

Санкт-Петербургский государственный университет

БОКАТЫЙ Антон Николаевич

Выпускная квалификационная работа

Офтальмологические системы доставки дексаметазона на основе хитозана

Уровень образования: магистратура

Направление 04.04.01 химия

Основная образовательная программа ВМ.5512.2020 «Химия»

Научный руководитель: Главный научный
сотрудник кафедры медицинской химии, д.х.н.,
профессор
Тенникова Татьяна Борисовна

Рецензент: заведующий НИЛ нанотехнологий
НМИЦ им. В.А. Алмазова, д.х.н.
Королев Дмитрий Владимирович

Санкт-Петербург

2022

Перечень условных обозначений и сокращений

DEX – дексаметазон

EDC – N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид

NHS – N-гидроксисукцинимид

CS – хитозан

ГК – глюкокортикоид

SucCS-DEX – конъюгат сукцинилхитозан-дексаметазон

DS – степень замещения

TNF α – фактор некроза опухоли альфа

LPS – липополисахарид

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов — агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США

SA – янтарный ангидрид

SEM – сканирующая электронная микроскопия

DMSO-d₆ – дейтерированный диметилсульфоксид

PBS – солевой фосфатный буферный раствор

CAM – молекула клеточной адгезии

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

HA – гиалуроновая кислота

DCC – N,N'-дициклогексилкарбодиимид

DIC – N,N'-диизопропилкарбодиимид

HOBT – N –гидроксибензотриазол

COX-2 – циклооксигеназы-2

NOS2 – синтазы оксида азота 2

RAFT – обратимая полимеризация с передачей цепи присоединение-фрагментация

TFA – трифторуксусная кислота

AIBN – азобисизобутиронитрил

PEG – полиэтиленгликоль

MCF-7 – клетки рака молочной железы

ESI – ионизация электрораспылением

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Общая характеристика биополимеров, используемых для доставки лекарств в глаза	10
1.2. Модификации лекарственных средств хитозаном для окулярной доставки	16
1.3. DEX как фармацевтическая субстанция: химические, фармакологические и биофармацевтические свойства	17
1.4. Методы синтеза конъюгатов DEX	21
1.4.1. Карбодиимидная реакция	22
1.4.2. Твердофазный синтез	23
1.4.3. RAFT-полимеризация.....	24
1.4.4. Клик-химия	25
1.4.5. Реакция Дильса-Альдера	27
1.4.6. Реакция Траута	29
1.5. Конъюгаты дексаметазона, как системы доставки с модифицированным высвобождением	30
1.5.1. Глазные системы доставки	30
1.5.2. Конъюгаты антиген-лекарственное средство.....	31
1.5.3. Противоопухолевые системы доставки.	32
1.5.4. Системы доставки генов.	34
1.6. Выводы по обзору литературы.....	37
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	39
2.1. Реактивы и материалы.....	39
2.2. Синтез сукцинил дексаметазона (SucDEX).....	40
2.3. Синтез конъюгатов дексаметазон-хитозан (CS-DEX)	40
2.4. Синтез конъюгатов сукцинил хитозана-дексаметазон (SucCS-DEX)	41
2.5. Характеристика конъюгатов (SucCS-DEX)	41
2.6. Определение содержания DEX в конъюгатах SucCS-DEX	42
2.7. Высвобождение DEX <i>in vitro</i> из конъюгатов SucCS-DEX.....	42
2.8. Противовоспалительная активность конъюгатов SucCS-DEX.....	43
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.1. Синтез и характеристика конъюгатов сукцинилхитозан-дексаметазон (SucCS-DEX)	45
3.2. Высвобождение DEX <i>in vitro</i> из конъюгатов SucCS-DEX.....	50
3.3. Противовоспалительная активность конъюгатов SucCS-DEX.....	52
ВЫВОДЫ.....	56
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	57
Публикации по материалам выпускной квалификационной работы.....	59
Список литературы	60

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, около 300 миллионов человек во всем мире живут с серьезными нарушениями зрения. Число людей, живущих с той или иной формой нарушения зрения вдаль или вблизи, составляет около 2,2 миллиарда человек, из них 33,6 миллиона человек слепы [1]. Хотя каждое заболевание имеет уникальные причины, симптомы и методы лечения, все они при отсутствии лечения приведут к полной потере зрения.

Трудности доставки лекарств в глаза связаны со сложной анатомией глаза, его компартиментализацией и отделением от остального тела. Анатомия глаза обычно подразделяется на два сегмента: передний сегмент состоит из радужной оболочки, роговицы, хрусталика и окружающей водянистой влаги; и задний сегмент, включающий стекловидное тело, сетчатку, желтое пятно и зрительный нерв [2].

Большинство пациентов с заболеваниями глаз получают медикаментозную терапию. Биодоступность офтальмологических препаратов после системного введения сильно ограничена системой гематоофтальмического барьера, образованной двумя основными барьерами: гемато-водным барьером для переднего отрезка глаза и гемато-ретиальным барьером для заднего отрезка глаза (рисунок 1). Первый состоит из плотных контактов беспигментного эпителия цилиарного тела, тканей радужки и кровеносных сосудов радужки. Этот барьер ограничивает доступ препарата к переднему сегменту глаза. Гемато-ретиальный барьер образован соединениями между капиллярными эндотелиальными клетками сетчатки и плотными соединениями между клетками пигментного эпителия сетчатки [3].

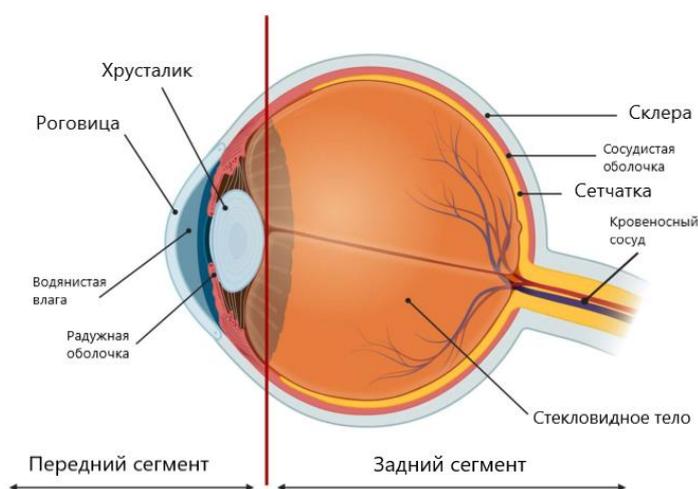


Рисунок 1. Схема глаза. Глазное яблоко можно условно разделить на две части: передний сегмент и задний сегмент.

Не более 5% от общей дозировки препарата, вводимого в виде глазных капель, достигает внутренних тканей глаза [4]. Только ~30 мкл жидкой лекарственной формы можно нанести на глаз из-за ограниченной площади поверхности глаза, и большая ее часть быстро выводится с поверхности глаза из-за оборота слезы, моргания и носослезного дренажа. Сообщается, что через две минуты после закапывания выводится около 60% препарата; через 8 мин препарат разбавляется до 1/1000, а через 15–25 мин почти все активное вещество удалялось с поверхности глаза [5].

Кроме того, тканевые и жидкостные барьеры глаза ограничивают поступление активного вещества во внутренние структуры глаза. Основным путем местного введения препаратов в передний сегмент глаза является всасывание через роговицу и конъюнктиву с последующим попаданием в переднюю камеру. Слезная пленка на роговице и конъюнктиве, покрывающая остальную поверхность глаза и внутреннюю поверхность век, является первым барьером проницаемости, ограничивающим внутриглазную доставку лекарств. Слезная пленка покрывает, увлажняет и защищает поверхность глаза, обеспечивает скольжение век и может задерживать проникновение лекарств в глаз. Конъюнктивальный мешок человека может временно содержать около 30 мкл слезной жидкости, а нормальный объем слезной жидкости оценивается примерно в 7 мкл. Слезы имеют высокую скорость оборота (время восстановления 2–3 мин). Слезная пленка представляет собой тонкий прозрачный слой жидкости, состоящий из трех фаз, включая внешнюю липидную фазу, промежуточную водную фазу и внутренний муциновый слой (рисунок 2). Внешний липидный слой толщиной 0,1 мкм препятствует испарению слезной пленки, а также препятствует перетеканию слезы. Водный слой толщиной 7–8 мкм является основным компонентом слезной пленки. Белки и ферменты в водной фазе могут связывать и метаболизировать активное лекарственное средство, что приводит к снижению его биодоступности. Внутренний слой муцина имеет толщину 0,2 мкм. Муцины слезной пленки представляют собой сильно гликозилированные белки (гликоконъюгаты). Высокое содержание сиаловой кислоты и сульфата в большинстве муцинов обеспечивает отрицательный поверхностный заряд глаза [6]. Таким образом, муцины могут притягивать или отталкивать лекарства посредством электростатических взаимодействий в зависимости от заряда молекулы лекарства или системы-носителя [7]. Осмолярность слезной жидкости близка к осмолярности крови, однако слезы

также содержат слабые буферные системы в виде карбонат-ионов и слабых органических кислот, которые могут изменять степень ионизации препарата и, следовательно, его биодоступность [8].

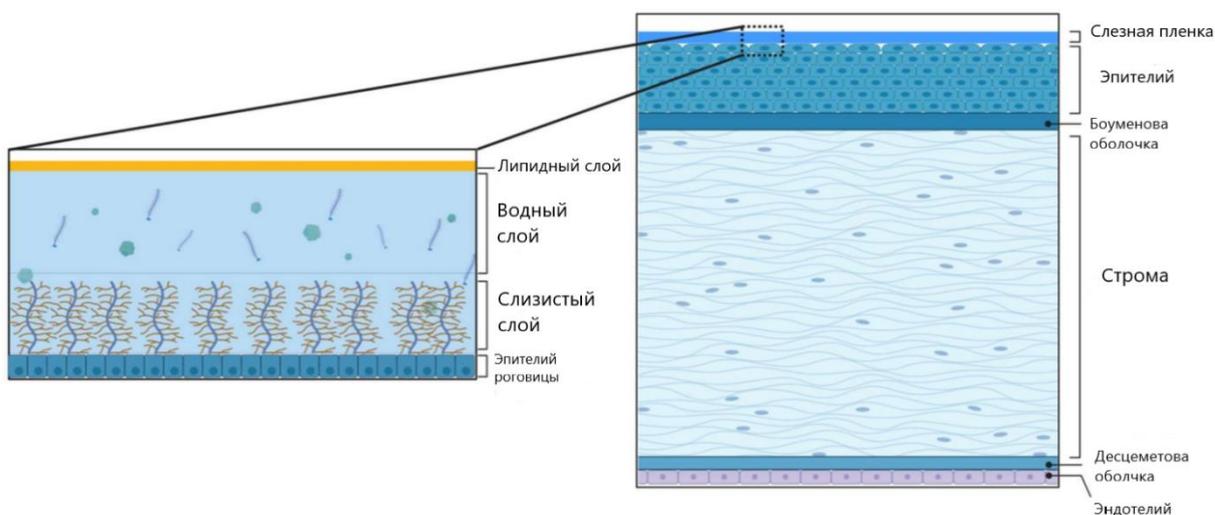


Рисунок 2. Схематическое изображение структуры и состава роговицы и слезной пленки.

Роговица является наиболее значительным механическим и химическим барьером для офтальмологических препаратов. Это оптически прозрачная бессосудистая структура толщиной 0,5–0,7 мм, состоящая из пяти слоев: эпителия, боуменовой мембраны, стромы, десцеметовой мембраны и эндотелия [9] (рисунок 2). Слоями, образующими существенные барьеры проницаемости, являются эпителий и строма. Внешний многослойный эпителий роговицы представляет собой гидрофобный слой с плотными контактами между эпителиальными клетками, который образует плотный барьер для гидрофильных препаратов [10]. Высокая липофильность эпителия обеспечивает проникновение до 90% липофильных молекул лекарств и только около 10% гидрофильных молекул. Наличие в эпителии ферментов, разлагающих лекарственные средства, представляет собой еще одну причину низкой биодоступности местных лекарственных средств [11-13]. Следующий слой, расположенный прямо под эпителием, — это мембрана Боумена — бесклеточный слой, состоящий в основном из коллагена. Средний роговичный слой представляет собой строму, составляющую около 90% общей толщины роговицы. Он состоит из коллагена, других белков, мукополисахаридов и почти на 80% состоит из воды. В отличие от эпителия, строма ограничивает проникновение гидрофобных препаратов.

Рядом со стромой находится десцеметова мембрана, поддерживающая внутренний слой роговицы, — эндотелий — единственный слой эпителиоподобных клеток, важных для регуляции гидратации стромы, но более слабый барьер для лекарств, чем внешние слои [14].

Местное введение офтальмологических препаратов представляет собой удобный и безопасный способ введения лекарственных средств. Тем не менее, биодоступность является низкой для местных препаратов (глазные капли, гели) из-за барьеров глаза (слизистой оболочки) и быстрого удаления препарата с поверхности конъюнктивы слезной жидкостью [15]. Слезная жидкость в основном выделяется конъюнктивой, которая представляет собой соединительную ткань, расположенную на передней поверхности глаза, которая служит для увлажнения и смазывания поверхности глаза, а также для удаления инородных материалов. Конъюнктивa состоит из многослойного цилиндрического эпителия, который продуцирует макромолекулярные гликопротеины, содержащие кислые полисахариды (муцины). Использование полимерных носителей, которые могут «прилипнуть» к этим слизистым муцинам, может улучшить местную задержку лекарственного средства в глазу. Одним из перспективных материалов, которые могут взаимодействовать таким образом с муцинами, является хитозан [16]. Следовательно, время пребывания лекарственного средства в глазу может быть увеличено с использованием носителей на основе хитозана и его производных [17].

Глюкокортикоиды (ГК), в том числе дексаметазон (DEX), являются наиболее мощными доступными противовоспалительными препаратами, но они могут иметь довольно тяжелые острые и хронические системные побочные эффекты [18]. Местное введение DEX в глаза или суставы, а также ингаляционные и ирригационные аппликации могут обеспечить правильную дозу препарата непосредственно на воспаленный участок и уменьшить побочные эффекты, которые могут возникнуть при системном введении. Однако эти местные методы требуют частого применения, что создает неудобства для пациентов и может привести к несоблюдению больными протокола приема лекарственных средств. Кроме того, применение внутрисуставных и интравитреальных инъекций ограничено возможными осложнениями, которые могут включать инфекции суставов и отслойку сетчатки соответственно [18-23].

Текущие интравитреальные препараты включают имплантаты (например, одобренный FDA препарат Озурдекс [24]) и различные типы полимерных наночастиц, но многие из этих имплантатов и наночастиц состоят из недеградируемых полимеров, и это ограничивает их широкое клиническое применение для контролируемого высвобождения лекарств [25-27,34]. Использование различных наночастиц для доставки в сетчатку не обеспечивает желаемого месячного профиля высвобождения, а также может привести к повышению внутриглазного давления и ухудшению зрения [28]. Кроме того, физический размер как имплантатов, так и частиц может препятствовать целенаправленной доставке именно к клеткам сетчатки [29].

Введение лекарств с использованием систем доставки с пролонгированным высвобождением может контролировать высвобождение и увеличивать время пребывания лекарства в целевом участке, тем самым снижая частоту доз и риск побочных эффектов [30-34]. По этой причине многие исследования сосредоточены на разработке систем доставки DEX с профилем высвобождения от нескольких дней до месяцев [35]. Особый интерес представляют конъюгаты, способные обеспечивать пролонгированное высвобождение за счет гидролиза химических связей [36].

Одним из подходов к разработке оптимальных систем доставки в стекловидное тело является конъюгация низкомолекулярных активных фармацевтических субстанций с природными полимерами [37]. Скорость диффузии лекарства в стекловидном теле и его выведение из глаза зависят от размера молекулы [38]. Таким образом, фармакологические эффекты лекарств, вводимых в стекловидное тело, могут быть продлены за счёт увеличения их молекулярного размера [39], поскольку это предотвращает быстрое выведение, наблюдаемое с низкомолекулярными компонентами, а также обеспечивает целевое и контролируемое высвобождение лекарственного средства. Помимо размера, поверхностный заряд (ζ -потенциал) частицы является решающим фактором для успешной интравитреальной доставки [40-42].

Таким образом, **целью** работы является разработка системы офтальмологической доставки дексаметазона на основе хитозана.

Для достижения поставленной цели потребовалось решение следующих задач:

1. Получение и характеристика сукцинилдексаметазона (SucDEX)

2. Разработка методики синтеза и характеристика конъюгатов SucCS-DEX.
3. Сукцинилирование SucDEX-CS для формирования отрицательно заряженного конъюгата (SucCS-DEX),
4. Изучение физико-химических характеристик конъюгатов (гидродинамический диаметр и ζ -потенциал) и кинетики высвобождения DEX.
5. Изучение противовоспалительных эффектов SucDEX и SucCS-DEX в сравнении с DEX.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика биополимеров, используемых для доставки лекарств в глаза

Прямое введение с использованием глазные капли, субконъюнктивальной или интравитреальной инъекции обеспечивает лишь кратковременное облегчение и требует частого введения, а результаты в значительной степени зависят от соблюдения пациентом режима лечения. Современные технологии доставки лекарств в глаза сосредоточены на использовании биополимерных материалов для увеличения продолжительности высвобождения в глазу и для уменьшения частоты применения. Чаще всего для этих целей используются полисахариды – производные целлюлозы, хитозан, гиалуроновая кислота, декстран, пуллулан и др.

Целлюлоза считается наиболее распространенным биополимером и содержится в клеточных стенках растений. Целлюлоза биосовместима, биоразлагаема посредством ферментативных реакций и химического гидролиза, содержит большое количество гидроксильных звеньев и поэтому гидрофильна, легко подвергается химической модификации, одобрена FDA для глазного применения. Для доставки лекарств в глаза чаще всего используют карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ), эфирное производное целлюлозы, поскольку добавление карбоксильных групп к цепям биополимера увеличивает его растворимость в воде [43]. Из-за своей биосовместимости и гидрофильности КМЦ часто встречается в глазных каплях для местного применения, таких как Refresh® или Optive® для лечения сухости глаз [44]. Линейная природа КМЦ обеспечивает прекрасную основу для гидрогелей и тонких пленок для пролонгированного местного высвобождения лекарственных средств, а также формирующихся *in situ* гелей для инъекций в стекловидное тело.

Хитозан представляет собой полисахарид, состоящий из мономерных звеньев глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, который обладает сильным положительным зарядом благодаря наличию способных к протонированию первичных аминогрупп [45]. Катионная природа полимера обеспечивает мукоадгезивные свойства, которые использовались в глазных каплях для улучшения терапевтической биодоступности и в гелях с пролонгированным высвобождением для субконъюнктивальных инъекций [46]. Амфифильная природа хитозана обеспечивает улучшенную растворимость гидрофобных препаратов и повышенное проникновение через мембрану роговицы по

сравнению с неконъюгированными препаратами [47]. Хитозан имеет ограниченное одобрение FDA и в настоящее время не одобрен для глазных применений; тем не менее, есть несколько публикаций, демонстрирующих эффективность хитозана *in vitro* и *in vivo* [48]. Такие технологии, как хитозановые липосомы и мицеллы, обеспечивают высокую полезную загрузку лекарственного средства с более длительным периодом высвобождения, которое можно легко вводить путем инъекции в стекловидное тело. Из-за своей катионной природы хитозан часто используется в качестве полимерного покрытия для менее биосовместимых анионных полимеров, для послойной сборки биоматериалов, доставки анионных терапевтических средств и генетического материала [49]. Недавно были исследованы гидрогели на основе хитозана для увеличения биодоступности местного антибиотика левофлоксацина [50]. Было показано, что термочувствительные гидрогели гексаноилгликоля и хитозана обладают низким раздражением глаз и в 1,92 раза большей биодоступностью в водянистой влаге кроликов по сравнению с традиционной суспензией антибиотиков.

Гиалуроновая кислота (НА) представляет собой гидрофильный полисахарид, состоящий из мономеров D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. НА эндогенно обнаруживается во многих тканях глаза, включая роговицу, водянистую влагу, стекловидное тело и сетчатку, и выполняет ряд важных функций в глазу. Структура НА допускает высокое содержание воды и потенциальное набухание в водной среде, а также быструю деградацию ферментативными путями [51,52]. Биосовместимость НА, высокая степень гидратации, регулируемое влагоудерживание и вязкоупругие свойства сделали ее популярным выбором для определенных типов систем доставки лекарств в глаза, таких как полимерные гели. НА также предложена в качестве биосовместимого покрытия для различных систем доставки и как неотъемлемая часть терапии на основе клеток сетчатки [53].

Чаще всего НА применяли в качестве смазывающего агента в глазных каплях от сухости глаз, а глазные капли НА служили в качестве искусственной слезы в таких продуктах, как Optive Fusion, Vismed Multi, DROPSTAR®, Hyalistil® и Neop [54]. Другие области применения включают гель Solaraze™, в котором гель НА используется для формирования депо для контролируемого высвобождения диклофенака для лечения глазного воспаления и боли [54]. В будущем, вероятно, продолжится изучение НА поскольку она представляет собой легко получаемый и

биоразлагаемый полимер со значительным потенциалом для образования разлагаемых резервуаров для контролируемого высвобождения лекарств в дополнение к свойствам гидратации и заживления.

