

Содержание

Введение	
<i>Мельников М.Я., Трахтенберг Л.И.</i>	8
Список аббревиатур с расшифровкой	17
Глава 1	
Криохимический синтез нанопорошков лекарственных веществ.	
<i>Шабатин В.П., Морозов Ю.Н., Верная О.И., Шабатина Т.И.</i>	20
1.1. Карведилол	25
1.2. 5-Андростендиол-3 β ,17 β	28
1.3. Феназепам	29
1.4. Пироксикам	34
1.5. Дегидроэпиандростерон (ДГЕА).....	35
1.6. Диоксидин.....	39
1.7. Гентамицина сульфат	46
Заключение	48
Авторы	49
Литература.....	50
Глава 2	
Наноконпозиты антибиотик-биологически активный металл.	
<i>Верная О.И., Шабатина Т.И., Шабатин В.П., Семенов А.М., Мельников М.Я.</i>	54
2.1. Криохимический синтез гибридных наноконпозитов Ag (Cu)/диоксидин и Ag (Cu)/гентамицина сульфат	56
2.2. Структурная и спектроскопическая характеристика образцов.	57
2.3. Определение антибактериальной активности образцов	63
Заключение	64
Авторы	65
Литература.....	66

Глава 3**Принципы и методы криоструктурирования полимерных систем для создания инновационных материалов биомедицинского назначения.**

<i>Лозинский В.И.</i>	69
3.1. Криогели и криоструктураты — что это такое, в чем сходство и каковы различия.....	70
3.2. Химически-сшитые полимерные криогели и криоструктураты	73
3.3. Нековалентные (физические) полимерные криогели и криоструктураты	81
3.4. Ионно- и координационно-сшитые полимерные криогели и криоструктураты	87
Заключение	91
Авторы	92
Литература.....	92

Глава 4**Экспериментальные подходы к получению белковых криогелей и криоструктуратов.**

<i>Родионов И.А., Синицкая Е.С., Иванов Р.В., Цискарашвили А.В., Лозинский В.И.</i>	102
4.1. Криогели и криоструктураты на основе фибриллярных белков	105
4.2. Криогели и криоструктураты на основе глобулярных белков ..	112
4.3. Криогели и криоструктураты на основе белков с неупорядоченной конформацией статистического клубка.....	120
Заключение	127
Авторы	128
Литература.....	129

Глава 5**Гибридные наноформы антибактериальных веществ в биополимерных матрицах.**

<i>Шабатина Т.И., Верная О.И., Нурждина А.В., Шабатин В.П., Семенов А.М., Лозинский В.И., Мельников М.Я.</i>	137
5.1. Синтез гибридных наноформ	143
5.2. Структурная и спектральная характеристика криоформируемых гибридных наносистем.....	145
5.3. Антибактериальная активность гибридных наноформ и кинетика высвобождения лекарственных компонентов из биополимерных матриц	151

Заключение	155
Авторы	156
Литература.....	157

Глава 6

Биокатализаторы в криоструктурированных полимерных матрицах.

<i>Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Лозинский В.И.</i>	161
6.1. Полимерные криогели и криоструктураты в качестве носителей иммобилизованных молекул и клеток	163
6.2. Иммобилизация ферментных биокатализаторов на криогенно-структурированных носителях.....	173
6.3. Биокатализаторы на основе разных клеток микроорганизмов, включенных в криогенно-структурированные носители: бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы, искусственные и природные ассоциации разных клеток (анаэробный ил)	183
Заключение	197
Авторы	198
Литература.....	199

Глава 7

Низкотемпературные методы получения нано- и биоматериалов.

<i>Шляхтин О.А., Лозинский В.И.</i>	212
7.1. Синтез наноматериалов из замороженных растворов	213
7.2. Криотропное гелеобразование в золях неорганических веществ	217
7.3. Сублимационная сушка продуктов гидролиза, осаждения и со-осаждения	218
7.4. Низкотемпературные методы изоляции наночастиц	224
7.5. Низкотемпературные методы в синтезе углеродных наноматериалов	227
Заключение	231
Авторы	233
Литература.....	233

Глава 8**Наночастицы серебра: синтез, биологическое действие на бактерии и высшие растения.**

<i>Кудринский А.А., Кондаков С.Э., Крутяков Ю.А.</i>	246
8.1. Химический синтез сферических НЧ серебра.....	247
8.2. Физические методы синтеза сферических наночастиц серебра	257
8.3. Методы синтеза несферических наночастиц серебра	260
8.4. Антибактериальная активность наночастиц серебра	264
8.5. Биологическая активность серебра в отношении высших растений	268
Заключение	286
Авторы	287
Литература.....	287

Глава 9**Наноразмерные системы для контролируемой доставки лекарственных веществ.**

<i>Бычкова А.В., Ольхов А.А., Карпова С.Г., Иорданский А.Л.</i>	304
9.1. Области применения биоразлагаемых форм доставки соединений терапевтического назначения	306
9.2. Основные компоненты биоразлагаемых инновационных форм доставки ЛВ	312
9.3. Структура и морфология ультратонких волокон как носителей ЛВ	317
Заключение	334
Благодарности	335
Авторы	335
Литература.....	336

Глава 10**Металл-полимерные нанокомпозиты: криохимический синтез, структура и эксплуатационные свойства.**

<i>Герасимов Г.Н., Громов В.Ф., Иким М.И., Трахтенберг Л.И.</i>	342
10.1. Методы твердофазного криохимического синтеза	344
10.2. Структура металл-полимеров, полученных криохимическим методом	347
10.3. Физико-химические свойства металл-полимерных материалов.	358
Проводимость и фотопроводимость	359
Ферромагнитные свойства. Запись и считывание информации	364

Диэлектрические свойства	366
Каталитическая активность	368
10.4. Применение металл-полимеров в биологии и медицине	372
Заключение	376
Авторы	378
Литература.....	378

Глава 11

Магнитные наночастицы в медицине.

<i>Верная О.И., Шабатин В.П., Шабатина Т.И., Мельников М.Я.....</i>	385
11.1. Токсичность наночастиц магнетита и маггемита.....	387
11.2. Синтез магнитных наночастиц оксидов железа	389
11.3. Биомедицинское применение магнитных оксидов железа	392
Заключение	403
Авторы	403
Литература.....	404

*Съешь осиновой коры —
И взбодришься до поры:
Чай, не химия какая,
Чай, природные дары!*

Л.А. Филатов. Про Федота-стрельца...

Введение

Мельников М.Я.¹, Трахтенберг Л.И.^{1,2}

В связи с весьма сложной экологической обстановкой, стрессовыми ситуациями, непростыми производственными отношениями и др. даже относительно молодым людям приходится все чаще обращаться за медицинской помощью. Помимо обычных советов: не курить, воздерживаться от спиртного, делать утреннюю зарядку, несколько раз в неделю посещать бассейн и тренировочный зал, а также есть овощи и фрукты, пациентам, как правило, прописывают различные биоактивные и лекарственные препараты. Как известно, количество таких веществ в настоящее время исчисляется многими тысячами. Существует множество способов приготовления и применения этих препаратов и над этими задачами работают научные лаборатории во всех развитых странах. Вместе с тем возникают новые вызовы, например появление большого числа штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам. При этом скорость появления таких штаммов опережает возможности синтетической химии в создании новых лекарственных субстанций и требует поиска новых подходов к борьбе с ними, в частности разработки нанокомпозитных составов с новыми функциональными свойствами.

В предлагаемом учебном пособии основным объектом изучения будут наночастицы — ультрадисперсные объекты, объединяющие атомы химических элементов или молекулы органических и неорганических соединений с размерами в несколько нанометров (нм; 1 нм = 10^{-9} метров). Наночастицы существуют в природе и также являются результатом деятельности человека. Из-за своего субмикроскопического размера они обладают уникальными характеристиками, в первую очередь, огромной площадью поверхности на единицу объема, высокой долей атомов в поверхностных и приповерхностных слоях и способностью проявлять квантовые эффекты. Их уникальные свойства невозможно прогнозировать только исходя

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

из свойств массивных материалов. Они находят практическое применение в различных областях, включая медицину, инженерию, катализ и экологию.

В 2008 году Международная организация по стандартизации (ISO) определила наночастицу как дискретный нанобъект, где все три декартовых измерения меньше 100 нм. Стандарт ISO аналогичным образом определил двумерные нанобъекты (нанодиски и нанопластины) и одномерные нанобъекты (нановолокна и нанотрубки). Но в 2011 году Комиссия Европейского Союза одобрила более широкое определение наночастицы: природный или рукотворный материал, содержащий частицы в несвязанном состоянии или в виде агломерата, размер 50 и более % которых хотя бы в одном из декартовых измерений находится в диапазоне 1 нм–100 нм [1].

Вопросы, которые рассматриваются в данном пособии, касаются научных проблем, связанных с разнообразными методами создания нанокompозитных лекарственных форм, а также их функциональными свойствами. Рассматриваются разные объекты с различной химией протекающих процессов. Основное внимание уделено различным аспектам криохимического синтеза, обладающего такими преимуществами, как чистота получаемых материалов, их строгое соответствие составам исходных веществ, возможность регулирования размеров наночастиц, а также однородность распределения компонентов в конечном продукте. Вместе с тем следует признать, что в настоящее время сведения о промышленном изготовлении наноформ биоактивных и лекарственных веществ криохимическим методом весьма ограничены. Поэтому обсуждаются различные процессы получения этих веществ также и в широком диапазоне температур.

Наряду с проблемами синтеза и применения биологических препаратов важное значение имеют также их доставка и сегрегация. Помимо естественной доставки, определяемой кровотоком и диффузией в организме, в научной литературе рассматривается и принудительная доставка, под действием низкочастотного электромагнитного и электрического полей, благодаря электрофоретическому или диэлектрофоретическому эффектам. В основе метода лекарственного электрофореза лежит миграция ионов, содержащихся в лекарствах, в электрическом поле к противоположно заряженному электроду при введении лекарственных веществ в организм через кожу или слизистую оболочку. В случае диэлектрофореза лекарственные частицы подвергаются действию неоднородного электрического поля и движутся силой, обусловленной градиентом напряженности поля, в сторону его усиления. Благодаря значительным различиям в диэлектрических свойствах биологических объектов, диэлектрофорез уже в течение нескольких десятилетий активно используется в медицине и биологических исследованиях для транспортировки и сортировки различных видов

клеток, например отделения раковых клеток от здоровых, выделения из крови отдельных видов кровяных телец и т. д.

