

МИЦЕЛЛЯРНЫЕ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОФОБИЗИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Ю.В. Ермоленко, М.М. Антонова, К.В. Малкова, И.Н. Соловьева, С.Э. Гельперина

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение

Амфифильные полимеры в настоящее время широко используются в фармацевтике для повышения растворимости лекарственных веществ (ЛВ), а также для разработки на их основе систем адресной доставки лекарств [1, 2]. Гидрофобизированная гиалуроновая кислота (ГК) имеет амфифильную природу и способна образовывать мицеллярные структуры [3–5]. Растворимость в воде, вязкоупругость, неиммуногенность, биосовместимость, способность к биологическому разложению и легкость химической модификации являются ключевыми факторами для рассмотрения этого полимера в качестве носителя лекарственного вещества при разработке лекарственных форм. Кроме того, за счет способности распознавать специфические рецепторы, сверхэкспрессируемые на поверхности опухолевых клеток (например, CD44), ГК может нацеливать противоопухолевые препараты на клетки-мишени [2]. В представляемом исследовании мы изучали возможность загрузки в мицеллы, образуемые ГК, гидрофобизированной олеиновой кислотой (ГК-С18), противораковых лекарственных молекул (этопозид и паклитаксел) и изучали физико-химические свойства полученных мицеллярных структур.

Материалы и методы

В работе использовали гиалуроновую кислоту (ГК-С18) (олеилгиалуронат натрия, Delcore, производства Contipro a.s.), степень замещения 5–15 %, молекулярная масса 5–15 кДа. Все органические растворители и соли соответствовали чистоте «для ВЭЖХ» или «хч», использовали деионизованную воду. Фармацевтические субстанции: этопозид (ЕТО), QILI ANTIBIOTICS, Linyi, Китай и паклитаксел (РТХ), Shanghai Jinhe Bio-Technology Co, Китай.

Получение мицеллярных форм лекарственных веществ. В зависимости от используемого ЛВ, применяли различные методы получения мицеллярных форм:

Метод упаривания растворителя (для ЕТО): В водный 1-%-ный раствор ГК-С18, объемом 10 мл по каплям вносили раствор ЕТО (10 мг его растворяли в минимальном количестве этилового спирта) и интенсивно перемешивали на магнитной мешалке в течение суток. Полученный раствор подвергли ультразвуковой обработке на ледяной бане, 70 Вт, в течение 5 минут. Растворитель упаривали на ротационном испарителе до образования тонкой пленки, которую затем растворяли в 8 мл дистиллированной воды. Невключенный ЕТО фильтровали через стекловолоконный фильтр (1 мкм), раствор разлили по флаконам по 1 мл, фильтрат лиофилизировали.

Метод диализный (для РТХ): В водные растворы ГК-С18 (0,4 % или 0,8 %) по каплям вносили растворы РТХ в ДМСО (20 мг паклитаксела в 2 мл ДМСО). Полученные смеси подвергли ультразвуковой обработке при 70 Вт на ледяной бане в течение 30 минут. Диализную очистку мицелл от ДМСО и невключенного РТХ проводили в дистиллированной воде, общее время диализа 20 часов (смена среды два раза: через 2 часа через 18 часов). Далее растворы отфильтровали через стекловолоконный фильтр (1 мкм), разливали по флаконам и лиофилизировали.

Характеристика полученных мицеллярных форм ЛВ. Гидродинамический диаметр (далее, размер) и дзетта-потенциал (далее, заряд) поверхности полученных мицелл определяли с использованием наносайзера (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Великобритания), для чего применяли методы динамического лазерного светорассеивания (ДЛСР) и микроэлектрофореза, соответственно. Морфологию мицелл оценивали методом просвечивающей электронной спектроскопии (ПЭМ) (электронный микроскоп JEOL JEM-1400, JEOL, Ltd, Япония, ускоряющее напряжение 120 кВ).

Исследование стабильности при разбавлении мицеллярных форм ГК-С18:ЕТО в клеточной среде RPMI. Растворы мицеллярных форм ГК-С18:ЕТО разбавляли в 2, 10, 50, 100, 200, 400 и 800 раз раствором клеточной среды RPMI. Сразу после разбавления 1 мл раствора помещали в кювету и проводили измерения методом ДЛСР.