Декстран представляет собой полисахаридный биополимер, состоящий из звеньев D-глюкозы и синтезируемый молочнокислыми бактериями. Он биосовместим, биоразлагаем, гидрофильен и способен образовывать гидрогели [55]. Декстран — это одобренный FDA биополимер, содержащийся в растворах глазных капель, таких как Tears Natural Forte® и Tears Natural II® для лечения синдрома сухого глаза [56]. Он легко химически сшивается и был исследован для местного и интравитреального введения глазных терапевтических средств [57].

Пуллулан — это полисахарид, полученный из дрожжей *Aureobasidium pullulans*, состоящий из мальтотриозных звеньев, соединенных α -1,6-связями [58]. Пуллулан биосовместим, неионогенен, стабилен в широком диапазоне температур и pH, растворим в воде, нерастворим в большинстве органических растворителей, легко обрабатывается, не пропускает кислород, повышает вязкость и биоразлагаем [58,59]. Пуллулан имеет статус FDA GRAS (generally recognized as safe) и используется в различных областях, включая доставку лекарств в глаза [60]. Неионогенная природа пуллулана часто требует сульфатирования или аминирования для включения в полимер заряженных функциональных групп или повышения реакционной способности. Гелеобразующие свойства пуллулана в воде делают его перспективным для использования в тонких пленках и гидрогелевых вставках. Например, Паем и Редди [61] исследованы свойства глазной вставки из 10% геля пуллулана для доставки лекарств в конъюнктиву. Глазная вставка из пуллулана полностью деградировала *in vitro* и полностью высвободила лекарственное средство в течение 3 ч после введения.

В таблице 1.1. обобщены свойства некоторых наиболее часто используемых для окулярной доставки биополимеров.

Таблица 1.1. Биополимеры, используемые для доставки лекарств в глаза, и их свойства.

Полимер	Экспериментальные/ клинические/ одобренные FDA биоматериалы	Применения, одобренные FDA	Достоинства/ Недостатки
Целлюлоза	Гидрогели, пленки, наночастицы, вставки	Пищевая добавка, препараты местного применения	Достоинства: Биосовместимость, нетоксичность, высокая загрузка лекарственным средством, возможность изготовления наноматериалов. Недостатки: Низкая растворимость
Хитозан	Наночастицы, гидрогели	Пищевая добавка, раневая повязка	Достоинства: Мукоадгезивный, положительно заряженный при физиологическом pH. Недостатки: Нерастворим в нейтральных или щелочных растворах, хрупкий в форме гидрогеля, сильный полиэлектролит.
Гиалуроновая кислота	Гидрогели, наночастицы, пленки, тканеинженерные скаффолды	Косметические наполнители, инъекционные препараты для лечения остеоартрита, препараты для местного применения	Достоинства: Биосовместимость, мукоадгезия, хорошие вязкоупругие свойства, встречается в природе. Недостатки: Трудно функционализировать, сложно конъюгировать лекарство, влияние молекулярной массы неясно.
КМЦ	Гидрогели, глазные капли, наночастицы	Пищевая добавка, косметические инъекции, повязка на рану	Достоинства: Биоразлагаемый, биосовместимый, способный к замедленному высвобождению, чувствительный к pH. Недостатки: Сложно разработать правильные вязкие растворы.

Декстран	Гидрогели, пленки, наночастицы	Шок и другие показания, связанные с кровью, ингаляция	Достоинства: Отличная биосовместимость Недостатки: Сложно функционализировать
Пуллулан	Гидрогели, наночастицы, глазные капли, волокна	Пищевые добавки, покрытия для таблеток, стабилизаторы и загустители	Достоинства: Легко выводится, стабилен, обладает хорошими пленкообразующими свойствами, биоразлагаем, нетоксичен. Недостатки: Неожиданно медленная диффузия, требуется функционализация для загрузки лекарств.

Хотя полимеры использовались для доставки лекарств в глаза на протяжении десятилетий, первые полимерные имплантаты для интравитреального введения получили одобрение в 1996 году, а для местного применения они использовались с 1970-х годов. Многие области применения полимеров в системах доставки лекарств в глаза все еще находятся на ранней стадии разработки, со значительными неиспользованными инновациями, которые могут привести к радикальному улучшению возможностей, качества и простоты методов лечения глазных заболеваний. В следующем десятилетии значительно увеличится количество доклинических и клинических испытаний систем доставки лекарственных препаратов в глаза на основе полимеров. На данный момент наибольший успех достигнут в разработке и клиническом использовании глазных капель, содержащих полимерный компонент для увеличения времени пребывания капли на поверхности роговицы. Тем не менее, сохраняющиеся проблемы с проникновением в роговицу оставляют место для дальнейших исследований. Текущие исследования по внедрению в клиническую практику наноцеллярных и гелеобразующих агентов направлены на дальнейшее повышение эффективности глазных капель в качестве системы доставки. Местная доставка для лечения заболеваний заднего сегмента также заслуживает пристального изучения. Для разработки интравитреальных инъекционных форм и имплантатов полимерные носители используются для увеличения продолжительности времени высвобождения лекарства. Однако интравитреальные имплантаты бывает трудно правильно расположить и еще труднее извлечь после истощения. Дальнейшие разработки биоразлагаемых имплантатов, таких как Ozurdex®, а также разработка

альтернативных систем, использующих образование гидрогелей *in situ*, вероятно, создадут менее инвазивные интравитреальные системы с аналогичной способностью повышать эффективность и снижать частоту инъекций. Субконъюнктивальные и супрахориоидальные инъекции и имплантаты – самые молодые типы систем окулярной доставки, получают толчок к развитию как только будут найдены оптимальные составы полимеров как для инъекционных растворов, так и для имплантируемых систем. Для всех этих методов получение одобрения регулирующих органов будет, пожалуй, самой серьезной проблемой. Несмотря на трудности с получением разрешения, у использования полимеров в глазных системах доставки лекарств есть светлое будущее с прочной основой клинических технологий и десятками зарегистрированных клинических испытаний систем доставки с более высокой эффективностью.

1.2. Модификации лекарственных средств хитозаном для окулярной доставки

Модификация лекарственных средств хитозаном широко используется для улучшения фармакологических характеристик, увеличения биодоступности и уменьшения побочных эффектов. Взаимодействие с полимерным носителем позволяет субстанции преодолевать глазные барьеры и увеличивает время пребывания препарата в ткани-мишени [62].

Амфифильные полимеры, имеющие как гидрофильные, так и гидрофобные части, могут образовывать самоорганизующиеся частицы или мицеллы в водных растворах. Полученная структура представляет собой гидрофобное ядро, окруженное гидрофильной оболочкой. В ядро могут входить нерастворимые в воде молекулы лекарственного средства, а гидрофильная оболочка обеспечивает растворимость в воде и стабильность мицелл в водной среде [63,64]. Различные полимеры могут образовывать такие мицеллярные носители; однако амфифильные полисахариды, такие как хитозан, и его производные имеют определенные преимущества:

1) Они являются производными природного полисахарида хитина и поэтому являются биосовместимыми и биоразлагаемыми, с низкой токсичностью и низкой иммуногенностью.

2) Хитозан легко химически модифицируется, а его гидрофобные производные самоорганизуются в нано- или микрочастицы, которые могут служить носителями лекарственных средств.

3) Кроме того, загрузка лекарственного средства во внутренние гидрофобные домены наноносителя на основе хитозана защищает лекарственное средство от разрушения, а также обеспечивает контролируемое его высвобождение.

Гидрофобная модификация хитозана может улучшить самосборку в водной среде и тем самым улучшить загрузку гидрофобных лекарств. Например, хитозан был гидрофобно модифицирован холестерином для доставки циклоспорина для лечения экстраокулярных патологий [151]. Наномицеллы на основе хитозана, модифицированные с помощью валилвалина и стеариновой кислоты, были разработаны для местной доставки DEX в глаз [152].

1.3. DEX как фармацевтическая субстанция: химические, фармакологические и биофармацевтические свойства

DEX (9-фтор-11 β ,17,21-тригидрокси-16 α -метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион, рисунок 1.1А) представляет собой синтетический ГК, фторированный гомолог гидрокортизона и входит в состав основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения. DEX имитирует гормон ГК, который секретируется корой надпочечников в основном для регуляции углеводного и белкового обмена. Наличие атома фтора в молекуле DEX делает этот ГК примерно в 7 раз более активным, чем преднизолон, и примерно в 35 раз более активным, чем кортизон, хотя DEX практически не обладает минералокортикоидной активностью. Продолжительность действия DEX составляет 36–72 ч, что намного больше, чем у кортизона и гидрокортизона (всего 5–12 ч) и преднизолона (12–30 ч) [30, 65-68].

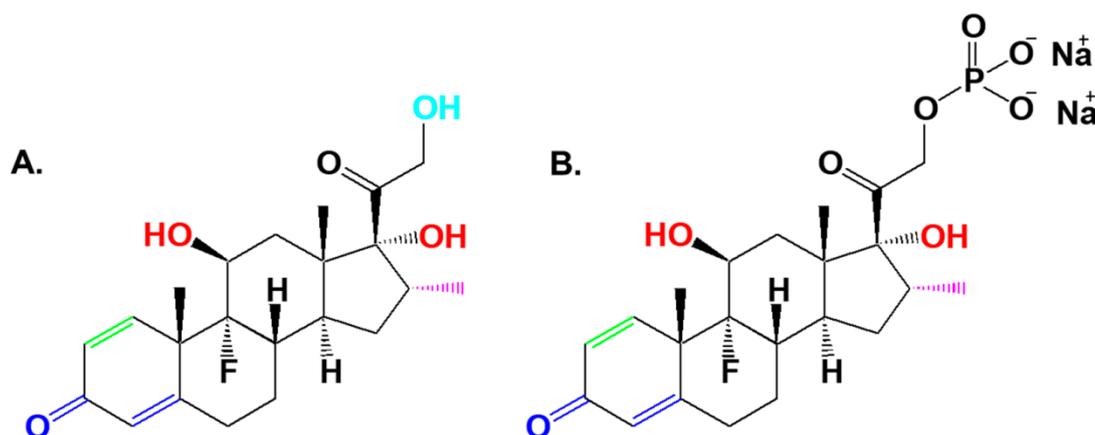


Рисунок 1.1. Химическая структура дексаметазона (А) и дексаметазона фосфата натрия (В). Структуры, необходимые для фармакологической активности, выделены красным (противовоспалительные), зеленым (регуляция углеводов), синим (функция адренокортикостероидов), голубым (задержка Na⁺) и фиолетовым (выведение Na⁺) [69,70].

DEX — липофильное вещество с растворимостью в воде 100 мкг/мл; DEX растворим в ацетоне, этаноле и хлороформе. Водорастворимая форма, DEX фосфат натрия (рисунок 1.1В), трансформируется в организме в активный DEX, — он имеет более низкую проницаемость липидной мембраны и используется как более растворимая форма активного фармацевтического вещества во внутривенных препаратах [71,72]. DEX имитирует природные ГК с точки зрения фармакологических эффектов, таких как противовоспалительное,

противоаллергическое, иммунодепрессивное, противошоковое и антитоксическое действие [73,74].

Механизм действия DEX может быть реализован как геномным, так и негеномным путем [75]. Геномный механизм выглядит следующим образом (рисунок 1.2А): липофильный DEX легко проникает через клеточную мембрану и связывается с внутриклеточными цитоплазматическими рецепторами ГК, расположенными практически во всех органах и тканях. Образовавшийся комплекс рецептор-ГК взаимодействует с определенным участком ДНК и активирует транскрипцию определенных генов. В результате синтезируется мРНК, которая действует как матрица для синтеза специфических белков, которые затем изменяют функции клетки. Например, синтезированный белок липокортин блокирует фосфолипазу А₂ (PLA₂), тем самым блокируя разрушение фосфолипидов и образование арахидоновой кислоты, обычно осуществляемое PLA₂. Затем это предотвращает синтез медиаторов воспаления (простагландинов [PG], тромбоксанов [TBX] и лейкотриенов [LT]). Кроме того, комплекс рецептор-ГК может подавлять выработку некоторых белков, таких как цитокины (СТКs, в том числе хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухоли), а также синтазы оксида азота 2 (NOS2) и циклооксигеназы-2 (COX-2). Геномные эффекты развиваются примерно через 30 мин после образования комплекса рецептор-ГК.

Напротив, негеномные эффекты развиваются в течение первых минут после введения высоких доз DEX. Эти эффекты реализуются за счет взаимодействия активированного комплекса рецептор-ГК с ядерным фактором каппа В (NF-κB) (рисунок 1.2В). Комплекс блокирует NF-κB и нарушает синтез СТКs, в том числе интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли альфа (TNF-α) и ферментов, в том числе NOS2, COX-2, PLA2 и молекулы клеточной адгезии (CAM). За счет такой сложной модуляции цитокинов, интерлейкинов и CAM, а также за счет изменений пролиферации и синтеза белков DEX блокирует активацию клеточного иммунитета, опосредованного макрофагами, моноцитами, базофилами, фибробластами и лимфоцитами. Таким образом, и противовоспалительное, и иммуномодулирующее действие реализуются одновременно несколькими путями.

Таким образом, негеномные эффекты DEX включают (i) стабилизацию клеточных мембран, включая мембраны тучных клеток и мембраны органелл,

включая лизосомы; (ii) ингибирование активности системы мононуклеарных фагоцитов; (iii) подавление миграции лейкоцитов к очагу воспаления; и (iv) снижение активности эндотелиальных клеток, моноцитов, макрофагов, нейтрофилов и фибробластов [76,77-89]. Негеномные эффекты DEX более выражены по сравнению с другими ГК; поэтому DEX широко используется в клинической медицине, особенно в форме высокодозной пульс-терапии ГК [74,87,90-92].

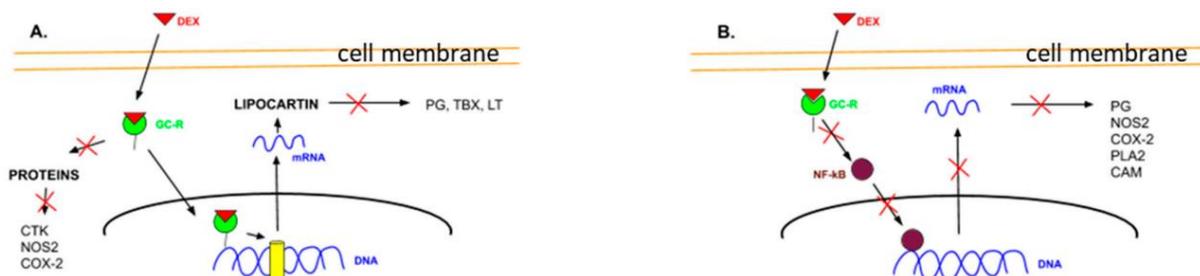


Рисунок 1.2. Модели действия дексаметазона: геномный эффект (А) и негеномный эффект (В) [91].

DEX имеет хорошую пероральную биодоступность, он быстро и полностью всасывается в желудочно-кишечном тракте и имеет период полувыведения 1-2 ч. После внутримышечного введения DEX натрия фосфат всасывается медленно, максимальная концентрация в плазме крови достигается через 7–9 ч, а период полувыведения составляет 3–5 ч. В крови 60–70% DEX связывается со специфическим белком-переносчиком (транскортином). Этот комплекс DEX-транскортин не является фармакологически активным, однако связанный DEX может высвободиться, и это поддерживает его уровень в кровотоке. DEX легко проникает через гистогематические барьеры, включая гематоэнцефалический барьер и плацентарный. Выводится в основном путем печеночного метаболизма и почечной экскреции. При местном применении (кожном, конъюнктивальном или ушном) DEX плохо всасывается и практически не оказывает резорбтивного действия или сопутствующих побочных эффектов [65,66,71,93-101].

По данным FDA, DEX используется в лекарственных формах, которые включают таблетки, растворы для перорального введения, аэрозоли, глазные и ушные суспензии, глазные мази и гели для местного применения; офтальмологические вставки, внутриглазные суспензии и интравитреальные имплантаты. DEX фосфат натрия чаще всего используется в виде раствора для инъекций, а также в виде

офтальмологических и ушных растворов, глазных мазей, кремов для местного применения и аэрозолей для ингаляций (включая назальные аппликации) [102].

DEX используется для лечения многих состояний, включая ревматоидный артрит, бронхиальную астму, системную красную волчанку, аутоиммунные заболевания, шоки различной этиологии, кожные аллергические заболевания (нейродермит, экзема), хронический риносинусит, а также для подавления отторжения трансплантата [22,65,81,103]. DEX легко проникает в конъюнктиву, поэтому является одним из наиболее часто используемых ГК для лечения заболеваний глаз, включая воспалительные заболевания как переднего отдела (кератит, блефарит, аллергический конъюнктивит, сухость глаз), так и заднего (хориоидит, увеит, возрастная макулярная дегенерация, диабетический макулярный отек и диабетическая ретинопатия) сегментов [22,30].

Фармакокинетические и фармакодинамические параметры DEX указывают на то, что разработка модифицированных нанопрепаратов DEX актуальна в первую очередь для местного применения (например, офтальмологического и кожного) и других путей применения (таких как интравитреальное, внутрисуставное, ингаляционное, назальное и ушное). Таким образом, использование различных наноносителей для этих типов введения будет направлено на увеличение времени пребывания лекарственного средства в целевом участке за счет биоадгезии, а также на обеспечение контролируемого замедленного высвобождения. В общем, идеальный наноноситель должен обеспечить более безопасную и эффективную дозировку путем адресной доставки, а также снизить дозу лекарства, частоту введения и любые побочные эффекты.

1.4. Методы синтеза конъюгатов DEX

Конъюгаты активных фармацевтических веществ с направленным вектором (например, полимером или наночастицей) представляют собой лекарственные формы 3-го поколения, обеспечивающие контролируемое и направленное высвобождение. Как правило, молекула препарата присоединяется к вектору через специальные линкеры, а последующий гидролиз обеспечивает нужные параметры высвобождения. В качестве линкеров могут быть использованы как быстрые (эфирные и амиды), так и медленные (гидразоны) линкеры [104-107].

21- гидроксильная группа DEX (рисунок 1.3) не связана с противовоспалительной активностью и поэтому является наиболее подходящим местом для конъюгации [69,70]. Кроме того, 21-гидроксил является наиболее реакционноспособным из-за его стерической доступности. Через этот 21-гидроксил DEX может быть ковалентно связан с группами COOH и NH₂ различных векторов с образованием сложноэфирных и амидных связей, которые способны к химическому и ферментативному гидролизу с высвобождением активного фармацевтического вещества. Однако гидролиз обычно легче и быстрее с эфиром, чем с амидом для высвобождения лекарства [108].

Синтез конъюгатов DEX может включать карбодиимидную химию, твердофазный синтез, полимеризацию с обратимой фрагментацией-переносом цепи (RAFT) или клик-реакции (Cu(I)-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение, Cu(II)-катализируемое [3+2] азид-алкиновое циклоприсоединение и циклоприсоединение Дильса-Альдера) и химия 2-иминотиолана (рисунок 1.3).

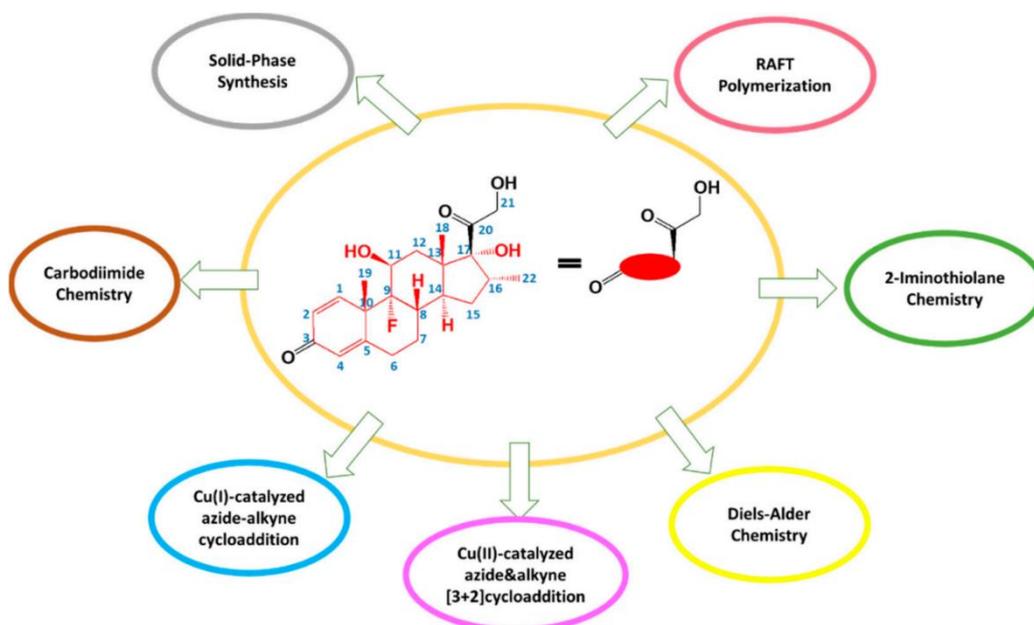


Рисунок 1.3. Методы синтеза конъюгатов дексаметазона.

1.4.1. Карбодимидная реакция

В химии карбодимидов используются связующие агенты в форме карбодимидов ($RN=C=NR$) для активации карбоксильных групп следующим образом: (i) группа $COOH$ реагирует с карбодимидом с образованием *O*-ациломочевины; (ii) *O*-ациломочевина реагирует с аминами с образованием необходимого амида. Химия карбодимидов чаще всего используется для сопряжения DEX с полимерами, которые содержат группу NH_2 для образования амида (амидная связь) или которые содержат группу $COOH$ для образования сложного эфира (эфирная связь). Для присоединения к группе NH_2 полимера группа OH DEX должна быть функционализована группой $COOH$, например, с использованием ангидридов.

