

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ С ПОМОЩЬЮ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ СРЕД

¹В. Н. Баграташвили, ¹С. Э. Богородский, ¹А. Н. Коновалов,
¹А. П. Кубышкин, ¹А. А. Новицкий, ¹В. К. Попов, ²К. Уптон,
²С. М. Хоудл

¹*Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, г. Троицк
Московской обл., Россия*

²*University of Nottingham, Nottingham, UK*

Поступила в редакцию 21.12.2006 г.

Предложен и разработан новый подход к управлению процессом «сухого» (без использования органических растворителей) формирования микрочастиц и пористых волокон из биорезорбируемых полимеров, основанный на комбинированном воздействии на полимерные материалы сверхкритического диоксида углерода и мощного акустического возбуждения. Методом распыления в воздух через импульсные сопла пластифицированных в сверхкритическом CO₂ низкомолекулярных ($M_w \leq 11000$) ϵ -поликапролактона и D,L-полилактида получены мелкодисперсные частицы и их агломераты, соответствующие требованиям, предъявляемым к матричным средствам доставки лекарственных препаратов пролонгированного действия. При воздействии мощного акустического возбуждения на пластифицированный в СК-CO₂ высокомолекулярный D,L-полилактид достигнуто существенное снижение его вязкости, приводящее к заметным изменениям морфологии конечных продуктов. При этом не происходит сколько-нибудь заметного изменения молекулярной массы и полидисперсности (отношение M_w/M_n) исследованных полимерных материалов.

Ключевые слова: биорезорбируемые полимеры, полимерные микрочастицы, сверхкритический диоксид углерода, акустическое воздействие.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых лекарственных препаратов адресного и пролонгированного действия является одним из наиболее перспективных направлений развития современной фармакологии. Биорезорбируемые (постепенно растворяющиеся в организме) полимерные микрочастицы заданного химического состава, размера и внутренней структуры составляют методологическую основу различных стратегий этого процесса [1, 2]. К ним предъявляются высокие требования по токсичности и биосовместимости [3], а также по возможности контролируемого выхода из них биологически активных компонентов в кровь или определенные ткани человеческого организма [4]. При этом, в идеале, сами микрочастицы не должны подавлять активность этих препаратов как в момент формирования самих микрокапсул, так и в течение периода времени, требуемого для достижения необходимого терапевтического эффекта [5].

До недавнего времени выполнение всех вышеперечисленных требований представлялось практически нереализуемым. Дело в том, что традиционные методы и технологии производства этих структур основаны либо на использовании органи-

ческих растворителей (ацетон, хлороформ и др.) с последующим весьма дорогостоящим и не всегда эффективным циклом удаления их следов, либо на применении относительно высокой температуры (100 °С и выше). И то, и другое может приводить к существенному снижению биоактивности лекарственных компонентов, а также к неконтролируемому изменению свойств полимерных частиц [6]. Это резко сужает круг практически ценных и разрешенных в клинической практике термолабильных биоактивных соединений и полимеров, которые могли бы быть использованы для решения широкого круга биомедицинских задач.

Ситуация изменилась коренным образом в 90-х годах прошлого столетия, когда для синтеза биорезорбируемых полимерных микрочастиц, содержащих биоактивные компоненты, начали использовать сверхкритические флюиды (СКФ). Сегодня уже существует целый ряд СКФ-технологий, позволяющих получать полимерные микрочастицы заданных размеров и инкапсулировать в них разнообразные биоактивные субстанции [7]. Большое количество работ в этом направлении посвящено методу быстрого расширения сверхкритических растворов (Rapid Expansion of Supercritical Solution — RESS) полимеров и биологически активных веществ [8, 9]. Однако в этом случае необходимо обеспечить растворение исходных компонентов (как полимера, так и инкапсулируемой добавки) в СКФ, что, в силу недостаточно высокой растворяющей способности последних, часто бывает невозможно реализовать без использования уже упоминавшихся выше органических со-растворителей [10]. Поэтому данным способом удается получать весьма ограниченный круг биологически активных препаратов. Другим широко используемым методом является сверхкритическое антисольвентное (Supercritical Anti-Solvent — SAS) осаждение, в процессе которого происходит образование микрочастиц из раствора полимера и лекарственного препарата, растворенных в органическом растворителе, при его взаимодействии с СКФ, обладающим более слабой (по сравнению с используемым растворителем) растворяющей способностью [11]. Понятно, что и в этом случае избежать присутствия хотя бы небольшого количества токсичных соединений (растворителей) в конечном продукте практически невозможно.

