



На правах рукописи

Кусков Андрей Николаевич

**Амфифильные полимеры N-винилпирролидона и
наноразмерные лекарственные формы
на их основе**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени доктора
химических наук

Москва - 2017

Работа выполнена в Учебно-научном центре магистерской подготовки «Биоматериалы» ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Научный консультант: доктор химических наук, профессор
Штильман Михаил Исаакович
руководитель Учебно-научного центра магистерской подготовки «Биоматериалы» ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Официальные оппоненты: академик РАН, доктор технических наук, профессор
Береговых Валерий Васильевич
заведующий кафедрой промышленной фармации
ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор химических наук, профессор
Варламов Валерий Петрович
заведующий лабораторией инженерии биополимеров
Института биоинженерии Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук

доктор химических наук, профессор
Чалых Анатолий Евгеньевич
заведующий лабораторией структурно-морфологических исследований Института физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Защита состоится «20» сентября 2017 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 999.095.03 _____ Шакир И.В.

Актуальность проблемы

Наноразмерные системы в последнее время привлекают широкое внимание в качестве препаратов, используемых в различных областях медицины и биотехнологии.

Особую актуальность при этом представляет использование в качестве носителей и модификаторов биологически активных веществ (**БАВ**) наноразмерных систем, получаемых на основе полимеров. В том числе это относится к таким средствам доставки БАВ, содержащим полимерные компоненты, как липосомы, модифицированные амфифильными полимерами, и полимерные наночастицы (**ПН**).

В настоящее время медицина располагает широким арсеналом лекарственных субстанций, однако в большом количестве случаев их потенциальная эффективность значительно снижается при применении. Наиболее часто для повышения эффективности лечения используют повышенные дозы БАВ. Это приводит к повышению неспецифической токсичности БАВ, а в случаях с сильнодействующими БАВ, побочные эффекты могут превышать терапевтическую эффективность препарата.

Создание новых полимерных наноразмерных форм БАВ является одним из перспективных путей решения данной проблемы. Благодаря особенностям физико-химических свойств и строения макромолекул полимерные наноносители позволяют обеспечить пролонгированное действие и контролируемое выделение БАВ, и повысить локальную концентрацию терапевтического агента в очаге поражения. Тем не менее, общим недостатком используемых в медико-биологических областях полимеров остается низкая биосовместимость и избирательность действия лекарственных форм на их основе, а также сложность регулирования процесса иммобилизации БАВ.

Это подтверждает необходимость и актуальность создания новых амфифильных полимеров, обладающих более высокой степенью безвредности и биосовместимостью, и способных в мягких условиях формировать наночастицы и иммобилизовать БАВ. В том числе это относится к производным низкомолекулярных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона (**ВП**), широко используемых в составе различных медицинских изделий и препаратов. К настоящему времени потребности в таких полимерах и полимерных наноносителях не являются многотоннажными, но их разработка и получение крайне важны для развития фармацевтической отрасли и биотехнологии.

Таким образом, разработка новых амфифильных полимеров и систем доставки БАВ на их основе является актуальным направлением современной полимерной химии, фармакологии, медицины и биотехнологии.

Цель и задачи исследования

Цель данной работы состояла в создании научных основ и методологических подходов к получению амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона с контролируемым строением гидрофильной и гидрофобной частей, и к формированию на их основе безвредных, биосовместимых наноразмерных носителей для применения в биомедицинских областях.

Для достижения данной цели в работе необходимо было решить следующие основные задачи:

– Разработать и оптимизировать методы синтеза амфифильных полимеров N-винилпирролидона, содержащих одну концевую алифатическую гидрофобную группу различного строения и отличающихся молекулярной массой полимерного фрагмента.

– Разработать и оптимизировать способы получения наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона (**ПВП**), в том числе содержащих функциональные группы различной природы, и липосом, модифицированных амфифильными полимерами.

– Выявить влияние химического строения амфифильных полимеров на их способность образовывать наноразмерные системы в водных средах и встраиваться в липосомальные мембраны.

– Исследовать взаимодействие амфифильных полимеров N-винилпирролидона, наночастиц на их основе, и липосом, модифицированных полимерами, с различными биологическими объектами, клеточными системами и опытными животными в условиях *in vitro* и *in vivo*, определить их биосовместимость и токсикологические характеристики.

– Исследовать взаимодействие амфифильных полимеров N-винилпирролидона разного строения с низкомолекулярными (нистатин, амфотерицин В, индометацин) и высокомолекулярными (соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк, фактор крови IX) биологически активными соединениями. Изучить влияние строения амфифильных полимеров ВП, методов и условий иммобилизации различных биологически активных и лекарственных субстанций на степень и эффективность их включения.

– Выявить влияние иммобилизации биологически активных и лекарственных веществ в наноразмерные формы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона на их биосовместимость, параметры токсичности, и эффективность действия в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна

В рамках специальности «Высокомолекулярные соединения»:

– Впервые разработаны методы синтеза новых амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона, показаны пути регулирования молекулярной массы гидрофильного фрагмента полимера, природы алифатического гидрофобного фрагмента и массового соотношения гидрофобной и гидрофильной частей синтезируемых полимеров для оптимизации свойств лекарственных форм, созданных на их основе.

– Разработаны методы синтеза новых функциональных амфифильных полимеров, содержащих эпоксидные, альдегидные, аминокислотные и другие группы и показана возможность их использования при создании носителей для направленного транспорта БАВ в организме.

– Определены условия синтеза полимеров с регулируемой молекулярной массой гидрофильного полимерного фрагмента в диапазоне 1000-15000 Да, различной длиной n-алкильного (от $-C_8H_{17}$ до $-C_{21}H_{43}$) или ди-n-алкильного (от $(C_8H_{17})_2$ до $(C_{18}H_{37})_2$) концевых гидрофобных фрагментов, содержанием боковых функциональных групп различной природы (эпоксидные, альдегидные, аминогруппы), пригодных для получения полимерных наночастиц и для модификации липосомальных мембран.

– Установлено, что полученные амфифильные производные N-винилпирролидона, содержащие гидрофильный полимерный фрагмент с молекулярной массой 2000-10000 Да и один гидрофобный алифатический n-алкильный (от $-C_8H_{17}$ до $-C_{21}H_{43}$) или ди-n-алкильный (от $(C_8H_{17})_2$ до $(C_{18}H_{37})_2$) фрагмент различной длины при определенных концентрациях самопроизвольно образуют в водных средах организованные наноразмерные структуры. Показано, что размеры образующихся ассоциатов полимерных молекул находятся в нанометровом диапазоне и составляют от 30 до 300 нм, имеют сферическую форму, а их строение и свойства зависят от способа и условий их получения, а также от массового соотношения гидрофильной и гидрофобной частей полимера.

В рамках специальности «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»:

– Впервые проведено исследование цитотоксичности, гемотоксичности и острой токсичности полученных амфифильных полимеров ВП и наночастиц на их основе в условиях *in vitro* и *in vivo* и показана их высокая биосовместимость.

– Впервые изучены и охарактеризованы липосомы, модифицированные амфифильными производными поли-N-винилпирролидона. Установлено, что модификация липосомальных мембран амфифильными полимерами ВП с молекулярной массой гидрофильного полимерного фрагмента 2000 – 8000 Да и одной концевой гидрофобной октадецильной группой ведет к увеличению стабильности модифицированных липосом при хранении и против воздействия различных дестабилизирующих факторов (циклы заморозки-разморозки, поликатионы, рН среды, детергенты, компоненты крови), увеличению времени их циркуляции в крови и уменьшению накопления в печени экспериментальных животных, а также к повышению эффективности включенных в них противогрибковых антибиотиков нистатина и амфотерицина В в условиях *in vitro*. Показано влияние содержания модифицирующего полимера в липосомах и молекулярной массы его гидрофильного фрагмента на их устойчивость.

– Впервые получены наноразмерные полимерные частицы из амфифильных полимеров N-винилпирролидона различного строения. Показано, что, варьируя состав амфифильных полимеров ВП, можно получать наночастицы с разным размером, распределением по размерам, поверхностным зарядом и высокой стабильностью при хранении, лиофилизации и при взаимодействии с биологическими объектами, компонентами крови, клетками и тканями организма в условиях *in vitro* и *in vivo*.

– Показано, что наноразмерные частицы на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона могут быть использованы в качестве носителей БАВ различной природы с высокой эффективностью. Впервые были получены полимерные наноносители, содержащие фактор крови IX, соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк и его производные (препараты белковой природы, обладающие противовоспалительным и антиканцерогенным действием), противовоспалительный препарат индометацин.

– Проведено сравнение различных методов получения частиц-наноносителей (диализ, эмульсионный метод и т.д.), определены оптимальные условия получения наноразмерных форм введения с высоким содержанием включенного БАВ для каждой из исследованных модельных субстанций (концентрация полимера, размер его гидрофильной и гидрофобной частей, тип растворителя, массовое соотношение полимера и БАВ).

– В условиях *in vitro* и *in vivo* установлены преимущества новых полимерных наноразмерных форм с иммобилизованными БАВ по сравнению с неиммобилизованными БАВ, заключающиеся в повышенной или сравнимой эффективности, пролонгированном профиле выделения и пониженной токсичности по отношению к культурам клеток или в организме экспериментальных животных.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты работы являются теоретической и практической основой для дальнейших разработок в области фармакологии, биотехнологии и полимерной химии с использованием амфифильных полимеров ВП контролируемого строения в качестве основы новых систем доставки БАВ и лекарственных форм.

Практическая значимость работы заключается в создании и подтверждении возможности применения простого и доступного способа получения наноразмерных суспензионных лекарственных форм и систем доставки БАВ, где в качестве носителей выступают самоорганизующиеся системы на основе новых амфифильных полимеров ВП различного контролируемого строения.

Разработан оригинальный, простой и универсальный метод получения биосовместимых амфифильных полимеров с различным контролируемым строением гидрофильной и гидрофобной частей и полимерных наноносителей на их основе, практическая значимость которого состоит в возможности получать наноразмерную форму

различных по строению и свойствам биологически активных веществ, сочетающую биосовместимость, направленную доставку в организме, сниженную эффективную дозу иммобилизованного БАВ и его пролонгированное, контролируемое действие.

Показана возможность повышения специфической активности, снижения терапевтических доз и достижение пролонгированного действия новых полимерных систем доставки на основе амфифильного ПВП с иммобилизованными биологически активными веществами по сравнению с неиммобилизованными формами этих же БАВ.

Применение водных суспензий наночастиц амфифильного ПВП дает возможность создавать инъекционные, трансмукозальные, и парентеральные формы введения для плохорастворимых и нерастворимых БАВ.

Разработаны методы получения наноразмерных форм БАВ на основе полимерных носителей, сочетающих высокую биосовместимость и эффективность включения активного вещества. Показана возможность использования для этих целей компонентов и мягких условий, позволяющих сохранять структуру и свойства иммобилизованных БАВ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Методы получения новых амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона, в том числе функциональных, с контролируемым массовым соотношением гидрофильной и гидрофобной частей.

2. Двухстадийный и одностадийный методы синтеза амфифильных полимеров с введением одной концевой гидрофобной группы различной природы и дополнительных боковых функциональных групп как эффективные способы модификации для регулирования физико-химических свойств и поведения полимеров и сополимеров в водных средах.

3. Формирование монодисперсных полимерных наночастиц из амфифильных полимеров ВП и липосом, модифицированных амфифильными полимерами, методами самопроизвольной ассоциации амфифильных молекул полимера в водных средах.

4. Влияние строения гидрофильного и гидрофобного фрагмента полимера и его концентрации на реализацию процесса самосборки амфифильных молекул полимера в полимерные наночастицы.

5. Научные подходы, позволяющие с помощью полимерных наночастиц и липосом, модифицированных полимерами, эффективно иммобилизовать различные биологически активные вещества, повышая их стабильность и биосовместимость в организме, эффективность их действия и снижая их токсичность.

6. Регулирование свойств полимерных лекарственных форм, таких как размер наночастиц и распределение их по размерам, эффективность иммобилизации БАВ, путем изменения строения амфифильных полимеров, их концентрации, массового соотношения с БАВ и метода получения наноразмерных частиц-носителей (эмульсионный метод, диализ, прямое растворение).

7. Пути реализации процессов включения низкомолекулярных и высокомолекулярных биологически активных и лекарственных веществ различной природы в полимерные наноносители, обеспечивающие высокую степень включения, уровень безвредности, биосовместимость и биологическую активность получаемых систем доставки БАВ.

Апробация работы

Основные положения диссертации докладывались на международных и всероссийских научных конференциях и семинарах (в виде устных докладов и с опубликованием тезисов), в том числе: 6th International Conference "Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery" (London, England, 2003); 3rd Annual Meeting and

Exposition of the Controlled Release Society (Vienna, Austria, 2006); XVI International conference on bioencapsulation (Dublin, Ireland, 2008); 76th Prague Meeting on Macromolecules «Polymers in Medicine» (Prague, Czech Republic, 2012); 51st Congress of the European Societies of Toxicology (Porto, Portugal, 2015); International conference «Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues (Bionanotox)» (Heraklion, Crete, Greece, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017); Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005, 2006, 2007, 2010, 2015, 2016, 2017).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 оригинальных статей в журналах, рекомендованных ВАК, более 50 тезисов докладов на российских и международных конференциях, получено 8 патентов Российской Федерации.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы из 320 наименований. Работа изложена на 327 страницах и включает 83 рисунка и 35 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основными задачами работы являлись: разработка методов синтеза и анализ строения и свойств амфифильных полимеров N-винилпирролидона с разным размером и строением гидрофильного фрагмента ПВП и гидрофобного длинноцепного алкильного фрагмента, в том числе, содержащих дополнительные функциональные группы (1); исследование их поведения в водных средах с самопроизвольным образованием наноразмерных полимерных агрегатов и изучение свойств таких наночастиц (2); изучение биосовместимости и особенностей взаимодействия амфифильных производных ПВП и наночастиц на их основе с живыми клетками, тканями и органами (3); поиск возможности использования разработанных полимерных наноносителей в составе новых лекарственных форм для доставки БАВ в организме (4).

При этом для синтеза амфифильных полимеров N-винилпирролидона был использован путь синтеза диблочных семителехелевых полимеров, состоящих из двух блоков – гидрофильного блока полимера этого мономера и одной концевой длинноцепной алифатической группы, выполняющей роль гидрофобного блока.

В качестве синтетического подхода в работе была использована радикальная полимеризация в присутствии вещественного инициатора и передатчика цепи. В качестве последнего в работе было использовано два типа передатчиков цепи: низкомолекулярные меркаптаны, содержащие дополнительные функциональные группы, позволяющие на второй стадии синтеза ввести в полимер концевую гидрофобную группу, и передатчик цепи, уже содержащий гидрофобный фрагмент (хлорангидрид длинноцепной карбоновой кислоты). В последнем случае целевой продукт был получен в одну стадию.

Следует отметить, что проведение радикальной полимеризации в присутствии передатчиков цепи позволило решить еще одну важную задачу - оптимизировать молекулярную массу полимерного фрагмента, что было важно с точки зрения получения амфифильного полимера, легко образующего наноразмерные агрегаты. С другой стороны, метод радикальной полимеризации удобен для проведения сополимеризации с функциональными сомономерами для введения в полимер дополнительных функциональных группы, пригодных для связывания различных лигандов.

