ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ С ПОМОЩЬЮ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО ДИОКСИДА УГЛЕРОДА.

В.К. Попов, Е.Н. Антонов, С.Э. Богородский, Л.И. Кротова (ИПЛИТ РАН), Е.А. Марквичева, Л.Д. Румш (ИБХ РАН, г.Москва), И.И. Агапов (МГУ им. М.В. Ломоносова)
А. Нейлор, С.М. Хоудл (Ноттингемский Университет, Великобритания).

Разработка и создание новых лекарственных препаратов адресного и пролонгированного действия является одним из наиболее перспективных направлений развития современной фармакологии. Биорезорбируемые полимерные микрочастицы определенного химического состава, размера и внутренней структуры составляют методологическую основу различных подходов к решению этой задачи [1, 2]. К микрочастицам-носителям предъявляются высокие требования по токсичности и биосовместимости [3], а также по контролируемости кинетики выхода из них биологически активных компонентов в кровь или определенные ткани человеческого организма [4]. При этом, в идеале, сами микрочастицы не должны подавлять активность этих препаратов как в момент формирования самих микрокапсул, так в течение периода времени, требуемого для достижения необходимого терапевтического эффекта [5].

До недавнего времени выполнение всех вышеперечисленных требований представлялось практически нереализуемым. Дело в том, что традиционные методы и технологии производства этих структур основаны либо на использовании органических растворителей (ацетон, хлороформ, и др.) с последующим весьма дорогостоящим и не всегда эффективным циклом удаления их следов, либо на применении относительно высокой (до 100^{o}C и выше) температуры. И то, и другое может приводить к существенному снижению биоактивности лекарственных компонентов, а также к неконтролируемому изменению свойств самих полимерных частиц [6]. Кроме того, это резко сужает круг практически ценных и разрешенных в клинической практике термолабильных биоактивных соединений и полимеров, которые могли бы быть использованы для решения широкого круга биомедицинских задач.

Коренным образом ситуация изменилась в 90-х годах прошлого столетия, когда для решения этой проблемы начали использовать сверхкритические флюиды (СКФ) [7]. Большое количество работ посвящено методу RESS - быстрого расширения сверхкритических растворов (Rapid Expansion of Supercritical Solution) полимеров и биологически активных веществ [8, 9]. Однако, в этом случае необходимо обеспечить растворение всех исходных компонент в СКФ, что, в силу не достаточно высокой растворяющей способности последнего, часто бывает невозможно реализовать без использования уже упоминавшихся выше органических со-растворителей [10]. Другим широко используемым методом является сверхкритическое антисольвентное осаждение (Supercritical Anti-Solvent - SAS), в процессе которого происходит образование микрочастиц из органического раствора полимера и лекарственного препарата при его взаимодействии с СКФ, обладающим более слабой (по сравнению с органическим растворителем) растворяющей способностью [11]. Понятно, что и в этом случае избежать присутствия следовых количеств токсичных растворителей в конечном продукте практически невозможно.

Предложенный (впервые в России) и разрабатываемый в ИПЛИТ РАН совместно с Ноттингемским Университетом (Великобритания) метод получения микрочастиц из пластифицированных под действием СКФ биорезорбируемых полимеров – PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions), позволяет получать полимерные микрочастицы, однородно наполненные как растворимыми, так и нерастворимыми (в отличие от метода RESS) в СКФ компонентами [12-17]. При этом синтез можно проводить при температурах, близких к комнатной, и (в отличие от метода SAS) не требуется применения органических растворителей. Одновременно может происходить удаление (экстракция) и других растворимых в СКФ токсичных соединений (непрореагировавшие мономеры и низкомолекулярные олигомеры, инициаторы полимеризации, пластификаторы и т.д.), что существенно повышает биохимические характеристики конечных продуктов.

Принцип получения полимерных микрочастиц, содержащих биологически активные соединения (БАС) проиллюстрирован на Рис.1.