Предложенный нами ранее подход, основанный на снижении температуры стеклования T_g и пластификации аморфной полимерной матрицы при ее обработке сверхкритическим диоксидом углерода (СК-СО₂), позволил получить однородно наполненные полимерные композиции с последующим формированием из них микрочастиц для новых лекарственных форм как из растворимых, так и из нерастворимых в СК-СО₂ компонентов [12]. Основным ограничением данного метода является вязкость пластифицированного композита, в первую очередь определяемая молекулярной массой исходного полимера. В настоящей работе представлены результаты развития этой методологии, направленные на уменьшение вязкости высокомолекулярных систем за счет воздействия на них интенсивного акустического возбуждения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходных полимеров нами были выбраны ϵ -поликапролактон (Sigma-Aldrich) и D,L-полилактид (Medisorb[®] производства «Alkermes», США и Purasorb[®] производства «Puras», Нидерланды), уже зарекомендовавшие себя как перспективные биорезорбируемые материалы для биомедицинских применений. В экспериментах использовался ϵ -поликапролактон (ПКЛ) с молекулярной массой $M_w \sim 5000$ и два типа D,L-полилактида (ПЛ) с молекулярными массами $M_w \sim 11000$ и 75000 .

Данный выбор был обусловлен различием физико-механических свойств этих полимеров и скоростей их резорбции в организме. Низкомолекулярные ПКЛ и ПЛ могут быть использованы в качестве транспортных матриц для лекарственных препаратов со сроками действия до нескольких суток, в то время как структуры высокомолекулярного ПЛ могут служить исходным материалом для препаратов со сроками действия до нескольких недель, а также матриц для тканевой инженерии. Диоксид углерода марки ОСЧ (99,99 %) производства Балашихинского кислородного завода (Московская обл.) использовался без какой-либо дополнительной очистки.

Для анализа формы, размеров и морфологии полученных микрочастиц и структур использовались оптическая и сканирующая электронная микроскопии. Сравнение молекулярных масс и полидисперсности (отношение M_w/M_n) исходных полимеров с аналогичными характеристиками полученных структур проводилось методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ).

Для исследования влияния акустического воздействия на пластифицированные в СК- CO_2 полимеры была создана экспериментальная установка, блок-схема которой представлена на рис. 1. Ее основными элементами являются: система напуска CO_2 и инъекции полимерных микрочастиц (1 — баллон с CO_2 , 2 — насос высокого давления, 3 — компрессор, 4 и 6 — входной и выходной игольчатые вентили, 7 — сопло); 5 — реакционная камера высокого давления (до 30 МПа), изготовленная из нержавеющей стали; система отдельного нагрева (до 200 °С) и контроля температуры реакционной камеры и сопла (8 — термопары с цифровыми измерителями, 9 — блоки нагрева и термостабилизации); 10 — магнитно-стрикционный генератор (МСГ) с акустическим концентратором и титановым индуктором; 11 — блок питания и управления МСГ. В верхнем фланце камеры (крепящемся и уплотняющемся к ней с помощью байонетного зажима) находятся ввод и вывод для газа, манометр, а также предохранительный клапан, предотвращающий несанкционированный рост давления выше установленного значения (30 МПа). В этом фланце также имеется устройство ввода и уплотнения титанового индуктора. Система акустического концентратора и индуктора спроектирована таким образом, чтобы в месте ввода стержня в камеру находился узел акустической

