

УДК 547.953:615.012:665:372

# ЛІПОСОМИ І НАНОСОМИ: СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ, ВИРОБНИЦТВО

С. М. ШУЛЬГА

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ

E-mail: shulga5@i.ua

Отримано 02.06.2013

Ліпосоми — порожнисті частинки, вміст яких обмежено ліпідною мембраною. Належать до великого сімейства везикулярних (бульбашкових) структур, утворених амфифільними молекулами. Ліпосоми, що складаються з одного або декількох бішарів фосфоліпідів, уперше було описано в середині 60-х рр. За порівняно короткий термін ліпосоми перетворились із простої моделі, що імітує клітинні мембрани, на об'єкт активних наукових досліджень і набули різноманітного практичного застосування. На сьогодні існує значна кількість лабораторних методик створення ліпосом і порівняно невелика кількість технологій, використовуваних у промисловості. Проте більшість цих методів мають обмеження за включення біологічно активних речовин у ліпосоми внаслідок чутливості останніх до механічних та/або хімічних ушкоджень. В огляді охарактеризовано структуру ліпосом, їхні властивості, методи створення та масштабування у промисловому виробництві.

**Ключові слова:** ліпосоми, фосфоліпіди, фосфатидилхолін, наносоми, везикули.

Історія успіхів у вивченні та практичному використанні ліпосом завдячує Бенгхему і його колегам, які на початку 1960-х помітили, що мазки з яєчного лецитину реагували з водою, утворюючи досить складні структури [1, 2]. Одержані структури було проаналізовано за допомогою електронного мікроскопа і з'ясовано, що спонтанно утворюється безліч везикул. Ці більш-менш однорідні ліпідні везикули спочатку було названо смектичними мезофазами [3], а згодом вони одержали більш благозвучну назву — ліпосоми [4]. У наступні роки ліпосоми використовували в основному як моделі для вивчення мембран, транспортних функцій і механізмів, властивостей проникнення (просочування), а також кінетики адгезії та злиття.

Незабаром ліпосоми було визнано перспективними об'єктами для систем доставки лікарських засобів [5, 6] і з огляду на це дедалі більше досліджень проводили з метою застосування їх у медицині, косметичці, харчовій промисловості та сільському господарстві. При цьому основні напрями досліджень стосувалися використання у фармацевтиці, зокрема у її біотехнологічній галузі.

Термін «мікрокапсули» для визначення ліпосом або фосфоліпідних везикул (ФВ) було запропоновано в 70-ті рр. минулого сто-

річчя. Пік розвитку цього напрямку досліджень припадає на 80-ті рр., коли було запатентовано основні методи одержання різноманітних ФВ [7–9]. Деякі ФВ отримали спеціальні назви, наприклад «протеоліпосоми», «імуносоми», «віросоми» (останні використовують як штучні вакцини). Термін «фармакосоми» було запропоновано для ФВ із ковалентно приєднаними лікарськими речовинами, тобто з амфифільними попередниками лікарських засобів [10].

Ліпосомальна частинка в класичному варіанті — це сферична структура (рис. 1).

Зовні ліпосоми не завжди виглядають як глобулярні частинки. Іноді вони набирають плоскої дископодібної форми (так звані диски) або мають вигляд дуже довгих і тонких

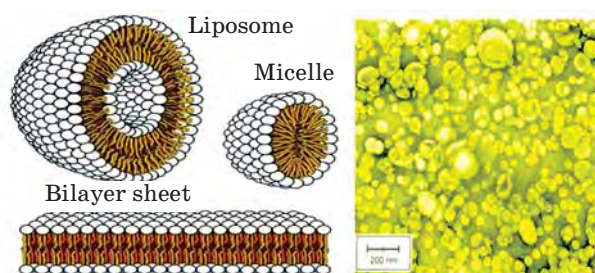


Рис. 1. Зовнішній вигляд ліпосом (поперечний переріз)

трубок, які називають тубулярними ліпосомами (рис. 2).

У разі включення в ліпосоми біологічно активних речовин (БАР) водна фаза вбудовується в порожнину везикули, а масляний екстракт — у її оболонку. Одна з причин уваги до ліпосом полягає у їхній здатності захоплювати як водорозчинні, так і жиророзчинні сполуки. Це дає змогу залучати у везикулярні структури як гідрофільні, так і ліпофільні інгредієнти, що утворюють суспензії у водному середовищі.

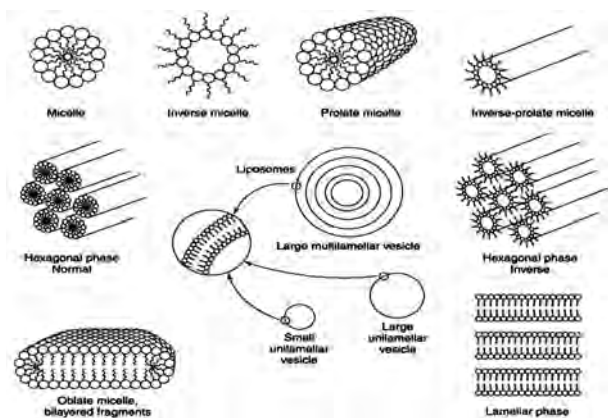


Рис. 2. Різні види ліпосом

На рис. 3 показано, як у водному розчині відбувається самозбирання мембран та замикання мембран з утворенням ліпідних пухирців — ліпосом.

Ліпосоми можна розділити на три основні групи: до першої входять ті, що складаються з фосfolіпідів (сої, яєчного жовтка, соняшнику, мозку великої рогатої худоби тощо), до другої — катіонні ліпосоми, утворені молекулами довголанцюгових аліфатичних амінів (C12 — C22), які містять дві або три гідроксильні групи. До третьої групи належать неіонні ліпосоми (ніосоми). Найчастіше це продукти взаємодії неіонних поверхнево-активних речовин (ПАР, зокрема тих, що мають поліоксетиленові ланцюги) із холестерином.

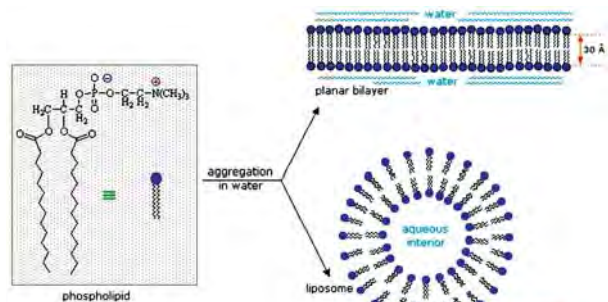


Рис. 3. Самозбирання фосfolіпідних молекул у ліпідні везикули у водному розчині

Мембрани ліпосом захищають інкапсульовані речовини від руйнування, поступово вивільняючи включені в них речовини і на певний час продовжують їх дію.

Ліпосоми із фосfolіпідів (фосфатидилхоліну) формуються відносно просто, а їхні суспензії зберігають стабільність упродовж тривалого часу зберігання. Підвищену здатність вмісту ліпосомальних композицій до проникнення можна пояснити не тільки особливою будовою ліпосомальних частинок, але й наявністю природних лецитинових фрагментів.

Для одержання ліпосом спиртовий розчин фосfolіпідів впорскують у великий об'єм водного розчину. Нерозчинні у воді фосfolіпіди утворюють дрібні бульбашки, стінки яких складаються з одного ліпідного бішару (одношарові ліпосоми). Можна спочатку висушити у пробірці розчин фосfolіпідів в органічному розчиннику (наприклад, хлороформі), додати у пробірку водний розчин і добре струсити. Ліпіди переходять в останній у вигляді багатшарових ліпосом (рис. 4). Використання фосфатидилхоліну у складі двошарових оболонок мікрокапсул забезпечує його найбільшу біодоступність.

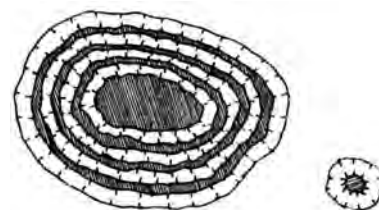


Рис. 4. Структура багатшарової та одношарової ліпосом:

заштриховані ділянки — місцезнаходження води, світлі — бімолекулярний ліпідний шар, «хвости» складових його молекул звернені всередину шару

Інші фосfolіпіди, що не утворюють ліпідних сфер, зазвичай використовують для модифікації заряду ліпосом. Фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидні кислоти та фосфатидилгліцерол сприяють електростатичному відштовхуванню, запобігаючи агрегації або злипанню ліпосом. Деякі ліпіди можуть бути залучені для модифікації амфифільних агрегацій, що зумовлює зміну властивостей мембрани ліпосом. Так, холестерол підвищує жорсткість і зменшує проникність ліпідних бішарів, а лізофосфатидилхолін сприяє здатності ліпосом до проникнення.

Основними характеристиками ліпосом є розмір та об'єм внутрішнього водного простору (мл/г ліпиду).

Ліпосоми (умовно) можна класифікувати за структурою, методом одержання, складом компонентів і застосуванням (звичайні та спеціальні).

Класифікацію ліпосом залежно від структури наведено в табл. 1, від методу одержання — табл. 2, від складу компонентів та застосування — табл. 3.

Дрібні одношарові (моноламельярні) ліпосоми (SUV) відносно однорідні за розміром. Кожна ліпосома має тільки одну бішарову мембрану, що робить їх легкодоступними для водорозчинних молекул.

Зважаючи на те, що товщина зовнішньої мембрани є постійною (близько 3–5 нм), а діаметр SUV невеликий, водний об'єм їх істотно зменшується зі зменшенням розміру, що призводить до зниження здатності захоплення БАР. SUV зазвичай одержують шляхом ультразвукової обробки водних дисперсій фосfolіпідів. Потім везикули фракціонують за розміром методом гельпроникної хроматографії або центрифугуванням у градієнті гліцеролу. Інший метод приготування таких везикул полягає в швидкому введенні у водну фазу розчину ліпиду в етанолі. Окрім того, можна використовувати прес Френча.

**Таблиця 1. Типи везикул залежно від їхніх розмірів та кількості шарів ліпідів**

| Тип везикул                    | Скорочена назва | Діаметр, нм            | Кількість шарів ліпідів  |
|--------------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------|
| Одношарові везикули            | UV              | Весь діапазон розмірів | Один                     |
| Малі одношарові везикули       | SUV             | 20–100                 | Один                     |
| Середні одношарові везикули    | MUV             | 100–150                | Один                     |
| Великі одношарові везикули     | LUV             | 100–500                | Один                     |
| Гігантські одношарові везикули | GUV             | Більше 1000            | Один                     |
| Оліголамельярні везикули       | OLV             | 100–1000               | 5                        |
| Багатошарові везикули          | MLV             | Більше 500             | 5–25                     |
| Мультивезикулярні везикули     | MVV             | Більше 1000            | Мульти-блокова структура |

Великі одношарові (моноламельярні) ліпосоми (LUV) також мають одну зовнішню мембрану, але здатні захоплювати велику кількість водної фази. Проте їхня незначна механічна міцність може легко призвести до розриву мембрани і втрати вмісту внутрішньої сфери. Низькою є і здатність їх до утримання водорозчинних компонентів. Вибір методу одержання SUV залежить від ліпідного

**Таблиця 2. Методи одержання та формування везикул**

| Методи одержання                                                            | Скорочена назва | Везикули |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------|
| Прості чи оліговезикули, одержані за допомогою випарювання в оберненій фазі | REV             | SUV/OLV  |
| Багатошарові везикули, отримані випарюванням в оберненій фазі               | MLV-REV         | MLV      |
| Стабільні багатошарові везикули                                             | SPLV            | SPLV     |
| Багатошарові везикули, одержані методом заморожування–розморожування        | FAT MLV         | MLV      |
| Везикули, отримані методом екструзії                                        | VET             | SUV/LUV  |
| Везикули, одержані методом дегідратації–регідратації                        | DRV             | OLV/MVV  |

**Таблиця 3. Класифікація ліпосом залежно від складу компонентів та застосування**

| Тип ліпосом              | Скорочена назва везикул | Склад                                                             |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Звичайні ліпосоми        | CL                      | Нейтральні або негативно заряджені фосfolіпіди та холестерол      |
| Спеціальні ліпосоми      | RSVE                    | Відновлений вірус Сендай                                          |
| pH-залежні ліпосоми      | —                       | Фосfolіпіди Фосфатидилетаноламін або діолеїл-фосфатидилетаноламін |
| Катіонні ліпосоми        | —                       | Катіонні ліпіди Діолеїлфосфатидилетаноламін                       |
| Довгоциркулюючі ліпосоми | LCL                     | Нейтральні фосfolіпіди, холестерол та 5–10% PEG — DSPE            |
| Імуноліпосоми            | IL                      | CL або LCL з додаванням моноклональних антитіл                    |

складу везикул та їх призначення. Так, методи, за яких здійснюють розбавлення дисперсії, є непридатними для інкапсуляції лікарських препаратів, а з використанням органічних розчинників — не підходять для протеїнів.

