

ПОЛИМЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2003 г. Л. И. ВАЛУЕВ, Т. А. ВАЛУЕВА*,
И. Л. ВАЛУЕВ, Н. А. ПЛАТЭ

*Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева РАН, Москва,
Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Полимерные гидрогели, выделяющие биологически активные соединения по механизму обратной связи. III. Термоактивируемый направленный транспорт биологически активных соединений. IV. Полимерные гидрогели для направленного транспорта полипептидов. V. Полимерные материалы с повышенной гемосовместимостью. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В середине 70-х годов сформировалась и в настоящее время переживает период интенсивного развития новая область науки — химия медико-биологических полимеров, находящаяся на границе химии высокомолекулярных соединений, органической химии, биохимии и фармакологии. Предметом изучения этой науки являются синтетические вещества и материалы, предназначенные для длительного или кратковременного контакта с тканями живого организма и обеспечивающие терапевтический результат, качественно отличный от случая использования других, традиционно применявшихся в прошлом веществ и материалов.

Интерес к химии медико-биологических полимеров вызван потребностью в них многих областей фармакологии и медицины.

Принятые сокращения: БАС — биологически активные соединения, НКТС — нижняя критическая температура смешения, АА — акриамид, ГАА — N-(2-D-глюкоз)акриламид, П-N-ИПАА — поли-N-изопропилакриламид, Кон А — конканавалин А, ГО — глюкозооксидаза.

Адрес для корреспонденции: e-mail: valuev@tips.ac.ru

Наиболее перспективным в этом направлении является создание макромолекулярных систем для контролируемого выделения биологически активных соединений (БАС), главным образом – различных лекарственных веществ.

Все используемые в настоящее время лекарственные средства состоят из двух основных компонентов – БАС и компонентов лекарственной формы. Обычные низкомолекулярные лекарства не рассчитаны на длительное пребывание в организме; они быстро выводятся или метаболизируются. Поэтому для достижения терапевтического эффекта прибегают к многократному приему лекарства, в результате чего концентрация его в организме непрерывно меняется – от большой вначале до очень малой перед повторным приемом. Роль компонентов лекарственной формы как раз и заключается в обеспечении благоприятных условий для действия БАС. Но, к сожалению, применяемые до последнего времени лекарственные формы (таблетки, мази, капсулы, растворы) не оптимальны с точки зрения выполняемых ими функций. Они не обеспечивают длительную и равномерную подачу БАС в кровотоки и практически не способствуют их доставке в орган-мишень. В организме БАС распределяются в соответствии с их физико-химическими свойствами, и только в редких случаях в пораженный орган попадает около 10% введенного, часто достаточно дорогого и токсичного по отношению к здоровым тканям, лекарства [14].

В 70-х годах на основе синтетических полимеров был предложен и реализован новый подход, обеспечивающий решение этой проблемы. Одной из первых систем подобного рода были глазные лекарственные пленки на основе сополимера акриламида, N-винилпирролидона и этилакрилата, содержащего различные БАС: антибиотики, сульфаниламиды, витамины, анестетики и т.п. [15]. При введении в конъюнктивальную полость глаза такие пленки постепенно растворялись, выделяя содержащееся в них БАС. Скорость растворения можно было регулировать изменением состава сополимера. В итоге терапевтическая концентрация БАС, например, сульфамида натрия, в полости глаза сохранялась в течение полутора суток, тогда как при использовании раствора лекарства это время не превышало трех часов.

Дальнейшая задача заключалась в создании систем, функционирующих по принципу обратной связи и способных в соответствии с требованиями внутренней среды организма [18] обеспечивать длительную равномерную подачу БАС в активной форме в орган-мишень. Системы, действующие по принципу обратной связи и в какой-то

степени моделирующие некоторые функции организма, следует отнести к наиболее универсальным и физиологически оптимальным.

Проблемы конструирования таких систем и рассматриваются в настоящем обзоре.

II. ПОЛИМЕРНЫЕ ГИДРОГЕЛИ, ВЫДЕЛЯЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ПО МЕХАНИЗМУ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Полимерные гидрогели – это пористые, хорошо набухающие, но не растворяющиеся в воде материалы. Обычно их получают полимеризацией водорастворимых ненасыщенных соединений в присутствии бифункционального сшивающего агента. Содержание воды в равновесно набухших гидрогелях составляет от 10 до >95% [43].

Первое упоминание о применении гидрогелей в медицине относится к 60-м годам, когда гидрогели на основе полигидроксиэтилметакрилата были использованы для создания мягких контактных линз [62]. В 70-х годах было предложено использовать гидрогели в качестве инертной матрицы для контролируемого выделения БАС. Так, противозачаточные средства на основе диспергированного в гидрогеле прогестерона при однократном применении обеспечивали необходимый эффект в течение 2-х месяцев [63].

В таких устройствах БАС не связано с гидрогелем химическими связями, и скорость его выделения определяется его природой и строением гидрогеля. Регулирование скорости выделения БАС при синтезе гидрогеля достигалось варьированием природы водорастворимого мономера или соотношения между мономером и сшивающим агентом [33]. Гораздо более широкие возможности для регулирования скорости выделения БАС открываются при использовании полимеров, способных изменять степень набухания при изменении параметров окружающей среды, например, температуры, pH или химического состава. Наиболее простое и универсальное устройство для контролируемого выделения БАС по механизму обратной связи приведено на рис. 1. Оно представляет собой жесткий контейнер с отверстиями, заполненный гидрогелем, набухшим в растворе БАС [27]. При изменении внешних условий гидрогель либо уменьшает степень набухания, либо частично разрушается. В результате в контейнере появляется раствор лекарства, который достаточно легко диффундирует в окружающую среду. Очевидно, что главная задача заключается в синтезе подходящего для каждого конкретного случая гидрогеля, в котором при небольших изменениях параметров внешней

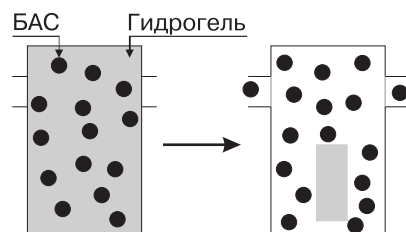


Рис.1. Устройство для выделения БАС при изменении внешних условий.

среды должен происходить фазовый переход первого рода, сопровождающийся значительным изменением объема.

Одним из основных параметров, изменяющихся при патологических состояниях, является температура. Поэтому во многих случаях для контролируемого выделения БАС целесообразно использовать

гидрогели на основе полимеров, имеющих нижнюю критическую температуру смешения (НКТС). Фазовое расслоение в растворах таких полимеров при повышении температуры обусловлено переходом макромолекул из конформации набухшей глобулы в конформацию компактного клубка. Такой переход сопровождается резким уменьшением размеров макромолекулы, а применительно к сшитым полимерным системам – резким уменьшением их объема [25]. Известно большое количество полимеров, в основном N-замещенных производных полиакриламида, НКТС которых лежит в области температур от 9 до 85 °С [55].

