



Структура нанолекарств на основе соевых фосфолипидов по данным МУРН

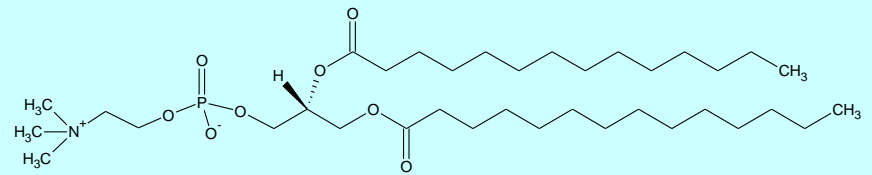
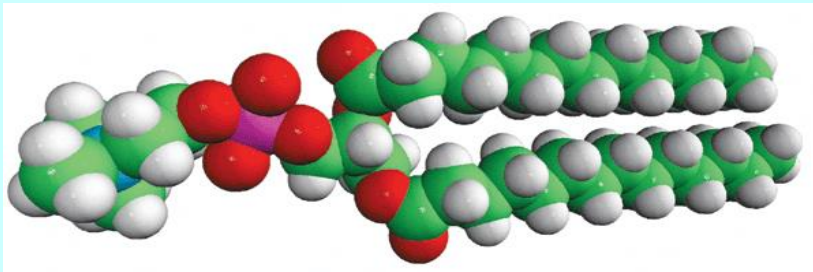
М.А. Киселев

*Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка, Объединенный
институт ядерных исследований, Дубна*

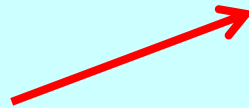
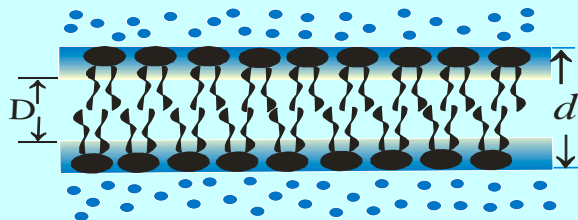
IV совещание по малоугловому рассеянию нейтронов «МУРомец 2016»

Образование липидного бислоя в воде.

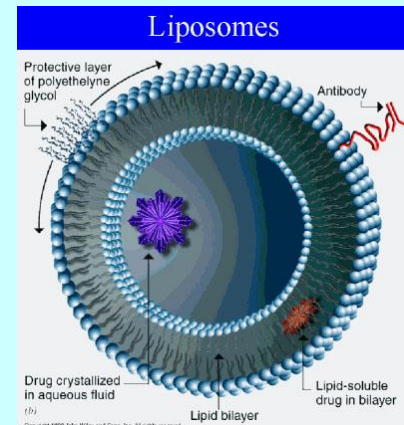
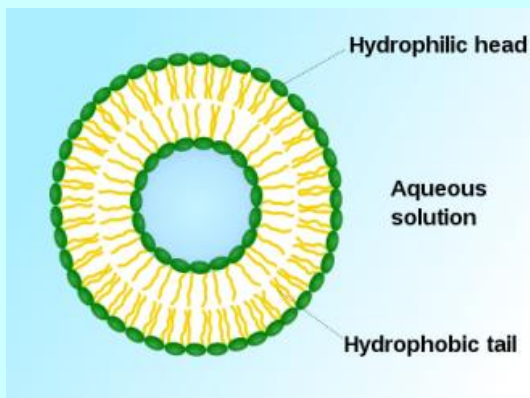
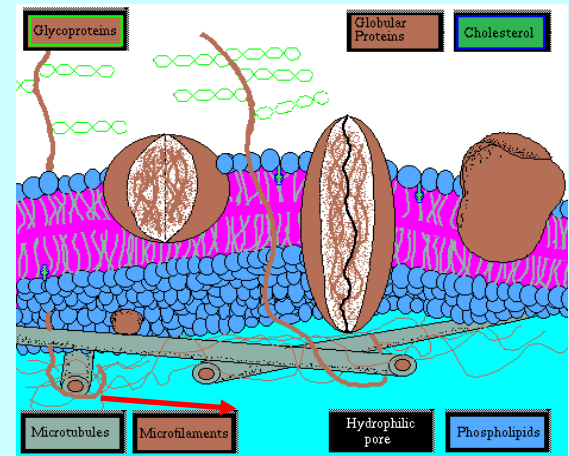
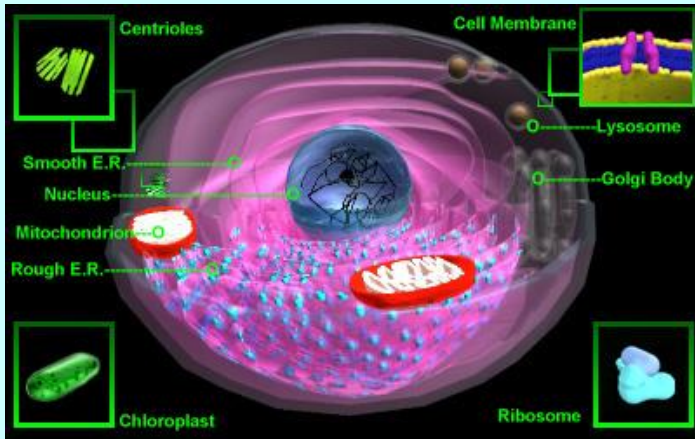
Фосфолипид димиристоилфосфатидилхол (ДМФХ)



