

## **ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ЛІПІДНОЇ МЕМБРАНИ ПРИ СТВОРЕННІ ЛІПОСОМ ІЗ ІРИНОТЕКАНОМ**

© **О. В. Стадніченко<sup>1</sup>, Ю. М. Краснопольський<sup>2</sup>, Т. Г. Ярних<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Національний фармацевтичний університет, Харків

<sup>2</sup>Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Харків  
alstn@mail.ru

**Мета роботи.** Вивчити вплив складу ліпідної мембрани на ступінь інкапсуляції та розмір наночасток при створенні ліпосом з іринотеканом.

**Матеріали і методи.** Використовували реактиви фірм Lipoid (Німеччина) та Sigma-Aldrich (США), прилади Buchi 210, Zetasizer Nano ZS, Minim2 з касетами із верхньою межею відсікання 30 кДа, ВЕРХ Shimadzu LC-20. Ліпосоми з іринотеканом отримували методом «хімічного градієнта».

**Результати й обговорення.** Для створення ліпосом з іринотеканом було досліджено ліпідні мембрани із різним співвідношенням фосфатидилхолін / холестерин. Визначено, що при зростанні масового співвідношення холестерину в мембрані покращується ступінь інкапсуляції іринотекану при використанні методу «хімічного градієнта». З іншого боку, при масовому співвідношенні фосфатидилхолін / холестерин 75/25 та 70/30 неможливо позбутись часток із розмірами понад 1000 нм, що неприпустимо з точки зору впровадження технології.

**Висновки.** Проведено експеримент із дослідження оптимального складу ліпідної мембрани із використанням трьох типів криопротектора. Досліджено ліпосомальні мембрани із співвідношенням ліпідів фосфатидилхолін / холестерин: 85/15; 80/20; 75/25; 70/30 за показником розміру ліпосом та інкапсуляції іринотекану у ліпосоми. Оптимальними визначено ліпосоми із співвідношенням ліпідів 80/20 відповідно. Окреслено шляхи підвищення ступеня інкапсуляції.

**Ключові слова:** ліпосоми; іринотекан; ліпідний бішар; фосфатидилхолін; холестерин; гомогенізація методом високого тиску.

**Вступ.** Ліпосоми як фізичні об'єкти були відкриті на початку 60-х років минулого сторіччя і являють собою штучні сфероїди. Внутрішнє водне середовище в ліпосомах оточене мембраною, яка складається із бішару фосфоліпідів, які перебувають у стані рідкого кристалу [1]. Розмір ліпосом, які застосовують у фармацевтичній промисловості, коливається від 30 до 200 нм. Навіть зараз, більш ніж через півсторіччя після винаходу, ліпосоми є важливою платформою створення нових лікарських, діагностичних та дослідницьких засобів [2, 3]. Унікальна здатність інкапсулювати як гідрофільні, так і гідрофобні молекули робить ліпосоми універсальним інструментом для доставки лікарських речовин при проведенні терапії [4].

В українській фармацевтичній промисловості широко використовують ліпосоми як носія для лікарських речовин. Так, на Харківському підприємстві «Біолік» було розроблено низку ліпосомальних препаратів. Це такі препарати, як «Ліпін», «Ліолів», «Антраль», «Ліпофлавіон», «Ліподокс» [5].

Звичайно, у фармацевтичній практиці, ліпосоми використовують як носії для речовин, які не розчинні у воді, чи речовин, які проявляють токсичні та по-

дразнуювальні ефекти при введенні в організм людини. Більшість цих речовин – цитостатики, які використовують при терапії онкологічних хвороб. Створення ліпосомальних форм таких препаратів є одним із шляхів зменшення токсичного впливу на організм пацієнта [6].

Включення до ліпосом речовин, що проявляють токсичні ефекти, зменшує подразнення судин у місці введення, а також впливає на спрямованість ліпосом, «навантажених» лікарським засобом до онкологічно змінених органів. Такий ефект має назву «enhanced permeability and retention (EPR) effect» – ефект підвищеної проникненості та утримання – та спостерігається у пухлинах за рахунок розвиненої васкуляризації капілярів, що спричинено швидким ростом, та, як наслідок – нещільним вистиланням клітинного ендотеліального шару судин [7].