Найчастіше для одержання SUV використовують такі:

А) Діаліз (або розбавлення) детергентних розчинів — найпопулярніший метод для біохімічних досліджень, оскільки він придатний для включення протеїнів у SUV, що утворюються. Ліпід (або ліпід із протеїном) диспергують з надлишком детергенту, а потім детергент видаляють різними методами залежно від значення його критичної концентрації міцелоутворення. Розмір ліпосом залежить не тільки від типу детергенту або ліпиду, але й швидкості видалення детергенту.

Б) Інфузія та обернено-фазове випаровування — методи, пов'язані з використанням неполярних розчинників. Однак для приготування модельних мембран, що містять протеїни, вони непридатні.

В) Методи злиття — це кілька підходів, що ґрунтуються на злитті SUV до утворення ліпосом більшого розміру. Наприклад, повторні операції заморожування–танення (придатні для реконструкції деяких мембранних протеїнів), використання  $\text{Ca}^{2+}$  для злиття SUV, які містять фосфатидилсерин.

Г) Додавання фосфатидилхоліну з короткими ланцюгами в кількості до 20% від загального вмісту ліпідів, при цьому мультиламелярні бішари перетворюються на стабільні LUV.

Д) Додавання жирних кислот або детергентів за певних умов спричинює злиття SUV з утворенням LUV і сприяє включенню протеїнів у бішар останніх.

Є) Швидка екструзія мультиламелярної дисперсії через полікарбонатні фільтри дає змогу одержувати LUV діаметром 600–1000 Å і має низку істотних переваг.

Ж) Короткотривале підвищення pH сприяє утворенню везикул (як SUV, так і LUV) із молекул фосфатидної кислоти.

Багат шарові (мультиламелярні) ліпосоми (MLV), як правило, є наночастинками більш ніж із п'ятьма шарами. Оскільки їхні концентричні оболонки повільно руйнуються, MLV поступово вивільняють свій вміст. Значна кількість шарів забезпечує вищу здатність до утримання водорозчинних молекул порівняно з іншими типами ліпосом. Однак об'єм захоплення менший, ніж у LUV, оскільки кількість фосфоліпідів, потрібних для утворення численних бішарів, більша.

Олігошарові ліпосоми (OLV) — частинки, що складаються з декількох десятків і навіть сотень шарів, вони, як правило, менші, ніж MLV із кількома шарами. OLV поєднують відносно великий об'єм захоплення і утримувальну здатність, що є важливим для мікроінкапсуляції.

У водних системах із речовинами, що здатні утворювати ліпідні мембрани, можливі два варіанти асоціації речовин. Перший варіант пов'язаний з утворенням «істинних» ліпосом (рис. 1), другий — так званих наносом із ліпідів (nanosomes, piosomes і т. д.) — дрібних сфер діаметром 10–1000 нм, які не мають, на відміну від ліпосом, внутрішнього водного резервуара і відокремлені від зовнішнього водного середовища моношаровою ліпідною мембраною (рис. 5).

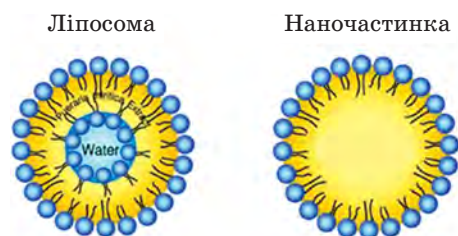


Рис. 5. Схематичне зображення наночастинки (наносоми)

Ліпідні наносоми можна собі уявити, якщо взяти звичайну емульсію типу «олія-у-воді» і замінити в ній олійні краплі на частинки твердого жиру.

Утворення таких частинок, мабуть, є енергетично доцільним, оскільки необхідність структурування (зниження ентропії системи) виявляється тільки в організації поверхневого ламінарного моношару, тимчасом як внутрішні молекули, що містяться у сфері, розташовуються хаотично.

Можна вважати [11], що наночастинки утворюються за інтенсивного фізичного впливу на ліпосомальні структури (наприклад, за допомогою ультразвуку), і ймовірність їх утворення збільшується зі зростанням відносного вмісту ліпідів у вихідній системі. Враховуючи, що наночастинки утворюються під час руйнування ліпосомальних структур, діаметр наночастинок буде значно меншим.

Окрім того, наночастинки, зміцнені полімерами, можна одержати у процесі полімеризації акриламідів, метилметакрилату, ефірів ціанакрилової кислоти або з використанням готових полімерів — альбуміну, поліефірів гідроксикарбонових кислот (молочної та гліколевої). Оптимальними

шляхами застосування суспензій наночастинок є ін'єкційне (наприклад, внутрішньосудинне) чи пероральне введення або у складі очних крапель [10,12].

Ліпідні наноконтейнери можуть бути двох видів: наночастинок або нанокапсули. Наночастинок — це монолітні, зазвичай сферичні, утворення, що містять БАР в об'ємі наночастинок або тільки на її поверхні. Виділення БАР з наночастинок відбувається поступово з контрольованою швидкістю: тільки з поверхні; з усього об'єму наночастинок внаслідок її розпаду або набухання. До наночастинок належать також нанокристали, які складаються тільки з БАР і подрібнені до відповідних розмірів, що дає їм змогу розчинятися зі швидкістю, вищою, ніж за розчинення частинок більших розмірів. Нанокапсули — це порожнисті сферичні контейнери (з товщиною стінки ~10–30 нм), що містять рідке середовище, в якому розчинена БАР. Вивільнення БАР з нанокапсули відбувається унаслідок дифузії через стінку або під час розриву капсули. Швидкість вивільнення регулюють дизайном нанокапсул і способом їх одержання.

Властивості ліпосом та їхня поведінка визначаються насамперед наявністю в них замкнутої мембранної оболонки. Незважаючи на молекулярну товщину (3–5 нм), ліпідний бішар відзначається механічною міцністю і гнучкістю. У рідкокристалічному стані його компоненти мають високу молекулярну рухливість, тому загалом мембрана поводить себе як досить рідка, текуча фаза. Завдяки цьому ліпосоми зберігають цілісність за різних ушкоджень, а їхня мембрана має здатність до самовідновлення структурних дефектів, що виникають. Разом з тим гнучкість бішару та його плинність надають ліпосомам високої пластичності. Так, ліпосоми змінюють розміри і форму у відповідь на зміну осмотичної концентрації зовнішнього водного розчину. За сильного осмотичного стресу цілісність бішару може порушитися і ліпосоми можуть розпастися на частинки меншого розміру.

Для практичного застосування ліпосом і везикул важливою є їхня здатність включати в себе і утримувати речовини різної природи. Перелік таких речовин надзвичайно широкий — від неорганічних іонів і низькомолекулярних органічних сполук до протеїнів та нуклеїнових кислот. Так, наприклад, у роботі [13] показано високу ефективність ліпосом для солюбілізації речовин (таксолу і бетулінової кислоти), погано розчинних як у воді, так і в олії.

Хоча ліпосоми відносно міцні й стабільні, їх можна зруйнувати до міцелярного стану за допомогою ПАР, що належать до розряду детергентів. Цей процес (солюбілізація) є зворотним, і ліпосоми знову формуються, якщо детергент видалити з міцелярного розчину. Самозбирання мембран шляхом видалення солюбілізуючого детергенту зазвичай застосовують для вбудовування інтегральних мембранних протеїнів у ліпідний бішар (процес реконструкції). При цьому одержують протеїновмісні ліпосоми — протеоліпосоми.

Іншою важливою властивістю ліпосом, що дає їм переваги перед іншими носіями БАР, є спорідненість із природними мембранами клітин за хімічним складом. Відомо, що ліпіди, які входять до складу мембран, займають від 20% до 80% їхньої маси. Тому за правильного підбору компонентів введення ліпосом в організм не спричиняє негативних реакцій.

Залежно від хімічних і фізичних властивостей ліпосом (складу, поверхневого заряду) вони вибірково поглинаються різними тканинами організму і навіть різними органами, тобто змінюється тропність ліпосом. Регулюючи тропність, можна спрямовувати діючу речовину в конкретні тканини і органи. У ліпосоми можна інкапсулювати сполуки, що легко окиснюються, чим істотно уповільнити їх деградацію і захистити кінцевий продукт від передчасного розпаду.

Хоча ліпосоми порівняно легко руйнуються в організмі, вивільняючи доставлені речовини, проте надійно захищають їх від контакту з імунною системою і, отже, не викликають захисних та алергічних реакцій організму.

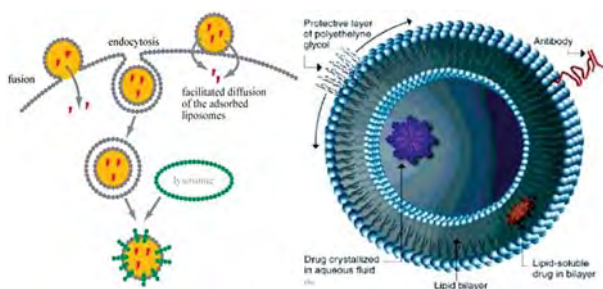
Важливо, аби БАР надійно утримувалися в ліпосомі і разом з тим виходили (бажано з регульованою швидкістю) з неї у разі досягнення тканини або органа-мішені. Такі властивості мають ліпосоми з контрольованим вивільненням, наприклад термо- і рН-чутливі ліпосоми, що мають достатньо жорстку мембрану за нормальних (фізіологічних) умов, але з підвищенням температури (у разі термочутливих ліпосом) або зниженні рН середовища (для рН-чутливих ліпосом) проникність мембрани таких ліпосом різко збільшується.

Здатність ліпосомальних частинок деформувати свою структуру в процесі подолання мікрокапілярів є ще однією їхньою особливістю.

Численні дослідження показали, що ліпосоми активно реагують із мембраною

клітини [14–17]. При цьому важливу роль відіграє форма їх взаємодії, яка залежить від властивостей ліпосом (рис. 6).

Найпростіша форма взаємодії — це коли ліпосоми з БАР адсорбуються на поверхні клітини. Ліпосома може так і залишитись на поверхні, а може відбутися процес її поглинання клітиною (ендоцитоз) і разом з нею всередину клітини потраплять відповідні БАР.



**Рис. 6. Схематичне зображення процесу злиття ліпосоми з клітиною**

Інший варіант взаємодії — клітинна мембрана і ліпосоми обмінюються ліпідами. І, нарешті, ліпосоми здатні злитися з мембранами клітин і стати їх частиною. При цьому можуть змінюватися властивості клітинних мембран, зокрема їхні в'язкість і проникність, поверхневий заряд. Може також збільшитись або зменшитись кількість каналів, що проходять через мембрани. Таким чином, завдяки ліпосомам з'являється новий спосіб спрямованого впливу на клітину, який можна назвати «мембранною інженерією».

Узагалі розподіл ліпосом в організмі залежить від складу ліпосомальної мембрани, розміру, заряду й інших хімічних чи фізичних параметрів везикул та іммобілізованих у них речовин, а також від способу їх введення.

Так, наприклад, після підшкірного введення основна кількість ліпосом депонується у місці введення і вивільняється звідти переважно лімфогенним шляхом. Оптимальним способом доставлення ліпосомальних препаратів є місцеве введення їх у регіональні лімфовузли [14, 17].

За внутрішньом'язового введення ліпосоми здатні створювати депо препарату в місці введення. Швидкість вивільнення з депо залежить від розміру і властивостей ліпосом і становить від декількох годин (дрібні ліпосоми) до декількох днів (великі ліпосоми). Дрібні ліпосоми на відміну від великих, за внутрішньочеревного або внутрішньом'язового введення набагато швидше проникають у кровеносне русло, що вказує на обмежену здатність останніх проходити через капіля-

ри і мембрани судин [14]. За внутрішньосудинного введення дрібні ліпосоми виводяться з кровотоку повільніше, ніж великі [18].

Як приклад можна навести результати роботи з дослідження процесу фагоцитозу за допомогою аналізу електронно-мікроскопічної картини взаємодії ліпосом із клітинами [19]. Було виявлено, що вже через 15 хв після введення ліпосом адсорбуються на всій поверхні макрофагів. При цьому частина ліпосом за цей короткий період інкубації включається в цитоплазму макрофага. Через 30 хв усі ліпосоми з поверхні інтерналізуються в цитоплазму і зливаються з лізосомами, утворюючи фагосоми. Слід зазначити, що в цитоплазму включаються не тільки одиничні ліпосоми, а й скупчення (кластери) ліпосомальних везикул. Через 3 год інкубації ліпосоми втрачають свої зовнішні контури і на їх місці залишаються «тіні».