Исследование стабильности мицеллярных форм во времени. Навеску лиофилизата мицелл (около 5 мг) растворяли в 5 мл 0,9 % раствора NaCl или в DMEM и перемешивали 10 минут до полного растворения. Полученные растворы делили на две равные порции: первую порцию оставляли при комнатной температуре, вторую порцию перемещали в шейкер-инкубатор (37 °C, 200 rpm). Во всех случаях размеры мицелл оценивали в точках 0, 1, 2, 4 и 24 часа.

Определение критической концентрации мицеллообразования (ККМ) ГК-C18-ЕТО методом ДЛСР. Готовили 7 растворов ГК-C18-ЕТО с убывающей концентрацией 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001; 0,0005 мг/мл. Из полученных растворов отбирали пробы объемом 1 мл и измеряли CountRate (скорость счёта) (ZetasizerNano ZS) в режиме обратного рассеяния с максимальной аттенуацией. Строили график в координатах зависимости CountRate от концентрации. По пересечению линейных участков графика определяли ККМ.

Определение загрузки мицелл ЛВ. Для количественной оценки загрузки ЛВ в мицеллы использовали метод ВЭЖХ. Эффективность загрузки рассчитывали по формуле:

$$\text{ЭЗ} = \frac{\text{кол- во загруженного ЛВ}}{\text{исходное кол- во ЛВ}} * 100$$

Результаты

Используемые при получении мицелл загрузочные соотношения и характеристики полученных мицеллярных структур приведены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики мицеллярных форм ЛВ

Загрузочное соотношение ЛВ/ГК-C18	Метод получения мицеллярных форм	ЭЗ, %	Средний размер частиц, нм	PDI	ZP, мВ
ГК-C18-ЕТО					
1/20	Упаривание растворителя	74,14 %	386,0± 66,7	0,36± 0,07	-46,4 ± 0,99
ГК-C18-PTX					
1/20	Диализ	34,73 %	426,8± 53,7	0,45 ±0,02	-59,3 ± 0,1
1/40	Диализ	59,88 %	434,0± 13,4	0,33 ±0,06	-45,8 ± 2,47

На рисунке 1 приведены изображения структур, полученные методом ПЭМ.

