

## **ВИВЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ ПАРАМЕТРІВ ЕКСТРУЗІЇ У РАЗІ СТВОРЕННЯ ЛІПОСОМ ІЗ ІРИНОТЕКАНОМ**

**Ключові слова:** ліпосоми, іринотекан, екструзія, гомогенізація методом високого тиску

Сьогодні розвиток систем доставлення ліків сфокусовано на створенні препаратів із покращеною фармакологічною ефективністю та безпекою дії для пацієнта. Тому, розроблення таких систем як ліпосоми, емульсії та полімерні наночастинки є перспективним напрямом розвитку сучасної фармації [1].

Питання пошуку ефективних ліків у боротьбі із онкологічними захворюваннями стоїть дуже гостро. Існуючі ліки, хоч і забезпечують рецесію пухлин при терапії, мають тяжкі побічні ефекти, які негативно відображаються на якості життя та стані пацієнтів [2, 3].

Одним із рішень створення низькотоксичних лікарських засобів із цитостатичними препаратами є включення їх у ліпосоми [4]. Інкапсуляція токсичних лікарських речовин у ліпосоми зменшує подразнення у місці введення препарату та впливає на спрямованість навантажених наночастинок до онкологічно змінених органів. Це відбувається за рахунок розвиненої васкуляризації судин пухлини та за рахунок щільного клітинного ендотеліального шару судин. Ліпосоми потрапляють у пори між клітинами ендотелію і вивільняють там лікарську речовину [5]. Такий механізм – «enhanced permeability and retention (EPR) effect» – призводить до зменшення загальної та кардіотоксичності цитостатиків, що створює умови для поліпшення якості лікування та якості життя пацієнтів. Також будівельний матеріал ліпосом – фосфатидилхолін – використовується організмом для відтворення пошкоджених клітинних мембран.

Іринотекан є сучасним протионкологічним препаратом, який являє собою похідну камптотецину [6, 7].

Створення ліпосомальної форми іринотекану є перспективним напрямом розвитку протипухлинних препаратів [8, 9]. Через ліпідний бішар, а саме через його гідрофобну частину, яка складається із залишків жирних кислот ліпідів, можуть проходити лише незаряджені молекули, які не мають поверхневого заряду. Для завантаження іринотекану у ліпосоми було запропоновано метод «хімічного градієнта» у варіанті «градієнта рН», за якого на ліпідній мембрані створюється градієнт концентрації іонів водню. Під час потрапляння усередину молекул іринотекану у незарядженій формі, відбувається протонування молекул, вони набувають позитивного заряду і вже не мають можливості проникати через мембрану і, таким чином, концентруються у середині ліпосом.

Важливими характеристиками ліпосом із водорозчинною лікарською речовиною є ступень інкапсуляції активної речовини, дзета-потенціал та розмір ліпосом.

Остання характеристика впливає не тільки на ступень інкапсуляції та відтворюваність технології, але і на безпеку медичного застосування, оскільки наявність частинок за розміром більш ніж 1 мкм може призвести до закупорювання судин пацієнта та наступної емболії. Розмір частинок протионкологічних ліпосомальних препаратів, ухвалених FDA, наведено у таблиці [10].

Т а б л и ц я

**Розмір ліпосом у препаратах, які пройшли ухвалення FDA**

Назва препарату	Виробник	Розмір частинок, нм
Myocet	Elan Pharma, США	120–150
Doxil	Janssen Products, США	80–100

Із табл. 1 випливає, що оптимальні параметри розміру ліпосом знаходяться у діапазоні 80–150 нм. Тобто, на етапі гомогенізації слід орієнтуватися на досягнення розмірів 90–120 нм, щоб при подальшій технології залишитися всередині оптимальних параметрів.

**Мета** роботи – вивчення оптимальних параметрів екструзії під час створення ліпосом із іринотеканом.

Для реалізації поставленої мети здійснено експеримент по визначенню найбільш прийняттого способу гомогенізації ліпосом і дослідженню параметрів технологічного процесу.