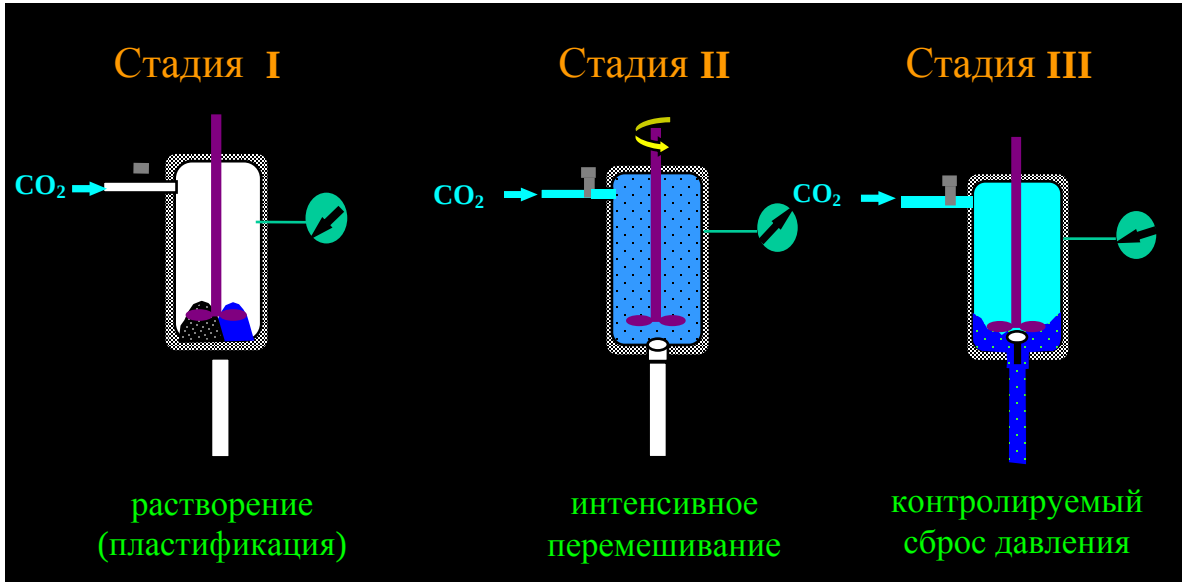

Рис.1. Принцип формирования биоактивных полимерных микрочастиц методом PGSS.

Смесь БАС и полимера загружается в камеру высокого давления. Затем в нее нагнетается CO_2 при комнатной температуре до давления порядка 5МПа и включаются нагреватели. По мере разогрева, давление в камере увеличивается и (при достижении температуры 35°С) доводится до требуемой величины – 10÷20МПа (Стадия I). После этого включается механический смеситель и система выдерживается в этих условиях 30-60 минут. При этом устанавливается определенный режим пластификации и происходит гомогенизация смеси пластифицированного полимера с БАС (Стадия II). Затем производится импульсно-периодический сброс полученной смеси в приемную камеру (с помощью импульсного сопла и пневмоклапана, управляемого от компьютера) и образование полимерных микрочастиц (Стадия III).

Исследования процессов СКФ формирования биорезорбируемых микрочастиц с инкапсулированными в них БАС проводились на экспериментальной установке, схема которой представлена на Рис.2. В верхнем фланце камеры находятся ввод и вывод для газа, цифровой манометр, а также предохранительный клапан, предотвращающий несанкционированный рост давления выше установленного значения (~30МПа). В этом фланце также имеется магнитная муфта, передающая крутящий момент от электропривода на смеситель. В качестве систем инжекции полимерных композиций из реакционной камеры в атмосферу использовались сопла Шлика (Schlik) с полым конусом и диаметром 100÷200мкм. Приемная емкость из нержавеющей стали объемом 2000см^3 обеспечивала сбор образующихся микрочастиц, агломератов или волокон, а также позволяла изучать зависимость геометрических характеристик полученных частиц от расстояния до дна приемной камеры.

Оценка размеров и морфологии поверхности полимерных микрочастиц частиц проводилась на основе анализа снимков полученных с помощью оптической и сканирующей электронной микроскопии (Рис.2 и 3).

Рис.2. Установка PGSS.

При использовании в качестве исходного материала низкомолекулярного поли-ε-капролактона (M_w ~ 5000) практически во всем рабочем диапазоне температур и давлений были получены мелкодисперсные частицы и их агломераты. Средний размер частиц варьировался в пределах от 7 до 18 мкм, а размер их агломератов - от 30 до 130 мкм (Рис.3.а).