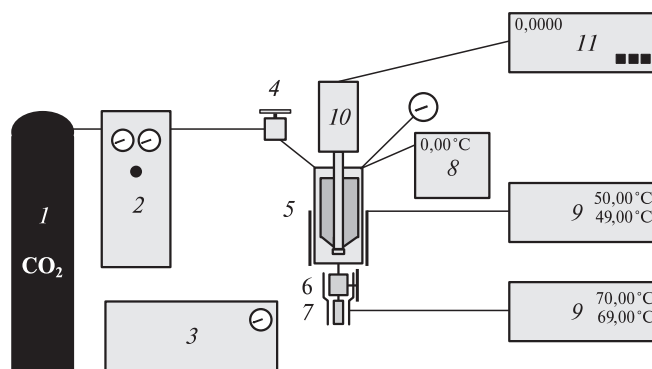


Рис. 1. Блок-схема экспериментальной установки для исследования влияния акустического воздействия на пластифицированные в СК- CO_2 полимеры:

1 — баллон с CO_2 ; 2 — насос высокого давления; 3 — компрессор; 4 и 6 — входной и выходной игольчатые вентили; 5 — реакционная камера; 7 — сопло; 8 — термопары с цифровыми измерителями; 9 — блоки нагрева и термостабилизации; 10 — МСГ с акустическим концентратором и титановым индуктором; 11 — блок питания и управления МСГ

волны для сведения к минимуму механических колебаний в данной зоне. Титановый индуктор (представляющий собой цилиндрический стержень диаметром 10 мм) является проводником акустических волн, вызывающих механические колебания пластифицированного полимера, тем самым как бы «разрыхляя» полимер и снижая его вязкость. Максимальная амплитуда колебаний нижнего торца стержня на частоте 18 ± 1 кГц при максимальной мощности источника питания МСГ 5кВт составляла порядка 100 мкм. При этом легко может быть достигнут кавитационный режим возбуждения плотной среды (например, водных растворов или полимеров, пластифицированных в СК-СО₂), который делает излишним использование механических смесителей для гомогенного перемешивания как растворимых, так и нерастворимых в СКФ компонентов. В качестве систем инъекции полимерных композиций из реакционной камеры в атмосферу нами использовались сопла диаметрами 200, 400 и 500 мкм. Приемной емкостью служила полипропиленовая камера с крышкой, обеспечивавшая сбор получающихся микрочастиц, агломератов и волокон, а также дававшая возможность изучать зависимость размера и внешнего вида частиц от расстояния до ее дна.

Процесс формирования микрочастиц из выбранных полимеров проходил в следующей последовательности. В камеру 5 загружалось 0,5 г полимерных гранул (диаметром $\sim 3 \div 4$ мм). Камера уплотнялась, и в нее подавался СО₂ комнатной температуры до достижения давления 5 МПа. После этого включались нагреватели камеры и сопла. Температура камеры варьировалась в диапазоне от 40 до 80 °С, а температура сопла — от 80 до 200 °С. По мере разогрева камеры давление в ней увеличивалось. При достижении требуемого значения температуры давление в камере доводилось до заранее выбранной величины (10 ÷ 20 МПа). Входной вентиль 4 оставался открытым для компенсации перепада давления при сбросе СО₂ и полимерной композиции из камеры. Затем (при проведении экспериментов с акустическим воздействием) включался блок питания и управления МСГ, мощность которого изменялась в пределах от 1 до 4 кВт. Для формирования установившегося режима возбуждения, пластификации и гомогенизации пластифицированного полимера в реакторе выдержка системы при этих условиях составляла около пяти минут. После этого производился импульсный сброс диоксида углерода и полимера в приемную камеру с помощью импульсного дозатора (игольчатый вентиль 6).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании в качестве исходного материала низкомолекулярного ПКЛ ($M_w \sim 5000$) практически во всем рабочем диапазоне температур и давлений были получены мелкодисперсные частицы и их агломераты. Оценка размеров частиц проводилась на основе анализа снимков, полученных с помощью оптической микроскопии (рис. 2). Средний размер частиц варьировался в пределах от 7 до 18 мкм, а размер их агломератов — от 30 до 130 мкм (рис. 2а). Важно отметить, что какого-либо существенного влияния акустического возбуждения на размеры и внутреннюю структуру частиц отмечено не было. По всей видимости, вязкость пластифицированного ПКЛ была настолько малой, что ее дополнительное снижение уже никак не сказывалось на процессе формирования микрочастиц в данных условиях эксперимента.

