

УДК 616-006.04:615.456.1: 615.071

А. В. Стадниченко¹, Ю. М. Краснопольский¹, В. И. Швець², Т. Г. Ярних³¹ *Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»*² *Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова*³ *Національний фармацевтичний університет*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРЕННЕГО ОБЪЁМА ЛИПОСОМ С ИРИНОТЕКАНОМ

Были получены липосомы с иринотеканом методом «градиента pH». Для определения внутреннего объёма липосом использовали метод контроля цитрата иона в ультрафильтрате методом ВЭЖХ. Было определено, что внутренний объём полученных липосом составляет 10,15 % от общего объёма эмульсии. Методика может использоваться при разработке липосом методом «градиента pH» с использованием лимонной кислоты в качестве внутреннего буфера.

Ключевые слова: липосомы; иринотекан; определение внутреннего объёма; ВЭЖХ

ВСТУПЛЕНИЕ

В настоящее время фармацевтическая наука является одной из наиболее динамично развивающихся направлений научно-технологического сектора. Создание наукоёмких и современных лекарственных средств является одной из задач современной фармации [4]. Липосомы широко применяются в качестве транспортных систем доставки, в том числе и для создания цитотоксических лекарственных средств нового поколения [1, 6]. Инкапсулируя высокоактивные лекарственные средства, липосомы уменьшают их нежелательный контакт с сосудами в месте введения, уменьшают токсические побочные эффекты [2, 10].

Перспективными на данный момент являются препараты растительного происхождения и их производные [8]. Один из активных фармацевтических ингредиентов – иринотекан гидрохлорид является производным камптотецина – алкалоида природного происхождения, полученного из древесины дерева *Camptotheca accuminata*. Он является ингибитором топоизомеразы I. Иринотекан взаимодействует с комплексом ДНК – топоизомеразы I и препятствует синтезу ДНК. Фармакологическое действие иринотекана обусловлено невозможностью репликации ДНК и как следствие – гибелью клетки [11].

Создание липосом с иринотеканом позволит уменьшить общее и, в частности, кардиотоксическое действие на организм за счёт инкапсуляции активного вещества в липидную оболочку. Инкапсуляция ведёт к

продолгованию действия препарата, проникновению наночастиц в капилляры опухоли за счёт развитой васкуляризации и высвобождению в них лекарственного вещества [9].

Нами были получены липосомы с иринотеканом гидрохлоридом по методике «градиента pH» [7]. На рис. 1 приведены равновесия, существующие в растворе при инкапсуляции иринотекана во внутреннюю полость липосом. Строение липидного бислоя, в частности, его гидрофобной части позволяет проникать через него только незаряженным молекулам.

Константа протонизации молекулы иринотекана pK_a составляет $6,57 \pm 0,70$. На рис. 1 показано равновесие во внешнелипосомальном буферном растворе (равновесие 1), при котором при pH 4,0-5,0 часть молекул иринотекана переходит в молекулярное состояние. При этом молекулярный иринотекан проходит через липидный бислой и приобретает заряд за счёт протонирования (равновесие 2) кислым буферным раствором внутри липосом. За счёт смещения равновесия в сторону поглощения липосомами иринотекана из внешнего раствора реакция протекает в сторону образования депротонированной, молекулярной формы. Таким образом, осуществляется активная загрузка лекарственного вещества во внутреннюю полость липосомы. Основными факторами системы, влияющими на степень инкапсуляции, является разница значений pH внутри и снаружи липосом, ёмкости буферных растворов, а также размер липосом. В то время как первые два фактора легко регулируются в ходе эксперимента, размер липосом является производным значением от состава липидов, эффективности и количества циклов экструзии.

© Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Швець В. И., Ярних Т. Г., 2016

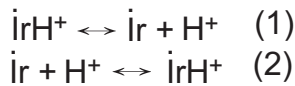


Рис. 1. Химические равновесия при инкапсуляции иринотекана в липосомы

Известны методики определения внутреннего объема липосом, основанные на теоретических математических расчетах, исходя из размера липосом [3]. Однако, в связи с тем, что на практике сложно достаточно полно оценить все свойства наносистемы, как то – толщина липидной плёнки, состав липидов, полидисперсность размеров, математический метод не применим на практике. Также известен метод, основанный на равновесии йодоводородной кислоты, используемой в качестве маркера [5]. Этот метод может быть использован при моделировании процесса получения липосом, однако наличие йодоводородной кислоты может изменить свойства процесса активной инкапсуляции и не позволит объективно оценить объём липосом в условиях конкретного процесса.

Цель работы – определение внутреннего объема липосом с иринотеканом.

Для реализации поставленной цели необходимо было разработать методику определения внутреннего объема липосом для её применения при разработке липосом с иринотеканом методом градиента рН. Методика не должна вносить дополнительные химические реагенты в систему для сохранения свойств получаемых липосом и обладать простотой исполнения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Липосомы получали методом липидной плёнки, используя яичный фосфатидилхолин/холестерин на роторном испарителе при остаточном давлении 15 мм рт. ст. Плёнка была гидратирована 0,2 М раствором лимонной кислоты моногидрата с рН 1,9 и подвергнута экструзии на гомогенизаторе Microfluidics Microfluidizer Y-110P. Средний размер липосом составил 105 нм. Количество лимонной кислоты моногидрата, которое было использовано для изготовления липосом, составило 42 г.

Ультрафильтрацию проводили на установке Minim2, фирмы PALL. Использовали ультрафильтрационные кассеты с верхним пределом отсечения 30 кДа.

Хроматографические исследования проводили на приборе ВЭЖХ Shimadzu LC-20. Использовали колонку фирмы Waters – Ascentis RP-Amide 250 mm × 4.6 mm, размер сорбента – 5 мкм.

Хроматографирование проводили на приборе Shimadzu LC-20 в условиях:

- подвижная фаза – раствор трифторуксусной кислоты с рН 2,0;
- скорость подвижной фазы – 1 мл/мин;
- детектирование – спектрофотометрическое, длина волны 210 нм;
- объём ввода – 10 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения внутреннего объема липосом нами была применена методика хроматографического определения содержания лимонной кислоты моногидрата в отфильтрованном растворе при проведении ультрафильтрации.

Поскольку гидратирование плёнки происходит раствором 0,2 М лимонной кислоты моногидрата, она присутствует в липосомах именно в этой, начальной концентрации. Зная количество отфильтрованной лимонной кислоты моногидрата, мы узнаем количество лимонной кислоты моногидрата, которое осталось в липосомальной эмульсии. А поскольку концентрация раствора цитрата внутри липосом известна, можно определить внутренний объём липосом.

На установке тангенциальной фильтрации была проведена процедура замены внешнего буфера на раствор воды для инъекций. На рис. 2 приведена хроматограмма раствора фильтрата с пиком лимонной кислоты на 5,23 мин.

Поскольку существовала необходимость определять количество лимонной кислоты моногидрата в широких диапазонах – от 0,2 М до следовых количеств, была проведена калибровка в диапазоне от 0,2 М до 0,0002 М содержания лимонной кислоты моногидрата.

Было проведено 11 циклов ультрафильтрации. Эмульсия липосом концентрировалась на установке ультрафильтрации и далее разбавлялась водой для инъекций. В таблице приведены значения объёмов фильтрата и концентраций лимонной кислоты моногидрата в фильтрате.

Исходя из данных таблицы, всего было отфильтровано 39,98 г лимонной кислоты моногидрата. Учитывая, что на приготовление раствора цитрата ушло 42 г лимонной кислоты моногидрата, в 1 л осталось 4,267 г, что соответствует 10,15 % 0,2 М раствора. Исходя из этого, объём, занимаемый липосомами, равен 10,15 %.