Синтезированные амфифильные полимеры N-винилпирролидона в данной работе были использованы для получения полимерных наночастиц и модификации липосом.

Изучены свойства полученных наночастиц в зависимости от строения амфифильных полимеров и от условий получения наночастиц.

Кроме того, для изучения биологической совместимости разработанных полимерных наночастиц и модифицированных полимерами липосом были проведены исследования взаимодействия амфифильных полимеров с компонентами крови, их влияния на реологические свойства крови, их цитотоксичности и острой токсичности в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Разработаны готовые лекарственные формы ряда модельных биологически активных и лекарственных веществ, в числе которых белковые молекулы (соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк, фактор крови IX), противогрибковые антибиотики (нистатин и амфотерицин В), нестероидные противовоспалительные препараты (индометацин). В данной работе были исследованы свойства полученных наноразмерных форм этих веществ, изучена их биосовместимость, токсичность и биологическая активность.

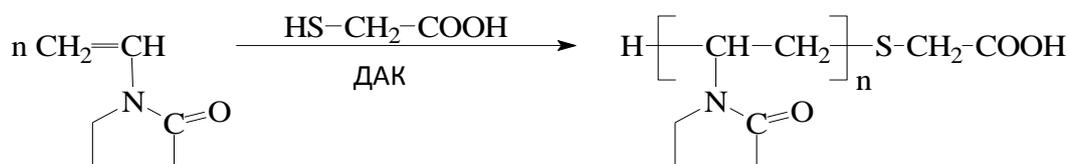
1. Получение и исследование амфифильных полимеров N-винилпирролидона

Для получения амфифильных производных ПВП с разным строением гидрофильного и гидрофобного фрагментов в работе использовались два основных метода синтеза – двухстадийный и одностадийный.

В двухстадийном методе на первом этапе для получения семителехелевых полимеров ВП с разным и регулируемым значением молекулярной массы, содержащих одну концевую функциональную группу на макромолекулу полимера, проводили радикальную полимеризацию мономера в присутствии инициатора – динитрила азоизомасляной кислоты (ДАК) и передатчика – меркаптана. В качестве регулятора роста цепи, содержащего концевую функциональную группу, использовали меркаптоуксусную кислоту (МУК), меркаптопропионовую кислоту (МПК) или 2-меркаптоэтиламин (МЭА).

Полученные результаты показали, что при невысоких концентрациях меркаптанов могут быть получены с достаточно высоким выходом низкомолекулярные полимеры с контролируемыми молекулярными массами в диапазоне, необходимом для создания на их основе наноразмерных систем доставки БАВ ($M_n = 1500-15000$ Да). При этом активность меркаптанов в качестве регуляторов роста цепи уменьшалась в ряду МУК, МПК, МЭА.

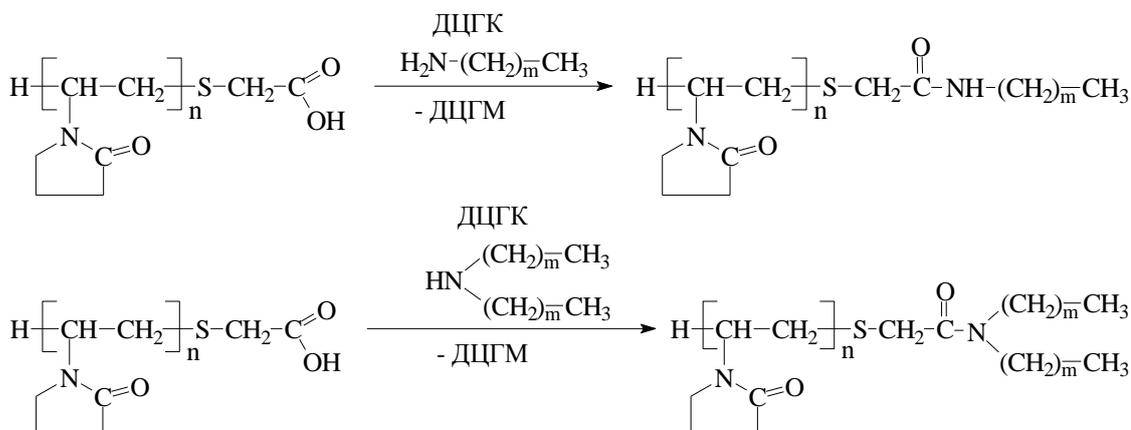
В общем виде реакции полимеризации ВП в присутствии функциональных меркаптанов могут быть представлены следующим образом (на примере МУК):



В результате радикальной полимеризации ВП в присутствии инициатора (ДАК) и регулятора роста цепи (МУК, МПК или МЭА) были получены семителехелевые полимеры с различными, контролируемыми значениями молекулярной массы, содержащие одну концевую функциональную группу, входящую в состав меркаптана (карбоксылную или аминную).

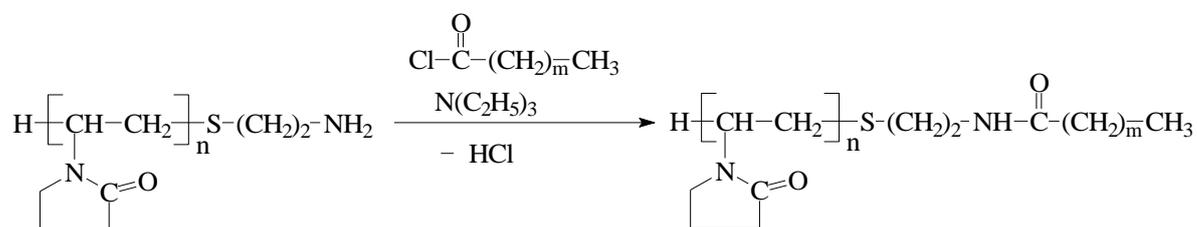
На втором этапе получения амфифильных производных ПВП присоединение к полученным семителехелевым полимерам концевой гидрофобной группы проводили взаимодействием карбоксилсодержащих полимеров, карбоксильная группа которых была активирована N,N'-дициклогексилкарбодимидом (ДЦГК) с длинноцепными первичными или вторичными алифатическими аминами различного строения (н-гексиламин, н-октиламин, н-додециламин, н-гексадециламин, н-октадециламин, ди(н-гексил)амин, ди(н-

октил)амин, ди(н-додецил)амин, ди(н-октадецил)амин), с выделением N,N'-дициклогексилмочевины (ДЦГМ). Общая схема синтеза амфифильных производных из семителехелевых полимеров N-винилпирролидона, содержащих концевую карбоксильную группу, может быть представлена следующим образом:

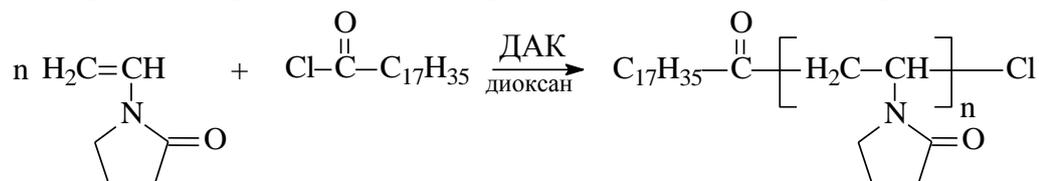


где $m = 5, 7, 11, 15$ или 17 , в зависимости от используемого в реакции первичного или вторичного амина.

Для получения амфифильных производных аминосодержащих семителехелевых полимеров их обрабатывали хлорангидридами длинноцепных алифатических кислот (лауриновой, пальмитиновой, стеариновой, арахиновой и бегеновой) в присутствии триэтиламина с выделением хлористого водорода. В общем случае схема модификации семителехелевых полимеров, содержащих концевую аминогруппу, для получения их амфифильных производных, выглядит следующим образом:



С целью создания более простого и эффективного способа синтеза амфифильных полимеров ВП, пригодных для получения на их основе полимерных наночастиц, был разработан и исследован одностадийный метод получения таких амфифильных полимеров. Этот метод заключается в проведении полимеризации мономера ВП в присутствии инициатора радикальной полимеризации (например, ДАК) с использованием в качестве передатчика и, одновременно, регулятора роста цепи хлорангидрида длинноцепной карбоновой кислоты алифатического ряда, например, хлорангидрида стеариновой кислоты (ХАСК). Общее уравнение реакции можно представить следующим образом:



В результате этой реакции атом хлора из молекулы ХАСК занимает место одной концевой группы в образующемся полимере. Вторую концевую группу образует гидрофобный алкильный радикал хлорангидрида, соединенный с основной цепью полимера кетонной группой. Молекулярную массу синтезированных полимеров

определяли с помощью функционального анализа путем оксимирования кетонной группы и, дополнительно, осмометрическим методом.

Таким образом, в первой части работы, с помощью разработанных одностадийного и двухстадийного методов были получены амфифильные полимеры N-винилпирролидона блочного типа, состоящие из гидрофильного фрагмента ПВП с разной молекулярной массой (1500÷15000 Да) и гидрофобного фрагмента, представляющего собой длинноцепной первичный ($C_6\div C_{22}$) или вторичный ($(C_6)_2\div(C_{18})_2$) радикал.

Строение синтезированных полимеров и сополимеров ВП, а также их амфифильных производных было изучено, сравнено и подтверждено методами элементного анализа, ИК-спектроскопии и ЯМР спектроскопии высокого разрешения на ядрах ^{13}C и 1H (400 МГц).

Возможность контролируемого изменения соотношения гидрофильной и гидрофобной частей полимерных макромолекул позволила в дальнейшем оптимизировать свойства получаемых на основе амфифильного ПВП носителей биологически активных веществ, а разработка одностадийного и двухстадийного получения амфифильных полимеров, различающихся способом присоединения водорастворимого и водонерастворимого блоков, расширила возможности их дальнейшей функционализации.

2. Получение и исследование наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона

С целью разработки новых систем доставки биологически-активных и лекарственных веществ (БАВ) на основе полимерных наночастиц (ПН) из полученных амфифильных полимеров-N-винилпирролидона (**Амф-ПВП**) были изучены поведение таких амфифильных полимеров в водных средах, процессы их самопроизвольной ассоциации с образованием наноразмерных полимерных агрегатов, и основные свойства образующихся полимерных наночастиц.

Поскольку синтезированные амфифильные полимеры ВП состояли из достаточно больших гидрофильных и гидрофобных фрагментов, логично было предположить, что в водных средах гидрофобные фрагменты полимеров, для уменьшения контакта с водой, будут самопроизвольно сворачиваться с формированием внутреннего гидрофобного ядра коллоидных структур, оболочку которых будут образовывать гидрофильные полимерные фрагменты. Это должно приводить к спонтанному образованию полимерных наночастиц по типу «ядро-оболочка». При этом гидрофобные алкильные концевые фрагменты полимеров будут направлены к ядру ассоциатов, а водорастворимые фрагменты ПВП будут переплетаться с образованием внешней водосовместимой оболочки наночастиц.

В качестве объектов исследования были выбраны две группы амфифильных полимеров. Первую группу составили амфифильные полимеры, полученные двухстадийным методом – радикальной полимеризацией N-винилпирролидона в присутствии меркаптоуксусной кислоты в качестве регулятора, с последующим введением в полимеры концевой гидрофобной группы взаимодействием семителехелевых полимеров с различными первичными или вторичными алифатическими аминами (таблица 1).

Вторую группу составили амфифильные полимеры, полученные одностадийным методом – радикальной полимеризацией ВП в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты в качестве регулятора роста и обрыва цепи (таблица 2). Кроме того, во вторую группу был включен образец модифицированного амфифильного ПВП, содержащего в качестве функциональных групп остатки аминокислоты – глицина.

Кодовое обозначение выбранных для исследования полимеров, представленное в таблицах 1 и 2 будет использовано при описании результатов проведенных исследований.

Таблица 1 – Амфифильные полимеры N-винилпирролидона, полученные двухстадийным методом

Код полимера	Молекулярная масса (Mn) гидрофильного фрагмента ^a , Да	Строение гидрофобного фрагмента	ИПД ^b Mw/Mn	ККА ^b , мкМ
ПВП-ОД 1500	1500	-C ₁₈ H ₃₇	1.20	3,9
ПВП-ОД 2000	2000	-C ₁₈ H ₃₇	1.18	5,2
ПВП-ОД 2500	3000	-C ₁₈ H ₃₇	1.16	6,1
ПВП-ОД 4000	4000	-C ₁₈ H ₃₇	1.22	6,5
ПВП-ОД 6000	6000	-C ₁₈ H ₃₇	1.28	7,2
ПВП-ОД 8000	8000	-C ₁₈ H ₃₇	1.26	9,1
ПВП-ГД 4000	4000	-C ₁₆ H ₃₃	1.22	13,3
ПВП-ДД 4000	4000	-C ₁₂ H ₂₅	1.22	16,4
ПВП-Окт 4000	4000	-C ₈ H ₁₇	1.22	20,2
ПВП-Гек 4000	4000	-C ₆ H ₁₃	1.22	-
ПВП-Окт ₂ 4000	4000	-(C ₈ H ₁₇) ₂	1.22	10,2
ПВП-ДД ₂ 4000	4000	-(C ₁₂ H ₂₅) ₂	1.22	12,1
ПВП-ОД ₂ 4000	4000	-(C ₁₈ H ₃₇) ₂	1.22	-

^a Определена потенциометрическим и осмометрическим методами; ^b Индекс полидисперсности; ^B Критическая концентрация ассоциации (ммоль/л)

Таблица 2 – Амфифильные полимеры N-винилпирролидона, полученные одностадийным методом

Код полимера	Молекулярная масса (Mn) гидрофильного фрагмента ^a , Да	Строение гидрофобного фрагмента	ИПД ^b Mw/Mn	ККА ^b , мкМ
ПВП-Стеар 10000	10000	-C ₁₇ H ₃₅	1.18	7.8
ПВП-Стеар 6000	6000	-C ₁₇ H ₃₅	1.20	6.2
ПВП-Стеар 4000	4000	-C ₁₇ H ₃₅	1.19	4.7
ПВП-Стеар 2000	2000	-C ₁₇ H ₃₅	1.23	3.5
ПВП-Бег 4000	4000	-C ₂₁ H ₄₃	1.26	0.8
ПВП-Пал 4000	4000	-C ₁₅ H ₃₁	1.17	6.8
ПВП-Лаур 4000	4000	-C ₁₁ H ₂₃	1.22	11.1
ЭПВП-Стеар-Глицин 6000	6000	-C ₁₇ H ₃₅	1.20	5.7

^a Определена потенциометрическим и осмометрическим методами; ^b Индекс полидисперсности; ^B Критическая концентрация ассоциации (ммоль/л)

Как правило, амфифильные молекулы в растворах способны к самопроизвольной ассоциации при концентрациях, превышающих некую пороговую концентрацию, называемую в общем случае критической концентрацией агрегации (ККА). При этом могут образовываться и наблюдаться структуры различного строения и морфологии.

Для всех исследуемых образцов амфифильных полимеров были определены критические концентрации агрегации (ККА) методом, основанным на солубилизации амфифильными полимерами гидрофобных флуоресцентных красителей, в качестве которых использовали пирен или 1,3,5-дифенилгексатриен (ДФГТ), флуоресценция которых изменяется при переносе их молекул из воды в фазу полимерных агрегатов. Полученные значения ККА амфифильных полимеров представлены в таблицах 1 и 2. Как

видно, значения ККА для большинства образцов полимеров находятся в микромолярном диапазоне концентраций, то есть синтезированные полимеры образуют агрегаты при относительно небольших концентрациях.