Направленный поток наночастиц возможен также в отсутствие стационарных внешних воздействий за счет сил с нулевым средним значением. Такой поток можно организовать с использованием рэтчет- или моторного эффекта, который возникает в системах с нарушенной зеркальной симметрией как результат выпрямления неравновесных флуктуаций различной природы. Изучение рэтчет-моделей дало ключ к пониманию ряда биологических процессов, таких как, например, функционирование внутриклеточных трансляционных белковых машин, выполняющих транспортные задачи, а также вдохновило на разработки наномеханизмов, работающих внутри биологических систем. Такие «диэлектрофоретические рэтчеты» имеют ряд преимуществ, к которым относится большое количество параметров управления движением, в том числе температура, частота и форма импульсов приложенного поля, вязкость среды и т. п.

Свойства лекарственных веществ могут быть улучшены (без изменения их химического состава) различными способами: варьированием размера частиц, структуры, формированием сольватов, молекулярных комплексов, сокристаллов и др. Эффективность лекарственных веществ и их фармакологические свойства во многом зависят от кристаллической структуры, в частности от присутствия тех или иных полиморфных модификаций или аморфного состояния. Первоочередное значение имеет размер наночастиц, так как малым частицам проще преодолевать защитные барьеры организма, проникать в клетки и накапливаться в тканях. Таким образом, одна и та же эффективность биоактивных и лекарственных веществ может быть получена при разных количествах препаратов, что позволяет снизить, а иногда и избавиться от побочных эффектов.

Среди многочисленных работ, посвященных биоактивным и лекарственным композициям, в данном пособии преимущественно рассматриваются только те исследования, которые относятся к наноразмерным системам. Т. е. будут подчеркиваться особенности синтеза и то новое, что дает наноразмер объектов в протекании в них различных физико-химических процессов. При этом будет сделана попытка систематизировать методы синтеза, приводящие к получению соединений различного класса.

Рассмотрение начинается с обсуждения особенностей применения низких температур для получения новых наноразмерных модификаций лекарственных соединений различных классов. В **главе 1** представлены преимущества и недостатки различных вариантов криохимического синтеза и криохимической модификации. На ряде примеров показана возможность микронизации (уменьшение размера частиц) лекарственных субстанций

и формирования новых метастабильных кристаллических структур, полиморфных модификаций, различающихся как молекулярной конформацией лекарственных веществ, так и системой межмолекулярных водородных связей, стабилизирующих молекулярные упаковки в различных кристаллических структурах. Проанализированы эффекты, связанные с уменьшением размера частиц исходной субстанции и возможности получения новых полиморфных кристаллических модификаций, а также имеющиеся положительные результаты биологического тестирования.

Следует отметить, что широкое и зачастую необоснованное применение антибиотиков в медицине и ветеринарии привело к возникновению большого числа штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам. Антибиотико-резистентные микроорганизмы являются одной из основных проблем современной медицины. В **главе 2** предлагается одно из возможных решений данной проблемы, заключающееся в создании новых лекарственных форм, содержащих помимо антибактериальных препаратов наночастицы биологически активных металлов (Ag, Cu), которые активны в отношении патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам. Такие формы обладают более высокой антибактериальной активностью по сравнению с исходными наночастицами металлов и антибактериальными препаратами и требуют меньшего времени на клинические и доклинические испытания по сравнению с новыми антибиотиками, так как входящие в их состав компоненты уже содержатся в применяющихся в настоящее время лекарственных формах.

Криоструктурирование полимерных систем — это процессы, включающие замораживание исходно макроскопически бесструктурного раствора или коллоидной дисперсии соответствующих предшественников, что после инкубации в замороженном состоянии и дальнейшем оттаивании или удалении кристаллической фазы сублимацией либо криоэкстракцией приводит к получению пространственно-структурированного полимерного материала, обладающего макропористой морфологией. **Глава 3** посвящена описанию процессов криоструктурирования и обсуждению свойств образующихся полимерных матриц. Отмечается, что в результате криогенной обработки исходных растворов мономерных или полимерных предшественников можно сформировать макропористые полимерные материалы двух основных типов: *криогели* (когда в замороженной среде происходит образование узлов трехмерной полимерной сетки) и *криоструктураты* (когда сшитая сетка не образуется, а закристаллизованный растворитель тем или иным методом удаляется из замороженного препарата).

Криотропное гелеобразование протекает в незамерзшей жидкой микрофазе макроскопически замороженных образцов, а также может происходить в замороженных как водных, так и органических средах, при

условии, что используемый растворитель и режимы охлаждения системы обеспечивают ее кристаллизацию. Криогели и криоструктураты обладают специфической макропористой текстурой, причем крупные поры взаимосвязаны. Роль порогена при формировании и криогелей, и криоструктуратов выполняют кристаллы замерзшего растворителя, поэтому характер пористости получаемого полимерного материала определяется режимами кристаллизации и иногда рекристаллизации. Полимерные криогели и криоструктураты, особенно их представители, сформированные на основе нетоксичных и разрешенных к медицинскому применению биополимеров, — перспективные материалы для биомедицинских областей науки и практики.

Направление, связанное с *криогелями* и *криоструктуратами*, продолжает рассматриваться в **главе 4**. Отдельный научный и прикладной интерес представляют криогели и криоструктураты на основе белковых веществ, поскольку в большинстве случаев белковые материалы биосовместимы, нетоксичны и биodeградируемы. В частности, такие материалы с помощью приемов криоструктурирования могут быть сформированы на основе белков разных типов — фибриллярных, глобулярных, белков с неупорядоченной клубковой конформацией полипептидных цепей. При этом на комплекс физико-химических свойств получаемых криогенно-структурированных матриц и их макропористую морфологию влияет множество факторов, к основным из которых относятся тип белка, его концентрация в исходном растворе, концентрация сшивающих агентов (если таковые применяются), присутствие и количество растворимых или дисперсных добавок, а также режимы криогенного воздействия. В результате удается получать инновационные практически значимые материалы биомедицинского назначения, обладающие необходимым, зачастую уникальным, набором свойств.

В **главе 5** обсуждаются криохимические подходы, развитые для синтеза гибридных наносистем, представляющих собой сульфат гентамицина или криомодифицированную β -форму диоксидина, содержащие наночастицы серебра или меди. Полученные гибридные композиты и их прекурсоры были включены в криогенно-структурированные биополимерные носители на основе желатина, БСА, альгината кальция и хитозана. Гибридные композиты на основе металлов и антибактериальных препаратов, включенные в альгинатные, желатиновые и БСА матрицы проявляют большую активность к подавлению роста *E. coli* 52 и *S. aureus* 144, чем их составляющие по отдельности. Исключением являются системы, включенные в хитозановые криоструктураты. Представляется возможным, что гибридные системы Ag/антибактериальный препарат и Cu/антибактериальный компонент более сильно взаимодействуют с хитозановой матрицей,

чем их отдельные компоненты, что приводит к снижению их антибактериальной активности.

В **главе 6** рассматриваются биокатализаторы, иммобилизованные на/в криогенно-структурированных полимерных матрицах. Как известно, криогенно-структурированные носители представляют широкие возможности для создания биокаталитических систем на основе различных ферментов. Иммобилизация существенно увеличивает их стабильность, а ферменты позволяют использовать биокатализаторы в мягких условиях и заметно усиливают их каталитическую эффективность по сравнению с классическими катализаторами. К преимуществам добавляются плюсы, приносимые криоструктурированными носителями: отсутствие ограничений для массообмена, возможность использования высоких скоростей потока, простота получения и масштабируемость. На основе криоструктурированных носителей созданы биопрепараты для доставки лекарств, а также ферментов, и для их контролируемого медленного высвобождения. Еще одним направлением применения криоструктурированных матриц является протеомный анализ клеток с применением пористых подложек и создание мультиферментных систем.

Глава 7 посвящена использованию низких температур при получении нано- и биоматериалов из водных растворов, суспензий и осадков. Низкотемпературные методы могут использоваться при синтезе наночастиц для последующего использования в качестве сорбентов-носителей иммобилизованных клеток микроорганизмов и лекарственных препаратов. Высокая скорость замораживания многокомпонентного водного раствора обеспечивает высокую химическую однородность продукта сушки, что приводит к снижению температуры фазообразования оксидных соединений и уменьшению размера их частиц. Низкотемпературный золь-гель переход в растворах полимеров при замораживании обеспечивает формирование прочного пористого полимерного каркаса. Пиролиз подобных каркасов в инертной среде приводит к формированию объемных углеродных наноматериалов с высокими значениями удельной поверхности.

Важной особенностью криохимических методов является возможность регулирования размеров макропор в объемных наноструктурированных материалах путем управления размерами кристаллитов льда при замораживании. Использование сублимационной сушки осадков позволяет предотвратить образование прочных агломератов наночастиц, образующихся при атмосферной сушке. Сублимационная сушка суспензий является одним из основных методов выделения индивидуальных неорганических и углеродных наночастиц из жидкой фазы для последующего исследования. Описаны также основные сферы применения различных видов синтезируемых материалов.

Особенности синтеза водорастворимых наночастиц серебра обсуждаются в **главе 8**. Благодаря заметной антибактериальной активности наночастиц серебра они широко используются для создания бактерицидных покрытий и лекарств, а высокая гидрофильность способствует практическому применению этих наночастиц в области аналитической химии, биологии и медицины. Препараты, приготовленные на основе наносеребра, обладают высокой биологической активностью в отношении высших растений, что связано с действием ионов серебра, высвобождающихся при окислительном растворении наночастиц. Следует иметь в виду, что фитотоксичность серебра препятствует широкому использованию серебродержащих препаратов в качестве регуляторов роста и развития растений, что может быть преодолено в результате использования коллоидного раствора химически модифицированных наночастиц серебра.