Наиболее часто используемыми карбодимидами для конъюгации DEX являются 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC), *N,N'*-дициклогексилкарбодимид (DCC) и *N,N'*-диизопропилкарбодимид (DIC). Различные добавки, такие как *N*-гидроксисбензотриазол (HOBT) или *N*-гидроксисукцинимид (NHS), часто используются в химии карбодимидов для увеличения выхода и уменьшения побочных реакций [104,105,109,110].

В целом этот процесс можно описать следующим образом: (i) получение сукцинимидилового эфира (т.е. активированного эфира) реакцией с NHS в присутствии карбодимида; (ii) полученный активированный сложный эфир взаимодействует со свободной аминогруппой полимера с образованием соответствующего амида. Этот метод, основанный на активированном эфире с последующим образованием амида, является наиболее простой и удобной процедурой конъюгации DEX (рисунок 1.4) [104].

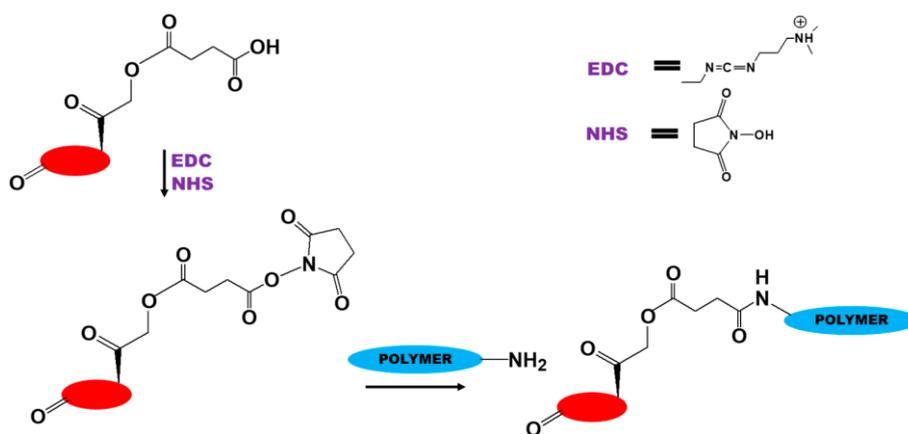


Рисунок 1.4. Схема конъюгации дексаметазона с помощью карбодимидной химии.

1.4.2. Твердофазный синтез

Твердофазный синтез используют для получения конъюгатов DEX в ходе пошаговой реакции в одном реакторе по следующей схеме: (i) аминокислота, защищенная аминогруппой, связывается с твердофазным материалом (смола) через карбонильную группу; (ii) аминогруппа затем снимается с защиты и реагирует с карбонильной группой следующей аминокислоты с защищенной аминогруппой (этот цикл повторяется для образования желаемой цепи); (iii) синтезированное соединение отсоединяется от смолы. Наиболее широко используемыми защитными группами для аминогрупп являются 9-флуоренилметилоксикарбонильная (Fmoc) и трет-бутилоксикарбонильная (Boc) группы. Например, Cho и др. [111] разработали следующую методику твердофазного синтеза циклических и линейных конъюгатов DEX-пептида. Впервые была синтезирована DEX-21-тиопропионовая кислота (SDex-COOH) (с высоким сродством к лигандсвязывающему домену ГК рецептора и совместимостью с твердофазным синтезом) [112]. (Fmoc)-диаминопропионовая кислота (1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутил)-ОН на смоле Rink Amide AM, где для синтеза использовали одну аминогруппу пептоидных последовательностей, а другой — для присоединения производного DEX (рисунок 1.5). Бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидино-фосфония гексафторфосфонат (PyBOP) использовали в качестве линкера между фрагментом DEX и пептоидами. Желаемые конъюгаты циклического DEX-пептоида получали путем снятия защиты с 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутила с помощью 2% гидразина и связывания с SDex-COOH. Полученные конъюгаты отщепляли от смол с помощью 92% трифторуксусной кислоты (TFA), содержащей 3% триизопропилсилана и 5% воды, а затем очищали с помощью обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

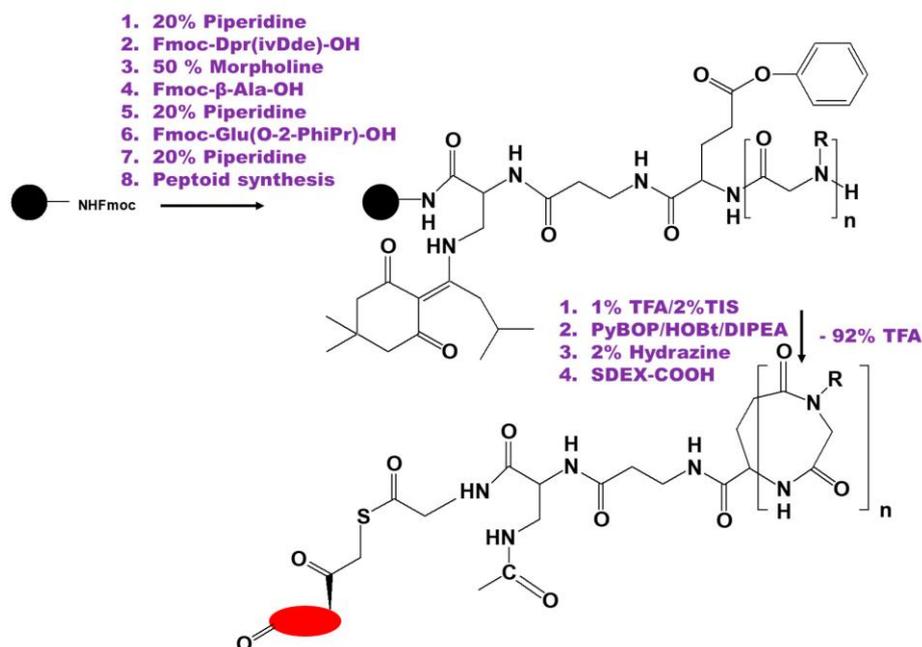


Рисунок 1.5. Схема твердофазного синтеза конъюгата дексаметазон-пептоид [111].

1.4.3. RAFT-полимеризация

Конъюгаты DEX также могут быть получены с помощью обратимой полимеризации с передачей цепи присоединения-фрагментации или полимеризации (RAFT). Обычно система полимеризации RAFT состоит из (i) мономера; (ii) инициатора (источник радикалов, также может регулировать молекулярную массу (MM) и дисперсность); и (iii) RAFT агента (агента переноса цепи). Мономеры для синтеза RAFT конъюгатов DEX могут включать (гидроксипропил)метакриламид (HPMA) и DEX-содержащие мономеры. Радикальные инициаторы, такие как азобисизобутиронитрил (AIBN) и RAFT агенты в форме тиокарбонилтиосоединений, такие как S,S'-бис(α,α' -диметил- α'' -уксусная кислота)-тритиокарбонат (CAT), наиболее часто используется для производства RAFT-полимеров, содержащих DEX. Системы RAFT обычно конъюгируют молекулу DEX в положении 3C.

Liu и др. [113] разработали pH-чувствительный DEX, содержащий конъюгат сополимера HPMA, для улучшения лечения ревматоидного артрита. Мономер, содержащий DEX, был сначала синтезирован, а затем сополимеризован с HPMA с использованием RAFT-полимеризации. Полученные конъюгаты имели молекулярную массу 34000 и содержание DEX 100 мг/г. Разработанная схема синтеза включала следующие стадии: (i) синтез N-метакрилоилглицилглицилгидразида (MA-Gly-Gly-NHNNH₂) следующим образом: до N-метакрилоилглицилглицин (MA-Gly-Gly-OH) добавляли небольшое количество ингибитора (трет-октилпирокатехин) для

предотвращения полимеризации и DCC в качестве связующего агента. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 2 ч при комнатной температуре, а затем фильтровали для удаления дициклогексилмочевины при 0°C. Затем в фильтрат добавляли гидразингидрат и перемешивали раствор в течение 4 ч при комнатной температуре, продукт осаждали гексаном и промывали смесью этанол-гексан; (ii) синтез pH-чувствительного MA-Gly-Gly-NHN=DEX был следующим: MA-Gly-Gly-NHNH₂ и DEX растворяли в метаноле и добавляли уксусную кислоту в качестве катализатора. Раствор продували аргоном, перемешивали 3 дня при комнатной температуре, выпаривали растворитель и очищали продукт колоночной флэш-хроматографией; (iii) синтез конъюгата DEX-HPMA посредством сополимеризации RAFT был следующим: HPMA и MA-Gly-Gly-NHN=DEX растворяли в метаноле/ДМФ с AIBN в качестве инициатора и CAT в качестве агента RAFT (рисунок 1.6).

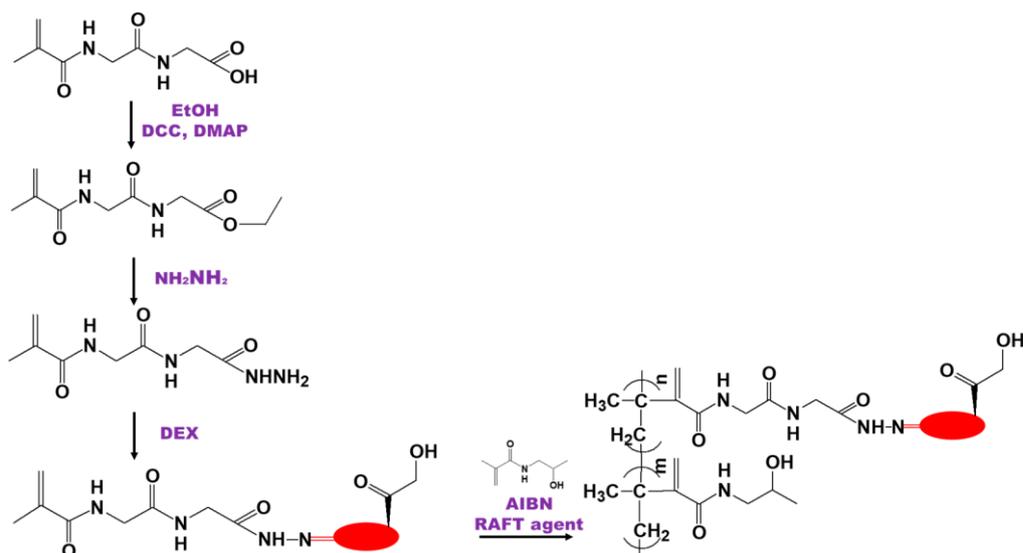


Рисунок 1.6. Схема синтеза конъюгата дексаметазон-(гидроксипропил)метакриламид методом обратимой полимеризации с передачей цепи присоединения [113].

1.4.4. Клик-химия

Клик-химия представляет собой процедуру синтеза продукта, которая объединяет небольшие модульные единицы и характеризуется «зелеными» условиями одnoreакторного синтеза, высокой специфичностью и высоким выходом продукта, а также минимальными и нетоксичными побочными продуктами [114]. Поэтому клик-реакции, включая катализируемое Cu(I) азид-алкиновое циклоприсоединение и Cu(II)-катализируемое [3 + 2] азид-алкиновое циклоприсоединение, использовались для синтеза конъюгатов DEX [115,116].

Liu и др. [115] синтезировали конъюгат DEX-полиэтиленгликоль (PEG) (DEX-PEG) с использованием Cu(I)-катализируемого 1,3-диполярного циклоприсоединения, которое включало кислотолабильную гидразонную связь для высвобождения DEX в патофизиологической среде. Первый продукт, 2,2-бис(азидометил)пропан-1,3-диол, был синтезирован и затем монокарбоксилирован метил-2-бромацетатом. Затем карбоксилат превращали в гидразид путем взаимодействия с избытком гидразина. На последнем этапе была образована неустойчивая к кислотам гидразонная связь путем сочетания DEX с гидразидным соединением (рисунок 1.7). Используя клик-сополимеризацию, DEX-PEG был синтезирован путем смешивания DEX-содержащего мономера, ацетилена PEG, ацетиленмонометилового эфира PEG (mPEG) (в качестве обрыва цепи), трис-(гидроксипропилтриазилилметил)амин (в качестве стабилизатора), и катализатор Cu(I). Исследования высвобождения *in vitro* показали линейный профиль высвобождения DEX при pH 5,0 (приблизительно 10% DEX высвобождалось за 17 дней). Напротив, менее 1% DEX высвобождалось при pH 6,0, а высвобождение DEX не обнаруживалось при pH 7,4 через 17 дней. Исследование *in vivo*, сравнивающее конъюгат с эквивалентной дозой свободного DEX, показало, что однократное введение конъюгата DEX-PEG обеспечивает долгосрочное (> 15 дней) снижение воспаления голеностопного сустава в крысиной модели артрита, вызванного адьювантом.

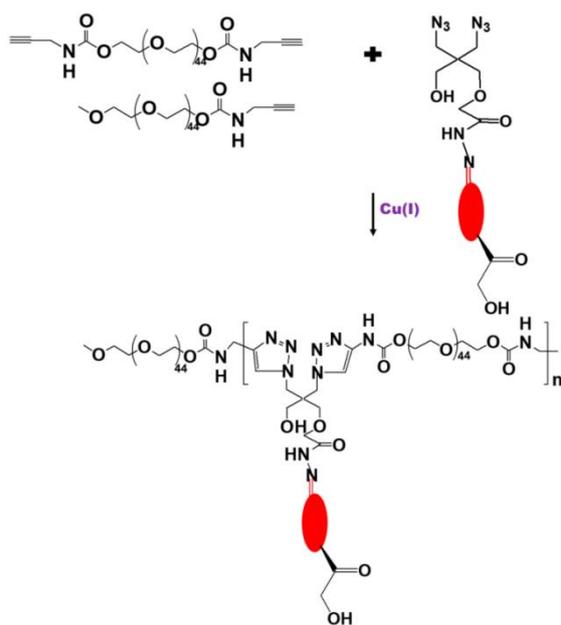


Рисунок 1.7. Схема синтеза конъюгата дексаметазона с ацетиленполиэтиленгликолем с помощью Cu(I)-катализируемого 1,3-диполярного циклоприсоединения.

Karandish и др. [116] использовали Cu(II)-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение для разработки ориентированных на ядро полимером, реагирующих на стимулы, для доставки противоопухолевых препаратов к ядрам раковых клеток поджелудочной железы. В этом случае группу DEX использовали для улучшения транспорта переносчиков лекарств к ядрам за счет расширения ядерных пор. Производное алкин-DEX было сначала синтезировано под N₂ с использованием метансульфонилхлорида и пропаргиламина; это производное затем конъюгировали с сополимером N₃-PEG-полимолочной кислоты или сополимером PEG-S-S-полимолочной кислоты с помощью комплекса Cu(II) (смесь CuSO₄ и пентаметилдиэтилентриамина [PMDETA]), катализируемой реакцией циклоприсоединения) (рисунок 1.8). Исследования ядерного поглощения показали, что целевые полимеросомы, содержащие DEX, присутствовали в ядрах раковых клеток поджелудочной железы после 3 ч инкубации, в то время как нецелевые полимеросомы, не содержащие DEX, не проникали в клетки.

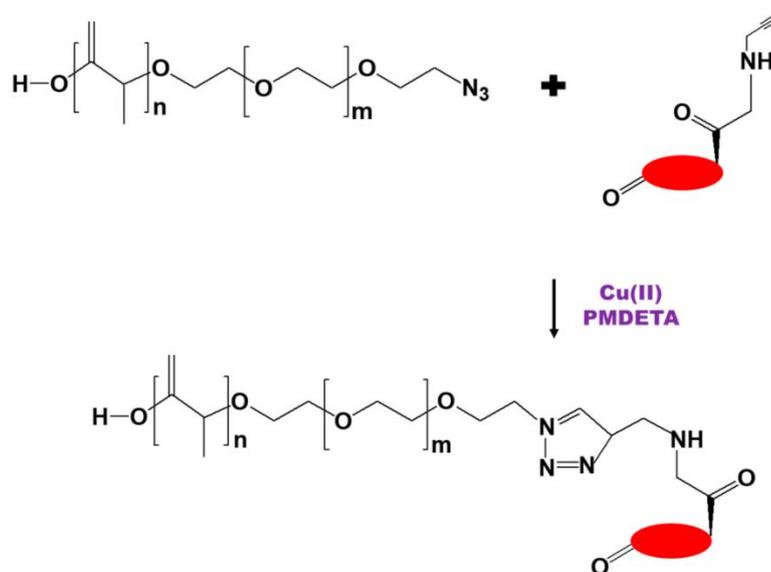


Рисунок. 1.8. Схема синтеза конъюгата дексаметазона с сополимером N₃ - полиэтиленгликоля и полимолочной кислоты с помощью Cu(II)-катализируемого циклоприсоединения [116].

1.4.5. Реакция Дильса-Альдера

Циклоприсоединение Дильса-Альдера [4 + 2], которое представляет собой химическую реакцию между сопряженным диеном и замещенным алкеном (диенофилом), образующим замещенное производное циклогексена, также может быть использовано для дизайна конъюгатов DEX. Например, Jia et al. [117]

разработали конъюгаты DEX в качестве адипогенного фактора с системой наносфер магнитной гиалуроновой кислоты (НА) (ММ 1 600 000) для инженерии жировой ткани. Магнитная наносферная система НА была получена между фурановой и малеимидной группами производных НА (конъюгация фурфуриламина с карбоксильной группой на НА с образованием амидной связи) водным циклоприсоединением Дильса-Альдера. Фуран-функционализированный DEX-пептид (DEX-GQPGK) затем синтезировали с помощью твердофазного синтеза с использованием синтетического Fmoc-защищенного аналога аминокислоты. 3-фурановую функциональность вводили непосредственно во время твердофазного синтеза, а сложный эфир DEX-NHS вводили путем реакции с N-концевой первичный амин. Наконец, была приготовлена система наносфер НА путем конъюгации НА-фурана и DEX-GQPGK-фурана с НА-малеимидом посредством циклоприсоединения Дильса-Альдера (рисунок 1.9). Полученные частицы имели размер около 150 нм и обеспечивали пролонгированное высвобождение DEX (13% за 24 ч, PBS, pH 7,4). Тесты на цитотоксичность *in vitro* показали, что включение DEX в наносферы НА дало продукт, который показал высокую эффективность в повышении жизнеспособности стволовых клеток, полученных из жировой ткани человека.

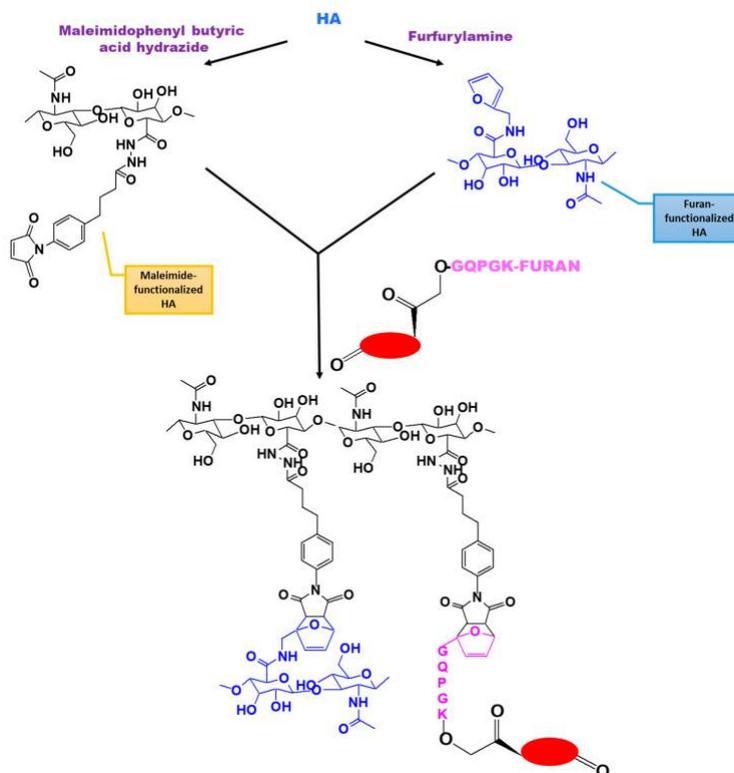


Рисунок 1.9. Схема синтеза конъюгата дексаметазона с малеимидом гиалуроновой кислоты методом циклоприсоединения Дильса-Альдера [117].