В табл. 1 представлены результаты испытания устройства, приведенного на рис. 1 [27]. В качестве наполнителя был использован сшитый поли-N-изопропилакриламид (П-N-ИПАА). Этот полимер имеет НКТС 32 °С. То есть при температуре ниже 32 °С гидрогель набухает в воде, а при температуре выше этой точки – в десятки раз

Таблица 1.

Зависимость скорости выделения ацетаминофенола из гидрогеля на основе сшитого поли-N-изопропилакриламида от температуры

Температура, °С	Скорость выделения, мкг/мин	Время, час
30	не определяется	25,6
30	не определяется	30,4
31	0,6	30,8
31	1,0	32,0
33	1,0	46,0
33	4,8	50,0
30	4,8	52,3
30	не определяется	53,6
33	2,9	70,0
33	6,0	71,8
20	6,0	74,0
20	не определяется	75,2

уменьшает свой объем. Как видно из табл. 1, при температуре ниже НКТС лекарство (например, жаропонижающее) практически не выделяется. При повышении температуры выше 32 °С гель коллапсирует, и скорость выделения лекарства увеличивается. Снижение температуры, например, в результате действия выделившегося лекарства, приводит к тому, что скорость его выделения падает практически до нуля. Это устройство может действовать многократно вплоть до полного исчерпания первоначально введенного в него препарата. Поскольку в основе фазового разделения растворов полимеров лежат гидрофобные взаимодействия, то НКТС полимеров можно легко регулировать, используя реакции сополимеризации. Так, сополимеризация с гидрофобными мономерами приводит к снижению НКТС, а использование гидрофильных мономеров – к ее повышению [34, 52].

Аналогично действуют и рН-чувствительные гидрогели, которые обычно синтезируют полимеризацией ионогенных мономеров в присутствии сшивающего агента. Имеющийся сегодня набор мономеров с функциональными группами кислотного или основного характера позволяет в широких пределах варьировать степень набухания гидрогелей, то есть тот параметр, который определяет возможное изменение объема гидрогеля при изменении рН окружающей среды [28]. Гидрогели, содержащие кислотные группы, например, на основе полиакриловой, полиметакриловой кислот, стиролсульфокислоты и т.п., хорошо набухают в щелочной среде, но коллапсируют в кислой. В то же время, гидрогели с основными группами, напротив, набухают в кислой среде и резко уменьшают свой объем при повышении рН. К таким гидрогелям относятся сшитый полиаминоэтилметакрилат, поливинилпиридин и т.д. С точки зрения практического применения возможно два пути использования рН-чувствительных гидрогелей. В первом случае, например, при лечении ран, на поверхность раны наносят высушенный порошок основного гидрогеля, содержащего БАС. При рН крови (7,4) практически не происходит выделения лекарства из гидрогеля на основе сополимера метилметакрилата и диметиламиноэтилметакрилата. При патологии, которая сопровождается уменьшением рН до 5,0, гидрогель набухает, выделяя содержащееся в нем лекарство [56, 57]. Такие гидрогели пригодны для однократного выделения БАС.

Если необходимо пульсирующее выделение БАС, то можно применить описанное выше устройство (рис. 1). В этом случае был использован гидрогель на основе полиакриловой кислоты, а в качестве модельного БАС – канамицин [10]. При рН 7,4 стенки контейнера препятствовали выделению канамицина из набухшего гидрогеля, а при рН ниже 5,0 скорость выделения лекарства существенно увели-

Таблица 2.
**Зависимость скорости выделения канамицина из гидрогеля
на основе сшитой полиакриловой кислоты от рН**

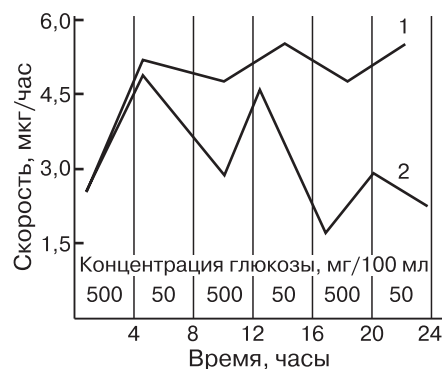
рН	Скорость выделения, мкг/мин	Время, час
8,0	не определяется	3,0
6,0	0,1	8,0
5,0	не определяется	15,0
5,0	0,4	30,0
4,4	1,3	44,0
4,4	6,2	48,0
5,0	6,1	53,0
6,0	1,1	54,0
6,0	1,0	58,0

чивалась. При обратном изменении рН (восстановлении физиологического значения) система «выключает» выделение лекарства (табл. 2).

Гораздо более сложные полимерные системы были использованы для контролируемого выделения инсулина. Поскольку повышение концентрации глюкозы в крови является главным стимулом секреции инсулина поджелудочной железой, то применительно к проблеме лечения сахарного диабета перспективными представляются глюкозочувствительные полимерные системы. Такие системы, будучи имплантированы в организм больного, контролируемо выделяли бы инсулин в ответ на повышение концентрации глюкозы.

Принцип создания подобных систем, впервые сформулированный в 1979 г., был основан на использовании лектинов — белков, способных избирательно и обратимо связывать углеводы [29]. В полимерную мембрану, проницаемую для инсулина и глюкозы, но не проницаемую для лектина, помещали комплекс лектина с предварительно синтезированным производным инсулина и углевода. Обычно в качестве лектина использовали конканавалин А (Кон А) — белок с молекулярной массой 102000 Да, имеющий четыре места связывания углеводов. Глюкоза, появляющаяся в окружающей среде, проникала через мембрану и вытесняла производное инсулина из его комплекса с Кон А. Экспериментально работоспособность высказанной идеи была проверена ее авторами на примере производных инсулина и мальтозы. Биологическая активность этих производных, оцененная по их способности понижать концентрацию глюкозы в крови животных при подкожном введении, составляла в среднем 90% от активности нативного инсулина. Синтезированные производные образовывали достаточно устойчивые комплексы с Кон А, причем

Рис. 2. Зависимость скорости выделения *n*-(сукцинилиамидо)фенил- α -(*D*-глюкопиранозид)-инсулина (1) и *n*-(сукцинилиамидо)фенил- α -(*D*-маннопиранозид)-инсулина (2) через мембрану из пористого полигидроксиэтилметакрилата (площадь 12,6 см²) от времени и концентрации глюкозы в растворе.



их константы связывания с Кон А были близки к константам связывания глюкозы с Кон А. Последнее и определяло основной недостаток этой системы: замещение глюкозой производного инсулина в его комплексе с Кон А и выделение его в окружающую среду происходило практически при любых концентрациях глюкозы [30].

