

УДК 615.071: 615.456.1: 616-006.04

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ИРИНОТЕКАНА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ АКТИВНОЙ ЗАГРУЗКИ ЛИПОСОМ

© А. В. Стадниченко, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец, Т. Г. Ярных

Рассмотрены механизмы активной инкапсуляции иринотекана в липосомы по технологиям «градиента pH» и технологии «градиента аммония».

Цель работы: используя данные о механизме конверсии иринотекана, была поставлена цель провести исследование его стабильности при значениях pH, характерных для каждой из технологий «химического градиента», оценить соответствие содержания примесей проекту методик контроля качества по пункту "Сопутствующие примеси".

Методы: исследование проводилось методом ВЭЖХ по методике контроля примесей из USP для полусинтетического продукта, на приборе LC-20 фирмы Shimadzu.

Результаты: было проведено исследования динамики образования примеси, соответствующей продукту деструкции лактонного кольца E иринотекана в 3 этапа: при значениях pH: 1,9; 5,0; 5,5. При pH 1,9 образования примесей не происходит, иринотекан стабилен в период наблюдения – 12 часов. При pH 5,0 иринотекан стабилен в течении 12 часов, при этом не образуются примеси, количество которых выходит за рамки спецификации на готовый продукт. При pH 5,5, которое характерно для технологии «градиента аммония» уже через час эксперимента образуются примеси, более чем в 3 раза превышает допустимые нормы по содержанию примесей в готовой лекарственной форме липосомального иринотекана.

Выводы: установлено, что с точки зрения стабильности активного вещества, технология «градиента pH» является предпочтительной в сравнении с технологией «градиента аммония». При использовании технологи "градиента pH" показатель "Сопутствующие примеси" соответствует проекту методик контроля качества. Полученные данные использованы при создании липосомальной формы иринотекана для проведения доклинических и клинических испытаний

Ключевые слова: липосомы, иринотекан, образование примесей, технология «градиента pH», технология «градиента аммония», ВЭЖХ

Irinotecan active encapsulation mechanisms into liposomes according "pH gradient" and "ammonium gradient" technologies were considered.

Aim. Research of Irinotecan stability at typical for each "chemical gradient" technology pH values, and estimation of the impurities content correspondence with Draft quality control methods on "Related impurities" index, using Irinotecan conversion mechanism data.

Methods. HPLC method was used for research, using Shimadzu LC-20 appliance, according to the USP impurities control method for semisynthetic product.

Results. Impurity formation dynamics, similar to Irinotecane E lactone ring destruction product, was studied in 3 stages: at pH values 1.9, 5.0, and 5.5. Impurities formation wasn't observed at pH 1.9, and Irinotecan was stable during observation period – within 12 hours. At pH 5.0, Irinotecan was stable during 12 hours, while impurities formation in quantity over specifications for the finished product was not observed. At pH 5.5, which is specific for the "ammonium gradient" technology, impurities formation was observed in one hour, which is more than 3 times exceeds permissible norms for impurities content in Liposomal Irinotecan finished dosage form.

Conclusion. It has been found, that in terms of active compound stability, "pH gradient" technology is preferred compared to the "ammonium gradient" technology. After using "pH gradient" technology, "Related impurities" index corresponded to the Draft quality control methods. The obtained data were used for Irinotecan liposomal dosage form development for the further preclinical and clinical study

Keywords: liposomes, Irinotecan, impurities formation, "pH gradient" technology, "ammonium gradient" technology, HPLC

1. Введение

В настоящее время, фармацевтическая наука и промышленность активно проводят создание препаратов на основе веществ растительного происхождения и их производных [1]. Один из активных фармацевтических ингредиентов – иринотекан, в форме гидрохлорида, является производным камптотецина – алкалоида природного происхождения, полученного из древесины дерева *Camptotheca acuminata*. По механизму действия является ингибитором топоизомеразы I, взаимодействует с комплексом ДНК – то-

поизомеразы I и препятствует синтезу ДНК, что обуславливает невозможность репликации ДНК, и как следствие – гибель клетки [2, 3].