1.4.6. Реакция Траута

Химия 2-иминотиолана (реактив Траута). Gruneich и др. [69] разработали процедуру введения группы NH₂ в DEX для создания катионного DEX для доставки генов и противовоспалительной активности. Это было достигнуто 45-минутной однореакторной реакцией между алифатическим полиамином спермином и DEX-21-мезилатом (DEX-21 метансульфонатом) в присутствии 2-иминотиолана по следующему механизму. Реагент Траута селективно раскрывал кольцо первичными аминами на спермине с образованием гидролитически чувствительной амидиновой связи между спермином и иминотиоланом и реактивным анионом тиолата, который реагировал с α-кетомезилатом в положении 21 DEX-мезилата с образованием α-кето-тиоэфир между спермином и иминотиоланом. Полученный конъюгат гидролизовали в 1 М NaOH в течение 20 мин, что приводило к разрушению амидиновой связи между спермином и иминотиоланом и образованию амида DEX, состоящего из 21-замещенной боковой цепи амида бутилтиоэфира на DEX. (рисунок 1.10)

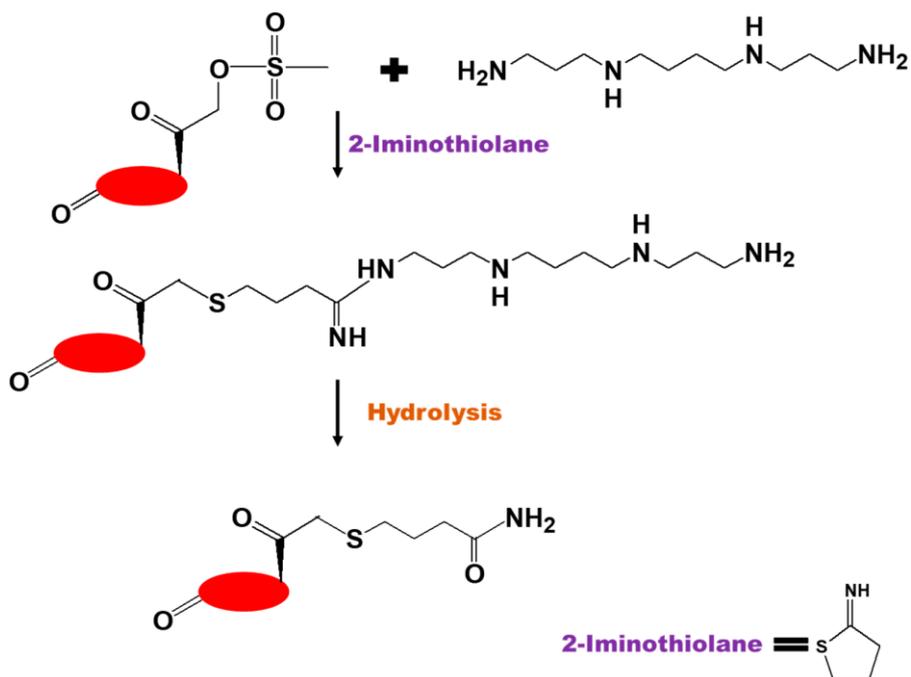


Рисунок 1.10. Схема синтеза дексаметазона-NH₂ с помощью химии 2-иминотиолана (реактив Траута).

Эта процедура имеет два преимущества. Во-первых, DEX с аминфункциональными группами можно использовать для конъюгации с носителями, содержащими группы COOH. Во-вторых, реагент Траута можно использовать для конъюгации DEX с аминсодержащими носителями. Этот метод чаще всего используется для синтеза систем доставки генов.

1.5. Конъюгаты дексаметазона, как системы доставки с модифицированным высвобождением

DEX широко используется для синтеза конъюгатов с модифицированным высвобождением без ущерба для фармакологической активности. Существует много примеров которые показывают, что для иммобилизации DEX можно использовать различные векторы и платформы и что эти системы могут быть успешно использованы для адресной доставки лекарств в различные ткани и органы.

1.5.1. Глазные системы доставки

Местное введение стероидов в виде глазных растворов, суспензий или мазей с меньшей вероятностью вызывает серьезные побочные эффекты по сравнению с системным применением (инъекционным, пероральным) и является более комфортным для пациента. Однако местное применение имеет низкую биодоступность для глаз из-за быстрого прекорнеального клиренса и плохой проницаемости роговицы. Конъюгаты DEX с различными биоадгезивными полимерами могут увеличивать время пребывания в прекорнеальной области и улучшать проницаемость роговицы, тем самым повышая биодоступность для глаз.

Лечение заболеваний сетчатки (диабетический макулярный отек и диабетическая ретинопатия) требует разработки интравитреальных форм, не требующих хирургической имплантации. Yu и др. [118] разработали конъюгат DEX-пептид для местного применения в глаза путем образования биоразлагаемого сложноэфирного линкера янтарного ангидрида, который может самопроизвольно собираться в мицеллы в водном растворе. Конъюгаты получали классическим методом твердофазного пептидного синтеза с использованием 2-хлортритилхлоридной смолы и N-Fmoc-защищенных аминокислот (N-защищенных аминокислот). Сукцинил-DEX связывали с пептидом с использованием N,N-диизопропилэтиламина и O-бензотриазол-1-ил-тетраметилурония гексафторфосфат в качестве связующего агента. Образовавшиеся мицеллы имели размер 150 нм и несли отрицательный заряд -18 мВ за счет ионизированных карбоксильных групп аминокислотных остатков на поверхности мицеллы. Исследование высвобождения *in vitro* (PBS, содержащий 20 ед/мл эстеразы, pH = 7,4) показало, что почти 100% высвобождение DEX за 48 ч.

Yavuz и др. [108] изготовили субконъюнктивальные и интравитреальные конъюгаты DEX-поли(амидоamina) (PAMAM) дендримера для доставки в сетчатку. Конъюгаты были синтезированы путем этерификации PAMAM-карбоксильной группы с DEX-гидроксильной группой в присутствии DCC и DMAP. Полученные конъюгаты имели степени замещения 4 и 10, размеры 130–185 нм и ζ -потенциалы от -17 до -57 мВ. Изучение гидролиза в присутствии тканей пигментного эпителия роговицы и склеро-хориоидеи-ретиального эпителия показало, что ферментативная деградация конъюгатов протекает очень медленно, так как за 6 дней высвобождается менее 8% DEX. Флуоротронный анализ показал низкие уровни конъюгата в стекловидном теле и сетчатке после субконъюнктивальной инъекции, но высокие уровни после интравитреального введения конъюгата (1 мг/мл).

Более того, Wang и др. [119,120] разработали конъюгаты микрочастиц пористого диоксида кремния для интравитреального контролируемого высвобождения DEX. Для этого частицы пористого диоксида кремния, функционализированные амином, подвергали взаимодействию с янтарным ангидридом с получением поверхности, функционализированной карбоновой кислотой (группа карбоновой кислоты образовалась в результате раскрытия кольца янтарного ангидрида посредством реакции с аминогруппой на поверхности частиц). Затем DEX конъюгировали с помощью реакции этерификации Стеглиха между гидроксильной группой DEX и этой карбоксильной группой (в присутствии DCC и DMAP). Эффективность загрузки лекарственным средством составляла от 6 до 10%. Исследование высвобождения лекарственного средства *in vitro* показало, что высвобождение DEX из конъюгатов (в среде чистой воды для культивирования клеток) было устойчивым в течение более 90 дней; это было на 80 дней дольше, чем высвобождение из свободного DEX или из частиц пористого кремнезема с инфильтрацией в тех же условиях. Кроме того, пилотное исследование *in vivo* на модели глаза кролика продемонстрировало, что однократная инъекция в стекловидное тело (3 мг) давала свободный уровень лекарственного средства через 2 недели 110 нг/мл, что значительно выше терапевтического уровня.

1.5.2. Конъюгаты антиген-лекарственное средство.

Лечение пациентов (например, с рассеянным склерозом) иммуномодулирующими препаратами, включая DEX, неспецифично и может

привести к общей иммуносупрессии. Направленная доставка конъюгатов антиген-ГК к больным клеточным популяциям может значительно снизить уровень этой тяжелой побочной реакции.

Pickens и др. [121] образовали конъюгаты DEX-антиген для лечения рассеянного склероза с использованием Cu(II)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения с включением гидролизуемого линкера для поддержания активности высвобождаемого DEX. В качестве антигена использовали протеолипидный белок миелиновой оболочки; и 4-пентиновая кислота использовалась в качестве сложноэфирного линкера, способного высвободить DEX в кислой среде. Сложный эфир азидоуксусной кислоты NHS использовали для N₃-функционализации OH-группы DEX. Изучение кинетики высвобождения показало, что DEX высвобождается через 100 ч в незабуференных растворах (pH 7,0) и полностью высвобождается примерно через 50 ч при pH 5,5. В то же время полный гидролиз сложноэфирных линкеров происходил в течение нескольких часов, что указывает на то, что фосфат-анионы катализируют эффект посредством нуклеофильной атаки на сложноэфирную связь. Подкожное введение этих конъюгатов DEX-антиген мышам, индуцированным аутоиммунным энцефаломиелитом, защищало их от начала заболевания в течение 25 дней, демонстрируя повышенную эффективность по сравнению со свободным DEX.

1.5.3. Противоопухолевые системы доставки.

Микроокружение опухоли аномально и неоднородно. В одном из процессов (так называемый эффект Варбурга) раковые клетки неэффективно используют глюкозу и производят большое количество молочной кислоты, которая подкисляет опухолевую ткань. Кроме того, эффект повышенной проницаемости и удерживания (эффект ЭПР) показывает, что опухоли имеют аномальные кровеносные сосуды и неэффективный лимфодренаж, что позволяет крупным молекулам и частицам (<500 нм) проникать в ткани опухоли и оставаться в них длительное время. Эффекты Варбурга и ЭПР являются обоснованием для систем доставки лекарств, чувствительных к pH, которые могут доставлять и высвобождать лекарства, главным образом, в опухолевых тканях [122-124]. Поэтому основное внимание в разработке уделяется конъюгатам адресной доставки, чувствительным к специфическим факторам опухолевой среды (высокая концентрация глутатиона, pH ~5–6). При

внутривенном введении эти системы избирательно накапливаются в опухоли за счет ЭПР-эффекта, а затем лекарство высвобождается в ответ на низкий pH и окислительно-восстановительную среду.

DEX является полезной молекулой для доставки лекарств в ядро. В цитозоле DEX связывается с GC-рецепторами и в конечном итоге транслоцируется в ядро, увеличивая размер ядерных пор почти до 100 нм, тем самым облегчая доставку носителя лекарственного вещества в ядро [125-127]. Вторым полезным фактором является противовоспалительный эффект DEX. Хроническое воспаление является важным онкогенным фактором; например, ассоциированные с опухолью макрофаги способствуют гиперплазии опухолевых клеток посредством секреции факторов роста, способствуют ангиогенезу посредством секреции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), способствуют метастазированию и инвазии опухолей посредством секреции матриксных металлопротеиназ, а также подавляют адаптивный иммунитет посредством секреции различных иммуносупрессивных цитокинов [128].

Chaikomon и др. [129] синтезировали конъюгаты DEX-доксорубин (DOX) для преодоления резистентности раковых клеток, обладающих способностью активно удалять DOX из ядра. Конъюгат был получен путем простой конъюгации 3'-аминогруппы DOX с атомом 3C молекулы DEX через линкер 2-иминотиолана. Конъюгированный продукт сохранял цитотоксичность в клетках MCF-7 (клетки рака молочной железы), сверхэкспрессирующих множественную лекарственную устойчивость-1, которые показали примерно в 16 раз более высокую устойчивость к DOX, чем клетки дикого типа.

Howard и др. [106] конъюгировали DEX с блок-сополимерами ПЭГ-поли(аспартата) (молекулярная масса 12000) с использованием двойных линкеров гидразона, сложного эфира или сложного эфира гидразона для достижения высвобождения лекарственного средства с контролируемым pH. Кетонные кислоты, содержащие 3, 4 и 5 метиленовых групп (4-ацетилмасляная кислота [ABA], 6-оксогептановая кислота [ОНА] и 7-оксооктановая кислота [ООА]), использовали в качестве спейсеров для разделения двойных линкеров. DEX был конъюгирован через сложный эфир или гидразон-эфир (гидразон-ABA-эфир, гидразон-ОНА-эфир и гидразон-ООА-эфир) двойными линкерами в результате реакции этерификации между гидроксильной группой C21 DEX и карбоксильными группами

сополимеров. Загрузка DEX составляла около 4,5–9%. Сложноэфирный линкер продемонстрировал ускоренное высвобождение DEX при pH 7,4 и подавленное высвобождение при pH 5,0. Двойные линкеры гидразон-эфир показали противоположные модели высвобождения лекарственного средства с ускоренным высвобождением при pH 5,0 и подавленное высвобождение при pH 7,4. Таким образом, можно ожидать, что конъюгаты с двойными линкерами гидразон-эфир будут стабильными в крови и будут высвобождать DEX в кислой среде опухоли. Кроме того, высвобождение DEX снижалось при pH 5,0 по мере увеличения длины цепи спейсера, но не зависело от длины спейсера при pH 7,4.

Krakoviřcová и др. [130] синтезировали конъюгат, в котором DOX и DEX были ковалентно присоединены к сополимеру HPMA. Оба препарата были присоединены к полимерному носителю с помощью спейсеров, содержащих pH-лабильные гидразонные связи. Сложные эфиры DEX получали путем этерификации гидроксильной группы C21 двумя кетокислотами, LEV или 4-(2-оксопропил)бензойной кислотой. Оба эфира DEX были присоединены к полимерному носителю гидразонной связью со спейсером, содержащим остаток 6-аминогексановой кислоты. DOX был присоединен к тому же полимерному носителю посредством гидразонной связи, образующейся при конденсации его карбонильной группы C13 с гидразидной группой полимера. Высвобождение *in vitro* DEX и его эфира (DEX-LEV) из полимерного конъюгата показало гораздо меньшее высвобождение при pH 7,4 (30% суммы DEX и DEX-LEV за 2 ч), чем при pH 5 (более 80 % за 10 мин).

1.5.4. Системы доставки генов.

Тремя важными этапами эффективной доставки генов являются клеточное поглощение, эндосомальное высвобождение и ядерная транслокация [131]. Ядерный транспорт является одним из основных препятствий, которые необходимо преодолеть при выборе используемых аддуктов, поскольку они могут действовать как сигналы ядерной локализации. Например, DEX имеет внутриклеточные рецепторы и может эффективно проникать в ядро посредством стероид-опосредованного механизма доставки генов [132].

Jeong и др. [109] разработали конъюгаты DEX-полиэтиленимин (PEI) в комплексе с плазмидой minicircle (гидродинамический размер приблизительно 200 нм) в качестве системы доставки генов в стволовые клетки, полученные из жировой ткани,

для индукции синергических эффектов с хондрогенными генами. DEX был ковалентно конъюгирован с PEI с использованием карбодимидной химии. Эксперименты *in vivo* с использованием хирургически индуцированного остеоартрита показали, что у крыс, получавших конъюгаты, были значительно более низкие уровни СОХ-2 (в 4–5 раз) и матриксной металлопротеиназы-13 (в 5–10 раз) в синовиальной жидкости, а также значительно меньшая деструкция суставов, чем у контрольных крыс.

Malaekheh-Nikouei и др. [133] разработали переносчики генов путем конъюгации DEX (5, 10 и 20%) с полипропиленiminaми (PPI) 4 и 5 поколения (катионные дендримеры с концевыми аминогруппами, мощные невирусные векторы) 21-ОН группы DEX сначала модифицировали метансульфонилхлоридом для его активации, а затем конъюгировали с PPI с использованием реагента Траута (2-иминотиолан; тиолирующий реагент, который реагирует с первичными аминогруппами с образованием сульфгидрильных групп). Степени замещения DEX составляли 4, 8 и 15%. Полученные частицы имели размер 170–400 нм, ζ -потенциал варьировался от +20 до +30 мВ. Добавление DEX увеличивало трансфекцию в 1,3–1,6 раза и снижало цитотоксичность в 2–5 раз.

Choi и др. [134] разработали многоцелевую систему доставки для лечения астмы путем объединения DEX с малой интерферирующей РНК (siRNA). Комплекс формировали, сначала получая конъюгат DEX-21-мезилата с PEI (MM 2000) (PEI2k) через линкер 2-иминотиолана (реагент Траута), а затем добавляя витамин D-связывающий белок и siРНК. Полученные частицы имели размер около 400 нм и ζ -потенциал около +47 мВ. Исследование *in vivo* на мышинной модели показало, что разработанные конъюгаты эффективно снижают воспаление дыхательных путей, гиперплазию бокаловидных клеток и экспрессию IL-4, IL-13 и CCL11.

Jeon и др. [135] разработали DEX-конъюгированный PAMAM поколения 1 (PAMAMG1) и поколения 2 (PAMAMG2) для доставки в мозг гена гемоксигеназы-1 для лечения ишемического инсульта. Конъюгаты синтезировали реакцией сшивания с использованием реактива Траута и DEX-21-мезилата. Молярное соотношение между конъюгированным DEX и PAMAM составляло 2,4:1. Полученные комплексы имели размер частиц примерно 170 нм и положительный ζ -потенциал примерно 56 мВ. Эффективность доставки рDNA в клетки Neuro2A была примерно в 1,5 раза выше для

разработанных конъюгатов, чем для PEI25k, DEX-конъюгированного PEI или свободного PAMAM.

1.6. *Выводы по обзору литературы*

1. Успехи в разработке подходов на основе нанотехнологий для преодоления ограничений местного применения глазных препаратов для терапии заболеваний переднего и заднего отрезка глаза весьма впечатляют. Новые составы были разработаны для лучшего контакта с поверхностью глаза и увеличения времени пребывания на поверхности глаза, лучшего проникновения в глаз, длительного высвобождения лекарственного средства и пролонгированного действия лекарственного средства. Таким образом, эффективность этих препаратов может быть существенно увеличена. Кроме того, доза и частота введения препарата могут быть уменьшены за счет уменьшения местных и системных побочных эффектов препарата.

2. Хитозан легко химически модифицируется и легко самоорганизуется в нано- или микрочастицы с образованием носителей лекарственных средств, при этом обладает низкой токсичностью и из литературы можно сделать вывод о том, что хитозан является перспективным биополимером, который можно использовать как носитель для лекарственного средства.

3. Конъюгаты DEX очень широко используются:

I. В качестве систем доставки DEX для усиления фармакологических эффектов ГК (противовоспалительного, иммуномодулирующего и др.)

II. В качестве противоопухолевых систем доставки, включая комбинации с химиотерапевтическими препаратами.

III. Как системы доставки генов.

4. Скорость высвобождения DEX из конъюгатов зависит от молекулярной массы полимеров, метода синтеза и типа линкера. Пролонгирование действия DEX снижает потребность в дозе и частоте введения препарата. Кроме того, тип линкера обеспечивает стабильность конъюгата в физиологических условиях и его гидролиз с высвобождением активного DEX в патологических средах (например, очагах воспаления и опухолях). Такой подход позволяет защитить здоровые органы и ткани и обеспечивает адресную доставку DEX к патологическому очагу, повышая при этом биодоступность и снижая токсичность и побочные эффекты.

5. Чаще всего системы доставки DEX используются для лечения воспалительных заболеваний суставов. Однако эти системы также обладают

большим терапевтическим потенциалом для интравитреальной доставки. Адресная доставка DEX-конъюгатов в стекловидное тело глаза позволит значительно снизить дозу препарата и частоту побочных эффектов, а пролонгированное высвобождение сократит количество необходимых инъекций. Однако только небольшое количество исследований сосредоточено на конъюгатах DEX с природными полисахаридами, которые представляют собой нетоксичные и биосовместимые макромолекулы, подходящие для простых методов конъюгирования DEX. Эти виды конъюгатов представляют интерес для медицинского применения, в том числе для интравитреальной доставки DEX. В этом плане большой потенциал имеют системы доставки на основе НА, являющейся естественным компонентом стекловидного тела.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Реактивы и материалы

В качестве объекта исследований использовали хитозан (CS) из панциря краба (ЗАО «Биопрогресс», Щелково) со средневязкостной молекулярной массой 3.7×10^4 и степенью дезацетилирования $DD=0.74$ (из данных спектроскопии ЯМР 1H).

Дексаметазон (DEX)

Белый или почти белый кристаллический порошок без запаха. Устойчив на воздухе. Растворимость в воде (25 °C): 10 мг/100 мл; растворим в ацетоне, этаноле, хлороформе [136].

Солевой фосфатный буферный раствор (PBS)

Представляет собой стерильный фосфатный буферный раствор, содержащий калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный, натрия хлорид, воду очищенную в определенных пропорциях [137].

1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид(EDC)

Твердое кристаллическое вещество, водорастворимый карбодимид, как правило, в виде гидрохлорида [138].

N-гидроксисукцинимид (NHS)

Твердое бесцветное вещество, он используется в качестве активирующего реагента для карбоновых кислот [139].

Тетрагидрофуран (ТГФ)

Бесцветная легколетучая жидкость с характерным «эфирным» запахом. Важный апротонный растворитель. Смешивается со многими органическими растворителями и с водой [140].

Янтарный ангидрид

Бесцветные кристаллы, растворяются в кипящем хлороформе, этилацетате, этаноле, плохо растворимы в воде и диэтиловом эфире [141].

Хлористоводородная кислота

Бесцветная прозрачная летучая жидкость, своеобразного запаха, кислого вкуса. Смешивается с водой и спиртом во всех соотношениях, образуя растворы сильно кислой реакции [142].

Гидрокарбонат натрия

Белый кристаллический порошок без запаха, солено-щелочного вкуса. Устойчив в сухом воздухе, медленно разлагается во влажном. Легко растворим в воде (1:2) с образованием щелочных растворов (рН 5% раствора 8,1), практически нерастворим в этаноле [143].

Трифторуксусная кислота

Фторорганическая карбоновая кислота, органическое вещество. По внешнему виду представляет собой бесцветную дымящую жидкость с резким специфическим запахом (отдаленно напоминающим запах уксусной кислоты). Смешивается во всех отношениях с водой, этанолом, ацетоном, диэтиловым эфиром. С водой образует азеотроп (20,6 % воды) [144]

Дейтерированная вода (D₂O) производства Sigma-Aldrich

Изотопная разновидность воды. Наиболее часто употребляется как растворитель для спектроскопии ЯМР.