В дальнейшем было синтезировано большое количество различных углеводных производных инсулина, биологическая активность которых составляла 82–88% от активности нативного инсулина [36,37,53]. По фармакодинамическим характеристикам эти соединения не отличались от нативного инсулина и обеспечивали вполне приемлемую зависимость скорости выделения инсулина от концентрации глюкозы (рис. 2) [53]. Эксперименты на животных, хотя и подтвердили результаты, полученные *in vitro*, но обозначили новую проблему: повышение надежности системы. Авторы отмечали, что у некоторых животных через 2 дня после имплантации развивалась тяжелая форма гипогликемии, вызванная разрушением мембраны и выделением громадного количества инсулина [37].

В связи с этим, дальнейшее развитие работ было сосредоточено, главным образом, на совершенствовании системы с целью повышения ее надежности. Так, например, вместо раствора Кон А было предложено использовать этот белок, иммобилизованный на гранулах Сефарозы, или Кон А, сшитый карбодиимидом, а в качестве материала для полимерной мембраны – ацетат целлюлозы, поликарбонат или поливинилиденфторид [39, 44]. Константы связывания глюкозилрованного инсулина с иммобилизованным или сшитым Кон А имели близкие значения и в 3–4 раза превосходили константы связывания глюкозы с лектином. Эти системы начинали выделять инсулин при концентрации глюкозы выше 1 мг/мл, причем время ответной реакции определялось природой мембраны. Из мембраны на основе аце-

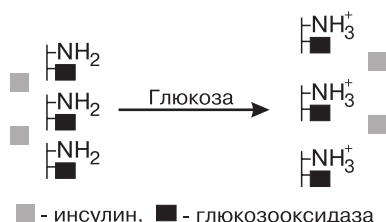
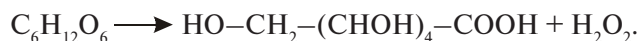


Рис. 3. Принцип действия глюкозо-чувствительных мембран на основе иммобилизованной глюкозооксидазы.

образовывать комплексные соединения с боратами [41, 54]. Исходный гидрогель получали обработкой сополимера N-винилпирролидона с *m*-акриламидофенилборной кислотой раствором полимера, содержащего гидроксильные группы, например, раствором поливинилового спирта. При появлении в окружающей среде глюкозы часть межмакромолекулярных связей разрушалась и заменялась связями глюкозы с борсодержащим полимером; степень набухания гидрогеля увеличивалась, и в том случае, если изначально гидрогель был насыщен инсулином, скорость его выделения также увеличивалась.

Применительно к контролируемому выделению инсулина достаточно перспективными представляется использование мембранной технологии. Принцип действия одной из таких систем приведен на рис. 3. Резервуар с насыщенным раствором инсулина закрывали гидрогелевой мембраной на основе аминоксодержащего полимера, в объеме которого иммобилизовали глюкозооксидазу (ГО) — фермент, избирательно катализирующий реакцию окисления глюкозы до глюконовой кислоты:



Глюкоза, появляющаяся в окружающей среде, диффундировала в гидрогель, фермент окислял глюкозу с образованием кислоты, и понижение pH приводило к ионизации аминоксодержащих групп гидрогеля. В результате электростатического отталкивания заряженных аминоксодержащих групп степень набухания гидрогеля увеличивалась и инсулин диффундировал через мембрану в окружающую среду [35].

Хотя в дальнейшем эти системы были значительно усовершенствованы [40, 45, 58, 59], основной их недостаток: выделение инсулина при любых, даже крайне низких и физиологически приемлемых концентрациях глюкозы, не удалось устранить. Следует напомнить, что в живом организме пороговая концентрация глюкозы для секреции

тата целлюлозы инсулин начинал выделяться через 2 часа после добавления глюкозы, а из поликарбонатной мембраны — уже через полчаса. Еще более короткий индукционный период (10 минут) был достигнут для мембран, полученных на основе поливинилиденфторида.

В основе создания другого типа глюкозо-чувствительных гидрогелей лежит способность глюкозы, подобно другим диолам,

инсулина составляет 80–100 мг/100 мл крови, а максимальная скорость достигается при концентрации глюкозы 300–500 мг/100 мл [18].

Для решения этой довольно сложной проблемы (создания системы, реагирующей на определенную концентрацию глюкозы) было предложено использовать принципиально иную полимерную систему — гидрогели на основе сополимеров акриламида (АА) с ненасыщенным производным глюкозы — N-(2-D-глюкоз)акриламидом (ГАА), сшитых Кон А [7, 23, 50].

Гидрогели синтезировали сополимеризацией АА с ГАА и последующим смешиванием водных растворов полученных сополимеров с Кон А. При изучении взаимодействия гидрогелей с растворами глюкозы различной концентрации было обнаружено, что существует пороговая концентрация, ниже которой никаких видимых изменений с гидрогелем не происходит. При концентрациях глюкозы выше пороговых наблюдался быстрый переход гидрогеля в растворимое состояние, — комплекс [Кон А—ГАА] распался с образованием комплекса [Кон А—глюкоза] и водорастворимых макромолекул сополимера ГАА и АА (рис. 4). Чем выше содержание звеньев ГАА в сополимере, тем выше значение пороговой концентрации. Так, для содержания звеньев ГАА 4,92; 10,14 и 14,45 мол.% пороговая концентрация глюкозы, при которой происходило разрушение гидрогелей, составляла 180, 380 и 565 мг/100 мл, соответственно. Наличие пороговой концентрации, вероятно, было обусловлено кооперативным эффектом, возникающим при взаимодействии двух полифункциональных макромолекул: Кон А и сополимера ГАА с АА. При этом, пороговая концентрация глюкозы оказалась даже несколько выше, чем можно было ожидать, исходя из значений констант связывания [Кон А—глюкоза] ($3,7 \cdot 10^3$ л/моль) и [Кон А—ГАА] ($1,1 \cdot 10^2$ л/моль). При удалении глюкозы из раствора путем диализа комплекс [Кон А—глюкоза]

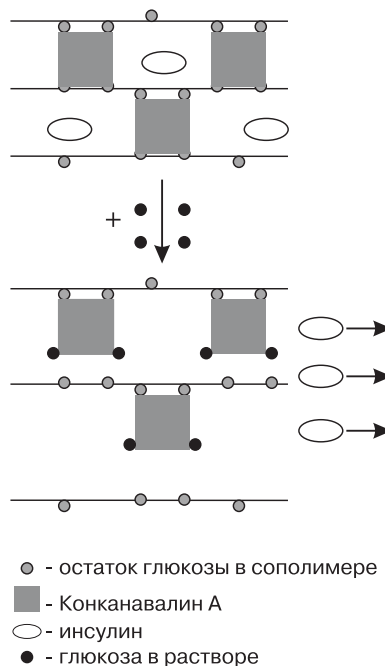


Рис. 4. Схема действия глюкозочувствительных гидрогелей.