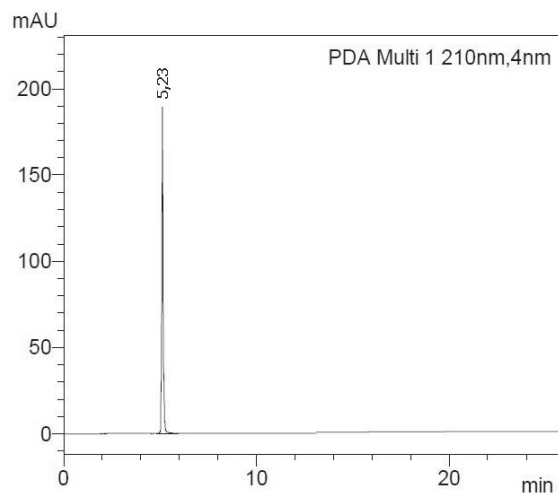


Рис. 2. Хроматограмма фильтрата. Время удерживания лимонной кислоты – 5,23 мин

Таблиця

ЗНАЧЕНИЯ ОБЪЕМОВ И КОНЦЕНТРАЦИЙ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ МОНОГИДРАТА В ФИЛЬТРАТЕ

Объём фильтрата, мл	Концентрация в фильтрате лимонной кислоты моногидрата М/л	Содержание по массе лимонной кислоты моногидрата, г
600	0,180	22,70 в 600 мл
400	0,0905	7,60 в 400 мл
400	0,045	3,78 в 400 мл
400	0,022	1,85 в 400 мл
400	0,011	0,92 в 400 мл
400	0,0055	0,462 в 400 мл
400	0,0025	0,210 в 500 мл
400	0,0012	0,1 в 400 мл
400	0,00073	0,061 в 400 мл
400	0,00059	0,050 в 400 мл
400	0,00044	0,037 в 400 мл

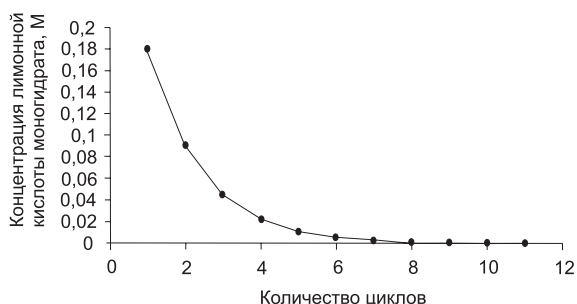


Рис. 3. Зависимость концентрации лимонной кислоты моногидрата от количества циклов ультрафильтрации

О полноте фильтрации также свидетельствует тот факт, что в эмульсии остаётся 4,267 г лимонной кислоты моногидрата, что соответствует концентрации 0,02 М. Однако её концентрация в фильтрате на 9-11 циклах составляет 0,0007-0,0004 М, что меньше в 100 раз концентрации в липосомах, и свидетельствует о полноте удаления внешнего буфера. Минимальное, но в то же время постепенное уменьшение количества лимонной кислоты моногидрата можно объяснить разрушением липосом, которое имеет место в процессе ультрафильтрации в минимальных количествах.

На рис. 3 приведен график зависимости снижения концентрации лимонной кислоты моногидрата в фильтрате от количества циклов.

Из таблицы и рис. 3 видно, что количество лимонной кислоты моногидрата, находящееся в фильт-

рате, асимптотически приближается к 0, однако, на 9-11 циклах экстрезии количество лимонной кислоты моногидрата в фильтрате на 3 порядка меньше изначальной концентрации. Также на последних циклах разница в концентрациях невелика, что свидетельствует о полноте удаления.

Было проведено измерение на 4 лабораторных сериях препарата с объёмом серий 1000 мл. Значение внутреннего объёма составило 9,8-11,1 %.

Если общая концентрация иринотекана в липосомальной эмульсии составляет 2 мг/мл, то при достижимой эффективности инкапсуляции 98 % происходит его концентрирование в липосомах в 10 раз. При этом концентрация иринотекана внутри липосом достигает 20 мг/мл.

