

УДК 615.4

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ, ИСПОЛЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР)

А.А. Новикова^{1*}, П. Кезимана¹, Я.М. Станишевский¹

Резюме. В статье представлен обзор по основным способам получения липосомальных лекарственных препаратов, таким как конвекционный, звуковой методы, метод высокого давления, метод растворения и удаления детергента и метод испарения с обращением фаз. Показаны проблемы технологии гидрофобных антиоксидантных средств (низкая растворимость и химическая стабильность данных лекарственных веществ) и преимущества липосом для их доставки. Установлено, что наиболее перспективной технологией получения липосом с лекарственными веществами, обладающими антиоксидантными свойствами, является метод гидратации тонкой пленки с дальнейшим озвучиванием.

Ключевые слова: липосомы, фосфолипиды, направленный транспорт, метод гидратации тонкой пленки, ультразвуковое воздействие.

METHODS OF OBTAINING LIPOSOMES, USED AS DRUG DELIVERY SYSTEMS (REVIEW)

А.А. Novikova^{1*}, P. Kezimana¹, Ya.M. Stanishevskiy¹

Abstract. The article presents an overview of the main methods for producing liposomal medications, such as convectional and acoustic methods, high pressure method, detergent dissolution and removal method and the vapor method with phase inversion. The problems of hydrophobic technology of antioxidant pharmaceuticals (low solubility and chemical stability of such drug) and the advantages of liposomes to deliver them are reported. It is established that the most promising technology of producing liposomes containing drugs with antioxidant effects is a thin film hydration method with further sonication.

Keywords: liposomes, phospholipids, directional transport, thin film hydration method, sonication.

1 – ФГАОВ ВО «Российский университет дружбы народов» (Институт биохимической технологии и нанотехнологии), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

1 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: annterskih@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних нескольких десятилетий во всем мире активно исследуются вопросы создания инновационных препаратов, которые содержат системы направленной доставки или системы направленного транспорта лекарственных веществ. Такие системы смогут позволить контролировать распределение по тканям, адсорбцию, метаболизм и выведение лекарственного препарата из организма пациента, а также улучшить биодоступность и биосовместимость препарата [1–6].

Особый интерес в области разработки систем направленного транспорта лекарств вызывают переносчики на основе фосфолипидов (липосомы). Благодаря ряду преимуществ с помощью липосом можно транспортировать очень широкий спектр препаратов – от традиционных лекарственных субстанций до генных конструкций. Многие лекарственные препараты, инкапсулируемые в липосомы, уже нашли свое применение в медицине [7–11].

Важную роль средства транспортировки препаратов играют в фармакологии новых антиоксидантных средств [12]. Антиокислительные агенты чаще всего имеют низкую растворимость, плохую химическую стабильность и в этой связи быстро разрушаются в пищеварительном тракте [13]. Решением перечисленных проблем становится применение антиоксидантных средств в липосомальной форме.

Целью настоящей работы является информационно-аналитическое исследование по некоторым способам получения липосомальных носителей и их особенностям.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ

В литературе описаны различные методы получения липосомальных частиц. Одни из наиболее популярных: конвекционный, звуковой методы, метод высокого давления, метод растворения и удаления детергента и метод испарения с обращением фаз [14–25].

Конвекционный метод (метод гидратации тонкой пленки)

По этой методике фосфолипиды растворяются в смеси органических растворителей и при использовании ротаторного испарителя откладываются в виде тонкой пленки на стенках круглодонной колбы. В качестве органических растворителей обычно используют смеси, содержащие в своем составе полярный растворитель, например метанол. При добавлении водного буфера, содержащего в избыточном объеме лекарственное вещество, в образовавшейся тонкой пленке происходит образование многослойных липидных везикул. Включение лекарственного вещества в липосомы зависит от времени гидратации высушенной пленки и от условий перемешивания реакционной массы. Отделить невключенное лекарственное вещество можно посредством центрифугирования или гель-фильтрации [14]. Установлено, что при гидратировании липидов в течение 20 ч при слабом перемешивании, в липосому включается наибольшее количество водной фазы. Чтобы сократить время гидратации до 2 ч, колбу с эмульсией необходимо интенсивно встряхивать [15].