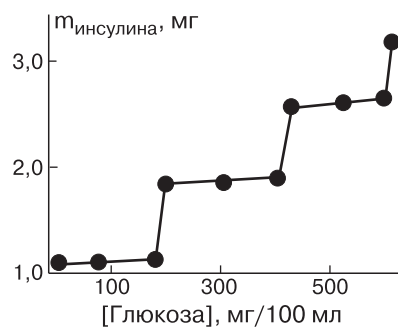


Рис. 5. Зависимость количества выделяющегося инсулина ($m_{\text{инсулина}}$) от концентрации глюкозы в окружающей среде.

разрушался, что приводило к обратному переходу сополимера из раствора в гидрогель. Вновь образовавшийся гидрогель по своим физико-механическим свойствам не отличался от исходного и мог быть использован повторно.

С точки зрения контроля выделения инсулина при достижении определенной концентрации глюкозы, интерес представляют смеси сополимеров с различным содержанием ГАА. На рис. 5 приведена кинетика выделения инсулина из контейнера, содержащего смесь предварительно

насыщенных раствором инсулина гидрогелей на основе сополимеров различного состава. Были использованы сополимеры с содержанием ГАА 4,92, 10,14 и 14,45 мол.%. Количество гидрогеля каждого типа составляло 1 мл; в каждый гидрогель было введено 1,3 мг инсулина. Затем сосуд помещали в стакан с 10 мл буферного раствора с рН 3,5. Диффузия инсулина из сосуда в отсутствие глюкозы не превышала 15 мкг за 10 часов. При добавлении глюкозы к буферному раствору наблюдалась ее диффузия в сосуд с гидрогелем, и при концентрации выше пороговой для каждого типа гидрогеля происходил его переход в раствор с выделением содержащегося в нем инсулина. Такую систему легко «настроить» на выделение требуемого количества инсулина при заданной концентрации глюкозы, то есть в данном случае можно говорить о создании, пусть даже в нулевом приближении, синтетической модели поджелудочной железы, способной эффективно замещать одну из ее функций, а именно выделять инсулин в ответ на повышение уровня глюкозы.

III. ТЕРМОАКТИВИРУЕМЫЙ НАПРАВЛЕННЫЙ ТРАНСПОРТ БАС

В основе большинства подходов к созданию препаратов направленного действия лежит совместная иммобилизация на растворимом полимере-носителе БАС и молекулы-вектора, специфически взаимодействующего с рецепторами на поверхности клетки больного органа [51]. Этот подход наиболее перспективен, главным образом, из-за крайне высокой избирательности действия такой системы. К его не-

достаткам следует отнести чрезвычайную сложность, поскольку в каждом конкретном случае необходимо выяснить какое соединение в больном органе можно использовать в качестве лиганда, найти или синтезировать вещество, способное избирательно реагировать с этим лигандом, и затем присоединить это вещество к лекарству без изменения активности обоих компонентов.

Второй подход — это модификация лекарства веществами, которые являются строительным материалом для очага поражения. Например, тромболитический фермент можно модифицировать фибриногеном — белком, который является основой тромба. В этом случае фибриноген выступает в роли троянского коня, который привносит в тромб разрушающий его фермент [26]. Этот подход относительно прост, но, к сожалению, имеет частный характер.

Третья группа методов включает введение в лекарственный препарат ферромагнитных веществ с последующим наложением магнитного поля на больной орган [46]. Однако, этот метод не нашел широкого распространения, поскольку при использовании таких препаратов возникает серьезная проблема выведения частиц ферромагнитного вещества из организма.

И, наконец, четвертый подход основан на использовании полимерных систем, изменяющих свои свойства при изменении температуры окружающей среды, то есть водорастворимых полимеров с НКТС [4, 11, 12, 17, 60, 61]. Применительно к лекарствам этот подход представляется достаточно универсальным, поскольку, как уже отмечалось, в зонах воспаления или новообразований обычно наблюдается местное повышение температуры, что должно обеспечивать самопроизвольное концентрирование лекарства в этих зонах. Кроме того, почти всегда существует возможность локального нагревания органа-мишени и принудительного транспорта лекарства в этот орган. Вводя в кровеносную систему иммобилизованное на таком полимере лекарство и нагревая орган-мишень до температуры выше НКТС, следует ожидать концентрирование полимера и связанного с ним лекарства в этом органе. Естественно, что использование этого подхода возможно только при соблюдении двух условий. Во-первых, после иммобилизации БАС полимер-носитель должен сохранять способность к фазовому переходу при температурах выше НКТС, то есть осуществлять транспортную функцию. Во-вторых, полимер-носитель не должен оказывать денатурирующего воздействия на молекулу БАС при температурах выше НКТС, что особенно важно для БАС полипептидной природы.

Биологическую активность полимерных производных БАС изучали на примере двух систем: трипсина и пероксидазы хрена,

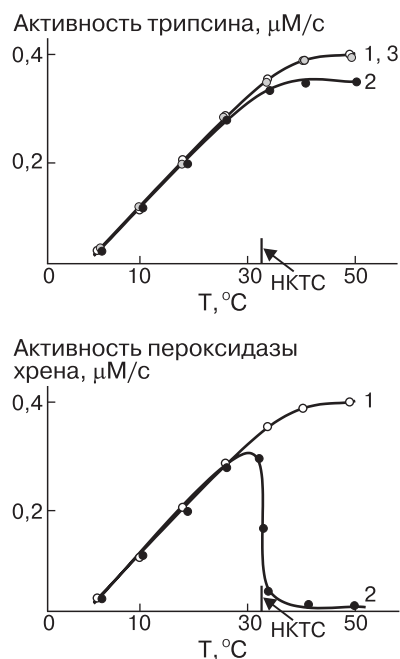


Рис.6. Зависимость активности трипсина (А) и пероксидазы хрена (Б) от температуры.

1 – нативный фермент, 2 – фермент, иммобилизованный на поли-N-изо-пропилакриламиде, 3 – трипсин, иммобилизованный на полиакриламиде. НКТС – нижняя критическая температура смешения.

было обратимо и при охлаждении раствора активность трипсина полностью восстанавливалась.

Оценка конформационного поведения макромолекул, проведенная методом кругового дихроизма, показала, что степень спиральности нативного и иммобилизованного трипсина при температурах ниже НКТС практически одинакова ($10,2 \pm 1,3$ и $9,6 \pm 1,2\%$, соответственно), а активность трипсина, иммобилизованного на модельном полиакриламиде, не имеющем НКТС, полностью совпадала с активностью нативного фермента во всем изученном температурном интервале. Следовательно, уменьшение активности трипсина, иммобилизованного на поли-N-ИПАА, при повышении температуры выше НКТС обусловлено гидрофобизацией полимера-носителя. Подтвер-

иммобилизованных на П-N-ИПАА [4, 60]. Иммобилизация фермента в количестве 1–5 молекул на одну молекулу полимера с M_r 150000–200000 не изменяла НКТС этого полимера. Этого и следовало ожидать, так как в результате иммобилизации образуется привитой сополимер фермента на цепи синтетического полимера, а характер конформационных изменений основной цепи в таких системах мало зависит от природы привитых цепей при их высоком содержании [1].