Пиридин (ЗАО «Вектон» (Россия))

Бесцветная жидкость с резким неприятным запахом; смешивается с водой и органическими растворителями [145].

Пиридин сушили над гидроксидом натрия и перегоняли перед использованием.

Другие реагенты и растворители были получены из коммерческих источников и использовались без дальнейшей очистки.

2.2. Синтез сукцинил дексаметазона (SucDEX)

SucDEX получали по следующей методике с некоторыми модификациями [146]: 0,2 г (0,51 ммоль) DEX и 0,255 г (2,55 ммоль) SA растворяли в 2,2 мл пиридина. Реакционную смесь оставляли на 7 сут при комнатной температуре, затем продукт осаждали 30 мл 1 М HCl для очистки от пиридина. Образовавшийся белый осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали деионизированной водой и сушили при 60°C в течение 3 ч. Степень сукцинирования по данным ¹H ЯМР составила около 80%.

2.3. Синтез конъюгатов дексаметазон-хитозан (CS-DEX)

CS (0,1 г, 0,53 ммоль N) сначала растворяли в 5 мл 0,1 М HCl, а затем добавляли определенное количество SucDEX, растворенного в 0,5 мл тетрагидрофурана. Затем добавляли EDC и NHS для активации карбоксильной группы SucDEX, и реакционную

смесь перемешивали в течение 72 ч при 20 °С (мольное соотношение SucDEX, EDC и NHS представлено в таблице 2.1). Полученный продукт осаждали ацетоном, дважды промывали ацетоном, фильтровали, растворяли в дистиллированной воде, подвергали диализу против дистиллированной воды в течение 3 сут и лиофилизовали.

Таблица 2.1. Условия синтеза конъюгатов CS-DEX.

Образец	Мольное количество реагентов			
	CS	EDC	NHS	SucDEX
CS-DEX-5	1	0,05	0,05	0,05
CS-DEX-10	1	0,1	0,1	0,1
CS-DEX-20	1	0,2	0,2	0,2
CS	-	-	-	-

2.4. Синтез конъюгатов сукцинил хитозана-дексаметазон (SucCS-DEX)

Синтезированный CS-DEX (0,1 г, 0,45 ммоль N) диспергировали в 10 мл дистиллированной воды, добавляли SA в 5-кратном молярном отношении (относительно CS) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре примерно 7 ч. В реакционную смесь добавляли гидрокарбонат натрия до pH 7–8. Полученный продукт диализовали в течение 3 дней против дистиллированной воды, а затем лиофилизовали.

2.5. Характеристика конъюгатов (SucCS-DEX)

Спектры ¹H ЯМР были получены в Институте высокомолекулярных соединений РАН в.н.с., к.ф.-м.н. Добродумовым А.В. на приборе Bruker Avance 400 (Bruker, Billerica, MA, USA). Образцы SucDEX (10 мг) растворяли в DMSO-d6 и регистрировали спектр при 20°C. Образцы CS-DEX и SucCS-DEX готовили растворением 5 мг конъюгатов в D₂O. Для протонирования всех аминогрупп к раствору добавляли 5 мкл трифторуксусной кислоты. Спектры записывали при 70°C с использованием последовательности импульсов zgpg с подавлением остаточной H₂O.

ИК-Фурье спектры были получены в Институте высокомолекулярных соединений РАН н.с. Власовой Е.Н. в режиме ослабленного полного внутреннего отражения с использованием ИК-Фурье спектрометра Vertex-70 (Bruker, Billerica, MA, USA), оснащенного приставкой полного отражения ZnSe (PIKE Technologies, Fitchburg, WI, USA). Элементный анализ (EA) был выполнен в Ресурсном центре СПбГУ Методы анализа состава вещества на элементном анализаторе Euro EA3028-NT. Гидродинамический диаметр (2Rh) измеряли методом динамического

светорассеяния, а ζ -потенциал — методом электрофоретического светорассеяния на приборе «Фотокор Компакт-3» («Фотокор», Москва, Россия) с гелий-неоновым лазером (659,7 нм, 25 мВ). Измерения проводились при температуре 20 °С с углом рассеяния 90°.

Морфологию частиц изучали в научном центре «ЦНИИ Электроприбор» с помощью растровой (сканирующей) электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Tescan Mira 3 (Tescan, Брно, Чехия). Изображения получены в режиме вторичных электронов (SE) при ускоряющем напряжении 20 кВ; расстояние между образцом и детектором составляло 6 мм. Исследуемые образцы были помещены на двусторонний углеродный скотч и высушены в вакуумной печи в течение 48 ч до проведения РЭМ наблюдений.

2.6. Определение содержания DEX в конъюгатах SucCS-DEX

Содержание DEX в SucCS-DEX определяли спектрофотометрически. Для этого определяли концентрацию DEX в наносuspensions (1 мг SucCS-DEX на 20 мл бидистиллированной воды) при длине волны 242 нм с использованием калибровочной кривой по уравнению $y = 89,817x$, $R^2 = 0,9923$, 10 кварцевая кювета мм, спектрофотометр УФ-видимого диапазона UV-1700 Pharma Spec (Shimadzu, Киото, Япония). Затем рассчитывали содержание DEX на 1 мг SucCS-DEX.

2.7. Высвобождение DEX in vitro из конъюгатов SucCS-DEX

Образец SucCS-DEX массой 1 мг диспергировали в PBS (4 мл, pH 7,4) и инкубировали при 37 °С в течение 30 дней. Через выбранные промежутки времени наносuspension ультрацентрифугировали при 4500 об/мин с использованием центробежного концентратора с отсечкой молекулярной массы Vivaspin® Turbo4 5000 и пополнением объема среды растворения свежим буфером. Количество и химическую структуру высвобожденного DEX или SucDEX было определено методом сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии на базе НМИЦ им. В.А. Алмазова с.н.с., к.б.н. Дубровским Я.А. Хроматографическое разделение проводили с использованием УВЭЖХ (Bruker Daltonics GmbH, Бремен, Германия), оснащенной аналитической колонкой Millipore Chromolith Performance/PR-18e, C18 (100 мм × 2 мм, Merck, Дармштадт, Германия) с Chromolith®. Защитные картриджи RP-18 с торцевой крышкой 5-3 (Merck, Дармштадт, Германия), работающие при скорости потока 300 мкл/мин. Подвижные

фазы были следующими: А = вода: ацетонитрил: муравьиная кислота - 100:1:0,1 (об . / об . / об .) и В = вода: ацетонитрил: муравьиная кислота - 10:90:0,1 (об . / об . / об .). Градиент элюирования был следующим: 0 → 1 мин 40%В → 50%В (линейный градиент); 1 → 1,2 мин 50% В → 90% В (линейный градиент); 1,2 → 2,2 мин 90% В (изократический); 2,2 → 2,4 мин 90% В → 40% В (линейный градиент); 2,4 → 4 мин 40% В (изократический). Общее время выполнения метода составило 4 мин; объем инъекции составлял 5 мкл. Масс-спектры получали на масс-спектрометре Maxis Impact Q-TOF (Bruker Daltonics GmbH, Германия), оснащенном источником ионизации электрораспылением (ESI) (Bruker Daltonics GmbH, Германия). Прибор работал в режиме положительной ионизации при напряжении электрораспыления 4,5 кВ и диапазоне сканирования МС 50–1000 м/з. Полученные масс-спектры анализировали с помощью программ DataAnalysis® и TASCQ® (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

2.8. Противовоспалительная активность конъюгатов SucCS-DEX

Эксперименты по противовоспалительной активности конъюгатов SucCS-DEX выполнены в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург) с.н.с., к.б.н. Кудрявцевым И.В. и с.н.с., к.б.н. Трулевым А.С.

Клетки THP-1 (клетки моноцитарного лейкоза человека) высевали в пластиковые колбы на 50 мл (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, и поддерживали в культуральной среде RPMI-1640 (Biolog, Санкт-Петербург, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Бартлсвилл, Оклахома, США), 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия) и 2 мМ L-глутамин (Биолот, Россия). , Россия) при плотности клеток 0,5–1 × 10⁶ клеток/мл со сменой среды каждые 2–3 сут.

Для экспериментов 200 мкл клеточной культуральной среды, содержащей 1 × 10⁵ клеток в суспензии, высевали в 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты (Sarstedt, Германия). Клетки THP-1 активировали *in vitro* путем добавления 2 нг/мл TNFα (BioLegend Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) или липополисахаридов (LPS) из *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Дармштадт, Германия) к каждому лунка (неактивированные клетки служили отрицательным контролем). Тестируемые соединения (SucDEX, Suc-CS и Suc-DEX-CS-10) добавляли в лунки в конечных концентрациях 10 и 1 мкг/мл (относительно DEX) и

инкубировали с клетками ТНР-1 в течение 24 ч. Затем клетки переносили в пробирки для проточной цитометрии 75 × 12 мм (Sarstedt, Германия) и промывали 4 мл стерильного PBS (центрифугирование при 300 × g в течение 5 мин). Затем промытые клетки ресуспендировали в 50 мкл свежего PBS, окрашивали мышинными антителами против CD54 человека (Beckman Coulter Inc., Индианаполис, Индиана, США) в темноте в течение 15 мин и снова промывали. Наконец, отмытые клетки ресуспендировали в 100 мкл свежего PBS и окрашивали в течение 5 минут 250 нМ йодида PO-PRO-1 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) и 3 мкМ DRAQ7 (Beckman Coulter Inc., США), как описано ранее [35]. Было получено не менее 10 000 одиночных клеток ТНР-1 на каждый образец. Данные проточной цитометрии получали на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном лазерами с длиной волны 405, 488 и 638 нм, и анализировали с помощью программного обеспечения Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.2.0 (Beckman Coulter, США). Данные представляли как процент жизнеспособных клеток на образец ± стандартная ошибка (SE), а интенсивность экспрессии CD54 в конечном итоге измеряли как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) на клеточной поверхности жизнеспособных клеток ТНР-1.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Синтез и характеристика конъюгатов сукцинилхитозан-дексаметазон (SucCS-DEX)

Конъюгация молекул лекарств с различными полимерами через линкеры с разной стабильностью (амидные, гидразонные или сложноэфирные связи) обеспечивает пролонгированное высвобождение за счет контролируемого гидролиза образующихся химических связей. Мы использовали сукцинильный линкер, чтобы ввести карбоксильную функцию в DEX для последующего конъюгирования с аминогруппами CS [146]. Полученный сукцинил-DEX (SucDEX) был охарактеризован с помощью спектроскопии ^1H ядерного магнитного резонанса (^1H ЯМР) (рисунок 3.1).

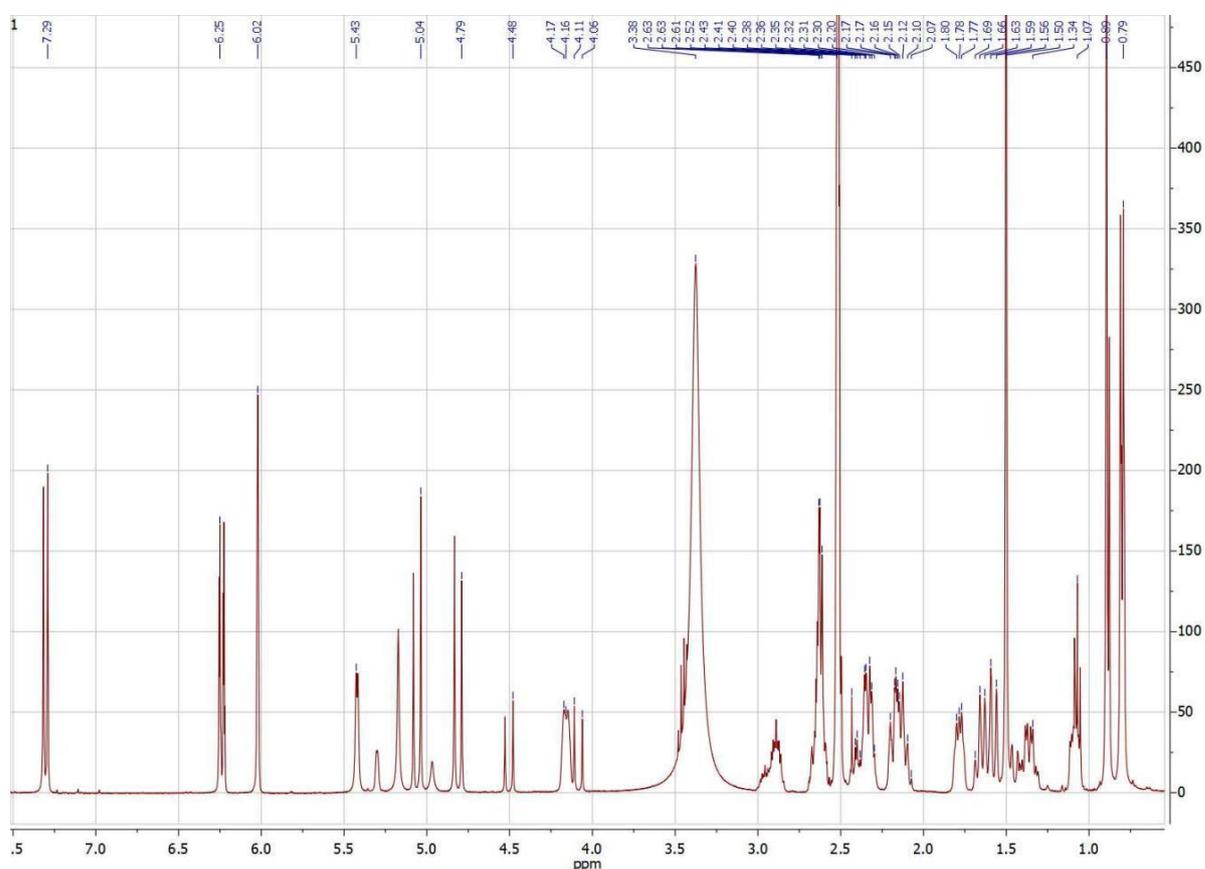


Рисунок 3.1. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) спектр сукцинил-дексаметазона (SucDEX). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.29 (d, 1H), 6.25 (dd, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.43 (d, 1H), 5.04 (d, 1H), 4.79 (d, 1H), 4.49 (d, 1H), 4.17–4.06 (m, 1H), 3.38 (s, 2H), 2.93–2.86 (m, 1H), 2.71–2.58 (m, 1H), 2.52 (s, 2H), 2.45–2.30 (m, 2H), 2.21–2.06 (m, 2H), 1.82–1.74 (m, 1H), 1.69–1.54 (m, 1H), 1.50 (s, 1H), 1.34 (dd, 1H), 1.07 (m, 1H), 0.89 (s, 3H), and 0.79 (d, 3H).

SucCS-DEX получали двухстадийным синтезом (рисунок 3.2). На первом этапе SucDEX конъюгировали с CS методом карбодимидной активации, варьируя соотношение SucCS к мономерному звену CS от 5 до 20 мол% (образцы CS-DEX-5, CS-DEX-10, CS-DEX-20). На втором этапе конъюгаты CS-DEX дополнительно сукцинилировали янтарным ангидридом (рисунок 3.2).

Образцы CS-DEX были выделены и охарактеризованы с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК-Фурье) (рисунок 3.3), спектроскопии ^1H ЯМР (рисунок 3.4) и элементного анализа (таблица 3.1). Образец CS-DEX-20 плохо редуспергировался в воде, поэтому в дальнейших испытаниях его не использовали. Степени замещения фрагментами DEX (DS_{DEX}) в конъюгатах CS-DEX варьировались от 2 до 4% (таблица 3.1).

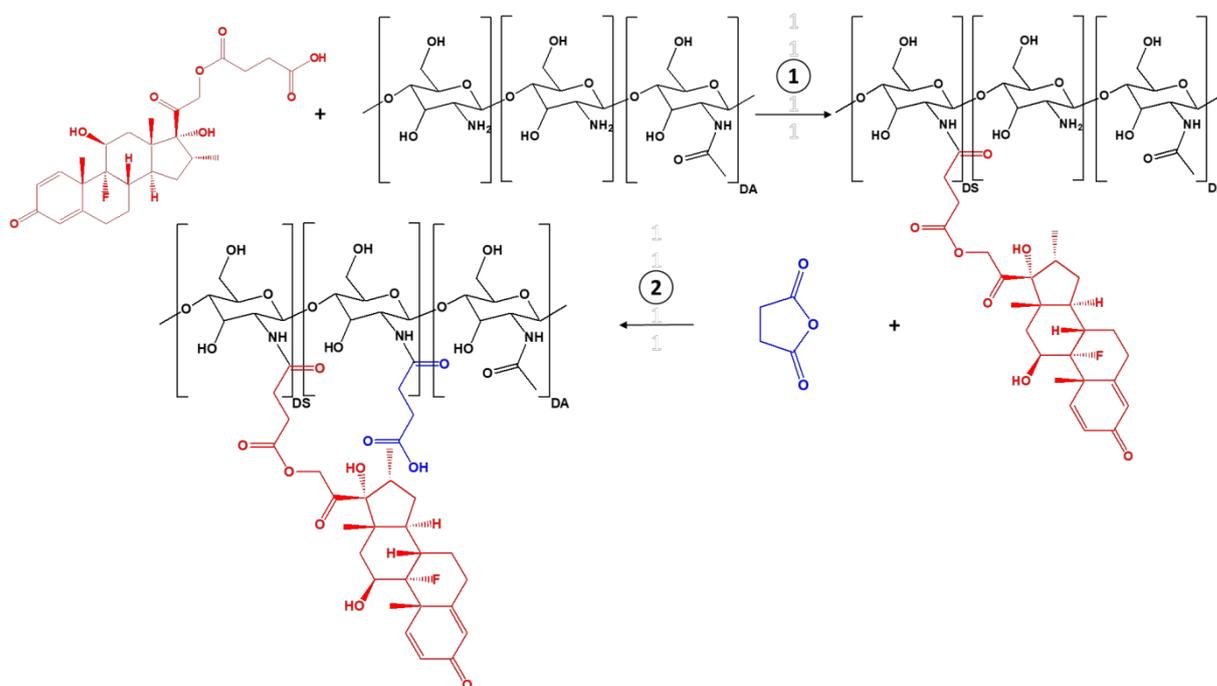


Рисунок 3.2. Схема синтеза для SucCS-DEX.

Таблица 3.1. Характеристика конъюгатов CS-DEX.

Образец	$\omega(\%)$		DS_{DEX}^* (%) из ЭА	DS_{DEX} (%) из ЯМР
	C	N		
CS-DEX-5	40,07	6,749	1,7	1,8
CS-DEX-10	40,09	6,424	3,1	2,9
CS-DEX-20	39,27	6,145	3,8	3,9
CS	41,55	7,449	-	-

DS_{DEX} рассчитывали из элементного анализа, используя следующую формулу:

$$\left(\frac{\omega(C)_{CS-DEX}}{\omega(N)_{CS-DEX}} - \frac{\omega(C)_{CS}}{\omega(N)_{CS}} \right) \frac{M(N)}{M(C)n} * 100\%,$$

где ω массовая доля элемента в образце, M молярная масса элемента, n=26 (число атомов C в SucDEX).

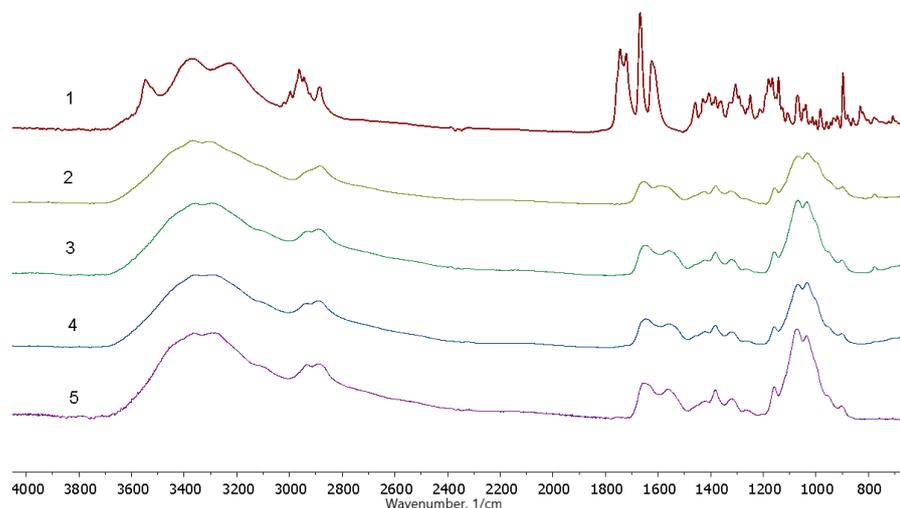


Рисунок 3.3. ИК-Фурье спектры DEX (1), CS (2) и CS-DEX-5 (3), CS-DEX-10 (4) и CS-DEX-20 (5): увеличение интенсивности полосы поглощения при 2940 см⁻¹, соответствующей колебательным переходам связей С-Н DEX, свидетельствует об увеличении содержания DEX в конъюгатах.