Применение биоразлагаемых форм лекарственных веществ в различных областях биомедицины, в том числе при реконструкции костной и хрящевой ткани, при создании кардио-, урологических и неврологических имплантатов, при разработке систем для противовоспалительной и противоопухолевой терапии, при тромболитической терапии и в целях остановки кровотечений рассматривается в **главе 9**. Одновременное использование природных и синтетических макромолекул создает уникальные возможности для доставки различных низко- и высокомолекулярных лекарственных веществ и обеспечения необходимых кинетических профилей их высвобождения.

Развитие технологии формирования нановолокон в электростатическом поле позволяет создавать разнообразные по форме и морфологии материалы с высокой удельной поверхностью и пористостью, с адекватными механическими свойствами, широким диапазоном структурно-динамических и диффузионных характеристик, способностью эффективно контролировать доставку лекарственных веществ. В главе сделан акцент на гибридные микро- и наночастицы, а также композиционные ультратонкие волокна, обладающие высокой удельной поверхностью, и рассмотрены специфические свойства нановолокнистых биоразлагаемых носителей, что принципиально важно при создании нового поколения терапевтических систем для дозированного и направленного транспорта лекарственных веществ в живых системах.

Рассмотрению структуры и свойствам металлполимерных нанокомпозитов, полученных методом совместной конденсации паров металла и мономера и последующей твердофазной низкотемпературной полимеризацией образующихся соконденсатов, посвящена заключительная **Глава 10**. Основным преимуществом этого метода по сравнению с другими является возможность стабилизации металлических наночастиц без каких-либо специфических координационных связей между поверхностью частицы

и полимером или без добавок каких-либо стабилизирующих соединений. В обзоре обсуждается механизм криохимического твердофазного синтеза металлсодержащих полимеров и рассмотрены электрофизические, диэлектрические, сенсорные, каталитические и ферромагнитные свойства образующихся композитов.

Особое внимание уделено использованию таких материалов в различных областях биологии и медицины. Рассматриваются металлполимерные нанокомпозиты, отличающиеся высокой эффективностью антибактериального действия при отсутствии побочных отрицательных эффектов, характерных для других бактерицидных препаратов. Такие нанокомпозитные пленки служат защитой от патогенных бактерий. Обсуждаются разработанные на основе наноструктурированных металлполимерных пленок новые высокочувствительные спектральные методы выявления и анализа биомолекул. Применение этих методов в медицинской практике позволяет обнаружить в организме источники различных заболеваний.

Глава 11 посвящена рассмотрению характеристик магнитных наночастиц, которые наряду со спектром свойств, присущих наноматериалам, в первую очередь большой удельной поверхности и высокой доли поверхностных атомов, обладают также суперпарамагнитными свойствами. Наночастицы могут переходить в однодоменное состояние, т. е. при отсутствии внешнего магнитного поля средняя намагниченность вещества равна нулю, а во внешнем магнитном поле вещество ведет себя как парамагнетик, но с магнитной восприимчивостью заметно более высокой, чем у обычных парамагнетиков. В результате материал на основе магнитных наночастиц становится важным классом биомедицинских функциональных наноматериалов. В первую очередь, это применительно к оксидам железа магнетита и маггемита, для которых исследования *in vitro* и *in vivo* показали низкую токсичность и высокую биосовместимость в сравнении с другими магнитными наноматериалами. Благодаря своим исключительным биологическим, физическим и химическим свойствам они находят широкое применение в таких областях, как гипертермия, направленная доставка лекарственных веществ, тканевая инженерия, магнитная сепарация биологических объектов (клеток, бактерий, вирусов, ДНК) и диагностика (они используются в качестве агентов для МРТ и при проведении иммуноанализа). В главе, помимо обсуждения основных проблем и перспектив использования наночастиц магнитных оксидов железа для передовых биомедицинских применений, также отражена информация об их структуре, методах получения и свойствах.

Каждая из представленных глав является самодостаточной и может быть изучена независимо от других. Наряду с обзорным материалом все главы содержат оригинальные исследования авторов, обобщающие их ра-

боты нескольких последних лет. Нетрудно видеть, что в учебное пособие включены разделы, охватывающие различные аспекты синтеза и использования наночастиц биоактивных и лекарственных веществ. Это сделано намеренно, т. к. такой состав содержания, как мы полагаем, будет способствовать ознакомлению исследователей, работающих в близких междисциплинарных областях, с новейшими достижениями в создании и изучении свойств гибридных наночастиц лекарственных веществ, а возможно, приведет и к их консолидации. Работы, по результатам которых написано учебное пособие, проводились при поддержке ряда научных грантов, в частности, грантов РФФИ № 16-13-10365 и РФФИ 16-08-00900а, 15-08-05178а, 17-07-00131а, 19-07-00141а, 20-07-00158а, 18-57-00003_Бел_а, 18-29-02012_мк.

Список аббревиатур с расшифровкой

- АБТС — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота)
- АГЭ — аллилглицидиловый эфир
- АОТ — бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия
- АФК — активные формы кислорода
- БАВ — биологически активное вещество
- БСА — бычий сывороточный альбумин
- ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГБК — гетерогенный биокатализатор
- ГКР — гигантское комбинационное рассеяние
- ДГЕА — дегидроэпиандростерон
- ДМСО — диметилсульфоксид
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДПД — дипиридамол
- ДСК — дифференциальная сканирующая калориметрия
- ЗЗР — зона задержки роста
- ИБК — иммобилизованный биокатализатор
- ИК-спектроскопия — инфракрасная спектроскопия
- ККГ — критическая концентрация гелеобразования
- КМЦ — карбоксиметил целлюлоза
- КР — комбинационное рассеяние
- КС — криоструктуры
- ЛВ — лекарственное(ые) вещество(а)
- МУНТ — мультистенные углеродные нанотрубки
- НД — нормативный документ
- НЖМФ — незамерзшая жидкая микрофаза
- ПАВ — поверхностно активное вещество
- ПВП — поливинил-2-пирролидон
- ПВС — поливиниловый спирт
- ПГБ — полигидроксibuтират, поли-(3-гидроксibuтират), *поли-β-гидроксibuтират*
- ПГМБ — гидрохлорид полигексаметиленбигуанида
- ПЭГ — полиэтиленгликоль
- ПЭГДА — полиэтиленгликоль диакрилат
- ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия

- РНК — рибонуклеиновая кислота
РФА — рентгенофазовый анализ
со-ПАА-АГЭ — сополимер полиакриламида и аллилглицидилового эфира
со-ПАА-БАА — сополимер полиакриламида и N, N'-бисакриламида
со-ПГЭМА-ГМА — сополимер поли-2-гидроксиэтилметакрилата и глицидилметакрилата
со-ПГЭМА-ПЭГДА — сополимер поли-2-гидроксиэтилметакрилата и полиэтиленгликоль диакрилата
со-ПГМА-МАТ — сополимер полиглицидилметакрилата и N-метакрилоил-L-триптофана
со-ПММА-ГМА — сополимер полиметилметакрилата и глицидилметакрилата
со-ПЭГМА-ТЭГДА — сополимер поли(этиленгликоль) метакрилата и тетраэтиленгликоль диакрилата
СЭМ — сканирующая электронная микроскопия
ТГЗ — транслугтаминаза
ТГ — термогравиметрия
ТЕМПО — (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил
ТКФ — трикальциевый фосфат, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
ТСХ — тонкослойная хроматография
ТФП — тетрафенилпорфирин
ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия
УФ-спектроскопия — ультрафиолетовая спектроскопия
УНТ — углеродные нанотрубки
ФС — фармакопейная статья
ЧДА — чистый для анализа
ЦТМА — цетилтриметиламмоний
ЭДК — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодии-мид
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, $(\text{HOOCCH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$
ЭФ — электроформование
ЯМР — ядерный магнитный резонанс
CVD — chemical vapor deposition; метод получения пленок пиролизом паров металлорганических соединений
OPF — олиго (полиэтиленгликоль фумарат)
PCL — поликапролактон
PEG — полиэтиленгликоль
PGA — полигликолевая кислота

- PLA — полимолочная кислота
PLGA — сополимер полилактид-ко-гликолид
PMMA — полиметилметакрилат
PPF — полипропиленфумарат
PPX — поли-пара-ксилилен
PX — пара-ксилилен
SAXS — small-angle X-ray scattering (малоугловое рассеяние рентгеновских лучей)
tPA — тканевой активатор плазминогена
Triton X-100 — [п-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполи(оксиэтилен)]_n
WAXS — wide-angle X-ray diffraction (рентгеновское рассеяние в больших углах)
 α -FP — α -фетопротеин

Глава I

Криохимический синтез нанопорошков лекарственных веществ

Шабатин В.П.¹, Морозов Ю.Н.¹, Верная О.И.¹, Шабатина Т.И.¹

Путь от синтеза биологически активной молекулы к внедрению лекарственного препарата часто занимает десятилетия. Основные затраты времени и ресурсов приходится на доклинические и клинические испытания, в том числе проверку токсичности, подбор оптимальной и предельной доз, а также отработку производственной технологии, выбор наиболее приемлемой формы. Очень важна всесторонняя проверка безопасности новых лекарств, изучение побочных эффектов их применения, многие из которых проявляются лишь через много лет, иногда даже в следующих поколениях. В этом отношении известные, проверенные десятилетиями, а иногда и веками, лекарственные вещества обладают рядом преимуществ, в частности не требуют длительных фармакологических и токсикологических испытаний, хотя их эффективность не всегда так высока, как хотелось бы. Поэтому актуальна задача разработки на их основе более действенных форм, что позволяет быстрее окупить вложенные в исследования средства чем поиск абсолютно новых препаратов.