Результаты изучения активности иммобилизованных ферментов при различной температуре представлены на рис. 6. Видно, что если активность нативного трипсина с повышением температуры в области 10–40 $^{\circ}\text{C}$ непрерывно увеличивалась, то для иммобилизованного на П-N-ИПАА трипсина в области выше НКТС активность переставала зависеть от температуры. Уменьшение активности иммобилизованного трипсина по сравнению с нативным при температуре выше НКТС

ждением этого вывода явилось поведение иммобилизованной на том же полимере пероксидазы хрена, которая более, чем трипсин, чувствительна к гидрофобной инактивации (рис.6, Б). Активность этого фермента при нагревании выше НКТС резко падала и составляла 5–10% от активности нативного фермента при тех же температурах.

Схема установки для изучения возможности транспорта лекарства представлена на рис. 7. Она состоит из двух отдельно термостатируемых сосудов (А и Б) объемом 1,5 мл. Непрерывное протекание раствора через сосуды со скоростью 1,5 мл/мин обеспечивали с помощью перистальтического насоса. В каждом сосуде формировали сгусток фибрина объемом 0,5 мл и систему заполняли 10 мл раствора либо нативного, либо иммобилизованного трипсина (концентрация фермента составляла 0,03 мкмоль). В том случае, когда температура в обоих сосудах ниже НКТС (36 °С), время полного растворения фибриновых сгустков в обоих сосудах было одинаково и составляло около 15 часов как при протекании раствора нативного трипсина (образец I), так и – трипсина, иммобилизованного на полимере без НКТС (образец II) или с НКТС (образец III). При использовании образцов I или II нагревание сосуда А до 38 °С не изменяло наблюдаемую картину; а при использовании образца III с НКТС 37,2 °С наблюдалось резкое ускорение скорости гидролиза сгустка в сосуде А – время полного растворения уменьшалось до 1 часа. В сосуде Б, нагретом только до температуре 36 °С, растворения сгустка не происходило даже за 15 часов.

Очевидно, что единственной причиной наблюдаемого эффекта являлось концентрирование всего иммобилизованного фермента в сосуде А за счет выделения в отдельную фазу полимера и связанного с ним трипсина. Если после растворения сгустка в сосуде А этот сосуд охлаждали до 36 °С, а сосуд Б нагревали до 38 °С, то весь иммобилизованный трипсин переходил в сосуд Б и сгусток в этом сосуде растворялся в течение 1 часа.

Рассмотренные результаты дают основание полагать, что использование водорастворимых полимерных носителей с НКТС может явиться новым подходом к созданию систем направленного транспорта лекарственных препаратов и других БАС.

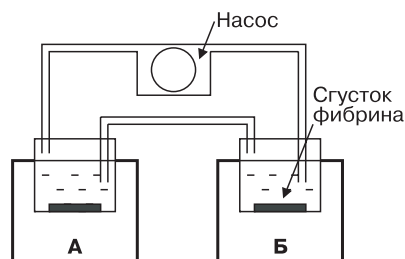


Рис. 7. Схема устройства для изучения транспорта иммобилизованного трипсина.

IV. ПОЛИМЕРНЫЕ ГИДРОГЕЛИ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА ПОЛИПЕПТИДОВ

Достаточно оригинальной представляется идея использования полимерных гидрогелей, модифицированных ингибиторами протеолитических ферментов и биоспецифическими лигандами, для повышения устойчивости полипептидных БАС к действию протеолитических ферментов и для направленного транспорта БАС в определенный участок организма [5, 6, 8, 9, 13, 16, 22]. Суть этой идеи применительно к случаю перорального введения инсулина иллюстрируется рис. 8. Полимерный гидрогель модифицировали овомукоидом (из белка утиных яиц), молекула которого состоит из двух частей: полипептидной и полисахаридной. Белковая часть молекулы овому-

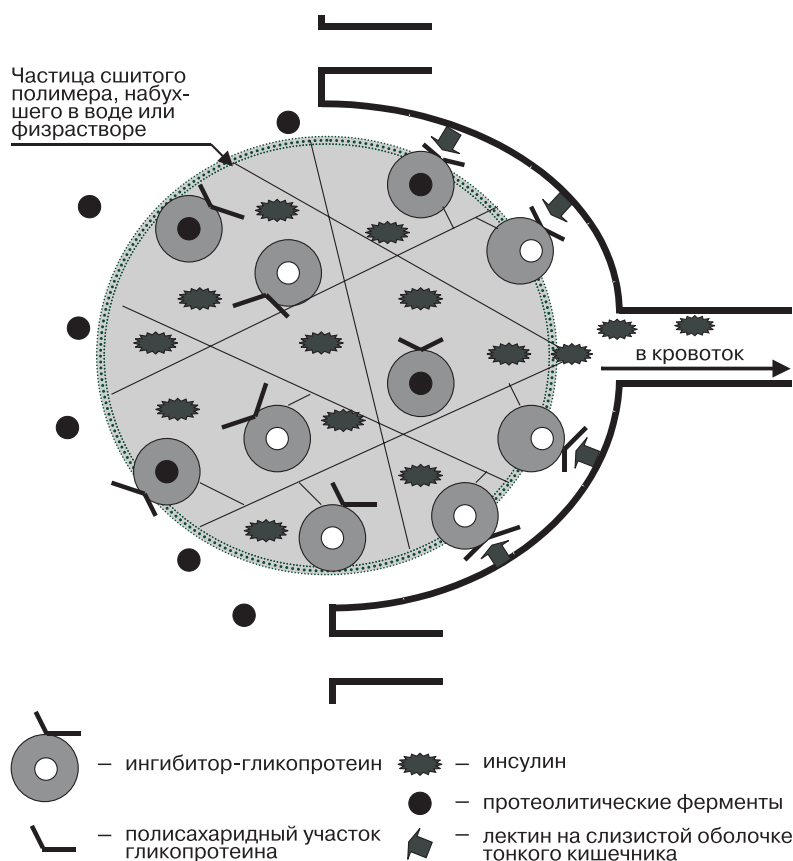


Рис. 8. Схема действия препарата иммобилизованного инсулина.

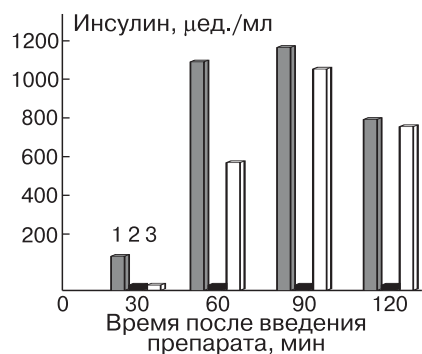


Рис. 9. Уровень иммунореактивного инсулина в крови белых крыс после однократного введения нативного инсулина, подкожно (1); инсулина в гидрогеле, модифицированном овомукоидом без полисахаридного участка, перорально (2); инсулина в гидрогеле, модифицированном овомукоидом, перорально (3). Доза 5 ед./кг. Средний результат для 25 животных.