Склонность амфифильных полимеров к самосборке в водных растворах в первую очередь связана с взаимодействием их гидрофобных фрагментов. Поскольку это взаимодействие зависит не только от относительной доли гидрофобных фрагментов в макромолекуле полимера, но и от их расположения и пространственной доступности, в работе было изучено влияние, этих факторов в полученных группах полимеров на процессы их самопроизвольной ассоциации. Как было установлено, значения ККА для всех образцов амфифильных полимеров зависели как от молекулярной массы гидрофильного фрагмента ПВП, так и от размера и строения гидрофобного алифатического остатка. Это можно объяснить разницей между силами гидрофобного взаимодействия алкильных радикалов различной длины при формировании ядра мицеллы, которые стабилизируют наночастицу, и силами свободного движения цепей гидрофильного ПВП, образующих оболочку мицеллы, которые дестабилизируют мицеллу.

Увеличение молекулярной массы гидрофильного фрагмента ПВП ведет к увеличению значения ККА при одинаковой длине гидрофобного фрагмента. Уменьшение размеров водорастворимого фрагмента ПВП обеспечивает эффективное образование полимерных агрегатов при низких значениях ККА за счет усиления гидрофобных взаимодействий. Разница в длине гидрофобных фрагментов при постоянной молекулярной массе ПВП фрагмента еще сильнее влияет на ККА. Это влияние наиболее выражено для полимеров со средней молекулярной массой фрагмента ПВП (3000÷6000 Да), когда октадецильные радикалы обеспечивают самые сильные гидрофобные взаимодействия в ядре наночастиц по сравнению со всеми другими n-алкилами.

Поскольку выбор подходящего оптимального метода получения полимерных наночастиц во многом определяет их свойства и эффективность лекарственных форм на их основе, для синтезированных амфифильных полимеров ВП были подобраны оптимальные условия и методы, позволяющие получать наночастицы из этих полимеров с наименьшим размером, сферической формой и высокой стабильностью. При этом необходимо было учитывать целый ряд различных факторов, таких как концентрация амфифильного полимера, массовое соотношение гидрофильного и гидрофобного фрагментов, природа растворителей, соотношение водной и органической фаз, время ультразвукования или диализа, природа включаемого БАВ, соотношение полимера и включаемого агента.

Методы получения наночастиц за счет самопроизвольной агрегации амфифильных полимеров можно разделить на три большие группы – методы прямого растворения, методы диализа и эмульсионные методы. Для получения наночастиц методом прямого растворения соответствующие полимеры непосредственно растворяли в дистиллированной воде или физиологическом растворе при различных концентрациях полимера выше ККА. В случае использования диализного метода для получения наночастиц, различные количества полимера растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) или диметилформамиде (ДМФА) и диализовали раствор в специальных кассетах или диализных мешках относительно дистиллированной воды в течение 24÷48 часов. Наконец, при получении наночастиц эмульсионным методом используемые в работе амфифильные полимеры растворяли в различных органических растворителях, и добавляли водную фазу для получения эмульсии. Размер капель эмульсии уменьшали при помощи обработки системы ультразвуком высокой мощности, а затем растворитель удаляли на роторном испарителе.

Определение основных характеристик полимерных наночастиц, в первую очередь размера, морфологии и дзета-потенциала, а также их визуализацию, проводили методами

динамического светорассеяния и электронной микроскопии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что, вне зависимости от способа получения, в водных средах, синтезированные амфифильные полимеры ВП при концентрации выше ККА образуют сферические частицы (рисунок 1), диаметр которых не превышает 250 нм, а распределение по размерам носит мономодальный характер (рисунок 2).

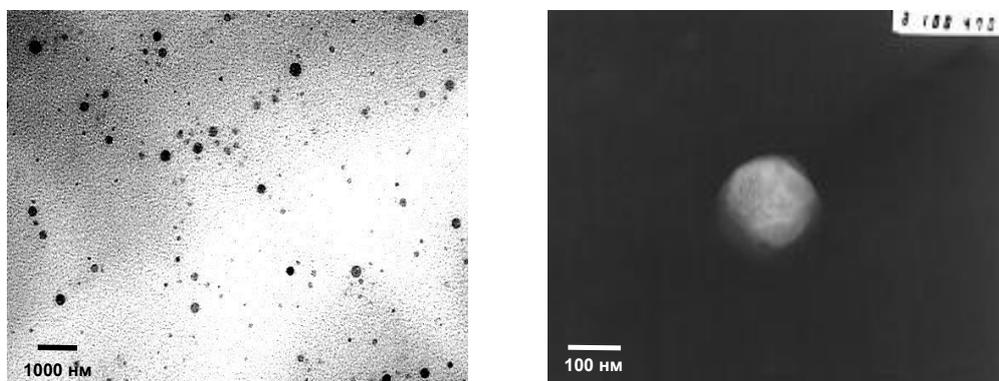


Рисунок 1 – Микрофотографии наночастиц ПВП-ОД 8000, полученных методом прямого растворения ($[ПВП-ОД\ 8000] = 1\ \text{мг/мл}$)

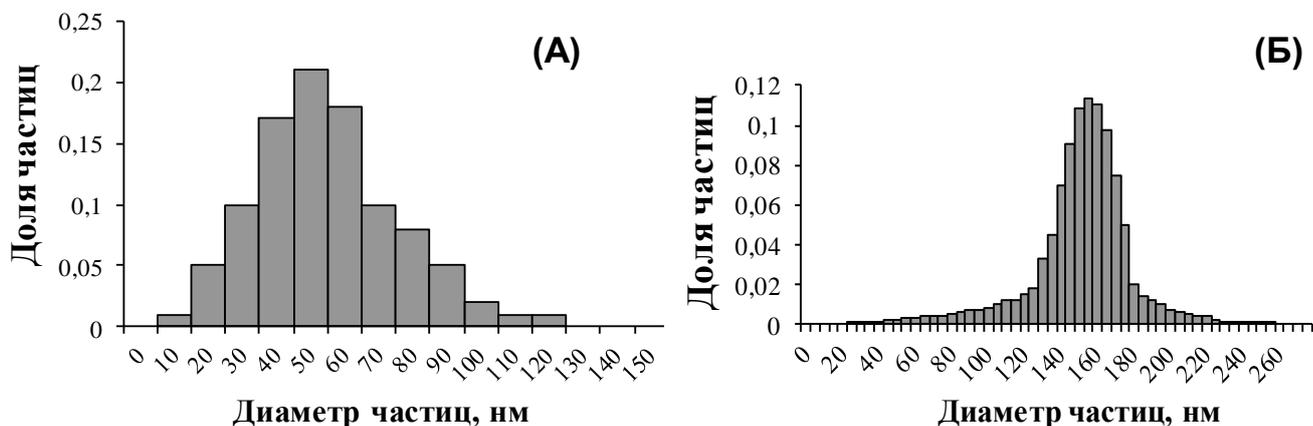


Рисунок 2 – Распределение полимерных наночастиц по размерам. Частицы получены методом прямого растворения полимера ПВП-ОД6000 в воде при концентрации полимера $C_p \sim \text{ККА}$ (А) и $C_p = 1\ \text{мг/мл}$ (Б)

На следующем этапе исследований были определены средние размеры наночастиц на основе синтезированных амфифильных полимеров, полученных методами растворения, диализа, и эмульсионным методом при концентрациях, превышающих ККА (таблица 3).

Наноразмерные полимерные частицы наименьшего размера удалось получить эмульсионным методом, при использовании системы растворителей этилацетат/вода. Кроме того, повышая мощность и продолжительность обработки первичной эмульсии ультразвуком, удалось значительно повысить дисперсность системы и уменьшить размер частиц. Таким образом, наибольший практический интерес из рассмотренных методов получения наночастиц представляет именно эмульсионный метод. Он позволяет широко варьировать свойства наночастиц за счет большого количества факторов (природа используемого растворителя, соотношение водной и органической фазы, концентрация амфифильного полимера, время и мощность ультразвукового воздействия). Важным преимуществом этого метода является и то, что используемый для получения наночастиц растворитель, в отличие от диализного метода, удаётся полностью удалить из системы.

Как видно из данных таблицы 3, помимо метода получения, еще одним важным фактором, влияющим на размер наночастиц, является строение самого амфифильного полимера. С увеличением молекулярной массы водорастворимой полимерной части,

вносящей наибольший вклад в размер всей амфифильной макромолекулы, увеличивается и средний размер образующихся из этих макромолекул ассоциатов. Также, но в большей степени, приводит к увеличению размеров агрегатов и уменьшению длины концевой гидрофобной алкильной группы. При этом полимеры с концевым октадецильным радикалом, обладающие оптимальным лиофильно-лиофобным балансом и самыми низкими значениями ККА, образуют наиболее стабильные и компактные наночастицы.

Таблица 3 – Средний размер полимерных наночастиц и их характеристики

Код полимера	Метод прямого растворения	Диализный метод	Эмульсионный метод		
	D ^a , нм	D, нм	D, нм	ИПД ^б	Z ^в , мВ
ПВП-ОД 2000	140	98	74	0.189	-4.72
ПВП-ОД 4000	182	130	104	0.311	-6.68
ПВП-ОД 8000	216	152	120	0.285	-8.42
ПВП-ГД 4000	240	168	132	0.272	-6.95
ПВП-ДД 4000	320	224	174	0.345	-7.82
ПВП-ДД ₂ 4000	280	192	144	0.318	-7.04
ПВП-Стеар 4000	166	110	82	0.221	-6.36
ПВП-Стеар 6000	170	124	96	0.252	-7.48
ПВП-Бег 4000	134	82	62	0.197	-6.11
ПВП-Пал 4000	238	148	110	0.313	-6.72

^a Диаметр наночастиц. Средняя погрешность определения диаметра наночастиц ± 10.8 нм;

^б Индекс полидисперсности частиц. Средняя погрешность определения индекса полидисперсности ± 0.062 ; ^в Дзета-потенциал наночастиц. Средняя погрешность определения дзета-потенциала ± 0.26 мВ; Концентрация полимера 1 мг/мл

Наконец, исследование влияния концентрации амфифильных ПВП на размер полученных из них полимерных наночастиц, показало, что увеличение концентрации полимера до значений, на несколько порядков превышающих ККА, вело к образованию более крупных ассоциатов и увеличению полидисперсности системы (рисунок 2).

Исследование дзета-потенциала полученных полимерных наночастиц, являющегося характеристикой заряда поверхности наночастиц показало, что все наночастицы, вне зависимости от строения амфифильного полимера обладали очень слабым отрицательным зарядом ($-2 \div -14$ мВ), в силу чего такие полимерные наноразмерные носители могут в дальнейшем рассматриваться как незаряженные. При этом поверхностный заряд полимерных наночастиц несколько снижался при увеличении доли гидрофильного ПВП в макромолекуле амфифильного полимера. В отличие от положительно заряженных наночастиц, слабо отрицательно заряженные наноразмерные носители не вызывают адсорбции белков при контакте с плазмой крови, а следовательно обладают способностью к более длительной циркуляции в кровеносном русле, что может значительно повысить эффективность лекарственных форм на их основе.

Исследование стабильности полимерных наночастиц к различным внешним воздействиям и факторам показало их высокую устойчивость к механическим воздействиям, добавлению дестабилизирующих агентов, и способность сохранять определенный размер при длительном хранении, как в виде водных суспензий, так и в виде лиофильно высушенных порошков, с их последующим ресуспендированием.

3. Изучение биосовместимости амфифильных полимеров N-винилпирролидона и наночастиц на их основе

Оценка биосовместимости и безопасности амфифильных полимеров и полимерных наноразмерных носителей, предполагаемых для применения в качестве новых высокоэффективных систем доставки БАВ и лекарственных форм является важнейшим шагом к решению вопроса о целесообразности их практического применения в медицине, фармацевтике и биотехнологии. В связи с этим, были изучены токсические свойства амфифильных полимеров N-винилпирролидона и наночастиц на их основе, инертности в отношении проявления иммунной активности, нейтральности по отношению к форменным и молекулярным элементам крови, ее водно-солевому балансу и pH, взаимодействия полимеров с клетками, тканями и органами.

Поскольку свойства полимерных систем доставки БАВ главным образом определяются их взаимодействиями с различными компонентами крови, в первую очередь была проанализирована устойчивость наночастиц из амфифильных полимеров ВП в присутствии сыворотки крови человека. Как было установлено, наночастицы амфифильных ПВП способны включать в свое гидрофобное ядро краситель пирен. По изменению интенсивности флуоресценции включенной пиреновой метки была определена степень дестабилизирующего влияния сыворотки крови человека на полимерные частицы.

Данные, представленные на рисунке 3, показывают, что, как и в предыдущих экспериментах, наночастицы на основе полимера ПВП-ОД2000, содержащего наименьший гидрофильный фрагмент ПВП, демонстрируют наибольшую стабильность в присутствии сыворотки крови за счет оптимального гидрофильно-гидрофобного баланса. При этом было установлено, что наночастицы из полимеров ПВП-ОД2000 и ПВП-ОД4000 сохраняли более 50% включенного пирена в течение 12 ч. Исходя из этого, можно предположить, что период полувыведения таких наночастиц вполне достаточен для использования их в качестве потенциальных носителей БАВ при внутривенном инъекционном введении. Наночастицы на основе полимера ПВП-ОД8000 показали более низкую устойчивость в сыворотке крови, обусловленную ослаблением гидрофобных взаимодействий между включенным веществом и ядром частиц.

Для изучения гемолитической активности амфифильных полимеров ВП были проведены тесты по их прямому литическому действию на эритроциты барана (рисунок 4).

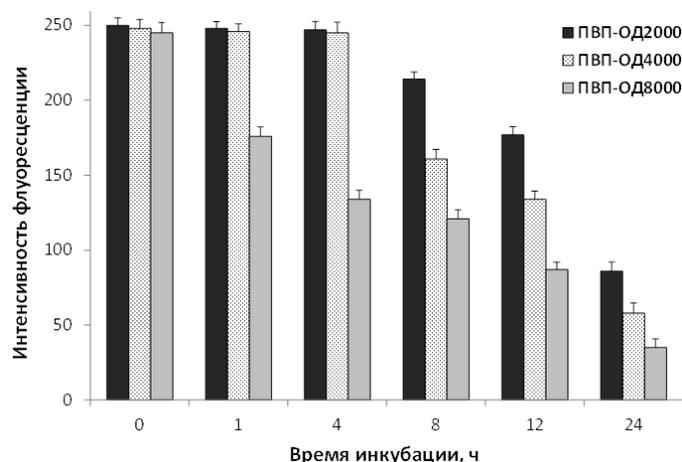


Рисунок 3 – Изменение интенсивности флуоресценции пирена, включенного в полимерные наночастицы в присутствии сыворотки крови человека

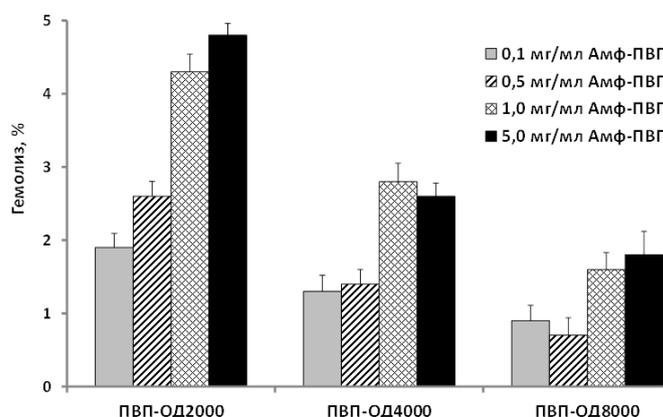


Рисунок 4 – Гемолитическая активность наночастиц на основе амфифильных полимеров N-винилпирролидона (Амф-ПВП)

Для всех исследованных полимеров процент гемолиза не превышал 5 %, что считается допустимым при исследовании влияния химических веществ на компоненты крови. Таким образом, можно сделать вывод о необходимости баланса между способностью амфифильного полимера образовывать компактные и стабильные наночастицы за счет гидрофобного фрагмента и биосовместимостью всей системы за счет гидрофильного фрагмента ПВП.