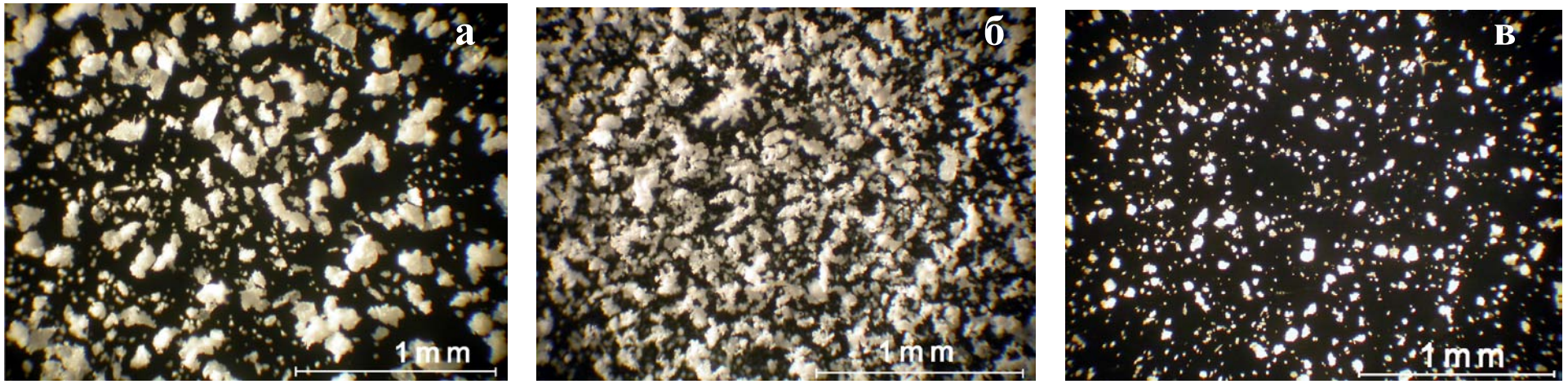

Рис.3. Фотографии микрочастиц и агломератов низкомолекулярных ε-поликапролактона (а) и D,L-полилактида, полученных без (б) и с использованием (в) акустического воздействия.

В случае низкомолекулярного D,L-полилактида (M_w ~ 11000) как общие закономерности процесса, так структура полученных в его результате микрочастиц и их агломератов были схожи с ПКЛ (Рис.3.б). С той лишь разницей, что характерный размер частиц и их агломератов был несколько больше и лежал в диапазоне 15 ÷ 25 мкм и 50 ÷ 200 мкм соответственно. При использовании мощного (до 100 Вт/см^2) акустического (частота ~18кГц) воздействия на пластифицированный в ск-CO_2 D,L-полилактид можно достигнуть существенного снижения его вязкости, приводящего к заметным изменениям морфологии конечных продуктов. Так, средний размер микрочастиц низкомолекулярного полилактида уменьшился до 5-12 мкм, а размер их агломератов до 30-70 мкм. Кроме того, форма большинства из них существенно приблизилась к сферической (Рис.3.в).

При использовании высокомолекулярного D,L-полилактида (M_w ~ 75000) в наших экспериментах образовывались уже не индивидуальные микрочастицы и их агломераты, а пористые нити и волокна, диаметры которых в среднем незначительно увеличивались с увеличением диаметра выходного отверстия сопла от 200 до 500 мкм и составляли величину от 20 до 700 мкм (Рис.4а и 4в). Это связано, прежде всего, с более высокой вязкостью пластифицированного высокомолекулярного полимера, вследствие чего и не реализуются условия образования полимерных “микрокапель” на срезе сопла.

В течение последних нескольких лет нами были исследованы процессы формирования полилактидных микрочастиц однородно наполненных спирторастворимыми ранозаживляющими экстрактами подорожника и календулы (Рис.5) [17], трипсином, рибосом-инактивирующим белком (вискумином) [16] и синтетическим пептидом TRAP-6 при смешении исходных компонентов непосредственно в атмосфере ск-CO_2 с последующим распылением пластифицированной смеси в ресивер атмосферного и повышенного давления.

