

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО СТВОРЕННЯ ЛПОСОМАЛЬНИХ
БІОПРЕПАРАТІВ»**

Виконав: здобувач вищої освіти 2 курсу групи ПБтм22(1,6д)-01а
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Олексій КАЩЕНКО

Керівник: доцент закладу вищої освіти
кафедри біотехнології, к. фарм. н., с.н.с.
Наталія ДВІНСЬКИХ

Рецензент:
Начальник відділу фармацевтичної розробки ТОВ “БІОЛІК
ФАРМА”, к. фарм. н., с.н.с.
Олена НАЗАРОВА

АНОТАЦІЯ

В роботі досліджено тенденції застосування ліпосом для діагностики та терапії різних захворювань. Розглянуто будову та види ліпосом, наведено класифікації ліпосом, проаналізовано способи отримання та їх особливості, визначено шляхи удосконалення ліпосом. Зроблено аналіз особливостей отримання ліпосом різними способами, обговорені технологічні параметри процесів, наведено приклади отримання ліпосом. Виявлено перспективи створення нових та вдосконалення існуючих засобів з інкапсульованими в них ліками, а також перспективність ліпосомоподібних наноструктур з покращеними характеристиками доставки ліків, які мають потенціал їхнього більш широкого використання у медичній практиці. Робота складається з вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи – 66 стор., кількість таблиць 3, рисунків 19, джерел літератури 45, додатків 1.

Ключові слова: ліпосоми, фосфоліпіди, екструзія, обернена фаза, стабільність.

ANNOTATION

The work examines the trends in the use of liposomes for the diagnosis and therapy of various diseases. The structure and types of liposomes are considered, classifications of liposomes are given, methods of obtaining liposomal carriers and their features are analyzed, ways of improving liposomes are determined. An analysis of the features of obtaining liposomes by various methods was made, the technological parameters of the processes were discussed, and examples of obtaining liposomes were given. Prospects for creating new and improving existing drugs with drugs encapsulated in them were revealed, as well as the prospects of liposome-like nanostructures with improved drug delivery characteristics, which have the potential for their wider use in medical practice. The work consists of an introduction, three sections, a conclusion. Total volume of work 65, number of tables 3, figures 19, sources of literature 45, appendices 1.

Key words: liposomes, phospholipids, extrusion, reverse phase, stability.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Розділ 1 Огляд літератури.....	6
1.1 Ліпосоми – якісно нові лікарські форми препаратів	6
1.2 Будова та види ліпосом	8
1.3 Методи одержання ліпосом	16
1.4 Завантаження лікарського засобу в ліпосоми.....	24
1.5 Ліпосоми, удосконалені полімерами, або стелс-ліпосоми	24
1.6 Властивості ліпосом та механізми їх взаємодії з клітинами	25
1.7 Шляхи використання ліпосом в медицині	26
Висновок до I розділу	30
Розділ 2 Об’єкти та методи досліджень.....	32
2.1. Фосфоліпіди як сировина для отримання ліпосом	32
2.2. Полімерні матеріали для отримання ліпосом	36
Висновок до 2 розділу.....	39
Розділ 3 Експериментальна частина.....	40
3.1 Аналіз способів отримання ліпосом	40
3.2 Технологічні процеси отримання ліпосом	41
3.3 Аналіз складу та способів стабілізації ліпосом.....	46
3.4 Напрямки удосконалення ліпосомальних структур	52
Висновок до 3 розділу	59
Висновки.....	60
Список використаних джерел.....	61
Додаток. Публікації за темою роботи.....	67

ВСТУП

Актуальність теми. Ліпосоми являють собою невеликі самозамкнені сферичні структури з концентричним ліпідним бішаром, які інкапсулюють в центрі водну фазу. Вони були відкриті в 1965 році і з тих пір широко використовуються завдяки їх унікальній здатності інкапсулювати гідрофільні агенти (гідрофільні ліки, ДНК, РНК тощо) у внутрішньому водному ядрі та гідрофобні ліки всередині ліпідної частини шарів, що робить їх універсальними терапевтичними носіями. Вони нетоксичні, забезпечують захист речовини, що міститься в них, від контакту з біологічним середовищем. Крім того, вони можуть забезпечувати доставку вмісту ліпосом у клітину при злитті їх мембрани з клітинною. Також ліпосоми поступово вивільняють лікарську речовину, що збільшує її тривалість дії.

Переваги цих везикул як носіїв лікарських засобів очевидні: отримані з природних фосфоліпідів ліпосоми, на відміну від полімерних систем доставки повністю біосумісні та здатні до повної біодеградації, придатні для включення в них багатьох біомолекул, у тому числі ферментів, гормонів, вітамінів, антибіотиків, імуномодуляторів, цитостатиків, які є активними фармацевтичними інгредієнтами. Включені в ліпосоми лікарські речовини стають більш стійкими в організмі, оскільки ізольовані ліпідною мембраною від шкідливих впливів зовнішніх умов, зокрема, від руйнування в шлунково-кишковому тракті, і в свою чергу меншою мірою чинять загальнотоксичну дію на організм. Унікальною особливістю ліпосом є можливість доставки лікарських засобів до клітин, з якими вони взаємодіють, шляхом злиття або ендоцитозу. Модифікуючи мембрану ліпосом молекулами, що забезпечують «впізнавання» клітини або органу-мішені, можна здійснювати направлене транспортування лікарських засобів. Тому дослідження, спрямовані на розробку ліпосомальних лікарських засобів, є актуальними.

Метою дослідження є аналіз сучасних тенденцій у застосуванні ліпосом у медицині, шляхів маніпулювання фізико-хімічними

характеристиками ліпосом для створення за їх допомогою гнучких систем доставки ліків, здатних впливати на різні захворювання, вивчення особливостей утворення стабільних ліпосомальних систем.

Завдання дослідження:

- провести аналіз джерел літератури щодо перспектив застосування ліпосомальних форм лікарських засобів;
- визначити основні види ліпосомальних систем доставки ліків;
- проаналізувати методи одержання ліпосом з активним та пасивним способами завантаження;
- визначити шляхи удосконалення ліпосом;
- проаналізувати властивості ліпосом та механізми їх взаємодії з клітинами;
- визначити шляхи використання ліпосом в медицині.

Об'єкти дослідження: речовини природного та синтетичного походження, які використовують для отримання ліпосомальних частинок, удосконалення їх властивостей та підвищення стабільності.

Предметом дослідження є сучасні технології отримання ліпосом та ліпосомальних препаратів, інноваційні технологічні рішення при виробництві біотехнологічних продуктів у вигляді ліпосом.

Методи дослідження. Методи опрацювання інформації з наукових публікацій та інших джерел: скринінг даних щодо фундаментальних та прикладних наукових основ отримання та використання ліпосом для отримання практично цінних продуктів, в тому числі ЛЗ та їх порівняльний аналіз, систематизація.

Практичне значення отриманих результатів. Проведений у роботі аналіз сучасних тенденцій отримання та стабілізації ліпосом, завантаження їх лікарськими речовинами, може бути використаний при розробці промислових технологічних схем виробництва на вітчизняних підприємствах для отримання ліпосомальних та ліпосомоподібних лікарських препаратів останнього покоління.

Апробація результатів дослідження і публікації.

Результати досліджень опубліковані в матеріалах конференцій:

1. Двінських Н.В. Ліпосоми як перспективна система доставки біологічно активних речовин / Двінських Н.В., Хохленкова Н.В., Кащенко О.В. // Chemical and biopharmaceutical technologies: collection of scientific papers / by general ed. V. Bessarabov, V. Lubenets. - Tallinn: Nordic Sci Publisher, 2023. - P. 154-156. ISBN 978-9916-4-2232-8 (pdf)
2. Кащенко О.В. Шляхи стабілізації ліпосомальних систем / Кащенко О.В., наук. керівн. Двінських Н.В. // Youth Pharmacy Science: мат. IV Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (6-7 грудня 2023 р., м. Харків). – Харків: НФаУ, 2023. – С. 167-168.

Результати досліджень опубліковані в доповіді:

1. Кащенко О.В. Наук. керівн. Двінських Н.В. Шляхи стабілізації ліпосомальних систем. / Секційне засідання СНТ каф. біотехнології на IV Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Youth Pharmacy Science», 6-7 грудня 2023 р., НФаУ.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.

Робота складається з вступу, трьох розділів - огляду літератури, об'єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 66 стор., кількість таблиць 3, рисунків 19, джерел літератури 45, додатків 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Ліпосоми – якісно нові лікарські форми препаратів.

На рубежі ХХІ століття відмічено збільшення інформаційного та наукового інтересу до створення якісно нових лікарських форм (ЛФ) препаратів. Ціль таких розробок є оптимізація фармакотерапевтичних ефектів лікарських засобів (ЛЗ), підвищення їх безпеки та відповідність принципу цільового (таргетного) впливу, а також розширення способів клінічного застосування, в т.ч. завдяки створенню парентеральних форм традиційних пероральних препаратів.

Наряду із зазначеними факторами, отримання лінії лікарських форм препаратів на основі створених відомих активних фармацевтичних інгредієнтів представляє значний маркетинговий інтерес. [1]

Під час розробки нових типів ЛФ особливу увагу приділяють проблемам спрямованої доставки ліків, біодоступності та тривалості дії. Перспективним напрямом створення нових високоефективних ЛЗ є нанорозмірні системи доставки ліків (*drug delivery system*), в основі яких лежать наночастки різноманітної структури. Ці наночастки здатні забезпечувати спрямованість дії та підвищення біодоступності активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ).

Особливе місце у сучасних системах доставки ліків посідають ліпосоми (ЛС), що мають цілу низку переваг у порівнянні з іншими наночастками, а саме: неімуногенність, малотоксичність, легка біодеградація в організмі; за певних умов можуть зливатися з фосфоліпідами (ФЛ) клітинних мембран та доставляти свій вміст усередину клітин. [2]

Сьогодні ліпосоми отримали доказаний статус як системи доставки ліків, а ліпосомні препарати – як ефективні ЛЗ на основі наночасток. [3-5]

У середині 60-х років англійський вчений Алек Бенгхем, який досліджував роль фосфоліпідів у згортанні крові, вивчав структуру колоїдних дисперсій, що утворюються при набуханні фосфоліпідів у

надлишку води. На електронних мікрофотографіях він побачив багаточисленні частинки, схожі на мембранні структури клітин. Подальше дослідження показало, що неорганічні іони, присутні в розчині в момент набухання фосфоліпідів, включаються всередину цих частинок і утримуються там тривалий час, обмінюючись з іонами зовнішнього розчину з дуже малою швидкістю [3-6]. Було встановлено, що фосфоліпіди, які є основними компонентами клітинних мембран, здатні спонтанно утворювати у воді замкнуті мембранні оболонки. Ці оболонки захоплюють у себе частину навколишнього водного розчину, а фосфоліпідна мембрана, яка їх утворює, має властивості напівпроникного бар'єру, легко пропускає воду, але перешкоджає дифузії розчинених в ній речовин [1, 3-7]. З моменту відкриття везикул і доказів їх інкорпорууючої та стабілізуючої здатності у відношенні багатьох речовин, в тому числі і лікарських, пройшло понад 60 років.

Спочатку ліпосоми використовували тільки як моделі біологічних мембран. Далі було встановлено, що їх можна застосовувати як мікроконтейнери, які здатні доставляти різноманітні лікарські препарати в різні органи і тканини. У 1974 році Грегорі Грегоріадіс з Лондона запропонував помістити всередину цих везикул – ліпосом - лікарські препарати для їх транспортування в організмі. Саме це і відкрило нові перспективи застосування ліпосом в медицині як носіїв ліків. У ліпосоми можуть бути поміщені ферменти, гормони, вітаміни, антибіотики, цитостатики, циклічні нуклеотиди та інші. [5, 6].

Усі ці роки ліпосоми (від грец. *lipos* – жир і *soma* – тільце або частка) інтенсивно досліджуються та застосовуються в якості моделей мембран, транспортних контейнерів, а також реакційних систем у біохімії, фармації, імунології та біотехнології. Деякі ліпідні везикули отримали спеціальні назви, наприклад, «протеоліпосоми», «імуносоми», «наносоми», «віросоми» та ін. Останні використовують в якості штучних вакцин. Термін «фармакосоми» запропоновано для ліпосом з ковалентно сполученими

лікарськими речовинами, тобто з амфіфільними попередниками лікарських препаратів [3-7].

1.2 Будова та види ліпосом.

Ліпосоми можна визначити як мікроскопічні везикули сферичної форми, що складаються з однієї або кількох двошарових фосfolіпідних мембран. Фосfolіпіди, з яких утворюються ці мембрани є складними ефірами триатомного спирту гліцерину та жирних кислот із довгими вуглеводневими радикалами. У фосfolіпідів молекули складаються з гідрофільної полярної голови та двох гідрофобних неполярних хвостів. Наявність амфіфільної природи дозволяє ліпідам спонтанно утворювати у водному середовищі стабільні агрегати так, щоб хвости були захищені всередину, а гідрофільні голови виставлені назовні, у воду. Агрегати набувають різних форм, наприклад, циліндрів, кульок тощо. Ця властивість амфіфільних молекул одержала назву поліморфізму (рис. 1.1). [10-12].

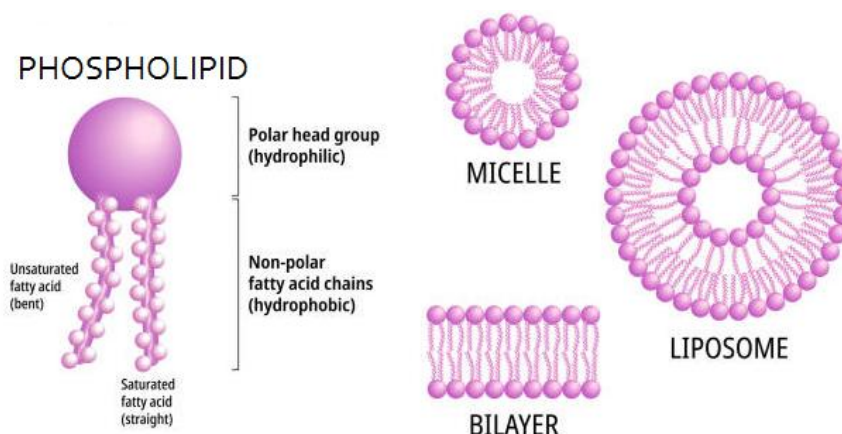


Рис. 1.1 – Поліморфні форми фосfolіпідних агрегатів.

Основною силою, яка стабілізує агрегати, що утворюються, є гідрофобні взаємодії, які впливають на упаковку молекул води навколо неполярних вуглеводнів. Остаточна форма, морфологія та фізико-хімічні властивості агрегатів, що утворюються молекулами фосfolіпідів, залежать від природи ліпиду, геометричних параметрів молекули ліпиду, концентрації у воді, температури, рН розчину та іонної сили розчину.

Найпростішими агрегатами є міцели, утворені ліпідними молекулами у водному середовищі при досягненні критичної концентрації і температури

міцелоутворення. Залежно від природи розчинника розрізняють міцели звичайного типу та «обернені» міцели. У звичайних міцелах гідрофільні головки ліпідних молекул звернені у бік розчинника, тоді як гідрофобні хвости утворюють гідрофобне ядро. У «обернених» міцелах, які утворюються у таких розчинниках, як бензол, гексан та ін., молекули ліпідів мають іншу орієнтацію: їх хвости спрямовані у бік розчинника, а полярні головки формують гідрофільну область міцели. [7, 10, 12]

Ліпідний бішар є термодинамічно найбільш вигідною формою асоціації тих ліпідів, молекули яких не здатні утворювати у воді агрегати міцелярного типу. Один або кілька концентричних ліпідних бішарів при замиканні утворюють ліпосоми (ліпідні везикули).

Ліпідний бішар відрізняється механічною міцністю та гнучкістю, незважаючи на малу молекулярну товщину (близько 4 нм). Компоненти ліпідного бішару в рідкокристалічному стані мають високу молекулярну рухливість, тому ліпідна мембрана в цілому поводить себе як рідка текуча фаза. [7, 10, 12]

Внутрішнє ядро ліпосом складається з гідрофільних частин фосфоліпідів, куди можуть бути включені гідрофільні молекули. З іншого боку, ліпофільні молекули мають тенденцію залишатися у ліпідній частині бислоя фосфоліпідів. Існує безліч типів ліпосом; відмінність між кожним типом в основному пов'язана з ліпідним складом структури ліпосоми, розміром і розмірами бульбашки, а також зарядом на поверхні ліпосоми.

Можливість упаковки молекул ліпиду в ліпосому, нормальну та «обернену» міцелу визначається геометричним параметром упаковки C_{pp} – співвідношенням розмірів полярної та неполярної частин ліпиду [8, 12]:

$$C_{pp} = \frac{V}{A_0 \times l_c}$$

де V – молекулярний об'єм гідрофобної області (хвостів) ліпиду, A_0 – площа поверхні гідрофільної головної групи ліпиду на межі розділу, l_c – максимальна довжина алкільного ланцюга (хвоста) ліпиду.

При збільшенні параметра упаковки C_{pp} структура агрегатів може змінюватися від сферичних міцел (А) до циліндричних міцел (В), моноламелярних везикул (С) та багатошарових мультіламелярних везикул (D). При більших значеннях параметра упаковки ліпіди будуть збиратися в «обернені» міцели (Е). Геометрію ліпідів у залежності від параметру упаковки показано на рис. 1.2.

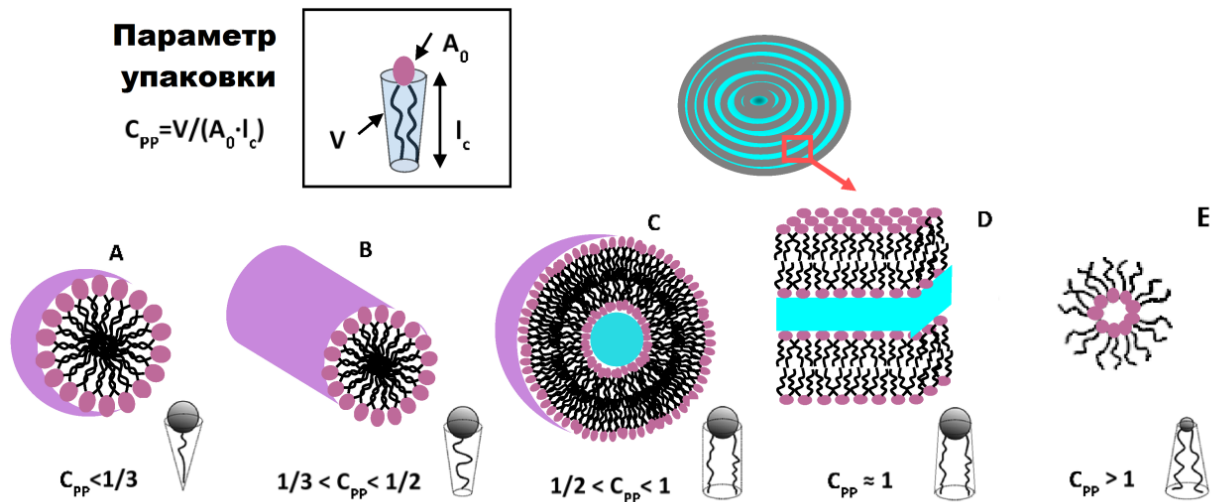


Рис. 1.2 - Геометрія ліпідів у залежності від параметру упаковки. [13]

Залежно від параметра упаковки ліпідів та умов середовища можливе існування різних фаз. На рис. 1.3 наведено схематичне зображення фаз водно-ліпідних систем залежно від збільшення концентрації ліпідів. Ламелярна рідкокристалічна фаза «Л» складається з бішарів, що поділяються шарами води, так що полярні групи ліпідів розташовуються на поверхні бішару і взаємодіють із водою, а вуглеводневі ланцюги орієнтовані вздовж нормалі до бішару. У гексагональній фазі («Г1», «Г2») ліпіди формують циліндричні структури з міцел, які розташовуються в гексагональній решітці. Гексагональна фаза «Г1» – нормальна, не інвертована. Гексагональна фаза «Г2» - «обернена», або інвертована, де полярні групи ліпідів звернені всередину циліндра. Гексагональна фаза зазвичай містить від 30 до 60 мас.% води, і, незважаючи на такий високий вміст води, фаза дуже в'язка. Для деяких систем може існувати ще більш в'язка фаза, ніж гексагональна, -

кубічна фаза («K1», «K2»), що складається з міцел упакованих за типом кубічних решіток. [10-14]

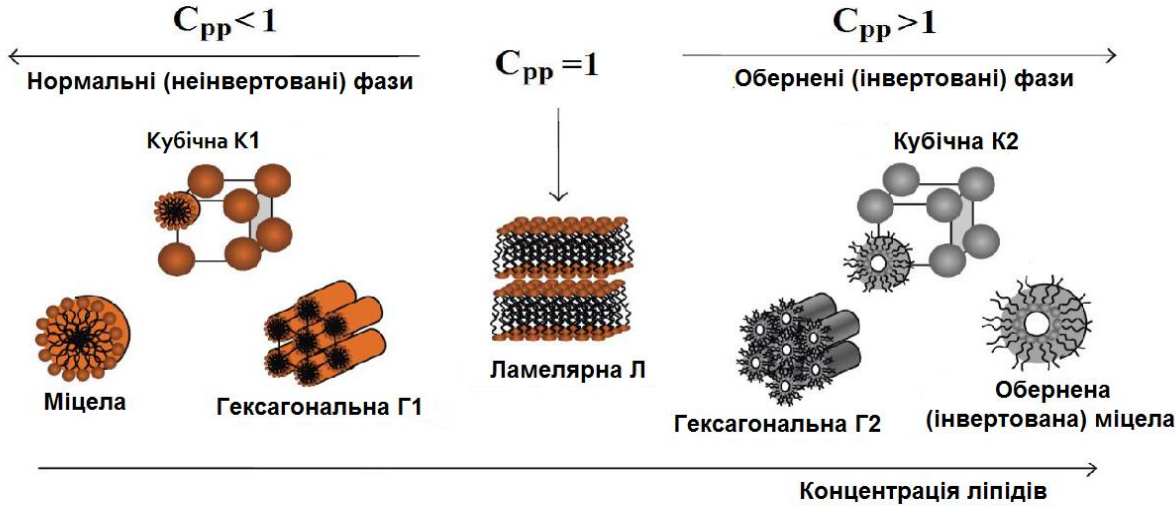


Рис. 1.3 – Схематичне подання зміни фаз водно-ліпідних систем зі збільшенням концентрації ліпідів.