Следующим этапом исследования биосовместимости полимеров стало изучение активации системы комплемента в присутствии полимерных наночастиц. Система комплемента является частью иммунной системы и осуществляет неспецифическую защиту организма от микроорганизмов, опухолевых и инфицированных вирусами клеток. Активацию системы комплемента оценивали как по классическому пути, так и по альтернативному пути активации. Полученные результаты показали, что исследованные полимеры не инициировали каскады комплемента ни по классическому пути, ни по альтернативному пути и не изменяли литический потенциал экспериментальной системы, что можно рассматривать как одно из проявлений биосовместимости исследуемых амфифильных полимеров.

Для подтверждения биосовместимости разрабатываемых полимерных наноразмерных носителей БАВ было изучено влияние синтезированных амфифильных полимеров ВП различного строения на целый комплекс реологических свойств крови человека. В ходе исследований было установлено, что амфифильные ПВП в широком диапазоне концентраций не оказывают влияния на такие реологические свойства крови доноров, как вязкость крови, вязкость плазмы, количество свободного гемоглобина в плазме, агрегационная активность эритроцитов, кислотная резистентность эритроцитов, степень деформируемости эритроцитов. При этом результаты для синтезированных полимеров ВП не отличались от результатов для используемых для сравнения в ходе исследований чистого физиологического раствора и раствора препарата «Гемодез» (Россия), являющегося широко применяемым биосовместимым кровезаменителем.

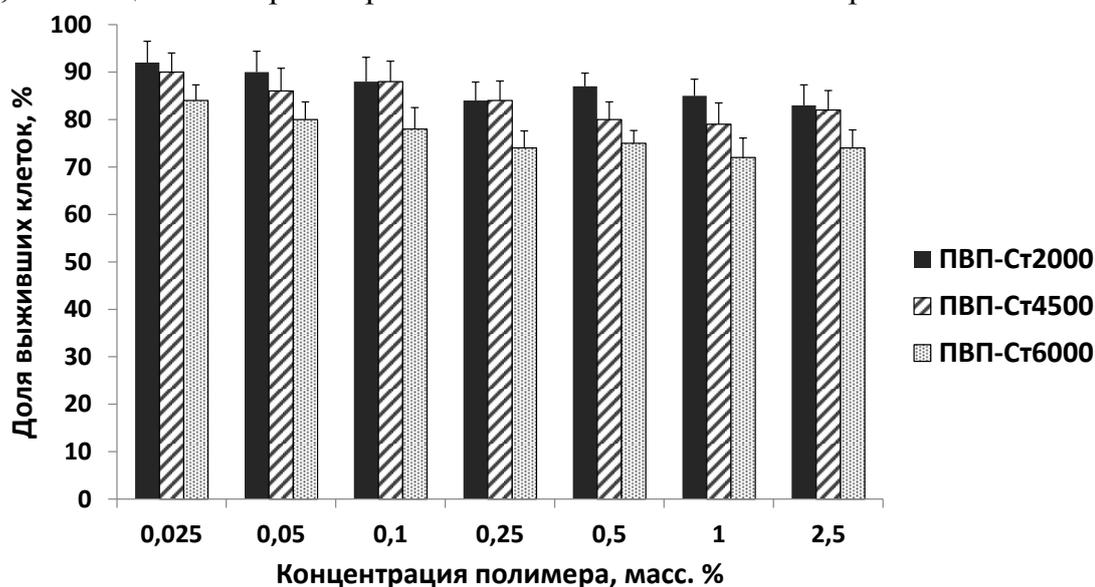


Рисунок 5 – Выживаемость клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7/R в присутствии амфифильных полимеров N-винилпирролидона

С целью предварительной оценки уровня безвредности синтезированных полимеров было проведено определение цитотоксичности образцов амфифильных полимеров различного строения. Исследование цитотоксичности полимеров проводили на клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7/R, гепатоклеточной карциномы HepG2

и фибробластах эмбриона человека EBF-H9. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтезированные и исследованные амфифильные полимеры ВП не проявляют заметной цитотоксичности в рассмотренном диапазоне концентраций (рисунок 5). Это также подтверждает низкий уровень цитотоксичности полимеров.

Были определены параметры острой токсичности амфифильных полимеров ВП, используемых для получения наночастиц. Изучение острой токсичности проводили при однократном внутрибрюшинном и при однократном внутривенном введении различных доз амфифильных полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 на мышах линии BALB/C (самцы и самки, возраст 5-6 недель, масса тела 20-22 г) и крысах Wistar (самцы и самки, возраст 7-8 недель, масса тела 180-210 г). При обработке результатов проведенных исследований по оценке токсичности полимеров при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/C были получены следующие результаты (таблица 4).

Таблица 4 – Показатели токсичности амфифильных полимеров при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/C

Полимер	Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
		ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД _{50+-m}	ЛД ₈₄
ПВП-ОД1500	Самцы	2520	2720	3120±300	3540
	Самки	3260	3430	3720±340	4010
ПВП-ОД4000	Самцы	4260	4410	4680±310	4960
	Самки	4680	4860	5140±380	5380
ПВП-ОД8000	Самцы	3720	3920	4140±320	4420
	Самки	3660	3880	4100±340	4360

По параметрам токсикометрии крысы Wistar оказались несколько менее чувствительными к токсическому действию полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-ОД4000 и ПВП-ОД8000 по сравнению с мышами линии BALB/C, однако статистически достоверных различий при этом не установлено (таблица 5).

Таблица 5 – Показатели токсичности амфифильных полимеров при однократном внутрибрюшинном введении крысам Wistar

Полимер	Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
		ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД _{50+-m}	ЛД ₈₄
ПВП-ОД1500	Самцы	2970	3110	3510±350	3960
	Самки	3690	3880	4150±290	4430
ПВП-ОД4000	Самцы	5180	5320	5580±340	5820
	Самки	4690	4810	5110±360	5410
ПВП-ОД8000	Самцы	4160	4320	4570±340	4810
	Самки	4020	4210	4530±380	4780

Представленные в таблицах 4 и 5 данные свидетельствуют об очень низкой токсичности исследованных полимеров ВП при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/C и крысам Wistar. При этом не выявлено существенных видовых и половых различий в чувствительности указанных видов лабораторных животных к токсическому действию полимеров. Оценка острой токсичности исследованных полимеров позволяет отнести их к 6 классу токсичности (относительно безвредно).

Поскольку лекарственные формы на основе полимерных наночастиц предполагают преимущественно инъекционный способ введения в организм, в данной работе было проведено исследование токсичности амфифильных полимеров ПВП-ОД1500, ПВП-

ОД4000 и ПВП-ОД8000 при однократном внутривенном введении этих полимеров в концентрациях от 20 до 100 мг/кг на крысах Wistar. В результате, ни для одного полимера внутривенное введение не приводило к гибели экспериментальных животных в течение всего периода наблюдения (14 дней). Оценка состояния внутренних органов при вскрытии животных, умерщвленных в конце эксперимента, показала, что макроскопических изменений внутренних органов животных за время проведения опытов не произошло. При этом средняя масса тела и органов животных, подвергнутых введению полимерных препаратов, статистически не отличалась от веса животных в контроле.

Проведенные исследования острой токсичности амфифильных полимеров позволили провести оценку их токсических доз и определить диапазон возможных концентраций, при которых наноразмерные носители на основе этих полимеров будут обладать высокой биосовместимостью в организме.

4. Разработка и исследование наноразмерных полимерных форм биологически активных и лекарственных веществ

Одними из наиболее перспективных наноразмерных систем доставки биологически активных и лекарственных веществ являются полимерные наночастицы и липосомы. Выбор подходящего носителя зависит от многих факторов, среди которых важнейшими являются природа и строение включаемого активного агента.

Наночастицы, образующиеся за счет процессов самосборки амфифильных макромолекул полимера, наиболее подходят для включения в свое гидрофобное ядро плохо растворимых лекарственных веществ. В свою очередь липосомы, за счет наличия липосомальной мембраны, состоящей из двойного слоя липидов, могут содержать в своем составе и водорастворимые (в водном ядре) и гидрофобные (в липидной мембране) жирорастворимые биологически активные вещества. С другой стороны липосомы обладают целым рядом существенных недостатков, например высокой стоимостью и низкой стабильностью в организме. Этих недостатков лишены полимерные наночастицы.

В связи с этим на основе синтезированных амфифильных полимеров ВП были созданы оба типа носителей БАВ – модифицированные полимерами липосомы с повышенной стабильностью и полимерные наночастицы. При этом актуальным представлялось получение конкретных лекарственных форм на основе полимерных наноносителей и различных модельных биологически активных и лекарственных веществ.

4.1. Разработка и исследование липосомальных форм БАВ

Гидрофобное взаимодействие между гидрофобными группами полученных амфифильных полимеров и гидрофобными фрагментами других молекул было подтверждено методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), путем исследования ЭПР-спектров растворов полимеров N-винилпирролидона, содержащих и не содержащих концевые гидрофобные алифатические группы, в присутствии гидрофобного спинового зонда. Так, в случае системы, содержащей ПВП без концевой гидрофобной группы, ЭПР-спектр зонда показывал сильное межмолекулярное взаимодействие между молекулами самого зонда, находящегося в системе в виде плохо распределяемой фазы. В случае наличия в системе амфифильного ПВП с концевой гидрофобной группой, наблюдалось заметное усложнение ЭПР-спектра, отражающее высокую подвижность свободнорадикального зонда, ассоциированного с концевой гидрофобной группой ПВП.

Полученные результаты исследования подтвердили возможность совместного использования таких амфифильных полимеров вместе с липидными компонентами липосомальных оболочек, имеющими гидрофобные части, для получения новых модифицированных липосом с существенно расширенными возможностями применения.

Модификацию липосомальных мембран амфифильными полимерами ВП проводили одновременно с формированием самих липосом. Для этого в исходную смесь липидов, формирующих липосомы, (фосфатидилхолин / кардиолипин (мольное соотношение 7:3)) добавляли раствор амфифильного полимера разной концентрации. В качестве модифицирующих липосомальную мембрану полимеров были выбраны амфифильные полимеры с концевой октадецильной группой и разной молекулярной массой полимерного фрагмента, так как они проявляют наибольшую склонность к агрегации и гидрофобным взаимодействиям (таблица 6). В качестве контроля, для сравнения, были получены немодифицированные нативные липосомы (Л).

Средний размер полученных липосом определяли методом динамического светорассеяния (таблица 6). Как видно, ни молекулярная масса, ни количество вводимого в липосомальную оболочку амфифильного полимера существенно не влияло на размер образующихся липосом, в виду небольшого его содержания, по сравнению с липидами.

Таблица 6. Липосомы, модифицированные амфифильными полимерами

*Средняя погрешность определения диаметра липосом ± 9 нм

Модифицирующий полимер	Количество модифицирующего полимера, мол. %	Условное обозначение липосом	Диаметр липосом, нм*
-	0	Л	230
ПВП-ОД2000	3,0	Л-ПВП-ОД2000(3)	230
	6,0	Л-ПВП-ОД2000(6)	220
	10,0	Л-ПВП-ОД2000(10)	200
	15,0	Л-ПВП-ОД2000(15)	210
ПВП-ОД4000	3,0	Л-ПВП-ОД4000(3)	210
	6,0	Л-ПВП-ОД4000(6)	220
	10,0	Л-ПВП-ОД4000(10)	200
	15,0	Л-ПВП-ОД4000(15)	200
ПВП-ОД8000	3,0	Л-ПВП-ОД8000(3)	220
	6,0	Л-ПВП-ОД8000(6)	200
	10,0	Л-ПВП-ОД8000(10)	200
	15,0	Л-ПВП-ОД8000(15)	210

Средний размер полученных липосом определяли методом динамического светорассеяния (таблица 6). Как видно, ни молекулярная масса, ни количество вводимого в липосомальную оболочку амфифильного полимера существенно не влияло на размер образующихся липосом, в виду небольшого его содержания, по сравнению с липидами.

Эффективность защиты липосом путем введения в их липидные мембраны амфифильных полимеров была подтверждена для случая взаимодействия отрицательно заряженных липосом с поликатионами, которые обычно вызывают агрегацию таких липосом при связывании остатков фосфорной кислоты липидов с основными группами поликатионов. Для этого с помощью метода флуориметрии исследовали систему, содержащую поликатион (кватернизованный поли-4-винилпирридин) и меченные флуоресцентной меткой отрицательно заряженные липосомы на основе смеси липидов фосфатидилхолина и кардиолипина. Результаты измерений показали, что в отсутствие амфифильного ПВП, добавление поликатиона к суспензии отрицательно заряженных липосом приводило к их активной агрегации. В этом случае поликатион являлся сшивающим агентом. Введение всего 3 мол. % амфифильного полимера ПВП-ОД4000

резко ингибировало взаимодействие поликатиона с липосомами. Увеличение количества модифицирующего полимера до 15 мол. % практически полностью предотвращало агрегацию липосом в присутствии поликатиона, демонстрируя их эффективную защиту.

Повышенная стабильность липосом, модифицированных амфифильными полимерами, была также подтверждена измерением их размеров методом динамического светорассеяния при длительном хранении и под воздействием внешних разрушающих факторов. Так, было установлено, что модифицированные липосомы, в отличие от нативных, сохраняют свою форму и размер при хранении в течение длительного срока (3 месяца), а также в условиях циклов замораживания/размораживания липосомальной суспензии. Кроме того модификация липосомальных мембран амфифильными производными ПВП повышает устойчивость липосом к воздействию дестабилизирующих агентов, таких как неионный детергент Тритон X-100 и этанол.

Проведенное исследование стабильности липосом, содержащих дополнительно карбоксифлуоресцен, в сыворотке крови мышей в условиях *in vitro*, по увеличению флуоресценции системы, вызванному выделением карбоксифлуоресцена из дестабилизированных и разрушенных липосом, показало, что эффективность защиты содержащих карбоксифлуоресцен липосом амфифильным полимером зависела от содержания этого полимера в липосомальной мембране. Чем выше было содержание амфифильного ПВП, тем лучшие защитные свойства он демонстрировал.

Поведение липосом, модифицированных амфифильными полимерами ВП в условиях *in vivo*, в организме экспериментальных животных было изучено в экспериментах на белых линейных мышах BALB/C. В качестве радиоактивной метки, для визуализации системы доставки, в липосомы вводили цитратный комплекс ^{111}In .

Результаты, представленные на рисунке 6А, демонстрируют, что введение в оболочку липосом амфифильного ПВП значительно увеличивало время циркуляции липосом в кровеносном русле. Кроме того, использование амфифильных полимеров в качестве компонентов липосомальных мембран позволило снизить захват модифицированных липосом клетками ретикуло-эндотелиальной системы, и как следствие уменьшить быстрое накопление липосом в печени (рисунок 6Б).