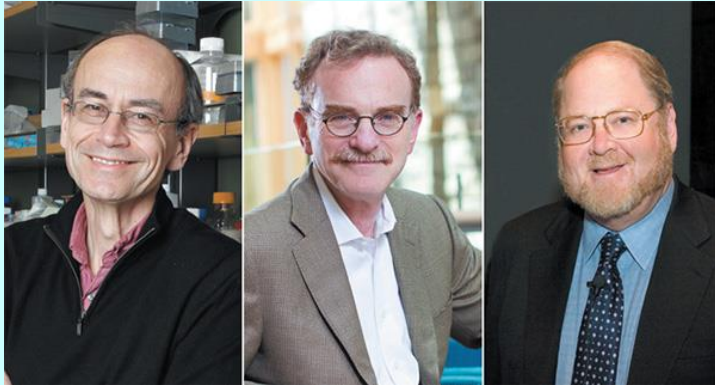
Жидкокристаллическая $L\alpha$ фаза



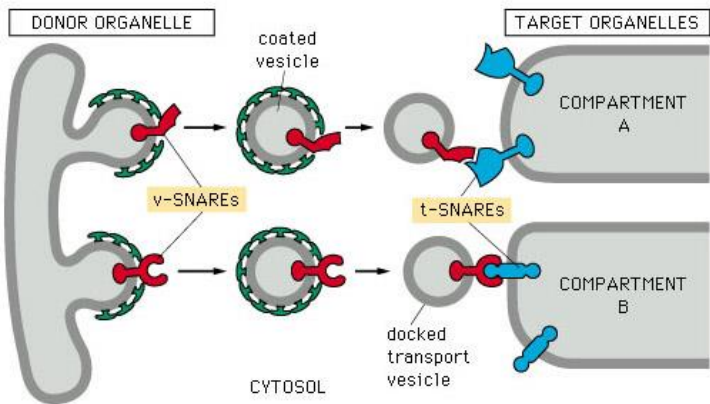
Фосфолипиды – основная компонента биологической мембраны, а также везикул, осуществляющих внутриклеточный и межклеточный транспорт, и везикул, используемых для транспорта лекарств.



Нобелевская премия 2013 года по физиологии и медицине



Лауреаты Нобелевской премии по физиологии и медицине 2013 года (Томас Зюдхоф, Рэнди Шекман, Джеймс Ротман). За раскрытие механизмов везикулярного транспорта — главной транспортной системы в наших клетках. Разнообразные молекулы, упакованные в пузырьки-**везикулы**, постоянно пересылаются из одного отдела клетки в другой, а также секретируются наружу. Точная доставка возможна благодаря комплексу белков, которые выступают как в качестве «адреса», так и в качестве «почтового отделения» в каждом клеточном отделе.

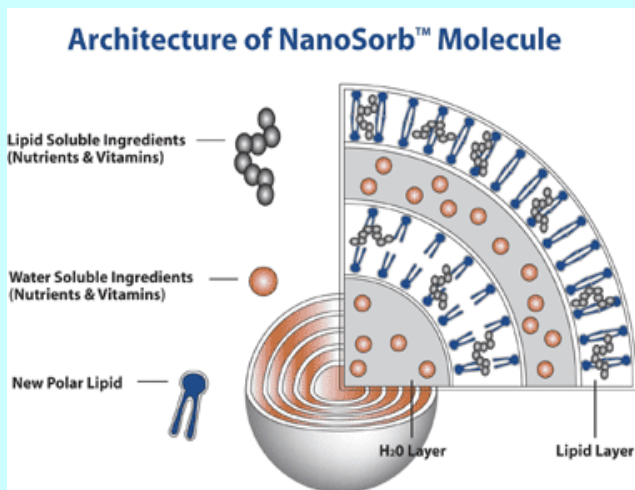


©1998 GARLAND PUBLISHING

Практическое применение

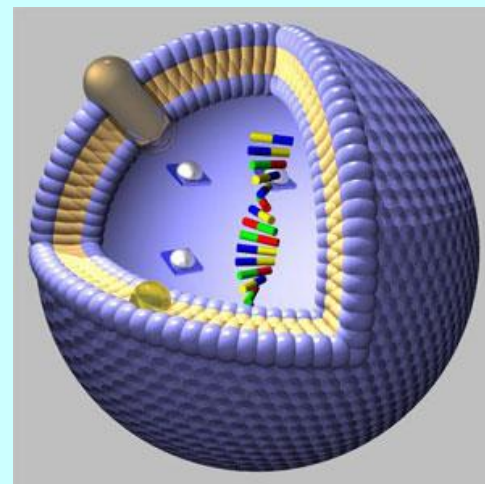
80% биотехнологических продуктов – переносчики лекарств. Оборот - 6 миллиардов USD/год.

Многослойные везикулы
Дифракция



Пищевые добавки.
Многослойная фосфолипидная везикула со встроенными водорастворимыми и водонерастворимыми лекарствами.

Однослойные везикулы
Малоугловое рассеяние

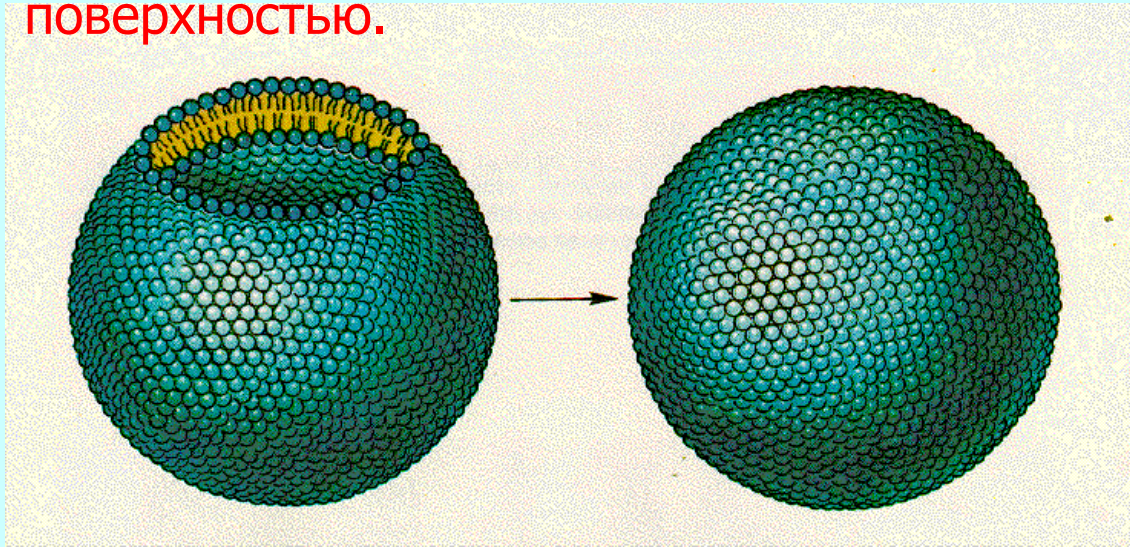


Наноллекарства. Фосфолипидная однослойная везикула со встроенными водорастворимыми и водонерастворимыми лекарствами.