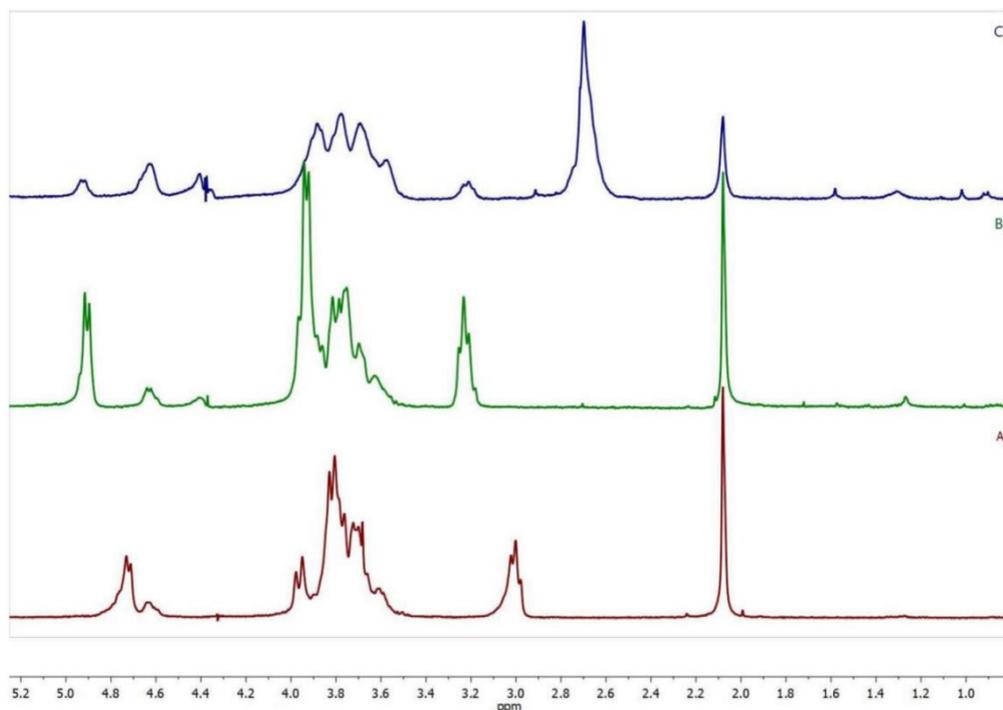


Рисунок 3.4. Спектры ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O/трифторуксусная кислота) (А) CS, (В) CS-DEX-10 и (С) SucCS-DEX-10.

В спектре ^1H ЯМР CS-DEX (рисунок 3.4В) обнаружены все сигналы исходного CS, включая сигнал протонов ацетамидной группы (2,08 м.д.), H-2 звена глюкозамина (3,23 м.д.), мультиплет при 3,5–4,1 м.д. (H-3–H-6 и H-2 звена N-ацетилглюкозамина), а сигналы аномерных протонов H-1 при 4,64 и 4,92 м.д. В спектре также присутствовали сигналы протонов DEX в диапазоне 0,75–3,0 м.д. Сигналы H-2–H-6 глюкозаминового кольца были выбраны в качестве эталонных сигналов, так как в этой области отсутствуют протоны DEX. DS рассчитывали по сигналам протонов DEX при 0,85–1,6 м.д. ($I(\text{DEX})_{0,85-1,6}$), что соответствует 14 протонам DEX, используя следующее уравнение: $DS_{\text{DEX}} = \frac{6I(\text{DEX})_{0,85-1,6}}{14I(\text{H-2-H-6})}$. DS, полученная ЯМР методом хорошо согласуется с данными элементного анализа (таблица 3.1).

Синтезированные конъюгаты CS-DEX самособирались в водной среде в субмикронные частицы с положительным ζ -потенциалом за счет присутствия на поверхности протонированных аминогрупп CS (таблица 3.3). Второй стадией синтеза конъюгатов было сукцинилирование положительно заряженных частиц по аминогруппе (рисунок 3.2, стадия 2); это привело к отрицательно заряженным частицам, пригодным для интравитреального введения (таблица 3.3). Отрицательный ζ -потенциал препятствует полиэлектролитному взаимодействию частиц с противоположно заряженными ионами и тем самым обеспечивает стабильность и подвижность конъюгатов в среде стекловидного тела, состоящей из полианионной гиалуроновой кислоты. Сукцинильная группа была выбрана в качестве модификатора поверхности для CS, так как она биотрансформируется в организме в янтарную кислоту, естественный нетоксичный эндогенный метаболит цикла Кребса [147]. Сукцинилированный CS, в дополнение к его высокому профилю безопасности и низкой токсичности, также менее биоразлагаем, чем CS, поэтому он является отличной полимерной платформой для пролонгированных систем доставки глюкокортикоидов и имеет профиль высвобождения активной фармацевтической субстанции в несколько месяцев [148]. Полученные конъюгаты SucCS-DE были охарактеризованы с помощью элементного анализа (таблица 3.2) и спектроскопии ^1H ЯМР (рисунок 3.4).

Таблица 3.2. Характеристики SucCS-DEX.

Образец	ω(%)		DS _{Suc} * (%) из ЭА	DS _{Suc} (%) из ЯМР	DS _{DEX} (%) из ЯМР	Содержание DEX (μg/mg)
	С	N				
SucCS- DEX-5	31,58	3,868	65	64	1,8	50
SucCS- DEX-10	30,40	3,575	66	68	3,0	85

* DS_{Suc} была рассчитана из данных элементного анализа, используя формулу:

$$\left(\frac{\omega(C)_{SucCS-DEX}}{\omega(N)_{SucCS-DEX}} - \frac{\omega(C)_{CS-DEX}}{\omega(N)_{CS-DEX}} \right) \frac{M(N)}{M(C)n} * 100\%, \text{ где } \omega \text{ массовая доля элемента в образце,}$$

M молярная масса элемента, и n = 4 (число атомов С в SA).

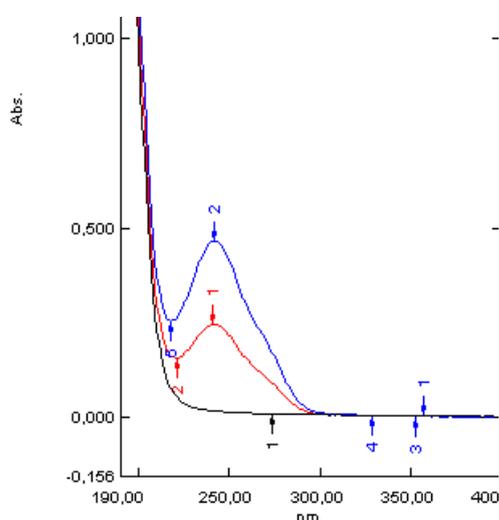


Рисунок 3.5. УФ-спектры конъюгатов сукцинилхитозан-дексаметазон и сукцинилхитозан: SucCS-DEX-5 (красный), SucCS-DEX-10 (синий) и SucCS (черный).

Физико-химические характеристики (гидродинамический размер и ζ-потенциал) CS-DEX и SucCS-DEX конъюгатов представлены в таблице 3.3. Синтезированные конъюгаты способны к самосборке в водной среде и образуют частицы субмикронного размера (400–1100 нм), ζ-потенциал для несукцинированных образцов был положительным и составлял 14-23 мВ, для сукцинированных конъюгатов – отрицательным (от -30 до -33 мВ). Сферическая форма образующихся частиц конъюгатов была подтверждена с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рисунок 3.6). Средний размер частиц на СЭМ-изображениях

составлял 200–600 нм, что не противоречило данным динамического светорассеяния (таблица 3.3).

Таблица 3.3. Физико-химические характеристики CS-DEX и SucCS-DEX (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 3$).

Образец	2Rh (нм)	ζ -потенциал (мВ)
CS-DEX-5	816 \pm 268	22,5 \pm 0,5
SucCS-DEX-5	916 \pm 326	-32,1 \pm 0,5
CS-DEX-10	700 \pm 252	14,9 \pm 0,8
SucCS-DEX-10	950 \pm 330	-30,9 \pm 0,7



Рисунок 3.6. СЭМ-изображения частиц SucCS-DEX-10.

3.2. Высвобождение DEX *in vitro* из конъюгатов SucCS-DEX

Анионные конъюгаты для интравитреальной доставки изучали для определения пути высвобождения DEX (т.е. путем гидролиза амидной или сложноэфирной связи). Фармакологическая активность зависит от химической структуры вещества и наличия заместителей. поэтому нам нужно было определить, какая форма DEX (нативный DEX или SucDEX) высвобождается из этих полимерных носителей. Данные масс-спектрометрии показали, что гидролиз SucCS-DEX приводит к образованию как SucDEX, так и DEX (выделенные ионные хроматограммы форм DEX, высвобождаемых из SucCS-DEX-10 в течение 30 дней, показаны на рисунке 3.7).

Кинетика высвобождения DEX и SucDEX для образцов SucCS-DEX-5 и SucCS-DEX-10 в фосфатно-солевом буфере (PBS) при 37 °С показана на рисунках 3.8 и 3.9 соответственно. В исследованных условиях скорость гидролиза сукцинильного линкера по амидной связи была выше, чем по сложноэфирной, что приводило к предпочтительному образованию SucDEX по сравнению с DEX.

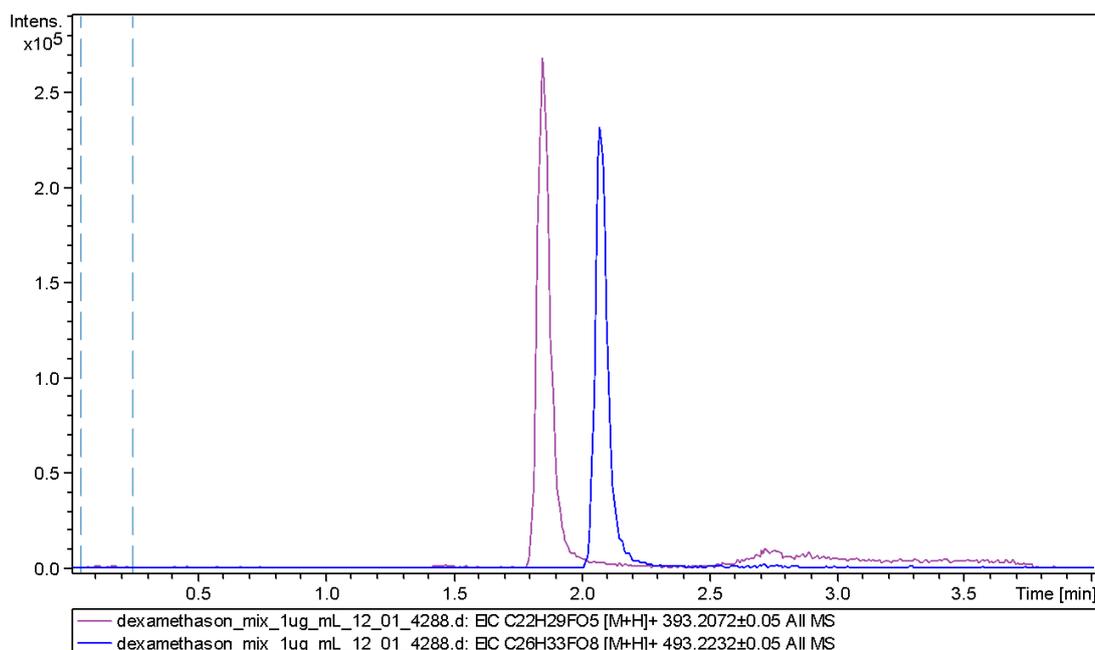


Рисунок 3.7. Хроматограммы извлеченных ионов при m/z 393,2072 (красный) и m/z 493,2232 (синий) для стандартного раствора с концентрацией 1 мкг/мл. m/z 393,2072 соответствует протонированной форме DEX, m/z 493,2232 соответствует SucDEX.

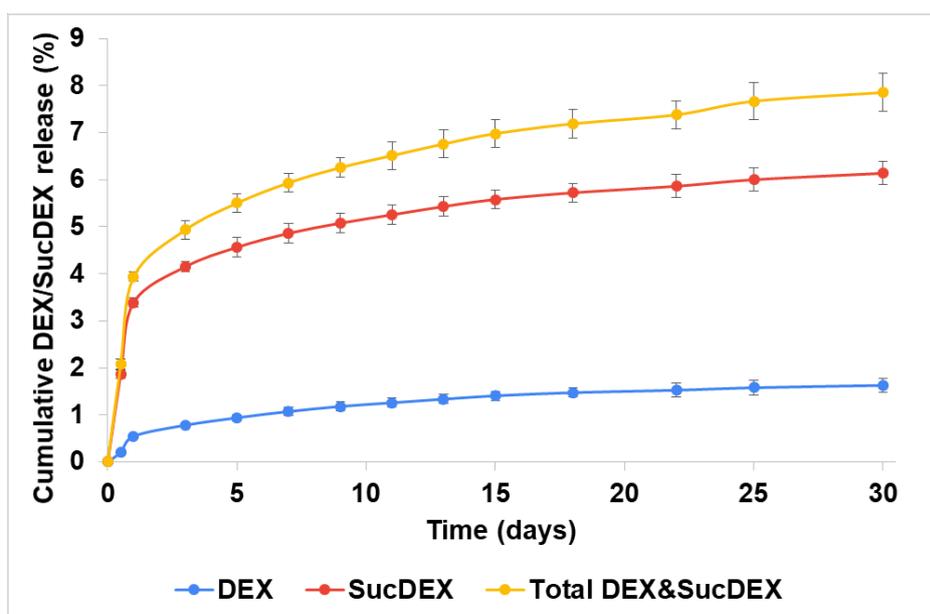


Рисунок 3.8. Высвобождение DEX и SucDEX из частиц SucCS-DEX-5; $n = 3$, планки погрешностей представляют собой одно стандартное отклонение.

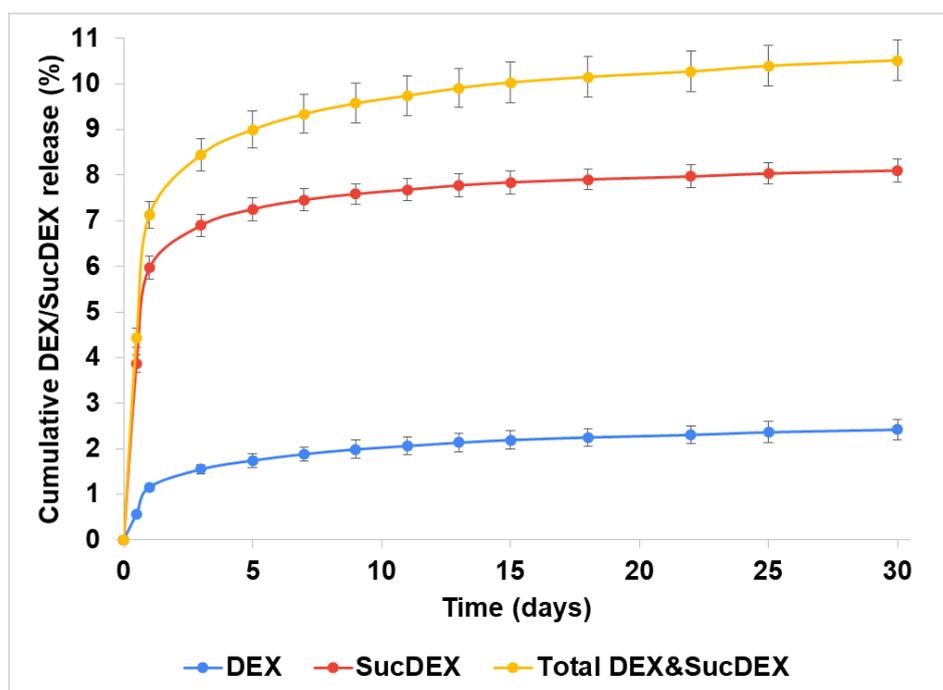


Рисунок 3.9. Высвобождение DEX и SucDEX из частиц SucCS-DEX-10; n = 3, планки погрешностей представляют собой одно стандартное отклонение.

Таким образом, полученные конъюгаты пролонгировали высвобождение как DEX, так и SucDEX суммарно на 8–10% не менее чем на месяц при физиологических значениях pH. Полимерные конъюгаты DEX с таким профилем высвобождения являются привлекательными кандидатами для использования в качестве систем доставки в стекловидное тело.

3.3. Противовоспалительная активность конъюгатов *SucCS-DEX*

Нужно было подтвердить, что две формы DEX (DEX и SucDEX), высвобождаемые из конъюгата SucCS-DEX, сохраняли противовоспалительную активность, сравнимую с активностью нативного DEX. SucCS с DS 65% использовали в качестве контроля. Сначала мы проверили влияние SucCS-DEX на жизнеспособность клеток THP-1 *in vitro*. В отсутствие стимуляции LPS или TNF α все протестированные соединения в концентрациях 1 и 10 мкг/мл значительно снижали относительное количество жизнеспособных клеток THP-1 (таблица 3.4), однако существенных различий между всеми образцами в условиях воспаления выявлено не было.

Таблица 3.4. Влияние растворов DEX, SucDEX, SucCS и SucCS-DEX-10 на жизнеспособность клеток THP-1 в условиях воспаления (среднее значение \pm стандартная ошибка).

Образцы	Концентрация (мкг/мл)	Без LPS или TNF α	LPS (1 мкг/мл)	TNF α (2 нг/мл)
Отрицательный контроль (n = 11)	-	95.8 \pm 0.3	92.40 \pm 0.7	87.8 \pm 1.6
DEX (n = 6)	1	94.0 \pm 0.8*	91.49 \pm 1.2	87.1 \pm 0.9
	10	92.6 \pm 0.8*	89.54 \pm 1.5	85.9 \pm 1.4
SucDEX (n = 6)	1	94.7 \pm 0.5	91.94 \pm 1.1	88.6 \pm 0.8
	10	94.0 \pm 0.6*	88.8 \pm 1.8	84.6 \pm 1.1
SucCS (n = 6)	1	94.2 \pm 0.5*	92.9 \pm 0.7	88.8 \pm 1.1
	10	94.4 \pm 0.6*	92.1 \pm 0.9	89.5 \pm 0.9
SucCS-DEX-10 (n = 6)	1	94.4 \pm 0.5*	91.2 \pm 0.8	87.33 \pm 1.3
	10	91.8 \pm 0.9*	91.4 \pm 0.7	85.23 \pm 1.2

* - различия с образцами отрицательного контроля достоверны по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$.

Затем мы протестировали SucCS-DEX-10 на его противовоспалительную активность. Использовали две стандартные модели активации клеток THP-1 *in vitro*, используя TNF α или LPS для индукции экспрессии CD54. CD54 (другое название — молекула межклеточной адгезии-1 или ICAM-1) представляет собой гликопротеин клеточной поверхности адгезии, который экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток и клеток иммунной системы, включая моноциты. Стимуляция провоспалительных цитокинов приводила к увеличению экспрессии CD54 альвеолярными макрофагами человека [149] и нейтрофилами периферической крови [150]. Активация клетки THP-1 приводит к увеличению экспрессии CD54 на ее поверхности.

Добавляли рекомбинантный TNF α в конечной концентрации 2 нг/мл и инкубировали в течение 24 ч. Влияние на экспрессию CD54 изучали с помощью проточной цитометрии (таблица 3.5). Мы обнаружили снижение индуцированной TNF α экспрессии CD54 в клетках THP-1 в присутствии SucCS-DEX-10, но экспрессия была повышенной по сравнению с образцами, не индуцированными TNF α .

Таблица 3.5. Влияние растворов DEX, SucDEX, SucCS и SucCS-DEX-10 на экспрессию CD54 в клетках THP-1 в условиях воспаления, стимулированного TNF α , среднее \pm стандартная ошибка.

Образцы	Концентрация (мкг/мл)	Без TNF	TNF α (2 нг/мл)	TNF vs. без TNF, p
Отрицательный контроль (n = 11)	-	0.51 \pm 0.02	3.3 \pm 0.5	<0.001
DEX (n = 6)	1	0.47 \pm 0.03	1.9 \pm 0.2	<0.001
	10	0.55 \pm 0.05	2.01 \pm 0.1	<0.001
SucDEX (n = 6)	1	0.46 \pm 0.01	2.0 \pm 0.2	<0.001
	10	0.46 \pm 0.02	2.1 \pm 0.2	<0.001
SucCS (n = 6)	1	0.43 \pm 0.06	2.2 \pm 0.4	<0.001
	10	0.43 \pm 0.06	2.4 \pm 0.4	<0.001
SucCS-DEX-10 (n = 6)	1	0.48 \pm 0.02	1.2 \pm 0.3*	0.030
	10	0.49 \pm 0.02	1.04 \pm 0.19**	0.018

* и ** — различия с контрольным образцом, обработанным 2 нг/мл TNF, достоверны по U-критерию Манна—Уитни с p = 0,004 и p = 0,008 соответственно.

Мы также проверили противовоспалительную активность SucCS-DEX-10 в клетках THP-1, обработанных LPS (таблица 3.6). Наблюдалось значительное снижение индуцированной LPS экспрессии CD54 в клетках THP-1 в присутствии SucCS-DEX-10, но не различали образцы, обработанные и необработанные LPS.

Таблица 3.6. Влияние растворов DEX, SucDEX, SucCS и SucCS-DEX-10 на экспрессию CD54 в клетках THP-1 в условиях воспаления, стимулированного LPS, среднее значение \pm стандартная ошибка.

Образцы	Концентрация (мкг/мл)	Без LPS	LPS (1 мкг/мл)	TNF vs. без TNF, p
Отрицательный контроль (n = 11)	-	0.51 \pm 0.02	2.6 \pm 0.9	<0.001
DEX (n = 6)	1	0.47 \pm 0.03	2.1 \pm 0.9	0.012
	10	0.55 \pm 0.05	3.0 \pm 1.2	<0.001

SucDEX (n = 6)	1	0.46±0.01	1.4±0.5	<0.001
	10	0.46±0.02	1.8±0.8	<0.001
SucCS (n = 6)	1	0.43±0.06	1.1±0.2	0.016
	10	0.43±0.06	1.0±0.3*	0.039
SucCS-DEX-10 (n = 6)	1	0.48±0.02	0.69±0.16**	0.23
	10	0.49±0.02	0.54±0.12**	0.693

* и ** — различия с контрольным образцом, обработанным 1 мкг/мл LPS, значимы по U-критерию Манна-Уитни с $p = 0,047$ и $p = 0,016$ соответственно.