Лікарська речовина іринотекан, структура якого наведена на рисунку 1, є сучасним цитостатичним засобом. Він є напівсинтетичною похідною камптотецину – алкалоїду природного походження, який видобувається із деревини дерева *Camptotheca acuminata* [8].

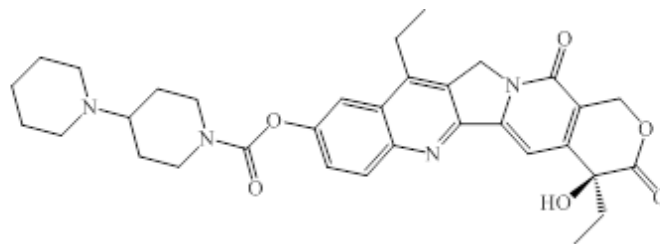


Рис. 1. Структурна формула іринотекану.

Фармакологічна дія іринотекану зумовлена його взаємодією із топоізомеразою I. Молекула іринотекану при введенні в організм взаємодіє із комплексом ДНК-топоізомераза I і перешкоджає процесу синтезу ДНК. Це призводить до неможливості реплікації ДНК і, як наслідок, до загибелі клітини [9]. Під час застосування іринотекану у вигляді розчину для ін'єкцій спостерігаються небажані токсичні прояви, які суттєво зменшують якість життя пацієнта, та в деяких випадках необхідно зменшити дозу препарату, що негативно впливає на якість терапії в цілому [10, 11].

Створення ліпосом з іринотеканом сприятиме зменшенню токсичного впливу на організм людини під час лікування, покращить стан пацієнтів та дасть можливість збільшувати дози препарату без розвитку побічних ефектів.

Метою роботи було дослідження складу ліпідної мембрани ліпосомальної ліофілізованої форми іринотекану для отримання стабільних розмірів та максимальних значень інкапсуляції активної речовини.

**Матеріали і методи.** Для виготовлення ліпосом використовували яєчний фосфатидилхолін виробництва фірми Lipoid (Німеччина); холестерин, трегалозу, мальтозу, лактозу – виробництва фірми Sigma-Aldrich (США). Ліпосоми отримували методом «хімічного градієнта». Ліпідну плівку отримували на ротатійному випарнику Buchi 210 із вакуум контролером, при остаточному тиску 15 мм рт. ст. Для гомогенізації використовували метод екструзії високим тиском. Як внутрішній буфер використовували цитратний буферний розчин. Розмір ліпосом визначали методом лазерної дифракції на приладі Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS. Ультрафільтрацію для створення «хімічного градієнта» проводили на установці Minim 2, фірми PALL. Використовували ультрафільтраційні касети із верхньою межею відсікання 30 кДа. Визначення ступеня інкапсуляції проводили методом ВЕРХ на приладі Shimadzu LC-20, відповідно до раніше розробленої методики [12].

**Результати й обговорення.** Від складу ліпідної мембрани залежать характеристики отриманих ліпосом, їх стабільність упродовж терміну зберігання, здатність утримувати всередині лікарську речовину, стійкість до ліофілізації та регідратації [13]. З одного боку, мембрана повинна мати задовільну жорсткість, оскільки це впливає на утримування діючої речовини, стійкість до ліофілізації та регідратації, з іншого

боку, мембрана повинна забезпечувати можливість пружної деформації ліпосом на етапі стерильної фільтрації через стерилізуючі фільтри із розміром пор 0,22 мкм.

Як основний матеріал мембрани обрано фосфоліпід природного походження фосфатидилхолін, який брали із жовтків курячих яєць. Як модифікатор, який регулює жорсткість мембрани, використовували холестерин.