**М а т е р і а л и т а м е т о д и д о с л і д ж е н н я**

Для виконання експерименту використовували яєчний фосфатидилхолін (Lipoid, Німеччина), Холестерин (Sigma-Aldrich, США). Ліпосоми зі складом ліпідного бішару фосфатидилхолін яєчний/холестерин 80/20 по масі, 85/15 по масі та загальною концентрацією ліпідів 20 мг/мл одержували методом «хімічного градієнта», як внутрішній буфер використовували 0,2 М розчин лимонної кислоти. Ліпідну плівку одержували на ротаційному випарнику Buchi Rotovap R-210 (Швейцарія) із вакуум-контролером за остаточного тиску 15 мм рт. ст. Для гомогенізації використовували УЗ-баню Сапфір (Росія) об'ємом 2,8 л, робочою частотою 35 кГц, потужністю генератора 130 Вт; екструдери Avestin Emulsiflex C-3 (Канада) та Microfluidics Microfluidizer M-110P (США). Розмір ліпосом визначали методом лазерної дифракції на приладі Malvern Instruments «Zetasizer Nano ZS» (Англія). Ультрафільтрацію здійснювали на установці Minim 2 (PALL, США). Використовували ультрафільтраційні касети із верхньою межею відсікання 30 кДа. Визначення ступеня інкапсуляції виконували методом ВЕРХ на приладі Shimadzu LC-20 (Японія).

**Результати дослідження та обговорення**

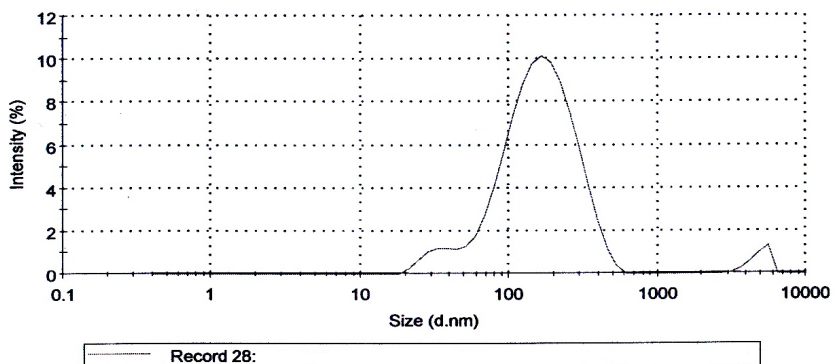
На цей час існують 2 основних методи гомогенізації ліпосомальної емульсії – оброблення ультразвуком та екструзія при високому тиску.

Було апробовано метод гомогенізації ультразвуком. Здійснювали експеримент на ліпосомах зі складом мембрани фосфатидилхолін яєчний/холестерин 85/15 (по масі). Після гідратації ліпідної плівки розчином лимонної кислоти виконували оброблення на ультразвуковій бані упродовж 3 год, при цьому робили вимірювання розміру ліпосом. Було відзначено зменшення розмірів ліпосом, але навіть за 3 год оброблення не вдалося позбавитися від частинок більше 1 мкм. Результати вимірювання розмірів ліпосом у разі гомогенізації методом оброблення ультразвуком наведено на рис. 1.