Таким образом, несмотря на незначительный цитотоксический эффект, наблюдаемый для всех тестируемых образцов, в клетках THP-1, культивируемых в стандартных условиях, мы наблюдали значительный противовоспалительный эффект SucCS-DEX-10. Этот эффект был продемонстрирован как на инфекционных (LPS-индуцированных), так и на стерильных (TNF-индуцированных) моделях воспаления. Интересной особенностью было то, что противовоспалительный эффект не зависел от дозы в обеих моделях и был одинаковым и значительным при концентрациях 1 и 10 мкг/мл. SucCS-DEX-10 значительно снижал экспрессию CD54 в клетках THP-1, и это можно интерпретировать как ингибирование активации клеток в условиях воспаления. Этот эффект был обнаружен только для SucCS-DEX-10.

ВЫВОДЫ

1. Разработан двухэтапный синтез конъюгатов SucCS-DEX для потенциального применения в качестве интравитреальной системы доставки с пролонгированным высвобождением: (i) конъюгирование CS с DEX через сукцинильный линкер с образованием гидролизуемой амидной связи, (ii) сукцинирование CS-DEX янтарным ангидридом для получения отрицательно заряженного конъюгата SucCS-DEX для предотвращения нежелательного электростатического взаимодействия конъюгата с компонентами стекловидного тела после интравитреальной инъекции.

2. Изучено влияние мольного соотношения реагентов на степень замещения и основные физико-химические параметры (гидродинамический диаметр и ζ -потенциал) конъюгатов CS-DEX и SucCS-DEX.

3. Показано, конъюгаты SucCS-DEX пролонгировали высвобождение различных форм дексаметазона (DEX и SucDEX) суммарно на 8–10% не менее чем на месяц при физиологических значениях pH. Такой профиль высвобождения является предпочтительным при использовании в качестве систем интравитреальной доставки.

4. Тесты *in vitro* показали, что конъюгаты SucCS-DEX поддерживали высвобождение активного фармацевтического вещества как в форме DEX, так и в форме SucDEX (всего 8–10% в течение 1 месяца).

5. Разработанные конъюгаты SucCS-DEX продемонстрировали значительные противовоспалительные эффекты как в стерильных (TNF α -индуцированных), так и в инфекционных (LPS-индуцированных) моделях воспаления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработан двухэтапный синтез конъюгатов SucCS-DEX для потенциального применения в качестве интравитреальной системы доставки с пролонгированным высвобождением. Для конъюгирования CS с DEX через сукцинильный линкер использовали реакцию карбодиимидной активации с образованием гидролизуемой амидной связи. Полученные конъюгаты имели DS_{DEX} 2–4% (содержание DEX 50–85 мкг/мг), размер 450–1000 нм и положительный ζ -потенциал 14–23 мВ. Поверхность синтезированных частиц дополнительно модифицировали янтарным ангидридом для получения отрицательно заряженного конъюгата (чтобы нивелировать нежелательное электростатическое взаимодействие CS с содержимым стекловидного тела после интравитреальной инъекции). В результате были получены частицы размером 400–1100 нм с ζ -потенциалом от -30 до -33 мВ и DS_{Suc} от 64 до 68%. Содержание DEX в сукцинилированных конъюгатах не изменилось по сравнению с исходными конъюгатами, что свидетельствует об оптимальном выборе условий синтеза и удовлетворительной надежности предложенной процедуры.

Тесты *in vitro* показали, что разработанные конъюгаты поддерживали высвобождение активного фармацевтического вещества как в форме DEX, так и в форме SucDEX (всего 8–10% в течение 1 месяца). Очевидно, что среда стекловидного тела имеет определенные условия (например, высокая вязкость и присутствие ферментов), которые будут влиять на гидролиз и высвобождение лекарства из этого типа конъюгата. Тем не менее, мы ожидаем, что достигнутый профиль высвобождения будет поддерживать терапевтические концентрации DEX в стекловидном теле в течение нескольких месяцев из-за низкого уровня биоразложения сукцинилированного CS и достаточно большого размера частиц, тем самым уменьшая побочные эффекты и необходимость частых инъекций. Кроме того, разработанные конъюгаты продемонстрировали значительные противовоспалительные эффекты как на стерильных (TNF α -индуцированных), так и на инфекционных (LPS-индуцированных) моделях воспаления, что подтверждено 2- и 4-кратным подавлением экспрессии CD54 в THP-1 клетках соответственно.

Основываясь на текущих результатах, показывающих улучшенный профиль высвобождения и противовоспалительный потенциал разработанных полимерных

систем, мы намерены расширить это исследование до экспериментов *in vivo*, направленных на создание интравитреальной системы доставки DEX с улучшенными фармакологическими характеристиками.

Публикации по материалам выпускной квалификационной работы

Статьи

1. Dubashynskaya, N.V.; Golovkin, A.S.; Kudryavtsev, I.V.; Prikhodko, S.S.; Trulioff, A.S.; Bokatyι, A.N.; Poshina, D.N.; Raik, S.V.; Skorik, Y.A. Mucoadhesive cholesterol-chitosan self-assembled particles for topical ocular delivery of dexamethasone. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 158, 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.251>
2. Dubashynskaya, N.V.; Bokatyι, A.N.; Skorik, Y.A. Dexamethasone Conjugates: Synthetic Approaches and Medical Prospects. *Biomedicines* 2021, 9, 341. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040341>
3. Dubashynskaya, N.V.; Bokatyι, A.N.; Golovkin, A.S.; Kudryavtsev, I.V.; Serebryakova, M.K.; Trulioff, A.S.; Dubrovskii, Y.A.; Skorik, Y.A. Synthesis and Characterization of Novel Succinyl Chitosan-Dexamethasone Conjugates for Potential Intravitreal Dexamethasone Delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 10960. <https://doi.org/10.3390/ijms222010960>

Материалы конференций

1. Бокатый А.Н., Дубашинская Н.В., Скорик Ю.А. Конъюгаты Дексаметазона с Хитозаном для Интравитреальной Доставки. Book of abstracts. International Bakeev Conference “Macromolecular Nanoobjects and Polymer Nanocomposites“ - 2020 (Bakeev Conference-2019)/ Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials of Russian Academy of Sciences. - Moscow, 2020. - С. 116.
2. Бокатый А.Н. Конъюгаты дексаметазона с хитозаном для интравитреальной доставки. Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», секция «Химия». - Москва, 2021 – С. 130.
3. Бокатый А.Н., Дубашинская Н.В., Скорик Ю.А. Офтальмологические системы доставки дексаметазона на основе хитозана. Материалы V Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология». - Гатчина, 2021 - С. 70
4. Bokatyι, A.N.; Dubashynskaya, N.V.; Skorik, Y.A. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL SUCCINYL CHITOSAN DEXAMETHASONE CONJUGATES FOR INTRAVITREAL DEXAMETHASONE DELIVERY. THE INTERNATIONAL CONFERENCE NEW APPROACHES TO BIOMATERIAL DEVELOPMENT - St. Petersburg, 2021. - С. 16

Список литературы

1. World Health Organization. Available online: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/blindness-and-visualimpairment>
2. Shahiwala A. Applications of polymers in ocular drug delivery. *Appl Polym Drug Deliv.* (2021) 355–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819659-5.00013-6>
3. Ghate, D.; Edelhofer, H.F. Ocular drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2006**, *3*, 275–287 <https://doi.org/10.1517/17425247.3.2.275>
4. Kompella, U.B.; Kadam, R.S.; Lee, V.H. Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther. Deliv.* 2010, *1*, 435–456. <https://doi.org/10.4155/tde.10.40>
5. Agrahari, V.; Mandal, A.; Agrahari, V.; Trinh, H.M.; Joseph, M.; Ray, A.; Hadji, H.; Mitra, R.; Pal, D.; Mitra, A.K. A comprehensive insight on ocular pharmacokinetics. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2016, *6*, 735–754. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0339-2>
6. Kamaledin, M.A. Nano-ophthalmology: Applications and considerations. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2017**, *13*, 1459–1472. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.02.007>
7. Patel, A.; Cholkar, K.; Agrahari, V.; Mitra, A.K. Ocular drug delivery systems: An overview. *World J. Pharmacol.* **2013**, *2*, 47. <https://dx.doi.org/10.5497/wjp.v2.i2.47>
8. Achouri, D.; Alhanout, K.; Piccerelle, P.; Andrieu, V. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2013, *39*, 1599–1617. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.736515>
9. Mun, E.A.; Morrison, P.W.J.; Williams, A.C.; Khutoryanskiy, V.V. On the barrier properties of the cornea: A microscopy study of the penetration of fluorescently labeled nanoparticles, polymers, and sodium fluorescein. *Mol. Pharm.* 2014, *11*, 3556–3564. <https://doi.org/10.1021/mp500332m>
10. Dastjerdi, M.H.; Sadrai, Z.; Saban, D.R.; Zhang, Q.; Dana, R. Corneal penetration of topical and subconjunctival bevacizumab. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011, *52*, 8718–8723. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7871>
11. Zhang, T.; Xiang, C.D.; Gale, D.; Carreiro, S.; Wu, E.Y.; Zhang, E.Y. Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: Implications for ocular drug disposition. *Drug Metab. Dispos.* 2008, *36*, 1300–1307. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.021121>

12. Karla, P.K.; Earla, R.; Boddu, S.H.; Johnston, T.P.; Pal, D.; Mitra, A. Molecular expression and functional evidence of a drug efflux pump (BCRP) in human corneal epithelial cells. *Curr. Eye Res.* 2009, 34, 1–9. <https://doi.org/10.1080/02713680802518251>
13. Kölln, C.; Reichl, S. mRNA expression of metabolic enzymes in human cornea, corneal cell lines, and hemicornea constructs. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2012, 28, 271–277. <https://doi.org/10.1089/jop.2011.0124>
14. Morrison, P.W.; Khutoryanskiy, V. Advances in ophthalmic drug delivery. *Ther. Deliv.* 2014, 5, 1297–1315. <https://doi.org/10.4155/tde.14.75>
15. E. Ghelardi, A. Tavanti, P. Davini, F. Celandroni, S. Salvetti, E. Parisio, E. Boldrini, S. Senesi, M. Campa, A mucoadhesive polymer extracted from tamarind seed improves the intraocular penetration and efficacy of rifloxacin in topical treatment of experimental bacterial keratitis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 3396–3401, <https://doi.org/10.1128/aac.48.9.3396-3401.2004>.
16. I. Bravo-Osuna, M. Noiray, E. Briand, A.M. Woodward, P. Argueso, I.T.M. Martinez, R. Herrero-Vanrell, G. Ponchel, Interfacial interaction between transmembrane ocular mucins and adhesive polymers and dendrimers analyzed by surface plasmon resonance, *Pharm. Res.* 29 (2012) 2329–2340, <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0761-1>.
17. Dubashynskaya, N.; Poshina, D.; Raik, S.; Urtti, A.; Skorik, Y.A. Polysaccharides in ocular drug delivery. *Pharmaceutics* 2020, 12, 22 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010022>.
18. Chan, E.D.; Chan, M.M.; Chan, M.M.; Marik, P.E. Use of glucocorticoids in the critical care setting: Science and clinical evidence. *Pharmacol. Ther.* 2020, 206, 107428, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107428>
19. Fung, A.T.; Tran, T.; Lim, L.L.; Samarawickrama, C.; Arnold, J.; Gillies, M.; Catt, C.; Mitchell, L.; Symons, A.; Buttery, R. Local delivery of corticosteroids in clinical ophthalmology: A review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2020, 48, 366–401. <https://doi.org/10.1111/ceo.13702>
20. Florance, J.; Hemke, R.; Chang, C.Y.; Torriani, M.; Bredella, M.A. Effects of intra-articular corticosteroid injections on lumbar trabecular density. *Skelet. Radiol.* 2019, 49, 787–793. <https://doi.org/10.1007/s00256-019-03362-2>

21. Petta, I.; Peene, I.; Elewaut, D.; Vereecke, L.; De Bosscher, K. Risks and benefits of corticosteroids in arthritic diseases in the clinic. *Biochem. Pharmacol.* 2019, 165, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.04.009>
22. Grayson, J.W.; Harvey, R.J. Topical Corticosteroid Irrigations in Chronic Rhinosinusitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2019, 9, S9–S15. <https://doi.org/10.1002/alr.22331>
23. Agusti, A.; Fabbri, L.M.; Singh, D.; Vestbo, J.; Celli, B.; Franssen, F.M.; Rabe, K.F.; Papi, A. Inhaled corticosteroids in copd: Friend or foe? *Eur. Respir. J.* 2018, 52, 1801219. <https://doi.org/10.1183/13993003.01219-2018>
24. Mehta, H.; Gillies, M.; Fraser-Bell, S. Perspective on the role of ozurdex (dexamethasone intravitreal implant) in the management of diabetic macular oedema. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 2015, 6, 234–245. <https://doi.org/10.1177/2040622315590319>
25. Nayak, K.; Misra, M. A review on recent drug delivery systems for posterior segment of eye. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 107, 1564–1582 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.138>
26. Ryu, M.; Nakazawa, T.; Akagi, T.; Tanaka, T.; Watanabe, R.; Yasuda, M.; Himori, N.; Maruyama, K.; Yamashita, T.; Abe, T.; et al. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly (γ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. *J. Control. Release* 2011, 151, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.029>
27. Manickavasagam, D.; Oyewumi, M.O. Critical assessment of implantable drug delivery devices in glaucoma management. *J. Drug Deliv.* 2013, 2013, 895013. <https://doi.org/10.1155/2013/895013>
28. Li, Q.; Weng, J.; Wong, S.N.; Thomas Lee, W.Y.; Chow, S.F. Nanoparticulate drug delivery to the retina. *Mol. Pharm.* 2020, 18, 506–521. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00224>
29. Urtti, A.; Pipkin, J.D.; Rork, G.; Repta, A. Controlled drug delivery devices for experimental ocular studies with timolol 1. In vitro release studies. *Int. J. Pharm.* 1990, 61, 235–240. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90214-O](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90214-O)
30. Villanueva, J.R.; Villanueva, L.R.; Navarro, M.G. Pharmaceutical technology can turn a traditional drug, dexamethasone into a first-line ocular medicine. A global perspective and future trends. *Int. J. Pharm.* 2017, 516, 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.053>

31. Yu, Z.; Reynaud, F.; Lorscheider, M.; Tsapis, N.; Fattal, E. Nanomedicines for the delivery of glucocorticoids and nucleic acids as potential alternatives in the treatment of rheumatoid arthritis. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2020, 12, e1630. <https://doi.org/10.1002/wnan.1630>
32. Wang, Q.; He, L.; Fan, D.; Liang, W.; Fang, J. Improving the anti-inflammatory efficacy of dexamethasone in the treatment of rheumatoid arthritis with polymerized stealth liposomes as a delivery vehicle. *J. Mater. Chem. B* 2020, 8, 1841–1851. <https://doi.org/10.1039/C9TB02538C>
33. Wang, Y.; Zhou, L.; Fang, L.; Cao, F. Multifunctional carboxymethyl chitosan derivatives-layered double hydroxide hybrid nanocomposites for efficient drug delivery to the posterior segment of the eye. *Acta Biomater.* 2020, 104, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.008>
34. Xu, X.; Sun, L.; Zhou, L.; Cheng, Y.; Cao, F. Functional chitosan oligosaccharide nanomicelles for topical ocular drug delivery of dexamethasone. *Carbohydr. Polym.* 2020, 227, 115356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115356>
35. Dubashynskaya, N.V.; Golovkin, A.S.; Kudryavtsev, I.V.; Prikhodko, S.S.; Trulioff, A.S.; Bokaty, A.N.; Poshina, D.N.; Raik, S.V.; Skorik, Y.A. Mucoadhesive cholesterol-chitosan self-assembled particles for topical ocular delivery of dexamethasone. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 158, 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.251>
36. Berezin, A.; Lomkova, E.; Skorik, Y.A. Chitosan conjugates with biologically active compounds: Design strategies, properties, and targeted drug delivery. *Russ. Chem. Bull.* 2012, 61, 781–795. <https://doi.org/10.1007/s11172-012-0109-3>
37. Bhattacharya, M.; Sadeghi, A.; Sarkhel, S.; Hagström, M.; Bahrpeyma, S.; Toropainen, E.; Auriola, S.; Urtti, A. Release of functional dexamethasone by intracellular enzymes: A modular peptide-based strategy for ocular drug delivery. *J. Control. Release* 2020, 327, 584–594 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.005>
38. Del Amo, E.M.; Vellonen, K.S.; Kidron, H.; Urtti, A. Intravitreal clearance and volume of distribution of compounds in rabbits: In silico prediction and pharmacokinetic simulations for drug development. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015, 95, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.01.003>
39. Shatz, W.; Hass, P.E.; Mathieu, M.; Kim, H.S.; Leach, K.; Zhou, M.; Crawford, Y.; Shen, A.; Wang, K.; Chang, D.P.; et al. Contribution of antibody hydrodynamic size to

vitreous clearance revealed through rabbit studies using a species-matched fab. *Mol. Pharm.* 2016, 13, 2996–3003. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00345>

40. Peynshaert, K.; Devoldere, J.; De Smedt, S.C.; Remaut, K. In vitro and ex vivo models to study drug delivery barriers in the posterior segment of the eye. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018, 126, 44–57 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.007>

41. Pitkanen, L.; Pelkonen, J.; Ruponen, M.; Ronkko, S.; Urtili, A. Neural retina limits the nonviral gene transfer to retinal pigment epithelium in an in vitro bovine eye model. *AAPS J.* 2004, 6, 72–80. <https://doi.org/10.1208/aapsj060325>

42. Mains, J.; Wilson, C.G. The vitreous humor as a barrier to nanoparticle distribution. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2013, 29, 143–150 <https://doi.org/10.1089/jop.2012.0138>

43. Aravamudhan A, Ramos DM, Nada AA. Natural polymers: polysaccharides and their derivatives for biomedical applications. *Nat Synth Biomed Polym.* (2014) 2014:67–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00004-1>

44. Dutescu RM, Panfil C. Comparison of the effects of various lubricant eye drops on the in vitro rabbit corneal healing and toxicity. *Exp Toxicol Pathol.* (2017) 69:123–9. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.12.002>

45. Hu L, Sun Y. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. *Nanoscale.* (2013) 5:3103–<https://doi.org/10.1039/C3NR00338H>

46. Cheng Y-H, Tsai T-H, Jhan Y-Y, Chiu AW-H, Tsai K-L, Chien C-S. Thermosensitive chitosan-based hydrogel as a topical ocular drug delivery system of latanoprost for glaucoma treatment. *Carbohydr Polym.* 144:390–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.080>

47. Ba,şaran E. Ocular application of chitosan. *Expert Opin Drug Deliv.* (2012) 9:701–12. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.681775>

48. Arafa MG, Girgis GNS. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for enhanced ocular anti-inflammatory efficacy of atorvastatin calcium. *Int J Nanomed.* (2020) 15:1335–47. <https://doi.org/10.2147/IJN.S237314>

49. Chaharband F, Daftarian N, Kanavi MR, Varshochian R, Hajiramezanali M, Norouzi P. Trimethyl chitosan-hyaluronic acid nano-polyplexes for intravitreal VEGFR-2 siRNA delivery: formulation and in vivo efficacy evaluation. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* (2020) 26:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102181>

50. Shi H, Wang Y, Bao Z, Lin D, Liu H, Yu A. Thermosensitive glycol chitosan-based hydrogel as a topical ocular drug delivery system for enhanced ocular bioavailability. *Int J Pharm.* (2019) 570:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118688>
51. Zhang X, Wei D, Xu Y, Zhu Q. Hyaluronic acid in ocular drug delivery. *Carbohydr Polym.* (2021) 264:1–24. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118006>
52. Saranraj P. Hyaluronic acid production and its applications-a review. *Int J Pharm Biol Arch.* (2013) 4:853–9.
53. Hemshekhar M, Thushara RM, Chandranayaka S, Sherman LS, Kemparaju K. Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. *Int J Biol Macromol.* (2016) 86:917–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.032>
54. Vasvani S, Kulkarni P. Hyaluronic acid: a review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *Int J BiolMacromol.* (2020) 151:1012–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066>
55. Diaz-Montes E. Sources, structures, and properties. *Polysaccharides.* (2021) 2:554–65 <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>
56. Kathuria A, Shamloo K, Jhanji V. Categorization of marketed artificial tear formulations based on their ingredients: a rational approach for their use. *J Clin Med.* (2021) 10:1–11. <https://doi.org/10.3390/jcm10061289>
57. Chaiyasan W, Srinivas SP. Crosslinked chitosan-dextran sulfate nanoparticle for improved topical ocular drug delivery. *Mol Vis.* (2015) 21:1224–34.
58. Cheng K-C, Demirci A. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2011) 92:29–44. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3477-y>
59. Prajapati VD, Jani GK. Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydr Polym.* (2013) 95:540–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.082>
60. Singh RS, Kaur N, Rana V. Recent insights on applications of pullulan in tissue engineering. *Carbohydr Polym.* (2016) 153:455–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.118>
61. Pai G. Formulation and evaluation of extended release ocular inserts prepared from synthetic and natural biodegradable-biocompatible polymers. *Res J Pharm Tech.* (2014) 7:48–51.