Проведено скринінговий експеримент із вивчення ліпідної мембрани із співвідношенням фосфатидил / холестерин: 100 / 0; 95 / 5; 85 / 15 та 70 / 30. Різниця в значенні рН при створенні «хімічного градієнта» складала 1,3 одиниці. Ліпосоми піддавали екструзії до одержання часток із розмірами менше 200 нм. До отриманих ліпосом додавали криопротектор лактозу, трегалозу чи мальтозу в кількості 2 % масових. Загальна концентрація ліпідів в емульсії після гомогенізації складала 15 мг/мл. Для порівняльної оцінки стійкості отриманих ліпосом до циклу ліофілізації / регідратації проводили ліофільне сушіння за режимом, наведеним на рисунку 2.

До та після ліофілізації було визначено ступінь інкапсуляції іринотекану. Результати досліджень наведено у таблиці 1.

Із даних таблиці 1 видно, що із збільшенням вмісту холестерину збільшується ступінь інкапсуляції. Експеримент 4 показав найвищі значення ступеня інкапсуляції як до, так і після ліофілізації. Але при співвідношенні фосфатидилхолін / холестерин 70/30 % масових спостерігається ускладнення фільтрації через фільтр із діаметром пор 0,22 мкм. Також під час аналізу розміру часток методом лазерної дифракції було виявлено наявність часток із діаметром понад 1000 нм, що свідчить про неоднорідність емульсії, а також впливає на якість проведення стерильної фільтрації.

Оскільки було встановлено, що мембрана зі складом фосфатидилхолін / холестерин 85/15 придатна для створення ліпосом, а мембрана фосфатидилхолін / холестерин 70/30 хоч і має кращі показники інкапсуляції – не забезпечує відсутності часток більше 1000 нм, було вирішено повторити експеримент із дослідження мембран із проміжним складом ліпідів. Також необхідно визначити, що трегалоза як криопротектор показала найкращий показник ступеня інкапсуляції.

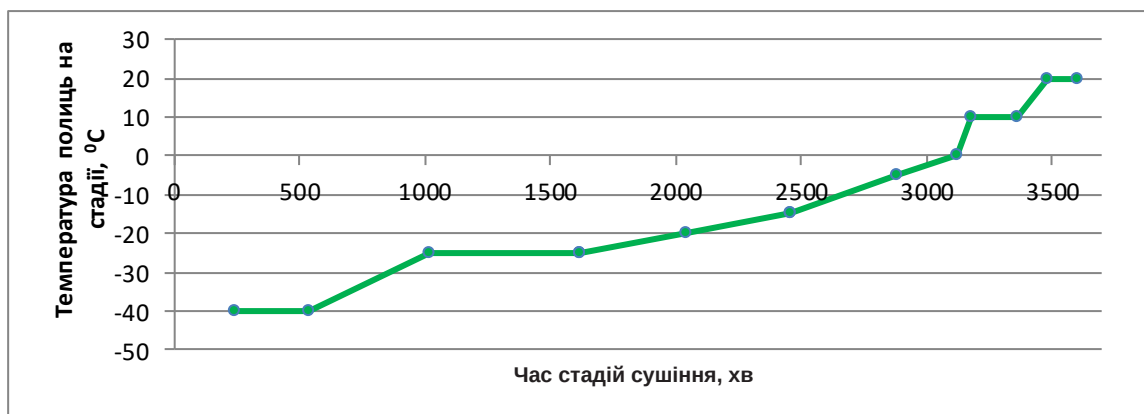


Рис. 2. Графік режиму ліофільного сушіння при скринінгових випробуваннях.

Таблиця 1. Ступінь інкапсуляції залежно від складу ліпосом. Скринінговий експеримент

№ з/п	Склад ліпідів: фосфатидилхолін / холестерин, % масові	Ступінь інкапсуляції до ліофілізації, %	Доданий криопротектор	Ступінь інкапсуляції після ліофілізації, %
1	100	33	Лактоза	12
			Трегалоза	19
			Мальтоза	7
2	95 / 5	44	Лактоза	16
			Трегалоза	28
			Мальтоза	12
3	85 / 15	57	Лактоза	39
			Трегалоза	43
			Мальтоза	35
4	70 / 30	71 Ускладнення при фільтрації 0,22 мкм	Лактоза	46
			Трегалоза	51
			Мальтоза	42