**Results**

**Size (d.nm):**  
**Peak 1:** 179,1  
**Peak 2:** 33,75  
**Peak 3:** 4875  
**Result quality :** Good

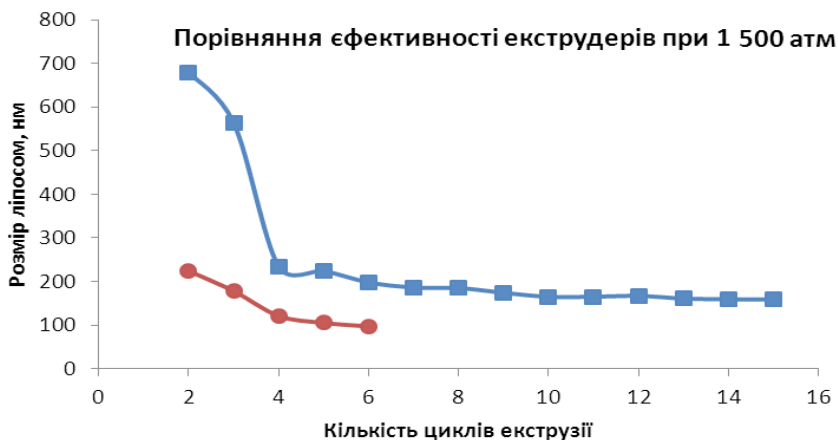
**Size Distribution by Intensity**



**Рис. 1. Результати вимірювання розмірів ліпосом у разі гомогенізації методом оброблення ультразвуком**

Із рис. 1 випливає, що після 3 год оброблення ультразвуком поруч із наявністю частинок із розміром більше 1 мкм з'являються дрібні частинки із діаметром 33 нм, а також ліпосоми із розміром, який наближається до цільового – 179 нм. Неможливість одержати гомогенну емульсію можна пов'язати з досить жорсткою мембраною, яка включає 15% по масі холестерину. Таким чином, метод оброблення ультразвуком виявився непридатним для одержання гомогенної емульсії ліпосом із ліпідною мембраною, модифікованою 15% холестерину.

Наступним кроком було порівняння екструзійних параметрів на приладах Avestin Emulsiflex C-3 та Microfluidics Microfluidizer M-110P. На рис. 2 наведено графік зменшення розміру ліпосом у разі виконання гомогенізації на обох приладах. Як модельну ліпідну мембрану використовували мембрану із складом ліпідів фосфатидилхолін ячний/холестерин 85/15 по масі. Для масштабування вихідний розмір частинок 6 000 нм не показано. За перший цикл екструдер Avestin C-3 зменшив розмір частинок до 684 нм, екструдер Microfluidics Microfluidiser M-110P зменшив розмір частинок до 223 нм.



**Рис. 2. Порівняння ефективності роботи екструдерів Avestin C-3 (■ – верхній графік) та Microfluidics Microfluidiser M-110P (● – нижній графік) Для масштабування вихідний розмір частинок 6 000 нм не показано**

Із рис. 2 випливає, що вже на 6-му циклі розмір ліпосом у разі роботи на екструдері Microfluidics Microfluidiser M-110P становить 97 нм порівняно з показником 160 нм на 15-му циклі для екструдера Avesten C-3. У разі роботи на обох екструдерах після одержання кінцевих ліпосом були відсутні частинки із діаметром більше 1 мкм.

Треба відзначити, що робота на екструдері Avesten C-3 при тиску 1 500 атм є роботою на верхній межі діапазону його роботи. Для досягнення розмірів ліпосом на рівні 160 нм необхідно виконати не менш ніж 16 циклів екструзії, при цьому емульсія перегрівається, незважаючи на охолодження і наявні перебої в роботі екструдера.

Виходячи з цього, технологічно доцільно обрати для гомогенізації в процесі відпрацювання технології екструдер Microfluidics Microfluidiser M-110P, верхній діапазон тиску для якого становить 2 500 атм.

Було встановлено, що ліпосомальна мембрана зі складом ліпідного бішару фосфатидилхолін яєчний/холестерин 80/20 по масі має кращі показники інкапсуляції активної субстанції. Для екструзії на гомогенізаторі Microfluidics Microfluidiser M-110P за застосування охолодження ліпідної емульсії до 20 °С знадобилося 7 циклів для досягнення розміру ліпосом 107 нм. На рис. 3 наведено результати вимірів розміру ліпосом зі складом мембрани фосфатидилхолін яєчний/холестерин 80/20.