Однослойная везикула из фосфолипидных (ДМФХ) молекул

С точки зрения физики-наносфера с жидкокристаллической поверхностью.

$R=250\text{\AA}$
 $n \approx 2 \cdot 10^{14}$ везикул / cm^3 for 1% ДМФХ (w/w)
13000 ДМФХ молекул в липидном бислое.

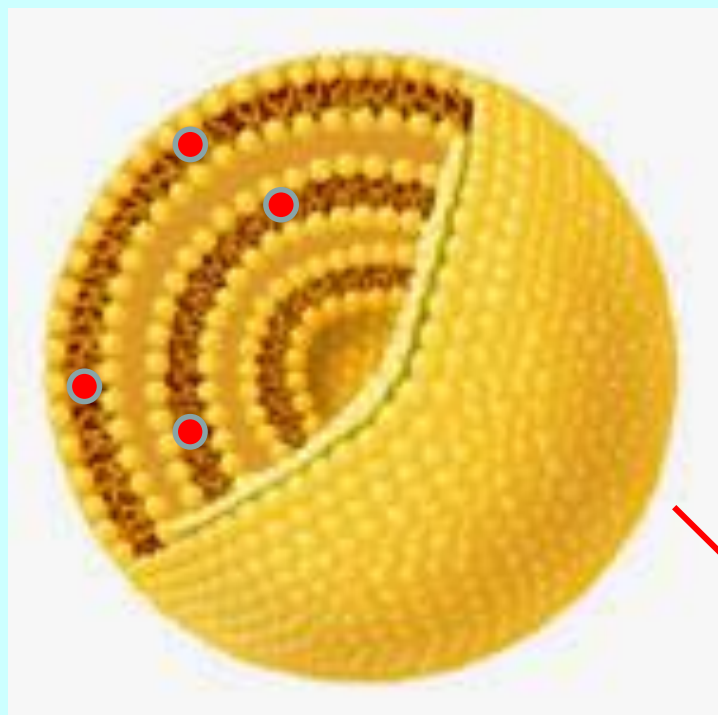


Малоугловое рассеяние нейтронов в D_2O

Рентгеновское малоугловое рассеяние в водных растворах дисахаридов (сахароза)

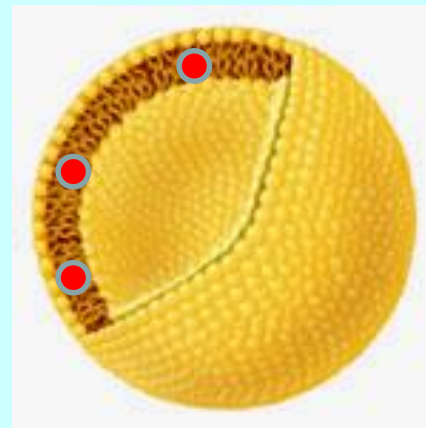
M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.M. Kisselev, D. Lombardo, M. Killany, S. Lesieur.
Sucrose solutions as prospective medium to study the vesicle structure:
SAXS and SANS study. J. Alloys and Compounds 328 (2001) 71-76.

Приготовление нанолекарств из многослойных везикул для случая водонерастворимых лекарств

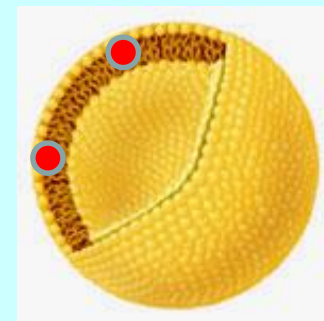


Микронная наночастица
100-1000 слоев

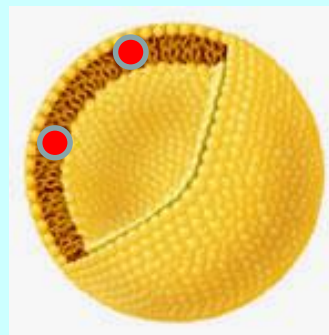
Экструзия, 100-50 нм



Ультразвук, до 30 нм

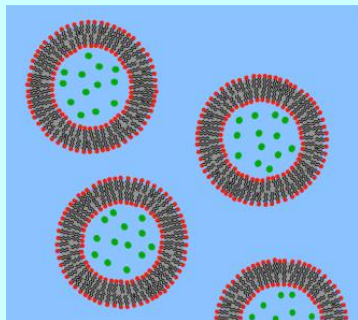


Гомогенизация,
при давлении
1000 атм. 10 нм.