Як модель для експерименту обрано концентрацію фосфоліпідів 15 мг/мл. Було досліджено ліпосоми із складом мембрани фосфатидилхолін / холестерин у масовому співвідношенні: 85/15; 80/20; 75/25; 70/30. Різниця в значенні рН при створенні «хімічного градієнта» складала 2,3 одиниці. Гомогенізацію проводили методом високого тиску до досягнення розміру часток 90–120 нм, який є прийнятним у фармацевтичній промисловості як усереднений розмір ліпосом. Завантажували ліпосоми після проведення ультрафільтрації іринотеканом до загальної кон-

центрації 2 мг/мл, інкубація тривала 12 год. У таблиці 2 наведено результати експерименту.

Результати таблиці 2 підтверджують дані скринінгового експерименту – незважаючи на високий ступінь інкапсуляції, при співвідношенні ліпідів фосфатидилхолін / холестерин 75/25 та 70/30 неможливо позбутися часток розміром більше 220 нм. Мембрана із співвідношенням ліпідів фосфатидилхолін / холестерин 80/20 підтвердила ступінь інкапсуляції іринотекану – 79 %, поруч із технологічною перевагою – відсутністю часток більше 1000 нм. Для подальшої

Таблиця 2. Характеристики отриманих ліпосом при різному співвідношенні фосфатидилхолін / холестерин

№ з/п	Склад ліпідів: фосфатидилхолін / холестерин, % масові	Кількість циклів екструзій	Розмір ліпосом, нм	Ступінь інкапсуляції іринотекану, %	Примітка
1	85/15	6	86	63	Частки більше 220 нм відсутні
2	80/20	7	108	79	Частки більше 220 нм відсутні
3	75/25	12	131	87	Наявні частки більше 1000 нм
4	70/30	14	128	92	Наявні частки більше 1000 нм

оптимізації складу ліпосом доцільно обрати мембрану із співвідношенням ліпідів фосфатидилхолін / холестерин 80 / 20 як найбільш перспективну.

Можна очікувати, що отриманий ступінь інкапсуляції можна покращити за рахунок дослідження таких показників ліпосомальної системи, як концентрація ліпідів, різниці в значенні рН при створенні «хімічного градієнта». Також необхідно проводити дослідження впливу кріопротекторів на процес ліофілізації ліпосом поруч із оптимізацією режиму ліофільного сушіння наночасток.

**Висновки.** 1. Проведено скринінговий експеримент з пошуку оптимального складу ліпідної мембрани та трьох типів кріопротекторів. Визначено пер-

спективний склад ліпідів для подальшого дослідження в більш вузькому діапазоні співвідношення фосфатидилхолін / холестерин.

2. Досліджено ліпосомальні мембрани із співвідношенням ліпідів фосфатидилхолін / холестерин: 85/15; 80/20; 75/25; 70/30 за показником розміру ліпосом та інкапсуляції іринотекану в ліпосоми. Експериментально доведено склад оптимального з точки зору ступеня інкапсуляції та технологічної придатності мембрани, із співвідношенням фосфатидилхолін / холестерин 80/20 % масових.

3. Визначено шляхи покращення ступеня інкапсуляції для ліпосом з обраною ліпідною мембраною.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЫ ПРИ СОЗДАНИИ ЛИПОСОМ С ИРИНОТЕКАНОМ**

**А. В. Стадниченко<sup>1</sup>, Ю. М. Краснопольский<sup>2</sup>, Т. Г. Ярних<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, Харьков

<sup>2</sup>Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Харьков  
alstn@mail.ru

**Цель работы.** Определить влияние состава липидной мембраны на степень инкапсуляции и размер наночастиц при разработке липосом с иринотеканом.

**Материалы и методы.** Использовали реактивы фирмы Lipoid (Германия) и Sigma-Aldrich (США), приборы: Buchi 210, Zetasizer Nano ZS, Minim2 с кассетами с верхним пределом отсечения 30 кДа, ВЭЖХ Shimadzu LC-20. Липосомы с иринотеканом получали методом «химического градиента».

