

# Наноразмерные лекарственные формы для доставки белков

Каплун А.П.<sup>1,2</sup>, Красильникова В.В.<sup>2</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

<sup>2</sup> — Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86

*Белки как лекарственные препараты имеют серьезные недостатки: быстро гидролизуются после введения, могут вызывать нежелательные иммунные реакции. Важным способом преодоления этих недостатков является либо их модификация, либо включение в микро- или наночастицы. В обзоре на основе конкретных примеров рассматриваются основные принципы модификации и инкапсуляции белков, а также эффекты, получаемые от таких манипуляций.*

**Ключевые слова:** вакцины, липосомы, нанокристаллы, наночастицы, пассивное нацеливание, эмульсии

## Список сокращений:

АХЭ — ацетилхолинэстераза

БСА — бычий сывороточный альбумин

ГУ — β-глюкоуридаза

ДМФХ — димиристоилфосфатидилхоллин

ДОФГ — диолеоилфосфатидилглицерин

ДОФХ — диолеоилфосфатидилхоллин

ДПФГ — дипальмитоилфосфатидилглицерин

ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхоллин

КБ — концентрирующий буфер

Лс — липосома

НЧ — наночастица

ПАВ — поверхностно-активное вещество

ПВП — поливинилпирролидон

ПЛс — пролипосома

ПМГК — поли(D,L-лактид-со-гликолид)

ПМК — поли(D,L-лактид), полимолочная кислота

ПОФС — 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфосерин

ПОФХ — 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохоллин

ПОФЭ — 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин

ПЭГ — полиэтиленгликоль

СА — стеариламин

ТФ — трансферрин

ФГ — фосфатидилглицерин

ФНО — фактор некроза опухолей

Хол — холестерин

ЧСА — человеческий сывороточный альбумин

яФГ — яичный фосфатидилглицерин

яФХ — яичный фосфатидилхоллин

СHEMS — холестерилгемисукцинат

DOTAP — диолеоилтриметиламмонийпропан

hIFN $\gamma$  — человеческий интерферон  $\gamma$

K<sub>p</sub> — коэффициент распределения

L-ПМК — поли-L-молочная кислота

MES — 2-(N-морфолино)этансульфонокислота

MOPS — 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота

SOF — метод вращающейся масляной пленки

## Введение

Начало использования инсулина в 1922 г. для лечения диабета I типа было одним из значительных медицинских успехов XX века, обеспечивающим лечение болезни, бывшей до этого смертельной для пациента к моменту достижения им двадцатилетнего возраста [1, 2]. Введение лекарства осуществлялось инъекцией, вызывающей длительное ощущение боли, связанное с использованием игл, и хотя в настоящее время иглы для введения инсулина имеют очень малый диаметр, такой способ введения лекарства является не самым удобным и приятным для пациента.

Другие белковые препараты появились примерно 50 лет спустя; ими стали фактор крови VIII (из плазмы крови человека; для лечения гемофилии) и гормон роста (для лечения карликовости) [3]. Появление технологии рекомбинантных ДНК расширило возможности, как для получения белков, так и для манипулирования их функциональными характеристиками. Сейчас белковые препараты широко используются в терапии различных заболеваний, в частности и для терапии рака. Однако их при-

менение зачастую затруднено. Существует ряд негативных факторов, в частности:

1) непосредственно сами белки плохо подходят для перорального введения (они имеют короткое время жизни в среде желудка и кишечника [4] и практически не всасываются в ЖКТ;

2) белки быстро гидролизуются и после внутривенного или другого парентерального введения, следствием чего является необходимость частого введения и увеличения дозы;

3) при введении белков «нечеловеческого» происхождения наблюдаются иммунные реакции, которые могут препятствовать повторному введению препарата;

4) распределение белка в организме редко оказывается оптимальным для лечения, что также является недостатком, учитывая, что белковые препараты довольно дороги.

Возможны два пути решения этих проблем:

1) модификация белка (как химическая, так и генно-инженерная);

2) включение белка в микро- и наночастицы.

## Модификации белка

Прежде всего, хотелось бы определиться с терминами. На сайте госкорпорации «Роснано» мы находим определения [5]:

**Наночастица** — аморфная или полукристаллическая структура, имеющая хотя бы один характерный размер в диапазоне 1—100 нм;

**Молекула** — стабильная группа из двух и более атомов, удерживаемых вместе химическими связями. Молекула — наименьшая частица вещества, полностью сохраняющая его свойства;

**Наноматериалы** — разновидность продукции нанотехнологии в виде материалов, содержащих структурные элементы с нанометровыми размерами, наличие которых обеспечивает существенное улучшение или появление качественно новых механических, химических, физических, биологических и других свойств, определяемых проявлением наномасштабных факторов.

Из приведенных определений остается неясным, может ли молекула (например, белка, модифицированного белка, в частности, сшитого, нуклеиновой кислоты, особенно двухцепочечной) считаться наночастицей? Вследствие этой неопределенности и близости свойств с наночастицами, мы сочли уместным включить в обзор и главу, посвященную модифицированным белкам.

Итак, многие проблемы могут быть решены присоединением к терапевтическому белку полипептидов, олигосахаридов, жирных кислот или синтетических полимеров. Примерами модификации белка могут служить:

- 1) получение фьюжн-белков;
- 2) гликозилирование;
- 3) гидрофобизация;
- 4) ПЭГилирование.

### Фьюжн-белки

Фьюжн-белки, как известно, получают в результате генно-инженерных манипуляций, представляют собой полипептидную цепь, состоящую из устойчивого в сыворотке крови эндогенного белка или его фрагмента (например, человеческий сывороточный альбумин, трансферрин, Fc-домен иммуноглобулина) и терапевтического белка [3]. Фьюжн-белки имеют сниженный почечный клиренс благодаря увеличению размера белка.

Коммерческим примером Fc-фьюжн-белка является Enbrel® (Amgen, лечение псориаза, ревматоидного артрита и др. [6]) — Fc-фрагмент IgG<sub>1</sub>, соединенный с экстрацеллюлярным доменом 75 кДа FНО $\alpha$  рецептора. Этот фьюжн-белок не только обладает существенно увеличенным временем циркуляции (режим введения — 1 раз в неделю), но также обладает увеличенным сроком благодаря большей авидности к фактору некроза опухоли FНО $\alpha$ .

Также существуют и препараты на основе ЧСА-фьюжн белков, например, продукты фирмы Human Genome Sciences [7] Albuleukin (лечение солидных опухолей) — фьюжн-белок ЧСА и интерлейкина-2 и Albutropin™ (лечение дефицита гормона роста) — фьюжн-белок ЧСА и человеческого гормона роста, а также на основе трансферрина (например, BioRexis Pharmaceutical Corporation разрабатывает такие технологии, время полужизни в организме полученных продуктов составляет 14—17 дней [8]).

Альтернативой фьюжн-белкам может стать конъюгация белков, как например используемая компанией ConjuChem технология drug affinity complex (DAC™) — терапевтический белок ковалентно связывается с ЧСА с использованием свободной тиольной группы в ЧСА [9].

### Гликозилирование

Гликоинженерия использует природный, посттрансляционный процесс гликозилирования для создания белковых молекул с увеличенным отрицательным зарядом, повышенным гидродинамическим размером, что может уменьшить почечный клиренс, модулировать рецептор-опосредованный эндоцитоз и маскировать сайты протеолитической деградации [10].

Примером применения гликозилирования белка для улучшения свойств лекарственного препарата может служить продукт компании Amgen—Aranesp® [6] — генно-инженерный препарат эритропоэтина, в котором увеличено число олигогликозидных цепей за счет введения дополнительных сайтов гликозилирования. Этот препарат назначают онкологическим больным, проходящим курс химиотерапии, для лечения анемии, также применяют при хроническом заболевании почек. Время полужизни Aranesp® в организме выросло по сравнению с немодифицированным эритропоэтином практически в 4 раза (32 ч), частота введений препарата по сравнению с негликозилированным уменьшена с 3 до 1 раза в неделю.

### Гидрофобизация

Ацилирование жирными кислотами — один из химических способов модификации, используемый для увеличения времени действия инсулина [3]. Так, к примеру, ацилирование применялось для продления времени действия инсулина (Insulin Detemir компания Novo-Nordisk). Ацилирование инсулина по LysB29 миристиновой кислотой увеличивает гидрофобность гексамерного комплекса, а, следовательно, замедляет выход лекарства в кровоток от места введения из-за взаимодействия между гексамерами.

### ПЭГилирование

Впервые о ПЭГилировании белков для модификации альбумина и каталазы сообщалось в семидесятых годах XX века в статьях A. Abuchowsky и F.F. Davies [11, 12]. Модифицированные белки сохраняли свою активность, что послужило толчком к развитию этого направления. Наиболее часто модификации подвергаются аминокислотные группы, однако также разработаны методы ПЭГилирования тиольной, гидроксильной и амидной групп; для этого используют специфические химические или ферментативные методы [13].

Применение ПЭГилирования позволяет:

- 1) уменьшить клиренс (и, следовательно, увеличить время циркуляции) за счет увеличения размера молекулы;
- 2) уменьшить доступность белка для протеолитических ферментов и антител, что приводит к увеличению времени действия;
- 3) увеличить растворимость за счет гидрофильности ПЭГ.

Благодаря этим свойствам ПЭГилирование является на сегодняшний день наиболее частой химической модификацией белковых препаратов — к 2005 г. существовало уже 6 торговых белковых препаратов: Oncaspar® (ПЭГ-ас-

псрагиназа) [14], Adagen® (ПЭГ-аденозиндеаминаза) [15], Pegasys® (ПЭГ-интерферон  $\alpha 2a$ ) [16], PEG-Intron® (ПЭГ-интерферон  $\alpha 2b$ ) [17], Neulasta® (ПЭГ-колониестимулирующий фактор гранулоцитов) [18], Somavert® (ПЭГ-Гилированный антагонист рецептора гормона роста) [19].

Обычно применяют ПЭГ с молекулярной массой линейных молекул не более 25 кДа и не более 40 кДа для разветвленных. Однако существует серьезная проблема — ПЭГ полидисперсны, даже современные методы очистки не обеспечивают полное отсутствие молекул ПЭГ с большой молекулярной массой, что определяет их токсичность.