Ліпосоми класифікують за розміром та структурою, методом одержання, складом компонентів і застосуванням (звичайні та спеціальні).

Класифікація ліпосом за розміром та структурою

Як розділяють ліпосоми за розміром та кількістю шарів, наведено на рис. 1.4.

Ліпосоми (везикули)						
одношарові UV				оліго- ламе- лярні	багато- шарові	мульти- везику- лярні
малі	середні	великі	гігантсь- кі	5 шарів	5-25 шарів	мульти- блокові
SUV	MUV	LUV	GUV	OLV	MLV	MVV
20-100 нм	100-150 нм	100-500 нм	> 1000 нм	100-1000 нм	>500 нм	> 1000 нм

Рис. 1.4 – Види ліпосом за кількістю шарів та розміром.

Кількість шарів ліпосом та їхній розмір обумовлює їх властивості, що урахується при створенні ліпосомальних ЛЗ.

Дрібні одношарові ліпосоми (SUV) відносно однорідні за розміром. Кожна ліпосома має тільки одну бішарову мембрану, що робить їх легкодоступними для водорозчинних молекул. Зважаючи на те, що товщина зовнішньої мембрани є постійною (близько 3–5 нм), а діаметр SUV невеликий, водний об'єм їх істотно зменшується зі зменшенням розміру, що призводить до зниження здатності захоплення БАР. Ці ліпосоми термодинамічно нестабільні і тому схильні до злиття одна з одною. Вони також не здатні інкапсулювати макромолекули.

Великі одношарові ліпосоми (LUV) також мають одну зовнішню мембрану, але здатні захоплювати велику кількість водної фази. Проте їхня незначна механічна міцність може легко призвести до розриву мембрани і втрати вмісту внутрішньої сфери. Низькою є і здатність їх до утримання водорозчинних компонентів.

Багатошарові ліпосоми (MLV) є наночастинками більш ніж із п'ятьма шарами. Оскільки їхні концентричні оболонки повільно руйнуються, MLV поступово вивільняють свій вміст. Значна кількість шарів забезпечує вищу здатність до утримання водорозчинних молекул порівняно з іншими типами ліпосом. Також вони мають високу здатність вловлювати ліпофільні лікарські засоби. Їх можна зберігати механічно протягом тривалого часу. Ці ліпосоми можуть бути корисними для націлювання на ретикулоендотеліальну систему (РЕС), а також швидко виводяться з організму РЕС. Однак об'єм захоплення менший, ніж у LUV, оскільки кількість фосфоліпідів, потрібних для утворення численних бішарів, більша.

Олігошарові ліпосоми (OLV) — частинки, що складаються з декількох десятків і навіть сотень шарів, вони, як правило, менші, ніж MLV із кількома шарами. OLV поєднують відносно великі об'єми захоплення і утримувальну здатність, що є важливим для мікроінкапсуляції. [9, 10, 15, 16, 20]

Класифікація ліпосом за складом та особливостями застосування для доставки лікарських речовин

За складом та способом доставки ліпосоми поділяють на [2, 9, 10, 15]:

- *звичайні ліпосоми.* Скорочена назва «CL». Вони є першим поколінням ліпосом і складаються з позитивно заряджених, негативно заряджених або незаряджених фосфоліпідів і холестерину. Ці ліпосоми призначені для поліпшення терапевтичного індексу ліків, наприклад, таких як доксорубіцин та амфотерицин, які у інкапсульованому в ліпосоми вигляді мають меншу токсичність і поліпшену доставку ліків. Але такі ліпосоми, хоча й мають клінічну ефективність, швидко виводяться з організму;
- *спеціальні ліпосоми.* Скорочена назва «RSVE». Вони мають ще назву «фузогенні ліпосоми» та складаються з інактивованого ультрафіолетом вірусу Сендай та звичайних ліпосом. Фузогенні ліпосоми ефективно і безпосередньо доставляють свій інкапсульований вміст у цитоплазму, використовуючи механізм злиття вірусу Сендай, тоді як звичайні ліпосоми поглинаються шляхом ендоцитозу фагоцитуючими клітинами РЕС, наприклад макрофагами та нейтрофілами. Таким чином, злиті ліпосоми є хорошим кандидатом як засіб доставки ліків до цитоплазми незалежним від ендоцитозу способом.
- *pH-чутливі ліпосоми.* Складаються з фосфоліпідів, фосфатидилетаноламіну або діолеїлфосфатидилетаноламіну. Коли ці ліпосоми стикаються зі зміною рН (зниженням), везикули дестабілізуються, тим самим вивільняючи їхній вміст. Вони є ідеальним транспортом для специфічної доставки протипухлинних препаратів, оскільки патологічні ракові тканини мають рН нижче за нормальний фізіологічний рівень;
- *катіонні ліпосоми.* Складаються з катіонних ліпідів, діолеїлфосфатидилетаноламіну. Оскільки вони містять позитивно заряджений фосфоліпід, то можуть бути пов'язані іонними взаємодіями з негативно зарядженими нуклеїновими кислотами, такими як мРНК, молекули дволанцюгової РНК. Ці ліпосоми вважаються ідеальними для доставки генів;

- *імуноліпосоми*. Скорочена назва «IL». Мають склад як у «CL» або «LCL» з додаванням моноклональних антитіл. Для їх створення антитіла або фрагменти антитіл зливаються з поверхнею ліпосом і можуть активно націлюватися на конкретну тканину через зв'язування зі специфічними для пухлинних клітин рецепторами. Ці ліпосоми можуть специфічно доставляти ліки до ракових клітин. Також вони демонструють перспективні результати в генній терапії для доставки ліків через гематоенцефалічний бар'єр;

- *довго циркулюючі ліпосоми*. Скорочена назва «LCL». Виготовляються з моносіалогангліозиду, поліетиленгліколю, похідних глюкуроніду тощо. Порівняно із звичайними ліпосомами, ці модифіковані ліпосоми не розпізнаються і не поглинаються спонтанно РЕС, тому період напіврозпаду їх у крові збільшується. Вони пасивно дифундують в пухлинні тканини і є корисними для візуалізації та терапії пухлин.

Види ліпосомальних систем доставки

Звичайні ліпосоми

Звичайні ліпосоми були першою групою ліпосом, яка була розроблена. Було виявлено, що в порівнянні з впливом препарату ці ліпосоми знижують летальність від кумульованих ліків та покращити доставку ліків до уражених тканин. Незважаючи на ці переваги, їх використання було утруднено, оскільки вони схильні до швидкого виведення з кровотоку; макрофаги печінки та селезінки, що становлять частину РЕС вродженої імунної системи, очищають опсонізовані ліпосоми. [4-6, 9]

Стерично стабілізовані ліпосоми

Для підвищення стабільності ліпосом у кровообігу були розроблені стерично стабілізовані ліпосоми, в яких ліпідні фрагменти кон'юговані з похідними гідрофільного полімеру поліетиленгліколю (ПЕГ). Було виявлено, що ПЕГ є найкращим вибором для створення стеричного бар'єру та підвищення ефективності інкапсульованих ліків. Ці модифіковані ліпосоми менш схильні до опсонізації *in vivo* і, таким чином, знижують розпізнавання та поглинання РЕС. У результаті препарати виводилися менше, тим самим

подовжуючи їх утримання та посилюючи накопичення в патологічних місцях. Крім того, стерично стабілізовані ліпосоми не показали значних побічних ефектів. Наприклад, при включенні доксорубіцину в пегільовані ліпосоми, неспецифічні взаємодії були зменшені. Крім того, поглинання та виведення РЕС пригнічується, що сприяє утриманню ліків. Доксорубіцин має тенденцію накопичуватися в пухлинній тканині, а не в неспецифічних нормальних тканинах. Пегільовані ліпосоми, що інкапсують доксорубіцин, були першим схваленим FDA нанопрепаратом, який використовувався для лікування різних типів раку, таких як пов'язана зі СНІДом саркома Капоші, рак яєчників, молочної залози та мозку [6, 9].

Ліпосоми, націлені на ліганди

Розподілу ЛЗ серед певних типів клітин або організмів, які експресують або надекспресують специфічні ліганди (наприклад, рецептори або молекули клітинної адгезії) в ураженій ділянці, значною мірою сприяють ліпосоми, націлені на ліганди. Антитіла, пептиди/білки та вуглеводи можуть бути лігандами, які можуть з'єднуватися з ліпосомами. Одним з найбільш універсальних лігандів, які можна приєднати до ліпосомальних поверхонь, є кон'югація антитіл, а саме моноклональних антитіл для створення імуноліпосом. Оскільки моноклональні антитіла мають два сайти зв'язування, мічені ліпосоми дуже стабільні і мають більш високу афінність зв'язування. Однак погана фармакокінетика та імуногенність обмежують ефективність імуноліпосом *in vivo*. В результаті розробляються нові покоління ліпосом для збільшення адресності ліпосом і, отже, доставки ліків. [4-6, 9]

Тераностичні ліпосоми

Для поєднання властивостей як стабілізованих LCL, так і специфічного зв'язування лігандів з імуноліпосомами були створені тераностичні ліпосоми, які значно покращують фармакокінетику імуноліпосом. Ці ліпосоми отримують шляхом поєднання спеціалізованих методів лікування та діагностичних можливостей в одному фармацевтичному агенті; тому вони

повинні бути дуже стабільними і мати конкретні таргетингові здібності і не повинні заважати іншим діагностичним та терапевтичним агентам у системі [4-6, 9].

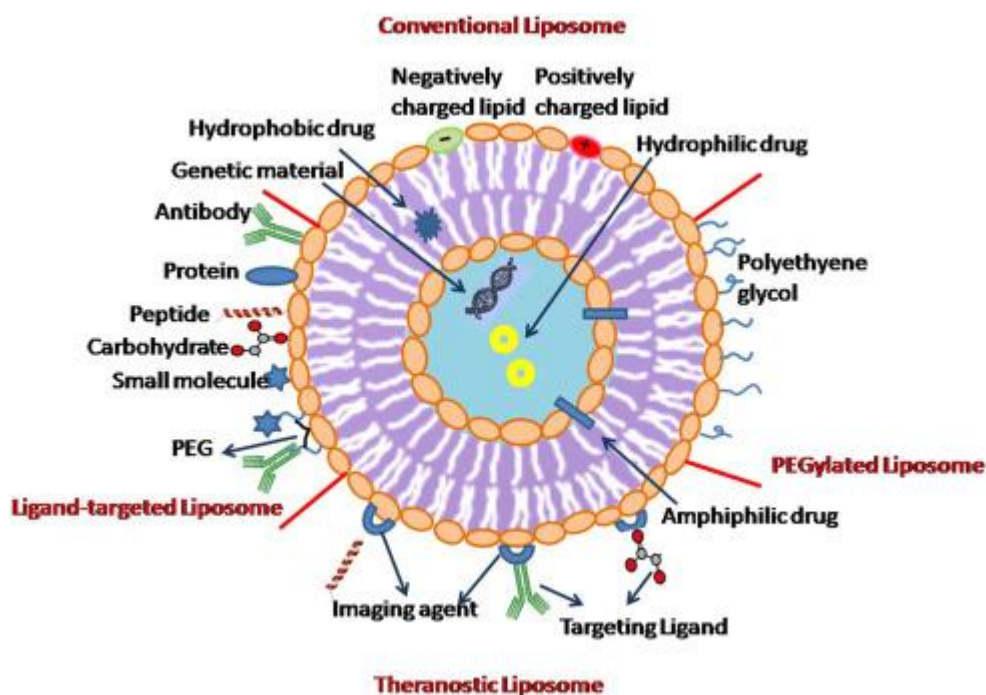


Рис. 1.5 - Схематичне зображення різних режимів ліпосомальних систем доставки ліків, що використовуються у терапевтичних цілях.

1.3. Методи одержання ліпосом.

У літературі описані різні методи одержання ліпосом. Це такі, які систематизовані на рис. 1.6. Нижче наведено аналіз цих методів.

Методи механічного диспергування

Метод гідратації ліпідної (тонкої) плівки або конвекційний метод.

Відноситься до методів пасивного навантаження. За цією методикою фосфоліпіди розчиняються в суміші органічних розчинників (зазвичай це суміші, що містять полярний розчинник, наприклад метанол) і при використанні роторного випарника відкладаються у вигляді тонкої плівки на стінках круглodonної колби. При додаванні водного буфера, що містить надлишкову кількість лікарської речовини, в плівці відбувається утворення багатошарових ліпідних везикул. Включення лікарської речовини в ліпосоми залежить від часу гідратації висушеної плівки та від умов перемішування реакційної маси. При гідратації при слабкому перемішуванні, в ліпосому

включається найбільша кількість водної фази за 20 годин. При інтенсивному струшуванні колби тривалість можна скоротити до 2 год. Невключену лікарську речовину відділяють центрифугуванням або гель-фільтрацією. [1, 7-10, 15, 20]

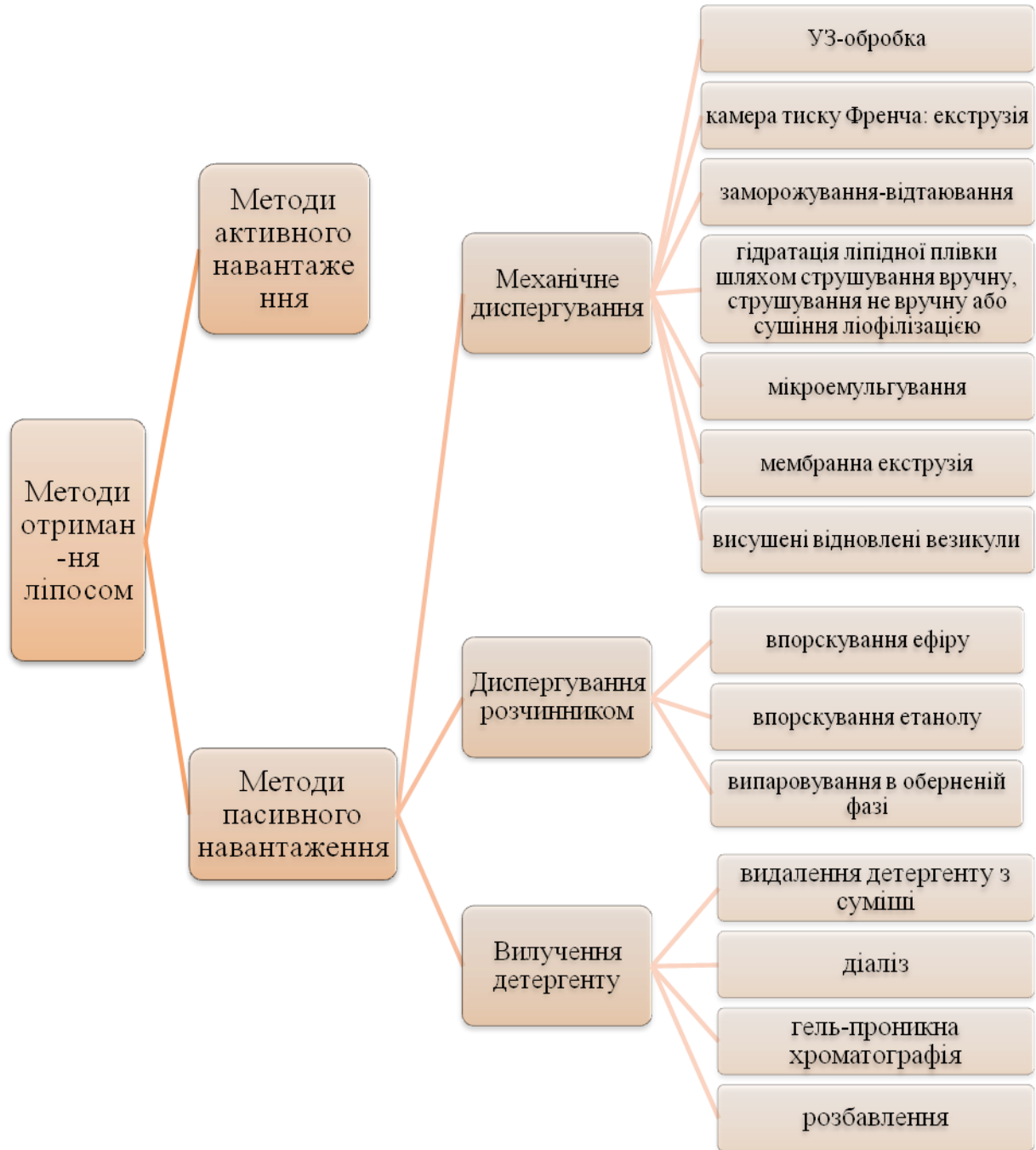


Рис. 1.6 – Методи отримання ліпосом.

Метод УЗ-обробки або озвучування.

Відноситься до методів пасивного навантаження. В його основі - отримання гомогенної дисперсії малих везикул, які здатні проникнути в

тканини організму. Багатошарові везикули, приготовлені конвекційним методом, піддаються звуковій обробці з використанням пульсуючих звукових хвиль високої частоти. В результаті такої обробки в суспензії утворюються одношарові везикули діаметром 15–50 нм.

Це найбільш широко використовуваний метод отримання ліпосом. Але він має цілий ряд недоліків:

- 1) денатурація або інактивація термочутливих речовин (наприклад, ДНК, деяких білків та ін.), які інкапсулюються;
- 2) окислення ненасичених зв'язків в ланцюгах залишків жирних кислот фосфоліпідів;
- 3) гідроліз фосфоліпідів з утворенням лізофосфоліпідів і вільних жирних кислот;
- 4) утворення везикул різного розміру (MLV наряду з SUV);
- 5) нестійкість везикул та їх схильність до зливання і, таким чином, укрупнення. [1, 7-10, 15, 20]

Метод високого тиску (екструзії)

Відноситься до методів пасивного навантаження. Багатошарові везикули MLV, приготовлені конвекційним методом, під високим тиском пропускають через мембрани з потрібним діаметром пор, матеріал яких сумісний з лікарськими речовинами. Перевагою екструзійного методу є отримання ліпосом з гомогенним розподілом за розміром.

Важливою особливістю методу є те, що для білків знижено загрозу руйнування, як це відбувається під дією ультразвуку. Цікавим є те, що везикули після преса, утримують захоплені розчини значно довше, ніж ліпосоми, утворені УЗ-обробкою або видаленням детергенту. Метод екструзії застосовний для отримання стабільних ліпосом з різним ліпідним складом.

Недоліки методу в тому, що висока температура досягається важко, а робочі об'єми порівняно малі (близько 50 мл як максимум). [1, 7-10, 15, 20]

Заморожування-відтавання ліпосом

Відноситься до методів пасивного навантаження. Ліпосоми швидко замерзають і повільно розморожуються. Короткочасна обробка ультразвуком розсіює агреговані матеріали LUV. Створення одношарових везикул відбувається в результаті злиття SUV в ході процесів заморожування та відтавання. Цей тип синтезу сильно інгібується збільшенням концентрації фосфоліпідів та збільшенням іонної сили середовища. Була одержана ефективність інкапсуляції від 20% до 30%.