Таким чином, процес фагоцитозу ліпосом охоплює такі стадії:

- адсорбцію на зовнішній мембрані макрофага;
- поглинання ліпосомальних везикул;
- «перетравлення» біоматеріалу.

Враховуючи високу здатність поглинання ліпосом макрофагами, можна вважати, що фагоцитоз є одним з найважливіших механізмів взаємодії ліпосом із клітинами.

## Сировина для одержання ліпосом

Значні обсяги виробництва ліпосомальних препаратів та жорсткі вимоги до жирнокислотного складу фосфоліпідів роблять актуальною проблему доступності джерел сировини. Основними методами виробництва фосфоліпідів є хімічний або ензиматичний синтез і виділення (екстракція) фосфоліпідів із природних джерел.

Існує декілька груп фосфоліпідів, які можна використовувати для приготування ліпосом, а саме: фосфоліпіди з природної сировини, модифіковані з природної сировини, напівсинтетичні, синтетичні, з натуральними «голівками».

Нижче перераховані фосфоліпіди, застосовувані у виготовленні ліпосом.

Природні:

- фосфатидилхолін (PC);
- фосфатидилетаноламін (PE);
- фосфатидилсерін (PS).

**Синтетичні:**

- діолеїлфосфатидилхолін (DOPC);
- дистеарїлфосфатидилхолін (DSPC);
- діолеїлфосфатидилетаноламін (DOPE);
- дистеарїлфосфатидилетаноламін (DSPE).

На сучасному етапі найбільш оптимальним є використання у виробництві ліпосомальних препаратів природних фосфоліпідів (із бобів сої, льону, ріпаку, кукурудзи, соняшнику, ліщини, жовтків курячих яєць, молоків лососевих риб), оскільки введення ліпосом, створених на основі природної сировини лецитину або фосфатидилхоліну — ефіру фосфорної кислоти і жирних кислот не пов'язано з ризиком розвитку токсичних ефектів, імуногенності та алергічних реакцій. Окрім того, відсутні обмеження на застосування природного лецитину у виробництві харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів як у Європейському Союзі, так і в інструкціях Управління з контролю за якістю харчових продуктів, медикаментів і косметичних засобів FDA США [20].

Спочатку термін «лецитин» вживали щодо ліпідів, які одержували з яєчного жовтка. Згодом його почали використовувати як синонім конкретного фосфоліпиду — фосфатидилхоліну, який є головним компонентом фракції фосфатидів яєчного жовтка і бобів сої. У деяких медичних виданнях термін «лецитин» означає 1,2-діацил-гліцери-3-фосфатидилхолін (L- $\alpha$ -лецитин). На противагу такому визначенню, у промисловості (зокрема, у технології виготовлення ліків та харчових добавок) і в торгівлі термін «лецитин» застосовують для визначення суміші нейтральних ліпідів (тригліцеридів, невеликої кількості «вільних» жирних кислот і стеролів), полярних ліпідів (фосфо- і гліколіпідів) та вуглеводів.

Лецитин знайдено в усіх живих організмах. Полярні ліпиди й інші фосфоліпиди виявляють у складі мембранних структур клітин тварин, рослин і мікроорганізмів. Однак для комерційного використання важливими є передусім джерела сировини з високою концентрацією фосфоліпідів. У тваринному світі це жовтки яєць, але вони досить дорогі. Рослинні джерела більш економічні, однак фосфоліпідний склад лецитину істотно змінюється залежно від клімату, ґрунту, умов росту, часу та терміну збору врожаю і виробничих умов. При цьому змінюються склад і властивості лецитину.

Комерційний (сирий) лецитин рослинного походження — досить складна суміш фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, фосфатидіінозиту та тригліцеридів. Крім того, до складу лецитину входять лізофосфатидилхолін, лізофосфатидилетаноламін і фосфатидилсерин. Для використання лецитину в різних галузях промисловості, зокрема в фармакології, слід виділити речо-

вину чи групу речовин, які мають визначальні фармакологічні або фізико-хімічні властивості. Розроблення ефективних способів ідентифікації й розділення сумішей фосфоліпідів дає підставу на цей час стверджувати, що застосування препаратів лецитину у фармакології можна пов'язати з присутністю фосфатидилхоліну. Оскільки комерційні препарати лецитину — складні суміші, то стандартизація індивідуальних фосфоліпідів окрім їх ідентифікації та кількісного аналізу має також на меті аналіз показників якості.

Одержання фосфоліпідів із фосфатидних концентратів рослинного або тваринного походження здійснюється фракціонуванням органічними розчинниками. Традиційно найпопулярнішою сировиною для побудови ліпосом є яєчний або соєвий РС. Однак вміст РС у соєвих бобах — основному джерелі його виробництва з рослинної сировини — становить не більше 22–35,5% від загальної кількості фосфоліпідів, тимчасом як у жовтках курячих яєць — близько 72%. Це потребує для одержання рівних кількостей РС значно більше рослинної сировини, ніж курячих яєць.

Останнім часом увагу дослідників звернено на технологію лецитину і РС соняшнику [21–30]. Це зумовлено тим, що вміст фосфоліпідів у його насінні практично не відрізняється від бобів сої, проте кількість поліненасичених жирних кислот більша, і виділення фосфоліпідів відбувається за м'якої температурної обробки [31–34].

Порівняльні характеристики лецитину із соняшнику і сої [21, 24, 35–38] показали, що за основними показниками вони ідентичні, а за деякими (вміст тригліцеридів та вільних жирних кислот) лецитин із соняшнику перевершує соєвий (рис. 7).

### Виробництво ліпосомальних систем

На цей час запропоновано багато різноманітних способів конструювання ліпідних везикул [39–49], що дають змогу одержувати ліпосоми різного розміру, складу, структури і внутрішнього об'єму. Властивості ліпосом, що утворюються із фосфоліпідів у водному середовищі, значною мірою залежать від способу їх одержання.

Багатошарові ліпосоми можуть утворюватися під час струшування водної дисперсії набряклого ліпиду. При цьому одержують суспензію ліпосом із широким розподілом за розмірами. Відносно гомогенну дисперсію ліпосом можна одержати, пропустивши їх

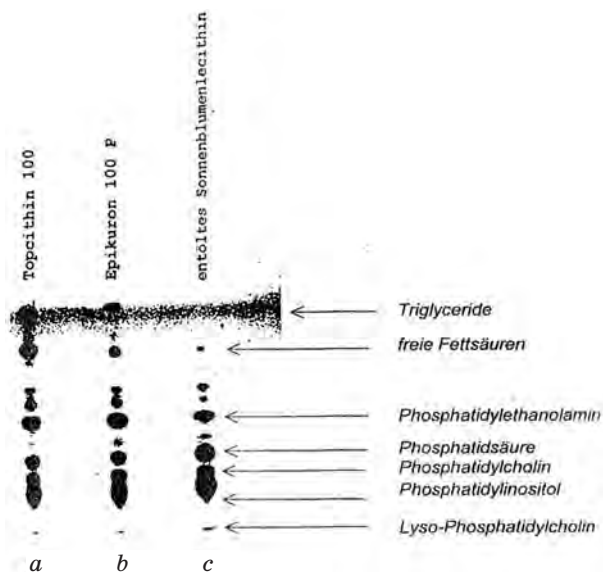


Рис. 7. Порівняльний склад лецитину із соняшнику та сої<sup>^</sup>  
a, b — лецитин із сої; c — лецитин із соняшнику

через полікарбонатні фільтри із заданим розміром пор. Відстань між сусідніми ліпідними бішарами становить 2–3 нм, але може зростати до 20 нм і більше у разі заряджених бішарів. На 1 моль ліпиду багатшарові ліпосоми містять від 1 до 4 мл води. Вони мають властивості ідеального осмометра, змінюючи свій об'єм у відповідь на зміну концентрації водного середовища.

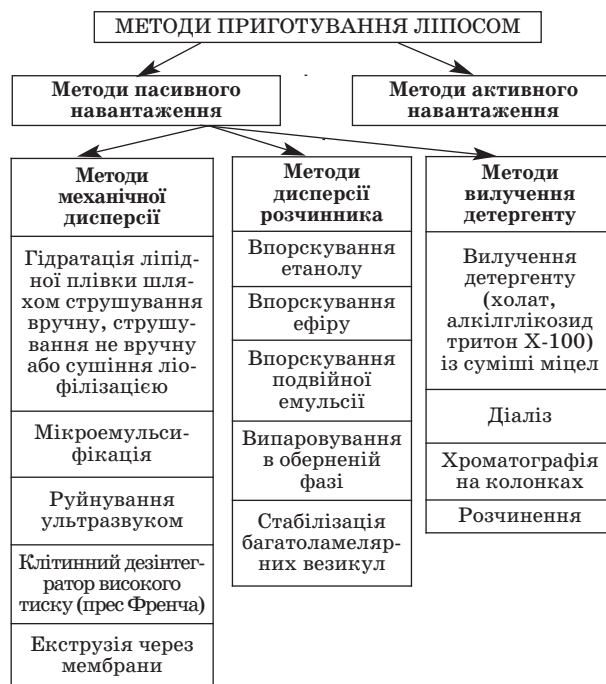
Крім того, багатшарові везикули можуть бути одержані за технологією, що включає процеси заморожування — танення і забезпечує багаторазове збільшення (з 5,8% до 88,6%) ефективності інкапсулювання порівняно з класичною технологією, яка ґрунтується на механічному перемішуванні ліпідної плівки з водою.

Малі моноламельярні ліпосоми одержують із багатшарових, обробляючи їх ультразвуком, впорскуючи спиртовий розчин ліпідів у водне середовище, пропусканням під великим тиском ліпідних дисперсій через невеликий отвір, а також методом видалення детергенту, що солюбілізує ліпід, діалізом або гель-фільтрацією. Такі ліпосоми містять 0,2–1,5 мл води на 1 моль ліпиду. Внаслідок малого розміру самої везикули ефективність інкапсулювання БАР у малі одношарові везикули знижується. Такі ліпосоми не мають осмотичної активності і не коагулюють протягом тривалого часу. Дрібні одношарові ліпосоми відрізняються високою агрегатною нестійкістю — вони або «закриваються», або піддаються коалесценції.

Великі моноламельярні ліпосоми мають значний внутрішній об'єм води (8–14 мл на 1 моль ліпиду) і осмотичну активність. Зазвичай їх виділяють видаленням солюбілізуючого детергенту в умовах контрольованого діалізу або впорскуванням розчину ліпиду в розчинник (діетиловий ефір, петролейний ефір, пентан) у підігріту до 60 °C воду. Можлива і пряма екструзія під тиском до 5,5 МПа через фільтри з розміром пор близько 0,03 мкм. При цьому досягається ефективність інкапсулювання до 60%. Окрім того, великі одношарові ліпосоми можуть бути також виділені з малих ліпосом шляхом їх злиття під дією  $\text{Ca}^{2+}$  або в умовах термотропного фазового переходу.

Теоретично створення ліпосом можливе за допомогою диспергування відповідних ліпідів у воді. Однак на практиці мембранні ліпіди важко диспергуються у воді, тому для одержання дисперсії використовують органічні розчинники або досить енергоємні процедури [48, 49].

Істотно відрізняється від існуючих методів виробництва ліпосом спосіб, яким ліпід диспергують у водне середовище. Деякі методики створено спеціально для виробництва ліпосом зі специфічним застосуванням. Розмір ліпосом, розподіл їх за розмірами, ефективність захоплення БАР, утримувальна здатність — усе це слід брати до уваги, вибираючи відповідну методику. Методи одержання ліпосом можна класифікувати залежно від способу навантаження БАР. Існують методи пасивного і активного навантаження (схема).



Широке коло стандартних методів, розроблених для формування ліпосом, можна розділити на три основні групи:

- тонкоплівкові методи;
- засновані на застосуванні розчинників;
- із застосуванням високого тиску.

Згідно з більшістю із цих методів мембранні ліпіди так само, як і жиророзчинні інгредієнти, спочатку розчиняють в органічному розчинникові для досягнення гомогенної суміші, а потім суміш висушують для видалення максимальної кількості розчинника.

За тонкоплівковим методом розчинник видаляють випарюванням у роторному випарнику, одержуючи тонку плівку ліпиду на склі. Далі до ліпідної плівки додають воду та водорозчинні інгредієнти і струшують.