Существуют примеры, когда белки играют роль носителей лекарственных субстанций, улучшающих их фармакологические свойства. Так, препарат Abraxane (American Pharmaceutical Partners, Inc.) [20], являющийся конъюгатом противоопухолевой субстанции паклитаксела и ЧСА, предназначенный для лечения метастатического рака грудной железы, обладает уменьшенной токсичностью, что позволяет увеличить дозу. Кроме того, время его введения составляет 30 мин (стандартный препарат паклитаксела вводится в течение 3 ч).

Большими перспективами обладают иммунотоксины — конъюгаты специфических иммуноглобулинов и токсинов. Пока в медицинскую практику введен один подобный препарат Mylotarg™ (Wyeth Pharmaceuticals) [21] — конъюгат гуманизированных моноклональных антител (IgG4,  $\kappa$ ) к CD33 антигену с противоопухолевым антибиотиком calicheamicin. Он предназначен для лечения миелодисплазии и острой лейкемии. Его цитотоксичность к клеткам лейкемии в 77 000 раз выше, чем к стволовым клеткам крови. Такая поразительная специфичность достигается уникальным спейсером, соединяющим два компонента конъюгата — он расщепляется лишь в лейкоцитарных клетках, куда проникает благодаря иммуноглобулину, специфичному к CD33 антигену.

### Корпускулярные формы для создания белковых препаратов

Сейчас известно более десятка типов наночастиц медицинского назначения [22]. Их все возрастающее применение как средств доставки лекарственных субстанций определяется общими для всех наночастиц свойствами. Эти свойства определяются размером частиц, формой и свойствами поверхности. Размер наночастиц во многом определяет их распределение в организме. Принятый термин, отражающий это свойство — *пассивное нацеливание*, своеобразный ситовой эффект.

Так, известно, что через почки выходят молекулы менее 60–70 кДа (~5 нм), в норме в капиллярах поры <40 нм, в опухолях поры в капиллярах до 200–600 нм. Из этого следует, что молекулы или частицы более 60 кДа долго циркулируют в крови (потому что не фильтруются через почки); молекулы или частицы более 40 нм еще дольше циркулируют в крови; проявляют меньшую токсичность, потому что не выходят из капилляров; молекулы или частицы размером 100–600 нм выходят из капилляров только в зонах воспаления (например, в раковые опухоли); для уменьшения токсичности, молекулы или наночастицы должны катаболизироваться до полярных веществ с  $M_w < 60$  кДа, которые могут вы-

водиться через почки. Недавно появились данные о том, что частицы размером 200 нм, введенные в глазное яблоко, могут там оставаться в течение двух месяцев, в то время как частицы с размером 20 нм элиминируются за несколько часов [23]. Ранее было обнаружено, что в волосяные фолликулы проникают липосомы размером менее 600 нм [24].

Также в большинстве случаев включение вещества в наночастицы повышает стабильность его в организме, так как экранирует молекулы субстанции от среды организма. Выход нагруженной субстанции из наночастицы происходит постепенно, что позволяет получать лекарственные средства с пролонгированным действием.

В состав некоторых наночастиц (липосомы, жировые эмульсии, кохлеаты) входят только природные вещества, такие наночастицы, как правило, менее токсичны; другие состоят из искусственных полимеров (полимерные мицеллы, полимерные наносферы). ПАВ и искусственные полимеры используются для стабилизации большинства типов частиц ([25]). Наиболее подходящий тип частиц-носителей следует выбирать в зависимости от свойств включаемой субстанции, способа применения препарата. Подходящие носители должны обеспечивать, по возможности, наибольшую ёмкость — соотношение вещества/носитель, длительное хранение готового препарата, что подразумевает и химическую стабильность, и агрегационную устойчивость препарата.

Что касается белков как высокомолекулярных полярных веществ, то для их инкапсуляции наиболее подходят наночастицы, которые имеют внутренний водный объем или внутреннее полярное ядро: липосомы, кохлеаты, множественные эмульсии, кубосомы, полимерные наносферы. В некоторых случаях белки могут сорбироваться (адьюванты) на поверхности наночастиц или присоединяться ковалентно (на нанокристаллы, в том числе магнитные наночастицы). К особому типу наночастиц следует отнести коагулированные белки.

### Липосомы

Первое место по публикациям, посвященным использованию НЧ для доставки белков, прочно занимают Лс. Идея использовать Лс для инкапсуляции белков появилась практически одновременно с их первым описанием в конце 60-х годов [26]. Привлекательность Лс можно объяснить их способностью защитить белки от биодegradации, возможностью получать препараты пролонгированного действия, вводить молекулярный адрес, а также эффектом пассивного нацеливания.

Но у Лс есть и серьезный недостаток — длительное хранение липосомальных препаратов без лиофилизации — скорее исключение, чем правило, из-за окисления липидов, агрегации Лс, выхода нагруженного вещества из липосом.

Многочисленные исследования направлены на улучшение характеристик Лс. Так, например, описан довольно экзотический вариант: Лс стабилизировали полимеризацией гидрофобных мономеров, локализованных в бислое [27]. Более реальный метод увеличить стабильность Лс — введение амфифильных диблок- и триблок-сополимеров [27].

Еще один способ увеличить стабильность мембраны был обнаружен сравнительно недавно — хитозан, адсорбированный на поверхности нагруженных инсулином

Лс после их получения, делает бислой намного менее проницаемым [28]. Такой липосомальный препарат, введенный энтерально, давал снижение уровня глюкозы в крови до 15% от начального.

Самый распространенный способ получения липосом — метод гидратации липидной пленки [29], который дает мультиламеллярные везикулы. Моноламеллярные Лс образуются обработкой ультразвуком либо экструзией через ядерные фильтры. В последнем случае размер частиц будет зависеть от размера пор фильтра. При применении пресса Френча получают липосомы, размер которых, в основном, зависит от липидного состава [30].

Метод гидратации липидной пленки (с последующей экструзией через ядерные фильтры) позволяет включать в Лс белки без потери их активности. Однако эффективность данного метода зачастую довольно мала. Colletier с соавторами [31] изучали влияние условий получения Лс методом гидратирования липидной пленки на эффективность включения модельного белка ацетилхолинэстеразы (АХЭ). В результате этого исследования были получены важные результаты, которые полезно рассмотреть подробно.

1. Гидратация липидной пленки приводит к образованию негомогенных мультиламеллярных везикул, которые после нескольких циклов замораживания-оттаивания превращаются в моноламеллярные. При каждом таком цикле возможна денатурация белка, для изучения влияния процедуры замораживания-оттаивания образцы мультиламеллярных везикул подвергали различному числу циклов замораживания-оттаивания — от 0 до 20. Это свидетельствует о том, что инкапсуляция происходит в основном на стадии замораживания-оттаивания. Оказалось, что инкапсуляция АХЭ возрастает с увеличением количества циклов замораживания-оттаивания.

2. Экструзия через ядерные фильтры позволяет получить дисперсию Лс с узким распределением частиц по размерам. Оптимальным с точки зрения эффективности загрузки оказалось 10 продавливаний.

3. Наиболее эффективным оказались поликарбонатные фильтры, фильтры из ацетата целлюлозы или восстановленной целлюлозы. Экструзия через фильтры из политетрафторэтилена и ацетата целлюлозы со стеклянными волокнами привела к намного меньшей инкапсуляции. Так как эти фильтры гидрофобны, можно предположить, что происходило удерживание некоторых Лс и молекул белка на этих фильтрах.

4. Состав буфера и значение pH (от 6.0 до 8.5) не оказывает существенного влияния. Однако на включение белка в Лс существенное влияние оказывает ионная сила раствора. Было показано, что увеличение концентрации NaCl от 10 мкМ до 1 М уменьшало процент включения с 48 до 14%, что объясняется, очевидно, ослаблением электростатических взаимодействий между молекулами фосфолипидов и белков при увеличении ионной силы.

5. При использовании в качестве криопротекторов 100 мМ растворов маннозы, сахарозы или трегалозы не наблюдалось значительного изменения эффективности включения. Было отмечено, что при добавлении ПЭГ и БСА происходит снижение инкапсуляции белка (с 48 до 5% для 1 мМ ПЭГ и с 48 до 17% для 10 мг/мл БСА).

6. Лс, образованные фосфолипидами с одинаковыми полярными группами, но с различными углеводородными цепями, имели близкие значения инкапсуляции бел-

ка. Так как при pH 8.5 белок заряжен отрицательно, отрицательный заряд Лс уменьшает эффективность включения.

7. Увеличение неспецифических взаимодействий между белком и липидами ограничено ионной силой и плотностью поверхностного заряда белка. Известно, что наличие «гистидиновых меток» (histidine tags) в белке позволяет образовывать координационные связи с никелем. Так как молекула АХЭ имела три «гистидиновые метки» на поверхности, добавление к яФХ 1% DOGS-NTA-Ni позволяет значительно увеличить эффективность включения АХЭ (с 7 до 17%). Для подтверждения значимости координационных связей, а не электростатических взаимодействий, исследования проводились в 0,5 М NaCl.

Оказалось, что при тщательном подборе условий получения Лс для АХЭ можно добиться включения в Лс до 40% от исходно загруженного в Лс белка.

Метод обращения фаз для белков (и других дорогих субстанций) представляет наибольшую ценность, так как дает наилучшую степень загрузки. Так, именно этот метод использовали китайские ученые для получения липосом, загруженных инсулином для перорального введения [28].

При включении белка в Лс необходимо учитывать, каким образом будут вводиться Лс в организм, а также, в какой момент после введения препарата потребуются высвобождение включенного белка. Так, например, Epstein с соавторами [32] исследовали липосомальную форму мышиного интерферона  $\gamma$  и выяснили, что его биологическая активность зависит от связывания с мембранным рецептором. Таким образом, при достаточной эффективности включения интерферона в Лс, для получения необходимого биологического эффекта нужно обеспечить возможность быстрого выхода белка из Лс в месте действия. Частое введение препарата, необходимое для достижения терапевтического эффекта, зачастую приводит к нежелательным побочным эффектам. Van Slooten с соавторами [33] исследовали возможность применения липосом для длительного высвобождения человеческого интерферона  $\gamma$ . Исследуемые липосомальные формы вводились подкожно, поэтому дисперсии Лс получали методом липидной пленки, не добиваясь их монодисперсности. Оказалось, что для Лс, состоящих только из яФХ, эффективность включения hIFN $\gamma$  минимальна по сравнению с Лс других составов.

