

УДК 615.451.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-190-191

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО КООРДИНАЦИОННОГО СОЕДИНЕНИЯ МЕДИ

Якимова Т.М., Власова К.Ю., Красновская О.О., Клячко Н.Л.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1
 e-mail: yakimova_t31@inbox.ru

Для инкапсуляции в липосомы лекарственного препарата для лечения трижды негативного рака молочной железы, представляющего собой координационное соединение меди, была разработана методика загрузки. Полученная липосомальная суспензия стабильна в течение двух недель, загрузка комплекса подтверждается спектрофотометрически и количественно оценивается с помощью ВЭЖХ.

Ключевые слова: липосомы, координационное соединение меди, тройной негативный рак молочной железы, доставка лекарств

Медатион – это противоопухолевый препарат, представляющий собой координационное соединение меди на основе 2-алкилтиоимидазола. По результатам доклинических испытаний препарат рекомендован для лечения трижды негативных опухолей молочной железы. Однако существенным ограничением применения комплекса на практике является его гидрофобность и, как следствие, низкий уровень биодоступности. Одним из способов улучшения параметров растворимости и биодоступности гидрофобных активных молекул является их включение в “наноконтейнеры” для доставки лекарств. Наиболее изученной и используемой системой для доставки биологически активных веществ являются липосомы. Гидрофобность медного комплекса не позволяет использовать для его загрузки в липосомы привычные для гидрофильных веществ способы, потому цель данной работы – поиск оптимального метода инкапсуляции координационного соединения меди в липосомы.

В литературе описана технология Метаплекс, позволяющая осуществлять синтез органических комплексов с медью внутри липосом. Основная идея подхода заключается в формировании комплекса в гидрофильной области липосом: порошок органического лиганда добавляется к предварительно приготовленной суспензии липосом с медной солью внутри, затем лиганд проникает через липидный бислой и начинается процесс комплексообразования. Технология имеет достаточно подробное описание в литературе, потому её воспроизведение было определено приоритетной задачей.

Для воспроизведения технологии были приготовлены липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC), холестерина (Chol) и ПЭГ-дистеароилфосфоэтаноламина (DSPE-PEG(2000)) состава DPPC:Chol:DSPE-PEG(2000) 55:40:5. Липосомы получали методом гидратации липидной пленки раствором хлорида меди, затем полученную суспензию экструдировали до получения частиц размером 110 нм. Эффективность загрузки составила 0,1 для меди и 0,05 для лиганда (мольное отношение меди и лиганда к липидам). Однако нами были выявлены существенные недостатки технологии, такие как большие потери лиганда и меди в процессе загрузки и сложность очистки итоговой суспензии от незагрузившихся веществ. Мы оптимизировали технологию Метаплекс для дополнительной очистки суспензии, тем не менее, использование технологии для инкапсуляции Медатиона остается неоптимальным.

Нам удалось успешно применить для загрузки комплекса альтернативную методику, основанную на методе этанольной инъекции. Методика реализуется путем приготовления растворов лиганда в ацетонитриле и липидов в метаноле, затем их совместной инъекции при быстром перемешивании в 300 мМ раствор CuCl_2 , нагретый до 75°C. Из полученной однофазной системы органические растворители отгонялись при температуре 45°C, при этом в водном растворе происходило формирование липосом с комплексом внутри, затем суспензию экструдировали и очищали от незагрузившейся меди. Данный подход позволил нам получить суспензию, стабильную до двух недель, а также существенно уменьшить расход лиганда в процессе получения образца. Присутствие комплекса в липосомах можно определить с помощью спектра поглощения, количественное определение лиганда можно осуществить с помощью ВЭЖХ. Предполагается, что данная методика является более подходящей для загрузки Медатиона, чем технология Метаплекс, поскольку она позволяет существенно увеличить стабильность суспензии, что принципиально важно для применения данной системы при внутривенном введении.

Эта работа частично поддержана грантами РФФИ 17-54-33027, 18-29-09154 и РНФ 19-74-10059, темой Гос. Регистрации АААА-А16-116052010081-5, Программой развития МГУ

UDC 615.451.2 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-190-191

ENCAPSULATION OF ANTITUMOR COPPER COMPLEX INTO LIPOSOMES

Yakimova T.M., Vlasova K. Yu., Krasnovskaya O.O., Klyachko N.L.

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie Gory, GSP-1
e-mail: yakimova_t31@inbox.ru*

To encapsulate a new copper coordination compound drug for triple-negative breast cancer treatment we have developed a new approach. The obtained liposomal suspension is stable up to 2 weeks; successful complex loading is confirmed spectrophotometrically and can be quantified by HPLC.

Key words: liposomes, copper coordination compound, triple-negative breast cancer, drug delivery

Medation is an antitumor drug classified as a copper complex compound of organic ligands containing 2-alkylthioimidazol. According to the results of pre-clinical trials, the drug is recommended for Triple-Negative Breast Cancer treatment. Nevertheless, a significant limitation for in vivo use of this complex is its hydrophobic properties and, as a result, a low level of bioavailability. One of the ways to increase bioavailability of hydrophobic substances is their encapsulation into drug delivery systems. Liposomes are the most studied and well-described systems for biological substances delivery. Hydrophobic properties of our coordination compound do not allow us to use typical ways of encapsulation. Thus, the main aim of our work is to investigate for an optimal method for encapsulation of copper coordination compound into liposomes.

Previous studies have reported the technology called Metaplex, which allows to provide metal complex synthesis inside liposomes. The key idea of this approach is to form the complex inside a hydrophilic volume of a liposome, the ligand powder is added to the previously prepared liposome suspension loaded with copper salt and then the process of loading of an organic ligand through the bilayer and complex formation start. Due to the detailed technology description, we have identified its' reproducibility as a priority.

For Metaplex approach reproducibility liposomes were prepared from dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol (Chol) and PEG-distearoylphosphoethanolamine (DSPE-PEG(2000)) in the ratio DPPC:Cholesterol:DSPE-PEG (2000) 55:40:5. Liposomes were prepared by thin film rehydration with 300 mM CuCl_2 solution and then were extruded through polycarbonate membrane until the final particle size of 110 nm. The loading efficiency for copper was 0.1 (molar ratio of copper to lipids) and 0.05 for ligand (molar ratio of ligand to lipids). However, significant Metaplex approach disadvantages were identified, such as a large loss of copper and ligand during encapsulation, which is accompanied by a complicated purification process of the final suspension. We have optimized Metaplex technology for an effective purification; nevertheless, Metaplex application for Medation encapsulation remains not optimal.

We have succeeded in applying an alternative technique based on ethanol injection method for complex encapsulation. This technique involves preparation of solutions of the ligand in acetonitrile and lipids in methanol, then their mixing and injection into 300 mM CuCl_2 solution heated up to 75°C with vigorous stirring. From the resulting single-phase system organic solvents were distilled at a temperature of 45°C to form liposomes containing the complex inside, then the suspension was extruded and purified from unencapsulated copper. This approach allowed us to obtain a suspension, which was stable up to 2 weeks, and to reduce the ligand consumption significantly. The presence of complex in liposomes has been proven by absorption spectra, quantitative analysis of ligand can be performed by HPLC. We consider this new technique to be more promising for Medation encapsulation than Metaplex approach as it has already shown an increase of stability time, which is of great importance for intravenous injections.

This work was supported by RFBR grants 17-54-33027, 18-29-09154 and RSF 19-74-10059, State Topic AAA-A-16-116052010081-5, MSU Program of Development