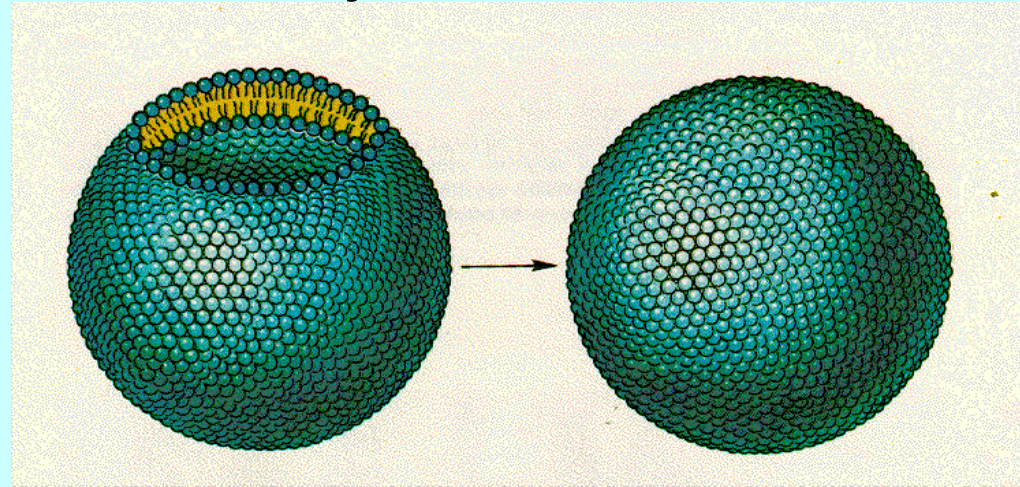
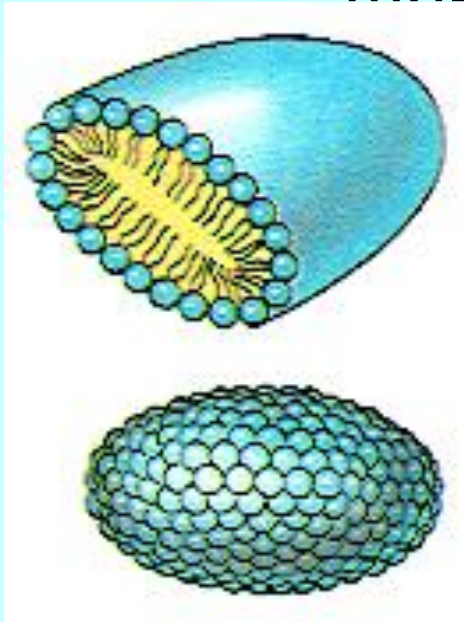


Встраивание лекарств в фосфолипидную транспортную наносистему



Composition	drug incorporation, %	Size, nm	pharmacological action
Phospholipid transport nanosystem (PTNS)		19±2	Acute toxic exposure, Precoma
Arbidol + PTNS	98	17±2	Antiviral action
Doxorubicin+PTNS	96	21±3	Antineoplastic action
Chlorin E6 + PTNS	90	22±5	Photodynamic therapy and diagnostics
Budesonite + PTNS	99	35±5	Anti-inflammatory action
Indometacin+ PTNS	98	35±3	Nonsteroidal, anti-inflammatory drug
Lipoic acid + PTNS	99		Anti-oxidant action

Какова морфология наночастиц после гомогенизации? Мицеллы или везикулы?

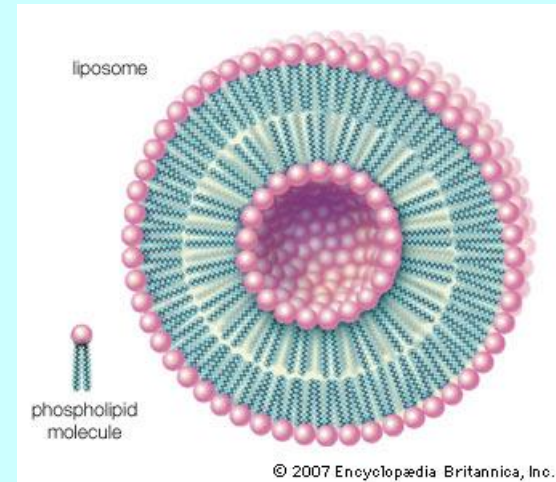


Наноллекарства изготавливаются в водном растворе мальтозы

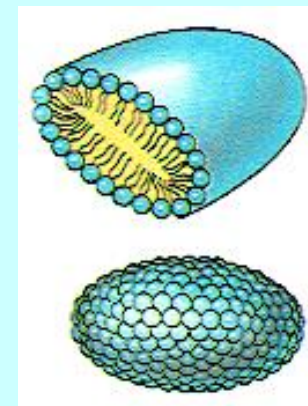
Лиофилизация

Наноллекарства хранятся в мальтозной матрице длительное время

Наноллекарства разрабатываемые в Институте биомедицинской химии



???



Что лучше SAXS или SANS для характеристики наноллекарств?

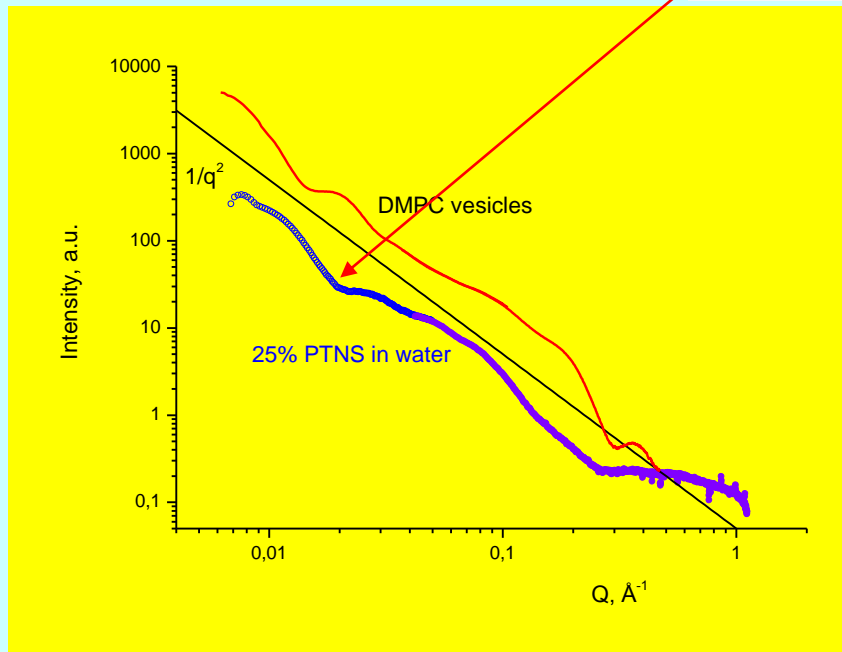
Лекарства перед применением растворяют в H_2O , а не в D_2O

Свойства дисахаридов:

- **Везикулы хранятся в дисахаридах не деградируя химически и физически**
- **Полидисерсность везикул уменьшается в водных растворах сахарозы**
- **Так же уменьшается агрегация однослойных везикул в многослойные**



Phospholipid transport nanosystems (FTNS) based on the soybean phosphatidylcholine is a vesicular system with an average vesicle radius of $160 \pm 2 \text{ \AA}$.