Методи, засновані на заміні органічних розчинників водним середовищем

Ці методи формування ліпосом об'єднує те, що органічні розчинники, які змішуються або не змішуються з водою, заміщуються водним розчином. Така заміна здійснюється або шляхом введення ліпідів, що містять органічний розчин, у водну фазу — методи впорскування, або ступінчастим додаванням водної фази в органічну фазу. Методи емульгування, зокрема метод випаровування в оберненій фазі та метод подвійної емульсії, ґрунтуються на заміщенні розчинника, що не змішується з водою, водною фазою, унаслідок чого утворюються ліпосоми з високим рівнем інкапсуляції гідрофільних речовин, а також речовин, розчинних у ліпідній фазі. [10]

Впорскування ефіру (випаровування розчинника)

Відноситься до методів диспергування розчинником, пасивного навантаження. Розчин ліпідів, розчинених у діетиловому ефірі або суміші ефір-метанол, поступово вводять у водний розчин матеріалу, який треба інкапсулювати, при температурі від 55°C до 65°C при зниженому тиску. Подальше видалення ефіру у вакуумі призводить до створення ліпосом. Основними недоліками методу є гетерогенність популяції (від 70 до 200 нм) та вплив на інкапсульовані сполуки органічних розчинників за високої температури. [15]

Впорскування етанолу

Відноситься до методів диспергування розчинником, пасивного навантаження. Ліпідний розчин етанолу швидко вводять у величезний надлишок буфера. Ліпосоми MLV формуються одночасно. Недоліками

методу є те, що популяція неоднорідна (від 30 до 110 нм), ліпосоми дуже розбавлені, видалення всього етанолу утруднене, оскільки він утворює азеотроп з водою, а також ймовірність інактивації різних біологічно активних макромолекул у присутності навіть невеликих кількостей етанолу. [1, 10, 15]

Метод випаровування в оберненій фазі

Відноситься до методів диспергування розчинником, пасивного навантаження. Цей метод забезпечив прогрес у ліпосомальній технології, оскільки вперше дозволив отримати ліпосоми з високим співвідношенням водного простору до ліпідів і здатністю вловлювати великий відсоток водного матеріалу. Метод заснований на створенні обернених міцел. Ці інвертовані міцели формуються при обробці ультразвуком суміші забуференої водної фази, яка містить водорозчинні молекули, що підлягають інкапсуляції в ліпосоми, та органічної фази, в якій амфіфільні молекули солюбілізовані. Повільне видалення органічного розчинника призводить до переходу цих обернених міцел у в'язкий стан та форму гелю. У критичний момент цього процесу стан гелю руйнується, і деякі з обернених міцел рійнуються. Надлишок фосфоліпідів у навколишньому середовищі сприяє утворенню повного бішару навколо залишкових міцел, що призводить до створення ліпосом. Ліпосоми, отримані методом обернено-фазового випаровування, можуть бути виготовлені з численних ліпідних складів і мають співвідношення об'єму води до ліпідів, яке в чотири рази вище, ніж ліпосоми, що струшуються вручну, або багат шарові ліпосоми.

Коротко, спочатку емульсію «вода в маслі» формують шляхом короткочасної обробки ультразвуком двофазної системи, що містить фосфоліпіди в органічному розчиннику, такому як ізопропіловий ефір або діетиловий ефір, або суміш ізопропілового ефіру та хлороформу з водним буфером. Органічні розчинники відокремлюються при зниженому тиску, у результаті утворюється в'язкий гель. Ліпосоми набувають форми, коли залишковий розчинник відокремлюється під час безперервного роторного випаровування при зниженому тиску. За допомогою цього методу можна

отримати високу ефективність капсулювання до 65% серед з низькою іонною силою, наприклад 0,01 М NaCl. Цей метод використовувався для інкапсулювання малих, великих та макромолекул. Основним недоліком методу є контакт інкапсульованих матеріалів з органічними розчинниками та короткочасний вплив ультразвуку. Ці стани можуть призвести до розриву ниток ДНК або денатурації деяких білків. Модифікований метод обернено-фазового випаровування був представлений Хандою та ін., і основна перевага цього методу полягає в тому, що ліпосоми мали високу ефективність інкапсуляції (близько 80%). [1, 10, 15]

Методи вилучення детергентів

Діаліз

Детергенти за критичних концентраціях міцел використовують для солюбілізації ліпідів. У міру відділення детергенту міцели стають все більш збагаченими фосфоліпідами і, нарешті, об'єднуються, утворюючи LUV. Детергенти видаляють діалізом. Діаліз можна проводити в діалізних мішках, занурених у буфери, які не містять детергентів (рівноважний діаліз). [15]

Видалення детергенту з суміші

Детергенти (холат, алкілглікозид, Тритон X-100) видаляють з суміші, де утворилися міцели, методом абсорбції. Абсорбція розчинників досягається струшуванням змішаного розчину міцел з гранульованими адсорберами з органічного полістиролу, такими як кульки XAD-2 (SERVA Electrophoresis GmbH, Гейдельберг, Німеччина) та Bio-beads SM2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, США). Великою перевагою використання адсорберів є те, що вони можуть видаляти з суміші детергенти, які не повністю витрачені, з дуже низьким їхнім вмістом. [15]

Гель-проникна хроматографія

У цьому методі детергент збіднюється спеціальною хроматографією за фактором розміру. Для гель-фільтрації можна використовують Sephadex G-50, Sephadex G1 00 (Sigma-Aldrich, Міссурі, США), Sepharose 2B-6B та Sephacryl S200-S1000 (General Electric Company, Тегеран, Іран). Ліпосоми не

проникають у пори гранул, упакованих у колонку. Вони просочуються через бусинки наповнювача. При низьких швидкостях потоку відокремлення ліпосом від детергентних мономерів відбувається дуже добре. Набряклі полісахаридні кульки адсорбують значну кількість амфіфільних ліпідів; тому необхідна попередня обробка. Попередню обробку проводять шляхом попереднього насичення гель-фільтрації колонки ліпідами з використанням порожніх ліпосомальних суспензій. [15]

Розведення

При розведенні водного змішаного міцелярного розчину детергенту та фосфоліпідів буфером розмір міцел і полідисперсність істотно збільшуються, а в міру розведення системи за межею змішаних міцелярних фаз відбувається мимовільний перехід від полідисперсних міцел до везикул. [15]

Метод розчинення і видалення детергентів

У цьому методі в якості розчинника для ліпідів використовується детергент (нейонний, аніонний або катіонний сурфактант). Метод розчинення і видалення детергенту дозволяє отримати великі одношарові везикули. [10]

Комбіновані методи

Отримання ліпосом in situ або проліпосомний підхід

«*In situ*» розглядається як метод одержання ліпосом, які формуються безпосередньо перед клінічним використанням. У проліпосомах ліпіди структуровані у формі складених бішарів. Система не містить достатньої кількості води для формування ліпосом. Утворення ліпосом починається з простого додавання надлишку води. АФІ та фосфоліпіди готують у вигляді нерозфасованого розчину з подальшою фільтрацією для стерилізації, наповнення та ліофілізації. У випадку препарату «Мераст» використовуються три компоненти: активний інгредієнт – мурамілтрипептид-фосфатидилетаноламін (МТР-РЕ), пальмітоїлолеоїлфосфатидилхолін (РОРС) і диолеоїлфосфатидилхолін (DOPS) при певному співвідношенні (РОРС : DOPS – 7 : 3, МТР-РЕ : фосфоліпіди – 1 : 250). Продукт являє собою суху

ліпідну масу з пористою структурою, що забезпечує велику площу поверхні для контакту. Перед клінічним застосуванням у флакон додають 0,9% фізіологічний розчин і гідратують суху речовину з утворенням мультиламелярних ліпосом з розміром частинок 2,0–3,5 мкм. Температура фазового переходу фосфоліпідів у воді становить близько 5 °С, що дозволяє одержувати ліпосоми *in situ* при кімнатній температурі.

Сучасні проліпосомні технології дають змогу: уникнути енергоємних стадій, небажаних розчинників, застосовувати нескладне обладнання, зробити відносно нескладним інкапсулювання корисних речовин, проводити масштабування у промисловому виробництві. [1, 10]

Метод подвійної емульгації

Технологія DeroFoam дозволяє отримати мутивезикулярні ліпосоми (рис. 1.7).

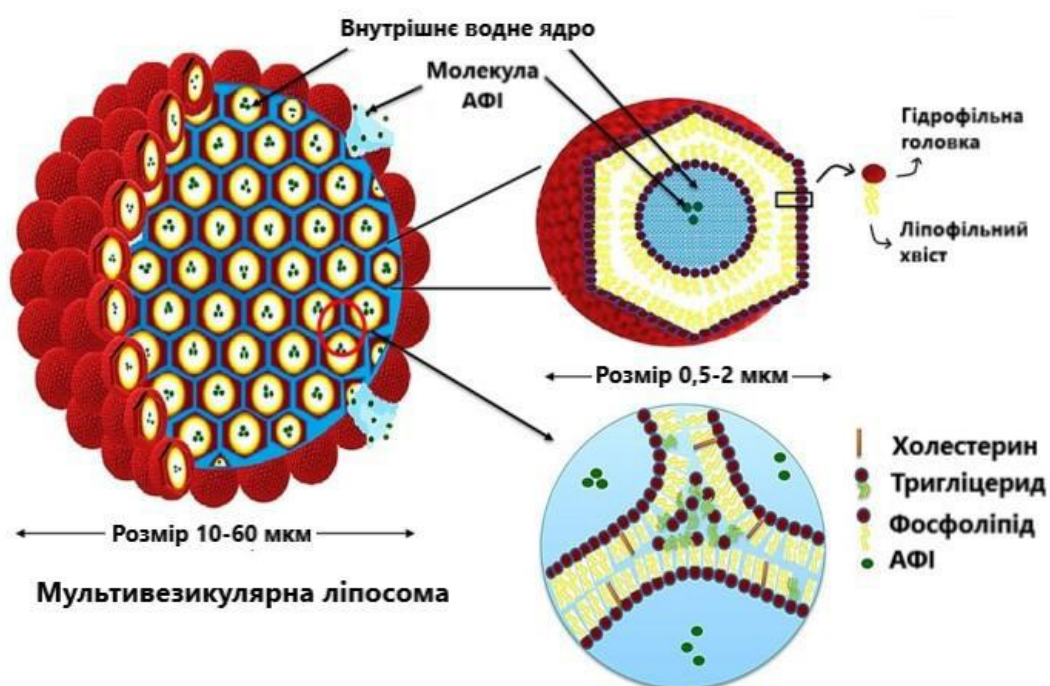


Рисунок 1.7 – Схема будови мутивезикулярних ліпосом [1].

Метод включає ряд послідовних операцій:

- формування емульсії «вода у маслі»;
- формування емульсії «вода у маслі у воді»;
- випарювання органічного розчинника за допомогою вакууму;

- ультрафільтрація для видалення неінкапсульованого в частинки АФІ, концентрування та заміна зовнішнього розчину

До складнощів при отриманні ліпосом методом DeroFoam відносять неможливість стерилізуючої фільтрації через мембрани з рейтингом пор 0,22 мкм через великий розмір ліпосом, тому всі технологічні етапи отримання мультивезикулярних ліпосом необхідно проводити в умовах асептики. [1]

1.4. Завантаження лікарського засобу в ліпосоми.

Завантаження лікарської речовини може бути досягнуто або пасивно (тобто лікарський засіб інкапсулюється під час утворення ліпосом,), або активно (тобто після утворення ліпосом), див. рис. 1.6. Гідрофобні препарати, наприклад, таксол, амфотерицин В або аннамідин, можуть бути безпосередньо захоплені в ліпосоми під час утворення везикул, а кількість їхнього поглинання та утримання регулюється взаємодією лікарської речовини та ліпідів. Часто можна досягти 100% ефективності уловлювання, але це залежить від розчинності препарату в ліпосомальній мембрані. Пасивна інкапсуляція водорозчинних ліків залежить від здатності ліпосом уловлювати водний буфер, що містить розчинені ліки під час утворення везикул. Ефективність уловлювання (зазвичай <30%) обмежена об'ємом захоплення ліпосомами, та розчинністю лікарської речовини. З іншого боку, водорозчинні ліки, які мають амінні групи, які здатні протонізуватися, можуть активно вловлюватися за допомогою градієнтів рН, що може призвести до ефективності уловлювання, що наближається до 100% [1, 10, 15, 20]

1.5. Ліпосоми, удосконалені полімерами, або стелс-ліпосоми.

Ліпосоми отримують в різних формах, включаючи звичайні ліпосоми, поліморфні (катіонні або фузогенні) ліпосоми і нереактивні (стерично стабілізовані, пегільовані або «приховані») ліпосоми.

Після введення *in vivo* звичайні ліпосоми адсорбують на своїй поверхні молекули опсонінів, в результаті чого відбувається розпізнавання та

захоплення ліпосом клітинами ретикуло-ендотеліальної системи та швидке видалення їх з кровоносного русла.

Для подолання цих труднощів та поліпшення використання ліпосом як ефективних наноносіїв для доставки ліків, запропоновано використання полімерів для посилення структури ліпосом та забезпечення ліпосом просторовим бар'єром. Гнучка структура полімерних молекул дозволяє використовувати відносно невелику їх кількість для створення непроникної просторової оболонки, яка й запобігає злипанню ліпосом, знижує взаємодію з опсонінами сироватки крові та збільшує час циркуляції ліпосом у кровоносному руслі. [3-6, 8-10, 15, 18, 20]

ПЕГ, на думку багатьох дослідників, є «золотим» стандартом для стеричної стабілізації ліпосом, але відмічено, що він також має недоліки. Відомі побічні реакції від ПЕГ - дерматологічна та анафілактична реакція, гіперчутливість. А також, метод активного завантаження, який застосовується при наповненні стабілізованих ПЕГ ліпосом, придатний лише для обмеженої кількості речовин.

Тому продовжується активний пошук інших полімерів для стеричної стабілізації та модифікації ліпосом.

1.6. Властивості ліпосом та механізми їх взаємодії з клітинами.

Особливості утворення ліпосомних структур, такі як самозбирання і утворення замкнутої мембранної оболонки або ліпідного бішару, визначають характерні властивості та поведінку ліпосом:

- ліпосоми зберігають структуру і цілісність при зовнішніх пошкоджуючих впливах;
- мембрана має здатність до самовідновлення структурних дефектів;
- ліпосоми мають високу пластичність внаслідок гнучкості та плинності ліпідного шару, вони змінюють розміри, форму зі зміною концентрації розчину, аж до дроблення на дрібніші структури – міцели;
- перспективною є висока терапевтична цінність ліпосом – здатність включати та утримувати лікарські речовини різної природи – від

неорганічних іонів, низькомолекулярних сполук до великих білків та нуклеїнових кислот. [1, 10, 17]

У роботах дослідників описані механізми взаємодії ліпосом з клітинною мембраною [1, 10, 17]:

- ліпосома може збільшити проникність мембрани за рахунок створення нових каналів;
- ліпосома може прикріпитися до клітинної мембрани, тобто адсорбуватись;
- клітина здатна поглинути ліпосому (цей процес «заковтування» називається ендоцитозом), тоді лікарська речовина, доставлена всередині ліпосоми, потрапляє безпосередньо в клітину;
- клітина та ліпосома можуть обмінюватися ліпідами, у цьому випадку відбувається злиття мембран клітини та ліпосоми, змінюються властивості клітинних мембран: електричний заряд, в'язкість, проникність тощо.

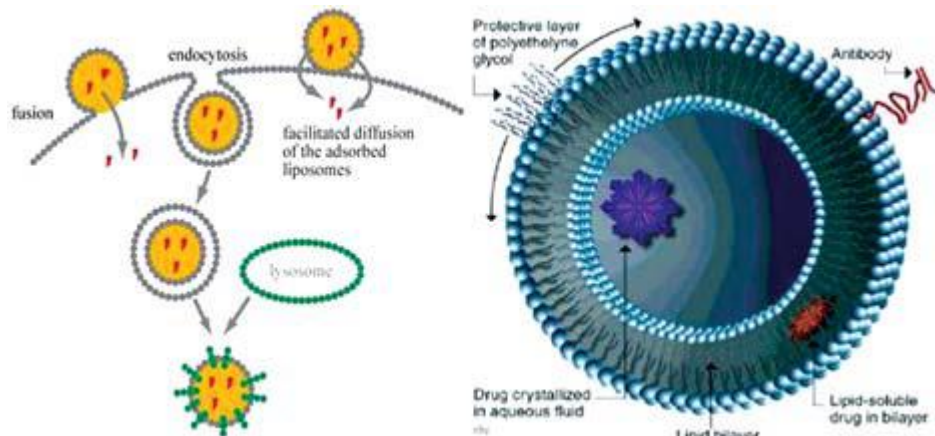


Рис. 1.6 - Схематичне зображення злиття ліпосоми з клітиною. [10]

Таким чином, завдяки ліпосомам з'являється новий спосіб спрямованої дії на клітину. [10, 17-19]

1.7. Шляхи використання ліпосом в медицині

Ліпосоми на даний час є тією *drug delivery system*, яка міцно увійшла до медицини. Відомо більше 50-ти оригінальних ЛЗ на основі ліпосом. Найважливішою перевагою ліпосом є зниження побічних

ефектів ліків, що мінімально взаємодіють зі здоровими органами або тканинами, що пояснює використання ліпосомальних форм для лікування широкого кола захворювань. [1, 5, 6]

Антибіотики у ліпосомальних формах

Серед сучасного спектру наноплатформ ліпосоми є одним із найбільш перспективних підходів до доставки антибіотиків. Останні вдосконалення ліпосомальних структур дозволили розробити такі способи доставки антибіотиків, які могли б виправити критичні проблеми в лікуванні інфекційних хворіб. Дослідження показали, що ліпосомальна інкапсуляція сприяє стабільності та безпечності антибіотиків, надаючи більш оптимальні фармакокінетичні та фармакодинамічні властивості за рахунок подовження часу циркуляції в кровообігу, уможливаючи специфічне націлювання на місця інфікування різними способами введення препарату: внутрішньовенно, трансдермально, орально, назально та шляхом інгаляції. [19]

Головною перевагою включення антибіотиків у ліпосоми є можливість регулювати вивільнення захопленого антибіотика. Ліпосоми можна сконструювати таким чином, що залежно від їх складу і наявності специфічних стимулюючих факторів, таких як рН або тепло, вони розпадатимуться і вивільнятимуть включені ліки запланованим контрольованим чином. Це може відбуватися безпосередньо в місці інфікування, без передчасного вивільнення під час циркуляції в крові або бути збереженим протягом певного часу, що дозволяє зменшити частоту дозування та, як наслідок, токсичність та негативний вплив антибіотиків на організм загалом.

Крім того, антибіотики, інкапсульовані в ліпосоми, змогли знешкодити бактерії завдяки стійкості до ферментативного гідролізу. Хоча ця стратегія була менш досліджена, Науккіо та інші продемонстрували, що інкапсуляція піперациліну в ліпосомах змогла захистити антибіотик проти гідролізу стафілококових β -лактамаз, таким чином зберігаючи свою антибактеріальну дію. Розробка інкапсульованих у ліпосомах антибіотиків зі специфічними

можливостями обходити ферментативний розпад є цікавою властивістю, яку слід особливо вивчати у боротьбі проти кишкових паличок, оскільки їх механізм резистентності найчастіше ферментативний. [19]

Отримані ліпосоми, що містять піразинамід та рифабутин. Повідомлення про ізоніазид і рифампін, інкапсульовані в стелс-ліпосоми, специфічні для легень, показали, що інкапсульовані в ліпосоми препарати в терапевтичних концентраціях і нижче були більш ефективні, ніж вільні препарати проти туберкульозу.[1, 5, 6, 19, 24]

Імуномодулятори у ліпосомальних формах

Бактеріальні, грибові, вірусні, паразитарні захворювання можна лікувати за допомогою ліпосом шляхом доставки імуномодуляторів до макрофагів. Ліпосоми, що містять цитокіни, такі як інтерферон (INF- γ), викликають реакцію інфекційних захворювань. Мікроорганізми, що зазнали фагоцитозу, вражають клітину-господаря, починають розмножуватися та виявляють стійкість до лікування протимікробними препаратами через менше проникнення або зниження внутрішньоклітинної активності. Доставка ліпосом через клітину може бути досягнута за рахунок фагоцитарної активності. Він також захищає організм від токсичності ліків. Пацієнти, які страждають на рак, діабет, СНІД, мають високу частоту зараження фатальними системними грибковими інфекціями, тому ліпосоми є ефективною системою доставки ліків для лікування таких пацієнтів. [20, 22]

Для вирішення проблеми терапії Covid-19 було висловлено припущення, що невеликий шматочок спайкового білка коронавірусу, введений людям у формі мРНК, може підвищити імунітет. Однак, мРНК виявилася надто вразливою, щоб вижити в організмі достатньо довго після ін'єкції для вироблення спайкового білка та імунної відповіді на нього.

Тоді було запропоновано використати ліпосоми для виготовлення вакцини на основі вірусів, які існували ще до коронавірусу. Такі вакцини створили компанії Pfizer/BioNTech і Moderna. Обидві вакцини складаються з компонентів, які підтримують стабільність ліпосом в крові та сприяють

імунній відповіді. Компоненти включають дистеароїл фосфатидилхолін (ліпід, який забезпечує ліпосомальний подвійний шар і, отже, основа ліпосомної ад'ювантності), холестерин (який сприяє стабільності ліпосомальної мембрани у крові), а також катіонний або іонізований ліпід, що сприяє покращенню ліпосомальної ад'ювантності.