**Результаты и обсуждение.** Для создания липосом с иринотеканом были исследованы липидные мембраны с различным соотношением фосфатидилхолин / холестерин. Определено, что при увеличении массового содержания холестерина в мембране улучшается степень инкапсуляции иринотекана при использовании метода «химического градиента». С другой стороны, при массовом соотношении фосфатидилхолин / холестерин 75/25 и 70/30 невозможно избавиться от частиц с размерами более 1000 нм, что недопустимо с точки зрения применения технологии для производства готового липосомального препарата.

**Выводы.** Проведен эксперимент по исследованию оптимального состава липидной мембраны с использованием трех типов кріопротекторів. Исследованы липосомальные мембраны с соотношением липидов фосфатидилхолин / холестерин: 85/15; 80/20; 75/25; 70/30 по показателю размера липосом и инкапсуляции иринотекана в липосомы. Доказано, что оптимальным являются состав липосом с соотношением липидов 80/20 соответственно. Намечены пути повышения степени инкапсуляции.

**Ключевые слова:** липосомы; иринотекан; липидный бислой; фосфатидилхолин; холестерин; гомогенизация высоким давлением.

## **RESEARCH OF THE LIPID MEMBRANE COMPOSITION DURING LIPOSOMAL IRINOTECAN CREATION**

**O. V. Stadnichenko<sup>1</sup>, Y. M. Krasnopolsky<sup>2</sup>, T. G. Yarnih<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> National University of Pharmacy, Kharkiv

<sup>2</sup> National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute», Kharkiv  
alstn@mail.ru

**The aim of the work.** Research the effect of lipid membrane composition on the encapsulation degree and the size of nanoparticles in the pharmaceutical development of liposomal irinotecan.

**Materials and Methods.** Reagents were purchased from Lipoid, Germany and Sigma-Aldrich, USA. The following instruments were used: Buchi 210, Zetasizer Nano ZS, Minim2 with cassettes with an upper cut-off limit of 30 kDa, Shimadzu LC-20 HPLC. Liposomes with irinotecan were obtained by the "chemical gradient" technology.

**Results and Discussion.** For purposes of liposomal irinotecan creation, lipid membranes with different phosphatidylcholine / cholesterol ratio were studied. It was determined that increasing of the cholesterol weight ratio in the membrane, improves the encapsulation of irinotecan when a «chemical gradient» method was used. On the other hand, at a mass ratio of phosphatidylcholine / cholesterol 75/25 and 70/30 it was impossible to avoid particles larger than 1000 nm formation, that is unacceptable from the position of industrial technology application.

**Conclusions.** An experiment was performed to research the optimal composition of the lipid membrane using three types of cryoprotectants. It was studied the influence of liposomal membranes with the ratio of lipids phosphatidylcholine / cholesterol: 85/15; 80/20; 75/25; 70/30 on liposomes size and encapsulation degree. The ratio of 80/20 was defined as optimum for obtaining liposomes with irinotecan. Ways of improving of irinotecan encapsulation into liposomes were outlined.