Существует много способов улучшения свойств лекарственных веществ (без изменения их химического состава): варьирование размера частиц, структуры, формирование сольватов, молекулярных комплексов, со-кристаллов и др. [1–3]. Биофармакологические свойства и эффективность лекарственных веществ зависят от их кристаллической структуры, в частности от присутствия тех или иных полиморфных модификаций или аморфного состояния [3, 4].

Размер имеет первоочередное значение, так как малые частицы, размером менее 200 нм, легче преодолевают защитные барьеры организма человека и животных, проникают в клетки и накапливаются в тканях, чем более крупные частицы [4]. Классический пример — даназол, плохо растворимый в воде ингибитор гонадотропина. Абсолютная биодоступность микросуспензии даназола у собак (200 мг, 10 мкм) составляет 52%, в то время как при введении наносуспензии (200 мг, 169 нм) она достигает 82,3%.

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Таким образом, одна и та же эффективность может быть получена при уменьшении дозы лекарства, что позволяет снизить побочные эффекты [5].

Значительная доля лекарственных веществ, используемых в настоящее время в медицинской практике, плохо растворимы в воде и других биологических жидкостях. Плохая растворимость лекарственных веществ приводит к ряду проблем, связанных с их применением. Из-за низкой растворимости в раствор для инъекций приходится вводить органические со-растворители и стабилизаторы, что приводит к нежелательным побочным эффектам [6]. Например, Cremophor[®] EL используется как солюбилизатор для паклитакселя в препарате Таксол и обладает серьезными побочными эффектами, такими как нефро- и нейротоксичность [7]. В результате исследования, летальная доза (LD50) наносuspензии паклитакселя составляет 100 мг/кг, что значительно выше, чем 30 мг/кг для препарата Таксол [8].

Уменьшение размеров частиц лекарственных соединений приводит к росту их удельной поверхности и, соответственно, скорости растворения, и в некоторых случаях к росту экспериментально определяемой растворимости насыщения и образованию стабильных пересыщенных растворов. Для плохо растворимых лекарственных веществ используются также суспензии нанокристаллов, которые, как и растворы, можно вводить в организм человека через инъекции. В настоящее время на фармацевтическом рынке уже имеется целый ряд лекарственных препаратов, содержащих действующее вещество в наноформе: Rapamune[®] (Sirolimus), Emend[®] (Aprepitant), Tricor[®] (Fenofibrate), Megace ES[®] (Megestrol acetate), Avinza[®] (Morphine sulfate), Focalin[®] XR (Dexmethyl-phenidate HCl), Ritalin[®] LA (Methylphenidate HCl), Zanaflex CapsulesTM (Tizanidine HCl), Triglide[®] (Fenofibrate).

Для получения наночастиц лекарственных препаратов используют методы, основанные на двух принципиально различных подходах: «сверху — вниз» (top — down) и «снизу — вверх» (bottom — up) [9]. В первом случае наноформы получают в результате раздробления более крупных частиц, во втором в результате сборки наночастиц из молекул или молекулярных ассоциатов. К настоящему времени промышленное применение нашли методы получения наноформ лекарственных субстанций, основанные на механическом измельчении. Методы, использующие подход «снизу — вверх» (bottom — up), несмотря на очевидные преимущества, в промышленных масштабах не используются.

Подход «сверху — вниз» (top — down) реализуется в ряде физических методов, таких как механическое измельчение в различных типах мельниц [10, 11], гомогенизация под высоким давлением [12] и лазерная абляция [13], которую проводят в органических растворителях, в которых измельчаемое вещество не растворяется. Все эти методы обладают рядом недостатков — их реализация требует больших энергозатрат, получаемые

наночастицы характеризуются широким распределением по размерам и морфологической неоднородностью. Поверхность наноразмерных частиц обладает высокой запасенной энергией и содержит большое число активных центров — атомов с нескомпенсированными химическими и координационно ненасыщенными связями, что приводит к слипанию частиц и образованию агрегатов и агломератов. Для получения мелкодисперсных порошков лекарственных веществ необходимо применение стабилизаторов — органических лигандов, связывающих и блокирующих поверхностные центры наночастиц. В ряде случаев возможна механохимическая (при механическом измельчении) и фотохимическая (при лазерной абляции) деструкция органических веществ. Среди методов, использующих подходы «снизу — вверх» (bottom — up), следует отметить наиболее перспективные методы, основанные на замене растворителя, в том числе технологии, использующие сверхкритические флюиды, и методы, основанные на контролируемом испарении лекарственного вещества и управляемой конденсации молекулярных паров на охлаждаемые поверхности при криогенных температурах.

Суть метода замены растворителя (метода микроосаждения) заключается в следующем: исходное вещество растворяют в подходящем растворителе, далее микроколичество приготовленного раствора быстро, при интенсивном перемешивании, вводят в большое количество антирастворителя. При резком изменении среды происходит микроосаждение [14–16]. Активно развивающейся разновидностью этого метода является использование сверхкритических флюидов в качестве растворителей и осадителей (антирастворителей). В качестве растворителя сверхкритические флюиды используют в методе быстрого расширения: насыщенный раствор вещества распыляют через насадку в флюид, при резком уменьшении давления растворитель испаряется, а вещество распыляется в виде мелкодисперсного аэрозоля [17]. Для измельчения плохо растворимых в флюиде веществ применяют методику, в которой сверхкритический флюид используется в качестве осадителя [18]. Для растворения таких веществ используют органические соединения, хорошо растворяющиеся в сверхкритическом флюиде. Насыщенный раствор целевого вещества вводят через распылительную насадку в емкость с флюидом, в котором соединение из-за резкого уменьшения растворимости кристаллизуется в виде микро- и наночастиц. К недостаткам этого метода относят загрязнение конечного продукта остаточными количествами органического растворителя, а также сложное техническое оформление метода и, соответственно, большую стоимость получаемого продукта. Наночастицы лекарственных веществ получают также в эмульсиях, содержащих раствор вещества в легколетучем растворителе. При испарении растворителя образуются наночастицы, сходные по раз-

мерам с каплями эмульсии. Эмульгирование в сочетании с ультразвуком или гомогенизацией высокого давления позволяет получить капли нанометрового размера [19].

Криохимические методы синтеза и модифицирования наночастиц лекарственных препаратов основаны на сочетании процессов испарения или сублимации и молекулярной конденсации при криогенных температурах. Использование низких температур позволяет достигнуть двух фундаментальных результатов — микронизации лекарственного вещества до наноразмеров и стабилизации метастабильных состояний и кристаллических структур, позволяющих получать новые полиморфные модификации известных препаратов. Низкие температуры необходимы также для предотвращения неконтролируемых превращений промежуточных и целевых продуктов и для управления свойствами получаемых материалов. Можно выделить три основных метода криохимического синтеза наноразмерных порошков лекарственных препаратов:

- первый — криохимический вариант сублимационной сушки,
- второй — статическая высоковакуумная сублимация исходного соединения — низкотемпературная конденсация (статический сублимационный метод),
- третий — динамическая сублимация исходного соединения в потоке нагретого газа — носителя — низкотемпературная конденсация (динамический сублимационный метод).

Ключевые аспекты криохимического варианта сублимационной сушки рассмотрены в работе [20]. Метод включает быстрое замораживание растворов исследуемых веществ с последующей сублимацией растворителя из твердого образца или с использованием метода криоэкстракции [21–22].

Второй и третий варианты криохимического синтеза наноразмерных порошков лекарственных препаратов включают перевод исходной субстанции в газовую фазу путем испарения или сублимации и организацию направленного потока молекул к охлаждаемой поверхности. Взаимодействие потока молекул с охлаждаемой поверхностью приводит к конденсации вещества из газовой фазы с образованием твердых наночастиц [23]. При осуществлении статического сублимационного метода сублимацию осуществляли локальным поверхностным нагревом слоя исходного вещества в высоком вакууме (меньше 5×10^{-5} Торр). Метод позволяет испарять труднолетучие и термически малостабильные органические соединения [24, 25]. В вакууме молекулы, вылетевшие с поверхности исходной субстанции, имеют небольшую кинетическую энергию и, практически не сталкиваясь с другими молекулами, достигают охлаждаемой поверхности. При взаимодействии молекул с холодной поверхностью возможна их конденсация,

отражение и миграция. Для увеличения аккомодации молекул на поверхности понижали температуру с помощью жидкого азота ($T = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Молекула при взаимодействии с поверхностью теряет избыток энергии и стабилизируется, формируя ту или иную твердофазную структуру. Высокая скорость потери избыточной энергии на поверхности при температуре жидкого азота обеспечивает малый размер образующихся твердофазных наночастиц и стабилизацию возможных метастабильных кристаллических структур.

При осуществлении статического сублимационного метода испарение или сублимация осуществляется увлечением паров соединения потоком нагретого газа — носителя [26]. При приближении к охлаждаемой поверхности поток газа-носителя с парами вещества резко охлаждается, газовая фаза оказывается многократно пересыщенной относительно упругости паров соединения и в системе создаются условия для быстрого газофазного зародышеобразования. В свою очередь высокая скорость зародышеобразования и последующий рост микрокристаллитов обедняет газовую фазу парами соединения, что ограничивает дальнейший рост размеров частиц. Уникальность данного метода состоит в том, что в системе, за счет температурного градиента, постоянно воссоздаются условия, способствующие новому зародышеобразованию. Возникшие зародыши новой фазы растут за счет потока молекул или кластеров вещества из газовой фазы. Растущие частицы могут сталкиваться в газовой фазе и агрегировать. Далее сформировавшиеся в газовой фазе наночастицы осаждаются на холодной поверхности и стабилизируются.

Полиморфное модифицирование является важнейшим технологическим резервом повышения эффективности лекарственных веществ [27–36]. Обычно под полиморфизмом вещества понимают его способность существовать в двух или более кристаллических фазах (модификациях), которые имеют различную структуру. Эти структуры отличаются термодинамическими, механическими и спектральными характеристиками. Часто эти характеристики обуславливают значительные изменения биофармацевтических параметров растворения и абсорбции *in vitro* и *in vivo*, стабильности и свойств лекарственных форм. Контроль полиморфного состояния лекарственных средств законодательно закреплен в США, Великобритании, Японии.