В случае низкомолекулярного D,L-полилактида ($M_w \sim 11000$) как общие закономерности процесса, так и структура полученных в его результате микрочастиц и

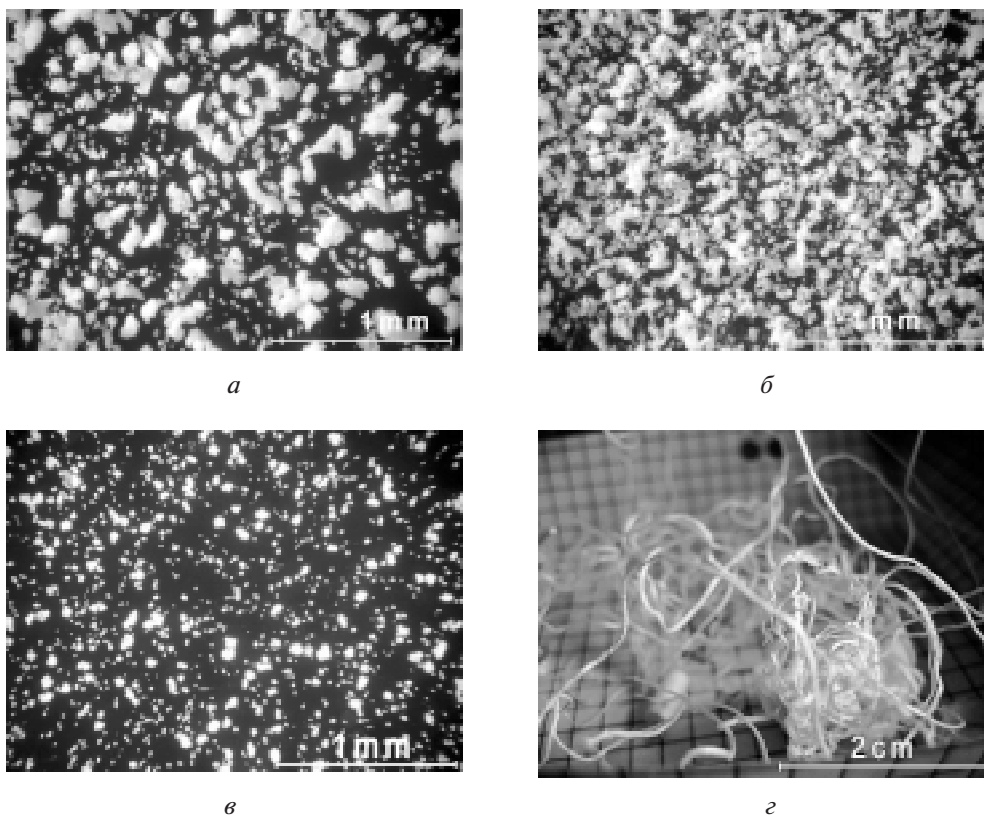


Рис. 2. Фотографии микрочастиц и агломератов низкомолекулярных ϵ -поликапролактона (а) и D,L-полилактида, полученных без (б) и с использованием (в) акустического воздействия, а также волокон и нитей высокомолекулярного ПЛ (г)