Наилучшая эффективность включения была достигнута при использовании смеси липидов яФХ с отрицательно заряженным яФГ (увеличение эффективности включения >80%). Включение положительно заряженного СА приводит к очень низкой эффективности включения белка. Эффективность включения не зависит ни от степени насыщенности ацильной цепи фосфолипида, ни от включения в липидный бислой холестерина.

Рассчитанная изоэлектрическая точка hIFN $\gamma$  имеет значение около 10, поэтому при более низких значениях pH белок имеет положительный заряд, что объясняет прямую зависимость эффективности включения от  $\zeta$ -потенциала. Оценивали эффект липидного состава на адсорбцию белка (hIFN $\gamma$ ) на поверхности Лс при pH 5.0. Минимальное количество белка ассоциировалось на поверхности Лс при применении яФХ и яФХ:СА липосом (табл. 1).

Введение отрицательно заряженного фосфолипида (яФГ) в состав Лс значительно увеличивает адсорбцию hIFN $\gamma$  на поверхности частиц. Важность электростатического взаимодействия была подтверждена отдельным экспериментом: отрицательно заряженные Лс, содержащие СНЕМС, инкубировались с положительно заряженным белком при рН 7.5, измерялась адсорбция белка на поверхности Лс, после чего рН понижали до 4.0 (табл. 1). Оказалось, что при понижении рН происходит значительная десорбция белка с поверхности Лс, так как при этом рН снижается доля заряженных фосфолипидов.

Количество hIFN $\gamma$ , адсорбированного на поверхности Лс зависит от среды приготовления дисперсии. Оказалось, что при использовании метода гидратации липидной пленки малым объемом раствора белка в буфере КБ и последующим доведением до нужного объема раствором, содержащим 0,9% NaCl, можно значительно уменьшить количество поверхностно адсорбированного белка по сравнению с обычным методом гидратации липидной пленки (табл. 2). При использовании данного метода несколько снижается эффективность включения, однако это уменьшение происходит в основном за счет десорбции hIFN $\gamma$  с поверхности Лс.

Для «жидких» (с мембраной, находящейся в жидко-кристаллическом состоянии) Лс (яФХ : яФГ 9:1) с наибольшей эффективностью включения белка и для «твердых» (с мембраной, находящейся в состоянии геля) Лс (ДПФХ : ДПФГ : Хол 10:1:10) исследовали динамику выхода hIFN $\gamma$  из Лс после подкожного введения.

Инкапсуляция белка в жидкие Лс не позволяет существенно увеличить время задержки белка в месте введения, в то время как твердые Лс обладают замедленным профилем клиренса: примерно 25% от введенной дозы выводится с места инъекции за первые 4 ч, оставшийся белок медленно выходит в течение всего периода наблюдений (168 ч).

Липосомальные формы белков могут быть использованы не только как водные дисперсии, но и в качестве сухих порошков. Использование аэрозолей для доставки белков в легкие широко исследуется в последнее время. Легкие обладают большой поверхностью, очень тонкой слизистой оболочкой и хорошим кровоснабжением. Y.Y. Huang и С.Н. Wang [34] разрабатывали липосомальную форму инсулина, пригодную для использования в небулайзере. Размер полученных частиц составлял 1 мкм. Наличие в Лс флуоресцентной метки показало, что Лс равномерно и эффективно распределяются в легочных альвеолах. Доставка в легкие белка в Лс обеспечивает увеличение времени выхода лекарства из легких и уменьшение экстрапульмонарных побочных эффектов.

Так, D. Li и A.J. Nikey [35] исследовали применение Лс в виде порошков для доставки белков через легкие. В качестве модельного белка использовали  $\beta$ -глобулиноидазу. Исследовалось влияние лиофилизации и размалывание струйной мельницей на активность белка в Лс.

Из исследованных липидных составов (табл. 3) наилучшую эффективность включения белка получили при использовании смеси липидов ДОФХ-Хол-ДОФГ (7:2:1) и ДМФХ-Хол (7:3). Последняя была выбрана для дальней-

Таблица 1

**Адсорбция hIFN $\gamma$  на поверхности пустых, предварительно сформированных Лс различного липидного состава**

Липидный состав	Мольное соотношение	Поверхностно-связанный hIFN $\gamma$	
		% от добавленного белка	мкг hIFN $\gamma$ /мг липида
яФХ	—	8 ± 1	0,13 ± 0,02
яФХ : яФГ	15:1	62 ± 10	1,03 ± 0,17
яФХ : яФГ	9:1	91 ± 4	1,52 ± 0,07
яФХ : яФГ	4:1	88 ± 6	1,47 ± 0,10
яФХ : яФГ : Хол	10:1:10	80 ± 15	1,33 ± 0,25
ДПФХ : ДПФГ : Хол	10:1:10	85 ± 9	1,42 ± 0,15
яФХ : СА	9:1	9 ± 2	0,15 ± 0,03
ФХ : СНЕМС рН 7,5 → 4,0*	9:1	90 ± 5 → 12 ± 1	1,50 ± 0,08 → 0,20 ± 0,02

Примечание. \*  $\zeta$ -потенциал липосом состава ФХ:СНЕМС при рН 7.5 и 4.0 составлял 73 ± 5 и 4 ± 1 мВ соответственно

Таблица 2

**Влияние метода приготовления на эффективность включения (ЭВ) и долю поверхностно-связанного (ПС) hIFN $\gamma$  для «жидких» Лс (яФХ : яФГ 9:1) и «твердых» (ДПФХ : ДПФГ : Хол 10:1:10) Лс**

Метод приготовления	Жидкие Лс		Твердые Лс	
	ЭВ % (мкг/мг)	ПС* % (мкг/мг)	ЭВ % (мкг/мг)	ПС % (мкг/мг)
Гидратация липидной пленки	87 ± 5 (1,45 ± 0,08)	74 ± 9 (1,23 ± 0,15)	80 ± 7 (1,33 ± 0,12)	31 ± 3 (0,52 ± 0,05)
Гидратация лип. пленки в малом объеме (КБ)**	96 ± 4 (1,60 ± 0,07)	24 ± 5 (0,40 ± 0,08)	Не опред.	Не опред.
Гидратация лип. пленки в КБ, с последующим разбавл. р-ром NaCl (0,9%)**	67 ± 7 (1,12 ± 0,12)	8 ± 3 (0,13 ± 0,05)	53 ± 2 (0,88 ± 0,03)	29 ± 6 (0,48 ± 0,10)

Примечание. \* ПС — процент поверхностно связанного белка от ассоциированного с Лс; \*\* липосомы гидратировали раствором белка КБ (1/10 от конечного объема); \*\*\* Лс гидратировали раствором белка в КБ (1/10 от конечного объема), затем добавляли Na-сукцинатный буфер, содержащий 0,9% NaCl. Десорбированный белок удаляли ультрацентрифугированием. Осадок Лс ресуспендировали в КБ буфере.

ших экспериментов. Следует упомянуть, что при выдержке в течение ночи при 4°C смеси липидов (ДФХ-Хол) и водного раствора белка перед циклами замораживания-оттаивания эффективность включения белка увеличивается до 43%. Эти результаты переключаются с исследованиями J.-P. Colletier с соавторами [31], о которых упоминалось выше — увеличение эффективности включения белка при большом числе циклов замораживания-оттаивания. Возможно, имеет значение не только количество циклов замораживания-оттаивания, но и время инкубации белка и липидов при пониженной температуре.

Размер Лс для доставки белка в легкие составлял  $3,07 \pm 0,35$  мкм, что является идеальным размером для легочного депонирования порошков [36]. Лс получали процедурой замораживания-оттаивания без использования дополнительных способов для уменьшения размеров.

Нестабильность липосомальной дисперсии при длительном хранении является существенным недостатком данной лекарственной формы. Лиофилизация позволяет в основном решить данную проблему. Однако решение одной проблемы в данном случае означает создание новой — после лиофилизации и регидратации Лс теряют часть включенного вещества из-за повреждения Лс во время замораживания, высушивания и регидратации, также могут частично повреждаться и белки.

В исследованиях [35], где в качестве криопротектора использовали D-маннит, было показано, что как лиофилизация, так и размалывание Лс приводит к потере активности ГУ и уменьшению эффективности инкапсуляции белка (приблизительно в 2,5 раза).

Оптимизируя процесс лиофилизации, использовали вместо маннита сахарозу. Сахароза, как и манит, может взаимодействовать с полярными группами фосфолипидов в мембране за счет водородных связей, замещая взаимодействие вода—липид, и тем самым стабилизировать мембрану. Маннит охотно образует кристаллы и имеет тенденцию к выделению в отдельную фазу в лиофилизованном осадке, в то время как сахароза в этих условиях дает аморфную фазу. Кристаллизацию моносахарида можно ингибировать добавлением ПВП благодаря его способности увеличивать температуру стеклования и большой молекулярной массе. Влияние криопротекторов, в том числе и ПВП, на активность белка после лиофилизации оценивали по активности липосомальной ГУ сразу после лиофилизации и по прошествии 50 дней хранения в эксикаторе.

Результаты этих экспериментов показывают, что при использовании в качестве криопротектора смеси ПВП-маннит обеспечивает наибольшую активность как непосредственно после лиофилизации, так и при хранении Лс. Сахароза улучшает стабильность белка лучше, чем манит, что служит прямым свидетельством того, что

кристаллизация криопротектора — важная причина потери активности белком в процессе лиофилизации.

Очень важной областью использования Лс, нагруженных белками, представляет собой вакцины. Так как Лс, как и другие наночастицы, охотно поглощаются макрофагами (антигенпредставляющими клетками). Таким образом, заключение антигена в липосому может существенно увеличить его иммуногенность [37].