Кристаллические модификации лекарственных веществ получают кристаллизацией (преимущественно из растворов и расплавов). Кристаллизационные методы получения полиморфных модификаций из растворов можно разделить на равновесные и неравновесные. Методы равновесной кристаллизации из растворов основаны на изотермическом и изоконцентрационном испарении растворителя из растворов, находящихся в равно-

веси с кристаллами данной полиморфной модификации. Неравновесные методы осуществляются при значительных пресыщениях в системе за счет быстрой кристаллизации, замены растворителя, распылительной или сублимационной сушки.

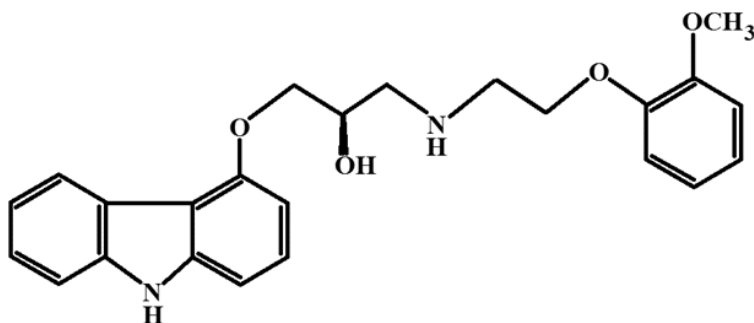
Важными параметрами, которые влияют на процесс кристаллизации полиморфных модификаций лекарственных веществ, являются температура, давление, степень пересыщения, природа растворителя, pH раствора, скорость перемешивания. Причем температура и давление играют решающее значение при выборе условий получения определенных полиморфных модификаций, поскольку определяют условия их стабильности и растворимости [37–47]. В последнее время исследуются новые способы кристаллизации: кристаллизация под действием поляризованного света (лазерное излучение), с использованием растворителей в сверхкритическом состоянии.

Если кристаллическая структура нарушается таким образом, что исчезает дальний порядок (упорядоченность во взаимном расположении атомов или молекул на неограниченно больших расстояниях), говорят об аморфизации образца. При этом размер частиц может уменьшаться или же сохраняться. Аморфизация — один из самых распространенных в настоящее время способов получения растворимых форм лекарственных веществ. Образованию и сохранению аморфных состояний способствует механическая обработка совместно со вспомогательными веществами. Например, аморфизация вещества происходит при его измельчении в мельницах [48].

В данной главе приведены конкретные примеры криохимического синтеза наноразмерных порошков лекарственных веществ.

1.1. Карведилол

Карведилол — кардиологический препарат, относящийся к классу α - и β -адреноблокаторов. Химическая формула соединения:



Для криохимической модификации карведилола использовали метод сублимации в потоке газа — носителя, сочетаемый с низкотемпературной конденсацией (динамический сублимационный метод). Криохимическим способом получен аморфный порошок [49, 50]. Методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^{13}C , ЯМР ^1H) была установлена идентичность исходного карведилола и полученного рентгеноаморфного порошка. Анализ препарата на чистоту проведен методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ ОФ. Суммарное содержание примесей в аморфном карведилоле не превышает 1%, что соответствует нормативному документу НД 42-11503-01 на лекарственную субстанцию карведилола. Таким образом, данные ЯМР-спектроскопии, ТСХ и ВЭЖХ свидетельствуют, что полученное при криомодифицировании вещество является карведилолом.

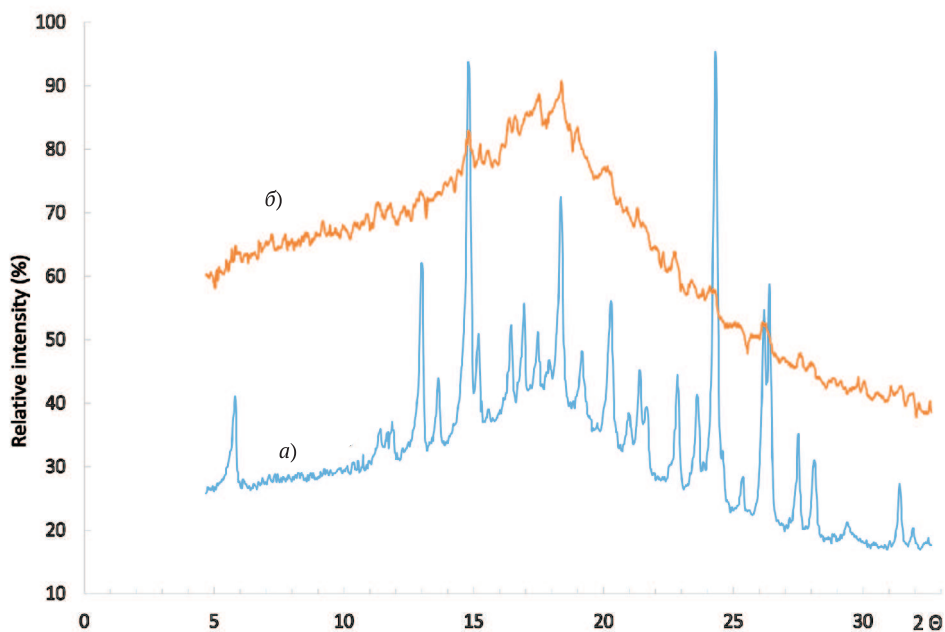


Рис. 1.1. Рентгенограммы образцов карведилола: а) — исходного фармакопейного, б) — криохимически модифицированного

Для определения структурных и термических свойств криоформы карведилола были проведены рентгенофазовый анализ, исследования методом ИК-спектроскопии и дифференциальная сканирующая калориметрия полученных образцов. По данным рентгенофазового анализа (РФА), криомодифицированное вещество является рентгеноаморфным. Спектр исходной субстанции карведилола характеризуется наличием набора дифракционных максимумов, что свидетельствует о ее кристаллическом состоянии (рис. 1.1). ИК-спектроскопическое исследование показало, что спектры ис-

ходного и аморфного карведилола различаются в области $1000\text{--}800\text{ см}^{-1}$ вследствие конформационных различий.

Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) свидетельствуют о том, что плавление исходной субстанции карведилола характеризуется одним эндотермическим эффектом при температуре $114\text{ }^{\circ}\text{C}$, а плавление полученного с применением низких температур карведилола фиксированной температуры плавления не имеет (рис. 1.2). Гранулометрическое исследование исходного и криомодифицированного карведилола методом оптической микроскопии показывает, что наряду с аморфизацией криомодификация позволяет уменьшить размеры частиц от исходных (более 10 мкм) до размеров менее 1 мкм .

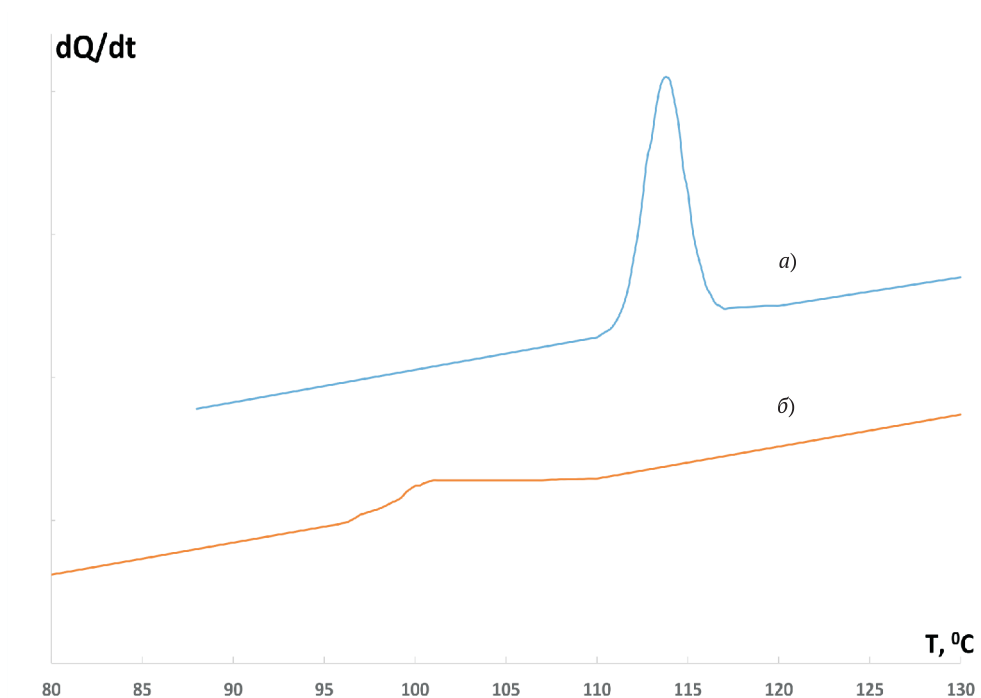


Рис. 1.2. Кривые разогрева образцов карведилола: *a*) — исходный фармакопейный карведилол, *б*) — криохимически модифицированный карведилол

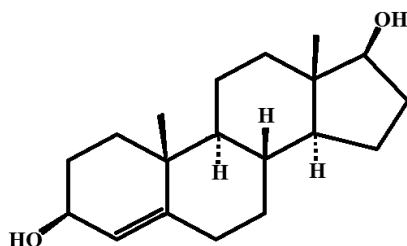
Биологическую активность аморфного карведилола проверяли на двух группах крыс, которым вводили исходный кристаллический и аморфный криомодифицированный карведилол. Проводили регистрацию системного артериального давления через имплантированные катеторы. Найдено, что аморфный препарат увеличивает межимпульсный интервал у животных, что, вероятно, обусловлено блокадой β_1 -адренорецепторов сердца. Это приводит к снижению коэффициента барорефлекса на введение животным фенилэфрина и изопротеренола и свидетельствует об увеличении

биоактивности криомодифицированного карведилола по сравнению с исходным.