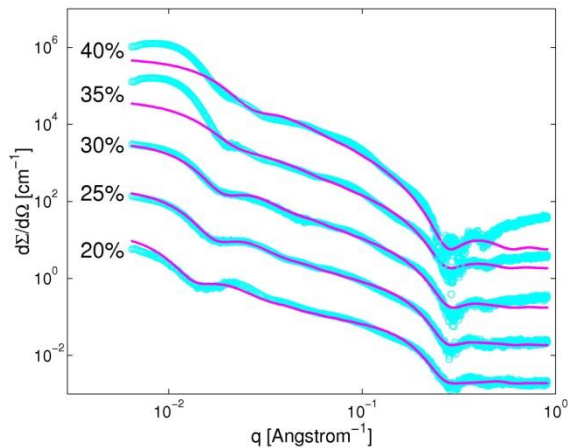


SAXS patterns. DMPC vesicles in 40% sucrose buffer – red line (the A2 station of the synchrotron DORIS at DESY, Hamburg, Germany). 25% solution of FTNS in water – blue line (DICS1 station of the Kurchatov Synchrotron Radiation Source, Moscow). Black line - $1/q^2$ law.

M.A. Kiselev, E.V. Zemlyanaya, O.M. Ipatova, A.Yu. Gruzinov, E.V. Ermakova, A.V. Zabelin, E.I. Zhabitskaya, O.S. Druzhilovskaya, V.L. Aksenov. Application of small-angle X-ray scattering to the characterization and quantification of the drug transport nanosystem based on the soybean phosphatidylcholine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 114 (2015) 288-291.

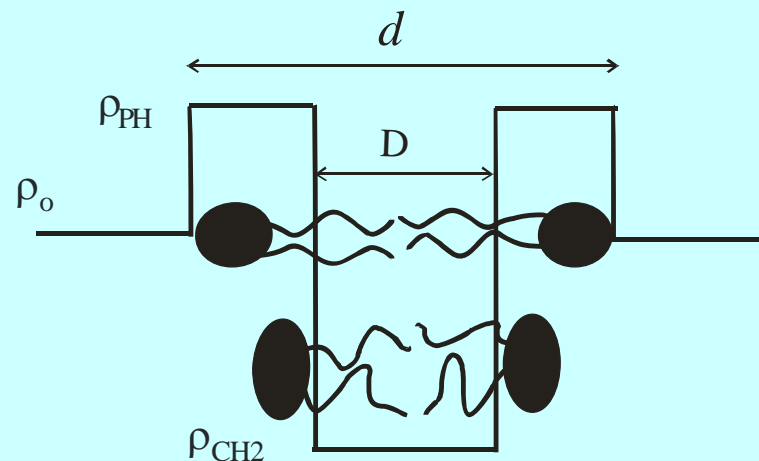
Dependence of the PTNS parameters on their concentration in water. Contrast variation.

For all sample maltose / phospholipid ratio (w/w) is permanent 4/1/



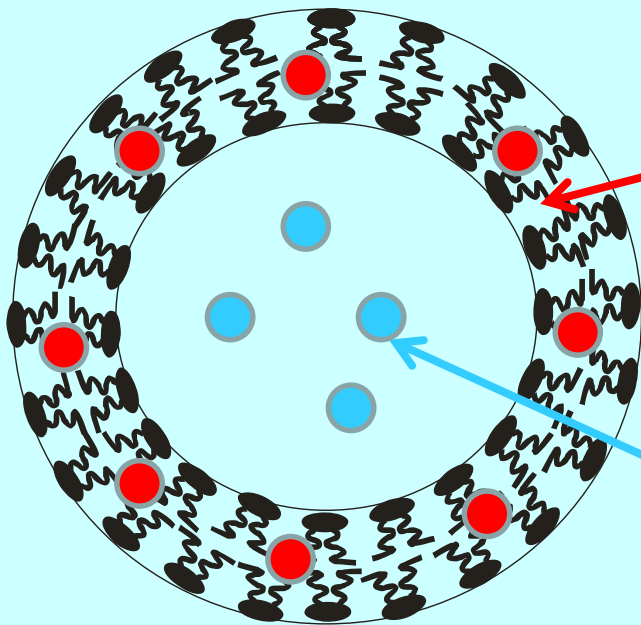
We can describe well the SAXS curves for 20%, 25%, and 30% maltose concentration

FTNS Maltose Lipids	25% 20 5%	31,25% 25% 6,25	37% 30% 7,5%
R, Å	205±2	161±1	148±2
σ, %	22,9±0,4	22,4±0,4	22,3±0,3
d, Å	53±1	50±1	47±1
D, Å	19,4±0,4	20,5±0,2	20,5±0,2
PH, Å	16,8±1,1	14,8±1,0	13,3±1,0
χ ²	0,6	0,4	1,2



Purified soybean phospholipids has a name
Essential Phospholipids (EPL) – Essentiale.

What our research give to pharmacy?



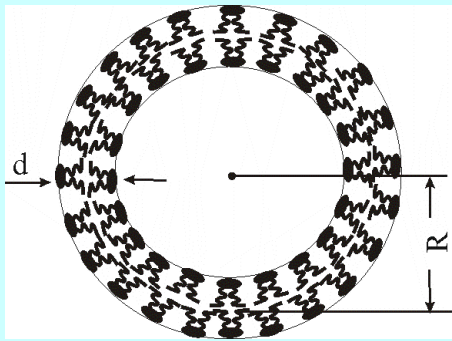
Volume of the hydrophobic region of the lipid bilayer to the location of the lipophilic (water unsoluble) drugs is about $10,24 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$