Недавно специально для мембранных белков был разработан новый метод получения нагруженных Лс [38]. Он заключается в введении фосфолипидов в заранее приготовленный мицеллярный раствор белка. Таким образом был получен препарат с рекомбинантным усеченным поверхностным белком ВИЧ gp-41 — возможным кандидатом для вакцинации ВИЧ-инфицированных больных.

Свойства поверхности Лс оказывают большое влияние как на эффективность загрузки (о чем уже говорилось ранее), так и на особенности применения в определенных условиях. Так, Nakanishi с соавторами изучали влияние заряда поверхности Лс на эффективность их поглощения макрофагами [39], а также на индуцирование иммунного ответа липосомами с включенными в них антигенами [40]. В работах сравнивали поглощение макрофагами незагруженных нейтральных, положительно и отрицательно заряженных Лс, а также аналогичных Лс с одинаковым количеством загруженного в них яичного альбумина. Выяснилось, что поглощение макрофагами положительно заряженных Лс происходит значительно быстрее, чем нейтральных и отрицательно заряженных. Также было показано, что положительно заряженные Лс с яичным альбумином функционировали как более мощный индуктор иммунного ответа, чем отрицательно заряженные и нейтральные липосомы. Данные результаты говорят о том, что положительно заряженные Лс могут использоваться как эффективное средство доставки белковых антигенов в макрофаги или в другие антигенпредставляющие клетки.

Однако в большинстве случаев поглощение макрофагами липосомальных препаратов нежелательно. В таких случаях в мембрану липосом вводят фосфолипиды, к полярной головке которых присоединен ПЭГ, получая так называемые стелс-липосомы [41]. Время циркуляции стелс-Лс зависит от длины ПЭГ и от концентрации ПЭГ-содержащего липида на поверхности Лс (табл. 4) [41].

Одним из основных преимуществ применения Лс является возможность направленной доставки лекарственного вещества. В данном случае белки принимают активное участие в связывании с клетками-мишенями. Такие белки называют «молекулярным адресом», вектором [42]. Для того чтобы у Лс с молекулярным адресом появились шансы добраться до клетки-мишени, она должна достаточно долго циркулировать в организме. Это значит, что эффективно

Таблица 3

Эффективность включения ГУ в липосомы различного липидного состава

Липидный состав	Мольное соотношение	Эффективность включения, %
ДФХ-Хол	7:3	3,9
ДФХ-Хол-ДОТАР	7:2:1	17,0
ДФХ-Хол-ДОТАР	7:1:2	13,6
ДФХ-Хол-ДФОГ	7:2:1	19,2
ДФХ-Хол	7:3	19,0
ДФХ-Хол	7:3	17,1

молекулярный адрес будет работать только на стерически стабилизированных липосомах [43]. Так, например, в работе С.С. Visser с соавторами [44] исследовались Лс, на поверхности которых на полиэтиленгликолевых цепочках были иммобилизованы молекулы трансферрина, в качестве «терапевтического» белка внутрь Лс заключали пероксидазу хрена. К Лс, содержащим пероксидазу хрена, добавляли мицеллы конъюгатов ФЭ-ПЭГ и ФЭ-ПЭГ-ТФ, в результате встраивания названных конъюгатов в Лс получали стелс-Лс, загруженные пероксидазой хрена, и снабженные молекулярным адресом. Лс имели размер около 100 нм, содержали 5–13 мкг пероксидазы на 1 мкмоль фосфолипида и 63–74 молекулы ТФ на липосому (ТФ-Лс). Также были получены в качестве контроля Лс со схожими параметрами, но не содержащие ТФ. Эндотелиальные клетки капилляров мозга инкубировались с Лс при 4°C (для определения связывания) и при 37°C (для определения ассоциации, т.е. и связывания, и эндоцитоза). Связывание ТФ-Лс было в 2–3 раза больше, чем для контрольных Лс.

Важным элементом повышения эффективности Лс как транспортного средства для доставки белков в клетку является увеличение эффективности транслокации Лс через клеточную мембрану. В этом отношении очень интересны «проникающие-в-клетку пептиды» (cell-penetrating peptides, CPPs), включающие олигоаргинин (Arg(n)-Лс). М. Furuhata с соавторами [45] исследовали влияние длины олигоаргининовой цепи (n = 4, 6, 8, 10) на эффективность доставки Лс в клетки. Arg(n)-Лс физически ассоциировали с белками. Было показано, что:

- БСА (66 кДа) и β-галактозидаза (120 кДа) в Arg4-Лс переносятся в клетки в 6 раз эффективнее, чем свободные белки;
- Arg10-Лс показали схожее с Arg4-Лс действие в отношении этих двух белков;
- Arg10-Лс обеспечивает наилучшее включение иммуноглобулина G (150 кДа), в 100 раз больше, чем для свободного иммуноглобулина G и в 3 раза больше, чем для Arg4-Лс.

Короткие олигоаргининовые (n = 4) цепи могут быть достаточны для доставки Лс в клетки, однако для образования комплекса с высокомолекулярными белками и до-

ставки их в клетки необходимы более длинные олигоаргининовые цепи.

Наиболее широко для этой цели используются так называемые ТАТ-пептиды (чаще всего используется ТАТ48-60 GRKKRRQRRRPPQ [46]), фрагменты транс-активаторного белка ВИЧ-1 [47]. Липосомы и другие наночастицы, поверхность которых модифицировали ТАТ-пептидами, транслоцировались в клетку на несколько порядков эффективнее, чем без ТАТ-пептидов. Долгое время механизм транслокации субстанций, к которым присоединяли ТАТ-пептиды, оставался не известным. Относительно недавно было доказано, что это происходит через макропиноцитоз [48].

Одним из перспективных способов преодоления главного недостатка липосом — малой стабильности при хранении — использование пролипосом (ПЛс). ПЛс позволяют избежать ряда негативных явлений (агломерация Лс, окисление липидов, выход вещества из Лс), которые ухудшают потребительские качества препарата. ПЛс — это препарат, который при разбавлении водой дает Лс без дополнительных обработок ультразвуком, экструзией и т. д. Липосомы из них получают *in situ* смешиванием пролипосом с водой. ПЛс могут быть как жидкими (липосомы из них получают при разбавлении водой) [49], так и твердыми, обычно в этом случае как вспомогательное вещество применяют высокопористый сорбит — липидный слой на порошок сорбита наносится выпариванием из раствора липидов органического растворителя [50].

К.-Н. Song с соавторами [50] изучали включение кальцитонина лосося в Лс, используя для их получения твердые ПЛс на частицах сорбита (210–297 мкм в диаметре). В результате было показано, что:

- Лс образуются не позже чем через 30 с после контакта с водой;
- в основном, образовывались частицы с размером  $56,2 \pm 17,6$  нм, но некоторые частицы дисперсии имели диаметр  $1085,3 \pm 342,0$  нм;
- эффективность включения кальцитонина в конечных липосомах была одинакова для ПЛс с соотношением ФХ:кальцитонин и сорбит:ФХ, не превышающим 12:1, и составляла  $19,9 \pm 1,38\%$ .

Таблица 4

Влияние длины цепи ПЭГ на время циркуляции стелс-Лс (100 нм) в крови

M <sub>пэг</sub> [Да]	Мольный % ПЭГ-липид в бислое	t <sub>1/2</sub> , ч
120	5	3,6
120	10	5,44
120	15	8,49
350	33,3	6,92
750	5	4,86
750	33,3	8,5
1000	6	≈4
2000	5	10,67-13,5
2000	5	18,5 (отр. заряд, ФГ)
2000	6	15,8
2000	7,5	5
3000	5	17,94
5000	5	10,98
5000	10	3,5
12000	6	2,44

Как можно видеть из изложенного, Лс широко применяются для создания новых белковых препаратов, однако существующие недостатки — сложности длительного хранения без лиофилизации, ухудшение параметров после лиофилизации, относительно невысокая эффективность включения, малая эффективность использования для пероральной доставки, высокая себестоимость — заставляют исследователей искать альтернативу липосомальным дисперсиям.

Инкапсуляция лекарственных субстанций в мультивезикулярные Лс (DeroFoam®) представляет собой новый подход к пролонгации действия лекарственных препаратов [51]. Частицы DeroFoam® представляют собой мультивезикулярные липосомы — агрегаты сотен полиэдрических компартментов отделенных друг от друга неконцентрическими липидными бислоями [51]. В настоящее время, FDA одобрило два лекарственных препарата на основе DeroFoam® для клинического применения. DeroCyte® — дисперсия цитарабина, инкапсулированного в мультивезикулярные Лс, для лечения лейкозного менингита [52]. Период полувыведения DeroCyte® составляет 130–277 ч [53]. DeroDur™ — лекарственная форма сульфата морфина [54]. При единичной эпидуральной инъекции DeroDur™ способен облегчать послеоперационную боль в течение нескольких дней [54]. На третий стадии клинических испытаний находится препарат IFN- $\alpha$ 2b, который поддерживает терапевтический уровень в течение 7 суток.

#### Кохлеаты

Хорошей альтернативой липосомам являются кохлеаты. Они впервые были описаны группой D. Parahadjoroulos в 1975 г. [55]. Эти частицы образуются из фосфолипидов, в состав которых входят отрицательно-заряженные полярные липиды (чаще всего, фосфатидилсерин) при доле 50% и выше. Они образуются из соответствующих Лс при добавлении к ним солей кальция (~10 мМ). Кохлеаты похожи на сигары — бислой, несущий отрицательный заряд, сворачивается в рулоны, скрепляемые двухзарядными ионами кальция. Кохлеаты имеют водный компартмент, поэтому они захватывают вещества, растворенные в среде, в том числе и пептиды и белки. Удаление ионов кальция, например, с помощью комплексонов, приводит к нарушению связей между бислоями — кохлеаты преобразуются в большие везикулы. Таким образом предлагается включать в Лс объемные структуры: небольшие Лс, большие молекулы полимеров, полимерные наносферы [56].

Еще важное положительное отличие кохлеатов от Лс — они достаточно стабильны в желудочно-кишечном тракте и поэтому их можно использовать для перорального введения [57]. Одним из перспективных направлений использования кохлеатов, нагруженных белками — конструирование вакцин. Так, было показано, что из протеолипосом, полученных из бактерий *Neisseria meningitidis B*, можно получить кохлеаты, вызывающие иммунный ответ при введении как перентерально, так и через слизистые оболочки, при этом активируется в том числе и Т-клеточный ответ [58, 59].