Звуковой метод (метод озвучивания)

Целью данного метода является получение гомогенной дисперсии малых везикул, которые способны проникать в ткани организма. Многослойные везикулы, приготовленные конвекционным методом, подвергают звуковой обработке с использованием пульсирующих звуковых волн высокой частоты. В результате такой обработки в суспензии образуются однослойные везикулы диаметром 15–50 нм [16]. Недостатками этого метода являются:

- 1) денатурация или инактивация некоторых термочувствительных веществ (например, ДНК, некоторых белков и др.), включаемых в липосомы;
- 2) окисление ненасыщенных связей в цепях остатков жирных кислот фосфолипидов;
- 3) гидролиз фосфолипидов с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот [17];
- 4) неустойчивость везикул и их склонность к слипанию и, таким образом, укрупнению.

Метод высокого давления (экструзии)

В работе [15] многослойные везикулы, приготовленные конвекционным методом, под высоким давлением пропускали через поликарбонатные мембраны с широким диапазоном диаметров пор. Однако при экструзии используются фильтры из других материалов, совместимых с лекарственным веществом. Таким образом, размер везикул можно варьировать, подбирая фильтры с желаемым диаметром пор. Преимуществом экструзионного метода является получение липосом с гомогенным распределением по размеру. Так-

же, в результате продавливания многослойных липосом сквозь малые поры снимаются последовательные слои липидных мембран, что приводит к образованию однослойных везикул. Метод экструзии применим для получения стабильных липосом с различным липидным составом [18, 19]. Наиболее часто используемое давление в данном методе – 5 МПа, но при низкой концентрации липидов также возможна и экструзия при низких давлениях (≈ 1 МПа) [20]. С помощью экструзионного метода можно получить только небольшие количества липосом. Для обеспечения наиболее высокого выхода продукта был предложен метод непрерывной экструзии под высоким давлением до 10,5 МПа [21].

Метод растворения и удаления детергента

В данном методе в качестве растворителя для липидов используется детергент (неионный, анионный или катионный сурфактант). Метод растворения и удаления детергента позволяет получить большие однослойные везикулы [22]. Детергент должен иметь высокую критическую концентрацию мицеллообразования, для того чтобы его можно было легко удалить диализом или колоночной хроматографией. Растворение липидов осуществляется в водном растворе детергента и белков, подлежащих инкапсуляции [23]. Образование одномембранных везикул диаметром 80–200 нм происходит при удалении детергента из смеси. Данный метод наиболее применим для инкапсуляции белков биомедицинского назначения [24].

Метод испарения с обращением фаз

По данной методике водный раствор лекарственного вещества быстро вводится в органический раствор липидов. Одновременно смесь подвергают звуковой обработке, что приводит к образованию эмульсии – капель воды в органическом растворителе [25]. Далее полученную эмульсию высушивают до полутвердого геля с использованием ротаторного испарителя. После гель подвергается сильному механическому воздействию до получения фазового изменения из дисперсии «вода в масле» в «масло в воде» (т.е. водную суспензию везикул). В ходе механического воздействия некоторые капли воды образуют внешнюю фазу, в то время как другие – замкнутый внутри везикул водный объем. При использовании этого метода становится возможным получение однослойных везикул диаметром от 0,1 до 1 мкм для инкапсуляции как малых, так и больших молекул (РНК и различные ферменты, без потери активности) [17, 25]. По сравнению с везикулами, полученными методом гидратации тонкой пленки с последующей звуковой обработкой, липосомы, полученные методом испарения с обращением фаз, имеют больший объем захватываемой водной среды и большую эффективность инкапсуляции гидрофильных лекарств [26]. В некоторых случаях метод может иметь следующие ограничения в использовании:

- 1) долгая выдержка материала, подлежащего инкапсуляции, в органических растворителях не всегда возможна;
- 2) механическая обработка может привести к денатурации некоторых белков или разрыву цепей ДНК [17].