их агломератов были схожи с ПКЛ (рис. 2б), с той лишь разницей, что характерный размер частиц и их агломератов был несколько больше и лежал в диапазоне $15 \div 25$ мкм и $50 \div 200$ мкм соответственно. Однако при использовании акустического возбуждения ситуация изменилась. Средний размер микрочастиц уменьшился до $5 \div 12$ мкм, а размер их агломератов — до $30 \div 70$ мкм. Кроме того, форма большинства из них существенно приблизилась к сферической (рис. 2в). Было также замечено, что время полного истечения полимерной композиции из реакционной камеры сократилось в $1,5 \div 2$ раза (в зависимости от мощности акустического воздействия).

При использовании высокомолекулярного ПЛ ($M_w \sim 75000$) во всех режимах проведенных экспериментов образовывались не индивидуальные микрочастицы и их агломераты, а пористые нити и волокна, диаметры которых в среднем незначительно увеличивались с увеличением диаметра выходного отверстия сопла от 200 до 500 мкм и составляли величину от 20 до 700 мкм (рис. 3а и 3в). Какой-либо существенной зависимости структуры нитей от давления или температуры в реакторе замечено не было. Следует также отметить тот факт, что более половины исходной навески полимера, как правило, оставалось в реакторе либо в силу блокирования сопла затвердевшим полимером, либо вследствие формирования канала, по которому CO_2 беспрепятственно выходил без следов полимер-

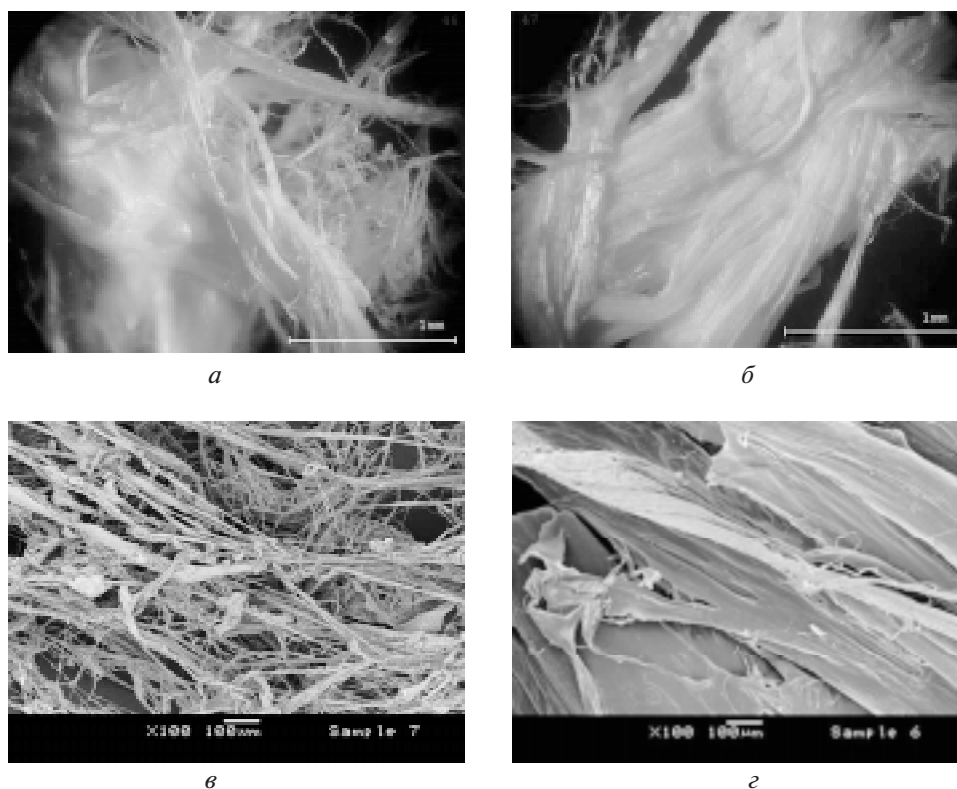


Рис. 3. Оптическая и сканирующая электронная микроскопии образцов волокон и нитей высокомолекулярного D,L-полилактида, полученных без (а, в) и с использованием (б, г) акустического воздействия