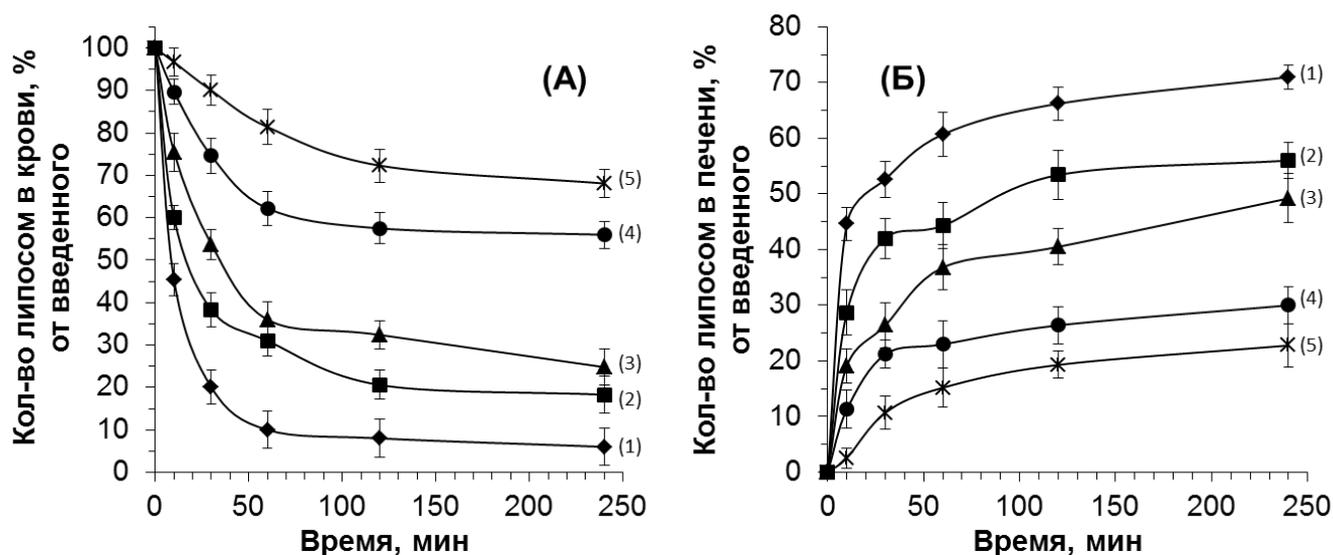


Рисунок 6 – Содержание липосом в крови (А) и накопление липосом в печени (Б) опытных животных. 1 – Л; 2 – Л-ПВП-ОД8000(3); 3 – Л-ПВП-ОД2000(3); 4 – Л-ПВП-ОД8000(10); 5 – Л-ПВП-ОД2000(10)

В качестве модельных БАВ для включения в липосомы, модифицированные амфифильными полимерами ВП, и обладающими повышенной стабильностью, были использованы хорошо известные и широко применяемых в лечении грибковых заболеваний антифунгальные антибиотики – амфотерицин В и нистатин. Это одни из наиболее известных противогрибковых субстанций, применяемых для лечения системных грибковых инфекций. Однако их низкая растворимость в воде и ряд негативных побочных эффектов ограничивают широкое применение этих препаратов и вызывают необходимость разработки их новых форм введения для устранения этих недостатков.

Для решения этой задачи были получены липосомы, поверхностный слой которых был модифицирован различными количествами амфифильного ПВП с молекулярной массой 4000 Да, содержащего одну концевую октадецильную группу (ПВП-ОД4000), с включенными фунгицидами. Модификацию липосомальных мембран и включение в липосомы фунгицидов осуществляли одновременно с формированием липосом.

Методами динамического светорассеяния и трансмиссионной электронной микроскопии было установлено, что образующиеся модифицированные липосомы с включенными фунгицидами имеют сферическую форму, узкое распределение по размерам, и средний диаметр 150÷250 нм. При этом для исследованных образцов тип модифицирующего полимера, противогрибкового антибиотика и их содержание в липосомах (в исследованном диапазоне) существенно не влияли на их размеры.

Модифицированные амфифильным ПВП липосомы обладали повышенной устойчивостью к воздействию детергентов (Тритон X) и ультразвука, причем стабильность липосом возрастала при увеличении содержания полимера в липосомальной оболочке.

Путем повышения концентрации нистатина и амфотерицина В при формировании липосом, удалось получить модифицированные липосомы, содержащие до 20 весовых % включенного антибиотика. При этом выходы по антибиотику составляли до 75 %.

Противогрибковую активность новых липосомальных форм нистатина и амфотерицина В определяли с использованием агаровой среды, по отношению к культуре гриба *Fusarium oxysporum* ВКМФ-26040/0603. На рисунке 7 приведены диаграммы, отображающие значения эффективных доз (ЭД₅₀) для различных липосомальных препаратов нистатина и амфотерицина В.

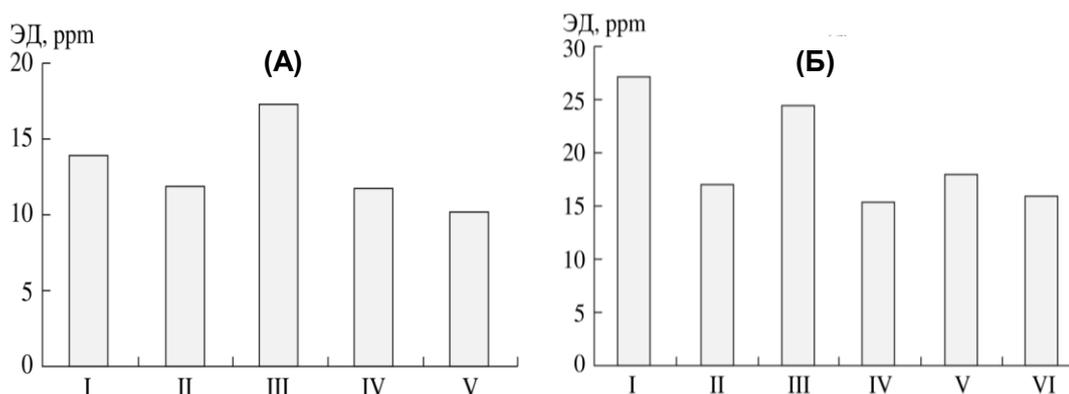


Рисунок 7 – Эффективные дозы (ЭД₅₀) для липосомальных препаратов нистатина (А) и амфотерицина (Б). Нативные липосомы, содержащие: I – 1 масс. % нистатина (А), амфотерицина (Б); II – 3 % нистатина (А), амфотерицина (Б). Модифицированные липосомы, содержащие: III – 0.5 % нистатина и 3 % полимера ПВП-ОД4000 (А), 1 % амфотерицина и 3 % полимера ПВП-ОД4000 (Б); IV – 1 % нистатина и 3 % полимера ПВП-ОД4000 (А), 3 % амфотерицина и 3 % полимера ПВП-ОД4000 (Б); V – 3 % нистатина и 3 % полимера ПВП-ОД4000 (А), 1 % амфотерицина и 6 % полимера ПВП-ОД4000 (Б); VI - 3 % амфотерицина и 10 % полимера ПВП-ОД4000 (Б)

Липосомы, модифицированные амфифильными полимерами ВП, и содержащие включенные антибиотики обладали несколько большей противогрибковой активностью по сравнению с нативными липосомами, при одинаковом весовом содержании нистатина и амфотерицина в этих препаратах. Увеличение содержания нистатина и амфотерицина во всех образцах липосом приводило к увеличению их антифунгальной активности. При этом значения ЭД₅₀ для новых липосомальных форм нистатина и амфотерицина В были соответственно в 2÷2,4 и в 1,8÷3,2 раза ниже, чем значения ЭД₅₀ для чистых субстанций нистатина (ЭД₅₀ = 35,7 ppm) и амфотерицина В (ЭД₅₀ = 48 ppm), определенные при тех же условиях по отношению к культуре гриба *Fuzarium oxysporum* ВКМФ 26040/0603.

Таким образом, модифицированные липосомы сохраняли специфические антифунгальные свойства антибиотиков при значительно большей стабильности таких систем по сравнению с нативными липосомами. Полученные данные исследований говорят о высокой эффективности новых липосомальных форм БАВ.

4.2. Разработка и исследование наносомальных полимерных форм БАВ

Важным свойством разработанных наночастиц на основе амфифильных полимеров ВП является их способность в процессе самоагрегации за счет гидрофобных взаимодействий включать в свое ядро плохо растворимые биологически активные молекулы. При этом происходит процесс солюбилизации – значительного увеличения растворимости гидрофобных веществ в водных средах. В результате включения таких липофильных веществ (в том числе биологически активных) в ядро наноразмерных носителей образуются устойчивые равновесные нанодисперсные коллоидные системы.

Для демонстрации широких возможностей применения разработанных полимерных наноносителей были получены и исследованы водосовместимые полимерные наноразмерные формы целого ряда модельных низкомолекулярных и высокомолекулярных плохо растворимых БАВ.

Так, в качестве гидрофобного БАВ белковой природы были выбраны соевый ингибитор протеиназ (**ВВІ**) и его гидрофобизованные производные (**Оле-ВВІ** и **Оле₂-ВВІ**), обладающие в качестве лекарственных субстанций высоким антиканцерогенным потенциалом. Однако высокий терапевтический потенциал ВВІ ограничен плохой растворимостью в воде и быстрым выведением из организма.

Для получения полимерных наночастиц с включенными белками ВВІ, Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ использовали метод прямого растворения в физиологическом растворе (0,1% NaCl, pH~7,4) при интенсивном перемешивании или обработке ультразвуком. Несолубилизованный белок отделяли центрифугированием или фильтрованием в виде осадка. Для измерения количества включенного в наночастицы белка, его выделяли осаждением ацетоном, центрифугировали, высушивали и определяли его массу.

Этим способом удалось получить достаточно высокий процент включения белка ВВІ и его производных в полимерные наночастицы. Так для полимера ПВП-ОД3000 удалось получить наночастицы с эффективностью включения до 90 %.

Средние размеры полимерных наночастиц с включенными белками ВВІ, Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ и распределения их по размерам были определены методом динамического светорассеяния и составили от 50 до 250 нм в зависимости от выбранного амфифильного полимера, производного белка, их соотношения и концентраций в системе и типа водной среды. Полученные носители с включенными белками были визуализированы методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), и было показано, что образующиеся наноразмерные частицы имеют сферическую форму.

Увеличение содержания белка ВВІ и его производных в растворе с 0,5 до 2,0 мг/мл вело к уменьшению размера частиц. Вероятно, присутствие белка компактизирует и

упорядочивает строение коллоидных частиц. Следует отметить, что в отличие от исходного белка ВВІ, его гидрофобные производные Оле-ВВІ и Оле₂-ВВІ инициировали образование агрегатов при очень низких концентрациях амфифильных полимеров в воде. Оба гидрофобизованных производных ВВІ уменьшали средний размер образующихся частиц и сужали их распределение по размерам. Такая разница может быть объяснена увеличением сродства белка к амфифильному полимеру, за счет усиления гидрофобных взаимодействий между ними, обусловленных введением в молекулу ВВІ одного или двух дополнительных гидрофобных олеоильных остатков.

Так как в процессе солюбилизации происходило включение гидрофобного белка в ядро наночастицы, при этом следовало ожидать, что его взаимодействие с внешней средой будет практически исключено. Для косвенного подтверждения солюбилизации препаратов белка ВВІ амфифильными полимерами ВП, было изучено денатурирующее воздействие низких значений рН раствора на антитриптическую активность чистого белка Оле₂-ВВІ, и белка Оле₂-ВВІ, включенного в полимерные наноразмерные частицы, в водной среде.

Полученные результаты показали (рисунок 8), что в чистом виде белок Оле₂-ВВІ в течение 24 часов терял 80 % антитриптической активности, а за двое суток полностью инактивировался. В тоже время, включение белка Оле₂-ВВІ в полимерные наночастицы способствует сохранению его активности. Такой защитный эффект может быть объяснен отсутствием взаимодействия включенного белка с растворителем, что является еще одним доказательством солюбилизации белка Оле₂-ВВІ полимерными наночастицами.

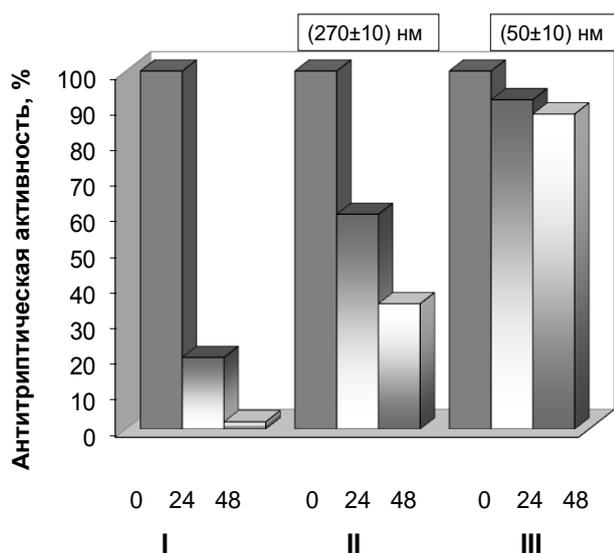


Рисунок 8 – Антитриптическая активность белка Оле₂-ВВІ в отсутствии и в присутствии амфифильного полимера ПВП-ОД6000, после инкубации образцов в течение 24 и 48 часов при рН 1,4. I - Оле₂-ВВІ(0,5 мг/мл); II - ПВП-ОД6000(1,0 мг/мл) + Оле₂-ВВІ(0,5 мг/мл); III – ПВП-ОД6000(1,0 мг/мл) + Оле₂-ВВІ(1,0 мг/мл)

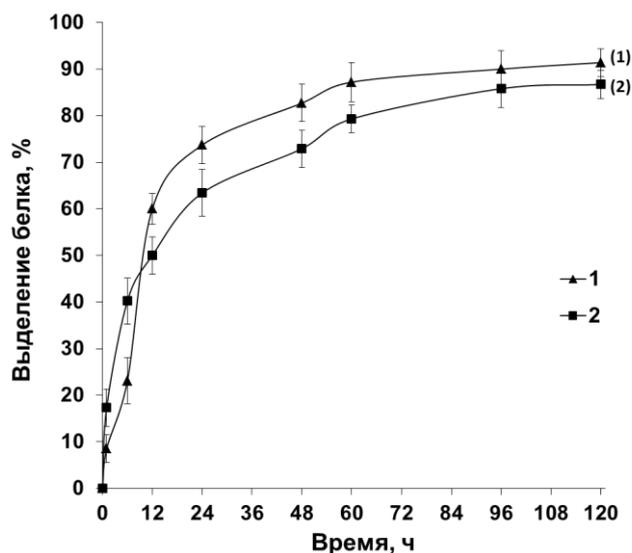


Рисунок 9 – Профиль выделения белка ВВІ из наночастиц на основе полимера ПВП-ОД4000. 1 – в 0,05М фосфатном буферном растворе (рН 7.4, 37°С); 2 – в 0,05М ацетатном буферном растворе (рН 5.5, 37°С)

Другим важным параметром систем доставки БАВ, позволяющим моделировать их поведение в организме, является профиль выделения активного агента из лекарственной формы. Поэтому было проведено исследование процессов выделения белка ВВІ и его производных из полимерных наночастиц. Как видно из рисунка 9, постепенное выделение белка из наночастиц происходило пролонгировано в течение 48 часов инкубации в буферном растворе. При этом белок ВВІ практически полностью сохранял

антитриптическую активность после инкубации, что говорит о сохранении его стабильности при инкапсуляции. Следовательно, включение белка в полимерные носители может эффективно защищать его от инактивации, и обеспечивать его контролируемое продолжительное выделение. Инкапсулированный в полимерные наноразмерные частицы белок может быть защищен от факторов окружающей среды, протеолиза, а, следовательно, от опсонизации и выведения из организма.