1.2. 5-Андростендиол-3 β ,17 β

5-Андростендиол-3 β ,17 β — природный гормон, обладающий ярко выраженными иммуностимулирующими и радиопротекторными свойствами [51]. Химическая формула соединения приведена ниже.

Для криохимической модификации 5-андростендиола-3 β ,17 β использовали метод сублимации в потоке газа — носителя в сочетании с низкотемпературной конденсацией. Получен наноразмерный моногидрат 5-андростендиола-3 β ,17 β . По данным тонкослойной хроматографии (ТСХ) содержание примесей в исходном и криохимически модифицированном образцах составляло менее 0,5%.



Данные ДСК и термогравиметрии (NETZCH STA 449 C), свидетельствуют о том, что исходный и криохимически модифицированный 5-андростендиол-3 β ,17 β представляют собой моногидрат, причем пик дегидратации для исходного 5-андростендиола-3 β ,17 β лежит в интервале 110–147 °С, а для криохимически модифицированного — в пределах 102–128 °С. Температура плавления исходного и криохимически модифицированного 5-андростендиола-3 β ,17 β — практически совпадают — 187 и 188 °С, соответственно.

Рентгенофазовый анализ (РФА) (RIGAKU D/MAX-2500, Япония) криохимически модифицированного 5-андростендиола-3 β ,17 β показал, что его кристаллографическая структура соответствует известной структуре, приведенной в кембриджской базе кристаллографических данных с параметрами: $a = 6,250 \text{ \AA}$, $b = 12,143 \text{ \AA}$, $c = 23,440 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $V = 1779,0 \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho_{\text{выч}} = 1,152 \text{ мг/м}^3$ пространственная группа симметрии $P2_12_12_1$.

По данным оптической микроскопии («Karl Zeiss, Jena»), размер исходных частиц находится в диапазоне от 8-594 мкм. Размер и форму ча-

стиц криохимически модифицированного 5-андростендиола-3 β ,17 β определяли методом сканирующей электронной микроскопии (JEOL JSM 6490-LV, JSM 7001 F и HITACHI TM-1000). По форме и размеру частиц криохимически модифицированный 5-андростендиол-3 β ,17 β обладает высокой степенью монодисперсности, частицы препарата представляют вытянутые палочки с закругленными концами, их средний продольный размер составляет 219 \pm 9 нм [52].

1.3. Феназепам

Феназепам — высокоэффективный анксиолитический препарат, разработанный в СССР в 70-х годах [53]. Химическая структура соединения приведена ниже.

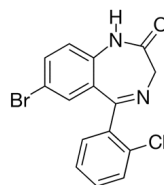
Известна одна кристаллическая модификация феназепам, для которой методом рентгенофазового анализа (РФА) определен набор дифракционных максимумов и их интенсивности [54].

Для криохимической модификации феназепам использовали метод сублимации в потоке газа — носителя в сочетании с низкотемпературной конденсацией. Методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^1H , ^{13}C), тонкослойной хроматографии и УФ-спектроскопии была установлена идентичность состава исходного и криохимически модифицированного феназепам.

Подлинность исходного фармакопейного и полученного нами криохимически модифицированного феназепам определяли по методике, представленной в ФС 42-2411-99 спектрофотометрическим методом в УФ-области.

Таким образом, при криохимической модификации фармакопейного феназепам превращения вещества не происходит и полученное из исходного фармакопейного феназепам вещество является 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2Н-1,4-бензодиазепин-2-оном. Для определения свойств наномодификации феназепам проведены: рентгенофазовый (п-РФА) и порошковый рентгеноструктурный (п-РСА) анализы, ИК-спектроскопия, термоаналитические исследования, определение диаметра частиц и определение скорости растворения в воде.

Сравнение результатов рентгенофазового анализа (РФА), проведенного на дифрактометре Rigaku D/MAX-2500 (Rigaku, Япония) на CuK α излучении, исходного и криомодифицированного феназепам свидетельствует о получении новой кристаллической β -модификации 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она.



Кристаллическую структуру определяли методом порошкового рентгеноструктурного анализа. Рентгенограмму получали в рентгеновской порошковой камере Гинье G370 ($\text{CuK}_{\alpha 1}$ -излучение, $\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$, съемка на просвет) в области углов $2\theta = 5\text{--}80^\circ$ в течение 8 ч. На измеренной порошковой диаграмме были уточнены положения первых 35 пиков, по которым проведено индентирование в моноклинной ячейке с помощью программы TREOR90. Систематические погасания, выявленные при уточнении порошковой диаграммы методом Паули программой MR1A, позволили установить пространственную группу $P2_1/c$.

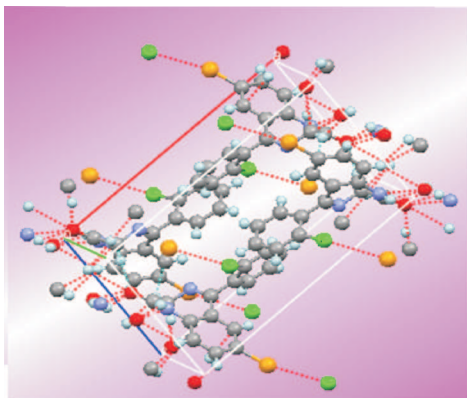


Рис. 1.3. Элементарная кристаллическая ячейка новой β -модификации феназепам: пространственная группа $P2_1/c$, $a = 14,792(5) \text{ \AA}$, $b = 11,678(3) \text{ \AA}$, $c = 8,472(2) \text{ \AA}$, $\beta = 93,677(19)^\circ$, $V^3 = 1460,4(7) \text{ \AA}^3$, $\rho_{\text{выч.}} = 1,59 \text{ г/см}^3$, $Z = 4$

ны в рассчитанные положения и не уточнялись.

Для новой структуры получены параметры кристаллической решетки: тип — моноклинная, $a = 14,792(5) \text{ \AA}$, $b = 11,678(3) \text{ \AA}$, $c = 8,472(2) \text{ \AA}$, $\beta = 93,677(19)^\circ$, $V^3 = 1460,4(7) \text{ \AA}^3$, $\rho_{\text{выч.}} = 1,59 \text{ г/см}^3$, $Z = 4 \text{ C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OClBr}$, пространственная группа $P2_1/c$ (рис. 1.3, 1.4). Сравнение полученных результатов с известными из литературы [53] свидетельствует о том, что полученное из фармакопейного феназепам, вещество является новой кристаллической модификацией 7-бром-1,3-дигидро-5-(2-хлорфенил)-2H-1,4-бензодиазепин-2-она, названной нами β -модификацией, со своими индивидуальными параметрами кристаллической решетки. Подробные данные о новой β -модификации феназепам приведены в работах [55, 56] и введены в Кембриджскую базу кристаллографических данных.

Кристаллическую структуру новой кристаллической β -модификации решали методом симулированного отжига и уточняли методом Ритвельда программой MR1A. Профили пиков описывали модифицированной функцией Войта. Эффект текстуры учитывали в рамках модели Марча–Долласа — направление преимущественной ориентации 001, уточненное значение параметра $r = 0,93(1)$. В процессе уточнения накладывались ограничения на допустимые отклонения длин связей и внутримолекулярных межатомных расстояний. Для неводородных атомов уточняли параметры изотропных тепловых колебаний, U_{iso} . Атомы водорода были помещены в рассчитанные положения и не уточнялись.

Анализ ИК-спектров исходной субстанции феназепам и полученной β -модификации показывает, что в областях $600\text{--}700\text{ см}^{-1}$; $800\text{--}900\text{ см}^{-1}$; $1350\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ и $1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ спектры различаются.

Термоаналитические исследования проводили на термоанализаторе STA 449 C Jupiter (NETZSCH) в токе аргона при повышении температуры 10 град/мин . Кривые ДСК исходного образца феназепам и β -криомодифицированного различаются. На кривой фармакопейного феназепам в диапазоне $(207\text{--}212)\text{ }^\circ\text{C}$ присутствует дополнительный эндотермический пик. Полученные результаты показали, что использование термического анализа позволяет различать исходную субстанцию феназепам и его новую кристаллическую β -модификацию. Температуры плавления образцов, определенные из ДСК-кривых, а также установленные согласно ГФ 11 издания (метод 1А — в капилляре) оказались равными $226\text{--}227\text{ }^\circ\text{C}$, что отвечает требованиям ФС 42–2411 — 99.

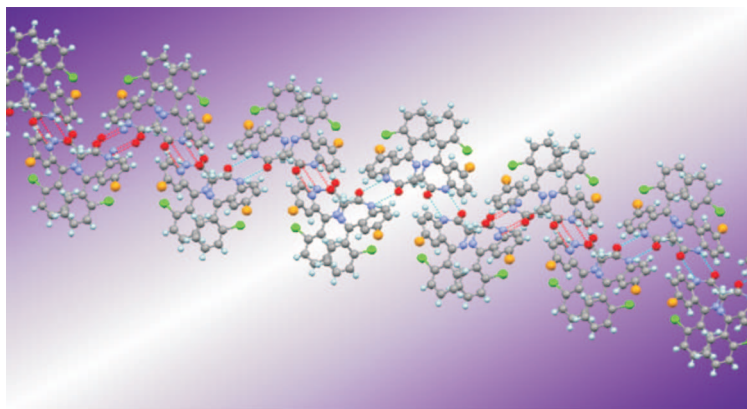


Рис. 1.4. Дополнительное зигзагообразное упорядочение в новой кристаллической β -модификации феназепам

Определение диаметра частиц проводили по микрофотографиям, полученным на сканирующем электронном микроскопе JSM 6380 LA при увеличениях $\times 1000\text{--}20\,000$. Диаметр частиц исходного феназепам равен $10\text{--}120\text{ мкм}$, а криомодифицированного — $50\text{--}300\text{ нм}$ в зависимости от условий получения. В указанном диапазоне находятся и размеры частиц криофеназепам, оцененные из рентгеновские спектров и из данных по величине поверхности.