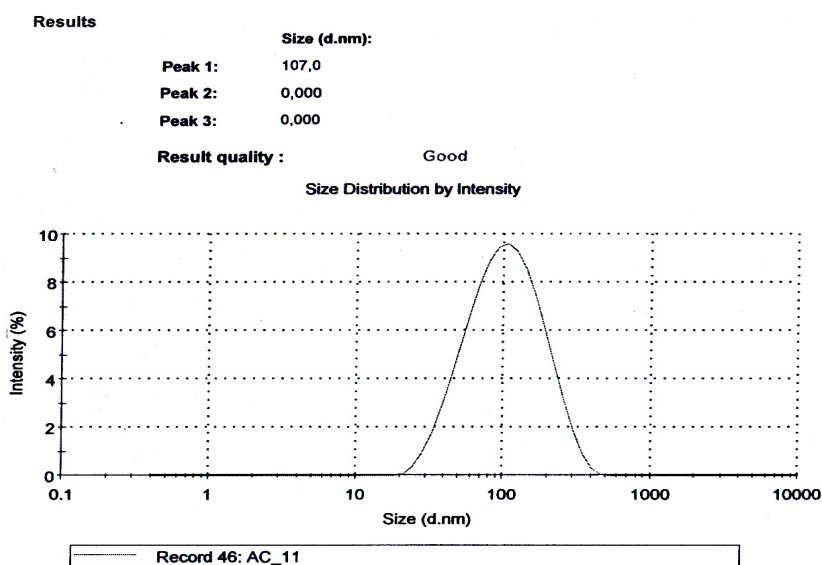


Рис. 3. Результати вимірювань розміру ліпосом зі співвідношенням ліпідів фосфатидилхолін яєчний/холестерин 80/20 та концентрацією 20 мг/мл

Із рис. 3 випливає, що емульсія є гомогенною, без наявності частинок більш ніж 1 мкм. Під час екструзії обладнання працює у штатному режимі.

### Висновки

1. Виконано порівняння методів гомогенізації ліпосом із мембраною, модифікованою холестеринном – ультразвукового оброблення та гомогенізацію методом екструзії за високого тиску. Доведено, що метод оброблення ультразвуком не відповідає вимогам до гомогенності емульсії за рахунок утворення частинок діаметром більш ніж 1 000 нм. Із двох екструдерів, які використовували, найбільш придатним для гомогенізації виявився Microfluidics Microfluidiser M-110P, за допомогою якого можливо одержати гомогенну ліпосомальну емульсію без наявності частинок більше 1 мкм.

2. Відпрацьовано режим екструзії для ліпосом із складом ліпідного бішару фосфатидилхолін яєчний/холестерин 80/20 по масі. Для досягнення розмірів ліпосом 107 нм достатньо 7 циклів екструзії за 1 500 атм та проточному охолодженні до 20 °С.

### Список використаної літератури

1. Keisuke Yoshino, Koji Nakamura, Yoko Terajima et al. Comparative studies of irinotecan-loaded polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – N 1818. – P. 2901–2907.
2. Xiong Ying, Liang Li-zhi, Cao Li-ping, et al. Clinical effects of irinotecan hydrochloride in combination with cisplatin as neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical cancer // *Gynecologic Oncology.* – 2011. – V. 123, N 1, – P. 99–104.
3. Megoa M., Chovanec J., Vochyanova-Andrejalova I. et al. Prevention of irinotecan induced diarrhea by probiotics: A randomized double blind, placebo controlled pilot study // *Complementary Therapies in Medicine.* – 2015. – V. 23, N 3, – P. 356–362.
4. Bozzuto G., Molinari A. Liposomes as nanomedical devices // *Int. J. Nanomedicine.* – 2015. – N 10. – P. 975–999.
5. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2011. – N 63. – P. 131–135.
6. Fujita Ken-ichi, Kubota Yutaro, Ishida Hiroo, Sasaki Yasutsuna. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer // *World J. Gastroenterol.* – 2015. – V. 21, N 43. – P. 12234–12248.
7. West-Ward Pharmaceuticals Corp. / Irinotecan prescribing information. [Electronic resourc]. 2016. – Access mode: <https://www.drugs.com/pro/irinotecan.html>
8. Hongyan Weia, Juan Songa, Hao Lib et al. Active loading liposomal irinotecan hydrochloride: Preparation, in vitro and in vivo evaluation // *Asian J. Pharmac. Sci.* – 2013. – V. 8, N 5. – P. 303–311.
9. Ko A. H., Tempero M. A., Shan Y.-S. et al. A multinational phase 2 study of nanoliposomal irinotecan sucrosefate (PEP02, MM-398) for patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer // *Br. J. Cancer.* – 2013. – V. 109, N 4. – P. 920–925.
10. Швеєц В. И., Краснополяский Ю. М. Липосомы в фармации продукты нанобиотехнологии // *Провизор.* – 2008. – N 03. – С. 22–25.