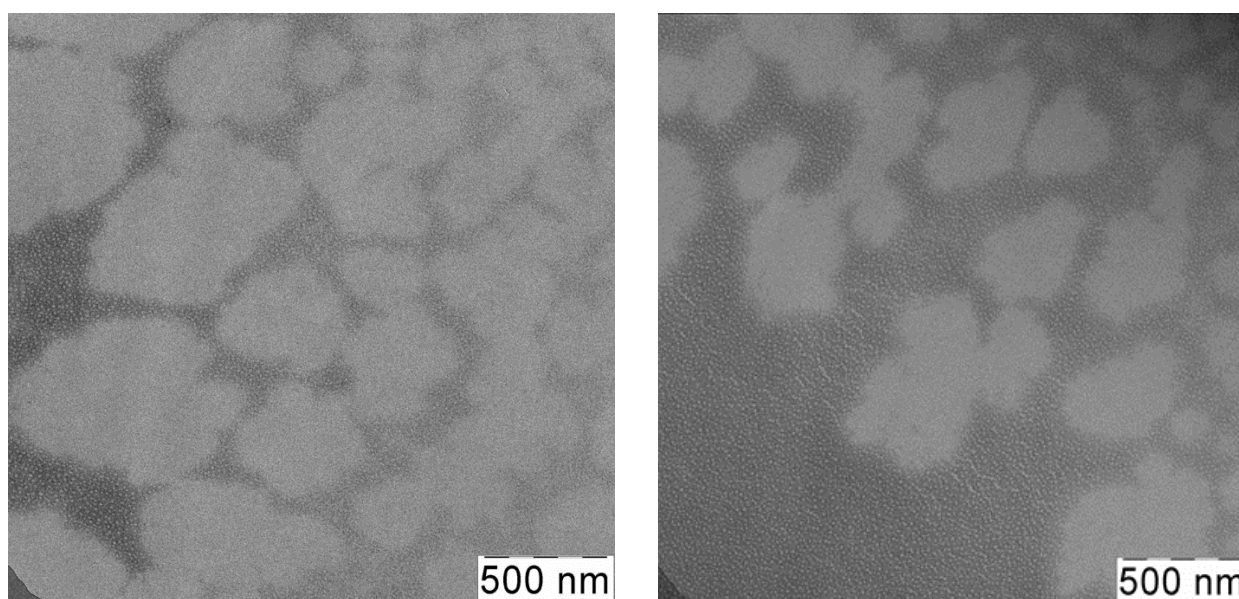


Рис. 1 ПЭМ-изображения мицелл ГК-C18-ЕТО

ККМ ГК-С18-ЕТО составила 0,04 мг/мл, способ ее расчета приведен на рисунке 2.

Оценивали стабильность мицелл ГК-С18-ЕТО, в течение 24 часов. Для этого методом ДЛСР следили за изменением во времени размеров мицелл. Для разбавления использовали различные среды: 0,9 % раствора NaCl и DMEM. Во всех случаях размеры мицелл изменялись не существенно. Для примера в таблице 2 приведены результаты, полученные для мицелл ГК-С18-ЕТО в среде DMEM.

Таблица 2. Изменение размеров мицеллярных структур ГК-С18-ЕТО во времени

Время	Комнатная температура		Шейкер-инкубатор (37° C)	
	Размер, нм	PDI	Размер, нм	PDI
0	330,7	0,354	330,7	0,354
1	358,5	0,348	258,7	0,588
2	330,6	0,357	241,5	0,396
4	316,6	0,330	221,2	0,237
24	355,4	0,359	226,4	0,396

ККМ ГК-С18-ЕТО составила 0,04 мг/мл (рисунок 2).

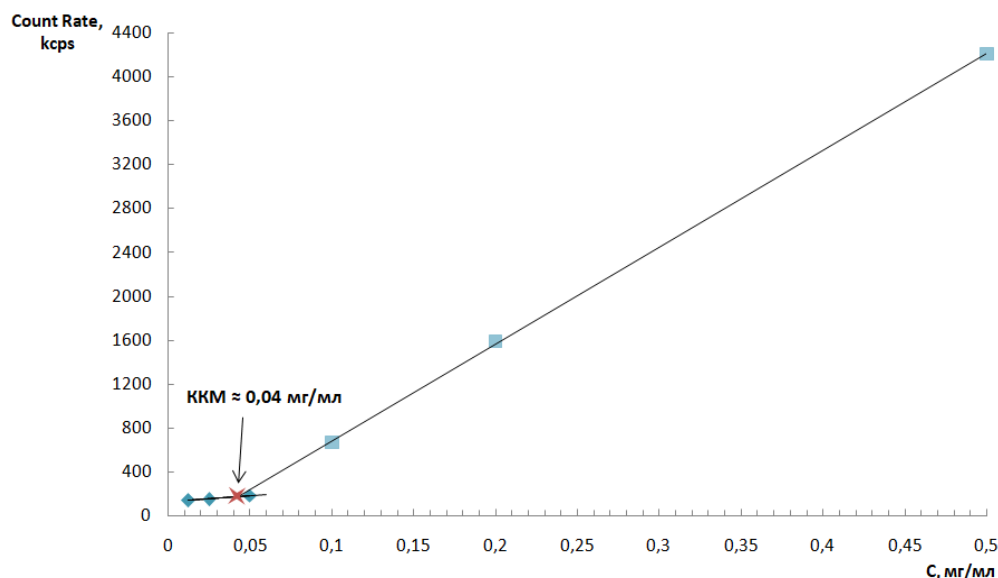


Рис. 2 Определение ККМ ГК-С18-ЕТО

Дискуссия

Структура используемой в работе ГК-С18 приведена на рис. 3:

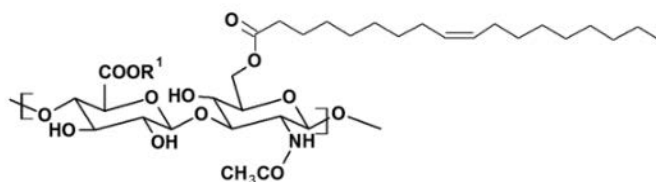


Рис. 3. Структурная формула ГК, модифицированной олеиновой кислотой; R = H⁺, Na⁺; M = 5–20 кДа