У методах, заснованих на застосуванні розчинників (етанол- або ефірінжекторний метод), суміш ліпиду і розчинника впорскують через голку безпосередньо у водну фазу з водорозчинними інгредієнтами. Потім розчинник видаляють діалізом або випарюванням (етанолінжекторна методика) або поступово випарюють під час повільного впорскування в гарячу водну фазу (ефірінжекторна методика).

Для виробництва багатошарових ліпосом без застосування розчинників використовують метод мікрофлюїдизації. Ліпідний пре-

парат і водне середовище прокачують під високим тиском через мікроканали і розділяють на два струмені, які стикаються один з одним на високій швидкості.

Для створення ліпосом молекули ліпідів слід ввести у водне середовище. У роботі [50] наведено співвідношення способу гідратації ліпідів (первинного формування ліпосом) зі структурою ліпосом.

Відомі кілька способів гідратації ліпідів. Класифікацію їх подано в табл. 4.

Окрім цих методів, було ще розроблено додаткові, такі як процес «заморожування–танення», сублімаційного сушіння та екструзії. Проте всі вони ґрунтуються на гідратації ліпідів і попередньому одержанні «пустих» везикул.

### Формування за плівковими методами

Властивості ліпідів змінюються залежно від їхнього складу. Однак один і той самий метод формування ліпосом можна використати для створення ліпідних везикул незалежно від їхнього складу. Загальними етапами є підготовка ліпідів для гідратації, гідратація шляхом змішування і калібрування з метою рівномірного розподілу везикул [51]. Розроблено багато різних варіантів

Таблиця 4. Методи одержання ліпосом та кінцевих продуктів [50]

| Методи                                                                      | Везикули                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Механічні методи</i>                                                     |                                             |
| Струшування у вортексі або ручне                                            | MLV                                         |
| Екструзія через полікарбонатні мембрани за низького або середнього тиску    | OLV, LUV                                    |
| Екструзія за допомогою преса Френча, техніка «мікрофлюїдаїзера»             |                                             |
| Гомогенізація високим тиском                                                | Здебільшого SUV                             |
| Оброблення ультразвуком                                                     | Здебільшого SUV<br>SUV мінімального розміру |
| Кавітація                                                                   | BSV                                         |
| <i>Методи, що ґрунтуються на заміні органічного розчинника водною фазою</i> |                                             |
| Видалення розчинника(ів)                                                    |                                             |
| Використання не змішуваних з водою розчинників: ефіру і петролейного ефіру  | MLV, OLV, SUV<br>MLV, OLV, LUV              |
| Впорскування етанолу                                                        |                                             |
| Впорскування ефіру (випаровування розчинника)                               | LUV                                         |
| Випаровування в оберненій фазі                                              | LUV, OLV, MLV                               |
| <i>Методи, засновані на видаленні детергенту</i>                            |                                             |
| Гель-хроматографія                                                          | SUV                                         |
| «Повільний» діаліз                                                          | LUV, OLV, MLV                               |
| Швидке розбавлення                                                          | LUV, OLV                                    |
| Інші методи                                                                 | MLV, OLV, LUV, SUV                          |

цього методу, що відрізняються тільки органічними розчинниками, які використовують для розчинення ліпідів, способами сушіння ліпідів і регідратації плівки.

Незважаючи на різні модифікації, спільним для всіх цих методів було одержання неоднорідних популяцій багатошарових ліпосом, розмір яких залежав від заряду ліпідів. Заряджені ліпіди утворювали менші за розмірами ліпосом з меншою кількістю шарів.

Плівкові методи мають низку переваг. Їх можна застосовувати для різноманітних видів ліпідних сумішей. Вони прості у використанні, мають високий рівень інкапсуляції ліпідів і розчинних у воді речовин. Одним з основних недоліків є труднощі масштабування до промислових об'ємів.

Для створення ліпосом з відносно однорідними розмірами було створено кілька методів зменшення їхнього розміру. Вперше опублікованим методом зменшення розміру був ультразвуковий [52]. За цим методом значне споживання енергії внаслідок процесу кавітації мало місце до ліпосомальної дисперсії або безпосередньо в контакт з накопичником чи опосередковано у сонікаторі.

Інші методи, які руйнують великі багатошарові везикули, — гомогенізація, деформація або гомогенізація під високим тиском. До цієї групи включено також методи мікрофлюїдизації, гомогенізації під високим тиском, а також гомогенізації, спричиненої силою зсуву (струшування).

Найвідоміший метод для зменшення розміру — екструзія через фільтри (мембрани) із чітко визначеними отворами.

### Методи гомогенізації

Ці методи застосовували у біології та мікробіології для руйнування клітин. Потім їх почали використовувати для зменшення розміру і кількості шарів багатошарових ліпосом.

Прес Френча [53] спочатку було створено для руйнування клітин за більш прийнятних умов порівняно з ультразвуковими методами, оскільки ліпіди, як і протеїни або інші чутливі сполуки, могли розкладатися під дією ультразвуку. Цю систему зазвичай використовують для об'ємів від 1 до 40 мл і тому вона не придатна для масштабного виробництва. Проте промислову стратегію масштабування, засновану на цій техніці, було реалізовано в процесі мікрофлюїдизації.

Починаючи з об'єму від 50 мл і більше для руйнування багатошарових ліпосомальних систем застосовують високий тиск.

Обладнання працює в діапазоні тиску 2–200 бар із системою нагрівання та охолодження і за контролю температури зразка під час оброблення [54]. Ліпосомальна суспензія проходить через отвори різних розмірів кілька разів (до тисячі проходів). Під час цього процесу ліпосоми утворюються в діапазоні від 50 до 100 нм. Цей метод підходить для широкомасштабного промислового виробництва стерильних ліпосом.

На відміну від мікрофлюїдизації, де потік рідини розщеплюється і змішується у спеціальній камері, гомогенізатори працюють за іншим принципом. У гомогенізаторі струм рідини під дією високого тиску проходить через отвір і стикається зі стінкою камери. Ліпосомальна суспензія безперервно прокачується через систему гомогенізатора, де генерується високий тиск для зменшення розміру ліпідних везикул [55].

Відомим методом зменшення розміру ліпосом із можливістю масштабування є екструзія. За цим методом везикули пропускають через мембрани за нижчого тиску, ніж у методі прес Френча. Методику екструзії через полікарбонатні мембрани вперше було опубліковано в роботі [56]. Дослідження впливу складу ліпідів і розміру мембрани на створення ліпосом у процесі екструзії було здійснено в роботі [57]. Для всіх методів зменшення розміру ліпосоми мають бути екструдовані за температури вище  $T_c$  фазового переходу.

Альтернативою є розроблений безперервний екструзійний пристрій [58], що працює із системою насосів і складається з термостабільних скляних ємностей, безпосередньо пов'язаних із пневматичним поршневым насосом високого тиску. Останній працює за тиску нижче 0,5 МПа (5 бар). Газ не вступає в контакт з ліпосомальною суспензією, і робочий тиск під час екструзії може за допомогою редукційного клапана досягати 12 МПа (120 бар).

Спільним для всіх розглянутих методів екструзії є те, що відтворюваність розміру везикул є надзвичайно високою, а системи з нагрівальним елементом можна використовувати як для насичених, так і для ненасичених жирних кислот. Основним недоліком є тривалий період підготовки, починаючи з одержання «пустих» ліпосом, далі заморожування — танення і, нарешті, екструзія. Загалом, можливі високі втрати продукту, особливо якщо відбувається засмічення екструзійних мембран, що призводить до технічних обмежень під час широкомасштабного виробництва.

### Методи, засновані на заміні органічних розчинників водним середовищем

Ці методи формування ліпосом об'єднують, що органічні розчинники, які змішуються або не змішуються з водою, заміщуються водним розчином. Така заміна здійснюється або шляхом введення ліпідів, що містять органічний розчин, у водну фазу — методи впорскування, або ступінчастим додаванням водної фази в органічну фазу. Методи емульгування, зокрема метод випаровування в оберненій фазі та метод подвійної емульсії, ґрунтуються на заміщенні розчинника, що не змішується з водою, водною фазою, унаслідок чого утворюються ліпосоми з високим рівнем інкапсуляції гідрофільних речовин, а також речовин, розчинних у ліпідній фазі.

#### Метод впорскування етанолу

Цей метод уперше було описано в роботі [59] як альтернативу формуванню SUV без використання ультразвуку. За цим методом молекули ліпідів утворюють спочатку двохарові пласкі фрагменти, які потім формують ліпосомальні системи, інкапсулюючи водну фазу [60].

Параметри процесу формування, які впливають на розмір ліпосом, розподіл за розмірами та ефективність інкапсуляції, більш детально досліджено в роботі [61]. Показано, що концентрація ліпідів у етанолі — це один із параметрів, що впливають на формування ліпосом. Швидкість перемішування водної фази і впорскування не мала значного впливу на розмір ліпосом та розподіл їх за розмірами.

Інший, модифікований, метод впорскування етанолу [62] тією чи іншою мірою є поєднанням методів впорскування етанолу, проліпосом і технології випаровування в зворотній фазі. Він має певні переваги, оскільки технологія, у принципі, є нескладною для масштабування, а етанол — відносно нешкідливий розчинник, дозволений для впорскування у концентрації максимум 0,1% [63]. Можна використовувати й деякі інші розчинники, однак слід мати на увазі норми стосовно залишків розчинників, що їх поділяють на різні категорії за Європейською чи Американською фармакопеями.

У роботі [64] подано результати розвитку технології виробництва ліпосом у промислових масштабах, що ґрунтується на техніці впорскування етанолу. Таку технологію було використано для ліпосомальних інкапсуляцій еконазолу, похідного імідазолу, для місцевого лікування дерматомікозів. Вона

поєднувала принципи системи впорскування етанолу і гомогенізації за високої швидкості зсуву.

Беручи за основу метод впорскування етанолу, автори [65] розробили технологію зі стерильними умовами виробництва, придатну для будь-яких масштабів — від звичайного процесу одержання однієї партії до безперервного виробництва. При цьому основним елементом був спеціально розроблений модуль [66]. До переваг цієї технології належить можливість змінювання характеристик струменів впорскування, що дає змогу здійснювати виробництво ліпосом незалежно від масштабів виробництва, оскільки масштабування визначається тільки розмірами ємностей. Визначивши параметри процесу в лабораторних умовах, можна легко змінити масштабування виробництва зміною виробничих ємностей, які можна стерилізувати паром або в автоклаві. Усю сировину (буферні розчини, розчин ліпідів у етанолі і навіть азот для тиску впорскування) передають до системи санітарної обробки та стерилізації через 0,2 мкм фільтри, що є гарантією асептичного виробництва [67].

Розмір ліпосом можна контролювати за допомогою локальної концентрації ліпідів у місці впорскування, яка визначається за концентрацією ліпідів у етанолі, діаметром сопла, тиском упорскування і швидкістю потоку водної фази. Змінюючи ці параметри, можна виділити ліпосоми різних розмірів. Ці параметри також є визначальними для відповідного рівня відтворення стосовно діаметрів везикул і швидкості інкапсуляції [68]. Наступним кроком процесу було видалення етанолу, а також залишків БАР за допомогою тангенціальної фільтрації потоку.

Ще однією важливою перевагою цього методу є придатність до інкапсуляції БАР [71], якої було досягнуто пасивною інкапсуляцією таких речовин, як великі гідрофільні протеїни, та за допомогою методу одноступеневого завантаження малих амфіфільних лікарських препаратів або методу асоціації антигенів для вакцин [69].

#### Метод проліпосом–ліпосом

Основою цього методу є перетворення вихідної проліпосомальної форми на ліпосомальну дисперсію шляхом розведення у водній фазі [62]. Його використовують для інкапсуляції широкого спектра речовин з різним ступенем розчинності у воді або спирті і з надзвичайно високою ефективністю інкапсуляції порівнянно з іншими методами, що ґрунтуються на пасивному захопленні.

На основі цього методу [70, 71] розроблено процес стерильного виробництва ліпосом. Процес одержання ліпосом корегували зміною швидкості розведення і температури. Метод легко піддається масштабуванню, що робить його альтернативою виробництву ліпосом для клінічного застосування.

#### *Випаровування в реверсній (оберненій) фазі (REV)*

Аналогічно методам впорскування гідратація ліпідів може відбуватися шляхом розчинення в органічному розчинникові з подальшим введенням у водну фазу. Органічна фаза не змішується з водною і таким чином створюється емульсія олії у воді, яку в подальшому розбавляють водною фазою для створення ліпосом [72]. Перевагою цієї технології одержання ліпосом є високий рівень інкапсуляції БАР — до 50%. В одному з варіантів методу мікроемульсії — подвійної емульсії — було збільшено швидкість інкапсуляції для одержання одношарових ліпосом [73]. Одним з можливих недоліків цього методу є залишкові концентрації розчинника. Інший момент стосується можливості здійснення масштабування виробництва, відповідних перемішувальних пристроїв для створення мікроемульсії та насосів для розведення.