Как иринотекан, так и его активный метаболит – SN-38 существуют в активной форме лактона и в биологически-неактивной форме аниона гидроксикислоты. Между этими двумя формами существует pH-зависимое равновесие (сдвиг pH в кислую сторону способствует образованию лактона, тогда как более щелочная среда благоприятствует образованию аниона гидроксикислоты) [4].

Биологическая активность иринотекана связана с взаимодействием самого белка топоизомеразы I с кольцом лактона E структуры иринотекана, представленной на рис. 1, с его раскрытием и образованием конъюгата иринотекан – топоизомеразы I.

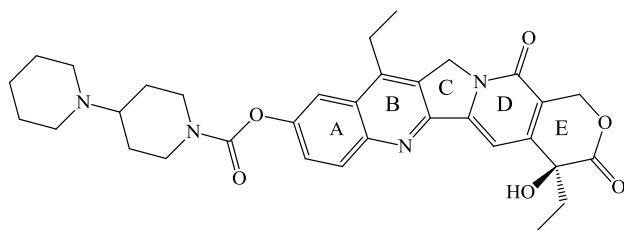


Рис. 1. Структурная формула иринотекана

2. Постановка проблемы в общем виде, актуальность темы и ее связь с важными научными или практическими вопросами

Для сохранения биологической активности иринотекана важно сохранение его структуры, в частности кольца E. Это осложняется тем, что в водных растворах, в условиях pH ближе к нейтральным, что является условием для получения парентеральных препаратов, наблюдается конверсия лактонного кольца E иринотекана в неактивную форму. Предположительный механизм конверсии активного лактона в неактивный анион гидроксикислоты представлен на рис. 2. Превращение включает конверсию лактона, и образование производного – гидроксикислоты, с дальнейшим её депротонированием и образованием неактивного аниона [5].

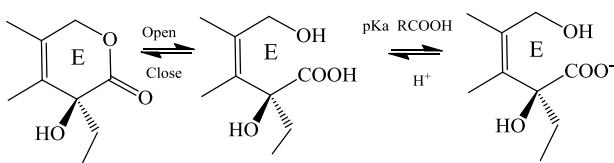


Рис. 2. Предположительный механизм конверсии активного лактона E в неактивный анион гидроксикислоты

3. Анализ последних исследований и публикаций, в которых начато решение данной проблемы и на которые опирается автор

Поскольку производное иринотекана в виде гидроксикислоты не обладает требуемой биологической активностью [5], при разработке технологии лекарственных форм иринотекана необходимо исследовать технологические параметры, позволяющие максимально сохранить исходную структуру и предотвратить образование нежелательных примесей.

Реакция образования неактивного производного и его конверсии в активный лактон обратима, но для этого необходимо нахождение молекулы в кислой среде. Однако, необходимо учитывать, что pH крови человека составляет 7,2, и при этом значении водородного показателя реакция идёт не в сторону образования активного лактона, а в сторону конверсии, с медленным образованием неактивного метаболита – гидроксикислоты. При применении лекарственного средства – раствора для инъекций ирино-

текана в форме гидрохлорида, предположительно, часть препарата, наряду с образованием активных метаболитов, проявляющих терапевтическое действие, превращается в неактивное соединение с де-структурированным лактонным кольцом E [6]. В связи с этим важно не только донести до стадии введения в организм активную лактонную структуру препарата, но и создать такие носители, которые могли бы уберечь действующее вещество от деградации, и высвободить, обеспечивая пролонгирование и максимальную полноту действия.

Один из основных способов создания транспортных систем с иринотеканом – это формирование липосомальных систем с включением в них иринотекана методом «химического градиента». Возможны два основных варианта формирования липосом с иринотеканом, с применением технологии активной загрузки: «градиента аммония» и «градиента pH».

4. Выделение не решенных ранее частей общей проблемы, которой посвящена статья

Несмотря на значительное количество работ, посвящённых созданию и доклиническим исследованиям липосомальной формы иринотекана, не были проведены исследования его химической стабильности при использовании различных технологий включения иринотекана в липосомы [7–10]. Проведение данных исследований необходимо для оценки безопасности препарата как при проведении клинических исследований, так и при серийном выпуске готового лекарственного средства.