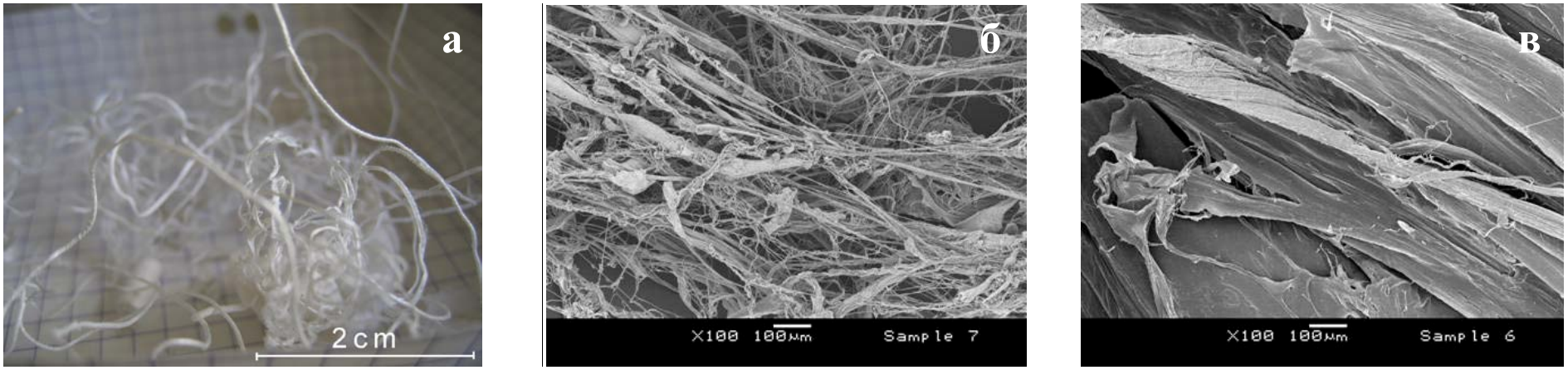

Рис.4. Оптическая и сканирующая электронная микроскопия образцов волокон и нитей высокомолекулярного D,L-полилактида, полученных без (а, б) и с использованием (в) акустического воздействия.

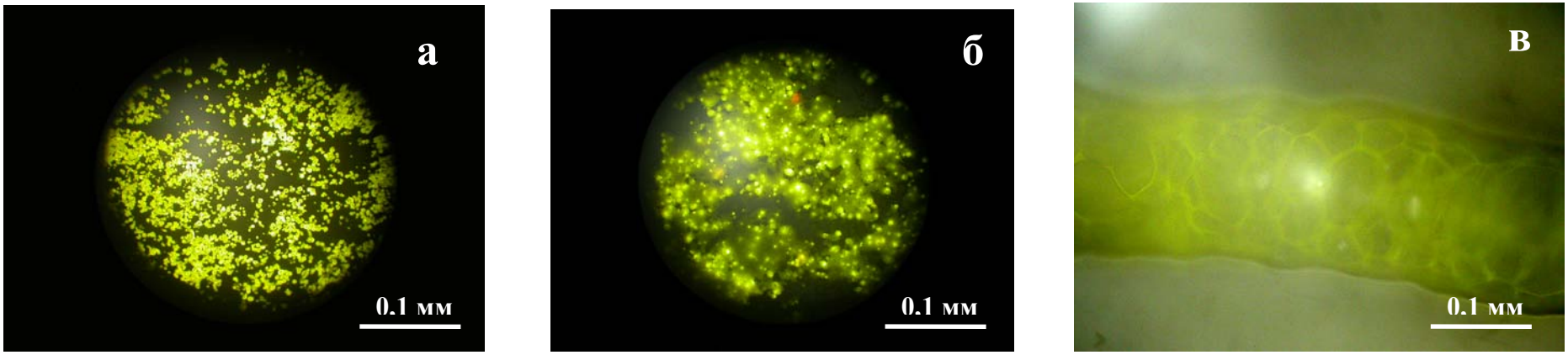

Рис.5. Флуоресцентная микроскопия образцов мелкодисперсных порошков экстрактов подорожника и календулы (а) инкапсулированных в микрочастицы низкомолекулярного (б) и нити высокомолекулярного (в) D,L-полилактидов методом PGSS.