#### **Методи, засновані на видаленні детергентів**

За цими методами для солюбілізації ліпідів у міцелярних системах використовують детергенти. На відміну від ліпідів, детергенти добре розчиняються як у воді, так і в розчинниках. Існує рівновага між молекулами детергенту у водній фазі й ліпідами у середовищі міцели. Розмір і форма одержаних везикул залежать від хімічної природи детергентів, їхньої концентрації та характеристик ліпідів. На сьогодні найпоширеніший метод реконструкції мембранних протеїнів включає солюбілізацію протеїнів мембрани і фосфоліпідів [74–76]. Загальні способи видалення детергенту зі змішаних міцел — розведення [77], гель-хроматографія [78] та діаліз через порожнисті волокна [79] або мембранні фільтри [80]. Окрім того, детергенти можна видаляти адсорбцією гідрофобними смолами або циклодекстринами [81]. Діаліз змішаних міцел у водному середовищі вперше описано в роботі [82]. Цей метод формування везикул передбачає збереження міцели, тимчасом як вільні молекули детергенту видаляють. Аби краще кон-

тролювати формування протеоліпосом, було розроблено нову методику, що поєднує передову технологію впорскування етанолу, а також метод перехресних струменів упорскування (впорскування у перехресному потоці) [65] з розчиненням детергенту за одноступеневим методом. Таким чином, ліпідні везикули утворюються відразу після впорскування в міцелярні розчини протеїнів. Складну технологію впорскування [66], яку раніше використовували для пасивної інкапсуляції розчинних у воді протеїнів, можна адаптувати для одноступеневого процесу розведення детергенту/формування везикул [69].

Найвідомішою технологією одержання полімерних ліпосом є метод з використанням синтетичних ліпідів на основі діациллен-, дієн- і метакрилоїл-похідних фосфатидилхоліну та диметилдіалкіламіну. За рахунок диспергування у водному середовищі й нагрівання вище температури фазового переходу такі ліпіди утворюють замкнені бульбашки, що складаються із серії концентричних сфер, розділених водною фазою.

Полімеризація може здійснюватись як у гідрофобній, так і в гідрофільній ділянці бішару. Вона ініціюється або УФ-опроміненням (довжина хвилі 254 нм), або радикальною полімеризацією — за допомогою азабіс-ізобутиронітрилу. Залежно від типу ліпиду, умов полімеризації, тривалості опромінення і його інтенсивності методом приготування водної дисперсії виділяють ліпосоми діаметром від декількох десятків до декількох сотень нанометрів. Порівнянно зі звичайними ліпосомами полімерні є більш стабільними. Крім того, полімерні ліпосоми, що містять у своїй структурі поліакрилові кислоти, мають противірусні властивості.

У роботі [83] аналізують ліпосоми, одержані методами етанольної інжекції, випарювання з оберненої фази, ручного струшування і оброблення ультразвуком. У результаті досліджень автори встановили, що найбільш ефективним є метод «випарювання з оберненої фази», який дає змогу виділяти ліпосоми з рівнем включення 80%.

Ліпосоми, одержані різними методами, відрізняються за розміром і структурою. Найбільші везикули можна вилучити за допомогою методу ручного струшування. Ліпосоми, одержані методом етанольної інжекції та випарювання з оберненої фази, містять гетерогенні за величиною везикули, проте в середньому вони приблизно удвічі дрібніші. Оброблені ультразвуком ліпосоми були найбільш однорідними і досить дрібними за розмірами (середній діаметр ~ 12 нм).

Збільшення кількості ліпідів у препараті та зменшення кількості активної речовини дає змогу значно підвищити включення активних речовин. Наприклад, за постійної кількості ліпідів у препараті й зміни кількості використовуваного інсуліну (20, 100, 500, 2000 Од/г) ступінь включення гормону в ліпосому становить 96, 91, 84 і 40%, відповідно. Для більшості вивчених БАР оптимальне співвідношення активний компонент : ліпід у ліпосомі становить 1:10 [84].

Автори роботи [85], вивчаючи метод одержання ліпосомальних препаратів, призначених для лікування туберкульозу, експериментально порівняли чотири методи (ультразвукове диспергування, детергентний діаліз, багаторазове заморожування-танення і механічне диспергування) і показали, що оптимальним є механічне диспергування. У результаті застосування цього методу було виділено мультиламелярні ліпосоми, що містили яєчний фосфатидилхолін, холестерол і стеаринову кислоту в співвідношенні 10:0,5:0,2. Для підвищення стабільності під час зберігання до їхнього складу було введено  $\alpha$ -токоферол (6 мг/мл). Сумарна концентрація ліпідів у ліпосомах становила 200 мг/мл [86].

У роботі [87] для одержання ефективного ліпосомального індуктора інтерферону використовували модифікований метод екструзії багатопарових (мультиламелярних) везикул через ядерні мембрани, одержані на основі поліетилентерефталатної плівки. Метод уможливив виділення ліпосом із включенням активного компонента до 55–65%. Для підвищення стабільності ліпосомального препарату застосовували заморожування за температури від  $-30^{\circ}\text{C}$  до  $-50^{\circ}\text{C}$ , після чого ліофільно висушували упродовж 36–48 год. Відразу після сушіння флакони герметично закупорювали в атмосфері інертного газу в асептичних умовах. Ліпосоми зберігали стабільність упродовж тривалого часу (рік) при температурі  $4^{\circ}\text{C}$ . Оцінювання стабільності ліпосомальної форми було проведено методом аналізу накопичення у препараті пероксидів ліпідів за збереження інтерфероніндукувальної активності [88]. Встановлено, що під час зберігання протягом 1 року зниження інтерфероніндукувальної активності та накопичення у препараті пероксидів ліпідів не відбувається.

У роботі [89] запропоновано спосіб одержання композиції у три стадії. На першій утворюються пусті ліпосоми, на другій — відбувається змішування отриманих ліпо-

сом із розчином кріопротектора і активним компонентом, на третій — проводять висушування. Такий метод забезпечував одержання дрібних ліпосом (розміром від 100 до 200 нм) з високою інкапсулювальною активністю, що особливо корисно у процесі виробництва фармацевтичних препаратів. Метод давав змогу скоротити час процесу і виділити стабільні ліпосоми.

Висушування суміші, яка містить ліпосоми, можна проводити з використанням традиційних методів, зокрема ліофільного або розпилювального сушіння, флеш-кристалізації, сушіння в повітряному потоці (наприклад, у псевдозрідженому шарі), вакуумного та пічного сушіння тощо. Механічні властивості продуктів, висушених різними способами, відрізнятимуться: продукт розпилювального сушіння — порошок, ліофільним висушуванням отримують твердий «коржик», однак властивості ліпосом за регідратації, з погляду їх стабільності, будуть загально схожі. Механічні властивості ліпосом, одержаних за допомогою розпилювального сушіння, кращі, ніж за ліофільного сушіння.

Спосіб виробництва ліпосом, стабільних під час зберігання, запропоновано в оботі [90]. Везикула містить оболонку з лецитину і негативно зарядженого компонента, яким слугує суміш кислих фосфоліпідів, що виділяються із соєвих фосфатидів. Склад оболонки такої ліпосоми, апробований у лабораторних умовах, дозволяє виділяти суспензії апірогенних і атоксичних ліпосом, стійких під час зберігання протягом 1 року і зі стабільними фізико-хімічними та біологічними властивостями.

Спосіб одержання ліпосом та їх суспензій включає розчинення нейтральних заряджених фосфоліпідів, що містять залишки насичених жирних кислот; видалення розчинника; одержання залишку; змішування залишку з водним розчином, який може містити БАР; струшування або перемішування отриманої суміші [91]. Масове співвідношення нейтрального і зарядженого фосфоліпідів — від 200:1 до 3:1. Ліпосоми, отримані за цим методом, мають середній розмір від 50 до 3000 нм, інкапсулювальна здатність становить 6–10 мл/г, загальна концентрація ліпідів — від 20 мг/мл до 100 мг/мл. Нейтральний ліпід — фосфатидилхолін, заряджені фосфоліпіди — фосфатидилсерин, фосфатидилгліцерол, фосфатидилінозит, фосфатидна кислота або ефір фосфатидної кислоти й аміноспирту.

Запатентовано спосіб [92] одержання одношарових та багатошарових ліпосом діаметром більше 0,1 мкм, що містять нерозчинений або розчинний у воді субстрат, який складається з біологічно, хімічно або фізично активних частинок, і передбачає три стадії: утворення ліпосом; сушіння заморожуванням (ліофілізацію); їх регідратацію в подрібненій суміші з матеріалом, який в них міститься. Сировиною для одержання ліпосом є фосфатидилхолін і/або дистеароїлфосфатидилхолін. Ліпідна композиція додатково містить один або декілька таких компонентів, як холестерол, фосфатидилгліцерол і триолеїн. Стадію ліофілізації проводять з БАР, яка має бути інкапсульована.

Фактично весь органічний розчинник (хлороформ), що його використовують для отримання ліпосом у першій стадії, видаляють перед стадією регідратації або ліофілізації. Як активний матеріал застосовують мікроорганізми, клітини рослин чи тварин або нерозчинні у воді структури, що мають незначну біохімічну або імунологічну активність в органічному розчинникові. Після стадії регідратації мікроорганізми або клітини одержують поживні речовини через мембрану ліпосом, що сприяє їх культивуванню і розмноженню. Описаний спосіб дає змогу виділяти на першій стадії одношарові ліпосом діаметром 0,1–50,0 мкм і багатошарові — 1,0–30,0 мкм. Третю стадію проводять регульованим додаванням води в малій кількості, достатній для утворення суспензії, з наступним додаванням через 20–40 хв такої самої кількості відповідного буфера, біологічно сумісного з матеріалом, що інкапсулюється. Суспензію витримують 20–40 хв і змішують з великим об'ємом буфера (сольовий розчин з фосфатним буфером), рН — 7,4.

У роботі [93] для одержання ліпосомних аерозолів з малим розміром частинок для доставлення антиканцерогенних лікарських препаратів застосовують спосіб, що передбачає стадії розчинення: ліпідрозчинного протиракового лікарського препарату, відповідного ліпиду для композиції і доставлення препарату за допомогою аерозолі; об'єднання розчинених препарату і ліпиду з одержанням розчину, в якому концентрація препарату не перевищує близько 10% від загального об'єму; випарювання розчинників із розчину.

Згодом було розроблено форму полімеризованих ліпосом, у яких фосфоліпіди, що утворюють ліпосому, з'єднані один з одним ковалентними зв'язками і не злипаються під дією фізичних сил. Це сприяло більшій

стабільності порівнянно зі звичайними ліпосомами, запобігало їх агрегації та злипанню як у процесі одержання, так і під час зберігання.

### Проліпосомний підхід у виробництві ліпосом

Під проліпосомами розуміють речовини, які у процесі взаємодії з водою спонтанно утворюють ліпосоми. Цей метод дає змогу вирішити дві основні проблеми: одержання стерильних проліпосомальних форм та інкапсулювання активних компонентів безпосередньо перед введенням в організм [94].

Проліпосоми самі по собі складаються з ретельно відібраної суміші фосфоліпідів у гідрофільному середовищі — суміші гідрофільних розчинників, зазвичай, але не обов'язково, водного етанолу та гліцеролу [95]. У проліпосомах ліпіди структуровані у формі складених бішарів. Система не містить достатньої кількості води для формування ліпосом. Утворення ліпосом починається з простого додавання надлишку води. При цьому для клініки потрібен стабільний препарат, що зберігається тривалий час. Отже, ліпосоми потрібно висушити так, щоб перед уживанням залишалося тільки додати води, при цьому має утворитись така сама суспензія ліпосом, як і вихідна (до сушіння). Крім того, більша частина БАР має бути всередині ліпосом, інакше вся процедура втрачає сенс.

Можна використовувати два основних типи проліпосом. Один — із ненасиченими фосфоліпідами, які перебувають у рідкокристалічній фазі вже за кімнатної температури, інший — з гідрогенізованими фосфоліпідами у стані гелю.

Оскільки ліпосоми можуть бути утворені тільки в рідкокристалічній фазі, формування їх із використанням гідрогенізованих фосфоліпідів слід виконувати за підвищеної температури.

Існує кілька способів одержання проліпосом [96–98]. Один із них — регідратація ліофільно висушених у вигляді тонкої плівки фосфоліпідів. Для цього вихідні ліпіди розчиняють в органічному розчинникові (хлороформ або етанол), потім розчин висушують до утворення тонкої плівки ліпідів. Після додавання до отриманої плівки води або водного буферного розчину утворюються багатошарові ліпосоми [99].