В литературе описано использование ГК-С18 для получения мицеллярных структур РТХ и показана их высокая загрузка РТХ (70 %) и высокая цитотоксичность *in vitro* к нормальным фибробластам кожи человека (NHDF) и клеткам карциномы толстой кишки человека (HCT-116) [5]. Однако, в этих работах нет достаточной информации о строении и свойствах этих структур. Поэтому представляет интерес установление возможности загрузки таких мицелл другими лекарственными веществами и изучение их физико-химических свойств, так как подобные структуры могут использоваться для адресной доставки лекарств. Помимо размера и заряда поверхности представляют интерес мицеллярные свойства (ККМ) структур, их морфология и информация об устойчивости мицелл при разбавлении и во времени.

Установленные нами характеристики мицелл ГК-С18, нагруженных ЕТО и РТХ (таблица 1) позволяют сделать вывод, что мицеллы имеют достаточно большие размеры (от 390 нм) и широкий индекс полидисперсности (PDI от 0,25), что объясняется их способностью собираться в ассоциаты. Этот вывод подтверждают представленные на рис. 1 ПЭМ-изображения, которые показывают большой разброс по размерам и неоднородность форм. На некоторых изображениях отчетливо видна организация единичных круглых структур в единый ансамбль (ассоциат) неопределенной формы. Наибольшую загрузку ЛВ удалось достичь для ЕТО: ЭЗ = 74,14 %. Дзета-потенциал полученных мицеллярных форм отрицательный, что объясняется наличием карбоксильных групп. Мицеллы показывают устойчивость при разбавлении и их ассоциаты сохраняют свои размеры в течение 24 часов. Полученное для ГК-С18-ЕТО значение ККМ (0,04 мкг/мл) говорит о средней устойчивости мицелл при разбавлении, следовательно, для использования таких структур при конструировании систем доставки ЛВ следует предпринимать меры для повышения их устойчивости.

Заключение

Методами упаривания растворителя и диализа, получены образцы мицеллярных форм из гидрофобизированной гиалуроновой кислоты, нагруженных противоопухолевыми лекарствами: паклитаксел и этопозид. Наибольшую загрузку удалось достичь для этопозид (ЕТО): ЭЗ = 74,14 %. Полученные мицеллы характеризуются полидисперсностью (индекс полидисперсности PDI не менее 0,25). Средние размеры мицеллярных структур, нагруженных ЕТО и РТХ составили ~390 нм и ~430 нм, соответственно. Просвечивающая электронная микроскопия показала, что мицеллярные структуры собираются в устойчивые при разбавлении ассоциаты, чем следует объяснять большую полидисперсность образцов. Размеры ассоциатов мицелл сохраняют устойчивость во времени.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-025-00381/20.

Литература

1. M.L. Adams, A. Lavasanifar, G.S. Kwon, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 92, 7, 1343–1355,
2. A. Passi, D. Vigetti, Hyaluronan as tunable drug delivery system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019, 13,
3. D. Smejkalová, T. Muthny, K. Nesporová, M. Hermannová, E. Achbergerova, G. Huerta-Angeles, M. Svoboda, M. Cepa, V. Machalová, D. Luptáková, V. Velebny, Hyaluronan polymeric micelles for topical drugdelivery, *Carbohydrate Polymers*, 2017. 156, 86–96,
4. L. Mayol, M. Biondi L. Russo, B.M. Mall, Kh. Schwach-Abdellaoui, Assunta Borzacchiello, Amphiphilic hyaluronic acid derivatives toward the design of micelles for the sustained delivery of hydrophobic drugs, *Carbohydrate Polymers*, 2014, 102, 110–116,
5. D. Šmejkalová, K. Nešporová, M. Hermannová, G. Huerta-Angeles, D. Cožíková, L. Vištejnová, B. Šafránková, Paclitaxel isomerisation in polymeric micelles based on hydrophobized hyaluronic acid, *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 466, 2014, 147–145.