Кинетику растворения исходного и нанофеназепам изучали в соответствии с ГФ, вып. 2, с. 154. Результаты представлены на рис. 1.5. Новая кристаллическая β -модификация в воде растворяется быстрее по сравнению с исходной субстанцией. Кроме того, новая кристаллическая β -модификация при растворении в воде образует пересыщенные, почти на $30\text{ мас.}\%$, водные растворы. Проведенные эксперименты показали, что новая кристалличе-

ская β -модификация более активна по сравнению с исходной субстанцией, что должно повлиять на ее биодоступность и возможный терапевтический эффект.

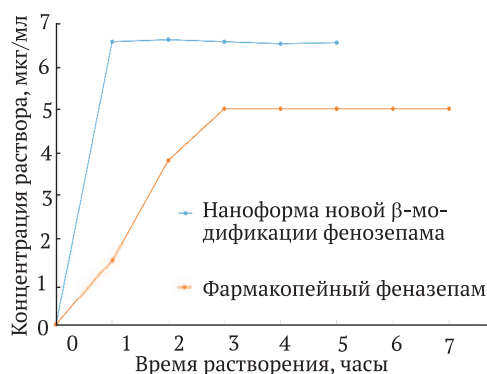


Рис. 1.5. Кинетика растворения различных форм феназепама в воде

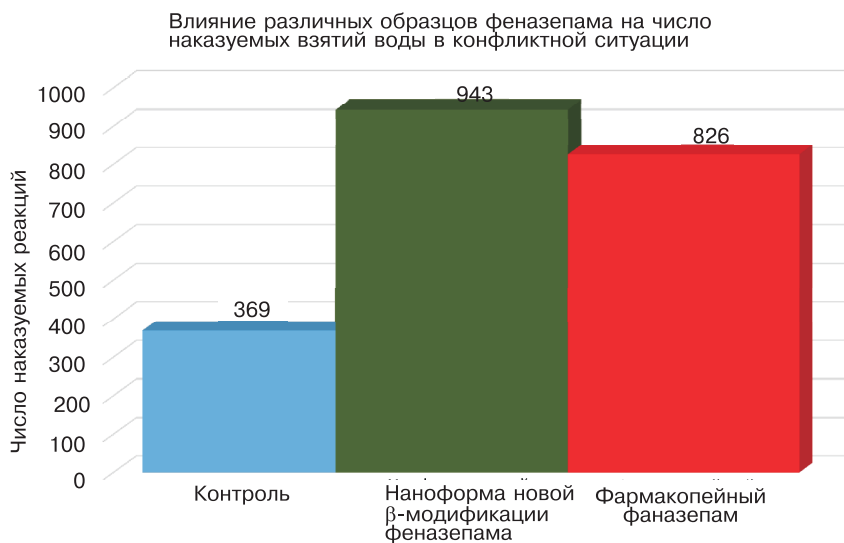


Рис. 1.6. Результаты биологических испытаний различных форм феназепама на анксиолитическую активность тестируемых животных

Испытания на глиальных клетках крысы С6 показали, что наноформа феназепама обладает меньшей токсичностью (рис. 1.6). Испытания также показали, что криохимически модифицированный феназепама обладает увеличенной анксиолитической, то есть противотревожной активностью и уменьшенным побочным седативным действием (рис. 1.7). Зафиксировано многократное снижение побочного миорелаксантного действия: доза ЭД₅₀ для наноформы феназепама примерно в пять раз выше по сравнению с известной. Биологические испытания на крысах показали, что композиция на основе новой кристаллической β -модификации феназепама обладает

большей анксиолитической активностью, значительно уменьшенной седативной активностью [57] (рис. 1.8).

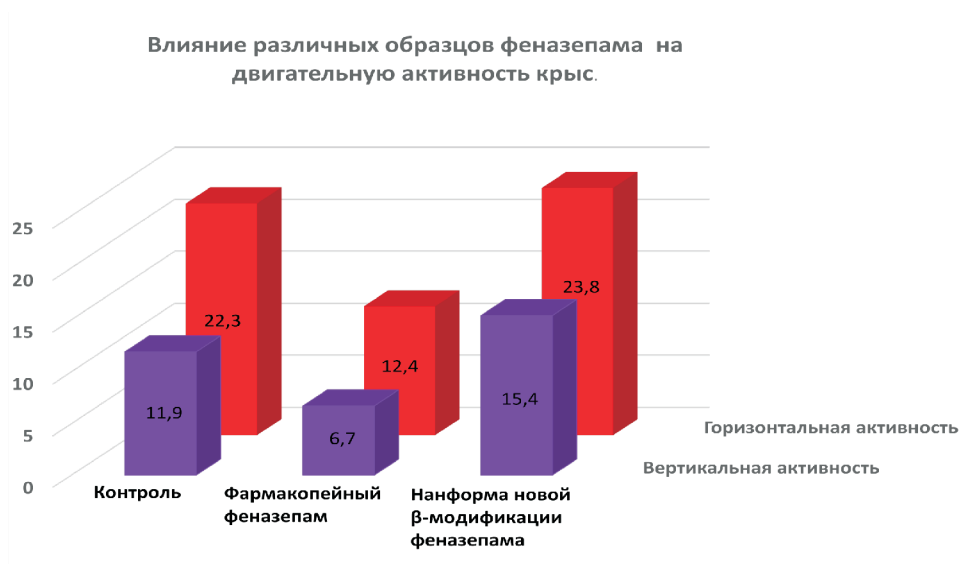


Рис. 1.7. Результаты биологических испытаний различных форм феназепама на седативный эффект тестируемых животных

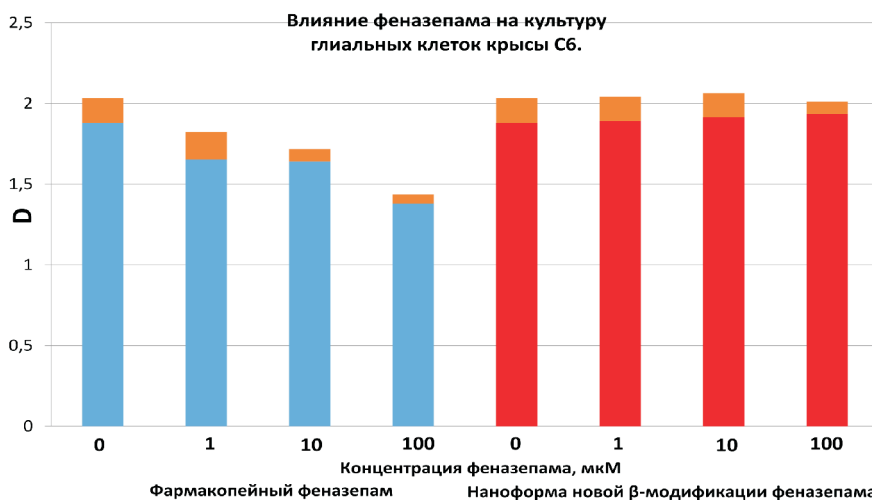
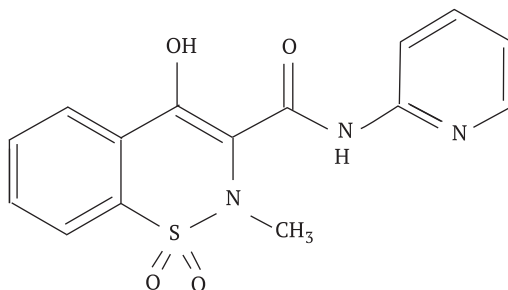


Рис. 1.8. Зависимость оптической плотности раствора глиальных клеток крысы С6 от концентрации феназепама/ β -модификации феназепама

1.4. Пироксикам

Пироксикам — эффективный нестероидный противовоспалительный препарат класса оксикамов. Данный препарат используется в лечении ревматоидного остеоартрита, первичной дисменореи, послеоперационной боли, может действовать как анальгетик, особенно в тех случаях, когда имеет место осложняющий воспалительный процесс. Структурная формула соединения приведена ниже.



Впервые препарат был выпущен фирмой «Pfizer» под торговой маркой «Felden» в 1980 г. Использование фармакопейных форм пироксикама в лечебной практике осложняется большим количеством побочных эффектов, связанных с негативным воздействием пироксикама на центральную нервную, сердечно-сосудистую и дыхательную системы, желудочно-кишечный тракт.

В работе использовали пироксикам, синтезированный в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского (лаборатория химии карбофункциональных соединений под руководством профессора А.С. Медведевой). Подлинность исходного фармакопейного и полученного нами криохимически модифицированного пироксикама определяли по методике, представленной в ФС 42-0271-07 по ИК-Фурье-спектру в диске с бромидом калия по полосам поглощения в области 4000 — 400 см⁻¹.

Для получения наноразмерных порошков пироксикама использовали метод динамической сублимации в потоке нагретого газа — носителя с последующей низкотемпературной конденсацией (динамический сублимационный метод). Для характеристики исходного фармакопейного и криохимически модифицированного пироксикама использовали методы ИК-Фурье-спектроскопии («Икар» производства ЗАО НПФ «Микротех», Россия), порошкового рентгенофазового анализа (п-РФА) («EMPYREAN» производства PANalytical Голландия), термогравиметрические измерения (STA 449 F1 Jupiter[®] производства «NETZSCH», Германия), термомикроскопи-

ческие исследования («OLYMPUS BX41» производства «Olympus Optical Co., LTD»). Размеры частиц оценивали с использованием просвечивающей электронной микроскопии («LEO 912 AB Omega» производства «ZEISS», Германия), а также посредством измерения эффективной поверхности путем определения количества адсорбированного на образцах аргона хроматографическим методом (Хром 5, Россия).

Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод, что криохимически модифицированный пироксикам представляет собой чистую форму III, которая является термодинамически метастабильной [58]. Данная форма известна уже более тридцати лет, однако ее кристаллографическая структура была расшифрована сравнительно недавно [59]. Ее кристаллографические параметры: пространственная группа P-1; $a = 8,0106(17) \text{ \AA}$, $b = 10,080(2) \text{ \AA}$, $c = 10,519(3) \text{ \AA}$; $\alpha = 81,215(9)^\circ$, $\beta = 69,330(5)^\circ$, $\gamma = 69,827(6)^\circ$. Средний размер частиц криохимически модифицированного пироксикама составляет: $d_{\text{ср}} = 300 \pm 30 \text{ нм}$.