#### Нанодиски

Относительно недавно было обнаружено, что можно получать нанодиски фосфолипидного бислоя диаметром около 10 нм, боковая гидрофобная поверхность которого

стабилизирована либо полярными липидами с небольшими жирнокислотными хвостами [60] или с большой полярной головкой [61], либо специальными амфифильными белками [62]. Эти белки были сконструированы на основе аполипопротеинов высокой плотности А-1 [63], и получаемые нанодиски в общих чертах моделируют липопротеины высокой плотности. Было показано, что единичные молекулы мембранных белков (в частности, цитохром Р450, бактериородопсин, мембранные рецепторы и др.) можно сольбилизовать в такие нанодиски [62, 64]. Эти конструкции используются как платформа для скрининга лекарственных субстанций, в качестве вакцин, для диагностики *in vitro* [65].

#### Эмульсии

Основная область применения эмульсий, нагруженных белком — вакцины [37]. Хорошо известный адьювант Фрейнда содержит убитые туберкулезные микобактерии, суспендированные в масляной фазе водной эмульсии. С 80-х годов прошлого века исследуются в качестве адьювантов эмульсии масло-в-воде: SAF (Syntex adjuvant formulation) и MF59. И тот, и другой адьювант в качестве масляной фазы содержит сквален. Детергенты, стабилизирующие эмульсию SAF — полуксамер 401 и Твин-80, для MF59 в качестве детергентов используется смесь Твин-80 и Спен-20. Малая токсичность и прекрасный иммунный ответ при использовании MF59 стало основанием для лицензирования этого препарата для использования в качестве адьюванта для людей [66] в том числе и для сезонной противогриппозной вакцины [67].

Эмульсии могут быть использованы для перорального введения плохо растворимых пептидов, например циклоспорина А [68]. Циклический ундекапептид циклоспорин А является сильнодействующим иммуносупрессивным препаратом. Серьезным недостатком циклоспорина является низкая абсорбция из желудочно-кишечного тракта, в том числе вследствие плохой растворимости. Частично этот недостаток компенсируется в препарате Sandimmun Neoral, представляющий собой жировую эмульсию, стабилизированную поли(этоксиллированным) касторовым маслом.

Авторами статьи [68] исследовались три новые формы циклоспорина А с использованием пищевых липидов, вводимые мышам внутрижелудочно, в качестве контроля использовали раствор для перорального введения Sandimmun Neoral:

- А — Sandimmun, раствор для перорального введения;
- В — циклоспорин растворенный масле с очень низким поверхностным натяжением в L<sub>2</sub>-фазе;
- С — циклоспорин растворенный в диспергированный L<sub>2</sub>-фазе, вводили в форме эмульсии;
- D — циклоспорин в диспергированной жидкокристаллической фазе из природных глицеридов.

В качестве жировой фазы использовали пищевые триглицериды — подсолнечное масло с высоким содержанием олеиновой кислоты и моноглицериды, состоящие преимущественно из моноолеата глицерина.

L<sub>2</sub>-фаза представляет собой фазу обращенных мицелл, которая содержит относительно маленькие липидные агрегаты, имеющие водное ядро, которое окружено полярными «головками» амфифильных липидов [69]. Эффек-

тивность оценивали по биодоступности (F) препаратов (табл. 5).

Все три новые формы увеличивают биодоступность циклоспорина по сравнению с Sandimmun в 3–5 раз.

Наноэмульсии также исследуются как средство интраназальной доставки белков и пептидов, в частности инсулина [70]. Исследовались эмульсии, содержащие инсулин: вода-в-масле и масло-в-воде. Только в первом случае наблюдалось повышение уровня инсулина в крови подопытных мышей (от 20 до 470 мкЕд/мл). Раствор инсулина при подобном введении давал повышение лишь до 120 мкЕд/мл.

Как отмечалось ранее, на заре липосомальной эры были многочисленны попытки использовать Лс для пероральной доставки инсулина [71, 72], но ни одна не увенчалась успехом. В настоящее время попытки перорального введения инсулина получили новый толчок в связи с конструированием других, более подходящих для этой цели, наночастиц [73–78]. Одна из главных надежд, связанных с наночастицами с инсулином — увеличение стабильности инсулина в желудочно-кишечном тракте; другая в том, что наночастицы будут поглощаться М-клетками тонкого кишечника. В работе турецких авторов [79] исследовали жировую эмульсию, содержащую инсулин для внутрижелудочного введения крысам. Было обнаружено, что это приводило к 30% снижению уровня глюкозы в крови; эффект длился более 90 мин. Специальными экспериментами было доказано, что вводимый таким образом инсулин, практически не подвергается биодegradации.

#### Кубосомы

По сравнению с ламеллярной фазой, кубическая фаза обладает большей жесткостью. Это свойство кубической фазы было использовано S. Estrom с соавторами [80] для создания новой лекарственной формы соматостатина. Тетрадекапептид соматостатин — пептидный гормон, участвующий в контроле высвобождения соматомедина, инсулина и панкреатина — время его полужизни в организме после внутривенного введения составляет примерно 2 мин. Было показано, что кубическая фаза, сформированная моноолеином, соевым фосфатидилхолином, Полоксамером 407 и водой, способна продлить высвобождение белковых лекарств и защитить их от деградации. Так как описанные кубосомы имеют длинные гидрофильные ПЭГ-цепи от полимерного стабилизатора, их время циркуляции оказалось значительным. Соматостатин в кубосомах вводили внутримышечно в организм кролика и измеряли уровень этого гормона в плазме. В результате введения кубосом с инкапсулированным соматостатином уровень его в плазме был постоянен на протяжении как минимум 6 ч после однократного введения.

#### Полимерные наносферы

Полимерные наносферы исследуются как адъюванты [81, 82] вследствие того, что, как упоминалось ранее, наночастицы хорошо поглощаются антиген-представляющими клетками. Наиболее часто используются следующие полимеры: (поли(лактид/глицид), поли(алкилцианоакрилаты), поли(гидроксibuтират). Характерно, что даже адсорбция на таких полимерах защищает белки от деградации в желудочно-кишечном тракте. Поэтому вакцины с описанными адъювантами перспективны и для перорального введения. При этом рассматриваются два основных пути прохождения эпителия: парацеллюлярный и через поглощение М-клетками [81].

Наночастицы, представляющие собой интерполимерные комплексы, исследовались как средство для улучшения биодоступности при пероральном введении инсулина [83]. Наночастицы, получающиеся из декстрана сульфата и хитозана, со средним размером 500 нм, обладающие отрицательным зарядом, проявляли мукоадгезивные свойства. Инсулин включался в наночастицы с эффективностью 70%. Флуоресцентная метка позволила зафиксировать адгезию и интернализацию наночастиц в эпителии тонкого кишечника. Отрицательный заряд наночастиц обуславливал рН-зависимое высвобождение инсулина. Было показано, что биодоступность инсулина, вводимого в составе исследуемых наночастиц повышается до 5,6% (с 1,6% для раствора).

Попыток получить наночастицы для перорального введения инсулина довольно много. Практически во всех случаях отмечается увеличение биодоступности инсулина по сравнению с пероральным введением, уменьшение содержания глюкозы в крови. Но, к сожалению, пока ни один из препаратов не показал результатов, сравнимых с внутримышечным введением [84–88].

Известны несколько способов инкапсуляции белков в полимерные наночастицы и, соответственно, различная их локализация в наночастицах: поверхностная сорбция, равномерное распределение по всему объёму частицы [89], белок может находиться в ядре частицы, окружённый полимерной оболочкой [90]. Липидный кор этих частиц состоит из смеси фосфатидилхолина с белком, а полимерная оболочка состоит из Pluronic F-127. Наночастицы получают диспергированием лиофилизованной смеси белка и фосфатидилхолина в водном растворе F-127, содержащим трегалозу в качестве криопротектора.

Часто для инкапсуляции белка используются полимеры ПМК и ПМГК [91–94]. Для получения частиц из таких полимеров, нагруженных белком, в основном применяется метод двойных эмульсий. Водный раствор белка образует эмульсию типа вода-в-масле в растворе полимера в органическом растворителе, затем эта эмульсия эмульгируется во внешней водной фазе и растворитель удаляется упариванием [93].

Таблица 5

Биодоступность циклоспорина при внутрижелудочном введении (10 мг/кг)

Формы	F <sub>0-∞</sub>
Sandimmun, раствор для перорального введения (A)	7,9
Циклоспорин в L <sub>2</sub> -фазе (B)	34
Циклоспорин в диспергированной L <sub>2</sub> -фазе (C)	38
Циклоспорин в дисперсии жидких кристаллов (D)	27

Более крупные частицы могут быть равномерно заполнены наночастицами, состоящими из чистого белка. Так, Leach с соавторами [95] описывают инкапсуляцию белковых наночастиц в микросферы для уменьшения взрывного высвобождения белка. Агрегаты частиц белка, полученные после замораживания в жидком азоте брызг раствора белка, с помощью ультразвука разбивались на субмикронные частицы. Эти частицы инкапсулировались в ПМГК и ПМК микросферы с помощью безводной техники *твердое-в-масле-в-масле*. При включении белка в микросферы удалось добиться снижения взрывного высвобождения белка в 5–10 раз.

При использовании описанного метода получают частицы с высокой полидисперсностью, однако известно, что для введения препарата через иглу размер частиц не должен превышать 125 мкм, к тому же макрофаги могут поглощать частицы размером менее 10 мкм. В уже цитированной статье Leach с соавторами [93] описывается новый метод получения микросфер, загруженных наночастицами белка — *метод вращающейся масляной пленки* (SOF). Отличие от метода с использованием мешалки состоит в том, что суспензия твердое-в-масле (размолотый белок в растворе ПМГК в ацетонитриле) попадает не непосредственно в емкость с маслом (и в ней при помощи лопастной мешалки образуется дисперсия), а через иглу вводится в тонкую вращающуюся пленку, где и происходит формирование суспензии и задается размер ее частиц.