Ряд сложностей при получении липосомальных лекарственных форм представляет включение в них гидрофильных веществ. Однако многие антиоксиданты, которые в настоящее время имеют перспективы разработки липосомальных препаратов, являются гидрофильными.

Наиболее часто применяемым методом для включения антиоксидантов в липосомальную оболочку является метод гидратации тонкой пленки. В результате образуются многослойные везикулы, после чего происходит получение мелких однослойных везикул посредством звуковой обработки или пропусканием суспензии через фильтры экструдера. В таблице 1 приведены примеры получения липосомальных препаратов с антиоксидантной активностью методом гидратации тонкой липидной пленки и методом озвучивания (ультразвуковой обработки).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди способов получения липосом наиболее часто в литературе упоминаются конвекционный, звуковой методы, метод высокого давления, метод растворения и удаления детергента и метод испарения с обращением фаз. Каждый из этих способов имеет свои особенности. Так, методом озвучивания можно получить из крупных липосом, полученных конвекционным методом, однослойные везикулы диаметром 15–50 нм. При этом следует отметить, что метод озвучивания не подходит для некоторых термочувствительных веществ (например, ДНК, некоторых белков и др.), включаемых в липосомы, а также может приводить к окислению и гидролизу фосфолипидов.

Методом высокого давления возможно получить однослойные везикулы, но лишь в небольшом количестве. Для получения большого количества однослойных липосом больше подходит способ растворения и удаления детергента.

Использование метода испарения и обращения фаз рационально, когда требуется получить большие однослойные везикулы.

По сравнению с везикулами, полученными методом гидратации тонкой пленки с последующей звуковой обработкой, липосомы, полученные методом испарения с обращением фаз, имеют больший объем захватываемой водной среды и большую эффективность инкапсуляции гидрофильных лекарств. Однако метод испарения с обращением фаз также не лишен недостатков. Среди них – возможность денатурации некоторых белков или разрыв цепей ДНК материала, подлежащего инкапсуляции, в процессе механической обработки.

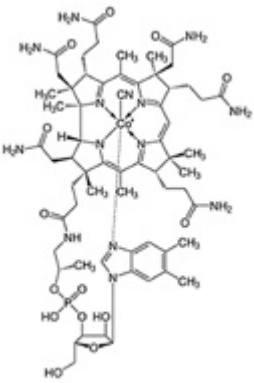
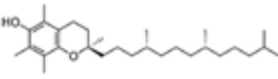
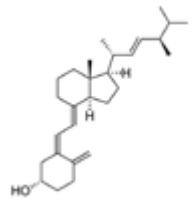
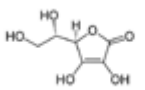
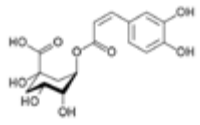
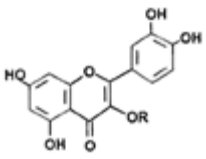
Наиболее перспективной технологией получения липосом с лекарственными веществами, обладающими антиоксидантными свойствами, является метод гидратации тонкой пленки с дальнейшим озвучиванием.