В цих вакцинах мРНК, що кодує протеїновий шар коронавірусу, заключена у ліпосоми, які залишаються стабільними в циркулюючій крові доти, поки вони поглинаються фагоцитуючими клітинами організму шляхом ендоцитозу. В цитозолі буде відбуватися дестабілізація ендосомальної мембрани, після чого шляхом дифузії ліпідів з ендосомального моношару, зверненого до цитоплазми, мРНК буде витіснена з комплексу і вивільнена в цитозоль. Потім мРНК, у свою чергу, буде сприйматися як чужорідний білок, який сприятиме імунній відповіді на нього, яка вб'є або дезактивує вторгнення вірусу. Таким чином ліпосоми діють як імунологічний стимулятор імунної відповіді на чужорідний білок. [1, 5-7, 9, 22-25].

Ліпосоми як системи доставки білково-пептидних ліків

Системи доставки на основі ліпосом були досліджені на предмет їх застосування як системи пероральної доставки ліків, в тому числі для доставки терапевтичних білків і пептидів, головним чином для пероральної доставки гормону інсуліну. Переваги ліпосом при пероральній доставці інсуліну полягають, головним чином, у захисті від гідролізу ферментами шлунково-кишкового тракту, та у посиленні всмоктування гормону інсуліну в тонкому кишечнику. Захист інсуліну ліпосомами обумовлений тим фактом, що інсулін інкапсульований у внутрішній частині структури ліпосом і тому недоступний для гідролізу протеолітичними ферментами. Було продемонстровано, що активність ліпосом з інсуліном залежить від різних факторів, пов'язаних зі їхньою структурою, таких як ліпідні компоненти і заряд на поверхні ліпосом.

Стабільність ліпосом *in vivo* вважається проблемою при їх застосуванні як системи пероральної доставки, оскільки солі жовчних кислот у ШКТ можуть сольватувати ліпосоми, що призводить до їх розриву та вивільнення інкапсульованих терапевтичних молекул у ШКТ. Для підвищення стабільності ліпосом *in vivo* можна використовувати кілька стратегій, таких як покриття їх відповідним полімером або дегідратованих форм ліпосом. [3, 5-7, 9, 11, 19-22]

Ліпосоми з протипухлинними компонентами

Коли хіміотерапевтичні агенти інкапсульовані в ліпосоми, період напіввиведення препарату (і отже тривалість впливу препарату на пухлинні клітини) значно збільшується. Стелс-ліпосоми також можуть переважно екстравазуватися в ділянки, де судинна мережа негерметична (наприклад, ложа пухлини). Це дозволяє транспортувати частинки розміром до 300 нм з крові в ділянку пухлини і це разом із відсутністю належного лімфодренажу призводить до накопичення довгоциркулюючих ліпосом у пухлині.

Доксорубіцин у ліпосомах показав активність проти грибоподібного мікозу, гемангіосаркоми, злоякісної гістіоцитомі та лімфоми, а також проти сарком у місці.

Ліпосоми також використовують для доставки ліків, які надзвичайно токсичні при введенні у вільній (неінкапсульованій) формі. Наприклад, вільний цисплатин смертельний; проте, коли він інкапсульований у ліпосому, його можна безпечно вводити. [3, 5-7, 9, 11, 18-22]

Висновок до I розділу

В розділі розглянуто історію розвитку ліпосом на шляху їхнього застосування як якісно нових лікарських форм препаратів. Розглянуто будову ліпідних везикул та види ліпосом. Наведено класифікації ліпосом за розміром та структурою, за складом та особливостями застосування для доставки лікарських речовин. Визначено основні види ліпосомальних систем доставки ліків. Проаналізовано та структуровано методи одержання ліпосом пасивного навантаження: види механічного диспергування, методи, засновані на заміні

органічних розчинників водним середовищем, методи, в основі яких вилучення детергентів, та комбіновані методи. Проаналізовано активні та пасивні способи завантаження лікарського засобу в ліпосоми. Виявлено переваги та недоліки ліпосомальних форм ліків щодо їх отримання та застосування. Визначені шляхи удосконалення ліпосом полімерами. Також проаналізовано властивості ліпосом та механізми їх взаємодії з клітинами. Наведено відомі та перспективні шляхи використання ліпосом в медицині.

Виявлено, що використання технологій отримання ліпосомальних форм лікарських засобів є перспективним підходом до забезпечення ефективної терапії багатьох захворювань.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Фосфоліпіди як сировина для отримання ліпосом.

Основним компонентом ліпосом є складні ліпіди, що містять залишок фосфорної кислоти – фосфоліпіди (ФЛ).

Існує декілька груп фосфоліпідів, які можна використовувати для приготування ліпосом, а саме: фосфоліпіди з природної сировини, модифіковані з природної сировини, напівсинтетичні, синтетичні, з натуральними «голівками».

Природні фосфоліпіди, застосовувані у виготовленні ліпосом:

- фосфатидилхолін (PC);
- фосфатидилетаноламін (PE);
- фосфатидилсерін (PS).

Серед синтетичних використовують:

- діолеоїлфосфатидилхолін (DOPC);
- дистеароїлфосфатидилхолін (DSPC);
- діолеоїлфосфатидилетаноламін (DOPE);
- дистеароїлфосфатидилетаноламін (DSPE).

На сучасному етапі найбільш оптимальним є використання у виробництві ліпосомальних препаратів природних фосфоліпідів (із бобів сої, льону, ріпаку, кукурудзи, соняшнику, ліщини, жовтків курячих яєць, молоків лососевих риб), оскільки введення ліпосом, створених на основі природної сировини лецитину або фосфатидилхоліну — ефіру фосфорної кислоти і жирних кислот не пов'язано з ризиком розвитку токсичних ефектів, імуногенності та алергічних реакцій. Окрім того, відсутні обмеження на застосування природного лецитину у виробництві харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів як у Європейському Союзі, так і в інструкціях Управління з контролю за якістю харчових продуктів, медикаментів і косметичних засобів FDA США . [6-10]

Спочатку термін «лецитин» вживали щодо ліпідів, які одержували з яєчного жовтка. Згодом його почали використовувати як синонім конкретного фосфоліпиду — фосфатидилхоліну (ФХ), який є головним компонентом фракції фосфатидів яєчного жовтка і бобів сої. У деяких медичних виданнях термін «лецитин» означає 1,2-діацил-гліцеро-3-фосфатидилхолін (L-а-лецитин). На противагу такому визначенню, у промисловості (зокрема, у технології виготовлення ліків та харчових добавок) і в торгівлі термін «лецитин» застосовують для визначення суміші нейтральних ліпідів (тригліцеридів, невеликої кількості «вільних» жирних кислот і стеролів), полярних ліпідів (фосфо- і гліколіпідів) та вуглеводів.

Лецитин (фосфатидилхолін, ФХ)

Фосфоліпід лецитин може бути похідним як рослинної сировини, наприклад, сої, так і тваринної - виділеної з яєчного жовтка. Подібність структурної організації таких ФЛ з фосфоліпідами людини зумовлює їх здатність вбудовуватися в клітинні мембрани та попереджати процеси порушення їхньої цілісності [1-3, 9].

Вміст ФХ у соєвих бобах — основному джерелі його виробництва з рослинної сировини — становить не більше 22–35,5% від загальної кількості фосфоліпідів, тимчасом як у жовтках курячих яєць — близько 72%. Це потребує для одержання рівних кількостей РС значно більше рослинної сировини, ніж курячих яєць.

Останнім часом увагу дослідників звернено на технологію лецитину і РС соняшнику [10]. Це зумовлено тим, що вміст фосфоліпідів у його насінні практично не відрізняється від бобів сої, проте кількість поліненасичених жирних кислот більша, і виділення фосфоліпідів відбувається за м'якої температурної обробки.

Порівняльні характеристики лецитину із соняшнику і сої показали, що за основними показниками вони ідентичні, а за деякими (вміст тригліцеридів та вільних жирних кислот) лецитин із соняшнику перевершує соєвий. [10]

Приклади виробників та торговельних назв для лецитину:

- Ліпоїд S100 (соєвий) «AVANTI Polar Lipids», США,
- соєвий «Ataman Kimya», Туреччина,
- Lipoid E PC S (ФХ яєчний) «Lipoid GmbH», Німеччина,
- PC 80 (ФХ соєвий) «Orison Chemicals Limited», Китай.

Хімічну структуру лецитину наведено на рис. 2.1. Для отримання ліпосом використовують цей ліпід очищеним. Він складається в основному з фосфатидилхоліну (98,1%) та лізофосфатидилхоліну (0,7%), має молекулярну масу 758,1 г/моль.

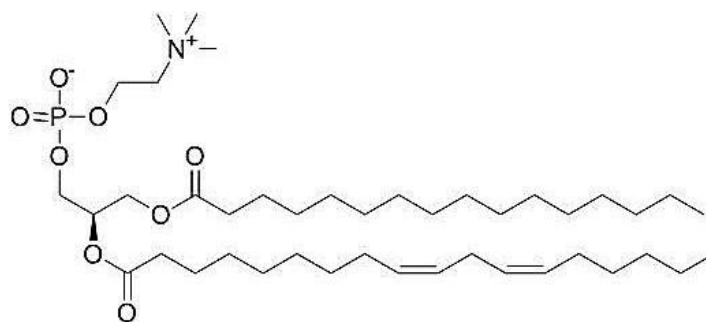


Рис. 2.1 – Хімічна структура лецитину (фосфатидилхоліну).

На рис. 2.2 зображено фазову діаграму системи яєчний лецитин (фосфатидилхолін) – вода.

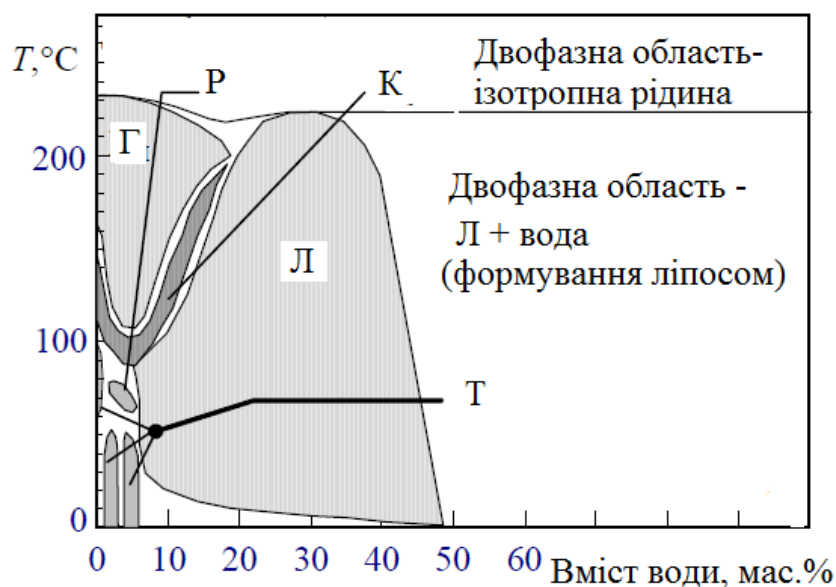


Рис. 2.2 – Діаграма залежності фаз водно-фосфоліпідної системи від температури та концентрації. [8]

Як можна побачити, фазові стани у зразку лецитин-вода відрізняються залежно від величин температури та концентрації. Літерою «Т» позначені

області, які відповідають твердій фазі лецитину. Вони відповідають зовсім малому вмісту води в суміші та низьким температурам. Області, помічені «Р», «Г» та «К» відносяться до випадку, коли вміст води малий (близько 10%), але температура підвищена, і називаються ромбедричною, гексагональною та кубічною рідкокристалічними мезофазами відповідно.

Область «Л» – це ламелярна рідкокристалічна мезофаза, утворена паралельно розташованими бімолекулярними шарами. При кімнатній температурі в цій фазі знаходяться зразки з концентрацією лецитину від 7 до 35 % і з вмістом води 9–45 %, і цей стан фази (в герметичних контейнерах) зберігається до 220-240°C. Якщо вміст води вище 45 %, то мезофаза «Л» розшаровується на «Л» та водний розчин.

Ця двофазна область - область формування ліпосом (везикул). Саме ця область цікава з точки зору технологій отримання ліпосом і тому для приготування їх вміст соєвого лецитину (ФХ) у воді, як правило, становить 50 мас.%. [8].

У порівнянні з іншими ліпідами фосфатидилхолін характеризується вищим рівнем стабільності та стійкості, а ще з легкістю сформує стійкі везикули, є природним антиоксидантом, підвищує пластичність мембран клітин. [19].

Холестерин

Холестерин – найпоширеніша молекула плазматичної мембрани, що має молекулярну масу 386,6 г/моль. Одна з найбільш відомих властивостей холестерину – це здатність стабілізувати рідкокристалічну впорядковану фазу «Л» [6, 8, 9]. Дана фаза має властивості рідини, оскільки молекули мають властиву рідини високу рухливість у площині мембрани, і в той же час зберігається високий рівень упорядкованості ланцюгів ліпідів. Холестерин одночасно перешкоджає переходу ліпідів у тверду фазу та збільшує упорядкованість ланцюгів, роблячи досліджувану систему більш стабільною, збільшуючи її товщину та зменшуючи флуктуацію рухливості молекул.

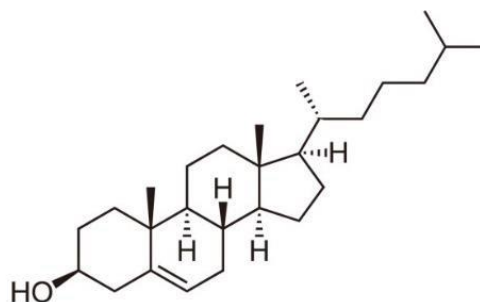


Рис. 2.3 – Хімічна структура холестерину.

Деякі ліпіди можуть бути залучені для модифікації амфіфільних агрегацій, що зумовлює зміну властивостей мембрани ліпосом. Так, холестерол підвищує жорсткість і зменшує проникність ліпідних бішарів, а лізофосфатидилхолін сприяє здатності ліпосом до проникнення.

Дипальмітоїлфосфатидилгліцерол (ДПФГ)

Аніонний ФЛ.

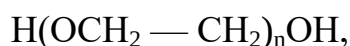
Відноситься до фосфоліпідів, що не утворюють ліпідних сфер, зазвичай використовують для модифікації заряду ліпосом.

Фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидні кислоти та фосфатидилгліцерол сприяють електростатичному відштовхуванню, запобігаючи агрегації або злипанню ліпосом. [10]

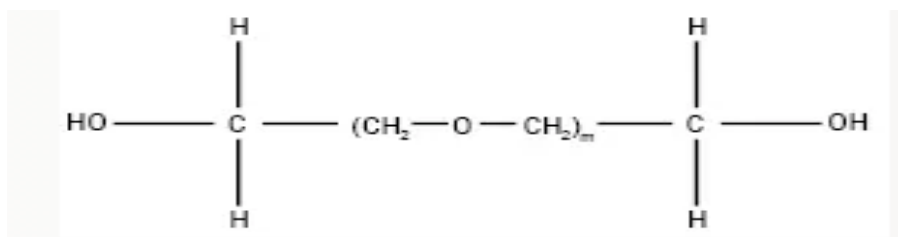
2.2 Полімерні матеріали для отримання ліпосом.

ПЕГ (поліетиленгліколь)

ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЬ (ПЕГ), макрогол, Polyethylene glycol (NSPNF), Macrogols (BP), Macrogola (Ph Eur), Macrogol 400, 1500, 4000, 6000, 20000 (JP); хімічна назва α -Hydro- ω -hydroxypoly(oxy-1,2ethanediyl) (в CAS реєстрі № 25322–68–3); син.: Carbowax, Lipoxol, Litrol E, polyoxyethylene glycol — загальна назва поліконденсованих полімерів етиленгліколю або полімеризованих полімерів окису етилену і води, представлених емпіричною формулою $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$, де m — середнє число оксіетиленових груп. Відповідно загальна формула ПЕГ:



Структурна формула:



Полімери окису етилену є водорозчинними матеріалами, молекулярна маса яких може досягати значень 10^6 . Полімери з молекулярною масою до 4×10^4 прийнято називати полі етиленгліколями (ПЕГ), а більш високомолекулярні – поліетиленоксидами (ПЕО). Залежно від ММ полімери окису етилену можуть бути безбарвними рідинами, воскоподібними або твердими матеріалами. [42]

Полімери окису етилену розчиняються у багатьох органічних розчинниках (бензолі, чотирехлористому вуглеці, хлороформі, диметилформаміді, ацетонітрилі) і добре розчиняються у воді, причому здатність до розчинення закономірно знижується зі збільшенням молекулярної маси.

У водних розчинах ПЕГ є типовим неіонним полімером, для якого характерна здатність до утворення різноманітних комплексів з деякими речовинами полімерної та неpolімерної природи. Полімери з мол. м. між 200 і 700 є в'язкими рідинами, а з мол. м. >1000 — воскоподібними твердими речовинами.

Наявність у ПЕГ двох кінцевих гідроксильних груп дозволяє створювати макромолекули як розгалуженої, так і лінійної структури. Можливе отримання зшитих форм ПЕГ, що утворюють у воді гідрогелі [42-44], а також синтез ПЕГ з різними функціональними групами за рахунок модифікації кінцевих гідроксильних груп. Таким чином, завдяки структурі ПЕГ можливе отримання і гетерофункціональних похідних.

ПЕГ є біосумісним полімером з дуже низькою імуногенністю, антигенністю та відсутністю токсичності. Він швидко та без структурних змін виводиться *in vivo*. Так, при $M \sim 2 \times 10^4$ ПЕГ переважно видаляється із

сечею, а при більшій молекулярній масі виводиться разом із сечею та калом.
[43]

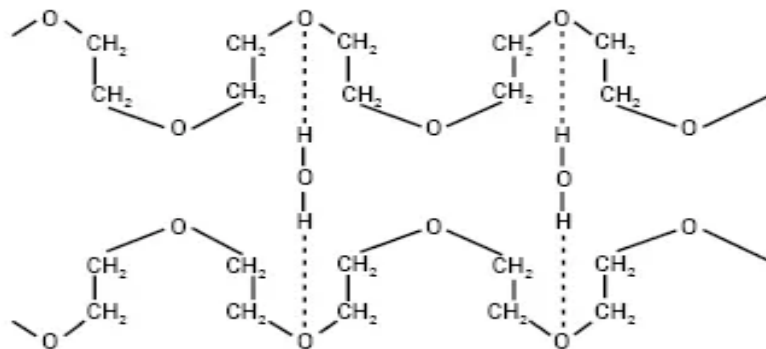


Рис. 2.5. «Зшивання» макромолекул ПЕГ за допомогою водневих зв'язків.

Деякі властивості ПЕГ та ПЕО наведені в таблиці на рис. 2.6.

Таблиця. Властивості деяких поліетиленгліколів

Середня мол. м.	Середній ступінь полімеризації (n)	Межі можли- вих відхилень мол. м.	Розчинність у								В'язкість, спз	Температура твердіння (°C)	Щільність, г/см³ (25°C)	T _{max} (°C)	T _m (°C)	n _D ²⁰	рН 5% розчину
			воді	метанолі	спирті (95%)	ацетоні	ефірі	гліцерині	гліколях	жирній олії							
300	6,4	285–315	л.р.	р	р	р	–	р	р	–	80–105	–15 до –8	1,11–1,14	185	–	1,463	–
400	9	380–420	л.р.	р	р	р	–	р	р	–	105–130	4–8		2,38	–	1,465	4,0–7,0
1500	34	1400–1600	л.р.	р	р	р	р	–	–	п.н.р.	29–34*	44–48	1,15–1,24	–	40–48	–	4,0–7,0
4000	80	3900–4500	л.р.	р	р	р	–	–	–	п.н.р.	90–120*	53–56		–	50–58	–	4,0–7,5
6000	185	6000–7500	л.р.	р	р	р	пнр	–	–	п.н.р.	700–900*	60–63		–	55–73	–	4,0–7,5

Примітка: л.р. – легкорозчинний; р – розчинний; п.н.р. – практично нерозчинний; * – в'язкість 50% водного розчину.

Рис. 2.6 – Властивості поліетиленоксидів. [42]

Плюроніки (полоксомери)

Плюроніки (полоксомери) - водорозчинні неіоногенні блок-сополімери, що складаються з ланок поліоксиетилену (ПЕО) та пропіленоксиду (ППО). Як приклад на рис. 2.7 наведена структурна формула плюроніка F127.

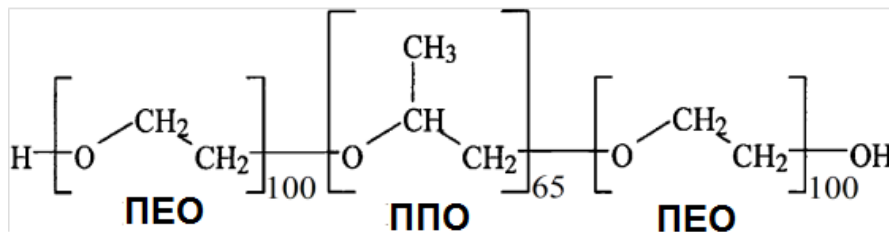


Рис. 2.7 - Структурна формула плюроніка F127.