Частицы, полученные методом SOF, имеют узкое распределение по размеру (примерно 120 мкм, полидисперсность 6%). Высвобождение белка из частиц, полученных методом SOF, происходит медленнее, чем в случае использования при получении микросфер перемешивания.

Для получения наночастиц, загруженных белком, используют также поливиниловый спирт, который в определенных условиях образует гель. Наночастицы гидрогеля поливинилового спирта получают, проводя несколько циклов замораживания-оттаивания эмульсии вода-в-масле. Авторы этого метода J.K. Li с соавторами [96] в качестве модельного белка использовали БСА; средний диаметр полученных наночастиц составлял  $675,5 \pm 42,7$  нм, эффективность включения  $96,2 \pm 3,8\%$ . Высвобождение БСА из частиц подчиняется контролируемому диффузией механизму и может достигать 30 ч.

Многие амфифильные полимеры способны образовывать в воде наносферы, которые могут быть использованы как носитель белка. Так, поли( $\gamma$ -глутаминовая кислота) при модификации ее этиловым эфиром L-фенилаланина образует амфифильный полимер, который образует наночастицы при удалении растворителя из эмульсии с помощью диализа, размер составляет 150–200 нм [89].

Часто используют ионотропные гели из-за простоты их получения. Так, из раствора триметилхитозана при добавлении триполифосфата в присутствии яичного альбумина при перемешивании [97] образуются наночастицы размером 350 нм при эффективности включения 95%. Показано, что при инкубации в течение 3 ч в фосфатно-солевом буфере при 37°C более чем 70% белка остается включенным в частицы. Полученные наночастицы применимы для интраназального введения белка.

Также были получены частицы из гексаноилхитозана при добавлении триполифосфата с последующей обработкой ультразвуком. Полученные частицы сферической

формы имели размер от 54,1 до 724 нм, эффективность включения БСА составляла 58,2, 44,5 и 28,1% при исходной концентрации белка 0,2, 0,4 и 0,6 мг/мл соответственно. Один из самых распространенных материалов матрицы для получения наночастиц для доставки белка — агарозный гидрогель [98].

Увеличение времени циркуляции наночастиц в кровотоке, как указывалось выше, возможно с помощью модификации поверхности частиц ПЭГ [94]. Полученные Y. Li с соавторами *методом двойной эмульсии* наночастицы ПЭГ-ПМГК имели размер около 200 нм и эффективность включения 48,6%. Высвобождение БСА из таких частиц имеет двухфазный характер: вначале взрывное, а затем постепенное высвобождение. ПЭГ-ПМГК частицы увеличили время полужизни БСА с 13,6 мин до 4,5 ч и существенно изменили распределение в крысах по сравнению с немодифицированными ПМГК частицами.

### *Нанокристаллы*

Нанокристаллы — наиболее выдающиеся наночастицы в отношении эффективности включения активной субстанции. Они практически полностью состоят из активного вещества (за исключением нескольких процентов детергента, выступающего в качестве стабилизатора). Получение нанокристаллов белков и пептидов довольно редкий случай.

Новый тип наночастиц был недавно предложен сингапурскими и китайскими исследователями [99]. Они предназначены для лечения бактериальных и грибковых инфекций. Пептид CholG<sub>3</sub>R<sub>6</sub>TAT содержит три функциональных фрагмента: Chol — остаток холестерина, присоединенный через спейсер из трех остатков глицина к гексапептиду из остатков аргинина, фланкирующий TAT-пептидом. Холестерин как гидрофобный фрагмент необходим для самосборки пептида в наночастицы, положительно заряженный гексапептид является фармакофором, TAT-пептид необходим для прохождения наночастиц через клеточные мембраны, в том числе через эндотелий капилляров мозга. Было показано, что образующиеся самосборкой наночастицы гораздо более токсичны против бактерий по сравнению с раствором. Также было продемонстрировано, что наночастицы проходят через гематоэнцефалический барьер.

Получение нанокристаллов считается одним из наиболее дешевых и технически простых способов улучшения биодоступности, к тому же нанодисперсии нанокристаллов являются довольно устойчивой формой лекарства [25]. Одним из самых простых способов измельчения является сухое размалывание частиц, хотя при этом получают довольно крупные частицы (более 5 мкм). Поэтому общий путь для получения нанодисперсий, так называемый *метод влажного помола* [100] — размалывание предварительно сформированных больших кристаллов в воде, содержащей ПАВ [25, 100] для уменьшения поверхностной энергии. Однако размалывание имеет недостатки, так как недавно созданные поверхности термодинамически активированы благодаря высокой поверхностной энергии, что приводит к агрегации полученных кристаллов [101]. Размер кристаллов (пре-дисперсии), получаемых таким методом, зачастую превышает 1 мкм [25], для уменьшения размера используют, как правило, гомогенизацию высокого давления. В результате получают частицы со средним диаметром 400–950 нм.

Магнитные наночастицы появились относительно давно — в 80-е годы [102], но прошло значительное время, прежде чем их стали исследовать как перспективные средства доставки лекарственных субстанций [103].

Использование магнитных частиц для доставки белков может оказаться весьма привлекательным. В числе преимуществ: малые размеры частиц (десятки нанометров), возможность направленной доставки за счет свойств самих частиц.

В последнее время были проведены исследования, показавшие, что белки могут быть ковалентно связаны с поверхностью магнитных частиц. Так, например, в работе S.-Y. Shaw с соавторами [104] описывается применение термически стабильной эстеразы из *Pseudomonas putida* F012996, иммобилизованной на поверхности магнитных частиц для гидролиза DL-β-ацетилтиоизобутирата до D-β-ацетилтиоизобутировой кислоты. Наночастицы были получены сосаждением ионов Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> в растворе гидроксида аммония и обработаны 3-аминопропилтриэтоксисиланом для введения аминогрупп на поверхность наночастиц.

Аминогруппы на поверхности частиц и аминогруппа эстеразы связывались глутаровым альдегидом. Средний диаметр частиц составил 11,9 нм, причем связывание с эстеразой существенно не влияет на размер частиц. Массовое соотношение связанной на магнитных НЧ эстеразы к магнитным частицам составило 0,058, т.е. на одну магнитную НЧ приходится около четырех молекул эстеразы; активность иммобилизованной эстеразы составляет 63% от исходной активности.

Возможность ковалентного связывания белка с поверхностью магнитных НЧ позволяет предположить, что магнитные наночастицы могут использоваться и для эффективной доставки белка, например с использованием их магнитных свойств для нацеливания.

Помимо функционализированных аminosиланами магнитных НЧ, для иммобилизации белков могут использоваться НЧ, функционализированные тиофеном [105] или полимером, таким, как поливиниловый спирт или полистирол при использовании карбодимидного метода [106, 107].

Как видно из обзора, на сегодняшний день НЧ вполне способны составить конкуренцию химической модификации белка при создании новых лекарственных форм. НЧ могут соединить в себе положительные качества, присущие химической модификации (например, ПЭГилирование поверхности НЧ для увеличения времени циркуляции в кровотоке и использование молекулярного адреса для адресной доставки) с достоинствами, свойственными наночастицам (пассивное нацеливание, защита субстанции от воздействий внешней среды).

### Заключение

Приведенный обзор подтверждает, что среди множества типов НЧ для доставки белков наиболее полно на сегодняшний день изучены липосомы. Достаточно перспективным и активно исследуемым направлением является использование наночастиц (полимерных, с липидным кором или магнитных наночастиц), однако, на сегодняшний момент, липосомы все же остаются лидерами среди НЧ в области технологий доставки белка.

1. <http://ru.wikipedia.org/wiki/Инсулин>.
2. Brange M. Galenics of Insulin: The Physico-chemical and Pharmaceutical Aspects of Insulin and Insulin Preparations. — Berlin: Springer-Verlag, 1987. — 103 p.
3. Beals J.M., Shanafelt A.B. Enhancing exposure of protein therapeutics // DDT: Technologies. — 2006. — Vol. 3, №1. — P. 87—94.
4. Lee S.Y., Zhang Z., Feng S.S. Nanoparticles of poly(lactide)-tocopherol polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery // Biomaterials. — 2007. — Vol. 28. — P. 2041—2050.
5. <http://www.rusnano.com/Dictionary.aspx/Show/15073?text=%CD>
6. <http://www.amgen.com>.
7. <http://www.hgsi.com>.
8. <http://www.biorexis.com>.
9. <http://www.conjuchem.com>.
10. Sinclair A.M., Elliot S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins // J. Pharm. Sci. — 2005. — Vol. 94. — P. 1626—1635.
11. Abuchowski A., van Es T., Palczuk N.C., Davis F.F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol // J. Biol. Chem. — 1977. — Vol. 252, №11. — P. 3578—3581.
12. Abuchowski A., McCoy J.R., Palczuk N.C., van Es T., Davis F.F. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase // J. Biol. Chem. — 1977. — Vol. 252, №11. — P. 3582—3586.
13. Veronese F.M., Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery // DDT. — 2005. — Vol. 10, №21. — P. 1451—1458.
14. Graham L.M. PEGASPARAGINASE: a review of clinical studies // Adv. Drug Deliv. Rev. — 2003. — Vol. 55. — P. 1293—1302.
15. Levy Y., Hershfield M.S., Fernandes-Mejia C., Polmar S.H., Scudieri D., Berger M., Sorensen R.U. Adenosine deaminase deficiency with late onset or recurrent infections: response to treatment with polyethylene glycol modified adenosine deaminase // J. Pediatr. — 1988. — Vol. 113. — P. 312—317.
16. Bailon P., Palleroni A., Schaffer C.A., Spence C.L., Fung W.J., Porter J.E., Erlich G.K., Pan W., Xu Z.X., Modi M.W., Farid A., Berthold W., Graves M. Rational design of a potent, long lasting form of interferon: a 40kDa branched poly-ethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C // Bioconjug. Chem. — 2001. — Vol. 12. — P. 195—202.
17. Wang Y.S., Youngster S., Grace M., Bausch J., Bordens R., Wyss D.F. Structural and biological characterisation of pegylated recombinant interferon α-2b and its therapeutic implications // Adv. Drug Deliv. Rev. — 2002. — Vol. 54. — P. 547—570.
18. Kinstler O.B., Brems D.N., Lauren S.L., Piage A.G., Hamburger J.B., Treuheit M.J. Characterization and stability of N-terminally pegylated rhG-CSF // Pharm. Res. — 1996. — Vol. 13. — P. 996—1002.
19. Trainer P.J., Drake W.M., Katznelson L., Freda P.U. Treatment of acromegaly with the growth hormone-receptor antagonist pegvisomant // N. Engl. J. Med. — 2000. — Vol. 342, №16. — P. 1171—1177.
20. <http://www.abraxane.com/>
21. Larson R.A., Sievers E.L., Stadtmauer E.A., Lowenberg B., Estey E.H., Dombret H., Theobald M., Voliotis D., Bennett J.M., Richie M., Leopold L.H., Berger M.S., Sherman M.L., Loken M.R., van Dongen J.J., Bernstein I.D., Appelbaum F.R. Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence // Cancer. — 2005. — 104(7). — P. 1442—1452.
22. Nanoparticulates as Drug Carriers / Ed. V.P. Torchilin. — Imperial College Press, 2006. — P. 724.
23. Amrite A.C., Edelhauser H.F., Singh S.R., Kompella U.B. Effect of circulation on the disposition and ocular tissue distribution of 20 nm nanoparticles after periorbital administration // Molecular Vision. — 2008. — 14. — P. 150—160.
24. Hoffman R.M. Topical liposome targeting of dyes, melanins, genes, and proteins selectively to hair follicles // J. Drug Target. — 1998. — 5(2). — P. 67—74.
25. Peters K., Leitzke S., Diederichs J.E., Borner K., Hahn H., Muller R.H., Ehlers S. Preparation of clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine Mycobacterium avium infection // J. Antimicrob. Chemother. — 2000. — Vol. 45. — P. 77—83.
26. Caygill C.P., Stein W.D. Binding of insulin by liposomes incorporating proteom // Life Sci. — 1969. — Vol. 8, №16. — P. 809—812.
27. Graff A., Winterhalter M., Meier W. Nanoreactors from Polymer Stabilized Liposomes // Langmuir. — 2001. — Vol. 17. — P. 919—923.