Запропоновано спосіб одержання проліпосом змішуванням фосфоліпідів, органічного розчинника і наповнювача. Активними

компонентами у проліпосомах слугують протеїни або ензими. Характерною особливістю цього методу є те, що біологічно активний компонент вводять у проліпосоми шляхом змішування сухих проліпосом з розчином БАР у полярному розчинникові, а сушіння їх проводять у два етапи — до і після введення БАР. Концентрація БАР у водних розчинах становить від 0,01 до 5,0 мг/мл [100].

Відомий також спосіб одержання проліпосом на основі так званих речовин-носіїв [99, 101]. Як носії використовують речовини, що мають розвинену зовнішню і внутрішню поверхню (високопористі), не розчинні в органічних розчинниках і добре розчинні у воді, наприклад цукри і полісахариди (глюкоза, фруктоза, декстрини тощо), поліоли (сорбіт, ксиліт та ін.), солі та порошкоподібні речовини. У роботі [101] запропоновано застосовувати не розчинні у воді й органічному розчинникові речовини (наприклад, оксид кремнію) або полімери, що набухають у воді, які потім видаляють із ліпосомальної дисперсії діалізом чи центрифугуванням.

Існує ще один спосіб утворення ліпосом. Ліпосомальні дисперсії утворюються з негативно заряджених ліпідів, які набухають

у воді (фосфатидилсерин, фосфатидна кислота, фосфатидилгліцерол). Ліпіди, які не несуть заряду або є в цілому електрично нейтральними (фосфатидилхолін), не набухають зовсім або набухають лише до граничної товщини водного прошарку між ламелами. Заряджені ліпіди схильні до необмеженого набухання і можуть включати воду між ламелами аж до порогової точки, коли утворюються фази повністю гідратованих моноламелярних везикул, що перебувають у стані рівноваги з водою. Ступінь набухання і відносна стабільність моно- і мультиламелярних структур визначаються електростатичними взаємодіями. За низької іонної сили відбувається дестабілізація мультиламелярних структур. Необмежене набрякання може відбуватись і в тому разі, коли в суміші ліпідів міститься всього кілька відсотків заряджених ліпідів.

Основні типи проліпосом наведено в табл. 5.

Таким чином, сучасні проліпосомні технології дають змогу: уникнути енергоємних стадій, небажаних розчинників, застосовувати нескладне обладнання, зробити відносно нескладним інкапсулювання корисних речовин, проводити масштабування у промисловому виробництві.

Таблиця 5. Типи проліпосом [100]

| Показники                                     | Проліпосоми С                     | Проліпосоми S                                                               | Проліпосоми Н                                                               | Проліпосоми DUO                |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Склад</i>                                  |                                   |                                                                             |                                                                             |                                |
| Масова частка фосфатидів                      | Ненасичені соєві фосфоліпіди 40 % | Ненасичений фосфатидилхолін +заряджені ліпіди 30%                           | Гідратований фосфатидилхолін 20%                                            | Ненасичені соєві фосфатиди 50% |
| Масова частка гідрофільного середовища        | Гліцерол / водний етанол 60 %     | Водний етанол 70 %                                                          | Водний етанол 80 %                                                          | Гліцерол/водний етанол 50%     |
| <i>Фізико-хімічні показники</i>               |                                   |                                                                             |                                                                             |                                |
| Водневий показник (рН) 1% -го розчину         | 5–6                               | 5–7                                                                         | 5–7                                                                         | 5–6                            |
| <i>Характеристика отриманих ліпосом</i>       |                                   |                                                                             |                                                                             |                                |
| Розчинник                                     |                                   | Демінералізована вода                                                       | Демінералізована вода                                                       |                                |
| Діаметр, нм                                   |                                   | 225–250                                                                     | 300                                                                         |                                |
| Внутрішній об'єм, мл/г                        |                                   | 10                                                                          | 10                                                                          |                                |
| Структура                                     |                                   | Олігошарова або багатошарова                                                |                                                                             |                                |
| Ефективність використання внутрішнього об'єму |                                   | 100% — у разі ліпофільних компонентів;<br>до 50% — гідрофільних компонентів | 100% — у разі ліпофільних компонентів;<br>до 60% — гідрофільних компонентів |                                |

Незалежно від того, який проліпосомний спосіб обрано, приготування ліпосом має відбуватися за вищої температури, ніж під час переходу ліпиду з гелю в рідкокристалічну фазу. Ця температура переходу, як правило, нижча 0 °C, але в разі повністю гідрогенізованих (насичених) ліпідів може бути значно вищою за кімнатну. Якщо використовують такі ліпіди, то процедура приготування проліпосом залишається такою самою, але всі операції слід виконувати за підвищених температур.

У роботі [94] показано, що захоплення водорозчинних компонентів є найефективнішим за двостадійного процесу розведення. Схему процесу подано в табл. 6.

У разі використання цих методів ефективність захоплення для більшості гідрофільних речовин зазвичай лежить у межах 40–60%, але може досягати 70–80%. Для ліпофільних речовин ефективність захоплення змінюється залежно від їхніх індивідуальних властивостей і може наближатися до 100%. Однак кількість жиророзчинних компонентів загалом не перевищує 25% від вмісту фосфоліпиду.

Основна перевага системи проліпосом — можливість завантаження гідрофільних і ліпофільних активних компонентів [102, 103].

### Аналізування ліпосом

Для характеристики ліпосом і ліпосомальних препаратів існують численні методи дослідження. Недоліком, загальним для всіх методів вимірювання, є необхідність застосування складного обладнання, що

навіть на сьогодні унеможливорює швидке одержання достовірних параметрів якості. Основні характеристики ліпосом та методи їх контролю наведено в табл. 7.

Головні чинники, які характеризують ефективність ліпосомальних препаратів: фізична присутність ліпосом, їхній розмір і кількість шарів, об'єм внутрішньої ділянки.

Методами оцінки якості ліпосом є, зокрема, світлорозсіювання, фотонна кореляційна спектроскопія, негативне контрастування, кріосколювання (заморожування–танення) та ін.

Розміри ліпосом можна визначати за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії, розмір і морфологію частинок — електронною мікроскопією.

Передусім слід упевнитися в тому, що ліпосоми у складі відповідного засобу присутні. Найпростіший метод визначення присутності ліпосом — використання будь-якої форми мікроскопії. Ліпосоми малі й розсіюють мало світла. Вони зазвичай виявляються як дуже маленькі «крапкоподібні» сфери, які важко відрізнити від масляних крапельок або крихітних пухирців повітря. Якісних зображень можна досягти, застосовуючи високоякісну кріомікроскопію.

Найпоширенішим є визначення присутності ліпосом за допомогою електронної мікроскопії (ЕМ), яка має додаткову перевагу в тому, що надає інформацію про структуру ліпосом. Розрізняють чотири основних типи ЕМ.

1. ЕМ тонкого зрізу: придатна для спостереження клітинних мембран, але не ефективна для ліпосом, оскільки включає стадію первісної екстракції розчинником.

Таблиця 6. Схема інкапсулювання в ліпосоми водо- і жиророзчинних компонентів проліпосомним методом

| Стадія                                              | Операції                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1-ша стадія:<br>перетворення проліпосом на ліпосоми | Змішування ліпофільних (активних) компонентів з проліпосомами<br>Умови:<br>– повільне перемішування 30–50 об/хв;<br>– час 15 хв;<br>– температура для ненасичених ліпідів +25 °C; для насичених +65 °C                                                                                                                                 |
|                                                     | Введення розчину гідрофільних (активних) компонентів.<br>Умови:<br>– швидке перемішування 1 000–10 000 об / хв;<br>– час 15 хв;<br>– температура для ненасичених ліпідів +25 °C, для насичених +65 °C;<br>– об'єм води достатній тільки для початку формування ліпосом.<br>Виходить висококонцентрована суспензія завантажених ліпосом |
| 2-га стадія:<br>розведення суспензії ліпосом        | Додавання водного середовища, що не має активного компонента<br>Умови:<br>– повільне перемішування 30–50 об / хв;<br>– час 10 хв;<br>– температура +25 °C                                                                                                                                                                              |

Таблиця 7. Характеристики ліпосом та інструментальні методи контролю якості

| А. Біологічні характеристики            | Методи аналізу                                       |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Стерильність                            | Аеробні/анаеробні культури                           |
| Пірогенність                            | Дослід на тваринах                                   |
| Токсичність у дослідях на тваринах      | Моніторинг виживання щурів                           |
| В. Хімічні характеристики               |                                                      |
| Концентрація фосфоліпідів               | HPLC/метод Барлета                                   |
| Концентрація холестеролу                | HPLC/метод окиснення холестеролу                     |
| Концентрація БАД                        | Відповідний метод аналізу                            |
| Окиснення фосфоліпідів                  | UV-спектроскопія                                     |
| Гідроліз фосфоліпідів                   | HPLC/TLC                                             |
| Автоокиснення холестеролу               | HPLC/TLC                                             |
| Зміна антиоксидантних властивостей      | HPLC/TLC                                             |
| pH                                      | pH-метр                                              |
| С. Фізичні характеристики               |                                                      |
| Форма везикул та морфологія поверхні    | ТЕМ та SEM                                           |
| Розміри великул і розподіл за розмірами | Динамічне розсіювання світла, ТЕМ                    |
| Заряд поверхні                          | Електрофорез                                         |
| Потенціал та pH поверхні                | Вимірювання зета- потенціалу та pH-чутливі електроди |
| Кількість шарів                         |                                                      |
| Поведінка фаз                           | DSC, заморожені зразки для електронної мікроскопії   |
| Відсоток інкапсульованої речовини       | Мініцентрифужні стакани, гель-хроматографія          |
| Вивільнення активної речовини           | Дифузія клітин/ діаліз                               |

2. ЕМ пофарбованого негативу: більш придатна. Основна проблема полягає в тому, що використовують барвники з важких металів (молібдат амонію, цитрат свинцю), які призводять до агрегації і можливої реорганізації ліпосом. Цей спосіб може дати реальне зображення індивідуальних ліпосом, але його слід використовувати з обережністю у багатокомпонентних системах.

3. Сканувальна ЕМ: застосовується вкрай рідко.

4. ЕМ замороженого відколу: вважається кращим методом із чотирьох можливих типів ЕМ. Зразок, що містить воду, швидко заморожують у рідкому азоті, потім розколюють на два шматки. Поверхня зламу (замороженого відколу) містить топографічні особливості, які досліджують у трансмісійному електронному мікроскопі. Техніка процесу може бути розділена на три стадії: заморожування, розколювання, приготування зразка. Швидке заморожування є необхідним для збереження ультраструктури без руйнування її кристалами льоду.

Метод ЕМ замороженого відколу може бути використаний для загальної оцінки стабільності (якість мембран, злиття — у тому числі під час зберігання).

### Визначення розміру ліпосом

Існують два основних підходи до визначення розміру ліпосом. Найкращим є метод вибору, тобто використання визначників розміру частинок (particle sizers) із застосуванням лазерно-кореляційної спектроскопії (PCS) та атомно-силової мікроскопії (AFM).

PCS включає аналіз тимчасової залежності інтенсивності коливань у розсіяному лазерному світлі, зумовлених броунівським рухом частинок у розчині (суспензії). Оскільки маленькі частинки в розчині дифундують з більшою швидкістю порівняно з великими, швидкість коливань розсіяного світла змінюється відповідно. Математичний аналіз інтенсивності коливань (кореляція) дає змогу визначити коефіцієнт дифузії частинок ( $D$ ). Підставляючи величину, одержану для коефіцієнта дифузії, у рівняння Стокса–Ейнштейна, можна обчислити еквівалентний гідродинамічний радіус частинок ( $R_h$ ):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h},$$

де  $k$  — константа Больцмана;  
 $T$  — абсолютна температура;  
 $\eta$  — в'язкість розчинника.

Об'єм захоплення ліпосомального препарату — це об'єм внутрішнього водного простору. Його найзручніше виражати в мл/г ліпиду, і це дуже важливий параметр, коли йдеться про капсулювання ліпосом.

Загальний об'єм ( $V$ ) і площа поверхні ( $S$ ) сферичної ліпосоми з діаметром  $r$  становлять:

$$V = \frac{4\pi \cdot r^3}{3} \quad \text{і} \quad S = 4\pi \cdot r^2, \text{ відповідно.}$$

Об'єм типової SUV (діаметр 25 нм) і типової LUV (діаметр 250 нм) відрізняються в 1000 разів. Ця різниця збільшується до 3 400 для об'єму захоплення після прийняття в розрахунок товщини ліпідного бішару (3–5 нм). Така велика різниця в об'ємі компенсується тим, що з фіксованої кількості ліпиду може утворитися набагато більше SUV, ніж LUV. Величини діаметра, кількості шарів і об'єм захоплення, безсумнівно, тісно пов'язані [94].