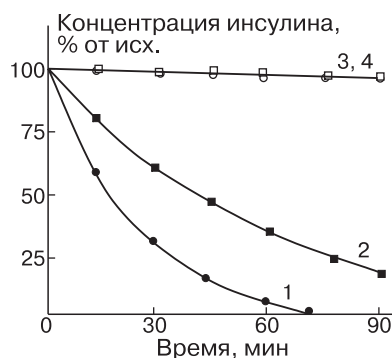


Рис. 10. Кинетика гидролиза нативного инсулина (1); инсулина, иммобилизованного в немодифицированном гидрогеле (2); инсулина, иммобилизованного в гидрогеле, модифицированном овомукоидом без полисахаридного участка (4) α -химотрипсином ($t = 37^\circ\text{C}$; рН 7,4; массовое отношение инсулин : фермент 200:1).

когда обеспечивала ингибирование протеолитических ферментов, а ее полисахаридный участок, взаимодействуя по механизму биоспецифического связывания с лектинами, содержащимися на стенках тонкого кишечника [42], обеспечивал прилипание частиц гидрогеля к стенкам тонкого кишечника.

На рис. 9 приведены результаты испытаний препарата, полученного импрегнированием модифицированного полимерного гидрогеля раствором инсулина. Видно, что после инъекции раствора нативного инсулина его концентрация в крови сначала повышалась, достигала максимума через полтора часа и затем начинала уменьшаться. Аналогичная картина наблюдалась при пероральном введении инсулина в составе модифицированного гидрогеля. Как и следовало ожидать, пероральное введение препарата на основе гидрогеля, модифицированного овомукоидом с удаленным полисахаридным участком, не приводило к изменению концентрации инсулина в крови, хотя защитное действие такого производного овомукоида в отношении протеолитических ферментов сохранялось (рис. 10). Это означает, что определяющая роль в проникновении инсулина через слизистую оболочку действительно принадлежит биоспецифическим взаимодействиям лектин-полисахарид.

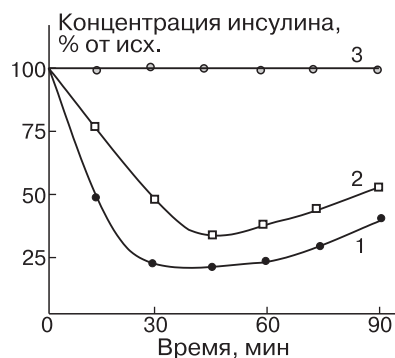


Рис. 11. Зависимость концентрации глюкозы в крови кроликов от времени после введения 5 ед./кг нативного инсулина, инъекционно (1) и инсулина, в составе гидрогеля, модифицированного овомукоидом, перорально (2). 3 – контроль (без введения инсулина). Приведены средние значения для 14 животных.

Таблица 3.
Концентрация глюкозы в крови крыс с экспериментальным диабетом после ежедневного перорального введения 5 ед. иммобилизованного инсулина

№	Концентрация глюкозы, мг/100 мл				
	Исходная	1 неделя	2 неделя	3 неделя	4 неделя
1	800	650	500	200	160
2	600	400	400	200	150
3	500	350	180	100*	100*
4	700	580	400	130	100
5	760	500	140	140*	120*
6	800	430	400	400	220
7	550	200	200	180	160
8	500	280	300	200*	160*
9, контроль	800	800	760	погибла	–
10, контроль	600	720	700	погибла	–
11, контроль	700	800	750	погибла	–

Экспериментальный диабет у крыс линии Вистар (масса 180–200 г) был моделирован инъекцией 60 мг стрептозотоцина на 1 кг массы животного.

* – без дополнительного введения инсулина после 3-ей недели.

Инсулин поступал в кровь в активном состоянии, что приводило к снижению концентрации глюкозы в крови (рис. 11). Видно, что эффективность действия перорально введенного препарата инсулина не намного уступала эффективности подкожного введения раствора инсулина. Синтезированные препараты активны и по отношению к животным с экспериментальным диабетом (табл. 3). Созданная система была универсальна и обеспечивала защиту полипептидных пре-

паратом (кроме инсулина, были исследованы глюкагон, кальцитонин и гормон роста [23]), от агрессивного действия окружающей среды (протеолитических ферментов пищеварительной системы) и контролируемое выделение препарата в нужном месте, в данном случае в тонком кишечнике.

V. ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ С ПОВЫШЕННОЙ ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬЮ

Основная задача при создании гемосовместимых полимеров заключается в предотвращении тромбообразования на поверхности полимера. Образование тромба — это естественная защитная реакция организма на введение чужеродного тела, конечным результатом которой является превращение растворимого белка крови фибриногена в нерастворимый фибриновый сгусток. К сожалению, проводимые в течение последних десятилетий многочисленные исследования так и не дали ответа на вопрос, какими свойствами должен обладать полимер, чтобы быть гемосовместимым.

Варьирование таких свойств системы, как физико-химические параметры, химический состав, степень «гладкости» поверхности и смачиваемость ее физиологическими растворами, электрохимические характеристики, свободная поверхностная энергия и т.д. [31,32], не привели к решающему успеху.

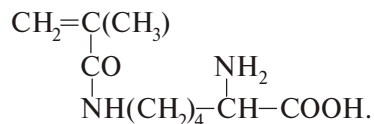
Более обнадеживающие результаты были получены при использовании полимеров, поверхность которых была модифицирована БАС, оказывающих положительное воздействие на процессы тромбообразования и/или фибринолиза, например, гепарином или фибринолитическими ферментами [2, 3, 20, 21, 47–49]. Некоторые подобные материалы уже нашли применение в клинической практике при создании изделий для кратковременного контакта с кровью. Вместе с тем, совершенно очевидно, что под действием присутствующих в крови веществ иммобилизованные БАС должны инактивироваться, то есть модифицированные полимеры вряд ли могут представить интерес для долговременного (десятки месяцев) контакта с кровью, особенно если речь идет о достаточно больших протезах.

В связи с этим, особого внимания заслуживает подход к повышению гемосовместимости, основанный на использовании принципа биоспецифической хроматографии. Хорошо известно, что предварительное покрытие поверхности полимера основным белком крови сывороточным альбумином (СА) приводит к заметному ингибированию процесса тромбообразования [24, 32, 38]. Однако, совершенно очевидно, что как бы прочно ни присоединяли альбумин к полимеру,

он является чужим для данного организма и в процессе долговременной имплантации обязательно разрушится под действием ферментов крови.