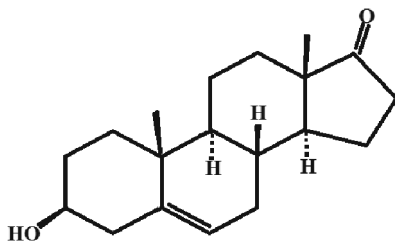
При нагревании наноформа полиморфной модификации III пироксикама претерпевает последовательные превращения: при температуре 125°C происходит укрупнение частиц с образованием игольчатых кристаллов, характерных для полиморфной модификации II, хорошо видимых на оптическом микроскопе. При температуре 160°C происходит исчезновение игольчатых кристаллов с образованием кристаллов кубической формы, характерных для термодинамически стабильной формы I.

В результате выдерживания криохимически синтезированной наноразмерной формы пироксикама при комнатной температуре в герметичном защищенном от воздействия солнечного света контейнере в течение четырех лет не произошло изменения структурно-размерных характеристик препарата.

1.5. Дегидроэпиандростерон (ДГЕА)

Дегидроэпиандростерон (ДГЕА) — эндогенный стероидный гормон, выполняющий многочисленные важные функции в организме человека, его называют гормоном здоровья и долголетия [60]. Содержание ДГЕА достигает максимума к 25 годам и постепенно уменьшается по мере взросления. Таким образом, многие возрастные болезни коррелируют с низким уровнем ДГЕА. Заместительная терапия физиологическими дозами ДГЕА при его эндогенном дефиците позволяет предотвратить или облегчить развитие многих заболеваний, связанных со старением.

Структурная формула соединения приведена на следующей странице.



Для криохимической модификации ДГЕА использовали как динамический, так и статический сублимационные методы. В качестве исходной субстанции использовали ДГЕА производства фирмы Astos Organics (Бельгия).

Подлинность исходного фармакопейного и полученного нами криохимически модифицированного ДГЕА подтверждали методами ИК-Фурье спектроскопии и порошкового рентгенофазового анализа (п-РФА). Анализ препарата на чистоту проведен методами масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Суммарное содержание примесей в исходном фармакопейном и криохимически модифицированном ДГЕА не превышало 0,5%.

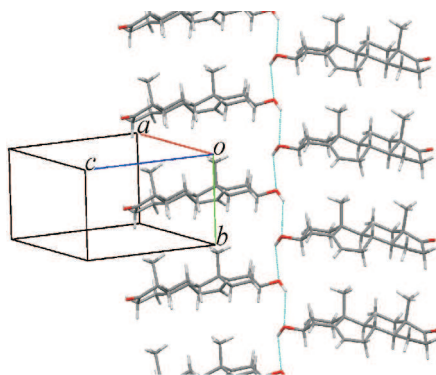
Для характеристики исходного фармакопейного и криохимически модифицированного ДГЕА использовали методы ИК-Фурье спектроскопии («Tensor II» производства фирмы «Bruker» Германия), порошкового рентгенофазового анализа (п-РФА) («EMPYREAN» производства Голландия), порошкового рентгеноструктурного анализа (п-РСА) (Huber G670 Guinier camera производства) термогравиметрические измерения (STA 449 F1 Jupiter[®] производства «NETZSCH», Германия), термомикроскопические исследования («OLYMPUS BX41» производства «Olympus Optical Co., LTD»). Размеры частиц оценивали с использованием просвечивающей электронной микроскопии («LEO 912 AB Omega» производства «ZEISS», Германия), а также посредством измерения эффективной поверхности путем определения количества адсорбированного на образцах аргона хроматографическим методом (Хром 5, Россия).

До последнего времени было известно шесть полиморфных модификации безводного ДГЕА. Из них только три (FI, FII, FVI) были охарактеризованы рентгеноструктурными исследованиями [61–64]. С использованием динамического сублимационного метода были получены наноформы новой полиморфной модификации ДГЕА, названной, согласно принятой классификации, как FVII [65]. Кристаллографическая структура формы FVII расшифрована методом порошкового рентгеноструктурного анализа [66]. Ее кристаллографические параметры: пространственная группа $P2_1$; $a =$

$= 13,105(2) \text{ \AA}$, $b = 5,9034(18) \text{ \AA}$, $c = 10,829(2) \text{ \AA}$; $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 97,64(2)^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$, $Z = 2$ (рис. 1.9). Параллельно с образованием новой полиморфной модификации FVII было зафиксировано наличие в криохимически модифицированных образцах еще одной полиморфной модификации FVIII, которая проявляется на рентгенограммах в виде небольшого количества уширенных пиков. Соотношение форм FVII/FVIII составляло 3:1.

Было обнаружено, что фазовый состав получаемых в результате криохимического синтеза, осуществляемого динамическим сублимационным методом с использованием газа-носителя, зависит от природы газа-носителя. Например, при использовании гелия в качестве газа-носителя, основной фазой является фаза FIII. Эта фаза известна более 20 лет, однако до последнего времени ее кристаллографическая структура не была расшифрована, что было связано с трудностью ее получения в чистом виде. Использование гелия в качестве газа — носителя при криохимическом синтезе наноформ ДГЕА, а также дополнительная термообработка, позволила получить образцы с практически стопроцентным содержанием фазы FIII, что позволило расшифровать кристаллографическую структуру [66]. Кристаллографические параметры фазы FIII ДГЕА: пространственная группа $P2_1$; $a = 14,5339(18) \text{ \AA}$, $b = 10,3792(14) \text{ \AA}$, $c = 11,8253(2) \text{ \AA}$; $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 111,559(18)^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$, $Z = 4$ (рис. 1.10).

Рис. 1.9. Фрагмент кристаллической структуры новой полиморфной модификации FVII ДГЕА: пространственная группа $P2_1$, $a = 13,105(2) \text{ \AA}$, $b = 5,9034(18) \text{ \AA}$, $c = 10,829(2) \text{ \AA}$; $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 97,64(2)^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$, $Z = 2$



При выдерживании образцов наноформы ДГЕА, содержащих фазы FVII и FVIII в соотношении 75% : 25%, в условиях стопроцентной влажности при комнатной температуре, зафиксировано образование нового кристаллогидрата S5 состава 1:1 с кристаллографической структурой S5, расшифрованной в [66]. Кристаллографические параметры кристаллогидрата S5 ДГЕА: пространственная группа $P2_12_12_1$; $a = 22,506(3) \text{ \AA}$, $b = 11,197(2) \text{ \AA}$, $c = 6,8094(18) \text{ \AA}$; $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 90,00^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$, $Z = 4$.

При исследовании полиморфных модификаций ДГЕА [59–61] обнаружено новое явление — влияние природы инертного газа-носителя, темпера-

туры конденсации и сублимации, а также других параметров криохимического синтеза на размер частиц и фазовый состав получаемых наночастиц ДГЕА. Учет таких зависимостей позволит разработать криохимические методы получения полиморфов ДГЕА с заданными свойствами.

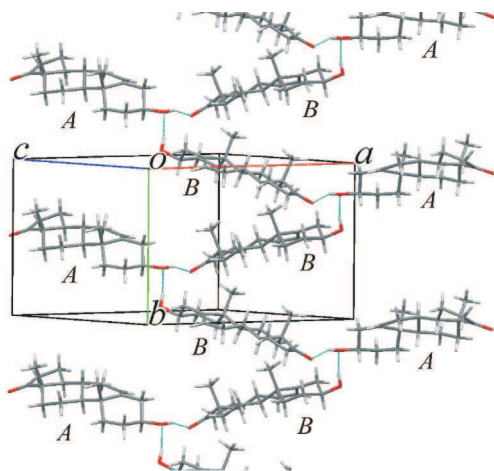


Рис. 1.10. Фрагмент кристаллической структуры полиморфной модификации FIII ДГЕА. пространственная группа $P2_1$, $a = 15,5339(18) \text{ \AA}$, $b = 10,3792(14) \text{ \AA}$, $c = 11,8253(14) \text{ \AA}$, $\beta = 111,559(4)^\circ$, $V = 1659,1(4) \text{ \AA}^3$, $\rho_{\text{выч.}} = 1,155 \text{ г/см}^3$, $Z = 2,2$

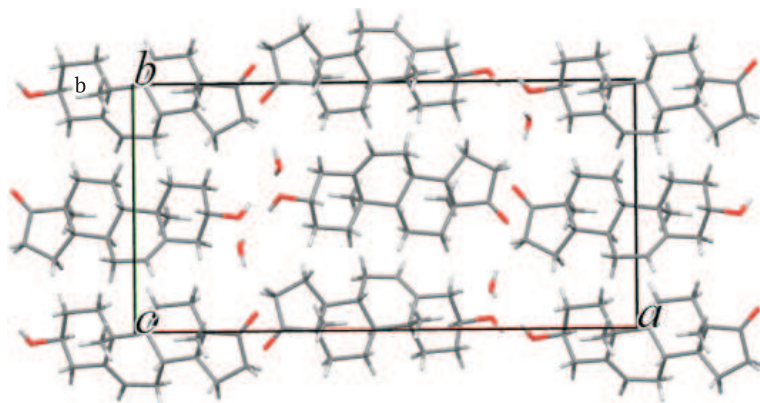


Рис. 1.11. Фрагмент кристаллической структуры кристаллогидрата ДГЕА S5: вид вдоль оси с полиморфной модификации FIII ДГЕА: $P2_12_12_1$, $a = 22,506(3) \text{ \AA}$, $b = 11,197(2) \text{ \AA}$, $c = 6,8094(18) \text{ \AA}$, $\beta = 90,00^\circ$, $V = 1716,0(6) \text{ \AA}^3$, $\rho_{\text{выч.}} = 1,186 \text{ г/см}^3$, $Z = 4$