На практиці ситуація є дещо складнішою, оскільки ліпосомальні препарати ніколи не бувають повністю однорідними.

Об'єм захоплення можна визначити за допомогою низки методів, але найкращий серед них для водорозчинних молекул — метод інуліннедоступного простору (Inulin Inaccessible Space — IIS) [104].

Інулін — це багатомолекулярний полісахарид, який не може проходити через ліпідний бішар. Принцип, що лежить в основі виміру, досить простий. Якщо фіксовану масу інуліну (або в разі використання Н-міченого інуліну фіксоване число імпульсів) додати до однакових об'ємів ліпосомної суспензії та розчину без ліпосом, то концентрація інуліну в зовнішній водній фазі ліпосомної суспензії буде вищою, ніж у зразку без ліпосом. Концентрацію інуліну в зовнішній водній фазі ліпосом можна визначити подальшим центрифугуванням і відбором зразка на поверхні супернатанта.

Якщо кількість імпульсів  $N$ , спрямованих до зразка об'ємом  $V$ , і кількість радіоактивних імпульсів на 1 мл в супернатанті й у зразку загалом дорівнює  $N_{spn}$  і  $N_{con}$  відповідно, то

$$N_{spn} = \left( \frac{N}{V - V_{lips}} \right) \quad \text{і} \quad N_{con} = \frac{N}{V},$$

де  $V_{lips}$  — об'єм, що його займають ліпосоми і, отже, недоступний для інуліну.

Якщо зразок містить  $W$  грамів ліпиду, то простір, недоступний для інуліну на 1 г ліпиду (IIS), розраховують так:

$$IIS = \frac{V \left( 1 - \frac{N_{con}}{N_{spn}} \right)}{W}, \quad V \left( 1 - \frac{N_{con}}{N_{spn}} \right) = V_{lips}.$$

На практиці, як правило, більше значення має об'єм внутрішнього водного простору ліпосом, ніж об'єм, що його займають ліпосоми. Якщо щільність ліпиду прийняти рівною 1 г / мл, то внутрішній об'єм ліпосом на 1 г ліпиду  $V_{int}$  виражають як

$$V_{int} = IIS - 1.$$

Захоплювальна здатність SUV ліпосом, одержаних за проліпосомним методом, набагато вища, ніж у SUV, виділених за іншими методами (10 і 2 мл / г відповідно). Вона також вища, ніж у MLV, і порівнянна тільки з LUV (табл. 1), які вважають найефективнішими ліпосомами з погляду захоплюваного об'єму. Однак ліпосоми, одержані проліпосомним методом, як правило, мають більше одного шару, що підвищує їхню механічну міцність, а здатність до утримання водорозчинних речовин вища, ніж у LUV.

Ліпосоми, наносомі, ліпосомальні форми препаратів, способи виробництва ліпосом, шляхи підвищення стабільності ліпосомних везикул і сфери застосування ліпосомальної форми препаратів та сучасні рецептури на їх основі є на сьогодні одним з наукових напрямів, який активно розвивається в усьому світі, що, безумовно, пов'язано з унікальними властивостями цих об'єктів.

Ліпідні наноконтейнери є одними з перспективних об'єктів для вирішення завдань, пов'язаних із цілеспрямованим доставленням БАР у необхідних концентраціях у препаратах та пролонгуванням їх фармакологічної дії.

Проте слід пам'ятати, що фосфоліпіди і, передусім, ліпосоми не є компонентами для повсякденних шаблонних рецептур, і щоразу перед розробниками постає складне завдання — підібрати або знайти нові необхідні композиції та методи приготування ліпосомальних везикул.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Bangham A. D.* Negative Staining of Phospholipids and their Structured Modification by Surface Agents as Observed in the Electron Microscope // *J. Mol. Biol.* — 1964. — V. 8. — P. 660–668.
2. *Bangham A. D.* Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids // *Ibid.* — 1965. — V. 13. — P. 238–252.
3. *Gregoriadis G., Leathwood P. D., Ryman B. E.* Enzyme entrapment in liposomes // *FEBS Lett.* — 1971. — V. 14, N 2. — P. 95–99.
4. *Rahman Y. E., Rosenthal M. W., Cerny E. A., Moretti E. S.* Preparation and prolonged tissue retention of liposome encapsulated chelating agents // *J. Lab. Clin. Med.* — 1974. — V. 83, N 4. — P. 640–647.
5. *Lasic D. D.* Kinetic and thermodynamic effects on the structure and formation of phosphatidylcholine vesicles // *Hepatology.* — 1991. — V. 13, N 5. — P. 1010–1012.
6. *Ulrich A. S.* Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles // *Bioscience Reports.* — 2002. — V. 22, N 2. — P. 129–150.
7. *Moghimi S. M.* Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice // *Pharm. Rev.* — 2001. — V. 53. — P. 283–318.
8. *Gregoriadis Ed. G.* Liposomes as Drug Carriers. — New York, 1988. — 885 p.
9. *Knight Ed. C. G.* Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications. — Amsterdam, 1981. — 497 p.
10. *Ostro Ed. M. J.* Liposomes. — New York, 1983. — 393 p.
11. *Shaw A. W.* Phospholipid phase transitions in homogeneous nanometer scale bilayer discs // *FEBS Lett.* — 2004. — V. 556. — P. 260–264.
12. *Несытова Н. Ю.* Тенденции в развитии исследований в области липосом: обзор патентной литературы // *Вестн. АМН СССР.* — 1990. — С. 8–19.
13. *Le Bang Son J.* Liposome // *Liposome Res.* — 1998. — V. 8. — P. 78.
14. *Dapergolas G.* Penetration of target areas in the rat by liposome — associated bleomycin, glucose oxidase and insulin // *FEBS Lett.* — 1976. — V. 63. — P. 235–239.
15. *Blume G.* Роль липосом и их применение в перспективе // *SOFW J. Eng. Vers.* — 2003. — V. 8. — С. 10–14.
16. *Эрнандес-Хименс Е. И.* Взаимодействие липосом с эритроцитами: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — М.: Рос. гос. мед. ун-т, 1995. — 22 с.
17. *Кобринский Г.* Липосомы в медицине // *Наука и жизнь.* — 1988. — № 6. — С. 126–129.
18. *Juliano B. L.* The effect of particle size and change on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs // *Biochem. Biophys. Res. Com.* — 1975. — V. 63. — P. 651–658.
19. *Бурханов С. А.* Липосомы в медицине // *Вестн. АМН СССР.* — 1990. — № 8. — С. 47–50.
20. *WHO/CDS/NTD/IDM/2007.4.* Report of a WHO informal consultation on liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis, Rome, Italy, 16 April 2005: World Health Organization. — 18 p.
21. *Шульга С. М., Глух И. С., Гаманухо В. И. и др.* Разработка и внедрение производств получения пищевой и биологически активной добавок «Лецитин» / Матер. наук.-практ. конф. «Харчові добавки, інгредієнти, БАДи: їх властивості та використання у виробництві продуктів і напоїв». — К.: Знання, 2003. — С. 68–70.
22. *Шульга С. М., Глух И. С., Гаманухо В. И. и др.* Аспекты применения подсолнечного лецитина в пищевой промышленности // *Одес. нац. акад. пищ. техн.* — 2009. — Вып. 36, Т. 2. — С. 177–179.
23. *Пат. № 46226.* Спосіб одержання 50% розчину фосфатидилхолину (L- $\alpha$ -лецитину) / Шульга С. М., Глух А. І., Гаманухо В. І., Глух І. С., Школа О. І. — Опубл. 10.12.2009.
24. *Микитюк В. В., Шульга С. М., Глух І. С.* Лецитин як фактор одержання продукції тваринництва. — К.: Освіта України, 2010. — 114 с.
25. *Shulga S. M., Glukh I. S.* Dry powder lecithin and liposomal nanoemulsions from sunflower / Abstracts of posters 10th ILPS Phospholipid Congress, Rotterdam, the Netherlands, 16–18 September 2011. — P. 6.
26. *Shulga S., Glukh I.* Liposomes and liposomal nanoemulsions from sunflower // Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology (23–26 September 2012, Istanbul, Turkey), New biotechnology. — V. 29. — Issue S. — P. S127.
27. *Shulga S., Glukh I.* Technology of dry powder sunflower lecithin for food, Feed and Pharmaceuticals / Lecithin from Alternative Sources, The 103rd AOCS Annual Conference & Expo in Long Beach, California, USA, April 29 — May 2, 2012. — PHO 1.
28. *Cabezas D. M., Diehl B., Tomás M. C.* Sunflower Lecithin: Application of a Fractionation Process with Absolute Ethanol // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* — 2009. — V. 86. — P. 189–196.
29. *Nieuwenhuysen W., Tomás M. C.* Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies // *Europ. J. Lipid Science Technol.* — 2008. — V. 110 — P. 472–486.
30. *Пат. SU 1289440 A1.* Способ получения фосфолипидов / Мельничук Д. А., Липко В. К., Стефанов А. В. и др. — Опубл. 15.02.1987, Бюл. № 6.
31. *Шульга С. М., Глух И. С., Гаманухо В. И. и др.* Создание производства пищевой и биологически активной добавки «Лецитин» из подсолнечного фосфатидного концентрата / Сб. статей науч.-практ. конф. с междунар. участием «Актуальные вопросы нутрициологии. Роль биологически активных пищевых добавок в обеспечении здоровья населения». — Днепропетровск, 2003. — С. 96–97.

32. Пат. № 81822. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату / Шульга С. М., Глух І. С., Глух А. І., Гаманухо В. І. — Опубл. 11.11.2008.
33. Дзяк Г. В., Шульга С. М., Дроздов О. Л. та ін. Порівняльна характеристика хроматографічних методів визначення складу соняшникового лецитину: Метод. рекомендації. — Дніпропетровськ, 2012. — 70 с.
34. Шульга С. М., Глух А. И., Глух И. С. и др. Разработка технологии получения сухого лецитина из фосфатидного концентрата подсолнечника // Наука та інновації. — 2012. — Т. 8, № 5. — С. 62-71.
35. Дзяк Г. В., Шульга С. М., Дроздов А. Л. и др. Современные представления о биологических свойствах лецитина: Метод. пособие. — Днепрпетровск, 2010. — 36 с.
36. Шульга С. М., Глух А. И., Глух И. С. и др. Внедрение технологии и создание производства эссенциальных фосфолипидов (50% -й раствор фосфатидилхолина) из подсолнечного фосфатидного концентрата // Наука та інновації. — 2010. — Т. 6., № 1. — С. 76-78.
37. Дзяк Г. В., Шульга С. М., Дроздов А. Л. и др. Биологические свойства лецитина // Мед. перспективы. — 2010. — Т. 15, № 2. — С. 123-135.
38. Шульга С. М., Глух І. С., Дроздов О. Л. Біологічні властивості лецитину з соняшнику / Наук. праці Одес. нац. акад. харч. технологій, Одеса. — 2012. — Вип. 42, Т. 1. — С. 234-238.
39. Allen T. M. Drugs // Suppl. — 1997. — V. 4. — P. 8-14.
40. Torchilin V. P. Liposomes as delivery agents for medical imaging // Mol. Med. Today. — 1996. — V. 2, N 6. — P. 242-249.
41. Torchilin V. P. Targeting of liposomes within cardiovascular system // J. Liposome Res. — 1997. — V. 7, N 4. — P. 433-435.
42. Dass C. R., Walker T. L., Burton M. A., Decruz E. E. Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes // J. Pharm. Pharmacol. — 1997. — V. 49, N 10. — P. 4671-4674.
43. Alico S. F. Liposome // Biochem. Pharmacol. — 1997. — V. 54. — P. 9-13.
44. Harrington K. L. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. — Part 2: Clinical development // Clin. Oncol. — 2000. — V. 12. — P. 16-24.
45. Липосомы в биологических системах: пер. с англ. / Под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. — М., 1983. — С. 36-39.
46. Liposome technology / Ed. by G. Gregoriadis. Boca Raton (Fla). — 1984. — V. 13. — 229 p.
47. Bermudez M. Liposome // J. Liposome Res. — 1996. — V. 6, N 1. — P. 221.
48. Medda S., Das N., Mahato S. B. et al. Glycoside-bearing liposomal delivery systems against macrophage-associated disorders involving Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis // Ind. J. Biochem. Biophys. Jun. — 1995 — V. 32, N 3. — P. 147-151.
49. New R. C. Liposomes: A Practical Approach. — IRL Press, Oxford, 1989. — 161 p.
50. Lasic D. D. Liposomes: From Physics to Application. — Amsterdam, New York: Elsevier, 1993. — 575 p.
51. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids // J. Mol. Biol. — 1965. — V. 13, N 1. — P. 238-252.
52. Huang C.-H. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics // Biochemistry. — 1969. — V. 8, N 1 — P. 344-352.
53. Barenholz S. Y., Amselem L. D. A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes)—French press // FEBS Lett. — 1979 — V. 99, N 1. — P. 210-214.
54. Mayhew E., Lazo R., Vail W. J. et al. Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier // Biochim. Biophys. Acta. — 1984. — V. 775, N 2. — P. 169-174.
55. Brandl M., Bachmann D., Drechsler M., Bauer K. H. Liposome preparation by a new high pressure homogenizer Journal of Drug Delivery 9 Gaulin Micron LAB 40 // Drug Devel. Ind. Pharm. — 1990. — V. 16, N 14. — P. 2167-2191.
56. Olson F., Hunt C. A., Szoka F. C. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes // Biochim. Biophys. Acta. — 1979. — V. 557, N 1. — P. 9-23.
57. Mayer L. D., Hope M. J., Cullis P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure // Ibid. — 1986. — V. 858, N 1. — P. 161-168.
58. Schneider T., Sachse A., Rossling G., Brandl M. Large scale production of liposomes of defined size by a new continuous high pressure extrusion device. // Drug Devel. Ind. Pharm. — 1994. — V. 20, N 18. — P. 2787-2807.
59. Batzri S., Korn E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication // Biochim. Biophys. Acta. — 1973. — V. 298, N 4. — P. 1015-1019.
60. Lasic D. D. Mechanisms of liposome formation // J. Liposome Res. — 1995. — V. 5, N 3. — P. 431-441.
61. Kremer J. M. H., Esker M. W., Pathmamanoharan C., Wiersema P. H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method // Biochemistry. — 1977. — V. 16, N 17. — P. 3932-3935.
62. Maitani Y., Soeda H., Junping W., Takayama K. Modified ethanol injection method for liposomes containing -sitosterol -d-glucoside // J. Liposome Res. — 2001. — V. 11, N 1. — P. 115-125.
63. Stano P., Bufali S., Pisano C. et al. Novel camptothecin analogue (Gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method // Ibid. — 2004. — V. 14, N 1-2. — P. 87-109.