С целью создания самообновляющихся покрытий было предложено использовать модификацию поверхности полимера биоспецифическими лигандами для сорбции СА [19]. Для этого на поверхность полимера прививали тонкий слой гидрофильного сополимера акриламида с цетилметакрилатом. СА образует с цетилметакрилатом достаточно прочные комплексы с константой диссоциации $5 \cdot 10^{-8}$ М. При контакте такого полимера с кровью его поверхность автоматически покрывается слоем альбумина, причем, если адсорбированный альбумин денатурирует, то его взаимодействия с цетилметакрилатом ослабляются и денатурированный белок замещается нативным из кровотока. Иными словами, такой материал можно рассматривать как аналог, пусть и очень отдаленный, самообновляющейся живой ткани. Изучение гемосовместимости синтезированных материалов проводили на собаках с использованием полиэтиленовых артериовенозных шунтов диаметром 2 мм. Было обнаружено, что, если все 10 катетеров из не модифицированного полиэтилена тромбировались за первые 7–10 минут контакта с кровью, то 9 из 10 модифицированных катетеров оставались свободными спустя 14 суток.

Гораздо более эффективной, по сравнению с иммобилизацией альбумина, является модификация поверхности фибринолитическими ферментами — катализаторами гидролитического расщепления фибриновых сгустков. Однако и в этом случае возникает проблема, связанная, в первую очередь, с быстрой инактивацией иммобилизованных ферментов ингибиторами, присутствующими в крови. Метод биоспецифической хроматографии обеспечивал и здесь положительный эффект [23]. Как и большинство протеолитических ферментов плазмин, наиболее активный фибринолитический фермент крови, находится в виде неактивного предшественника — плазминогена. При образовании в крови фибриновых сгустков происходит активация плазминогена под действием специфических активаторов, и в крови появляется активный плазмин, разрушающий эти сгустки. Превращение плазминогена в активный фермент может осуществляться и автокаталитически, особенно при достаточно высоких его концентрациях. Необходимо было подобрать достаточно устойчивый в условиях реального кровотока низкомолекулярный лиганд, способный обратимо связывать плазминоген. В качестве такого лиганда, способного обратимо связывать плазминоген, был использован N^ε-метакрилоил-L-лизин — ненасыщенное производное L-лизина:



Поверхность исходного материала модифицировали тонким слоем гидрофильного полимера с иммобилизованным производным лизина. Слой гидрофильного полимера необходим для удаления остатка лизина от поверхности материала для облегчения его взаимодействия с плазминогеном. При контакте с кровью модифицированный материал избирательно взаимодействовал с плазминогеном, концентрируя этот белок на поверхности. Сближение молекул белка способствовало самоактивации плазминогена, и в результате на поверхности материала возникал слой самого мощного фибринолитического фермента крови – плазмина. Активность образующегося плазмина не намного уступала активности плазмина из плазмы крови человека производства фирмы «Sigma» (США) — 350–400 ммоль тирозина/мг белка·мин. При этом не обнаруживалось каких-либо иммунных реакций и прочих осложнений, связанных с применением чужеродных фибринолитических агентов. Что касается сроков службы данного материала, то они были достаточно длительными — потери емкости по плазминогену не превышали 1% в месяц.

Таким образом рассмотренные принципы конструирования гемосовместимых полимеров, в основе которых лежит контролируемое концентрирование на поверхности полимера БАС, присутствующего в живом организме, и даже самопроизвольная активация БАС, позволили синтезировать широкий и разнообразный набор модифицированных материалов, во многом отвечающих потребностям сердечно-сосудистой и восстановительной хирургии, и другим областям медицины. Они оказались также полезными в решении проблем, связанных с хранением, переливанием крови, выделением из нее отдельных компонентов и т.п.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные результаты свидетельствуют о возросших возможностях современной биохимии и химии полимеров в плане создания систем, способных по заранее заданной программе выделять БАС, в необходимом месте, в требуемой концентрации и в нужное время, то есть моделирующих отдельные функции живых тканей и органов.

Химически модифицированные полимерные гидрогели, играющие не просто роль биоинертной матрицы, но и осуществляющие за

счет введенных в них активных химических фрагментов регулируюшую, каталитическую и транспортную функции, способны существенно продвинуть решение проблемы направленного транспорта лекарственных веществ. Это позволит значительно снизить токсичность препаратов и расширить диапазон их медицинского применения. Такие системы целесообразно использовать для высокоактивных, быстро метаболизирующих лекарств, предназначенных для лечения хронических больных в течение длительного времени, а также для коррекции нежелательных острых состояний. Поэтому наиболее перспективным будет создание полимерных систем, включающих противоопухолевые и сердечно-сосудистые средства, препараты, действующие на центральную нервную систему, гормоны, простогландины, витамины и т.п.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баттерд Г., Трегер Д.У. (1970) Свойства привитых и блок-сополимеров. Химия. Ленинград. 216 с.
2. Валуев Л.И., Платэ Н.А., Гумирова Ф.Х., Зимин Н.К., Розенфельд М.А. (1982) Вопросы мед. химии, **28**, № 3, 97–101.
3. Валуев Л.И., Платэ Н.А., Чупов В.В., Бурдыгина И.Ф. (1985) Вопросы мед. химии, **31**, № 4, 43–47.
4. Валуев Л.И., Зефирова О.Н., Обыденнова И.В., Платэ Н.А. (1993) Высокомолекулярная химия, **35**, № 1, 83–86.
5. Валуев И.Л., Валуев Л.И., Сытов Г.А. (1996) Прикладная биохимия и микробиология, **32**, № 4, 371–381.
6. Валуев И.Л., Валуев Л.И., Сытов Г.А., Платэ Н.А. (1996) Биохимия, **61**, № 9, 1584–1588.
7. Валуев И.Л., Валуев Л.И., Чупов В.В., Сытов Г.А., Платэ Н.А. (1997) Высокомолекулярная химия, **39Б**, № 4, 751–754.
8. Валуев И.Л., Валуев Л.И., Попович С.Н., Талызенков Ю.А., Сытов Г.А., Чупов В.В., Платэ Н.А., Жозефович Ж. (1997) Доклады РАН, **357**, № 5, 634–636.
9. Валуев И.Л., Валуев Л.И., Платэ Н.А. (1998) Доклады РАН, **358**, № 1, 57–60.
10. Валуев Л.И., Валуева Т.А. (1998) в: сб. «Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии». С.-Петербург. Р. 58.
11. Валуев И.Л., Обыденнова И.В., Шаназарова И.М., Розенфельд М.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А. (2000) Доклады РАН, **372**, № 2, 189–191.
12. Валуев И.Л., Антипов А.А., Обыденнова И.В., Шаназарова И.М., Розенфельд М.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А. (2000) Высокомолекулярная химия, **42**, № 8, 1419–1423.
13. Валуев Л.И., Валуев И.Л., Сытов Г.А., Валуева Т.А., Ульянова М.В., Платэ Н.А. (2001) Вопросы мед. химии, **47**, № 1, 132–139.
14. Васильев А.Е., Давыдов А.Б. (1985) ЖВХО им. Д.И.Менделеева, **30**, № 4, 395–402.
15. Давыдов А.Б., Хромов Г.Л., Майчук Ю.Ф., Старунова Л.Н., Кондратьев Т.С. (1974) Хим.-фарм. журнал, № 6, 24–29.
16. Королев Ю.М., Веретяхина Т.Г., Чупов В.В., Валуев Л.И., Платэ Н.А. (1995) Высокомолекулярная химия, **37А**, № 7, 1160–1165.
17. Лебедева Т.Л., Мальчугова О.И., Валуев Л.И., Платэ Н.А. (1992) Высокомолекулярная химия, **34А**, № 9, 113–122.