Еще одним гидрофобным активным веществом белковой природы, стабилизация которого амфифильными полимерами ВП была исследована, стал фактор свертывания крови IX. Недостаток этого белка в организме приводит к заболеванию, названному гемофилией В типа, одним из наиболее эффективных методом лечения которой является внешнее введение лекарственного препарата, содержащего фактор IX, выделенный из крови доноров. При этом хранение и применение фактора IX в виде лекарственной формы затруднено его низкой стабильностью и достигается только благодаря лиофильной сушке и пониженным температурам.

В связи с эти, актуальным представлялось создание полимерной наноразмерной стабилизированной формы фактора IX на основе амфифильных полимеров ВП. Для этого был использован полимер ПВП-ОД3500, содержащий гидрофильный блок ПВП с молекулярной массой 3500 Да, и один концевой гидрофобный октадецильный фрагмент.

Для получения полимерных наноразмерных агрегатов, содержащих стабилизированный фактор IX, использовали уже описанный ранее метод прямого растворения. Размер образующихся полимерных наночастиц, содержащих фактор IX и их дзета-потенциал определяли с помощью метода динамического светорассеяния, а их морфологию – методом электронной микроскопии. Специфическую активность фактора IX в полученных препаратах на основе полимерных наночастиц оценивали с помощью коагулологического анализа, основанного на измерении времени свертывания плазмы, которое напрямую зависит от содержания фактора, активность которого измеряется. Свойства наночастиц и эффективность включения фактора IX от концентрации амфифильного полимера и соотношения полимера и белка приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Полимерные наноразмерные агрегаты, содержащие фактор IX

*активность 1 мг использованного фактора IX ~ 80 МЕ, T = 25°C

ПВП-ОД3500, мг/мл	Фактор IX, мг/мл	Размер частиц, нм	Дзета-потенциал, мВ	Степень включения фактора IX, %	Специфическая активность фактора IX, МЕ*/мл
0,5	0,25	118 ± 14	14,24 ± 0,56	90,1	18,02
1,0	0,25	124 ± 11	12,84 ± 0,82	95,7	19,14
2,0	0,25	176 ± 18	5,38 ± 0,44	86,3	17,26

Как было установлено, образующиеся наночастицы с белком имели сферическую форму и размер менее 200 нм, а оптимальное весовое соотношение белок/полимер составило 1:4.

Для изучения возможности стабилизации фактора IX и защиты его от инактивации путем включения в полимерные наночастицы на основе амфифильных полимеров ВП, в качестве критерия оценки стабилизирующего действия была выбрана скорость падения специфической активности фактора IX, включенного в полимерные наночастицы, по сравнению с чистым белком, в зависимости от времени инкубации препаратов, при различных температурах. На кривых активности фактора IX (рисунок 10) видно преимущество включения белка в наночастицы на основе амфифильного ПВП.

Контрольный образец, содержащий чистый фактор IX, в этих условиях терял активность наиболее стремительно. Как показали проведенные исследования, наибольший стабилизирующий эффект на фактор IX оказывает включение его в наночастицы на основе амфифильного полимера ПВП-ОД3500, при массовом соотношении полимер/белок 4:1 и концентрации полимера ~1,0 мг/мл.

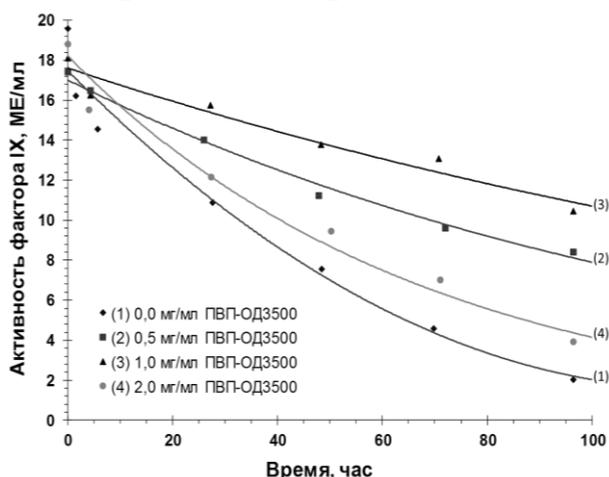


Рисунок 10 – Активность препаратов фактора IX на основе полимерных наночастиц (42°C)

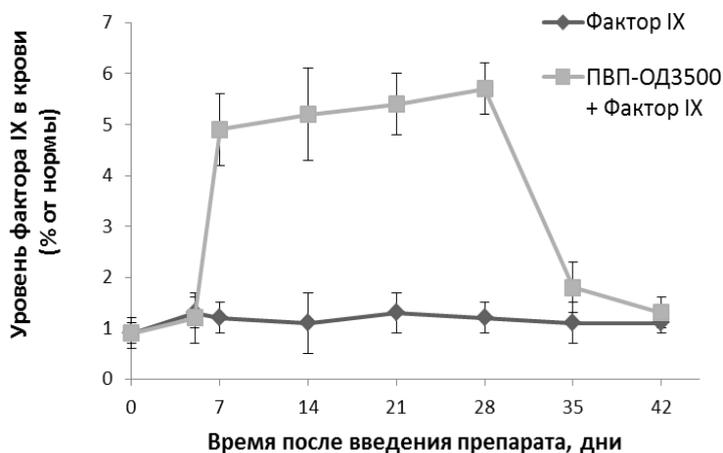


Рисунок 11 – Уровень выделяемого фактора IX после однократного введения чистого фактора IX и наносомальной полимерной формы фактора IX. Уровень фактора IX здорового человека обычно составляет 15-20%

На заключительной стадии исследования полимерной наноразмерной формы фактора IX была изучена терапевтическая активность такой новой системы доставки в условиях *in vivo*. Для экспериментов использовали мышей линии BALB/C nude (самки в возрасте 6-7 недель, вес 16-18г). Опухоль, вызывающую недостаток факторов свертывания крови (в том числе и фактора IX) формировали путем введения мышам клеток гепатоклеточной карциномы HepG2. Наночастицы на основе амфифильного полимера ПВП-ОД3500, содержащие суммарно 20 мкг фактора IX вводили внутривенно мышам с опухолью, полученной из клеток гепатоклеточной карциномы HepG2. После этого в течение 7 недель после инъекции препарата измеряли уровень фактора IX в плазме экспериментальных животных методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для сравнения мышам с опухолью также инъекционно вводили чистый фактор IX в количестве 20 мкг. В качестве контроля определяли уровень фактора IX в плазме здоровых животных.

Результаты исследований показали (рисунок 11), что активный синтез фактора IX в плазме мышей с опухолью начался через 7 дней после инъекции препаратов, продлился около месяца, и прекратился через 35 дней после применения препаратов. Достижимый при этом уровень фактора IX в плазме, теоретически был достаточен для перевода острой формы гемофилии В в умеренную форму у человека. Снижение уровня фактора IX в организме животных в конце эксперимента, по всей видимости, связано с началом процессов некроза опухоли, вызванной клетками гепатоклеточной карциномы HepG2.

Таким образом, было показано, что однократное инъекционное введение наночастиц с фактором IX значительно стимулирует процессы выработки собственного фактора IX в организме в течение продолжительного времени, по сравнению с чистым фактором IX.

Определение острой токсичности наночастиц на основе полимера ПВП-ОД3500 с включенным фактором IX на мышах BALB/C (самцы, возраст: 6-7 недель, вес: 18-20 г), показало, что среднесмертельная доза (ЛД₅₀) для данного препарата составляет около 65

мг/кг при однократном инъекционном введении, что позволяет отнести этот препарат к классу умеренно токсичных веществ.

Для подтверждения возможности создания высокоэффективной наноразмерной полимерной лекарственной формы, в качестве модельной низкомолекулярной лекарственной субстанции, было использовано противовоспалительное лекарственное вещество – индометацин (**Инд**). Недостатками индометацина, как и большинства других нестероидных противовоспалительных агентов, являются плохая растворимость в воде и выраженные побочные действия, в первую очередь язвенная (вызывающая появление язвы) активность.

Поскольку индометацин имеет гидрофобную природу, перспективным представлялось его включение за счет гидрофобных взаимодействий в ядро полимерных наночастиц на основе амфифильных полимеров ВП для возможного повышения эффективности в виде новой лекарственной формы.

Поскольку на свойства полимерных наночастиц с включенными БАВ оказывают влияние различные факторы, было проведено всестороннее изучение связи строения амфифильных полимеров ВП (массового соотношения гидрофильного и гидрофобных фрагментов), концентрации полимера, массового соотношения полимера и индометацина, способа включения индометацина в наночастицы с характеристиками получаемой лекарственной формы (размер частиц, эффективность, емкость включения индометацина).

Для этого были синтезированы амфифильные полимеры ВП с разной молекулярной массой гидрофильного полимерного фрагмента, содержащие *n*-алкильные или ди(*n*-алкильные) концевые гидрофобные группы различного строения. Для включения индометацина в наночастицы одновременно с их формированием, использовали те же методы (диализ или эмульсификация с последующим удалением растворителя под вакуумом), которые применяли для получения простых, не нагруженных, полимерных агрегатов. Размер и морфологию полученных наночастиц с индометацином определяли методами динамического светорассеяния и электронной микроскопии (рисунок 12). Все частицы с индометацином имели сферическую форму, относительно узкое мономодальное распределение по размерам, и их средний диаметр не превышал 200 нм.

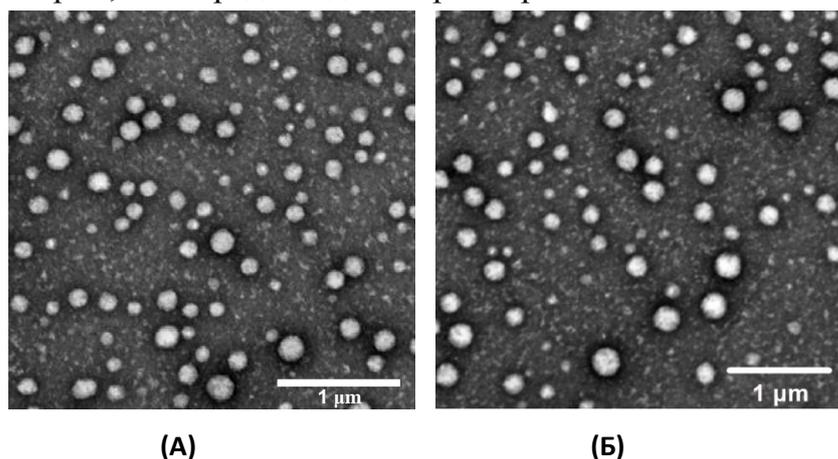


Рисунок 12 – Микрофотографии полимерных наночастиц, полученных из амфифильного полимера ПВП-ОД5000 (А) и полимерных частиц из полимера ПВП-ОД5000 с включенным индометацином при массовом соотношении полимера и индометацина 1:1 (Б)

Для оценки эффективности включения БАВ рассчитывали емкость включения по индометацину (**ЕВИнд**) и эффективность включения индометацина (**ЭВИнд**):

$$\text{ЕВИнд} = \frac{A - B}{C} \times 100\%, \quad \text{ЭВИнд} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

где А – общая масса использованного индометацина (мг); В – масса невключившегося, не растворенного индометацина, отделенного от коллоидного раствора центрифугированием (мг); С – масса использованного амфифильного полимера (мг). Альтернативно, определяли количество включенного в наночастицы индометацина после отделения осадка несолубилизованного лекарственного вещества методом спектрофотометрии.

Результаты проведенных исследований показали, что для включения индометацина в наночастицы оптимальным строением обладают амфифильные полимеры ВП с молекулярной массой 2000÷6000 Да и н-алкильной октадецильной гидрофобной группой, обладающие самыми низкими значениями ККА и образующие наиболее стабильные сферические ассоциаты наименьшего размера. В то же время, определение емкости и эффективности включения индометацина в полимерные наночастицы на основе амфифильных полимеров ВП показало, что эффективность загрузки лекарственным веществом при получении наночастиц эмульсионным методом во всех случаях заметно выше, чем при получении наноразмерных агрегатов диализным методом, что подтверждает более высокую эффективность эмульсионного метода.

При этом эффективность включения достигала практически 100% при массовом соотношении Инд/Амф-ПВП равном 0.5:1 или меньше, что являлось свидетельством полной солубилизации активного агента амфифильными полимерами. Эти результаты соответствовали наблюдениям в ходе экспериментов, когда получаемые коллоидные системы сохраняли стабильность долгое время, не образуя осадков. Увеличение количества добавляемого в систему индометацина вело к постепенному появлению осадка в системе. В результате эффективность включения лекарственного вещества значительно снижалась при повышении весового соотношения индометацин/полимер от 0.5:1 до 1:1.

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить оптимальные условия получения наиболее афинных к индометацину полимерных наночастиц, позволяющие получить лекарственную форму с высокой эффективностью включения (до 90 мас. %) и емкостью по лекарственному веществу (до 45 мас. %). Полученные суспензии нагруженных индометацином наночастиц из амфифильных полимеров ВП обладали высокой стабильностью на протяжении долгого времени без видимого изменения состава и выпадения осадка. Следует отметить, что приготовленные полимерные наночастицы с индометацином выдерживали лиофилизацию. После добавления воды лиофилизат легко редиспергировался с образованием устойчивой коллоидной системы. При хранении в течение 6 месяцев при комнатной температуре лиофилизированная форма сохраняла седиментационную и агрегационную устойчивость. Общее содержание индометацина и размеры наночастиц в течение такого периода наблюдения практически не изменялись.

Так как профиль выделения лекарственного вещества является одним из важнейших параметров его системы доставки, позволяющим моделировать ее поведение в организме, было проведено исследование процессов выделения этого БАВ из полученных наночастиц в условиях *in vitro*. На рисунке 13 представлены профили выделения индометацина из наночастиц на основе амфифильных полимеров различного строения, с концевой н-алкильной (Амф-ПВП) или ди(н-алкильной) гидрофобной группой (Амф₂-ПВП).

Так как ускорение выделения индометацина в начальный этап времени было минимальным или отсутствовало вовсе, можно сделать вывод о том, что удалось получить полимерные наночастицы без остаточных количеств лекарственного вещества на поверхности носителей. В то время как «чистый» индометацин показывал выделение в количестве 98% за первые 24 часа, индометацин, включенный во внутреннее ядро полимерных наночастиц, демонстрировал контролируемое выделение в количестве 45-

50 %, в срок до 10 дней. Скорость выделения индометацина сильно зависела от начального содержания загруженной лекарственной субстанции. Поскольку увеличение содержания гидрофобного индометацина в наночастицах усиливает его взаимодействие с гидрофобными алкильными фрагментами амфифильного полимера, оно может вызывать снижение скорости выделения и количества выделяемого БАВ.