Pharmaceutical concentration is 25% PTNS in water

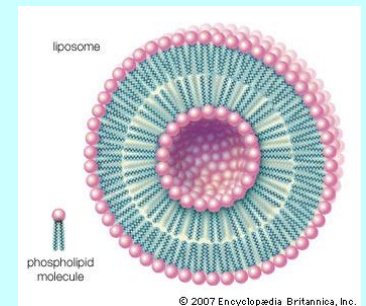
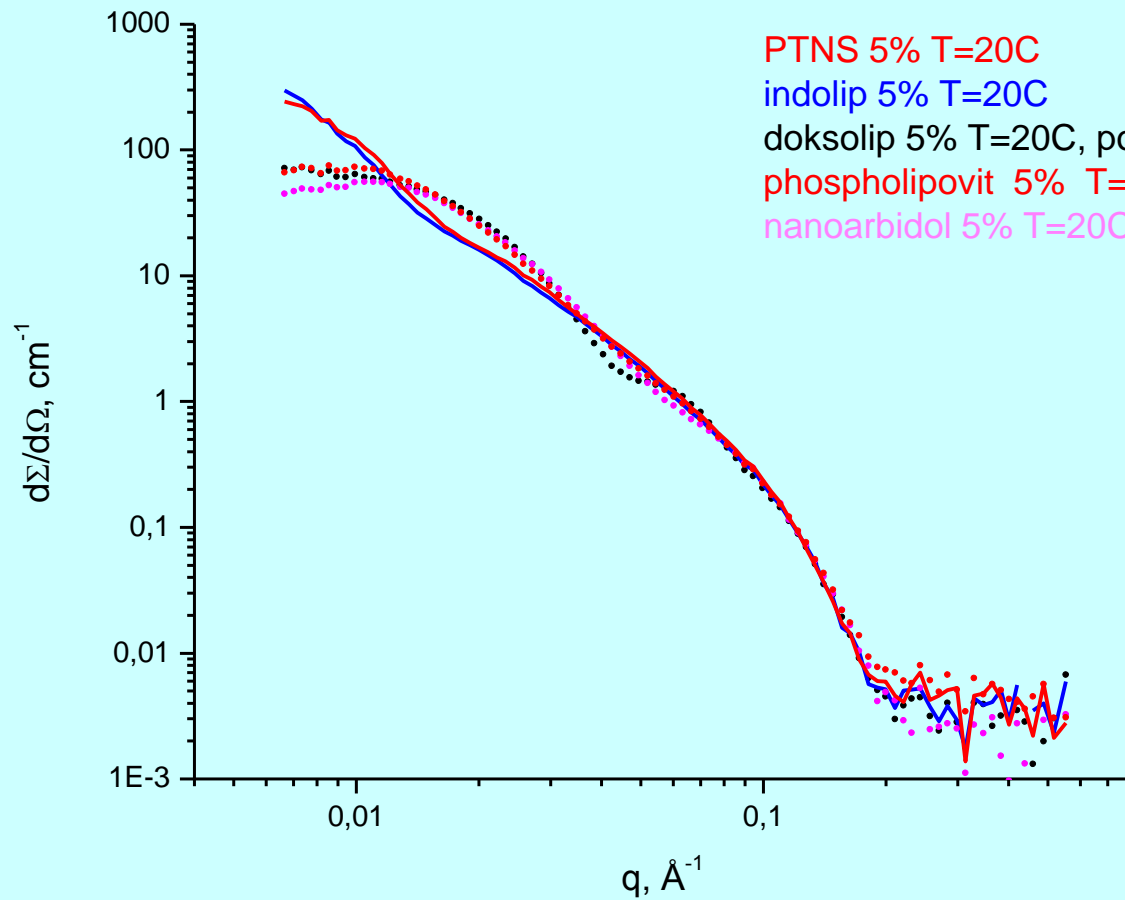
Internal volume of vesicle for the location of water soluble drugs is about $23,81 \cdot 10^6 \text{ \AA}^3$

This two important numbers cannot be obtained by other technique

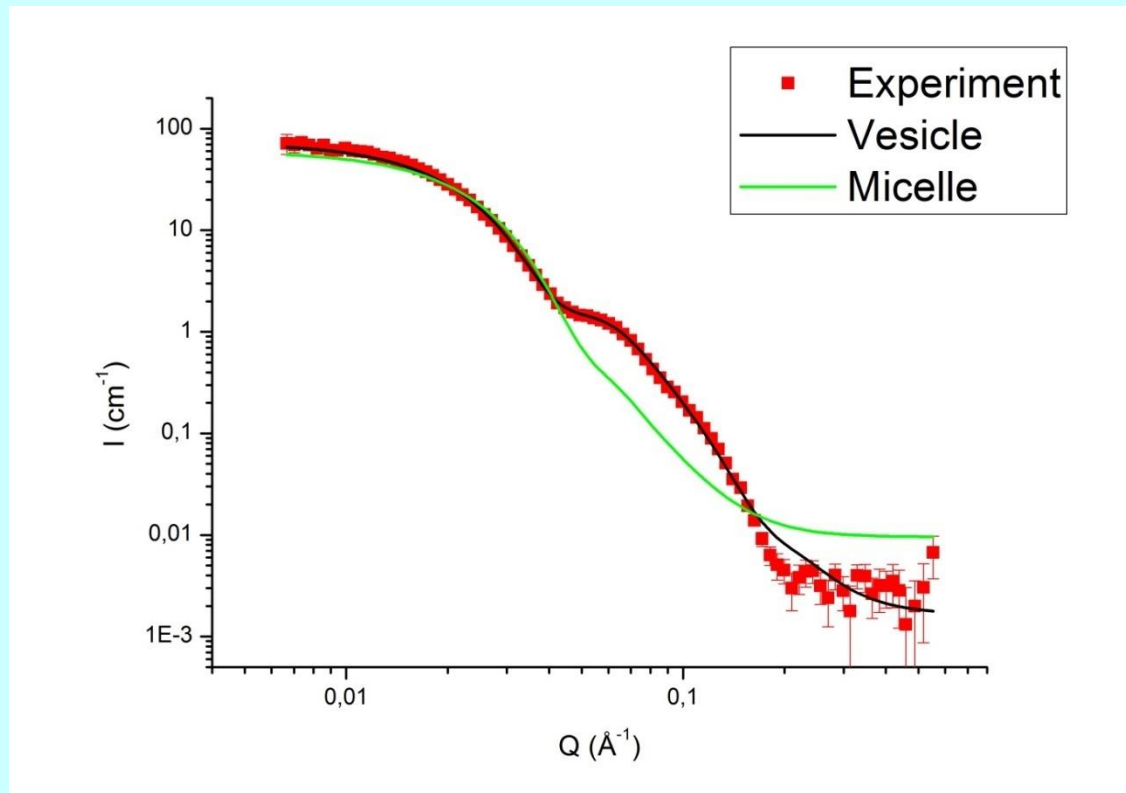
Hydrophilic and lipophilic volumes for drug location are compatible