Плюроніки мають нижчу токсичність і кращу сумісність із лікарськими препаратами. Плюронік F-127 схвалений для використання як допоміжний компонент у пероральних та офтальмологічних розчинах, пародонтальних

гелях. Пліуроніки у водному розчині виявляють амфідільний характер – ланки ПЕО розчиняються у воді (гідрофільні), а ППО – нерозчинні (гідрофобні). Пліуроникам притаманні такі загальні властивості, як мала гігроскопічність та хімічна стійкість до впливу кислот та лугів [32- 33].

У водних розчинах пліуроніки, у певному діапазоні концентрацій та температур, утворюють сферичні міцели. Ядро таких міцел складається з гідрофобних блоків ППО, а корона - гідрофільних блоків ПЕО (рис. 2.8).

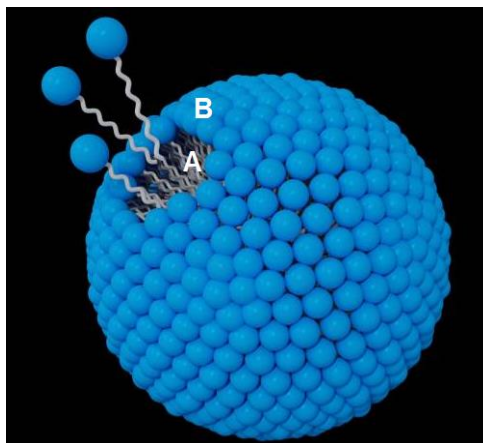


Рис. 2.8 – Структура міцели. А – ядро, В – корона. <http://surl.li/ouyukl>

Залежно від температури та концентрації водні розчини пліуроніка F-127 можуть утворювати різні просторові структури – від міцелярних до сітчастих. Утворення міцел відбувається, коли концентрація і температура піднімаються вище критичної концентрації міцелоутворення (CGC) і критичної температури міцело утворення (CGT). Подальше підвищення вище CGC та CGT призводить до фізичного переплетення міцелярних структур та упаковки міцел у гелеподібний стан.

Висновок до 2 розділу:

Були розглянуті речовини природного та синтетичного походження, які використовують для отримання ліпосомальних частинок, удосконалення їх властивостей та підвищення стабільності.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Аналіз способів отримання ліпосом.

Кожен із способів отримання ліпосом, які описано в розділі 1.3, має свої особливості.

Методом озвучування отримують з великих багатоламелярних або гігантських одношарових ліпосом, отриманих конвекційним методом, одношарові везикули діаметром 15-50 нм. Однак, цей метод не підходить для термочутливих речовин, як ДНК, білки тощо, які включають в ліпосоми, а також може призводити до окислення та гідролізу фосфоліпідів.

Методом високого тиску отримують одношарові везикули, але лише у невеликій кількості. Для отримання великої кількості таких ліпосом використовують метод розчинення та видалення детергенту. Методом випаровування та обернення фаз отримують великі одношарові везикули.

Інкапсуляція АФІ в ліпосоми методом ліпідної плівки дозволяє отримувати лікарські препарати переважно з ліпофільними субстанціями. Цей метод у ряді випадків можна використовувати для гідрофільних речовин, однак, якщо для ліпофільних АФІ інкапсуляція в ліпосоми становить не менше 85–90%, то для гідрофільних – не більше 30–50%.

Порівняно з везикулами, отриманими методом гідратації тонкої плівки з наступною звуковою обробкою, ліпосоми, отримані методом випаровування з оберненням фаз, мають більший об'єм захопленої водної фази та більшу ефективність інкапсуляції гідрофільних ліків. Але також останній метод має недолік – можливість денатурації деяких білків або розрив ланцюгів ДНК матеріалу, який підлягає інкапсуляції, в процесі механічної обробки.

Відомі дані, що ультразвукова обробка фосфоліпідних сумішей різного складу при частоті 22 кГц протягом 10–45 хвилин та температурі 25 ± 5 °C супроводжується збільшенням індексу окисленості в 1,5–2 рази. [1]

Прес Френча спочатку було створено для руйнування клітин за більш прийнятних умов порівняно з ультразвуковими методами, оскільки ліпіди, як і протеїни або інші чутливі сполуки, могли розкладатися під дією ультразвуку. Цю систему зазвичай використовують для об'ємів від 1 до 40 мл і тому вона не придатна для масштабного виробництва.

При застосуванні методу розчинення і видалення детергента він повинен мати високу критичну концентрацію міцелоутворення, для того щоб його можна було легко видалити діалізом або колонковою хроматографією. Розчинення ліпідів здійснюється у водному розчині детергенту і білків, які підлягають інкапсуляції. Утворення одномоembrанних везикул діаметром 80–200 нм відбувається при видаленні детергенту із суміші. Цей метод найбільш застосовний для інкапсуляції білків біомедичного призначення. [10]

3.2. Технологічні процеси отримання ліпосом.

Оскільки ЛС особливо чутливі до зміни технологічного процесу та масштабування, необхідно чітко ідентифікувати та оцінити критичні виробничі параметри (наприклад, метод інкапсуляції, температуру, розмір часток, заряд та ін.). Тому при фармацевтичній розробці ЛС-ЛЗ слід приділяти особливу увагу детальній розробці способу отримання ЛС та методу інкапсуляції АФІ.

Одержання ліпідної плівки проводять при постійному перемішуванні розчину ліпідів в органічному розчиннику за температури 37–43 °С. При використанні ліпофільного АФІ його розчиняють у відповідному органічному розчиннику та змішують з розчином ліпідів. [1]

В такий спосіб отримують ліпосомальні ЛЗ в роботах [2, 21, 28, 35, 36, 38-40]

Ряд авторів, включаючи і авторів цих робіт, пропонують комбіноване використання методів отримання ліпосом. Наприклад, при отриманні ліпосом спочатку проводять ультразвукову обробку при 22 кГц протягом 3–5 хвилин, а потім заморожування в рідкому азоті, з наступним відтаюванням при кімнатній температурі, після чого процес повторюють 3–6 разів [1], або

поєднання методу гідратації тонкої плівки з подальшим заморожуванням-таненням та центрифугуванням [38], або поєднання методу гідратації тонкої плівки з подальшим озвучуванням [35], або поєднання методу гідратації тонкої плівки та екструзії при високому тиску [2, 21, 28, 39, 40].

Найбільш часто використовуваний тиск в методі екструзії – 5 МПа, але при низькій концентрації ліпідів можлива також екструзія при низьких тисках (≈ 1 МПа). За допомогою екструзійного методу можна отримати лише невелику кількість ліпосом. Для забезпечення найбільш високого виходу продукту запропоновано метод безперервної екструзії під високим тиском до 10,5 МПа.

Проте промислову стратегію масштабування, засновану на цій техніці, було реалізовано в процесі мікрофлюїдизації. Починаючи з об'єму від 50 мл і більше для руйнування багат шарових ліпосомальних систем застосовують високий тиск. Обладнання працює в діапазоні тиску 0,2–20 МПа із системою нагрівання та охолодження і під контролем температури зразка під час обробки. Ліпосомальна суспензія проходить через отвори різних розмірів кілька разів (до тисячі проходів). Під час цього процесу ліпосоми утворюються в діапазоні від 50 до 100 нм. Цей метод підходить для широкомасштабного промислового виробництва стерильних ліпосом. [10]

Отримання проліпосом також має технологічні особливості, в залежності від бажаного типу: один — із ненасиченими фосфоліпідами, які перебувають у рідкокристалічній фазі вже за кімнатної температури, інший — з гідрогенізованими фосфоліпідами у стані гелю. Оскільки ліпосоми можуть бути утворені тільки в рідкокристалічній фазі, формування їх із використанням гідрогенізованих фосфоліпідів виконують за підвищеної температури. [1, 10]

Існує кілька способів одержання проліпосом. Один із них — регідратація ліофільно висушених у вигляді тонкої плівки фосфоліпідів. Для цього вихідні ліпіди розчиняють в органічному розчинникові (хлороформ або етанол), потім розчин висушують до утворення тонкої плівки ліпідів. Після

додавання до отриманої плівки води або водного буферного розчину утворюються багат шарові ліпосоми. Запропоновано спосіб одержання проліпосом змішуванням фосфоліпідів, органічного розчинника і наповнювача. Активними компонентами у проліпосомах слугують протеїни або ензими. Характерною особливістю цього методу є те, що біологічно активний компонент вводять у проліпосоми шляхом змішування сухих проліпосом з розчином БАР у полярному розчинникові, а сушіння їх проводять у два етапи — до і після введення БАР.

Відомий також спосіб одержання проліпосом на основі речовин-носіїв, які мають розвинену зовнішню і внутрішню поверхню (високопористі), не розчинні в органічних розчинниках і добре розчинні у воді, наприклад цукри і полісахариди (глюкоза, фруктоза, декстрини тощо), поліоли (сорбіт, ксиліт та ін.).

Існує ще один спосіб утворення ліпосом. Ліпосомальні дисперсії утворюються з негативно заряджених ліпідів, які набухають у воді (фосфатидилсерин, фосфатидна кислота, фосфатидилгліцерол). Ліпіди, які не несуть заряду або є в цілому електрично нейтральні (фосфатидилхолін), не набухають зовсім або набухають лише до граничної товщини водного прошарку між ламелами. А заряджені ліпіди схильні до необмеженого набухання і можуть включати воду між ламелами аж до порогової точки, коли утворюються фази повністю гідратованих моноламельярних везикул, що перебувають у стані рівноваги з водою. Ступінь набухання і відносна стабільність моно- і мультиламельярних структур визначаються електростатичними взаємодіями. За низької іонної сили відбувається дестабілізація мультиламельярних структур.

Незалежно від того, який проліпосомний спосіб обрано, приготування ліпосом має відбуватися за вищої температури, ніж під час переходу ліпиду з гелю в рідкокристалічну фазу. Ця температура переходу, як правило, нижча 0 °С, але в разі повністю гідрогенізованих (насичених) ліпідів може бути значно вищою за кімнатну. Якщо використовують такі ліпіди, то процедура

приготування проліпосом залишається такою самою, але всі операції слід виконувати за підвищених температур.

Захоплення водорозчинних компонентів є найефективнішим за двостадійного процесу розведення. Схему процесу подано в табл. 3.1.

У разі використання цих методів ефективність захоплення для більшості гідрофільних речовин зазвичай лежить у межах 40~60%, але може досягати 70~80%. Для ліпофільних речовин ефективність захоплення змінюється залежно від їхніх індивідуальних властивостей і може наближатися до 100%. Однак кількість жиророзчинних компонентів загалом не перевищує 25% від вмісту фосфоліпиду.

Основна перевага системи проліпосом — можливість завантаження гідрофільних і ліпофільних активних компонентів.

Таблиця 3.1

**Схема інкапсулювання в ліпосоми водо- і жиророзчинних компонентів
проліпосомним методом [10]**

Стадія	Операції
<i>1-ша стадія: перетворення проліпосом на ліпосоми</i>	Змішування ліпофільних (активних) компонентів з проліпосомами <i>Умови:</i> – повільне перемішування 30–50 об/хв; – час 15 хв; – температура для ненасичених ліпідів +25 °С; для насичених +65 °С
	Введення розчину гідрофільних (активних) компонентів. <i>Умови:</i> – швидке перемішування 1 000–10 000 об / хв; – час 15 хв; – температура для ненасичених ліпідів +25 °С, для насичених +65 °С; – об'єм води достатній тільки для початку формування ліпосом. Виходить висококонцентрована суспензія завантажених ліпосом
<i>2-га стадія: розведення суспензії ліпосом</i>	Додавання водного середовища, що не має активного компонента <i>Умови:</i> – повільне перемішування 30–50 об / хв; – час 10 хв; – температура +25 °С

На відміну від проліпосом, метод активного завантаження, що застосовується при виробництві препаратів на основі стабілізованих ПЕГ ліпосом (Doxil, Caelix), придатний лише для обмеженої кількості ліків, що мають природу слабких амфіфільних кислот або основ. [27, 29-31]

У таблиці 3.1 наведено приклади одержання ліпосомальних препаратів різного складу та різними методами.

Таблиця 3.1

Приклади одержання ліпосомальних препаратів

Препарат або АФІ	Склад ліпідної оболонки	Метод отримання	Розчин ники	Буфер	Розмір ліпосом
1	2	3	4	5	6
Ціанкобаламін (віт. В12) [35]	ЕРС, холестерин, ЕРГ, (10:8:1)	Метод гідратації тонкої плівки (мультиламелярні везикули, МЛВ) з подальшим озвучуванням (малі моноламелярні везикули, ММВ)	CHCl ₃ / CH ₃ OH (2:1)	Буферн ий розчин фосфату рН 7,4	МЛВ 5770±123 0 нм ММВ 51±28 нм
α-Токоферол (Віт. Е) [35]	ЕРС, холестерин (20:1)	-«-	CHCl ₃ / CH ₃ OH (2:1)	Буферн ий розчин фосфату рН 7,4	МЛВ 3890±172 0 нм ММВ 40±9 нм
Ергокальцифер ол (Віт. D2) [35]	ЕРС, холестерин (20:1)	-«-	CHCl ₃ / CH ₃ OH (2:1)	Буферн ий розчин фосфату рН 7,4	МЛВ 2960 1970 нм ММВ 48±37 нм
3-кофеїлхіна кислота (Хлорогенова кислота) [36]	HSPG, холестерин (5:1)	Метод гідратації тонкої плівки (великі монола- мелярні везикули (ВМВ))	CH ₂ Cl ₂ C ₂ H ₅ OH	-	БМВ 132,15±3, 03 нм
Оксаліплатин [21, 28]	ЕРС, холестерин, DPPG (50:20:30)	Метод гідратації тонкої плівки та екструзії при високому тиску	CHCl ₃ C ₂ H ₅ OH	-	(100±20) нм
Іринотекан [21, 41]	ЕРС, холестерин, (4:1)	Метод гідратації тонкої плівки та екструзії при високому тиску та ультрафільтрації, заповнення за градієнтом рН	C ₂ H ₅ OH	нитратни й буфер рН 2,0, кислота лимонна, натрію дигідроф осфат рН 4,5	80-120 нм
Водорозчинні протиухлинні засоби (ППЗ): Доксорубіцин	Ліпосомальна платформа фосфатидилхол іну (препарат	Ультразвукова обробка суміші ППЗ:Ліпін (1: 10- 50)	-	-	70-140 нм

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4	5	6
Іринотекан Оксаліплатин Етопозид Епірубіцин Вінкристин Вінорельбін Мітоксантрон Фторурацил [37]	"Ліпін")	(проліпосоми)			
Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) [38]	Лецитин соняшника, холестерин і ПЕГ (70:50:0,5)	Метод гідратації тонкої плівки, потім заморожування (-80 °C) – танення (+30 °C), а також центрифугування	Не вказано	Не вказано	Не вказано
Доцетаксел [39]	ЕРС	Метод гідратації тонкої плівки та екструзії при високому тиску	CHCl ₃	Буфер рН 5,62, (лактоза, лимонна кислота)	не більш 200 нм, потім 140,0 нм - 94,6%
Цитохром С [2]	Фосфатидилхолін, DPPG (1,20 : 1,0)	Метод гідратації тонкої плівки (MLV) та екструзії при високому тиску (ULV)	CHCl ₃ C ₂ H ₅ OH	Буферний розчин фосфату рН 6,8	< 220 нм
Цитохром С [40]	HSPG або ЕРС у суміші із одним або двома іншими ліпідами (DPPG, дипальмітоїлфосфатидилхолін, DSPC, дифосфатидилглицерину, ЕРГ, фосфатидилінозиту або діолеоїлоксипропілтриметиламонію (фосфатидилхолін:інші ліпіди 0,3-2,0:1)	Метод гідратації тонкої плівки (MLV) та екструзії при високому тиску (ULV)	CHCl ₃ C ₂ H ₅ OH (1:1,5-2,5)	Буферний розчин фосфату рН 6,8	< 160 нм

3.3. Аналіз складу та способів стабілізації ліпосом.

Оскільки можливості контролю та маніпулювання наноструктурами постійно розвиваються, інженерні стратегії щодо підвищення ефективності доставки ліків за допомогою ліпосом також швидко розвиваються.

Нами проаналізовано склад ліпосом для ряду відомих на ринку ліпосомальних ЛЗ (табл. 3.1). [1, 2, 20-23, 26,]

Таблиця 3.3

Ліпосомальні препарати на фармацевтичному ринку

Назва	Діюча речовина	Шлях введення	Лікарська форма	Ліпідна композиція	Показання до застосування
Ambisome	Амфотерицин В	Внутрішньовенний (в/в)	Порошок (П)	HSPC, DSPG, холестерол та амфотерицин В (2:0.8:1:0.4 мольне співвідношення)	Грибкова інфекція
Abelcet	Амфотерицин В	в/в	Суспензія (С)	DMPC і DMPG (7:3 мольне)	Грибкова інфекція
Amphotec	Амфотерицин В	в/в	П	Холестерил сульфат	Грибкова інфекція
DaunoXome	Даунорубіцин	в/в	С	DSPC та холестерол	Лейкемія
Myocet	Доксорубіцин	в/в	П	ЕРС та холестерол (55:45 мольне)	Комбінована терапія з циклофосфамідом при метастатичному раку молочної залози
Caelyx	Доксорубіцин	в/в	Розчин	HSPC, холестерол, MPEG	-«-
Visudyne	Вертепорфін	в/в	П	EPG та DMPC (3:5 мольне)	Вікова молекулярна дегенерація, патологічна

Назва	Діюча речовина	Шлях введення	Лікарська форма	Ліпідна композиція	Показання до застосування
					короткозорість, гістоплазмоз очей
Derocyt	Цитарабін	спінальний	С	Холестерол, триолеїн, DOPC та DPPG (співвідношення 11:1:7:1)	Неопластичний менінгіт і лімфоматозний менінгіт
Derodur	Морфіну сульфат	епідуральний	С	Холестерол, триолеїн, DOPC та DPPG (співвідношення 11:1:7:1)	Контроль над болем
Eрахal	Вірус гепатиту А інактивований (штам RG-SB)	Внутрішньом'язовий	С	DOPC та DOPE	Гепатит А
Inflexal V	Інактивований гемаглютинін штамів вірусу грипу А та В	Внутрішньом'язовий	С	DOPC та DOPE	Грип
Doxil	Доксорубіцин	в/в	С	HSPC, холестерол, and PEG2000-DSPE (56:39:5 мольне)	Саркома Капоші, рак яичників і молочної залози
Lipo-dox	Доксорубіцин	в/в	С	HSPC, холестерол, and PEG2000-DSPE (55:39:5 мольне)	Саркома Капоші, рак яичників і молочної залози
SPI-077 (cisplatin)	Цисплатин	в/в	Розчин	SoyHPC, холестерол, DSPE-PEG	Рак голови та шиї, рак легенів

Примітки:

HSPG, hydrogenated soy phosphatidylcholine;

EPC, egg phosphatidylcholine;

DOPC, dioleoylphosphatidylcholine;

DSPC, distearoylphosphatidylcholine;

DMPC, 1- α -dimyristoylphosphatidylcholine;

DOPE, dioleoylphosphatidylethanolamine;
 DPPG, dipalmitoylphosphatidylglycerol;
 DSPG, distearoylphosphatidylglycerol;
 DMPG, 1- α dimyristoylphosphatidylglycerol;
 EPG, egg phosphatidylglycerol;
 PEG 2000-DSPE, polyethylene glycol 2000-distearoylphosphatidylethanolamine
 MPEG methoxypolyethylene glycol

Звичайні ліпосоми являють собою ліпосомальні композиції з незмінними поверхневими властивостями. Ці ліпосоми, наповнені молекулами ліків, такі як амфотерицин В (див. табл. 3.3), представляють собою перше покоління ліпосомальних ліків на ринку. Однак застосування звичайних ліпосом стикається з проблемами із-за їх спадкової нестабільності. Ліпосоми, особливо розміром менше 100 нм, схильні зливатися, зменшуючи поверхневий натяг, що призводить до втрати корисного навантаження або небажаного змішування. Одною із стратегій вирішення цієї проблеми є покриття поверхні ліпосом «невидимими» полімерами. Шар полімеру не тільки запобігає зливанню ліпосом, але й збільшує термін їх циркуляції *in vivo*, забезпечуючи адсорбцію білків плазми на поверхні ліпосом. Ці приховані ліпосоми вважаються новим поколінням ліпосомальних складів, і їх успіх привів до появи ряду клінічно схвалених продуктів. [10, 26, 27]

Для покриття поверхні ліпосом використовують поліелектроліти, гідрофільні та гідрофобні полімери.