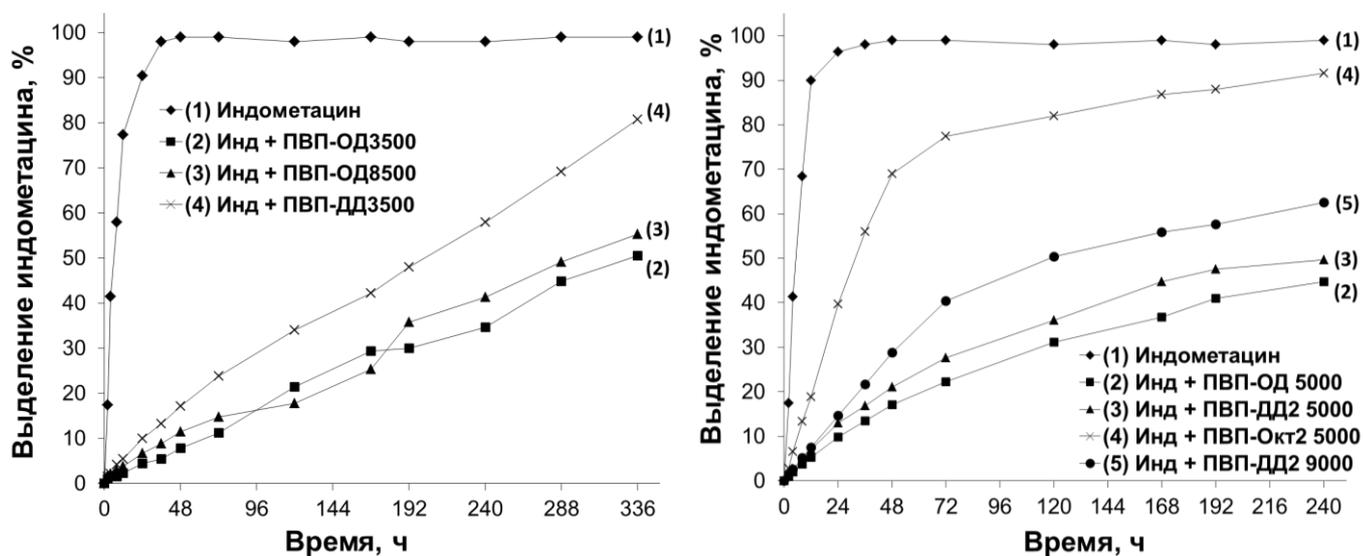


Рисунок 13 – Профили выделения индометацина из наночастиц на основе амфифильных полимеров Амф-ПВП и Амф₂-ПВП в условиях *in vitro* (буферный раствор, pH 7.4, 37°C, массовое соотношение индометацин/полимер – 0.5:1)

Так как ускорение выделения индометацина в начальный этап времени было минимальным или отсутствовало вовсе, можно сделать вывод о том, что удалось получить полимерные наночастицы без остаточных количеств лекарственного вещества на поверхности носителей. В то время как «чистый» индометацин показывал выделение в количестве 98% за первые 24 часа, индометацин, включенный во внутреннее ядро полимерных наночастиц, демонстрировал контролируемое выделение в количестве 45-50%, в срок до 10 дней. Скорость выделения индометацина сильно зависела от начального содержания загруженной лекарственной субстанции. Поскольку увеличение содержания гидрофобного индометацина в наночастицах усиливает его взаимодействие с гидрофобными алкильными фрагментами амфифильного полимера, оно может вызывать снижение скорости выделения и количества выделяемого БАВ.

Полученные профили выделения четко показывали, что основным фактором, влияющим на высвобождение лекарственного вещества, являлась афинность гидрофобного ядра полимерной наночастицы, образованного алкильными фрагментами полимера и активного вещества. Поэтому наноразмерные частицы, приготовленные из полимеров с более длинным гидрофобным фрагментом (октадецильным), показывают более медленное выделение БАВ. Молекулярная масса водорастворимого полимерного фрагмента не оказывала заметного влияния на скорость выделения индометацина.

Поскольку важную роль при разработке и применении новой лекарственной формы играет ее фармакокинетика и распределение в организме, были изучены биодоступность и биораспределение новой полимерной системы доставки индометацина в условиях *in vivo*. В качестве наносомальной формы индометацина в эксперименте использовали наночастицы на основе амфифильного ПВП с молекулярной массой гидрофильного фрагмента 3500 Да и одной концевой октадецильной гидрофобной группой (ПВП-ОД 3500). Соотношение индометацин/полимер в препарате составляло 0.25:1 (в/в), а размер

частиц – 162 ± 28 нм. В качестве препарата сравнения использовали суспензию свободного индометацина. Исследования проводили на крысах-самцах Wistar, препараты вводили внутривентриально, а дозы индометацина во всех случаях были равны и составляли 10 мг/кг.

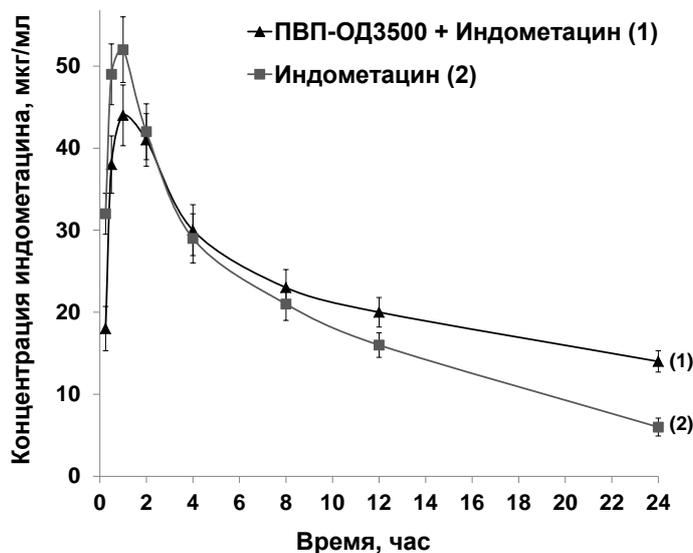


Рисунок 14 – Концентрация в плазме крови крыс индометацина после внутривентриального введения его стандартной и наносомальной формы (доза индометацина 10 мг/кг)

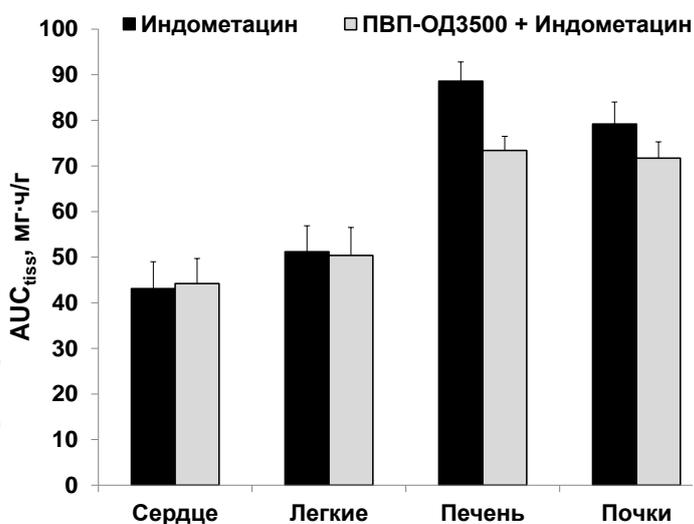


Рисунок 15 – Накопление индометацина в органах крыс спустя 8 часов после внутривентриального введения его стандартной и наносомальной формы (доза индометацина 10 мг/кг)

На рисунке 14 показано изменение концентрации индометацина в крови экспериментальных животных в течение 24 часов после однократного внутривентриального введения препаратов индометацина в виде полимерных наночастиц на основе амфифильного полимера ПВП-ОД 3500 и в виде свободной лекарственной субстанции.

В первый час после введения препаратов концентрация индометацина в крови, в случае применения полимерной наносомальной формы несколько ниже по сравнению с применением свободной лекарственной субстанции. При этом в обоих случаях максимум концентрации индометацина достигался приблизительно через 1ч и составил $51,82 \pm 6,47$ мкг/мл для чистого индометацина и $43,93 \pm 5,08$ мкг/мл для наночастиц на основе амфифильного полимера. Начиная с 4 часов после введения препаратов, наноразмерная полимерная форма индометацина, наоборот, обеспечивает его более высокую концентрацию в плазме крови вплоть до окончания эксперимента через 24 часа. Расчет основных фармакокинетических параметров индометацина в форме полимерных наночастиц и в свободном виде показал, что иммобилизация индометацина обеспечивает более низкую скорость элиминации активной субстанции, и, как следствие, более высокие значения среднего времени удержания индометацина в крови (MRT) при введении иммобилизованной формы индометацина по сравнению с его неиммобилизованной формой ($21,46 \pm 4,51$ часа против $12,01 \pm 0,93$ часа соответственно). Такой эффект можно объяснить контролируемым постепенным выделением индометацина из полимерных наночастиц и пролонгированной циркуляцией полимерных наночастиц *in vivo*.

Для исследования распределения индометацина, включенного в полимерные наночастицы, в органах и тканях организма определяли содержание этого лекарственного вещества в сердце, печени, почках и легких экспериментальных животных через 0.5, 1, 4 и 8 часов после однократного внутривентриального введения наносомального препарата. Для сравнения изучали накопление индометацина в органах после введения его в чистом виде в

эквивалентной дозе. Рассчитанные общие количества индометацина, аккумулированного в каждом из органов за 8 часов (AUC_{tiss}) представлены на рисунке 15.

Как было установлено, статистически значимая разница в распределении индометацина в органах крыс после применения его наносомальной и обычной формы наблюдается только для печени и почек, тогда как для сердца и легких такое достоверное различие отсутствует. Можно говорить о том, что иммобилизация индометацина в наночастицах на основе амфифильного ПВП снижает количество лекарственного вещества, захватываемого клетками ретикуло-эндотелиальной системы в печени и органами выделения (почками). Этот результат полностью согласуется с увеличением среднего времени удерживания действующего вещества в крови при введении иммобилизованной формы индометацина по сравнению с неиммобилизованной формой.

В целом, полученные результаты исследований *in vivo* свидетельствуют о повышении биодоступности индометацина при введении его в организм в виде наносомальной полимерной формы. Исходя из этого, можно предположить, что терапевтический эффект наносомальной формы индометацина может быть достигнут при меньшей дозе действующего вещества, а, следовательно, при этом значительно снижается вероятность проявления токсичности индометацина и возникновения побочных эффектов.

Таким образом, можно сделать вывод, что разработанные полимерные наночастицы, являются подходящими носителями для индометацина, так как обеспечивают высокую емкость и эффективность включения лекарственного вещества, а так же его пролонгированное и контролируемое выделение.

Для изучения биологической активности новой наноразмерной формы индометацина по сравнению с его чистой субстанцией, было проведено исследование противовоспалительного действия наночастиц из амфифильных полимеров ВП с включенным БАВ. Эксперименты проводились в условиях *in vivo* на лабораторных животных (крысы Wistar) с использованием двух разных моделей воспалительного процесса – модели отека лапы крыс, индуцированного полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) и модели каррагинан-индуцированного отека лапы крыс. В обоих случаях противовоспалительная активность испытываемого препарата определялась измерением объема лап животных после введения агентов, вызывающих отек. Терапевтическое воздействие испытываемого перпарата при этом оценивали по степени угнетения воспалительной реакции в сравнении с интактной левой лапой животного или реакцией лап крыс контрольной группы. Для сравнения также использовали свободный, немодифицированный индометацин.

Из полученных данных исследований, представленных на рисунке 16 видно, что и свободный индометацин и его новая форма введения на основе наночастиц из амфифильного полимера, введенные в количествах, обеспечивающих дозу индометацина 2,5 мг/кг веса животного, достоверно снижали степень воспаления. При этом новая полимерная форма индометацина с содержанием активного агента в дозе 2,5 мг/кг оказывало гораздо более ярко выраженное терапевтическое действие, которое можно объяснить повышением биодоступности и пролонгированностью действия наносомальной формы. Способность наноразмерной формы индометацина оказывать мощное противовоспалительное действие при введении экспериментальным животным свидетельствует о целесообразности и перспективности использования готовой инъекционной лекарственной формы индометацина на основе полимерных наночастиц.

Для изучения биосовместимости полимерных наночастиц амфифильного ПВП, содержащих индометацин, была исследована токсичность этой лекарственной формы.

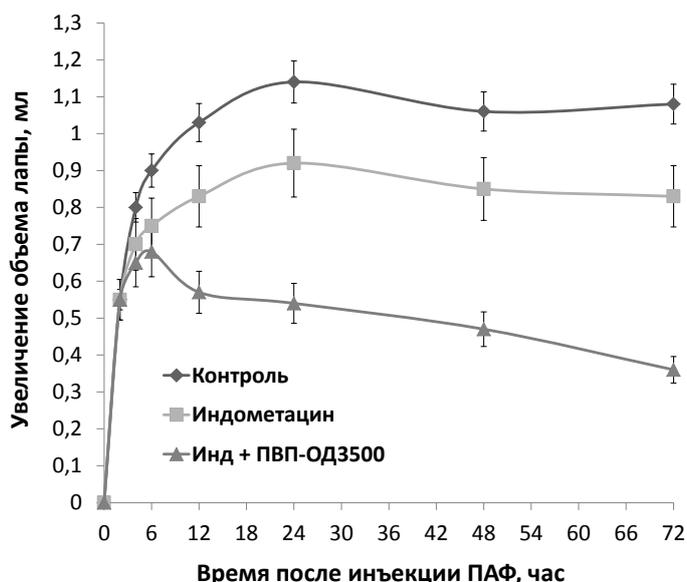


Рисунок 16 – Сравнение эффективности чистого индометацина и его наноразмерной полимерной формы (Инд+ПВП-ОД3500) при одинаковом содержании активного вещества (2,5 мг/кг) в отношении ПАФ-индуцированного отека у крыс (суб-хроническая модель)

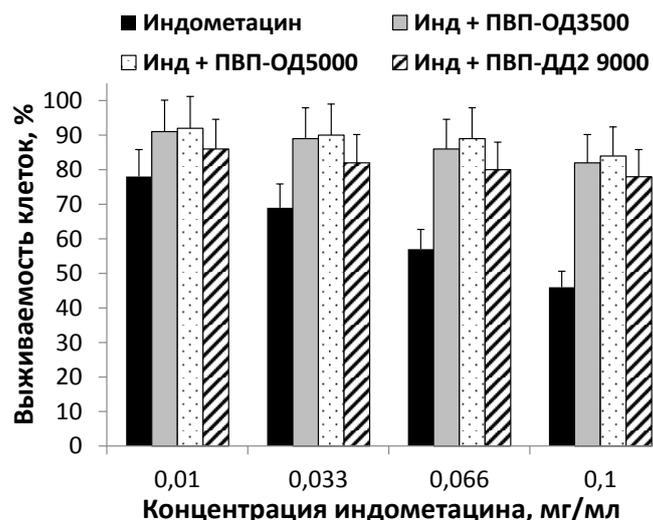


Рисунок 17 – Цитотоксичность полимерных наночастиц с включенным индометацином по отношению к фибробластам человека (EBF-H9)

Определение цитотоксичности полимерных наночастиц с индометацином проводили в условиях *in vitro* на фибробластах человека и сравнивали с цитотоксичностью свободного индометацина, при одинаковой его концентрации в препаратах.