64. Naeff R. Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale // *Advanc. Drug Del. Rev.* — 1996. — V. 18, N 3. — P. 343–347.
65. Wagner A., Vorauer-Uhl K., Kreismayr G., Katinger H. The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method // *J. Liposome Research.* — 2002. — V. 12, N 3. — P. 259–270.
66. Wagner A., Vorauer-Uhl K., Kreismayr G., Katinger H. Enhanced protein loading into liposomes by the multiple crossflow injection technique // *Ibid.* — 2002. — V. 12, N 3. — P. 271–283.
67. Wagner A., Vorauer-Uhl K., Katinger H. Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects // *Europ. J. Pharm. Biopharm.* — 2002. — V. 54, N 2. — P. 213–219.
68. Wagner A., Platzgummer M., Kreismayr G. et al. GMP production of liposomes—a new industrial approach // *J. Liposome Research.* — 2006. — V. 16, N 3. — P. 311–319.
69. Wagner A., Stiegler G., Vorauer-Uhl K. et al. One step membrane incorporation of viral antigens as a vaccine candidate against HIV // *Ibid.* — 2007. — V. 17, N 3–4. — P. 139–154.
70. Deamer D., Bangham A. D. Large volume liposomes by an ether vaporization method // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1976. — V. 443, N. 3. — P. 629–634.
71. Turanek J., Kasna A., Zaluska D., Neca J. Preparation of sterile liposomes by proliposome-liposome method // *Meth. Enzymol.* — 2003. — V. 367. — P. 111–125.
72. Turanek J., Zaluska D., Neca J. Linkup of a fast protein liquid chromatography system with a stirred thermostated cell for sterile preparation of liposomes by the proliposome-liposome method: application to encapsulation of antibiotics, synthetic peptide immunomodulators, and a photosensitizer // *Anal. Biochem.* — 1997. — V. 249, N 2 — P. 131–139.
73. Szoka F. Jr., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation // *PNAS USA.* — 1978. — V. 75, N 9. — P. 4194–4198.
74. Frokjaer S. Double emulsion vesicles // *Liposomes. A Practical Approach*, R. R. C. New, Ed.: IRL Press, Oxford, UK, 1989.
75. Anholt R. R. H. Solubilization and reassembly of the mitochondrial benzodiazepine receptor // *Biochemistry.* — 1986. — V. 25, N 8. — P. 2120–2125.
76. Jackson M. L., Litman B. J. Rhodopsin-phospholipid reconstitution by dialysis removal of octyl glucoside // *Ibid.* — 1982. — V. 21, N 22. — P. 5601–5608.
77. Driessen A. J. M., Wickner W. Solubilization and functional reconstitution of the protein-translocation enzymes of *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sciences USA.* — 1990. — V. 87, N 8. — P. 3107–3111.
78. Schurtenberger P., Mazer N., Waldvogel S., Kanzig W. Preparation of monodisperse vesicles with variable size by dilution of mixed micellar solutions of bile salt and phosphatidylcholine // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1984. — V. 775, N 1. — P. 111–114.
79. Brunner J., Skrabal P., Hauser H. Single bilayer vesicles prepared without sonication: physico chemical properties // *Ibid.* — 1976. — V. 455, N 2. — P. 322–331.
80. Goldin S. M. Formation of unilamellar lipid vesicles of controllable dimensions by detergent dialysis // *Biochemistry.* — 1979. — V. 18, N 19. — P. 4173–4176.
81. Milschmann M. H. W., Schwendener R. A., Weder H. G. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1978. — V. 512, N 1. — P. 147–155.
82. Kagawa Y., Racker E. Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. Reconstitution of vesicles catalysing adenosinetriphosphate exchange // *J. Biol. Chem.* — 1971. — V. 246. — P. 5477–5487.
83. Кузякова Л. М. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2, Химия.* — 2005. — Т. 46, № 1. — С. 74–79.
84. Кузнецов О. К., Киселев О. И., Автушенко С. С. Экспериментальное изучение сухой липосомальной инактивированной гриппозной вакцины (ЛИГВ) для перорального введения // *Совр. вакцинология.* — 1998. — С. 107–108.
85. Тихонов Н. Г. Лечение бронхопневмонии с/х животных липосомальным стрептомицином // *Проблемы биол. экол. безопасности: Матер. междунар. науч. конф. Оболенск, 22–24 мая 2000 г.* — С. 147.
86. Таганович А. Д. Получение липосом из природных липидов и результаты исследования их влияния на клетки легких // [http://www.med.by/dmn/book.php?book=04-13\\_1](http://www.med.by/dmn/book.php?book=04-13_1)
87. Пат. РФ 2306936, А61К 31/7105; А61К 9/127. Липосомальный индуктор интерферона / Золин В. В., Колокольников А. А., Таргонский С. Н., Бажутин Н. Б. — Заявл. 25.02.2004; Оpubл. 10.08.2005.
88. Aebi H. Catalase *in vitro* // *Methods Enzymol.* — 1984. — V. 105. — P. 121–126.
89. Пат. РФ 2216315 С2, 7А 61К 9/127. Способ получения липосом / Грегориadis Грегори, Зади Брахим, Джайасекара Прамукх Налака. — Заявл. 16.06.1999; Оpubл. 20.11.2003.
90. Пат. РФ № 93029233. Липосомная везикула, стабильная при хранении / Шанская А. И., Яковлева Т. Е., Булушева Е. В. и др. — Заявл. 04.06.1993; Оpubл. 20.07.1997.
91. Пат. РФ № 96119991. Липосомы с повышенной инкапсулирующей способностью / Хироси Кикүти, Кийото Яти. — Оpubл. 27.12.1998.
92. Пат. РФ № 96110886. Липосомы, содержащие материалы, состоящие из частиц / Грегори Грегориadis, София

- Джордж Антимисиарис, Ихсан Гурсел. — Заявл. 07.10.1994; Оpubл. 10.02.2000.
93. Пат. РФ № 2000110113. Липосомные аэрозоли с малым размером частиц для доставки противораковых лекарственных препаратов / Найт Дж. Вернон, Гилберт Брайан, Волдреп Дж. Клиффорд и др. — Заявл. 23.09.1998; Оpubл. 20.02.2004.
  94. Красильников В. Н. Липосомы: структура, свойства, производство. — СПб.: Торгово-экон. ин-т. — 147 с.
  95. Williams W. P. Liposomes and Pro-Liposome Method // SOFW J. — 1992. — V. 118. — P. 377–378.
  96. New R. C. Preparation of liposomes. In: Liposomes, a practical approach, ed. by RR. — C. New. Oxford etc. IRZ press. — 1990. — P. 33–104.
  97. Payne N. J. Characterization of proliposomes // J. Pharm. Sci. — 1986. — V. 75, N 4. — P. 330–333
  98. Пат. РФ № 2130771 C2, 6 A 61 K 9/127. Способ получения липосомальных препаратов / Автушенко С. С. — Заявл. 01.06.1998; Оpubл. 27.05.1999.
  99. Jung B. H., Chung S. J., Shim C. K. Proliposomes as prolonged intranasal drug delivery systems // STP Pharma Sciences. — 2002. — V. 12, N 1. — P. 33–38.
  100. Meyer L. Liposomes // The Pro-Liposome Approach. Publication 14 September. — 1993. — P. 43.
  101. Пат. РФ № 2217129 C2, 7 A 61 K 9/127. Способ получения липосомальных препаратов / Сорокин Е. М., Смирнова Л. Ф., Михайлова О. Г. и др. — Заявл. 28.10.2002; Оpubл. 27.11.2003.
  102. Пат. РФ № 2162689 C2, 7 A 61 K 9/127, 9/72, 31/56, 47/44. Пролипосомальные порошки для ингаляции / Катарина Бюстрем, Пер-Гуннар Нильссон. — Заявл. 20.12.1995; Оpubл. 10.02.2001.
  103. Сорокоумова Г. М. Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико-химических свойств липидных дисперсий в воде. — М.: МИТХТ, 2000. — 100 с.
  104. Perrett S. Method for the Preparation of Liposomes for Pharmaceutical Applications // J. Pharm. Pharmacol. — 1991. — V. 43. — P. 154–161.

## ЛИПОСОМЫ И НАНОСОМЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ПРОИЗВОДСТВО

С. М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии  
и геномики НАН Украины», Киев

E-mail: shulga5@i.ua

Липосомы — полые частицы, содержимое которых ограничено липидной мембраной. Относятся к большому семейству везикулярных (пузырьковых) структур, образованных амфифильными молекулами. Липосомы, состоящие из одного или нескольких бислоев фосфолипидов, впервые были описаны в середине 60-х годов. За сравнительно короткий срок липосомы превратились из простой модели, имитирующей клеточные мембраны, в объект интенсивных научных исследований и различных практических применений. Сегодня доступно значительное количество лабораторных методик создания липосом и сравнительно небольшое количество технологий, используемых в промышленности. Однако большинство этих методов имеют ограничения при включении биологически активных веществ в липосомы вследствие чувствительности последних к механическим и/или химическим повреждениям. В обзоре охарактеризованы структура липосом, их свойства, методы создания и масштабирования в промышленном производстве.

**Ключевые слова:** липосомы, фосфолипиды, фосфатидилхолин, наносомы, везикулы.

## LIPOSOMES AND NANOSOMES: STRUCTURE, PROPERTIES, PRODUCTION

S. M. Shulga

SO «Institute for food biotechnology  
and genomics NAS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

E-mail: shulga5@i.ua

Liposomes are hollow particles which content is limited to a lipid membrane. They belong to a large family of vesicular (bubble) structures formed by amphiphilic molecules. Liposomes consisting of one or more phospholipid bilayers were first described in the mid 60s. In a relatively short period liposomes transformed from a simple model that mimics the cell membrane into the object of active research and variety of practical applications. Currently a large number of laboratory techniques create liposomes and relatively small number of technologies used in the industry are available. However, most of ones have limitations in conditions of the biologically active substances inclusion in liposomes due to their sensitivity to mechanical and/or chemical damage. In reviews the liposomes structure, properties and methods for creating and scaling in industrial production are described.

**Key words:** liposomes, phospholipids, phosphatidylcholine, nanosomes, vesicles.