18. *Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В.* (1993) Биохимия человека. М.: Мир. 247 с.
19. *Платэ Н.А., Матросович М.Н.* (1976) Доклады АН СССР, **229**, № 1, 496–499.
20. *Платэ Н.А., Валув Л.И., Чупов В.В.* (1980) Высокомолекулярное соединение, **22А**, № 9, 1963–1972.
21. *Платэ Н.А., Валув Л.И., Гумирова Ф.Х., Лыс Я.И., Федосеев В.М.* (1982) Высокомолекулярное соединение, **24Б**, № 6, 470–473.
22. *Платэ Н.А., Валув Л.И., Старосельцева Л.К., Валуева Т.А., Ванчурова Л.В., Ульянова М.В., Валув И.Л., Сытов Г.А., Аметов А.С., Княжжев В.А.* (1994) Высокомолекулярное соединение, **36**, № 11, 1876–1879.
23. *Платэ Н.А., Валув Л.И., Княжжев В.А.* (2001) Вестник РАН, **71**, № 10, 899–914.
24. *Севастьянов В.И., Волков А.В., Родин О.И., Валув Л.И., Платэ Н.А.* (1981) Доклады АН СССР, **260**, № 2, 383–386.
25. *Тагер А.А.* (1978) Физико-химия полимеров. Москва. Химия. 544 с.
26. *Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Мазаев А.В., Торчилин В.П.* (1985) ЖВХО им. Д.И.Менделеева, **30**, № 4, 365–371.
27. *Bae Y.H., Kim S.W., Valuev L.I.* (1993) United States Patent. № 5226902.
28. *Bronsted H., Kopecek J.* (1990) in: Polyelectrolyte Gels. Properties, Preparation and Application. Eds. Harland R.S., Prudhomme R.K. Amer. Chem. Soc. Washington DC. 285 pp.
29. *Brownlee M., Cerami A.* (1979) Science, **206**, 1190–1191.
30. *Brownlee M., Cerami A.* (1983) Diabetes, **32**, № 3, 499–503.
31. *Bruck S.D.* (1973) Biomat. Med. Dev. Art. Org., **1**, № 1, 191–222.
32. *Bruck S.D.* (1977) J. Biomed. Mater. Res., **11**, № 1, 1–21.
33. *Davies B.K.* (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, № 14, 3120–3122.
34. *Hoffman A.S., Affrassiaci A., Dong L.C.* (1986) J. Contr. Release, **4**, № 2, P. 213–219.
35. *Ishihara K., Kobuayashi M., Ishimaru M.* (1984) Polym. J., **16**, № 3, 625–696.
36. *Jeong S.Y., Kim S.W., Eenink M.J.D., Feijen J.* (1984) J. Contr. Release, **1**, № 1, 57–66.
37. *Jeong S.Y., Kim S.W., Holmberg D.L., McRea J.C.* (1985) J. Contr. Release, **2**, № 1, P. 143–159.
38. *Jorgensen K.A., Stoffersen E.* (1980) Thromb. Res., **17**, № 1, 13–28.
39. *Kim S.W., Pai C.M., Makino K., Semionoff L.A., Holmberg D.L., Gleeson J.M., Wilson D.E., Mack E.J.* (1990) J. Cont. Release, **11**, № 1, 193–201.
40. *Kim J.J., Park K.* (2001) J. Contr. Release, **77**, № 1–2, 39–47.
41. *Kitano S., Kataoka K., Koyama Y., Okano T., Sakurai Y.* (1992) Makromol. Chem. Rapid Commun., **12**, № 2, 227–231.
42. *Kopecek J., Kopeckova P., Bronsted H., Rathi R., Rihova B., Yeh P.-Y., Ikesue K.* (1992) J. Contr. Release, **19**, № 1–3, 121–130.
43. *Kost J., Langer R.* (1987) in: Hydrogels in Medicine and Pharmacy. / Ed. Peppas N.A. CRC Press Inc. Boca Raton. **3**. 95–108.
44. *Makino K., Mack E.J., Okano T., Kim S.W.* (1990) J. Cont. Release, **12**, № 2, 235–239.
45. *Miyata T., Uragami T., Nakamae K.* (2002) Adv. Drug Deliv. Rev., **54**, № 1, 79–98.
46. *Mosbach K., Schroder U.* (1979) FEBS Lett., **102**, 112–115.
47. *Plate N.A., Valuev L.I.* (1982) Thromb. Res., **27**, № 1, 131–141.
48. *Plate N.A., Valuev L.I.* (1983) Biomaterials, **4**, № 1, 14–20.
49. *Plate N.A., Valuev L.I.* (1986) Adv. Pol. Sci., **79**, 95–137.
50. *Plate N.A., Valuev L.I., Valuev I.L.* (1997) J. Journals, **1**, 37–40.
51. *Ringsdorf H.* (1975) J. Polym. Sci. Polym. Symp., **51**, № 1, 135–153.

52. Ringsdorf H., Simon J., Winnik F.M. (1992) *Macromolekules*, **25**, 7306–7311.
53. Sato S., Jeong S.Y., McRea J.C., Kim S.W. (1984) *J. Contr. Release*, **1**, № 1, 67–77.
54. Shiino I., Murata Y., Kataoka K., Koyama Y., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y. (1994) *Biomaterials*, **15**, № 2, 121–128.
55. Shouei K., Kubota K., Ando I. (1989) *J. Physical Chem.*, **93**, № 17, 3311–3314.
56. Siegel R.A. (1990) in: *Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery*. / Ed. Kost J. CRC Press. Boca Raton. 130–138.
57. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kumbar S.G., Rudzinski W.E. (2002) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **28**, № 8, 957–974.
58. Tanna S., Tailor M.J., Adams G. (1999) *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, № 10, 1093–1098.
59. Traitel T., Cohen Y., Kost J. (2002) *Biomaterials*, **21**, № 16, 1679–1687.
60. Valuev L.I., Zefirova O.N., Obydenova I.V., Plate N.A. (1994) *J. Bioact. and Biocomp. Polym.*, **9**, № 1, 55–65.
61. Valuev L.I., Chupov V.V., Zefirova O.N., Lebedeva T.L., Plate N.A. (1995) *Pure and Appl. Chem.*, **67**, № 6, 963–968.
62. Wichterle O., Lim D. (1960) *Nature*, **185**, № 1, 117–119.
63. Zentner G.M., Cardinal J.R., Kim S.W. (1978) *J. Pharm. Sci.*, **67**, № 11, 1347–1351.