Рисунок 17 демонстрирует результаты проведенных после 3-дневной инкубации клеток тестов. Как можно заметить, свободный индометацин демонстрировал более высокую цитотоксическую активность по сравнению с наночастицами из амфифильного полимера ВП, содержащими индометацин, при одинаковом его содержании в обоих препаратах. При этом цитотоксичность полимерных наночастиц с увеличением их концентрации и, соответственно, увеличением содержания в них индометацина, росла менее выражено, по сравнению со свободным индометацином, для которого наблюдалось пропорциональное увеличение цитотоксичности от концентрации.

Отсюда можно сделать вывод, что можно эффективно уменьшить прямое взаимодействие индометацина с клетками введением его в гидрофобное ядро наночастиц. Одновременно, внешняя оболочка частиц из водорастворимых цепей ПВП значительно уменьшала взаимодействие уже самих наночастиц с клетками, делая наночастицы незаметными для клеток. Кроме того, растянутое по времени выделение пониженных доз индометацина из полимерных наночастиц, также могло способствовать выживанию клеток. В результате, исследованные наночастицы из амфифильных полимеров ВП с индометацином не обладали какой либо существенной цитотоксичностью.

Острую токсичность наночастиц на основе амфифильных ПВП с включенным индометацином изучали на мышах линии BALB/C и крысах Wistar, при однократном внутрибрюшинном введении различных доз препаратов. Результаты определения параметров острой токсичности наночастиц на основе амфифильного полимера с молекулярной массой гидрофильного фрагмента 3500 Да и октадецильным гидрофобным фрагментом (ПВП-ОД3500) с включенным индометацином приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Показатели токсичности наноразмерной полимерной формы индометацина (Инд + ПВП-ОД3500)

Вид животных	Показатели токсичности, мг/кг			
	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄	ЛД ₈₄ /ЛД ₁₆
Мыши	48,1	52,2 ± 0,55	56,8	1,18
Крысы	49,2	54,7 ± 0,48	58,7	1,20

Таблица 9 – Ульцерогенная активность полимерных наночастиц ПВП-ОД3500 с индометацином

Препарат, доза	Индекс Паулса
Индометацин, 50 мг/кг	12,4
Инд + ПВП-ОД3500, 50 мг/кг	3,4
Инд + ПВП-ОД5000, 100 мг/кг	6,1

Расчитанное значение среднесмертельной дозы ЛД₅₀ для наноразмерной полимерной лекарственной формы индометацина при однократном внутрибрюшинном введении мышам BALB/C и крысам Wistar при пересчете на чистый индометацин составило 53 мг/кг веса животного. При этом ЛД₅₀ для чистой субстанции индометацина (в виде натриевой соли) составляет 13 мг/кг. Таким образом, включение индометацина в полимерные наночастицы, довольно заметно уменьшает его острую токсичность при однократном внутрибрюшинном введении. Полученное значение ЛД₅₀ позволяет отнести испытанную лекарственную форму индометацина к классу 3 умеренно токсичных веществ.

Учитывая тот факт, что основным негативным свойством большинства нестероидных противовоспалительных средств является высокий риск развития нежелательных реакций со стороны желудочно-кишечного тракта, оценивали состояние желудка у крыс Wistar при ежедневном внутрижелудочном введении нового лекарственного препарата на основе полимерных наночастиц из амфифильных полимеров ВП. В качестве препарата сравнения использовали чистую субстанцию индометацина в его ульцерогенной дозе (50 мг/кг при внутрижелудочном введении крысам).

Проведенные эксперименты подтвердили выраженную ульцерогенную активность чистого индометацина. При морфологическом макроскопическом исследовании желудка подопытных крыс, получавших внутрижелудочно индометацин (50 мг/кг), были выявлены выраженные изменения со стороны желудка и его достаточно серьезные поражения. С другой стороны, одновременно, было отмечено, что оба испытанных образца полимерных наночастиц с индометацином обладали меньшей ульцерогенной активностью, чем у индометацина, хотя содержание индометацина в них было на уровне (50 мг/кг) и в 2 раза выше (100 мг/кг), чем в препарате сравнения.

Для сравнительной оценки ульцерогенной активности новых препаратов индометацина по результатам исследования морфологических изменений со стороны желудка определяли значение индекса Паулса. Было выявлено, что значение индекса Паулса для чистого индометацина (доза 50 мг/кг) составило 12,4. Значение этого показателя для исследованных наносомальных форм индометацина, было ниже, чем для чистой субстанции индометацина (таблица 9). Низкая ульцерогенная активность наноразмерной формы индометацина может быть связана с тем, что полимерные наночастицы, как система доставки, способны оказывать влияние на фармакокинетику индометацина. Включение в гидрофобное ядро наночастиц должно способствовать селективному транспорту индометацина в воспаленные ткани, что возможно будет проявляться в повышении терапевтической эффективности препарата в целом.

Результаты проведенных исследований показали, что включение индометацина в наночастицы на основе амфифильных полимеров ВП позволяет получить лекарственную

форму, пригодную для инъекционного или перорального введения в организм. Такая форма индометацина оказывает эффективное, пролонгированное, противовоспалительное действие даже при низком содержании активного вещества в препарате. Кроме того, она обеспечивает существенное снижение побочного токсического действия индометацина на желудочно-кишечный тракт. Учитывая отсутствие в Российской Федерации выпускаемой промышленно инъекционной формы индометацина, а также существующие ограничения на применение его пероральной формы из-за выраженной токсичности и побочных эффектов, практическая значимость проведенных исследований и их результатов, а также перспективность дальнейшей разработки готовой инъекционной формы индометацина на основе полимерных наноразмерных носителей, очевидна.

5. Выводы

1. Предложен новый подход к решению проблемы доставки плохорастворимых биологически активных и лекарственных веществ, основанный на использовании в качестве носителей самопроизвольно образующихся в водных средах наноразмерных ассоциатов амфифильных производных поли-N-винилпирролидона и липосом, модифицированных амфифильными полимерами. Показаны возможности практического применения таких систем доставки на примере иммобилизованных форм соевого ингибитора протеиназ типа Баумана-Бирк и его производных, фактора крови IX, нистатина, амфотерицина В и индометацина.
2. Сформулированы научные подходы к синтезу новых амфифильных полимеров и сополимеров N-винилпирролидона, состоящих из гидрофильного полимерного фрагмента разной молекулярной массы и одной концевой n-алкильной или ди-n-алкильной гидрофобной группы различного строения.
3. Разработаны методы синтеза новых функциональных амфифильных полимеров, содержащих боковые функциональные группы в полимерном фрагменте – эпоксидные, альдегидные, аминокислотные и другие. Показана перспективность их использования для создания носителей для направленного транспорта БАВ в организме.
4. На основе детального анализа поведения амфифильных полимеров в водных средах, показано, что при определенных концентрациях они самопроизвольно формируют наноразмерные сферические структуры размером от 30 до 300 нм.
5. Получены и охарактеризованы липосомы, модифицированные синтезированными амфифильными производными поли-N-винилпирролидона (ПВП). Установлено, что модификация липосомальных мембран амфифильными полимерами ВП ведет к увеличению их стабильности против воздействия различных дестабилизирующих факторов, таких как поликатионы, детергенты, циклы замораживания-размораживания, механическое воздействие, и к повышению эффективности включенных в них БАВ.
6. Разработаны и опробованы методы получения наноразмерных полимерных систем доставки БАВ различной природы. С использованием модельных БАВ проведено сравнение различных методов получения наночастиц (диализ, ультразвуковое диспергирование, эмульсионный метод и т.д.) и определены оптимальные условия получения наноразмерных форм введения с высоким содержанием включенного БАВ (массовое соотношение гидрофильной и гидрофобной частей полимера, его концентрация, массовое соотношение полимера и БАВ, тип выбранного растворителя).
7. Показано, что наноносители на основе синтезированных амфифильных полимеров способны с высокой эффективностью включать БАВ различной природы. Впервые были получены полимерные наночастицы, содержащие соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк и его производные (препараты белковой природы, обладающие противовоспалительным и антиканцерогенным действием), противовоспалительный

препарат индометацин, противогрибковые препараты нистатин и амфотерицин, фактор крови IX. Для всех исследованных лекарственных веществ определены преимущества их новых иммобилизованных полимерных наноразмерных форм по сравнению с неиммобилизованными субстанциями.

8. Проведено изучение *in vitro* и *in vivo* биосовместимости синтезированных амфифильных полимеров, их цитотоксичности, острой токсичности, влияния на компоненты и реологические свойства крови. Показана высокая биосовместимость амфифильных полимеров ВП и наночастиц на их основе.
9. Разработана новая стратегия получения биосовместимых амфифильных полимеров с различным строением и массовым соотношением гидрофильной и гидрофобной частей и полимерных наноносителей на их основе. Практическая значимость новой стратегии состоит в возможности получать наноразмерную форму абсолютно разных по строению и свойствам биологически активных веществ, сочетающую биосовместимость, направленную доставку в организме, сниженную эффективную дозу и пролонгированное, контролируемое действие.

6. Основные публикации по теме диссертации

1. Виллемсон А.Л., Кусков А.Н., Штильман М.И., Галевская Л.В., Рюмина Е.В., Ларионова Н.И. Взаимодействие полимерных агрегатов стеароил-поли-N-винилпирролидона с компонентами крови // Биохимия. 2004. Т. 69. № 6. С. 765-773. (IF 1.421)
2. Кусков А.Н., Штильман М.И., Тсатсакис А.М., Торчилин В.П., Ямсков И.А. Синтез амфифильных полимеров N-винилпирролидона и акриламида различного строения // Журнал прикладной химии. 2005. Т. 78. № 5. С. 822-826. (IF 0.307)
3. Kuskov A.N., Shtilman M.I., Villemson A.L., Larionova N.I., Tsatsakis A.M., Tsikalas I., Rizos A.K. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanocarriers with incorporated model proteins // Journal of Physics: Condensed Matter. 2007. V. 19. N. 20. P. 5139-5150. (IF 2.209)
4. Kuskov A.N., Shtilman M.I., Goryachaya A.V., Tashmuhamedov R.I., Yaroslavov A.A., Torchilin V.P., Tsatsakis A.M., Rizos A.K. Self-assembling nanoscaled drug delivery systems composed of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones // Journal of Non-Crystalline Solids. 2007. V. 353. I. 41-43. P. 3969-3975. (IF 1.825)
5. Ямсков И.А., Кусков А.Н., Бабиевский К.К., Березин Б.Б., Краюхина М.А., Самойлова Н.А., Тихонов В.Е., Штильман М.И. Новые липосомальные формы противогрибковых антибиотиков, модифицированные амфифильными полимерами // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 6. С. 688-693. (IF 0.671)
6. Кусков А.Н., Горячая А.В., Супрун О.В., Ярославов А.А., Штильман М.И., Мелик-Нубаров Н.С. Поведение амфифильных полимеров N-винилпирролидона в водных средах // Пластические массы. 2009. № 1. С. 36-43. (Импакт-фактор РИНЦ 0.240)
7. Kuskov A.N., Voskresenskaya A.A., Goryachaya A.V., Shtilman M.I., Spandidos D.A., Rizos A.K., Tsatsakis A.M. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal anti-inflammatory drugs: characterization and *in vitro* controlled release of indomethacin // International Journal of Molecular Medicine. 2010. V. 26. N. 1. P. 85-94. (IF 2.348)
8. Kuskov A.N., Voskresenskaya A.A., Goryachaya A.V., Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M. Preparation and characterization of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles containing indomethacin // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2010. V. 21. N. 5. P. 1521-1530. (IF 2.272)
9. Шаймурзин А.Х., Штильман М.И., Кусков А.Н. Получение и исследование иммобилизованной формы 6-бензиламинопурина на полимерном носителе // Пластические массы. 2013. № 10. С. 31-35. (Импакт-фактор РИНЦ 0.240)

10. Кусков А.Н., Бабкина С.С., Куликов П.П., Штильман М.И. Получение и анализ свойств наночастиц на основе амфифильного поли-N-винил-2-пирролидона // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 38. № 4. С. 109-118. (Импакт-фактор РИНЦ 0.321)
11. Кусков А.Н., Куликов П.П., Громов С.А., Штильман М.И. Синтез амфифильных полимеров N-винилпирролидона с альдегидными группами // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 46. № 6. С. 42-50. (Импакт-фактор РИНЦ 0.321)
12. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Shtilman M.I., Rakitskii V.N., Tsatsakis A.M. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles: Cytotoxicity and acute toxicity study // Food and Chemical Toxicology. 2016. V. 96. P. 273–279. (IF 3.584)
13. Кусков А.Н., Куликов П.П., Лусс А.Л., Горячая А.В., Штильман М.И. Получение полимерных наночастиц самосборкой амфифильных производных поли-N-винилпирролидона в водных средах // Журнал прикладной химии. 2016. Т. 89. № 9. С. 1170-1178. (IF 0.307)
14. Куликов П.П., Кусков А.Н., Горячая А.В., Лусс А.Н., Штильман М.И. Амфифильный поли-N-винил-2-пирролидон: получение, свойства, наночастицы на его основе // Все материалы. Энциклопедический справочник. 2017. Т. 1. С 15-21. (Импакт-фактор РИНЦ 0.599)
15. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Goryachaya A.V., Tzatzarakis M.N., Docea A.O., Velonia K., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal, anti-inflammatory drugs: In vitro cytotoxicity and in vivo acute toxicity study // Nanomedicine: NBM. 2017. V. 13(3). P. 1021-1030. (IF 6.922)
16. Кусков А.Н., Штильман М.И., Грицкова И.А., Тсатсакис А.М. Способ получения системы доставки водонерастворимых и плохорастворимых биологически активных веществ и лекарственная форма на ее основе: патент РФ 2325151; заявл. 29.06.06; опубл. 27.05.08, Бюл. № 15.
17. Кусков А.Н., Горячая А.В., Артюхов А.А., Штильман М.И. Фунгицидный материал для пищевых и сельскохозяйственных продуктов: патент РФ 2432741; заявл. 18.03.10; опубл. 10.11.11, Бюл. № 31.
18. Кусков А.Н., Горячая А.В., Артюхов А.А., Штильман М.И. Способ получения липосомальной формы биологически активного вещества: патент РФ 2477632; заявл. 22.12.11; опубл. 20.03.13, Бюл. № 8.
19. Шаймурзин А.Х., Кусков А.Н., Штильман М.И., Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А. Фармацевтическая композиция для применения в онкологии: патент РФ 2560702; заявл. 05.06.14; опубл. 20.08.15, Бюл. № 23.
20. Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И., Тзатзаракис М.А., Тсатсакис А.М. Водосовместимые полимерные композиции для доставки биологически активных веществ: патент РФ 2580649; заявл. 27.03.15; опубл. 10.04.16, Бюл. № 10.
21. Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И., Тсатсакис А.М. Амфифильные гомополимеры и способ их получения: патент РФ 2599576; заявл. 17.09.14; опубл. 10.10.16, Бюл. № 28.
22. Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И., Тсатсакис А.М. Амфифильные сополимеры и способ их получения: патент РФ 2599579; заявл. 17.10.14; опубл. 10.10.16, Бюл. № 28.
23. Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И., Ананьев В.В., Аксенова Т.И. Амфифильные полимерные металлокомплексы и способ их получения: патент РФ 2608304; заявл. 11.09.15; опубл. 17.01.17, Бюл. № 2.