5. Формулирование целей (задач) статьи

Целью данной работы является изучение устойчивости иринотекана в форме гидрохлорида при показателях pH, используемых в технологии «химического градиента» при получении липосомальных лекарственных препаратов. Результаты, полученные при исследовании должны определить оптимальные условия проведения технологии «химического градиента» максимально стабилизирующие молекулу иринотекана.

6. Изложение основного материала исследования (методов и объектов) с обоснованием полученных результатов

На рис. 3 представлены химические равновесия, существующие в растворе при активной загрузке иринотекана методом «градиента аммония». Константа протонизации молекулы иринотекана – pKa составляет порядка 6,57. Часть катионов иринотекана, попадая во внешний фосфатный буфер при значениях pH 5,0, депротонируется, и абсорбируясь на поверхности липосомы проникает через липидную мембрану во внутрилипосомальный объём. Количество депротонированных молекул при pH буфера мало, однако, протонированные молекулы, проникая в липосомы, покидают сферу реакции, что сдвигает равновесие в сторону образования молекулярной формы. Молекулы иринотекана, в незаряженном виде, проникнув внутрь липосом протонируются при помощи находящегося там аммоний иона. pH внутреннего буферного раствора, образованного раство-

ром сульфата аммония составляет 5,4–5,6. Вместе с этим, заряженные молекулы иринотекана теряют возможность проходить сквозь липидную мембрану, а депротонированные молекулы аммиака, напротив, покидают внутреннюю полость липосомы, диффундируя через бислои и выходя во внешний буфер. В процессе данной технологии, молекула иринотекана находится постоянно при pH 5,0–5,5, которое поддерживается фосфатным буфером снаружи липосом и раствором сульфата аммония внутри липосом. Метод позволяет получать липосомы с иринотеканом со значениями инкапсуляции вплоть до 95 %.

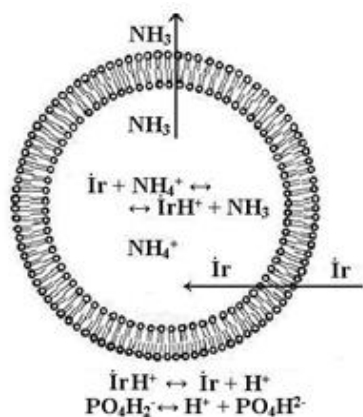


Рис. 3. Схема активной загрузки липосом с иринотеканом (Ir) при использовании технологии «градиента аммония»

Существует технология, применимая при приготовлении липосом с иринотеканом – технология «градиента pH». На рис. 4 приведены равновесия, существующие в среде в момент формирования активной загрузки иринотекана по методу «градиента pH». По аналогии с технологией «градиента аммония», катион иринотекана, попадая во внешний буфер с pH 5,0, частично депротонируется, и адсорбируясь на липосомах, проникает через липидный бислой во внутреннюю полость.

Внутри молекула иринотекана протонируется за счёт цитратного буферного раствора, имеющего pH 1,9. Таким образом, на накопление иринотекана внутри липосом влияет способность внешнего фосфатного буфера депротонировать иринотекана, и способность внутреннего цитратного буферного раствора протонировать молекулу иринотекана во внутрен-

ней полости после её прохождения через липидный бислой. Иринотекана в данной технологии кратковременно находится при pH 5,0, во внешнем буферном растворе, и далее, после инкапсуляции в липосомы находится при pH 1,9 в буферном растворе образованного лимонной кислотой. Метод позволяет получать липосомы с иринотеканом со значениями инкапсуляции вплоть до 95 %.