62. de la Fuente, M., et al., Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010. 62(1): p. 100-117. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.026>
63. Wang, X.Z., S.R. Wang, and Y. Zhang, Advance of the application of nano-controlled release system in ophthalmic drug delivery. *Drug Delivery*, 2016. 23(8): p. 2897-2901. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1116025>
64. Kamaledin, M.A., Nano-ophthalmology: Applications and considerations. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2017. 13(4): p. 1459-1472. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.02.007>
65. Czock, D.; Keller, F.; Rasche, F.M.; Häussler, U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin. Pharmacokinet.* 2005, 44, 61–98. <https://doi.org/10.2165/00003088-200544010-00003>
66. Spahn, J.D. Glucocorticoid pharmacokinetics. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 1999, 19, 709–723. [https://doi.org/10.1016/S0889-8561\(05\)70118-1](https://doi.org/10.1016/S0889-8561(05)70118-1)
67. Saviola, G.; Bonazzi, S.; Comini, L.; Abdi-Ali, L. Dexamethasone is an “essential, medicine”. It is time to consider this drug in the treatment of rheumatic diseases. A narrative review. *Acta Med. Mediterr.* 2020, 36, 107–114.
68. WHO Model Lists of Essential Medicines. Available online: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/> (дата обращения 10 апреля 2022).
69. Gruneich, J.; Price, A.; Zhu, J.; Diamond, S. Cationic corticosteroid for nonviral gene delivery. *Gene Ther.* 2004, 11, 668–674. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302214>
70. Goodman, L.S. Goodman and Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 1996; Volume 1549.
71. Salt, A.N.; Plontke, S.K. Pharmacokinetic principles in the inner ear: Influence of drug properties on intratympanic applications. *Hear. Res.* 2018, 368, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.03.002>
72. Zhang, M.; Moore, G.A.; Jensen, B.P.; Begg, E.J.; Bird, P.A. Determination of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate in human plasma and cochlear perilymph by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2011, 879, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.003>

73. Coutinho, A.E.; Chapman, K.E. Pmcid: Pmc3047790. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011, 335, 2–13.
74. Zen, M.; Canova, M.; Campana, C.; Bettio, S.; Nalotto, L.; Rampudda, M.; Ramonda, R.; Iaccarino, L.; Doria, A. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun. Rev.* 2011, 10, 305–310 <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.11.009>
75. Buttgereit, F.; Da Silva, J.; Boers, M.; Burmester, G.; Cutolo, M.; Jacobs, J.; Kirwan, J.; Köhler, L.; van Riel, P.; Vischer, T. Standardized nomenclature for glucocorticoid treatment regimens: Current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann. Rheum. Dis.* 2002, 61, 718–722. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.61.8.718>
76. Hardy, R.S.; Raza, K.; Cooper, M.S. Therapeutic glucocorticoids: Mechanisms of actions in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2020, 16, 133–144. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0371-y>
77. Zhao, L.; Gimple, R.C.; Yang, Z.; Wei, Y.; Gustafsson, J.-Å.; Zhou, S. Immunoregulatory functions of nuclear receptors: Mechanisms and therapeutic implications. *Trends Endocrinol. Metab.* 2020, 31, 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.10.002>
78. Ehrchen, J.M.; Roth, J.; Barczyk-Kahlert, K. More than suppression: Glucocorticoid action on monocytes and macrophages. *Front. Immunol.* 2019, 10, 2028. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02028>
79. Cannarile, L.; Delfino, D.V.; Adorisio, S.; Riccardi, C.; Ayroldi, E. Implicating the role of gilz in glucocorticoid modulation of t-cell activation. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1823. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01823>
80. Strehl, C.; Ehlers, L.; Gaber, T.; Buttgereit, F. Glucocorticoids—all-rounders tackling the versatile players of the immune system. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1744. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01744>
81. Ferrara, G.; Petrillo, M.G.; Giani, T.; Marrani, E.; Filippeschi, C.; Oranges, T.; Simonini, G.; Cimaz, R. Clinical use and molecular action of corticosteroids in the pediatric age. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 444. <https://doi.org/10.3390/ijms20020444>
82. Johnstone, W.M., III; Honeycutt, J.L.; Deck, C.A.; Borski, R.J. Nongenomic glucocorticoid effects and their mechanisms of action in vertebrates. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2019, 346, 51–96 <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.03.004><https://doi.org/10.3390/ijms20020444>

83. Panettieri, R.A.; Schaafsma, D.; Amrani, Y.; Koziol-White, C.; Ostrom, R.; Tliba, O. Non-genomic effects of glucocorticoids: An updated view. *Trends Pharmacol. Sci.* 2019, 40, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.11.002>
84. Balthazart, J.; Choleris, E.; Remage-Healey, L. Steroids and the brain: 50 years of research, conceptual shifts and the ascent of non-classical and membrane-initiated actions. *Horm. Behav.* 2018, 99, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.01.002>
85. Vandewalle, J.; Luypaert, A.; De Bosscher, K.; Libert, C. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.* 2018, 29, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.010>
86. Gray, J.D.; Kogan, J.F.; Marrocco, J.; McEwen, B.S. Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2017, 13, 661. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.97>
87. Jiang, C.-L.; Liu, L.; Tasker, J.G. Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Front. Neuroendocrinol.* 2014, 35, 72–75. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.09.005>
88. Wu, F.; Lee, A.S. Yy1 as a regulator of replication-dependent hamster histone h3. 2 promoter and an interactive partner of ap-2. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 28–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006074200>
89. Croxtall, J.D.; Van Hal, P.T.W.; Choudhury, Q.; Gilroy, D.W.; Flower, R.J. Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic mechanism of action in a549 cells. *Br. J. Pharmacol.* 2002, 135, 511–519. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704474>
90. Buttgereit, F. Views on glucocorticoid therapy in rheumatology: The age of convergence. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2020, 16, 239–246. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0370-z>
91. Lee, S.R.; Kim, H.K.; Youm, J.B.; Dizon, L.A.; Song, I.S.; Jeong, S.H.; Seo, D.Y.; Ko, K.S.; Rhee, B.D.; Kim, N. Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 2012, 464, 549–559. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1155-2>
92. Cutolo, M. Hormone therapy in rheumatic diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2010, 22, 257–263. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328336ec24>

93. Mager, D.E.; Jusko, W.J. Quantitative structure–pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of corticosteroids in man. *J. Pharm. Sci.* 2002, 91, 2441–2451. <https://doi.org/10.1002/jps.10231>
94. Kawai, S.; Ichikawa, Y.; Homma, M. Differences in metabolic properties among cortisol, prednisolone, and dexamethasone in liver and renal diseases: Accelerated metabolism of dexamethasone in renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1985, 60, 848–854. <https://doi.org/10.1210/jcem-60-5-848>
95. Hare, L.; Yeh, K.; Ditzler, C.; McMahon, F.; Duggan, D. Bioavailability of dexamethasone; ii. Dexamethasone phosphate. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1975, 18, 330–337. <https://doi.org/10.1002/cpt1975183330>
96. Duggan, D.; Yeh, K.; Matalia, N.; Ditzler, C.; McMahon, F. Bioavailability of oral dexamethasone. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1975, 18, 205–209. <https://doi.org/10.1002/cpt1975182205>
97. Rohdewald, P.; Möllmann, H.; Barth, J.; Rehder, J.; Derendorf, H. Pharmacokinetics of dexamethasone and its phosphate ester. *Biopharm. Drug Dispos.* 1987, 8, 205–212. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510080302>
98. McGhee, C. Pharmacokinetics of ophthalmic corticosteroids. *Br. J. Ophthalmol.* 1992, 76, 681. <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.76.11.681>
99. Waga, J.; Ehinger, B. Passage of drugs through different intraocular microdialysis membranes. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1995, 233, 31–37. <https://doi.org/10.1007/BF00177783>
100. Sekiyama, A.; Gon, Y.; Terakado, M.; Takeshita, I.; Kozu, Y.; Maruoka, S.; Matsumoto, K.; Hashimoto, S. Glucocorticoids enhance airway epithelial barrier integrity. *Int. Immunopharmacol.* 2012, 12, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.12.006>
101. Cázares-Delgadillo, J.; Ganem-Rondero, A.; Merino, V.; Kalia, Y.N. Controlled transdermal iontophoresis for poly pharmacotherapy: Simultaneous delivery of granisetron, metoclopramide and dexamethasone sodium phosphate in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016, 85, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.01.027>
102. Drugs@fda: Fda-Approved Drugs. Available online: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm> (дата обращения 10 апреля 2022).

103. Sarzi-Puttini, P.; Ceribelli, A.; Marotto, D.; Batticciotto, A.; Atzeni, F. Systemic rheumatic diseases: From biological agents to small molecules. *Autoimmun. Rev.* 2019, 18, 583–592 <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.12.009>
104. Sangar, M.L.C.; Girard, E.J.; Hopping, G.; Yin, C.; Pakiam, F.; Brusniak, M.-Y.; Nguyen, E.; Ruff, R.; Gewe, M.M.; Byrnes-Blake, K. A potent peptide-steroid conjugate accumulates in cartilage and reverses arthritis without evidence of systemic corticosteroid exposure. *Sci. Transl. Med.* 2020, 12, eaay1041. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay1041>
105. Bajpayee, A.G.; Quadir, M.A.; Hammond, P.T.; Grodzinsky, A.J. Charge based intra-cartilage delivery of single dose dexamethasone using avidin nano-carriers suppresses cytokine-induced catabolism long term. *Osteoarthr. Cartil.* 2016, 24, 71–81.
106. Howard, M.D.; Ponta, A.; Eckman, A.; Jay, M.; Bae, Y. Polymer micelles with hydrazone-ester dual linkers for tunable release of dexamethasone. *Pharm. Res.* 2011, 28, 2435–2446. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.07.010>
107. Numpilai, T.; Witoon, T.; Chareonpanich, M.; Limtrakul, J. Impact of physicochemical properties of porous silica materials conjugated with dexamethasone via ph-responsive hydrazone bond on drug loading and release behavior. *Appl. Surf. Sci.* 2017, 396, 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.10.183>
108. Yavuz, B.; Bozdağ Pehlivan, S.; Sümer Bolu, B.; Nomak Sanyal, R.; Vural, I.; Ünlü, N. Dexamethasone–pamam dendrimer conjugates for retinal delivery: Preparation, characterization and in vivo evaluation. *J. Pharm. Pharmacol.* 2016, 68, 1010–1020. <https://doi.org/10.1111/jphp.12587>
109. Jeong, S.Y.; Kang, M.L.; Park, J.W.; Im, G.I. Dual functional nanoparticles containing sox duo and angpt4 shrna for osteoarthritis treatment. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2020, 108, 234–242. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34383>
110. Bae, S.; Lee, H.-J.; Lee, J.S.; Webb, K. Cell-mediated dexamethasone release from semi-ipsns stimulates osteogenic differentiation of encapsulated mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules* 2015, 16, 2757–2765. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00694>
111. Cho, S.; Choi, J.; Kim, A.; Lee, Y.; Kwon, Y.-U. Efficient solid-phase synthesis of a series of cyclic and linear peptoid-dexamethasone conjugates for the cell permeability studies. *J. Comb. Chem.* 2010, 12, 321–326. <https://doi.org/10.1021/cc9001857>

112. Liu, B.; Kodadek, T. Investigation of the relative cellular permeability of DNA-binding pyrrole-imidazole polyamides. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4604–4612. <https://doi.org/10.1021/jm9002999>
113. Liu, X.-M.; Quan, L.-D.; Tian, J.; Alnouti, Y.; Fu, K.; Thiele, G.M.; Wang, D. Synthesis and evaluation of a well-defined hpma copolymer–dexamethasone conjugate for effective treatment of rheumatoid arthritis. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2910–2919. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9683-3>
114. Kritchenkov, A.; Skorik, Y.A. Click reactions in chitosan chemistry. *Russ. Chem. Bull.* **2017**, *66*, 769–781. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1809-5>
115. Liu, X.-M.; Thakur, A.; Wang, D. Efficient synthesis of linear multifunctional poly(ethylene glycol) by copper (i)-catalyzed huisgen 1, 3-dipolar cycloaddition. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2653–2658. <https://doi.org/10.1021/bm070430i>
116. Karandish, F.; Mamnoon, B.; Feng, L.; Haldar, M.K.; Xia, L.; Gange, K.N.; You, S.; Choi, Y.; Sarkar, K.; Mallik, S. Nucleustargeted, echogenic polymersomes for delivering a cancer stemness inhibitor to pancreatic cancer cells. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 4122–4132. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01133>
117. Jia, Y.; Fan, M.; Chen, H.; Miao, Y.; Xing, L.; Jiang, B.; Cheng, Q.; Liu, D.; Bao, W.; Qian, B. Magnetic hyaluronic acid nanospheres via aqueous diels–alder chemistry to deliver dexamethasone for adipose tissue engineering. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *458*, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.07.062>
118. Yu, X.; Zhang, R.; Lei, L.; Song, Q.; Li, X. High drug payload nanoparticles formed from dexamethasone-peptide conjugates for the treatment of endotoxin-induced uveitis in rabbit. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 591. <https://doi.org/10.2147/IJN.S179118>
119. Wang, C.; Hou, H.; Nan, K.; Sailor, M.J.; Freeman, W.R.; Cheng, L. Intravitreal controlled release of dexamethasone from engineered microparticles of porous silicon dioxide. *Exp. Eye Res.* **2014**, *129*, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.11.002>
120. Wu, E.C.; Andrew, J.S.; Buyanin, A.; Kinsella, J.M.; Sailor, M.J. Suitability of porous silicon microparticles for the long-term delivery of redox-active therapeutics. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5699–5701. <https://doi.org/10.1039/C1CC10993F>
121. Pickens, C.J.; Christopher, M.A.; Leon, M.A.; Pressnall, M.M.; Johnson, S.N.; Thati, S.; Sullivan, B.P.; Berkland, C. Antigen-drug conjugates as a novel therapeutic class

for the treatment of antigen-specific autoimmune disorders. *Mol. Pharm.* 2019, 16, 2452–2461. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00063>

122. Bort, G.; Lux, F.; Dufort, S.; Crémillieux, Y.; Verry, C.; Tillement, O. Epr-mediated tumor targeting using ultrasmall-hybrid nanoparticles: From animal to human with theranostic aguix nanoparticles. *Theranostics* 2020, 10, 1319. <https://www.thno.org/v10p1319.htm>

123. Hobbs, S.K.; Monsky, W.L.; Yuan, F.; Roberts, W.G.; Griffifith, L.; Torchilin, V.P.; Jain, R.K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 4607–4612. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4607>

124. Sun, H.; Chen, L.; Cao, S.; Liang, Y.; Xu, Y. Warburg effects in cancer and normal proliferating cells: Two tales of the same name. *Genom. Proteom. Bioinform.* 2019, 17, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.12.006>

125. Tran Thi, N.V.; Hwang, H.S.; Kim, Y.; Kang, H.C.; Huh, K.M. Reduction-responsive poly (ethylene glycol)-dexamethasone biarm conjugate and its self-assembled nanomicelles: Preparation, physicochemical characterization, and thiol-triggered drug release. *Polym. Adv. Technol.* 2019, 30, 2993–3002. <https://doi.org/10.1002/pat.4731>

126. Hyun, S.; Lee, G.; Kim, D.; Kim, H.; Lee, S.; Nam, D.; Jeong, Y.; Kim, S.; Yeom, S.; Kang, S.; et al. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green flfluorescent protein. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1060–1068. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014886>

127. Norman, A.W.; Mizwicki, M.T.; Norman, D.P. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3, 27–41. <https://doi.org/10.1038/nrd1283>

128. Ma, S.; Song, W.; Xu, Y.; Si, X.; Zhang, D.; Lv, S.; Yang, C.; Ma, L.; Tang, Z.; Chen, X. Neutralizing tumor-promoting inflammation with polypeptide-dexamethasone conjugate for microenvironment modulation and colorectal cancer therapy. *Biomaterials* 2020, 232, 119676. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119676>

129. Chaikomom, K.; Chattong, S.; Chaiya, T.; Tiwawech, D.; Sritana-Anant, Y.; Sereemasapun, A.; Manotham, K. Doxorubicinconjugated dexamethasone induced mcf-7 apoptosis without entering the nucleus and able to overcome mdr-1-induced resistance. *Drug Des. Dev. Ther.* 2018, 12, 2361. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S168588>

130. Krakovičová, H.; Etrych, T.; Ulbrich, K. Hpm-a-based polymer conjugates with drug combination. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, 37, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.03.011>

131. Kritchenkov, A.S.; Andranoviš, S.; Skorik, Y.A. Chitosan and its derivatives: Vectors in gene therapy. *Russ. Chem. Rev.* 2017, 86, 231. <http://dx.doi.org/10.1070/RCR4636>

132. Malaekheh-Nikouei, B.; Gholami, L.; Asghari, F.; Askarian, S.; Barzegar, S.; Rezaee, M.; Oskuee, R.K. Viral vector mimicking and nucleus targeted nanoparticles based on dexamethasone polyethylenimine nanoliposomes: Preparation and evaluation of transfection efficiency. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2018, 165, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.043>

133. Malaekheh-Nikouei, B.; Rezaee, M.; Gholami, L.; Sanjar Mousavi, N.; Kazemi Oskuee, R. Synthesis, characterization and evaluation of transfection efficiency of dexamethasone conjugated poly (propyleneimine) nanocarriers for gene delivery#. *Pharm. Biol.* 2018, 56, 519–527.

134. Choi, M.; Gu, J.; Lee, M.; Rhim, T. A new combination therapy for asthma using dual-function dexamethasone-conjugated polyethylenimine and vitamin d binding protein sirna. *Gene Ther.* 2017, 24, 727–734. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.83>

135. Jeon, P.; Choi, M.; Oh, J.; Lee, M. Dexamethasone-conjugated polyamidoamine dendrimer for delivery of the heme oxygenase-1 gene into the ischemic brain. *Macromol. Biosci.* 2015, 15, 1021–1028. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500058>

136. Дексаметазон (Dex) ФС.2.1.0089.18 «Дексаметазон» Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/554544640>

137. Фосфатно-буферный раствор (PBS) ОФС.1.3.0003.15 Буферные растворы Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-3-0003-15-bufernye-rastvory/>

138. 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид(EDC) Режим доступа: [https://ru.wikipedia.org/wiki/1-%D0%AD%D1%82%D0%B8%D0%BB-3-\(3-%D0%B4%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BB%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%B8%D0%BB\)%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B1%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D0%B4](https://ru.wikipedia.org/wiki/1-%D0%AD%D1%82%D0%B8%D0%BB-3-(3-%D0%B4%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BB%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%B8%D0%BB)%D0%BA%D0%B0%D1%80%D0%B1%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D0%B4)

139. N-гидроксисукцинимид (NHS) Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/N-%D0%93%D0%B8%D0%B4%D1%80%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D1%81%D1%83%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BD%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D0%B4>
140. Тетрагидрофуран (ТГФ) ТУ 6-02-621-81 Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/496917459>
141. Янтарный ангидрид ТУ 6 - 09 - 3611 – 85
142. Хлористоводородная кислота ОФС.1.3.0001.15 Реактивы, индикаторы Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/1-3-1-ofs-1-3-0001-15-reaktivy-indikatory/>
143. Натрия гидрокарбонат ФС.2.2.0011.15 Натрия гидрокарбонат Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-2-0011-15-natriya-gidrokarbonat/>
144. Трифторукусная кислота Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Трифторуксусная_кислота
145. Пиридин ГОСТ 13647-78 Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200017530>
146. Suzuki, T.; Sato, E.; Tada, H.; TOJIMA, Y. Examination of local anti-inflammatory activities of new steroids, hemisuccinyl methyl glycolates. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 816–821 <https://doi.org/10.1248/bpb.22.816>
147. Chen, S.W.; Xin, Q.; Kong, W.X.; Min, L.; Li, J.F. Anxiolytic-like effect of succinic acid in mice. *Life Sci.* **2003**, *73*, 3257–3264. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.06.017>
148. Skorik, Y.A.; Kritchenkov, A.S.; Moskalenko, Y.E.; Golyshev, A.A.; Raik, S.V.; Whaley, A.K.; Vasina, L.V.; Sonin, D.L. Synthesis of n-succinyl- and n-glutaryl-chitosan derivatives and their antioxidant, antiplatelet, and anticoagulant activity. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *166*, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.097>
149. Fattal-German, M.; Le Roy Ladurie, F.; Lecerf, F.; Berrih-Aknin, S. Expression of ICAM-1 and TNF α in human alveolar macrophages from lung-transplant recipients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *796*, 138–148. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb32575.x>
150. Yang, L.; Froio, R.M.; Sciuto, T.E.; Dvorak, A.M.; Alon, R.; Lusinskas, F.W. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood* **2005**, *106*, 584–592. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4942>

151. X.-B. Yuan, H. Li, Y.-B. Yuan, Preparation of cholesterol-modified chitosan selfaggregated nanoparticles for delivery of drugs to ocular surface, Carbohydr. Polym. 65 (2006) 337–345, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.020>.

152. Xiaoyue Xua, Liping Suna, Li Zhoua, Yanju Chengc, Feng Caoa, Functional Chitosan Oligosaccharide Nanomicelles for Topical Ocular Drug Delivery of Dexamethasone Carbohydr Polym 2020 Jan 1;227:115356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115356>.