Исследованы цитотоксические свойства вискумина, включенного в биорезорбируемые полилактидные микрочастицы методом СКФ инкапсуляции, после его высвобождения из матрицы. Использование тест-систем на основе моноклональных антител MNA4 и MNA9-bi позволило выявить вискумин, высвободившийся при деградации полилактидной матрицы. В течение 120 часов высвободилось 6,75 % от первоначально инкапсулированного токсина. Цитотоксическая активность вискумина, подвергавшегося и не подвергавшегося инкапсуляции

различаются незначительно. Процедура СКФ инкапсуляции практически не влияет на цитотоксические свойства вискумина и позволяет внедрять в биорезорбируемые полимеры такие белковые препараты, которые не могут быть инкапсулированы традиционными способами.

Разработка методов СКФ микронизации и инкапсуляции биоактивных компонентов в биорезорбируемые полимерные микрочастицы с целью получения новых готовых лекарственных форм (ГЛФ) с заданными фармакокинетическими свойствами, безусловно, носит приоритетный характер. Результаты этих работ позволят реализовать качественно новые возможности для создания высокоэффективных форм лекарственных препаратов адресного и пролонгированного действия для лечения целого ряда социально-значимых заболеваний. Важным преимуществом данного подхода по отношению к уже существующим методам является простота реализации всех вышеперечисленных процессов практически в одном цикле с использованием дешевого диоксида углерода. Особая важность этих исследований обусловлена тем, что сегодня на Российском фармацевтическом рынке присутствуют лишь иностранные производители ГЛФ с пролонгированными фармакокинетическими свойствами. Разработка и внедрение в фармацевтическую промышленность технологий СКФ микронизации и инкапсуляции позволит создать условия для импортозамещения указанных ГЛФ, что приведет как к снижению их стоимости, так и повышению уровня биобезопасности в Российской Федерации.

Литература.

1. Sakiyama-Elbert S.E., Hubbell J.A., *J. Controlled Release,* **65**, 389–402, 2000.
2. Marler J.J., Upton J., Langer R., Vacanti J.P. *Adv. Drug Del. Rev.,* **33**, 165–182, 1998.
3. Hubbell J.A. *Curr. Opin. Biotechnol,.* **10**, 123–129, 1999.
4. Whitaker M.J., Quirk R.A., Howdle S.M., Shakesheff K.M. *J. Pharm. Pharmacol*, **53**, 1427–1437, 2001.
5. Sakiyama-Elbert S.E., Panitch A., Hubbell J.A. *FASEB J.,* **15**, 1300–1302, 2001.
6. Griffith L.G. *Acta Mater.,* **48**, 263–277, 2000.
7. Hauthal W.H. Chemosphere, **43**, 123-135. 2001.
8. Kim J.H., Paxton T.E., Tomasko D.L., *Biotechnol. Prog.* **12**, 650–661, 1996.
9. Matsuyama K., Mishima K., Hayashi K.I., Ishikawa H., Matsuyama H., Harada T. *J. Appl. Polym. Sci.,* **89**, 742–752, 2003.
10. Kompella U.B., Koushik K. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.,* **18**,173–199, 2001.
11. Xu Q., Han B., Yan H. *J. Appl. Polym. Sci.,* **8**, 2427–2433, 2003.
12. S.M. Howdle, M.S. Watson, M.J. Whitaker, V.K. Popov, M.C. Davies, F.S. Mandel, J.D. Wang, K.M. Shakesheff. *Chem.Commun.*,109-110, 2001.
13. Баграташвили В.Н., Богородский С.Э., Попов В.К., Хоудл С.М. *Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика*, **2** (1), 53-60, 2007.
14. Tai H., Popov V.K., Shakesheff K.M., Howdle S.M. *Biochemical Society Transactions*, **35**, 516-521, 2007.
15. Попов В.К. *Альманах клинической медицины*, **XVII**, (2), 124-127, 2008.
16. Хапчаев Ш.Ю., Агапов И.И., Мойсейнович М.М., Рамонова А.А., Богородский С.Э., Попов В.К. *Биотехнология*, **5**, 43-49, 2008.
17. Антонов Е.Н., Богородский С.Э., Фельдман Б.М., Марквичева Е.А., Румш Л.Д., Попов В.К. *Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика*, **3** (1), 34-42, 2008.