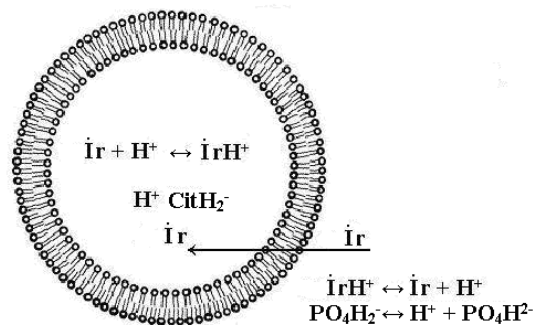


Рис. 4. Схема активной загрузки липосом с иринотеканом (Ir) при использовании технологии «градиента pH»

Проведены исследования зависимости образования примесей иринотекана при кислых и основных значениях pH, применяемых при проведении технологии «химического градиента». Исследования проведены на водном растворе иринотекана в форме гидрохлорида с концентрацией 2 мг/мл. Определение примесей проведено при помощи методики ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC-20 по методике предложенной USP, для полусинтетического продукта.

Проводили исследования динамики образования примеси, соответствующей продукту деструкции лактонного кольца E иринотекана в 3 этапа: при значениях pH: 1,9; 5,0; 5,5. Исследования велись методом ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC-20, в условиях контроля примесей согласно USP, для полусинтетического продукта.

Условия хроматографирования – Колонка – Zorbax Stable Bond 250 мм x 4,6 мм, размер сорбента 5 мкм.

Подвижная фаза – Фаза А – 0,02 М раствор фосфата калия однозамещённого с pH 3,5.

Фаза Б – Смесь ацетонитрил : метанол (3:2).

Программа градиентного элюирования представлена в табл. 1.

Таблица 1

Элюирование – градиентное, программа

Время (мин)	Раствор А (%)	Раствор Б (%)
0	80	20
40	30	70
45	30	70
50	80	20
55	80	20

Детектирование – спектрофотометрическое при 220 нм;

Скорость подвижной фазы – 1 мл/мин;

Температура колонки – 30 °C

Объём ввода – 10 мкл

Согласно требований спецификации на готовый препарат, содержание единичной примеси должно не превышать 0,4 %, суммарно примесей не более 2,0 %.

Установлено, что в приведённых условиях иринотекан имеет время удерживания 24–25 мин, а примесь, характерная конверсии лактона Е, имеет время удерживания 15–16 мин.

На первом этапе исследований была изучена устойчивость иринотекана в 0,2 М растворе лимон-

ной кислоты при pH 1,9. На рис. 5 приведена хроматограмма, полученная при исследовании стабильности иринотекана при pH 1,9 (12 часов испытания стабильности при 20 °С). Время удерживания иринотекана составляет 24,922, при этом, не образуются примеси, характерные для производного с раскрытым лактонным кольцом. Пик вещества с интенсивностью 195 mAU на 3-й минуте хроматографирования соответствует лимонной кислоте – компоненту буфера, который выходит в неударживаемом объёме.

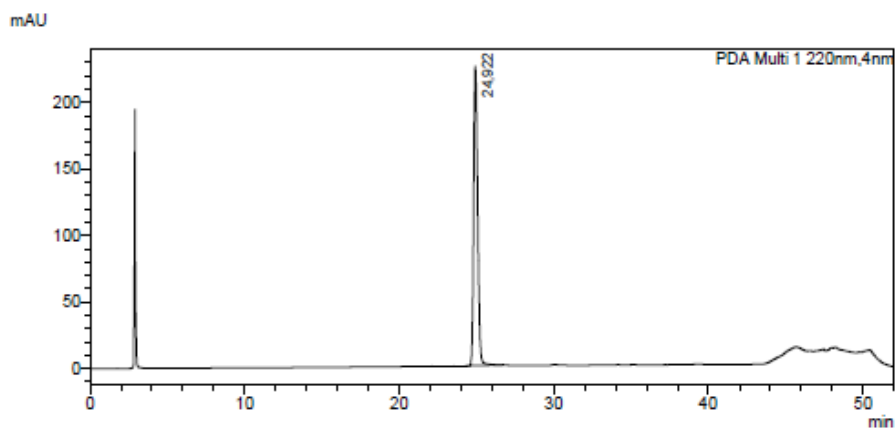


Рис. 5. Хроматограмма раствора иринотекана в 0,2 М растворе лимонной кислоты при pH 1,9 при хранении 12 часов при 20 °С

Таким образом, разрушения иринотекана гидрохлорида при pH 1,9 не происходит, что сохраняет его активную структуру. Иринотекан будет стабилен внутри липосом при реализации технологии градиента pH с использованием в качестве внутреннего буфера лимонной кислоты.