Поліелектроліти – це полімери, макромолекули яких містять функціональні групи, здатні до електролітичної дисоціації. Через електростатичні взаємодії поліелектроліти можуть адсорбуватися на поверхні ліпосом з протилежними зарядами (рис. 3.1, А). Прикладом такої взаємодії є система, що складається з полікатіону полі-N-етил-4-вінілпіридиній бромід (ПЕВП) та ліпосоми, утвореної яєчним лецитином та негативно зарядженим кардіоліпіном. Адсорбція поліелектроліту ПЕВП на поверхні ліпосоми супроводжується зниженням заряду ліпосоми до точки електронейтральності, після чого відбувається перезарядження поверхні в результаті адсорбції надлишкової кількості полікатіону [25]. Змінюючи рН розчину, можна

контролювати утворення та дисоціацію комплексу, тим самим домагаючись зниження кількості ефективного заряду на поверхні ліпосом.

Як гідрофільний полімер при модифікації поверхні ліпосом найчастіше використовують поліетиленгліколь (ПЕГ). Стабілізація ліпосом досягається додаванням холестерину або гідрофільного карбоксибетаїну. Цей полімер ковалентно зшивається з головками ліпідів та утворюються ліпосоми (рис. 3.1, В), які демонструють хорошу доставку гідрофільної лікарської речовини та збільшення часу циркуляції ліпосом у кровоносному руслі. [29]

Відомі способи стабілізації ліпосом додаванням гідрофобних полімерів, таких як полідіацетилен та насичені ліпіди. Механізм їх впливу обумовлений зшиванням гідрофобних кінців ліпідів з утворенням полімерної сітки навколо ліпосоми або всередині ліпідного бішару (рис. 3.1, С та D). Було визначено, що така модифікація поверхні ліпосоми запобігає передчасному вивільненню інкапсульованої речовини. [8-10, 15, 18]

Найвідомішою технологією одержання полімерних ліпосом є метод з використанням синтетичних ліпідів на основі діацетилен-, дієн- і метакрилоїл-похідних фосфатидилхоліну та диметилдіалкіламіну. За рахунок диспергування у водному середовищі й нагрівання вище температури фазового переходу такі ліпіди утворюють замкнені бульбашки, що складаються із серії концентричних сфер, розділених водною фазою. Полімеризація може здійснюватись як у гідрофобній, так і в гідрофільній ділянці бішару. Вона ініціюється або УФ-опроміненням (довжина хвилі 254 нм), або радикальною полімеризацією — за допомогою азабісізобутиронітрилу. Залежно від типу ліпиду, умов полімеризації, тривалості опромінення і його інтенсивності методом приготування водної дисперсії виділяють ліпосоми діаметром від декількох десятків до декількох сотень нанометрів. Порівнянно зі звичайними ліпосомами полімерні є більш стабільними. Крім того, полімерні ліпосоми, що містять у своїй структурі поліакрилові кислоти, мають противірусні властивості. [10]

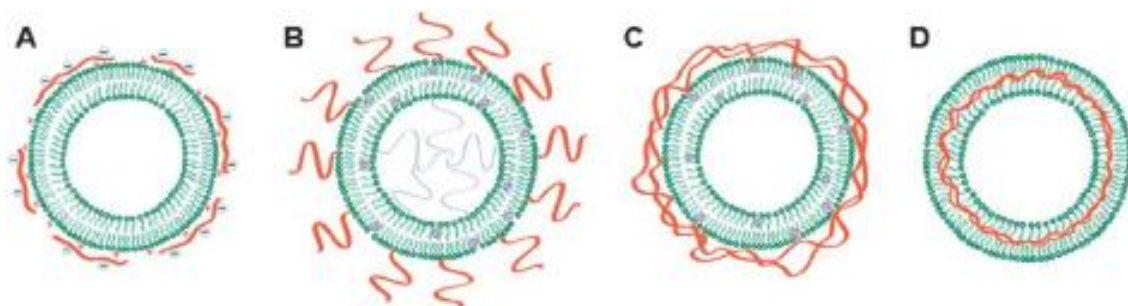


Рис. 3.1 - Стратегії використання полімерів для стабілізації ліпосом.

А - полімери фізично адсорбуються на зовнішній поверхні ліпосом; В - полімери ковалентно пов'язані з головними групами ліпідів; С - мономер, що полімеризується, попередньо кон'югується з головними групами ліпідів, а потім полімеризується з утворенням полімерного каркаса, що оточує і стабілізує ліпосому; D - гідрофобні хвостові групи ліпідів зшиті всередині ліпідних бішарів. [26]

Як стабілізатори ліпосом, крім ПЕГ, використовувалися різні полімери, включаючи полуксамери, полуксаміни, декстран, похідні сіалової кислоти, поліакрилові та полівінілові полімери та полігліцерини, які виявляли неоднозначні результати. Були розроблені супергідрофільні цвіттер-іонні полімери для створення стелс-ліпосом з багатообіцяючими результатами. У порівнянні з ПЕГ цей клас молекул забезпечує сильнішу гідратацію, слабо взаємодіє з ліпідними бішарями і забезпечує кращу стабілізацію ліпосом. [26]

Як цікаву альтернативу ПЕГ для стеричної стабілізації та модифікації ліпосом були запропоновані плуроніки (полуксомери), що широко використовуються як емульгатори та стабілізатори. Характерні особливості структури та властивостей плуроніків розглянуто в розділі 2. [27, 29-31]

Можливі два варіанти включення плуроніка в ліпідний бішар: плуронік абсорбується на поверхні ліпосом (рис. 3.2, А) або безпосередньо включений в ліпідний бішар (рис. 3.2, В). Таке розташування молекул блоксополімеру в ліпосомній системі залежить від черговості їх додавання в систему під час приготування везикул: перший - надати можливість молекулам блоксополімеру разом з ліпідами брати участь у процесі утворення малих моноламелярних везикул (ММВ) та другий - додати плуронік до попередньо сформованих невеликих моноламелярних ліпосом.

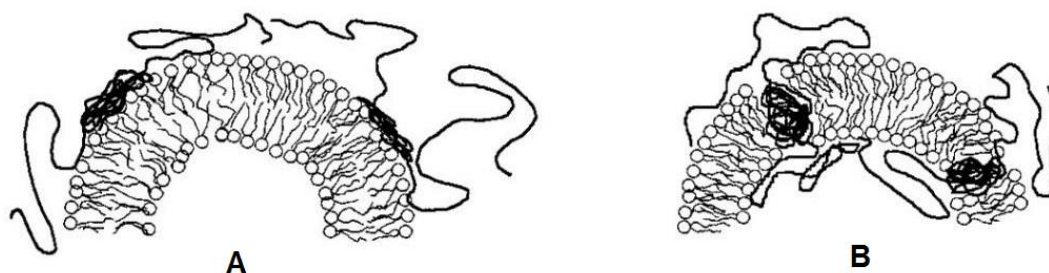


Рис. 3.2 - Варіанти включення плюроніка в ліпідний бішар.

У роботах дослідників показано, що при спільному утворенні везикул ліпідами та плюроніком (рис. 3.2, В) відбувається різке збільшення середнього діаметру ліпосом за рахунок включення гідрофобного поліпропіленоксиду блоку плюроніка в ліпідний бішар. У разі додавання плюроніку до вже сформованих ліпосом середній розмір ліпосом не змінюється. Це може вказувати на адсорбцію плюроніка на зовнішній поверхні ліпосоми. Це, зрештою, призводить до поділу фаз.

В дослідженнях два види ліпосом, модифікованих плюроніком F-127, показали різні механізми клітинного поглинання у клітин аденокарциноми кишечника Сасо-2. Ліпосоми з вбудованим плюроніком F-127 (рис. 3.2, В) демонстрували більш високу ефективність клітинного поглинання та покращену здатність проникати через слизову оболонку кишечника порівняно з адсорбованими ліпосомами (рис. 3.2, 10А), а також з немодифікованими ліпосомами. [30, 31]

3.4. Напрямки удосконалення ліпосомальних структур.

Успіх ліпосом разом із нещодавніми досягненнями в галузі нанотехнологій стимулював розробку різних нових ліпосомоподібних наноструктур з покращеними характеристиками доставки ліків. Ці наноструктури можна розділити на п'ять основних різновидів, а саме:

1. ліпосоми, стабілізовані полімером,
2. ліпосоми, стабілізовані наночастинками,
3. гібридні ліпідно-полімерні наночастки з ядром-оболонкою,
4. везикули природнього мембранного походження,
5. наночастки, покриті натуральною мембраною. [26]

Ліпосоми, стабілізовані полімерами

Ліпосоми, стабілізовані полімерами, в основному розглянуто вище. Але можна ще додати кілька фактів. Разом з розвитком ліпосомальної інженерії стабілізовані полімером ліпосоми почали застосовувати для просування ще новіших шляхів доставки ліків. Серед них внутрішньоклітинна доставка РНК є областю, що швидко розвивається. Ліпосоми, які використовують катіонні ліпіди для конденсації РНК і покриття ПЕГ для скритності, є найбільш досконалими прикладами системної доставки РНК. Серед цих матеріалів велику увагу привернули ліпідоїди, клас ліпідоподібних катіонних молекул. У порівнянні з традиційними ліпідами, ліпідоїди вимагають менше етапів синтезу та очищення. [26-29]

Ще одна область, що швидко розвивається - використання наноматеріалів для модуляції імунної системи. Ліпідні везикули з різними фізико-хімічними властивостями, включаючи спосіб прикріплення антигену, ліпідний склад, плинність бішару, ламелярність і поверхневий заряд, були протестовані як вакцини, що призвело до ефективних протимікробних або протипухлинних імунних відповідей. У ранніх дослідженнях популярними платформами були звичайні ліпосоми; однак стабілізовані ліпосоми з передбачуваною стабільністю все частіше використовуються для точної імунної модуляції для досягнення більш тривалої, широкої та потужнішої імунної відповіді. Наприклад, було показано, що в порівнянні зі звичайними, ліпосоми, посилені полімеризованими ліпідами, мають чудову ад'ювантну активність, що призводить до посилення вироблення антитіл. [26-29, 34]

Ліпосоми, стабілізовані наночастинками

Незважаючи на широке застосування полімер-стабілізованих ліпосом для системної доставки ліків, вони рідше використовуються для доставки препаратів протимікробних. Це відбувається тому, що полімерне покриття, стабілізуючи ліпосоми від злиття один з одним, також запобігає їх злиттю з бактеріальними мембранами, до яких необхідно доставити протимікробне навантаження. В ідеалі ліпосоми повинні бути стабілізовані проти злиття до

того, як вони «побачать» бактерії-мішені, тоді як їхня активність злиття відновлюється, як тільки вони прибудуть до місць зараження. Отже, для досягнення цієї мети ліпосомам потрібна альтернативна стратегія стабілізації.

Нова стратегія стабілізації полягає у зв'язуванні наночастинок з поверхнями ліпосом. Неспецифічна адсорбція заряджених наночастинок на фосфоліпідних бислоях забезпечує стеричне та електростатичне відштовхування. Залежно від щільності ці адсорбовані наночастки запобігають злиттю ліпосом з утворенням більших везикул. Крім того, наночастинки викликають реконструкцію поверхні ліпідів у місцях адсорбції та знижують поверхневий натяг ліпосом і ще більше підвищує їхню стабільність. Ця стратегія з різними варіантами стабілізаторів-наночастинок, як полістирол, золото та кремнезем, відкриває широкі можливості. [26-29, 34]

Використовуючи наночастинки можна точно налаштувати заряд і щільність заряду як наночастинок, так і ліпосом, щоб забезпечити зв'язування і від'єднання наночастинок, що реагує на стимули.

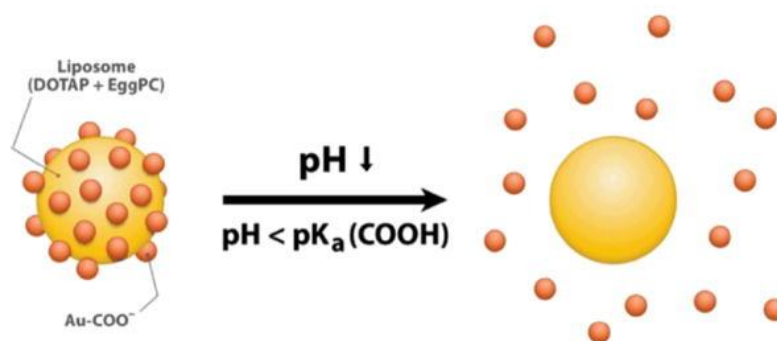


Рис. 3.3 - Схематична ілюстрація ліпосоми, стабілізованої карбоксил-модифікованими наночастинками золота (AuC), та її дестабілізації при кислому рН.

Наприклад, було показано (див. рис. 3.3), що карбоксилмодифіковані наночастинки золота, адсорбовані на зовнішній поверхні фосфоліпідних ліпосом, ефективно запобігають злиттю ліпосом при нейтральному значенні рН. У кислому середовищі ($\text{pH} < 5$) золоті наночастинки відокремлювалися від ліпосом, і активність злиття ліпосом відновлювалася. Шкіра людини

зазвичай кисла ($\text{pH} = 3,9-6,0$), особливо при інфекційних ураженнях ($\text{pH} 4,0$ при прищах). Таким чином, цей клас ліпосом з керованою здатністю до злиття привабливий для доставки ліків через шкіру. [26-29, 34]

Гібридні наночастинки ядро-оболонка ліпід-полімер

Нещодавно з'явилися нові конструкції наночастинок, які поєднують ліпідну оболонку та закрите тверде ядро в єдину структуру. Як ядра досліджувалися неорганічні матеріали, такі як діоксид кремнію, оксиди металів, або органічні матеріали, такі як полісахариди, полістирол, поліелектролітні капсули або гідрогелі.

Серед різних гібридних складів значну увагу привернули наночастинки, що складаються з ліпідних моношарів та ядер із полімолочної кислоти (PLA) або полі(молочно-гліколевої кислоти) (PLGA).

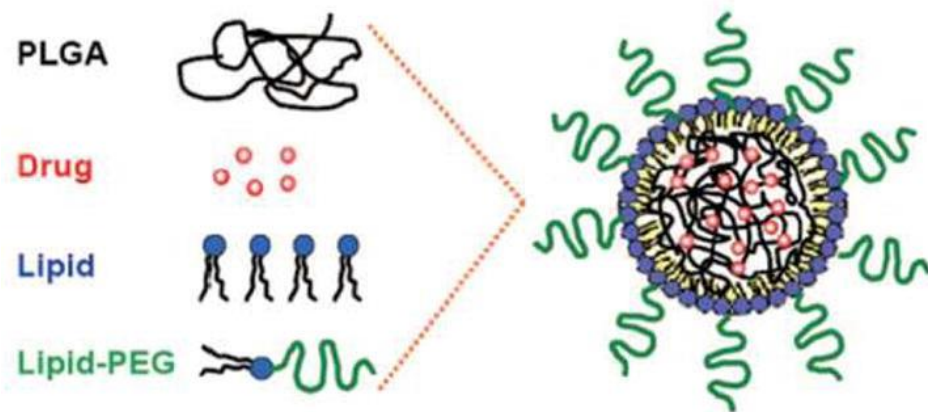


Рис. 3.4 – Схема гібридної наночастинки ліпід-полімер: гідрофобне ядро із PLGA, гідрофільна оболонку з PEG та ліпідний моношар з лецитину на межі розділу гідрофобного ядра та гідрофільної оболонки.

Цей гібрид використовує унікальні переваги як полімерних наночастинок, так і ліпосом. Тверді ядра діють як підкладка, яка забезпечує механічну стабільність, контрольовану морфологію, біорозкладність, збільшене співвідношення площі поверхні до об'єму та вузький розподіл за розмірами. Крім того, ядро цих частинок складається з полімеру PLA або PLGA, який є визнаним біополімером для доставки ліків та забезпечує контрольоване вивільнення ліків. При цьому ліпідна оболонка, що огортає ядро, імітує біологічні мембрани у взаємодії з довкіллям. Він також діє як

бар'єр, що зменшує дифузію лікарського засобу та проникнення води через межу розділу ядро-оболонка, тим самим полегшуючи інкапсуляцію лікарського засобу та змінюючи швидкість вивільнення лікарського засобу. Оболонка зазвичай закріплена фрагментом ліпід-ПЕГ, який дозволяє частинкам ухилятися від поглинання імунною системою та надає властивостей тривалій циркуляції. Оболонку можна додатково модифікувати функціональними лігандами для адресної доставки ліків. [26-29, 34]

Традиційне отримання гібридних наночастинок вимагає трудомістких операцій, включаючи нагрівання, механічне струшування та тривале випаровування. Натомість нещодавно був розроблений швидкий одноетапний метод з використанням ультразвукової обробки коктейльної суміші полімеру-попередника та розчинів ліпідів. Цей метод масштабування призвів до двадцятикратного скорочення часу, необхідного для приготування частинок, а також дозволив налаштовувати розміри частинок із підвищеною моно дисперсністю. [34]

Везикулы природнього мембранного происхождения

В якості альтернативи все більше зусиль спрямовується на використання як носіїв ліків везикул, отриманих з природних клітинних мембран. Перевага натуральних мембран у порівнянні з синтетичними полягає в тому, що отримані везикули зберігають багато природних функцій вихідного матеріалу.

Природні везикули, наприклад, екзосоми, вивільняються клітинами ссавців, призначені для позаклітинної передачі сигналів, а бактеріальні везикули зовнішньої мембрани (OMVs) призначені для самозахисту. Альтернативно, везикули можуть бути отримані штучно з очищених клітинних мембран. У цьому випадку мембрани спочатку готують шляхом видалення внутрішньоклітинного вмісту з подальшим приготуванням ліпосомальних везикул бажаного розміру. У доповненні до свого ендогенного походження і подібності до плазматичних мембранам вихідних клітин, екзосоми привернули увагу до застосування у сфері доставки ліків із-

за їх різноманітної біологічної ролі в імунитеті, ангіогенезі, гемостазі та патогенезі опухолей. [1, 34]

На відміну від ендогенних везикул, OMV секретуються бактеріями. Ці везикули досліджувалися в якості ад'ювантних носіїв антигенів для імунотерапії проти інфекцій. Зокрема, вакцини OMV успішно застосовувалися для боротьби зі спалахом менінгококової інфекції в Норвегії, Новій Зеландії та на Кубі. [1, 34]

Везикули, отримані з клітинних мембран, також можна отримати штучно з природних мембран. У порівнянні з везикулами, створеними природними процесами, штучне збагачення клітинних мембран може бути вигідним для великомасштабного виробництва везикул, що робить їх перспективними.

Везикули, отримані з мембран еритроцитів (наноеритросоми), були вперше отримані шляхом фізичної екструзії тіней еритроцитів через мембрани з певним розміром пор. Цей підхід підтримує біосумісність матеріалу і зберігає складний білковий склад еритроцитів, необхідний для їх біофункціональності. Наноеритросоми мають середній діаметр 100–200 нм, який дозволяє пасивно впливати на тканини з непроникною судинною сіткою. Крім того, ці везикули біорозкладаються, не токсичні і не володіють імуногенністю при аутологічному застосуванні. [1, 34]

Як і в разі звичайних ліпосом, відсутність стабільності є проблемою, що обмежує застосування наноеритросом. Для подальшої стабілізації наноеритросом здійснювали ковалентну кон'югацію ПЕГ з амінокислотними залишками на поверхні мембрани.

Також були заплановані спроби отримати везикули з мембранами, зібраними з інших типів клітин ссавців, які мають більш складну структуру та функції порівняно з еритроцитами. В цьому відношенні мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) часто вибираються в якості джерела для виробництва везикул, націлених на рак, оскільки МСК здатні пристосовуватися до багатьох типів раку на різних стадіях розвитку. [1, 34]

Наночастинки, функціоналізовані клітинною мембраною.

Інкапсуляція синтетичних наночасток в клітинні мембрани може бути досягнута за рахунок використання природних клітинних процесів, при яких нерозкладені частинки спочатку засвоюються клітинами за допомогою ендоцитозу, а потім вивільняються з клітин у формі, закритої в бульбашки. Таке були отримані різні гібридні наночастинки з мембранним покриттям, включаючи магнітні, магнітно-металічні та магнітно-флуоресцентні частинки. Ці гібридні наночастинки поєднують в собі корисні властивості кожного інтегрованого компонента і представляють собою корисну платформу для нанотераностики. [1, 3, 5, 34]

Інший підхід до функціоналізації наночастинок клітинними мембранами полягає в тому, щоб спочатку зібрати непошкоджені клітинні мембрани, а потім покрити ними частинки. Оскільки цей підхід не залежить від клітинних процесів, мембранне покриття можна використовувати не тільки на інертних неорганічних частинках, але і на біорозкладних частинках. У центрі цього технологічного процесу знаходяться мембрани з еритроцитів. Еритроцити давно використовують як носії і вже давно надихають дослідників на розробку штучних систем з виключними можливостями доставки. Наприклад, було показано, що полімерні частинки, що імітують форму і здатність до деформації природних еритроцитів, легше проходять через судини, ніж їх більш жорсткі аналоги. [10, 13, 23, 34]

Ці наночастинки мали період напіврозпаду з циркуляції *in vivo* близько 40 годин, у порівнянні з 16 годинами відповідно до ПЕГільованих наночастинок. Також показано значне покращення стабільності частинок *in vivo*, у порівнянні з наноеритросоми, розуміючи, що роль полімерного ядра відіграє значну роль у підтримці цілісності та структурної стабільності мембрани еритроцитів. Більш того, хіміотерапевтичні препарати, такі як доксорубіцин, можна легко завантажити в полімерні ядра шляхом фізичної інкапсуляції або хімічної кон'югації для контрольованої та стійкої доставки

ліків. Мембранне покриття, оточуюче частинки, забезпечувало додатковий дифузійний бар'єр, що знижував швидкість вивільнення лікарських засобів.