28. Wu Z.-H., Ping Q.-N., Wei Y., Lai J.-M. Hypoglycemic efficacy of chitosan-coated insulin liposomes after oral administration in mice // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2004. — 25 (7). — P. 966–972.
29. Liposomes: A Practical Approach. Second edition / Ed. by V.P. Torchilin, V. Weissig. — Oxford University Press, 2003. — P. 396.
30. Barenholz Y., Amselem S., Lichtenberg D. A New Method for Preparation of Phospholipid Vesicles (Liposomes) — french press // *FEBS Lett.* — 1979. — 99. — P. 210–214.
31. Colletier J.-P., Chaize B., Winterhalter M., Fournier D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer // *BMC Biotechnol.* — 2002. — Vol. 2. — P. 9–17.
32. Epstein D.A., Marsh Y.V., van der Pas M., Felgner P.L., Shreiber A.B. Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon  $\gamma$  is mediated by a cell membrane receptor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1985. — Vol. 82. — P. 3688–3692.
33. Van Slooten M.L., Boerman O., Romoren K., Kedar E., Crommelin D.J.A., Storm G. Liposomes as sustained release system for human interferon- $\gamma$ : biopharmaceutical aspects // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2001. — Vol. 1530. — P. 134–145.
34. Huang Y.Y., Wang C.H. Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers // *J. Control. Release.* — 2006. — Vol. 113, №1. — P. 9–14.
35. Li D., Hickey A.J. Liposomal Dry Powders as Aerosols for Pulmonary Delivery of Proteins // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* — 2005. — Vol. 6, №4. — Article 80. — P. E641–E648, <http://www.aapspharmsci.org>.
36. Shreier H., Mobley W.C., Concessio N., Hikey A.J., Niven R.W. Formulation and in vitro performance of liposome powder aerosols // *STP Pharma Sciences.* — 1994. — Vol. 4. — P. 38–44.
37. Singh M., O'Hagan D.T. Recent Advances in Vaccine Adjuvants // *Pharm. Res.* — 2002. — Vol. 19, №6.
38. Wagner A., Stiegler G., Vorauer-Uhl K., Katinger H., Quendler H., Hinz A., Weissenhorn W. One step membrane incorporation of viral antigens as a vaccine candidate against HIV // *J. Liposome Res.* — 2007. — 17(3–4). — P. 139–154.
39. Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T. Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing immune responses to soluble proteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1997. — Vol. 240, №3. — P. 793–797.
40. Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Nakanishi M., Tanaka K., Mayumi T. Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins // *J. Control. Rel.* — 1999. — Vol. 61, №1–2. — P. 233–240.
41. Lasic D.D. Sterisch stabilisierte Vesikel // *Angew. Chem.* — 1994. — B. 106. — S. 1765–1779.
42. Sual J.M., Annapragada A., Natarajan J.V., Bellamkonda R.V. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via folate receptor in vitro // *J. Cont. Rel.* — 2003. — Vol. 92. — P. 49–67.
43. Sahoo S.K., Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging // *Drug Deliv. Today.* — 2003. — Vol. 8, №24. — P. 1112–1120.
44. Visser C.C., Stevanovic S., Voorwinden L.H., van Bloois L., Gaillard P.J., Danhof M., Crommelin D.J., de Boer A.G. Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier in vitro // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2005. — Vol. 25, №2–3. — P. 299–305.
45. Furuhashi M., Kawakami H., Toma K., Hattori Y., Maitani Y. Intracellular delivery of proteins in complexes with oligoarginine-modified liposomes and the effect of oligoarginine length // *Bioconjug. Chem.* — 2006. — Vol. 17, №4. — P. 935–942.
46. Temsamani J., Vidal T. The use of cell-penetrating peptides for drug delivery // *Drug Discover Today.* — 2004. — Vol. 9. — P. 1012–1019.
47. Torchilin V.P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2008. — 60(4–5). — P. 548–558.
48. Petrescu A.D., Vespa A., Huang H., McIntosh A.L., Schroeder F., Kier A.B. Fluorescent sterols monitor cell penetrating peptide Pep-1 mediated uptake and intracellular targeting of cargo protein in living cells // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2009. — 1788(2). — P. 425–441.
49. Schubert M.A., Muller-Goymann C.C. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles — evaluation of the method and process parameters // *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* — 2003. — Vol. 1. — P. 125–131.
50. Song K.-H., Chung S.-J., Shim C.-K. Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin // *J. Contr. Release.* — 2002. — Vol. 84. — P. 27–37.
51. Mantripragada S. A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery // *Prog. Lipid Res.* — 2002. — Vol. 41. — P. 392–406.
52. Marcato P.D., Duran N. New Aspects of Nanopharmaceutical Delivery Systems // *J. Nanosci. Nanotechnol.* — 2008. — Vol. 8. — P. 1–14.
53. Zimm S., Collins J.M., Miser J. Cytosine arabinoside cerebrospinal fluid kinetics // *Clin. Pharmacol. Ther.* — 1984. — Vol. 35. — P. 826–856.
54. Nagle P.C., Gerancher J.C. DepoDur® (extended-release epidural morphine): a review of an old drug in a new vehicle // *Tech. Reg. Anesth. Pain Manage.* — 2007. — Vol. 11. — P. 9–18.
55. Papahadjopoulos D., Vail W.J., Jacobson K., Poste G. Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1975. — Jul. 3. — 394(3). — P. 483–491.
56. Evans C.C., Zasadzinski J. Encapsulating Vesicles and Colloids from Cochleate Cylinders // *Langmuir.* — 2003. — 19. — P. 3109–3113.
57. Santangelo R., Paderu N., Delmas G., Chen Z.W., Mannino R., Zarif L., Perlin D.S. Efficacy of Oral Cochleate-Amphotericin B in a Mouse Model of Systemic Candidiasis // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2000. — Vol. 44. — P. 2356–2360.
58. Bracho G., Lastre M., del Campo J., Zayas C., Gonzalez D., Gil D., Acevedo R., Taboada C., Solis R.L., Perez O. Proteoliposome derived cochleate as novel adjuvant // *Vaccine.* — 2006. — Apr. 12. — 24. — Suppl. 2. — S2–30–31.
59. Perez O., Bracho G., Lastre M., Mora N., Del Campo J., Gil D., Zayas C., Acevedo R., Gonzalez D., Lopez J.A., Taboada C., Solis R.L. Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *Immunol // Cell Biol.* — 2004. — 82. — P. 603–610.
60. Kiselev M.A., Janich M., Lesieur P., Hoell A., Oberdisse J., Peppy G., Kisselev A.M., Gapienko I.V., Gutberlet T., Aksenov V.L. DMPC vesicles and mixed DMPC/C12E8 micelles orientation in strong magnetic fields // *Appl. Phys.* — 2002. — A 74 (Suppl.). — S1239–S1241.
61. Johnsson M., Edwards K. Liposomes, Disks, Spherical Micelles: Aggregate Structure in Mixtures of Gel Phase Phosphatidylcholines and Poly(Ethylene Glycol)-Phospholipids // *Biophys. J.* — 2003. — Vol. 85. — P. 3839–3847.
62. Bayburt T.H., Sligar S.G. Self-assembly of single integral membrane proteins into soluble nanoscale phospholipid bilayers // *Prot. Sci.* — 2003. — 12. — P. 2476–2481.
63. Denisov I.G., Grinkova Y.V., Lazarides A.A., Sligar S.G. Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodisks with Controlled Size // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — 126. — P. 3477–3487.
64. Shih A.Y., Denisov I.G., Phillips J.C., Sligar S.G., Schulten K. Molecular Dynamics Simulations of Discoidal Bilayers Assembled from Truncated Human Lipoproteins // *Biophys. J.* — 2005. — Vol. 88. — P. 548–556.
65. Das A., Zhao J., Schatz G.C., Sligar S.G., Van Duyne R.P. Screening of type I and II drug binding to human cytochrome P450-3A4 in nanodisks by localized surface plasmon resonance spectroscopy // *Anal. Chem.* — 2009. — 81(10). — P. 3754–3759.
66. Podda A., Del Giudice G. MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile // *Expert Rev. Vaccines.* — 2003. — 2. — P. 197–203.
67. O'Hagan D.T. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection // *Expert Rev. Vaccines.* — 2007. — 6(5). — P. 699–710.
68. Bojrup M., Qi Z., Bjorkman S., Ostraat O., Landin B., Ljusberg-Wahren H., Ekberg H. Bioavailability of cyclosporine in rats after intragastric administration: a comparative study of the L2-phase and two other lipid-based vehicles // *Transpl. Immunol.* — 1996. — Vol. 4. — P. 313–317.
69. Lindblom G., Hauksson J.B., Rilfors L., Bergenstahl B., Wieslander A., Eriksson P.-O. Membrane Lipid Regulation in *Acholeplasma laidlawii* Grown with Saturated Fatty Acids // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 268, №22. — P. 16198–16207.
70. Mitra R., Pezron I., Chu W.A., Mitra A.K. Lipid emulsions as vehicles for enhanced nasal delivery of insulin // *Int. J. Pharm.* — 2000. — 205. — P. 127–134.
71. Dapergolas G., Gregoriadis G. Hypoglycaemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats // *Lancet.* — 1976. — 2. — P. 824–827.
72. Patel H.M., Ryman B.E. Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes // *FEBS Letters.* — 1976. — 62. — P. 60–63.
73. Sarmiento B., Ribeiro A., Veiga F., Ferreira D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* — 2006. — 53. — P. 193–202.
74. Mesiha M.S., Sidhom M.B., Fasipe B. Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles // *Intern. J. Pharm.* — 2005. — Vol. 288. — P. 289–293.