Далее была исследована стабильность иринотекана гидрохлорида в среде фосфатного буфера при pH 5,0, который используется для внешнего буферного раствора в технологии «градиента pH», а так же в технологии «градиента аммония». В обеих технологиях иринотекан кратковременно находится при pH 5,0, до момента его инкапсуляции в липосомы.

Далее была изучена стабильность иринотекана гидрохлорида в среде 0,002 М натрия фосфата однозамещённого при pH 5,0 при исследовании 8 часов. Как видно из рис. 6. на 4 часу исследования, на 15,1

минуте появляется примесь, характерная для деградации лактонного кольца Е иринотекана. К 6 часу испытаний содержание примеси достигает 0,2 %, а к 12 часу – 0,3 %. В целях предотвращения деградации иринотекана, выходящего за рамки спецификации, значение 0,3 % примеси гидроксикислоты было определено нами как максимально допустимое при проведении технологического процесса.

При этом стоит учесть, что с момента загрузки иринотекана в эмульсию, его количество во внешнем буфере сразу начинает уменьшаться, за счёт инкапсуляции и перехода внутрь липосом в кислую среду. При этом снижается динамика образования примеси.

Таким образом, pH 5,0 является приемлемым для технологии, при условии нахождения иринотекана гидрохлорида в липосомальной эмульсии в момент загрузки не более 12 часов.

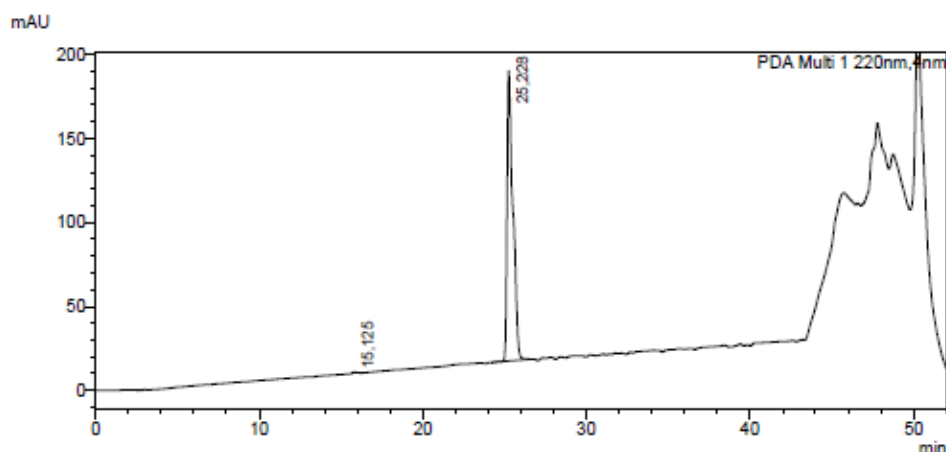


Рис. 6. Хроматограмма раствора иринотекана в среде фосфатного буфера при pH 5,0 при хранении 4 часа при 20 °С

Далее было проведено испытание стабильности иринотекана при pH 5,5, которое характерно для технологии «градиента аммония». Исходя из технологии, такое значение pH будет внутри липосом, поэтому, устойчивость иринотекана при pH 5,5 должна составлять не менее 12 часов – время, необходимое для активной инкапсуляции, стерильной фильтрации, розлива во флаконы, до момента заморозки в камере машины лиофильной сушки. На рис. 7. представлена хроматограмма начала испытаний стабильности иринотекана при pH 5,5. Из рис. 7 видно, что примесь,

характерная для конверсии лактона, в начале эксперимента отсутствует. На рис. 8 представлена хроматограмма испытания стабильности иринотекана при pH 5,5 после 60 минут при температуре 20 °С.