Технологія використання природної клітинної мембрани для покриття синтетичних наночастинок нещодавно була розширена від полімерних наночастинок до неорганічних наночастинок золота (AuNP). AuNP знайшли широке застосування в якості агентів візуалізації та носіїв ліків у біології та медицині. [1, 13, 23, 34]

Інтеграція природних і синтетичних біоматеріалів для формування функціональних наноструктур пропонує нову парадигму мислення щодо розробки та використання наномедицини.

Висновок до 3 розділу:

В розділі наведено аналіз особливостей отримання ліпосом різними способами, обговорені деякі технологічні параметри процесів, наведено схему двостадійного процесу, який відноситься до проліпосомного методу, наведено приклади отримання ліпосом різного складу та різними методами. Проведено порівняльний аналіз складів ліпосом для ряду відомих на ринку ліпосомальних ЛЗ, полімерів, які застосовують для стабілізації, та стратегій їх використання, обговорені перспективні напрямки удосконалення ліпосомальних структур та розробки нових ліпосомоподібних наноструктур з покращеними характеристиками доставки ліків.

ВИСНОВКИ

1. Проведене інформаційно-аналітичне дослідження тенденцій застосування ліпосом для діагностики та терапії різних захворювань.
2. Розглянуто будову ліпідних везикул та види ліпосом. Наведено класифікації ліпосом за розміром та структурою, за складом та особливостями застосування для доставки лікарських речовин.
3. Проаналізовано способи отримання ліпосомальних носіїв та їх особливості, обумовлені властивостями активних біомолекул, які в них завантажують.
4. Визначено шляхи удосконалення ліпосом, розглянуті речовини природного та синтетичного походження, які використовують для отримання та стабілізації ліпосомальних частинок.
5. Наведено аналіз деяких особливостей отримання ліпосом різними способами, обговорені технологічні параметри процесів, наведено приклади отримання ліпосом різного складу та різними методами.
6. Проведено порівняльний аналіз складів ліпосом для ряду відомих на ринку ліпосомальних ЛЗ, полімерів, які використовують для стабілізації та стратегій їх використання.
7. Виявлено, що використання технологій отримання ліпосомальних форм лікарських засобів є перспективним підходом до забезпечення ефективної терапії багатьох захворювань.
8. З'ясовані основні переваги та недоліки способів отримання ліпосом для виявлення перспектив створення нових та вдосконалення існуючих засобів з інкапсульованими в них ліками, а також перспективність ліпосомоподібних наноструктур з покращеними характеристиками доставки ліків, які мають потенціал більш широкого використання у медичній практиці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Краснопольський Ю.М. Створення систем доставки антигенів та ліків на основі штучних і природних ліпідних наночастинок: ліпосоми та екзосоми : монографія / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Друкарня Мадрид, 2023. – 179 с.
2. Кацай О. Г. Розробка технології отримання ліпосомальної форми цитохрому С для лікування офтальмологічних захворювань : дис. ... д-ра філософії в галузі фармацевтики. Харків, 2020. 217 с.
3. Rangar S. Nanoparticle – based drug delivery system / S. Rangar, P. Sirohi, P. Verma et al. // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. – 2014. – V. 57 (№. 2). – P. 209-222.
4. Rudy Jose Antonelli da Costa. Liofilization y obtencion de vesiculas lipidicas / Rudy Jose Antonelli da Costa // *Universidad Dsalamanca. Campus excelencia Internacional. Salamanea*. – 2013. – P. 1-69.
5. Grigorieva A.S. Real Nanopharmacology: Liposomic medicines in clinic / A.S. Grigorieva, N.F. Konakhoych, Yu.M. Krasnopolsky // *International Liposome Society. Liposome Advances: Progress in drug and Vaccine Delivery*. - London. – 2009 – P. 70-71.
6. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems / J. Li et al. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2015. Vol. 10, № 2. P. 81–98.
7. Промислова технологія лікарських засобів. Навчальний посібник для самостійної роботи студентів: опрацьоване та доповнене. / Сост. О.А. Рубан, В.Д. Рибачук, Л. М. Хохлова, Ю. С. Маслій та ін. – Х.: НФаУ, 2015. - 120 с.
8. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. / D. Lombardo, M. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra // *Condensed Matter Physics*. – 2015. – 22 с.

9. Amrita Saha, Arunima Biswas, S.K. Manirul Islam. Chapter 5 - Transport of drugs using liposomes. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* / Editor(s): Inamuddin, Jorddy Neves Cruz, Tariq Altalhi. Elsevier, 2023. P. 127-140. ISBN 9780323951715, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95171-5.00003-0>.
10. Шульга С.М. Ліпосоми і наносоми: структура, властивості, виробництво / С. М. Шульга // *Biotechnologia Acta*. – 2013. - V. 6, No 5. – С. 19-40.
11. Pran Kishore Deb, Omar Al-Attraqchi, Balakumar Chandrasekaran, Anant Paradkar, Rakesh K. Tekade. Advances in Pharmaceutical Product Development and Research. Chapter 16 - Protein/Peptide Drug Delivery Systems: Practical Considerations in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery* / Editor(s): Rakesh K. Tekade. Academic Press, 2019, P. 651-684, ISBN 9780128179093, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00016-9>.
12. Поверхнево-активні речовини. *Фармацевтична енциклопедія*. Харків: Видавництво «МОПІОН». Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/859/poverxnevo-aktivni-rechovini>
13. Lombardo, D.; Calandra, P.; Barreca, D.; Magazù, S.; Kiselev, M.A. Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery. *Nanomaterials* 2016, 6, 125. <https://doi.org/10.3390/nano6070125>
14. Ali, M. H. The role of lipid geometry in designing liposomes for the solubilisation of poorly water soluble drugs / Ali, M. H., Moghaddam, B., Kirby, D. J., Mohammed, A. R., & Perrie, Y. // *International journal of pharmaceutics*. – 2013. - № 453.1. – P. 225-232.
15. Abolfazl Akbarzadeh Liposome: classification, preparation, and applications [Electronic resource] / Abolfazl Akbarzadeh [et al.] // *Nanoscale Research Letters*. – 2013. – Vol. 8, no. 1. <https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-102>
16. Нові лікарські форми. Загальна характеристика та класифікація. TDMUV URL: <http://surl.li/otcjk> (дата звернення: 15.11.2017).

17. Bourgaux, C. Interactions of anticancer drugs with biomembranes: what can we learn from model membranes? / Bourgaux, C., & Couvreur, P. // *Journal of Controlled Release*. – 2014. - № 190. – P. 127-138.
18. Чекман І. С. Наномедицина, нанофармакологія: фармакотерапевтичний аспект / І. С. Чекман, М. Задорожній // *Галицький лікарський вісник*. – 2011. – № 2. – С. 159–165.
19. Луців Є. Ліпосоми: характеристика та використання у медицині / Луців Є., Стравський Я. // *Modern Engineering and Innovative Technologies*. – 2023. - № 4(26-04). – P. 53–65. <https://doi.org/10.30890/2567-5273.2023-26-04-028>.
20. Bonde S., Nair S. Advances in liposomal drug delivery system: fascinating types and potential applications. *Int J Appl Pharm*. 2017. Vol. 9, № 3. С. 1–7.
21. Стадніченко О. В. Наукове обґрунтування та розробка ліпосомальних протипухлинних лікарських засобів на основі іринотекану і оксаліплатину: автореф. дис. ... д. фарм. н. : 15.00.01. Харків, 2019. 48 с.
22. Григор'єва Г. С. Ліпосоми per se : фармакотерапевтичний статус / Г. С. Григор'єва, Ю. М. Краснопольський // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2020. - Том 14, No 4. – С. 264–271. <https://doi.org/10.33250/14.04.264>
23. Lipid Nanoparticles–From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Modern engineering and innovative technologies Issue 26 / Part 4 ISSN 2567-5273 www.63moderntechno.de Landscape of Research Diversity and Advancement [Electronic resource] / Rumiana Tenchov [et al.] // *ACS Nano*. – 2021. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>
24. Mahendra Rai, Avinash P. Ingle, Sunita Bansod, Kateryna Kon. Chapter 9 - Tackling the Problem of Tuberculosis by Nanotechnology: Disease Diagnosis and Drug Delivery : in *Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases* / Editor(s): Mahendra Rai, Kateryna Kon. - Academic Press, 2015. – P. 133-149. ISBN 9780128013175 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801317-5.00009-8>

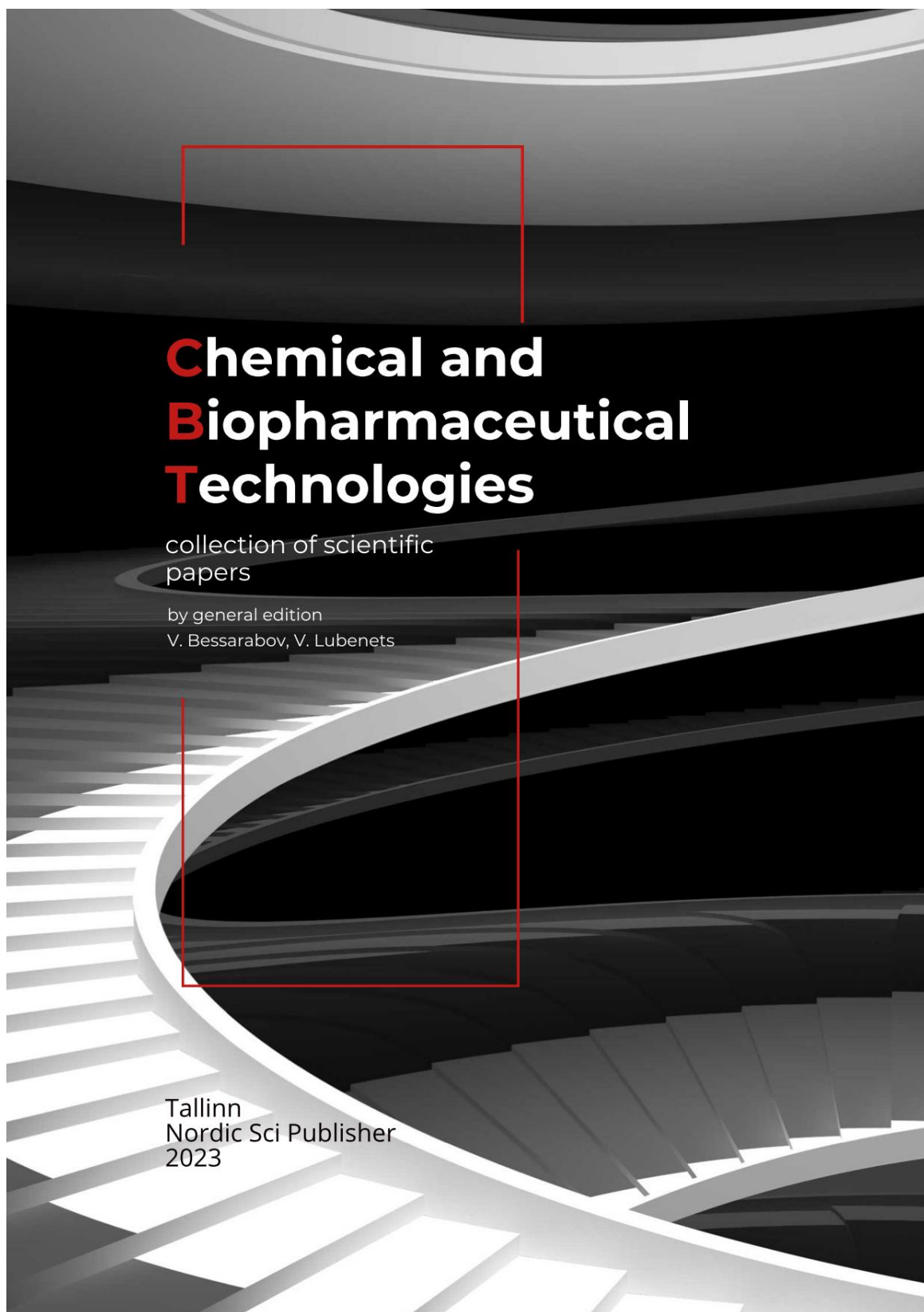
25. Westen, R. Myoblast Cell Interaction with Polydopamine Coated Liposomes / R. Westen, L. Hosta-Rigau, D.S. Sutherland, et.al. // *Biointerphases*. – 2012. – V. 7, N. 1. – P. 1-9.
26. Gao, Weiwei. Liposome-like Nanostructures for Drug Delivery / Gao, Weiwei & Hu, Che-Ming & Fang, Ronnie & Zhang, Liangfang // *Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine*. - 2013. – 1(48). doi: 10.1039/C3TB21238F.
27. Cattel L. From Conventional to Stealth Liposomes: a New Frontier in Cancer Chemotherapy / L. Cattel, M. Ceruti & F. Dosio // *Journal of Chemotherapy*. – 2004. - 16:sup4. – P. 94-97, DOI: 10.1179/joc.2004.16.Supplement-1.94
28. Stadnichenko O. Технологічні параметри виробництва ліпосом з оксаліплатином / Stadnichenko O., Krasnopolsky Yu., Yarnykh T. // *Фармацевтичний часопис*. – 2018. - № 1. – С. 57-62. DOI:10.11603/2312-0967.2018.1.8612.
29. Cao, Z. Superhydrophilic Zwitterionic Polymers Stabilize Liposomes / Z. Cao, L. Zhang, S. Jiang // *Langmuir*. – 2012. – V. 28, N. 31. – P. 11625-11632
30. Li, Z. Liposomes consisting of pluronic F127 and phospholipid: Effect of matrix on morphology, stability and curcumin delivery / Z. Li, Y. Huang, S. Peng, et.al. // *Journal of Dispersion Science and Technology*. – 2020. – V. 41, N. 2. – P. 207-213.
31. Marta, B. Pluronic-coated silver nanoprisms: Synthesis, characterization and their antibacterial activity / B. Marta, E. Jakab, M. Potara, et.al. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2014. – V. 441, N. 20. – P. 77-83.
32. Drug Approvals and Databases // FDA Database U.S. : [сайт]. – URL : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm> (дата звернення 10.12.2023).
33. Bodratti, A.M. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery / A.M. Bodratti // *Functional Biomaterials*. – 2018. – 24 с.

34. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Vaccine. 2012; 30:2256–2272. [PubMed: 22306376]
35. Bochicchio S. Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation / S. Bochicchio, A.A. Barba, G. Grassi, G. Lamberti // LWT – Food Science and Technology. - 2016. - V. 69. - P. 9–16.
36. Feng Y. Enhanced oral bioavailability and in vivo antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation / Y. Feng, C. Sun, Y. Yangyang, et al. // International Journal of Pharmaceutics. - 2015.
37. Спосіб отримання ліпосомальної емульсії, що містить водорозчинні протипухлинні препарати: пат. 112699 Україна. № у 2016 06975; заявл. 29.06.2016; опубл. 26.12.2016, Бюл. № 24. 9 с.
38. Спосіб отримання ліпосомальної форми аденозин-5'-трифосфату (АТФ) для перорального застосування : пат. 77865 Україна. № у 2012 10974; заявл. 20.09.2012; опубл. 25.02.2014, Бюл. № 4. 4 с.
39. Спосіб отримання ліпосомальної форми доцетакселу : пат. 022182 Євразійський патент. № 201201591; заявл. 24.12.2012; опубл. 30.11.2015. 11 с.
40. Спосіб отримання фармакологічно активної ліпосомальної композиції, що містить цитохром С, та ліпосомальна композиція, отримана таким способом : Пат. на винахід 118583 Україна. № а 2016 10776 ; заявл. 27.10.2016 ; опубл. 10.05.2018, Бюл. № 9. 19 с.
41. Спосіб отримання ліпосомальної форми іринотекану (варіанти) : пат. 023079 Євразійський патент. № 201201594; заявл. 24.12.2012; опубл. 29.04.2016. 8 с.
42. Поліетиленгліколь. *Фармацевтична енциклопедія*. Харків: Видавництво «МОРІОН». Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/881/polietilenglikol>
43. Geckil H., Xu F., Zhang X., Moon S., Demirci U. // Nanomedicine. 2010. V. 5. № 3. P. 469.

44. Wilems T.S., Lu X., Kurosu Y.E., Khan Z., Lim H.J., Smith Callahan L.A. // J. Biomed. Mater. Res. A. 2017. V. 105. № 11. P. 3059.
45. Двінських Н.В. Ліпосоми як перспективна система доставки біологічно активних речовин / Двінських Н.В., Хохленкова Н.В., Кащенко О.В. // Chemical and biopharmaceutical technologies: collection of scientific papers / by general ed. V. Bessarabov, V. Lubenets. - Tallinn: Nordic Sci Publisher, 2023. - P. 154-156. ISBN 978-9916-4-2232-8 (pdf)

ДОДАТОК

Публікації за темою роботи



управління лікуванням. Таким чином, розвиток трансдермальних систем з модифікованим вивільненням відкриває нові можливості для персоналізованої медицини та зміцнює їх роль у сучасному лікуванні.

Висновки.

Створення трансдермальної системи доставки ліків з модифікованим вивільненням забезпечить: покращення біодоступності активних інгредієнтів; контроль вивільнення лікарських засобів; безпеку та зниження побічних ефектів; комфорт лікування; підвищення потенціалу для розвитку фармацевтичної галузі.

ЛІПОСОМИ ЯК ПЕРСПЕКТИВНА СИСТЕМА ДОСТАВКИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Двінських Н.В., Хохленкова Н.В., Кащенко О.В.

Національний фармацевтичний університет, кафедра біотехнології, м. Харків, Україна, e-mail: begunova1203@gmail.com

Ліпосоми являють собою невеликі самозамкнені сферичні структури з концентричним ліпідним бішаром, які інкапсулюють в центрі водну фазу. Вони були відкриті в 1965 році і з тих пір широко використовуються завдяки їх унікальній здатності інкапсулювати гідрофільні агенти (гідрофільні ліки, ДНК, РНК тощо) у внутрішньому водному ядрі та гідрофобні ліки всередині ліпідної частини шарів, що робить їх універсальними терапевтичними носіями. Вони нетоксичні, забезпечують захист речовини, що міститься в них, від контакту з біологічним середовищем. Крім того, вони можуть забезпечувати доставку вмісту ліпосом у клітину при злитті їх мембрани з клітинною. Також ліпосоми поступово вивільняють лікарську речовину, що збільшує її час дії.

Переваги цих везикул як носіїв лікарських засобів очевидні: отримані з природних фосфоліпідів ліпосоми, на відміну від полімерних систем доставки повністю біосумісні та здатні до повної біодеградації, придатні для включення в них багатьох біомолекул, у тому числі ферментів, гормонів, вітамінів, антибіотиків, імуномодуляторів, цитостатиків, які є активними фармацевтичними інгредієнтами. Включені в ліпосоми лікарські речовини стають більш стійкими в організмі, оскільки ізольовані ліпідною мембраною від шкідливих впливів зовнішніх умов, зокрема, від руйнування в шлунково-кишковому тракті, і в свою чергу меншою мірою чинять загальнотоксичну дію на організм. Унікальною особливістю ліпосом є можливість доставки лікарських засобів до клітин, з якими вони взаємодіють, шляхом злиття або ендоцитозу. Модифікуючи мембрану ліпосом молекулами, що забезпечують «впізнавання» клітини або органу-мішені, можна здійснювати направлене транспортування лікарських засобів. Тому дослідження, спрямовані на розробку ліпосомальних лікарських засобів, є актуальними.

Мета дослідження: аналіз сучасних тенденцій у застосуванні ліпосом у медицині, шляхів маніпулювання фізико-хімічними характеристиками ліпосом для створення за їх допомогою гнучких систем доставки ліків, здатних впливати на різні захворювання.

Матеріали і методи дослідження. Методи опрацювання інформації з наукових публікацій та інших джерел: скринінг даних та їх порівняльний аналіз, систематизація.