75. Morcol T., Nagappan P., Nerenbaum L., Mitchell A., Bell S.J.D. Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin // Intern. J. Pharm. — 2004. — 277. — P. 91–97.
76. Onuki Y., Morishita M., Takayama K. Formulation optimization of water-in-oil-water multiple emulsion for intestinal insulin delivery // J. Controlled Release. — 2004. — Vol. 97. — P. 91–99.
77. Courmarie F., Cheron M., Besnard M., Vauthier C. Evidence for restrictive parameters in formulation of insulin-loaded nanocapsules // Eur. J. Pharm. Biopharm. — 2004. — Vol. 57. — P. 171–179.
78. Tiyaboonchai W., Woiszwillo J., Sims R.C., Middaugh C.R. Insulin containing polyethylenimine-dextran sulfate nanoparticles // Int. J. Pharm. — 2003. — Vol. 255. — P. 139–151.
79. Cilek A., Celebi N., Tirnaksiz F., Tay A. A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats // Intern. J. Pharm. — 2005. — 298. — P. 176–185.
80. Egstrom S., Ericsson B., Landh T. A cubosome formulation for intravenous administration of somatostatin // Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. — 1996. — Vol. 23. — P. 89–90.
81. Des Rieux A., Fievez V., Garinot M., Schneider Y.-J., Preat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach // J. Controlled Release. — 2006. — 116. — P. 1–27.
82. Singh M., Chakrapani A., O'Hagan D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems // Expert Rev. Vaccines. — 2007. — 6(5). — P. 797–808.
83. Sarmento B., Ribeiro A., Veiga F., Ferreira D., Neufeld R. Oral Bioavailability of Insulin Contained in Polysaccharide Nanoparticles // Biomacromolecules. — 2007. — 8. — P. 3054–3060.
84. Jederstrom G., Andersson A., Graso J., Sjolholm I. Formulating Insulin for Oral Administration: Preparation of Hyaluronan-Insulin Complex // Pharm. Res. — 2004. — Vol. 21, №11. — P. 2040–2047.
85. Goto T., Morishita M., Nishimura K., Nakanishi M., Kato A., Ehara J., Takayama K. Novel Mucosal Insulin Delivery Systems Based on Fusogenic Liposomes // Pharm. Res. — 2006. — Vol. 23, №2. — P. 384–391.
86. Sarmento B., Martins S., Ribeiro A., Veiga F., Neufeld R., Ferreira D. Development and Comparison of Different Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes as Insulin Carriers // Intern. J. Peptide Res. Ther. — 2006. — Vol. 12, №2. — P. 131–138.
87. Morcol T., Nagappan P., Nerenbaum L., Mitchell A., Bell S.J.D. Calcium phosphate-PEG-insulin-casein (CAPIC) particles as oral delivery systems for insulin // Intern. J. Pharm. — 2004. — 277. — P. 91–97.
88. Slager J., Domb A.J. Stereocomplexes based on poly(lactic acid) and insulin: formulation and release studies // Biomaterials. — 2002. — 23. — P. 4389–4396.
89. Akagi T., Kaneko T., Kida T., Akashi M. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly(gamma-glutamic acid) with l-phenylalanine as a protein carrier // J. Control. Release. — 2005. — Vol. 108, №2–3. — P. 226–236.
90. Oh K.S., Han S.K., Lee H.S., Koo H.M., Kim R.S., Lee K.E., Han S.S., Cho S.H., Yuk S.H. Core/Shell nanoparticles with lecithin lipid cores for protein delivery // Biomacromolecules. — 2006. — Vol. 7, №8. — P. 2362–2367.
91. Atman-Onal Y., Munier S., Ganee A., Terrat C., Durand P.Y., Battail N., Martinon F., Le Grand R., Charles M.H., Delair T., Verrier B. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 P24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models // J. Control. Release. — 2006. — Vol. 112, №2. — P. 175–185.
92. Leach W.T., Simpson D.T., Val T.N., Anuta E.C., Yu Z., Williams R.O. III, Johnston K.P. Uniform encapsulation of stable protein nanoparticles produced by spray freezing for the reduction of burst release // J. Pharm. Sci. — 2005. — Vol. 94, №1. — P. 56–69.
93. Leach W.T., Simpson D.T., Val T.N., Yu Z., Lim K.T., Park E.J., Williams R.O. III, Johnston K.P. Encapsulation of protein nanoparticles into uniform-sized microspheres formed in a spinning oil film // AAPS PharmSciTech. — 2005. — Vol. 6, №4. — P. E605–E617, <http://www.aapspharmscitech.org>.
94. Li Y., Pei Y., Zhang X., Gu Z., Zhou Z., Yuan W., Zhou J., Zhu J., Gao X. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats // J. Control. Release. — 2001. — Vol. 71, №2. — P. 203–211.
95. Leach W.T., Simpson D.T., Val T.N., Anuta E.C., Yu Z., Williams R.O. III, Johnston K.P. Uniform encapsulation of stable protein nanoparticles produced by spray freezing for the reduction of burst release // J. Pharm. Sci. — 2005. — Vol. 94, №1. — P. 56–69.
96. Li J.K., Wang N., Wu X.S. Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery // J. Control. Release. — 1998. — Vol. 56, №1–3. — P. 117–126.
97. Amidi M., Romeijn S.G., Borchard G., Junginger H.E., Hennink W.E., Jiskoot W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system // J. Control. Release. — 2006. — Vol. 111, №1–2. — P. 107–116.
98. Wang N., Wu X.S. Preparation and characterization of agarose hydrogel nanoparticles for protein and peptide drug delivery // Pharm. Dev. Technol. — 1997. — Vol. 2, №2. — P. 135–142.
99. Liu L., Xu K., Wang H., Tan P.K., Fan W., Venkatraman S.S., Li L., Yang Y.Y. Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent // Nat. Nanotechnol. — 2009. — 4(7). — P. 457–463.
100. Kondo N., Iwao T., Masuda H., Yamanouchi K., Ishihara Y., Yamada N., Haga T., Ogawa Y., Yokoyama K. Improved oral absorption of a poorly water-soluble drug, HO-221, by wet-bead milling producing particles in submicron region // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). — 1993. — Vol. 41, №4. — P. 737–740.
101. Rasenack N., Hartenhauer H., Muller B.W. Microcrystals for dissolution rate of poorly water-soluble drugs // Int. J. Pharm. — 2003. — Vol. 254, №2. — P. 137–145.
102. Петраковский Г.А., Пискорский В.П., Губин С.П., Кособудский И.Д. // ФТТ. — 1980. — Т. 22, №5. — С. 1507–1509.
103. De Cuyper M., Joniau M. Binding characteristics and thermal behaviour of cytochrome-C oxidase, inserted into phospholipid-coated, magnetic nanoparticles // Biotechnol. Appl. Biochem. — 1992. — Vol. 16, №2. — P. 201–210.
104. Shaw S.Y., Chen Y.J., Ou J.J., Ho L. Preparation and characterization of Pseudomonas putida esterase immobilized on magnetic nanoparticles // Enzym. Microb. Tech. — 2006. — Vol. 39. — P. 1089–1095.
105. Dyal A., Loos K., Noto M., Spagnoli S.W., Shafi K.V.P.M., Ulman A., Cowman M., Gross R.A. Activity of Candida rugosa lipase immobilized on gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticles // J. Am. Chem. Soc. — 2003. — Vol. 125. — P. 1684–1685.
106. Tong X.D., Xue B., Sun Y. A novel magnetic affinity support for protein adsorption and purification // Biotechnol. Prog. — 2001. — Vol. 17. — P. 134–139.
107. Koneracka M., Kopcansky P., Timko M., Ramchand C.N. Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles // J. Magn. Magn. Matter. — 2002. — Vol. 252. — P. 409–411.

Поступила 11.01.2013

## Nanosized dosage forms as delivery systems for proteins

Kaplun A.P., Krasilnikova V.V., Kubatiev A.A.

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, Russia, 125315, Moscow, Baltijskaya St., 8  
Moscow State University of Fine Chemical Technology, MV Lomonosov, 119571, Moscow, prosp. Vernadskogo, 86

*Proteins as drugs have serious disadvantages: they quickly hydrolyzed after administration, they can cause undesired immune responses. An important way to overcome these shortcomings is both modify them, or the incorporation into micro- or nanoparticles. The review on the basis of specific examples are considered basic principles of modification and encapsulation of proteins, as well as the effects obtained from such manipulations.*

**Key words:** vaccines, liposomes, nanocrystals, nanoparticles, passive targeting, emulsions