Надійшла до редакції 7 червня 2016 року.

А. В. Стадниченко<sup>1</sup>, Ю. М. Краснополяский<sup>1</sup>, Т. Г. Ярных<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт»*

<sup>2</sup> *Национальный фармацевтический университет, г. Харьков*

ИЗУЧЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ЭКСТРУЗИИ ПРИ СОЗДАНИИ ЛИПОСОМ С ИРИНОТЕКАНОМ

**Ключевые слова:** липосомы, иринотекан, экструзия, гомогенизация методом высокого давления

#### АННОТАЦИЯ

Сегодня развитие систем доставки лекарств сфокусировано на создании препаратов с улучшенной фармакологической эффективностью и безопасностью действия для пациента. Поэтому разработка таких систем как липосомы, эмульсии и полимерные наночастицы является перспективным направлением развития современной фармации.

Цель работы – изучение оптимальных параметров экструзии при создании липосом с иринотеканом. Для проведения эксперимента использовали яичный фосфатидилхолин (Lipoid, Германия), холестерин (Sigma-Aldrich, США). Липосомы получали методом «химического градиента».

В ходе выполнения экспериментальных исследований проведено сравнение методов гомогенизации липосом с мембраной, модифицированной холестерином, – ультразвуковой обработки и гомогенизации методом экструзии при высоком давлении. Доказано, что метод обработки ультразвуком не соответствует требованиям к гомогенности эмульсии за счет образования частиц диаметром более 1 000 нм. Из двух использовавшихся экструдеров наиболее пригодным для гомогенизации определен Microfluidics Microfluidiser M-110P, с помощью которого можно получить гомогенную липосомальную эмульсию без наличия частиц более 1 000 нм.

Отработан режим экструзии для липосом с составом липидного бислоя фосфатидилхолин яичный/холестерин 80/20 по массе. Для достижения размеров липосом 107 нм достаточно 7 циклов экструзии при 1 500 атм и проточном охлажденные до 20 °С.

*A. V. Stadnichenko<sup>1</sup>, Yu. M. Krasnopolskiy<sup>1</sup>, T. G. Yarmykh<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup> National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute»*

*<sup>2</sup> National University of Pharmacy, Kharkiv*

STUDY OF OPTIMAL PARAMETERS OF EXTRUSION FOR CREATION LIPOSOME WITH IRINOTECAN

**Key words:** liposomes, irinotecan, extrusion, high pressure homogenization method

A B S T R A C T

Today, the development of drug delivery systems is focused on creating of products with improved pharmacological efficacy and safety of action for the patient. Therefore, the development of systems such as liposomes, emulsions and polymer nanoparticles is a promising direction of development of modern pharmacy.

The objective of the work: To study the optimal extrusion parameters during liposomal irinotecan creation. For the experiment: egg phosphatidylcholine (Lipoid, Germany); cholesterol (Sigma-Aldrich, USA) were using. Liposomes were obtained by «chemical gradient» method.

During the experiment, two homogenization techniques were tested. Sonication and extrusion at high pressure methods were applied to cholesterol modified lipid membranes. It is proved that the sonication method is not applicable because of the particles with diameters greater than 1 000 nm formation.

Two different extruders were used. It was determined, that Microfluidics Microfluidiser M-110P more appropriate for preparation of current liposomal emulsion. Chosen extruder can be applicable for preparation on the homogenous liposomal emulsion without the presence of particles larger than 1 000 nm.

It was tested extrusion mode for liposomes with the following composition of the lipid bilayer: egg phosphatidylcholine/cholesterol 80/20 by weight. For achieving liposomes with diameter 107 nm it is necessary 7 extrusion cycles at 1 500 bar at 20 °C.

*Електронна адреса для листування з авторами: [alstn@mail.ru](mailto:alstn@mail.ru)*