Результати дослідження. За складом та способом доставки ліпосоми поділяють на:

- звичайні ліпосоми. Вони є першим поколінням ліпосом і складаються з позитивно заряджених, негативно заряджених або незаряджених фосфоліпідів і холестерину. Ці ліпосоми призначені для поліпшення терапевтичного індексу ліків, наприклад, таких як доксорубіцин та амфотерицин, які у інкапсульованому в ліпосоми вигляді мають меншу токсичність і поліпшену доставку ліків. Але такі ліпосоми, хоча й мають клінічну ефективність, швидко виводяться з організму;
- рН-чутливі ліпосоми. Коли ці ліпосоми стикаються зі зміною рН (зниженням), везикули дестабілізуються, тим самим вивільняючи їхній вміст. Вони є ідеальним транспортом для специфічної доставки протипухлинних препаратів, оскільки патологічні ракові тканини мають рН нижче за нормальний фізіологічний рівень;
- катіонні ліпосоми. Оскільки вони містять позитивно заряджений фосфоліпід, то можуть бути пов'язані іонними взаємодіями з негативно зарядженими нуклеїновими кислотами, такими як мРНК, молекули дволанцюгової РНК. Ці ліпосоми вважаються ідеальними для доставки генів;
- імуноліпосоми. Для їх створення антитіла або фрагменти антитіл зливаються з поверхнею ліпосом і можуть активно націлюватися на конкретну тканину через зв'язування зі специфічними для пухлинних клітин рецепторами. Ці ліпосоми можуть специфічно доставляти ліки до ракових клітин. Також вони демонструють перспективні результати в генній терапії для доставки ліків через гематоенцефалічний бар'єр;
- довго циркулюючі ліпосоми. Виготовляються з моносіалогангліозиду, поліетиленгліколю, похідних глюкуроніду тощо. Порівняно із звичайними ліпосомами, ці модифіковані ліпосоми не розпізнаються і не поглинаються спонтанно ретикулоендотеліальною системою, тому період напіврозпаду їх у крові збільшується. Вони пасивно дифундують в пухлинні тканини і є корисними для візуалізації та терапії пухлин.

У літературі описані різні методи одержання ліпосом. Це такі, як конвекційний, звуковий методи, метод високого тиску, метод розчинення та

видалення детергенту та метод випаровування зі зверненням фаз. Кожен із цих способів має свої особливості. Методом озвучування отримують з великих багатоламелярних або гігантських одношарових ліпосом, отриманих конвекційним методом, одношарові везикули діаметром 15-50 нм. Однак, цей метод не підходить для термочутливих речовин, як ДНК, білки тощо, які включають в ліпосоми, а також може призводити до окислення та гідролізу фосфоліпідів. Методом високого тиску отримують одношарові везикули, але лише у невеликій кількості. Для отримання великої кількості таких ліпосом використовують метод розчинення та видалення детергенту. Методом випаровування та звернення фаз отримують великі одношарові везикули. Порівняно з везикулами, отриманими методом гідратації тонкої плівки з наступною звуковою обробкою, ліпосоми, отримані методом випаровування зі зверненням фаз, мають більший об'єм захопленої водної фази та більшу ефективність інкапсуляції гідрофільних ліків. Але також останній метод має недолік – можливість денатурації деяких білків або розрив ланцюгів ДНК матеріалу, який підлягає інкапсуляції, в процесі механічної обробки.

Висновки.

Проведене інформаційно-аналітичне дослідження тенденцій застосування ліпосом для діагностики та терапії різних захворювань, що залежить від їх фізико-хімічних характеристик та особливостей, обумовлених способами отримання ліпосомальних носіїв та властивостями активних біомолекул, які в них завантажують, демонструє сучасність та перспективність ліпосомальних систем доставки. З'ясовані основні переваги та недоліки способів отримання ліпосом для виявлення перспектив створення та вдосконалення нових засобів з інкапсульованими ліками, та визначення можливості їхнього більш широкого використання у медичній практиці.

ПОЛІЕЛЕКТРОЛІТНІ КОМПЛЕКСИ АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ З ІНКОРПОРОВАНИМ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ

Рябов С.В., Кобріна Л.В., Штомпель В.І., Синельніков С.І.

Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, відділ модифікації полімерів, м. Київ, Україна, e-mail: sergii.riabov@gmail.com

Один із перспективних напрямків в сучасному підході до інкапсулювання лікарських препаратів пов'язаний з використанням поліелектролітних комплексів (ПЕК). Явища інтерполімерних взаємодій та утворення комплексів поліелектролітів є предметом інтенсивних фундаментальних та прикладних досліджень [1-5]. ПЕК доволі перспективний клас полімерних матеріалів для використання в різних галузях біотехнології, екології, мембранної технології, фармації та медицини тощо. Тому створення нових ПЕК є актуальною задачею хімії та модифікації полімерів, рішення якої може послужити основою для створення нових біоподібних матеріалів медико-біологічного призначення: засоби направленої доставки лікарських

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

YOUTH PHARMACY SCIENCE

МАТЕРІАЛИ
IV ВСЕУКРАЇНСЬКОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ З МІЖНАРОДНОЮ УЧАСТЮ

6-7 грудня 2023 року
м. Харків

Харків
НФаУ
2023

ШЛЯХИ СТАБІЛІЗАЦІЇ ЛІПОСОМАЛЬНИХ СИСТЕМ

Кащенко О.В.

Науковий керівник: Двінських Н.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

begunova1203@gmail.com

Вступ. Ліпосоми являють собою колоїдні частинки, що самоорганізуються, в яких ліпідний бішар інкапсулює частину навколишнього водного середовища. Таким чином, у ядрі ліпосом заключені водорозчинні речовини, а гідрофобний домен відповідає за уловлювання нерозчинних речовин.

З урахуванням таких унікальних властивостей застосування ліпосомної інкапсуляції інтенсивно вивчалася для розробки систем доставки нестабільних сполук (наприклад, протипухлинних засобів та інших лікарських сполук, ароматизаторів та біологічно активних речовин) та збереження їх функціональних властивостей.

Ліпосомальні системи широко застосовуються в медицині, фармацевтиці та косметології як системи доставки для трансдермального, перорального, парентерального введення в організм деяких лікарських та біологічно активних речовин, а також мають великі перспективи у харчових технологіях як харчові добавки, інкапсулятори ферментів, бактеріоцинів та стабілізаторів лабільних нутрієнтів.

Однак, обмежуючими факторами їх широкого використання є недосконалість способів утворення та наповнення ліпосом, а також проблема забезпечення їх стабільності у процесі зберігання, оскільки під впливом різних факторів може відбуватися порушення їх структури і, як наслідок, перехід активної речовини у зовнішнє середовище.

Таким чином, дослідження, спрямовані на виявлення закономірностей і механізмів утворення ліпосомальних систем, є актуальними.

Мета дослідження. Метою роботи є вивчення особливостей утворення стабільних ліпосомальних систем.

Матеріали та методи. Для виконання поставлених завдань використовували теоретичні методи скринінгу та аналізу літературних даних.

Результати дослідження. Ліпосоми отримують в різних формах, включаючи звичайні ліпосоми, поліморфні (катионні або фузогенні) ліпосоми і нереактивні (стерично стабілізовані, пегільовані або «приховані») ліпосоми.

Після введення *in vivo* звичайні ліпосоми адсорбують на своїй поверхні молекули опсонинів, в результаті чого відбувається розпізнавання та захоплення ліпосом клітинами ретикуло-ендотеліальної системи та швидке видалення їх з кровоносного русла.

Для подолання цих труднощів та поліпшення використання ліпосом як ефективних наноносіїв для доставки ліків, запропоновано використання полімерів для посилення структури ліпосом та забезпечення ліпосом просторовим бар'єром. Гнучка структура полімерних молекул дозволяє використовувати відносно невелику їх кількість для створення непроникної просторової оболонки, яка й запобігає злипанню ліпосом, знижує взаємодію з опсонінами сироватки крові та збільшує час циркуляції ліпосом у кровоносному руслі.

Для цього використовують поліелектроліти, гідрофільні та гідрофобні полімери. Через електростатичні взаємодії поліелектроліти можуть адсорбуватися на поверхні ліпосом з протилежними зарядами.

Як гідрофільний полімер при модифікації поверхні ліпосом найчастіше використовують поліетиленгліколь (ПЕГ). Стабілізація ліпосом досягається додаванням

холестерину або гідрофільного карбоксибетаїну. Цей полімер ковалентно зшивається з головками ліпідів та утворюються ліпосоми, які демонструють хорошу доставку гідрофільної лікарської речовини та збільшення часу циркуляції ліпосом у кровоносному руслі.

Відомі способи стабілізації ліпосом додаванням гідрофобних полімерів, таких як полідіацетилен та насичені ліпіди. Механізм їх впливу обумовлений зшиванням гідрофобних кінців ліпідів з утворенням полімерної сітки навколо ліпосоми або всередині ліпідного бішару. Було визначено, що така модифікація поверхні ліпосоми запобігає передчасному вивільненню інкапсульованої речовини.

ПЕГ, на думку багатьох дослідників, є «золотим» стандартом для стеричної стабілізації ліпосом, але відмічено, що він також має недоліки. Відомі побічні реакції від ПЕГ – дерматологічна та анафілактична реакція, гіперчутливість. А також, метод активного завантаження, який застосовується при наповненні стабілізованих ПЕГ ліпосом, придатний лише для обмеженої кількості речовин.

Тому продовжується активний пошук інших полімерів для стеричної стабілізації та модифікації ліпосом.

Висновки. На основі аналізу даних літератури визначено, що успіхи у розробці технологій отримання ліпосомальних систем великі. Але недоліки, які ще не подолані, є предметом пильної уваги дослідників, які працюють в напрямку створення ліпосомальних наноносіїв для фармацевтичного застосування, а також в косметології, харчовій та інших галузях.

УДОСКОНАЛЕННЯ СКЛАДУ СИРОПУ З ГЛУТАМІНОВОЮ КИСЛОТОЮ

Набока А.П.

Науковий керівник: Хохленкова Н.В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

hohnatal@gmail.com

Вступ. Промислове виробництво глютамінової кислоти обумовлене широким спектром напрямків її застосування. Дослідженнями, в тому числі клінічними, доведено, що глютамінова кислота бере активну участь у білковому та вуглеводному обміні; вона стимулює окиснювані процеси, сприяє виведенню з організму людини аміаку, підвищує стійкість організму людини до гіпоксії.

У нормальному здоровому організмі глютамінова кислота виробляється в достатній кількості, але з віком і при наявності різних патологій у людини її рівень може знижуватися. В такому випадку необхідно додаткове споживання глютамінової кислоти при внесенні у раціон продуктів з високим її вмістом або у вигляді дієтичних добавок.

Мета дослідження. Удосконалення складу сиропу з глютаміновою кислотою за рахунок введення антимікробних консервантів.

Матеріали та методи. Органолептичні, фармако-технологічні, мікробіологічні.

Результати дослідження. До складу досліджуваного лікарського сиропу входять ксиліт та фруктоза, сумарна концентрація яких становить 70 %, що за рахунок високого осмотичного тиску буде сприяти дегідратації клітин мікроорганізмів. Однак у процесі зберігання є вірогідна можливість проростання окремих представників мікрофлори, зокрема непатогенних дріжджів. Для забезпечення мікробіологічної чистоти при зберіганні до складу модельних зразків сиропу було додатково введено кислоту сорбінову, ніпагін, ніпазол,

Національний фармацевтичний університет

Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту

Кафедра біотехнології

Ступінь вищої освіти другий магістерський

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Промислова біотехнологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувачка кафедри
біотехнології

Наталя ХОХЛЕНКОВА

«03» жовтня 2023 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Олексію КАЩЕНКО

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Дослідження щодо створення ліпосомальних біопрепаратів»,
керівник кваліфікаційної роботи: Наталія ДВІНСЬКИХ, к.фарм.н., с.н.с.
(Ім'я, ПРИЗВИЩЕ, науковий ступінь, вчене звання)
затверджений наказом НФаУ від «16» жовтня 2023 року № 229
2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: 05.02.2024 р.
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: об'єкт дослідження – речовини, які використовують для отримання ліпосомальних частинок, їх властивості, технології ліпосомальних препаратів; мета – аналіз сучасних тенденцій у застосуванні ліпосом, шляхів маніпулювання фізико-хімічними характеристиками ліпосом для створення за їх допомогою гнучких систем доставки ліків, аналіз особливостей утворення стабільних ліпосомальних систем
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): вступ; огляд літератури; об'єкти і методи досліджень; експериментальна частина; висновки
6. Дата видачі завдання: «03» жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Формування напряму наукового дослідження, постановка проблеми	жовтень 2023	виконано
2	Аналітичний огляд літератури	жовтень 2023	виконано
3	Вибір об'єктів та методів дослідження	листопад 2023	виконано
4	Проведення досліджень	листопад 2023	виконано
6	Обробка результатів та оформлення кваліфікаційної роботи	грудень-січень 2023	виконано
8	Здача роботи до Екзаменаційної комісії	05 лютого 2024	виконано

Здобувач вищої освіти

(підпис) Олексій КАЩЕНКО
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

Керівник кваліфікаційної роботи

(підпис) Наталія ДВІНСЬКИХ
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 229
по Національному фармацевтичному університету
від 16 жовтня 2023 року

Про затвердження тем кваліфікаційних робіт

Затвердити теми кваліфікаційних робіт, керівників-консультантів та рецензентів здобувачам вищої освіти 2 курсу, спеціальність – 162 Біотехнології та біоінженерія, освітня програма – Промислова біотехнологія, ступінь вищої освіти – магістр, термін навчання – 1 р. 6 міс., денна форма здобуття освіти.

Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
Кащенко Олексій Віталійович	Дослідження щодо створення ліпосомальних біопрепаратів	Research on the creation of liposomal biological preparations	Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології, к.фарм.н., с.н.с. Двінських Н.В.	Начальник відділу фармацевтично і розробки ТОВ “БІОЛІК ФАРМА”, к.фарм.н., с.н.с. Назарова О.С.

В.о. ректора

Алла КОТВИЦЬКА

Вірно:
Декан факультету фармацевтичних технологій та менеджменту



Наталія ЖИВОРА

Ф А2.8-47-110

ВИСНОВОК

**Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі
здобувача вищої освіти**

№ 125553 від « 15 » січня 2024 р.

Проаналізувавши випускню кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Кащенко Олексія Віталійовича, 2 курсу, _____ групи, спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія, промислова фармація, на тему: «Дослідження щодо створення ліпосомальних біопрепаратів / Research on the creation of liposomal biological preparations», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копіляції).

**Голова комісії,
професор**



Інна ВЛАДИМИРОВА

1%

21%

ВІДГУК

наукового керівника на кваліфікаційну роботу магістерського ступеня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Олексія КАЩЕНКО

на тему: «Дослідження щодо створення ліпосомальних біопрепаратів»

Актуальність теми. Унікальні властивості ліпосом як структур, що самоорганізуються, та в яких ліпідний бішар захоплює частину навколишнього водного середовища, обумовили застосування ліпосомної інкапсуляції для розробки систем доставки нестабільних сполук (наприклад, протипухлинних засобів та інших лікарських речовин) та збереження їх функціональних властивостей. Однак, обмежуючими факторами їх широкого використання є недосконалість способів утворення та наповнення ліпосом, а також проблема забезпечення їх стабільності у процесі зберігання. Таким чином, дослідження, спрямовані на виявлення закономірностей і механізмів утворення ліпосомальних систем, є актуальними.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Ліпосомальні системи широко застосовуються в медицині, фармацевтиці та косметології як системи доставки в організм лікарських та біологічно активних речовин, а також мають великі перспективи у інших галузях для інкапсуляції ферментів, бактеріоцинів, лабільних нутрієнтів. В роботі окреслено коло проблем, які стосуються технологій отримання везикул, їх завантаження та стабільності, проаналізовано шляхи їх подолання. Проведений аналіз та зроблені висновки необхідні для проведення робіт з удосконалення складу ліпосомальних частинок, розробки технологічних процесів їх отримання, наповнення та стабілізації з урахуванням сучасних досягнень в цьому напрямку.

Оцінка роботи. У роботі розглянуто теоретичні питання та обґрунтовано актуальність обраної тематики, виконані скринінгові та аналітичні дослідження, які викладені послідовно та логічно. Зроблено висновки та запропоновано напрямки використання отриманих результатів.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту. Дана кваліфікаційна робота містить всі необхідні розділи, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт магістра та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії, а її автор заслуговує присвоєння кваліфікації «магістр з біотехнологій та біоінженерії».

Науковий керівник

_____ (підпис)

Наталія ДВІНСЬКИХ

(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

« 24 » січня 2023 р .

Ф А 2.2.1-32-356

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу _____Олексія КАЩЕНКО

(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

на тему: «Дослідження щодо створення ліпосомальних біопрепаратів»

Актуальність теми. Важливим завданням фармацевтичної розробки нових лікарських засобів є пошук шляхів спрямованої доставки ліків, їх біодоступності та тривалості дії. При вирішенні цього питання особливу увагу все частіше надають ліпосомам як універсальним терапевтичним носіям, які мають цілу низку переваг, а саме: неімуногенність, малотоксичність, легкість біодеградації в організмі. Тому аналіз сучасних тенденцій у застосуванні ліпосом у медицині, шляхів маніпулювання фізико-хімічними характеристиками ліпосом для створення за їх допомогою гнучких та одночасно стабільних систем доставки ліків є доцільним та актуальним.

Теоретичний рівень роботи. У роботі на достатньому теоретичному рівні проведено порівняльний аналіз та систематизація даних літератури щодо структури та видів ліпосомальних везикул, способів отримання ліпосомальних носіїв, шляхів удосконалення ліпосом. Опрацьовано особливості новітніх ліпосомоподібних наноструктур з покращеними характеристиками доставки ліків.

Пропозиції автора з теми дослідження. Створення нових та вдосконалення існуючих ліпосомальних засобів з інкапсульованими в них ліками, розробка новаторських ліпосомоподібних наноструктур з покращеними таргетними характеристиками є сучасною стратегією фармації, тому моніторинг та науковий аналіз стану ліпосомальних технологій в світі є обов'язковою складовою фармацевтичної розробки.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Проведений у роботі аналіз сучасних тенденцій отримання та стабілізації ліпосом, завантаження їх лікарськими речовинами, може бути використаний при розробці промислових технологічних схем виробництва на вітчизняних підприємствах для отримання ліпосомальних та ліпосомоподібних лікарських препаратів останнього покоління. Перспективність таких іновацій обґрунтовано в достатній мірі.

Недоліки роботи. В роботі є деякі невдалі вирази, деякі розділи можна було викласти менш докладно.

Загальний висновок і оцінка роботи. Робота містить всі необхідні розділи, розрахунки та дослідження, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт ступіня вищої освіти «магістр» та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії НФаУ.

Рецензент,

Начальник відділу фармацевтичної
розробки ТОВ «БІОЛІК ФАРМА,
к.фарм.н., с.н.с.



Назарова О.С.

«02» лютого 2023 р.

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 8

«05» лютого 2024 року

м. Харків

Засідання кафедри біотехнології

Голова: завідувачка кафедри, доктор фармацевтичних наук, професор
Наталя ХОХЛЕНКОВА.

Секретар: асистент закладу вищої освіти Аліна СОЛОВЙОВА.

ПРИСУТНІ: завідувачка кафедри Наталя ХОХЛЕНКОВА, професор
закладу вищої освіти Ольга ФІЛІПЦОВА, професор закладу вищої освіти
Лідія КРИЧКОВСЬКА, доцент закладу вищої освіти Ольга КАЛЮЖНАЯ,
доцент закладу вищої освіти Наталія ДВІНСЬКИХ, доцент закладу вищої
освіти Ольга ШАПОВАЛОВА, асистент закладу вищої освіти Аліна
СОЛОВЙОВА.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Про представлення до захисту до Екзаменаційної комісії випускних
кваліфікаційних робіт.

I. СЛУХАЛИ:

Здобувача вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія»
ОП «Промислова біотехнологія» денної форми 2 курсу 1 групи Олексія
КАЩЕНКА з доповіддю на тему «Дослідження щодо створення
ліпосомальних біопрепаратів» (керівник доцент закладу вищої освіти Наталія
ДВІНСЬКИХ).

УХВАЛИЛИ:

Рекомендувати до захисту кваліфікаційну роботу.

Голова

Завідувачка кафедри,
доктор фармацевтичних наук,
професор

Наталя ХОХЛЕНКОВА

(підпис)

Секретар

асистент закладу вищої освіти

Аліна СОЛОВЙОВА

(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**Направляється здобувач вищої освіти Олексій КАЩЕНКО

(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

до захисту кваліфікаційної роботи

за галуззю знань 16 Хімічна та біоінженеріяспеціальністю 162 Біотехнології та біоінженеріяосвітньою програмою Промислова біотехнологіяна тему: «Дослідження впливу нативних екзометаболітів на розвиток лактобактерій»

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ Наталія ЖИВОРА

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Олексій КАЩЕНКО рекомендується до захисту в Екзаменаційній комісії з кваліфікаційною роботою на тему: «Дослідження щодо створення ліпосомальних біопрепаратів».

Керівник кваліфікаційної роботи _____

Наталія ДВІНСЬКИХ

«31» січня 2024 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Олексій КАЩЕНКО допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри біотехнології _____

Наталя ХОХЛЕНКОВА

«05» лютого 2024 року

Кваліфікаційну роботу захищено

у Екзаменаційній комісії

«12» лютого 2024 р.

З оцінкою _____

Голова Екзаменаційної комісії,

кандидат сільськогосподарських наук

_____ / Олена ЩЕРБАК /