**Key words:** liposomes; Irinotecan; lipid bilayer; phosphatidylcholine; cholesterol; high pressure homogenization.

### Список літератури

1. Sessa G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes / G. Sessa, G. Weissmann // *J. Lipid Res.* – 1968. – Vol. 9, №3. – P. 310–318.
2. Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications / A. Madni, M. Sarfraz, M. Rehman [et. al.] // *J. Pharm. Pharm. Sci.* –2014. – Vol. 17. – № 3. – P. 401–426.
3. Швець В. І. Липосомальна платформа для створення низькотоксичних протипухлевих препаратів / В. І. Швець // *Вестник МІТХТ.* –2009. – № 4. – С. 4–25.
4. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы / А. Е. Шахмаев, А. Г. Кацай, В. В. Прохоров // *Ремедиум.* – 2015. – № 12. – С. 26–59.
5. Дудниченко А. В. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике / А. В. Дудниченко, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швець. – Харьков : РА-Каравелла, 2001. – 136 с.
6. Mechanisms of reduction of antitumor drug toxicity by liposome encapsulation / Y. E. Rahman, W. R. Hanson, J. Bharucha [et. al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1978. – Vol. 308. – P. 325–342.
7. Matsumura Y. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs / Y. Matsumura, H. Maeda // *Cancer Research.* – 1986. – № 46. – P. 6387–6392.
8. Стадниченко А. В. Технология получения липосомальных форм иринотекана (обзор) / А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швець // *Биофармацевтический журнал.* –2014. – Т. 6, № 6. – С. 3–9.
9. Official FDA site. FDA prescribing information. Irinotecan. – 2010. Access mode - [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/020571s048lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/020571s048lbl.pdf)
10. Paulik A. Predictors of Irinotecan toxicity and efficacy in treatment of metastatic colorectal cancer / A. Paulik, J. Grim, S. Filip // *Acta Medica.* – 2012. –Vol. 55, №4. – P. 153–159.
11. N. Kopjar. Irinotecan Toxicity to Human Blood Cells in vitro: Relationship between Various Biomarkers / N. Kopjar N., D. Zeljezic, A. Vrdoljak // *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.* –2007. – Vol. 100, № 6. – P. 403–413.
12. Стадниченко А. В. Разработка и валидация методики определения степени инкапсуляции иринотекана гидрохлорида в липосомы / А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швець // *Биофармацевтический журнал.* –2015. –Т. 7, № 1. – С. 53–55.
13. Li J. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems / J. Li, X. Wang, T. Zhang // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2014. – № 1. – P. 1–18.

### References

1. Sessa G, Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res.* 1968; 9(3): 310-318.
2. Madni A, Sarfraz M, Rehman M, Ahmad M, Akhtar N, Ahmad S et al. Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications. *J Pharm Pharm Sci.* 2014;17(3): 401-26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224351>
3. Shvets VI. Liposomalnaya platforma dlya sozdaniya nizkotoksichnikh protivopuholevikh preparatov. *Vestnik MITHT.* 2014;4: 4-25; Russian.
4. Shahmaev AY, Katsai AL, Prohorov VV, Stadnichenko AV, Balabanyan VY, Krasnopol'skiy YM et al. Investigation of the methods of inclusion of medicinal substances in liposomal nanoparticles. *Remedium.* 2015;12: 26-59. Available from: <http://elibrary.ru/item.asp?id=25280721>; Russian.
5. Dudnichenko AV, Krasnopol'skiy YM, Shvets VI. Liposomal drugs in the experiment and clinic. [Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике] Kharkov: RA-Karavella; 2001. Russian.
6. Rahman YE, Hanson WR, Bharucha J, Ainsworth EJ, Jaroslow BN. Mechanisms of reduction of antitumor drug toxicity by liposome encapsulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1978;308: 325-42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/279296>
7. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research.* 1986;46: 6387-92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2946403>

8. Stadnichenko AV, Krasnopolskiy YM, Shvets VI. The technology of obtaining liposomal forms of irinotecan (review). *Biofarmaceutichesky zhurnal*. 2014;6(6): 3-9. Available from: <http://www.biopharmj.ru/ojs238/index.php/biopharmj/article/view/249>
9. Official FDA site. FDA prescribing information. Irinotecan. 2010. Available from: - [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/020571s048lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/020571s048lbl.pdf)
10. Paulik A, Grim J, Filip S. Predictors of Irinotecan toxicity and efficacy in treatment of metastatic colorectal cancer. *Acta Medica*. 2012;55(4): 153-59. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631285>
11. Kopjar N, Zeljezic D, Vrdoljak A. Irinotecan Toxicity to Human Blood Cells in vitro: Relationship between Various Biomarkers. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2007;100(6): 403-13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17516995>
12. Stadnichenko AV, Krasnopolskiy YM, Shvets VI. Development and validation of the procedure for determining the degree of encapsulation of irinotecan hydrochloride in liposomes. *Biofarmaceutichesky zhurnal*. 2015;7(1): 53-55. Available from: <http://elibrary.ru/item.asp?id=23787998>.
13. Li J, Wang X, Zhang T. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2014;1: 1-18. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087614000725>

Отримано 11.01.2017