ной композиции. Последняя, судя по всему, распределялась по периферии внутренней области инъекционной системы. Понятно, что столь сильное отличие этих результатов от результатов предыдущих экспериментов связано прежде всего с более высокой вязкостью пластифицированного высокомолекулярного полимера, вследствие чего и не удалось реализовать условия образования полимерных «микрокапель» на срезе сопла.

Применение акустического возбуждения привело к образованию рваных, в основном слабо пористых волокон, а также ленточных структур (рис. 3б и 3г) вместо пористых нитей. В этом случае доля более толстых волокон была гораздо больше, чем в экспериментах без использования акустического возбуждения, и мы имели близкий к 100 % выход полимера из камеры высокого давления. Кроме того, так же, как и в случае с низкомолекулярным ПЛ, скорость истечения полимерной композиции из сопла реактора в несколько раз превышала этот параметр по сравнению с экспериментами без акустического воздействия. На наш взгляд, данный факт демонстрирует существенное снижение вязкости пластифицированного полимера под действием акустического возбуждения, что и приводит к существенным изменениям в морфологии конечного продукта.

В таблице приведены данные ГПХ-анализа полимерных микроструктур, полученных с использованием двух видов сопел (диаметром 200 и 500 мкм) при двух разных температурах (40 и 80 °С) и давлениях CO₂ (15 и 20 МПа) как с исполь-

Данные ГПХ-анализа полимерных микроструктур высокомолекулярного D,L-полилактида, полученных при различных условиях

№	Параметры процесса	M_w	M_w/M_n
1	Исходный ПЛ	74920	1,70
2	Сопло 500 мкм, 40 °С, 15 МПа	72068	1,66
3	То же + акустическое воздействие (АВ)	72253	1,66
4	Сопло 200 мкм, 80 °С, 20 МПа	79359	1,64
5	То же + АВ	79285	1,66
6	Сопло 500 мкм, 80 °С, 20 МПа	79976	1,66
7	То же + АВ	79173	1,64

зованием, так и без использования акустического воздействия при выходной мощности блока питания МСГ 2 кВт. Видно, что вариации M_w и полидисперсности микрочастиц, волокон и нитей, полученных в этих условиях, весьма незначительны и находятся в пределах погрешности измерений ($\pm 10\%$). Тенденция некоторого увеличения M_w и уменьшения полидисперсности при 80 °С может быть объяснена «вымыванием» (экстракцией) низкомолекулярной компоненты ПЛ при его обработке в СК-СО₂.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен и реализован новый подход к управлению процессом «сухого» (без использования органических растворителей) формирования микрочастиц и пористых волокон из биорезорбируемых полимеров, основанный на комбинированном воздействии сверхкритического диоксида углерода и мощного акустического возбуждения на полимерные материалы. Методом распыления пластифицированных в СК-СО₂ низкомолекулярных ϵ -поликапролактона и D,L-полилактида через импульсные сопла в воздушную среду получены мелкодисперсные частицы и их агломераты, соответствующие требованиям, предъявляемым к матричным средствам доставки лекарственных препаратов пролонгированного действия. При воздействии мощного акустического возбуждения на пластифицированный в СК-СО₂ высокомолекулярный D,L-полилактид достигнуто существенное снижение его вязкости, приводящее к заметным изменениям морфологии конечных продуктов. Анализ образцов методом ГПХ показал, что во всем диапазоне экспериментальных параметров не происходит сколь-нибудь заметного изменения молекулярной массы и полидисперсности исследованных полимерных материалов. При этом одновременно может происходить удаление (экстракция) и других растворимых в СК-СО₂ токсичных соединений (непрореагировавшие мономеры и низкомолекулярные олигомеры, инициаторы полимеризации, пластификаторы и т.д.), что может существенно понижать токсичность конечных продуктов. Важным преимуществом данного подхода по отношению к уже существующим методам является простота реализации всех вышеперечисленных процессов практически в одном цикле с использованием дешевого диоксида углерода. В дальнейшем для формирования на срезе импульсного сопла микрочастиц (а не волокон) высокомолекулярных