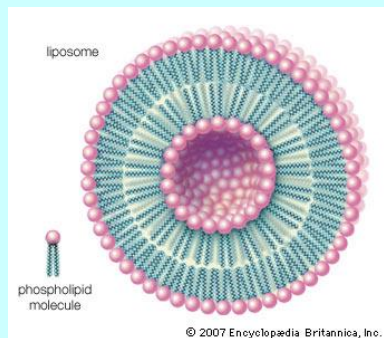
SANS



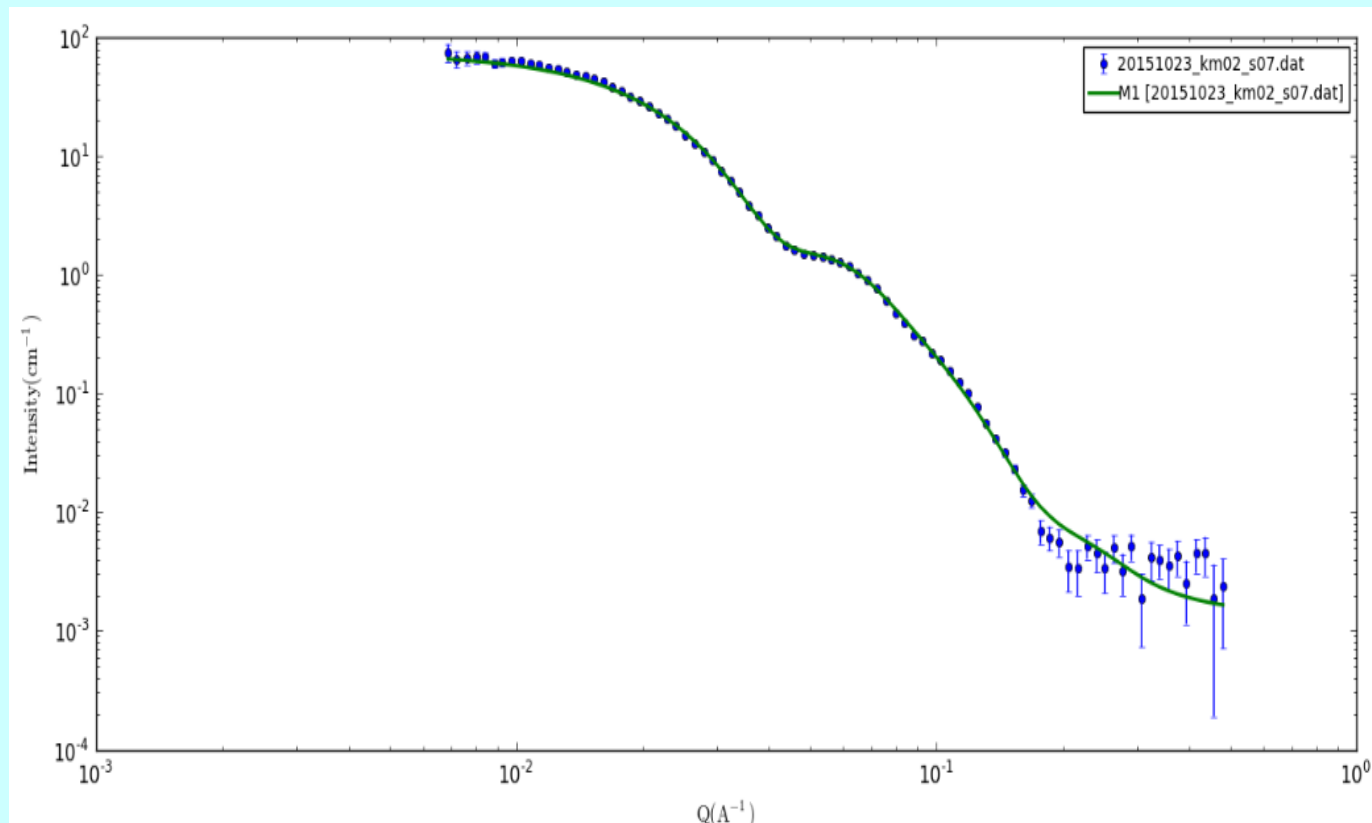
МУРН. Доксолип. Мицеллы или везикулы?



Доксолип 5%, $t=20^{\circ}\text{C}$, МУРН



Температурная
зависимость не
существенна



$T=20^{\circ}\text{C}$: $R=46.7\pm 0.2\text{\AA}$, $d=31.8\pm 0.4\text{\AA}$, $\sigma_R=32.4\pm 0.2\%$, $\sigma_d=26\pm 1\%$

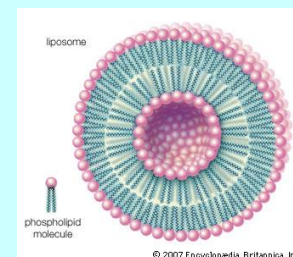
$T=37^{\circ}\text{C}$: $R=48.3\pm 0.2\text{\AA}$, $d=31.8\pm 0.5\text{\AA}$, $\sigma_R=33.2\pm 0.3\%$, $\sigma_d=24\pm 1\%$

Концентрационная зависимость до 25% морфологически не существенна.