ЛИТЕРАТУРА

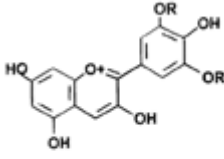
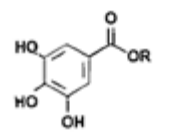
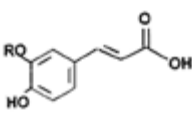
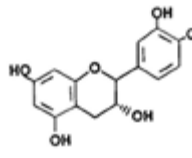
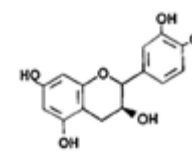
1. T. Stozek. The Effect of Entrapment of Procaine Hydrochloride in Liposomes on Local Anesthetic Action // *Pharmazie*. 1989. V. 44(7). P. 466–468.
2. B. Haley, E. Frenkel. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2008. V. 26. P. 57–64.
3. Y. Barenholz. Liposome application: problems and prospects // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2001. 6. P. 66–77.
4. M.K. Basu. Liposomal delivery of antileishmanial agents // *Journal of Applied Research*. 2005. V. 5(1). P. 221–236.
5. J.K. Vasir, M.K. Reddy, V.D. Labhasetwar. Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges // *Current Nanoscience*. 2005. V. 1(1). P. 47–64.
6. Н.Б. Демина. Биофармация – путь к созданию инновационных лекарственных средств // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2013. № 5.
7. C.G. Thanos, D.F. Emerich. Choroid Plexus Epithelial Cell Transplants for Repair of the Brain // *Cellular Transplantation*. 2007. P. 399–416.
8. U.K. Nassander, G. Storm, P.A.M. Peeters, D.J.A. Crommelin. *Liposomes // Biodegradable polymers as drug delivery systems* / Ed. by M. Chasin, R. Langer. – New York: Marcel Dekker, 1990. P. 261–338.
9. G. Storm, S.O. Belliot, T. Daemen, D.D. Lasic. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995. V. 17. P. 31–48.
10. A.S. Ulrich. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles // *Bioscience Reports*. 2002. V. 22(2). P. 129–150.
11. R. Tong, Y. Boucher, S. Kozin. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 3731–3736.
12. D.B. Fenske, P.R. Cullis. Liposomal nanomedicines // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2008. V. 5(1). P. 25–44.
13. Р.А. Мухамадияров, А.В. Веремеев, Н.Е. Марцияш, В.Г. Зинчук. Влияние α -токоферола на динамику процессов липопероксидации в липосомах, полученных методами ультразвуковой сонофикации и экструзии, при различных температурах хранения // *Фундаментальные исследования* 2012. № 6. С. 566–570.
14. A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids // *J. Mol. Biol.* 1965. V. 13. P. 238–252.
15. F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail, D. Papahadjopoulos. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes // *Biochim Biophys Acta*. 1976. V. 557. P. 9–23.
16. S.M. Johnson, A.D. Bangham, M.W. Hill, E.D. Korn. Single bilayer liposomes // *Biochim Biophys Acta*. 1971. V. 233. P. 820–826.
17. M.U. Uhumwangho, R.S. Okor. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review // *JMBR: A Peer-review Journal of Biomedical Sciences*. 2005. V. 4. № 1. P. 9–21.
18. R. Nayar, M.J. Hope, P.R. Cullis. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholine by extrusion techniques // *Biochim Biophys Acta*. 1989. V. 986. P. 200–206.
19. M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterisation of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential // *Biochim Biophys Acta*. 1985. V. 812. P. 55–65.
20. S. Amselem, A. Gabizon, Y. Barenholz. A large-scale method for the preparation of sterile and non pyrogenic liposomal formulations of defined size distributions for clinical use // *Liposome Technology*. 2nd Edition / Ed. by G. Gregoriadis. – Boca Raton: CRC Press, 1993. P. 501–525.

Таблица 1.

Способы получения липосомальных препаратов с антиоксидантами [27–30]