полимерных композиций заданного химического состава, размеров и внутренней структуры особое внимание будет уделено оптимизации конструкций акустического резонатора реакционной камеры и инъекционного тракта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою признательность за финансовую поддержку фондам The Wellcome Trust (UK, Grant № 073913), РФФИ (проекты № 05-08-50266 и № 06-02-08125-ОФИ) и программе РАН «Фундаментальные науки — медицине».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sakiyama-Elbert S. E., Hubbell J. A.* J. Controlled Release. 2000. Vol. 65. P. 389.
2. *Marler J. J., Upton J., Langer R., Vacanti J. P.* Adv. Drug Del. Rev. 1998. Vol. 33. P. 165.
3. *Hubbell J. A.* Curr. Opin. Biotechnol. 1999. Vol. 10. P. 123.
4. *Whitaker M. J., Quirk R. A., Howdle S. M., Shakesheff K. M.* J. Pharm. Pharmacol. 2001. Vol. 53. P. 1427.
5. *Sakiyama-Elbert S. E., Panitch A., Hubbell J. A.* FASEB J. 2001. Vol. 15. P. 1300.
6. *Griffith L. G.* Acta Mater. 2000. Vol. 48. P. 263.
7. *Hauthal W. H.* Chemosphere. 2001. Vol. 43. P. 123.
8. *Kim J. H., Paxton T. E., Tomasko D. L.* Biotechnol. Prog. 1996. Vol. 12. P. 650.
9. *Matsuyama K., Mishima K., Hayashi K. I., Ishikawa H., Matsuyama H., Harada T.* J. Appl. Polym. Sci. 2003. Vol. 89. P. 742.
10. *Kompella U. B., Koushik K.* Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2001. Vol. 18. P. 173.
11. *Xu Q., Han B., Yan H.* J. Appl. Polym. Sci. 2003. Vol. 8. P. 2427.
12. *Howdle S. M., Watson M. S., Whitaker M. J., Popov V. K., Davies M. C., Mandel F. S., Wang J. D., Shakesheff K. M.* Chem. Commun. 2001. P. 109.

FABRICATION OF BIORESORBABLE POLYMER MICROPARTICLES WITH SUPERCRITICAL FLUIDS

**¹V. N. Bagratashvili, ¹S. E. Bogorodski, ¹A. N. Konovalov, ¹A. P. Kubyishkin,
¹A. A. Novitski, ¹V. K. Popov, ²C. Upton, ²S. M. Howdle**

*¹Institute of Laser and Information Technologies, Russian Academy of Sciences,
Troitsk, Moscow Region, Russia*

²University of Nottingham, Nottingham, UK

A new approach to control the process of «dry» (without any use of organic solvents) synthesis of bioresorbable polymer microparticles and porous fibers has been proposed and developed. It is based on the combination of treatment in supercritical fluids and intensive acoustic excitation. Low molecular weight ($M_w \sim 1000$) ϵ -polycaprolactone and D,L-poly lactide microparticles and their agglomerates which can be used as a drug delivery vehicles were produced by spraying of the polymers plasticized in supercritical CO₂ through the pulse nozzles. The significant lowering of the initial D,L-poly lactide viscosity has been achieved by intensive acoustic agitation in supercritical fluid environment followed by the morphology changes of the final product. No noticeable alterations of both polymer molecular weight and polydispersity (M_w/M_n ratio) after the treatment were detected.

Key words: bioresorbable polymers, polymer microparticles, supercritical carbon dioxide, acoustic excitation.