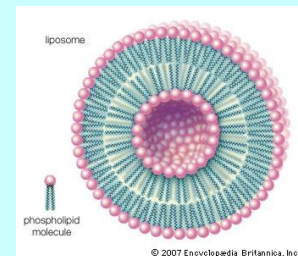
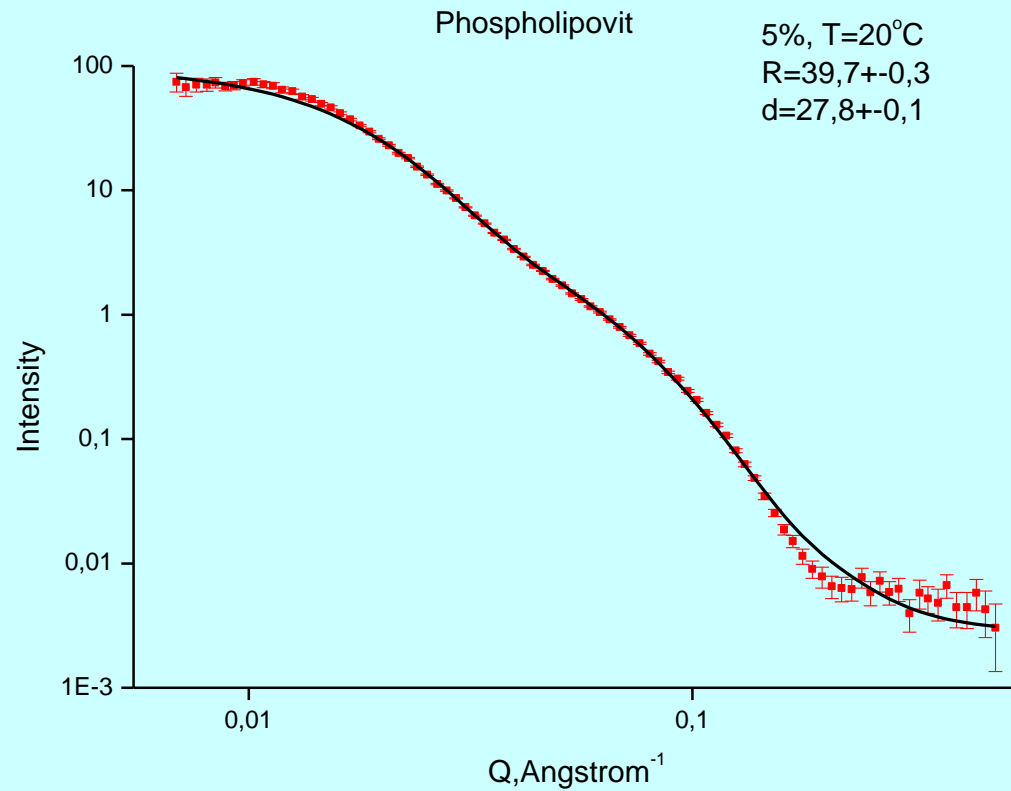
(На примере доксолипа при 20°C)

Концентрация лекарства, %	Радиус R, Å	Толщина бислоя d, Å	Полидисперсность размера σ_R , %	Полидисперсность толщины бислоя σ_d , %
5	46.7±0.2	31.8±0.4	32.4±0.2	26±1
10	49.0±0.1	32.7±0.7	30.9±0.2	22±1
25	52.0±0.1	33.1±0.2	26.8±0.1	24±1

Везикулы имеют критический размер.
Радиус везикулы соизмерим с толщиной липидного бислоя

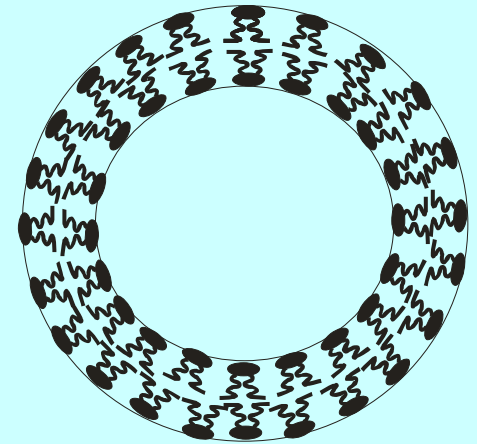


Фосфолиповит также является критической везикулой МУРН

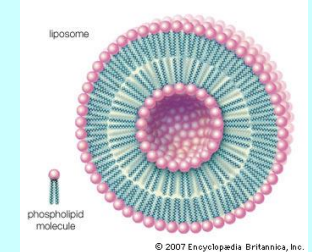


Выводы

Фосфолипидная транспортная система и индолип являются малыми везикулами с радиусом в интервале от 150\AA до 200\AA и толщиной бислоя около 50\AA .



Доксолип, фосфолиповит и наноарбидол являются везикулами, но с радиусом $40\text{-}60\text{\AA}$ и толщиной липидного бислоя $30\text{-}40\text{\AA}$. Такие наночастицы следует назвать критически малыми везикулами. В них радиус внутреннего объема воды приблизительно равен $10\text{-}20\text{\AA}$ и они не подходят для размещения водорастворимых лекарств.



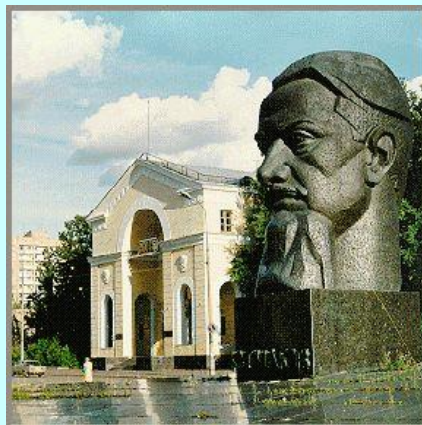
Чем меньше радиус везикулы, тем выше терапевтический эффект.

Методические выводы

- Комбинацией SANS и SAXS можно исследовать широкий диапазон концентраций наноллекарств, включающий и диапазон фармацевтических применений (25%)
- SANS – область малых концентраций (5% - 25%)
- SAXS – область высоких концентраций (25% - 40%)
- Область концентраций около 25% морфологически устойчива.

Работа выполняется при финансировании грантом
РНФ № 14-12-00516.

Проект реализуется в коллаборации: ОИЯИ,
Курчатовский институт, Институт биомедицинской
химии.



Спасибо за внимание.