Антиоксидант	Состав липидной оболочки	Метод	Раств-ли	Буфер	Размер липосом	Ист.
Цианокобаламин (Витамин B ₁₂) 	L-α-фосфатидилхолин (ФХ) Холестерин (ХОЛ) L-α-фосфатидил-DL-глицерин натриевая соль (ФГ) (10:8:1)	Метод гидратации тонкой пленки (мультиламеллярные везикулы, МЛВ) с дальнейшим озвучиванием (малые моноламеллярные везикулы, ММВ)	CHCl ₃ / CH ₃ OH (2:1)	Буферный раствор фосфата pH 7,4	МЛВ 5770±1230 нм ММВ 51±28 нм	27
α-Токоферол (Витамин E) 	L-α-фосфатидилхолин (ФХ) Холестерин (ХОЛ) (20:1)	Метод гидратации тонкой пленки (МЛВ) с дальнейшим озвучиванием (ММВ)	CHCl ₃ / CH ₃ OH (2:1)	Буферный раствор фосфата pH 7,4	МЛВ 3890±1720 нм ММВ 40±9 нм	27
Эргокальциферол (Витамин D ₂) 	L-α-фосфатидилхолин (ФХ) Холестерин (ХОЛ) (20:1)	Метод гидратации тонкой пленки (МЛВ) с дальнейшим озвучиванием (ММВ)	CHCl ₃ / CH ₃ OH (2:1)	Буферный раствор фосфата pH 7,4	МЛВ 2960 1970 нм ММВ 48±37 нм	27
L-аскорбиновая кислота (Витамин C) 	L-α-фосфатидилхолин (ФХ) Холестерин (ХОЛ) (20:80, 40:60, 60:40 и 80:20) Хитозан	Метод озвучивания	C ₂ H ₅ OH	Буферный раствор фосфата pH 7,4	ММВ 80 нм	28
3-кофеилхинная кислота (Хлорогеновая кислота) 	Соевый лецитин Холестерин (ХОЛ) (5:1)	Метод гидратации тонкой пленки (большие моноламеллярные везикулы (БМВ))	CH ₂ Cl ₂ / C ₂ H ₅ OH	–	БМВ 132,15±3,03 нм	29
Кверцетин, рутин  R = H Quercetin R = Rutinose Rutin	Соевый лецитин (L-α-фосфатидилхолин 80%)	Метод озвучивания	C ₂ H ₅ OH/ Янтарная кислота	Янтарно кислый буфер pH 4,7 (без или с 0,16% альбумином бычьей сыворотки)	ММВ 30–100 нм	30

Окончание табл. 1

Антиоксидант	Состав липидной оболочки	Метод	Раств-ли	Буфер	Размер липосом	Ист.
Мальдивин, Дельфинин  R = H Delphinidin R = Me Malvidin	Соевый лецитин (L-α-фосфатидилхолин 80%)	Метод озвучивания	C ₂ H ₅ OH	Янтарно кислый буфер pH 4,7 (без или с 0.16% альбумином бы- чей сыворотки)	MMB 30–100 нм	30
Кислоты Катехины  R = H Gallic acid R = C ₃ H ₇ Propyl gallate  R = H Caffeic acid R = Me Ferulic acid  (+)-Epicatechin  (+)-Catechin	Соевый лецитин (L-α-фосфатидилхолин 80%)	Метод озвучивания	Феноль- ные смолы	Янтарно кислый буфер pH 4,7 (без или с 0,16% альбумином бы- чей сыворотки)	MMB 30–100 нм	30

21. T. Schneider, A. Sacfse, G. Robling, M. Brandl. Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method // *Int J Pharm.* 1995. V. 119. P. 1–12.
22. J. Brunner, P. Skrabai, H. Hauser. Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physicochemical properties // *BiochimBiophys Acta.* 1976. V. 455. P. 322–331.
23. N. Weiner, F. Martin, M. Riox. Liposomes as drug delivery system // *Drug Dev Ind Pharm.* 1989. V. 15. № 10. P. 1523–1554.
24. F. Frezard. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines // *Braz J Biol Res.* 1999. V. 32. № 2. P. 181–189.
25. F. Szoka, D. Papahadjopoulos. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase // *Proceeding to the National Academy of Sciences.* 1978. V. 75. P. 4194–4198.
26. B. Tiwari Sandip, N. Udupa, B.S.S. Rao, P. Uma Devi. Thermosensitive liposomes and localised hyperthermia – an effective bimodality approach for tumour management // *Indian Journal of Pharmacology.* 2000. V. 32. P. 214–220.
27. S. Bochicchio, A.A. Barba, G. Grassi, G. Lamberti. Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation // *LWT – Food Science and Technology.* 2016. V. 69. P. 9–16.
28. N. Liu, H.J. Park. Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2010. V. 76. P. 16–19.
29. Y. Feng, C. Sun, Y. Yangyang, et al. Enhanced oral bioavailability and *in vivo* antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation // *International Journal of Pharmaceutics.* 2015.
30. M. Heinonen, D. Rein, T.M. Satue-Gracia, J. S.-W. Huang, B. German, E.N. Frankel. Effect of Protein on the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in a Lecithin-Liposome Oxidation System // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46. P. 917–922.