ВЫВОДЫ

Разработана методика определения внутреннего объёма липосом. Методика применима на практике для контроля количества необходимых циклов ультрафильтрации при создании «градиента рН» для производства липосом с иринотеканом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Швец В. И. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии / В. И. Швец, Ю. М. Краснопольский // Провизор. – 2008. – № 3. – С. 18-24.
2. Alyane M. Remote loading of doxorubicin into liposomes by transmembrane pH gradient to reduce toxicity toward H9c2 cells / M. Alyane, G. Barratt, M. Lahouel // Saudi Pharmac. J. – 2016. – Vol. 24, Issue 2. – P. 165-175.
3. Elorza M. A. Analysis of the particle size distribution and internal volume of liposomal preparations / M. A. Elorza, M. C. Sains, J. R. Chantres // J. of Pharmac. Sci. – 1993. – Vol. 82, № 17. – P. 98-114.
4. Franco V. Challenges in the clinical development of new antiepileptic drugs / V. Franco, J. A. French, E. Perucca // Pharmacol. Res. – 2016. – Vol. 103. – P. 95-104.
5. Furman A. Internal volume determination of liposomes by rapid equilibrium technique using hydrogen iodine as a marker / A. Furman, O. Saygin // Biotechnol. Techniques. – 1992. – Vol. 6, № 4. – P. 299-304.
6. Li Q. Human epidermal growth factor receptor-2 antibodies enhance the specificity and anticancer activity of light-sensitive doxorubicin-labeled liposomes / [Q. Li, Q. Tang, P. Zhang et al.] // Biomaterials. – 2015. – Vol. 57. – P. 1-11.
7. Mayer D. The use of transmembrane pH gradient-driven drug encapsulation in the pharmacodynamic evaluation of liposomal doxorubicin / D. Mayer, P. R. Cullis, M. B. Bally // J. of Liposome Res. – 1994. – Vol. 4. – P. 529-533.

8. Prakash O. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review / O. Prakash, A. Kumar, P. Kumar, Ajeet // Am. J. of Pharmacol. Sci. – 2013. – Vol. 1, № 6. – P. 104-115.
9. Ramsay E. C. Irinophore C: A liposome formulation of irinotecan with substantially improved therapeutic efficacy against a panel of human xenograft tumors / [E. C. Ramsay, M. Anantha, J. Zastre et al.] // Clin. Cancer Res. – 2008. – Vol. 14, № 4. – P. 198-239.
10. Ron-Doitch S. Reduced cytotoxicity and enhanced bioactivity of cationic antimicrobial peptides liposomes in cell cultures and 3D epidermis model against HSV / [S. Ron-Doitch, B. Sawodny, A. Kühbacher et al.] // J. of Controlled Release. – 2016.
11. Xu Y. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity / Y. Xu, M. A. Villalona-Calero // Annals of Oncol. – 2002. – Vol. 13. – P. 1841-1851.

УДК 616-006.04: 615.456.1: 615.071**О. В. Стадніченко, Ю. М. Краснопольський, В. І. Швець, Т. Г. Ярних****ВИЗНАЧЕННЯ ВНУТРІШНЬОГО ОБ'ЄМУ ЛІПОСОМ ІЗ ІРИНОТЕКАНОМ**

Отримані ліпосоми з іринотеканом методом «градієнта рН». Для визначення внутрішнього об'єму ліпосом використовували метод контролю цитрату іону в ультрафільтраті методом ВЕРХ. Визначено, що внутрішній об'єм отриманих ліпосом становить 10,15 % від загального об'єму емульсії. Методика може бути використана при розробці ліпосом методом «градієнта рН» з використанням лимонної кислоти в якості внутрішнього буфера.

Ключові слова: ліпосоми; іринотекан; визначення внутрішнього обсягу; ВЕРХ

UDC 616-006.04: 615.456.1: 615,071**A. V. Stadnichenko, Yu. M. Krasnopolskyi, V. I. Shvets, T. G. Yarnykh****DETERMINATION OF LIPOSOME INTERNAL VOLUME WITH IRINOTEKAN**

Liposomes with irinotecan by "pH gradient" method were obtained. The method of citrate ion in ultra filtrate by the HPLC was used for the determination of internal volume of Liposomes. It was determined that the internal volume of Liposomes is 10.15 % of the total emulsion volume. The method can be used in the development of liposomes by "pH gradient" using citric acid as an internal buffer.

Key words: liposomes; irinotecan; determination of internal volume; HPLC

Адреса для листування:
61118, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 17.08.2016 р.