Из рис. 8 видно, что на 15,3 минуте появляется значительная примесь. После обработки хроматограммы было выяснено, что площадь пика примеси составляет более 1,3 % от площади пика иринотекана. Примесь более чем в 3 раза превышает допустимые нормы по содержанию примесей в готовой лекарственной форме иринотекана.

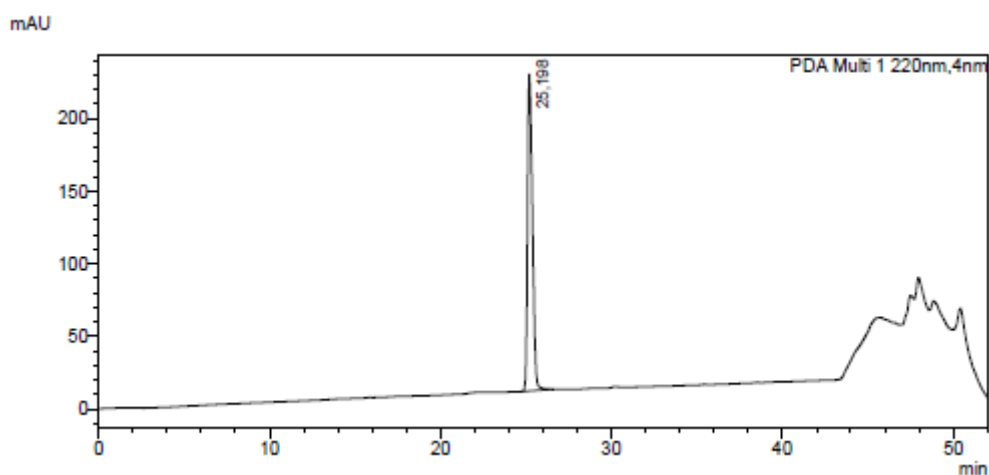


Рис. 7. Хроматограмма раствора иринотекана в среде фосфатного буфера при pH 5,5 после приготовления раствора при 20 °С

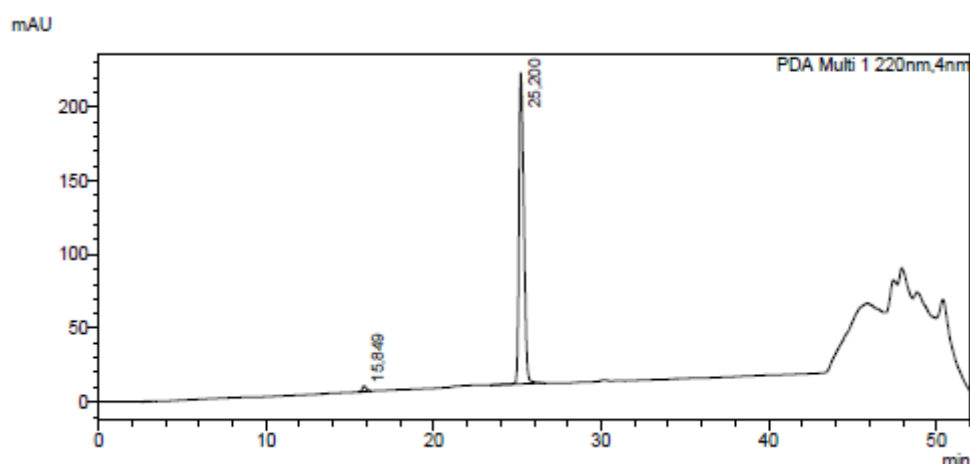


Рис. 8. Хроматограмма раствора иринотекана в среде фосфатного буфера при pH 5,5 после 60 минут при 20 °С

7. Выводы

1. Проведено изучение стабильности иринотекана при использовании различных методов активной загрузки липосом.

2. Экспериментально доказано, что при использовании метода «градиента аммония» при pH характерного для внутренней полости липосом, образуются примеси, более чем в 3 раза превышающие таковые при использовании технологии по методу «градиента pH».

3. Установлено, что технология получения липосомального иринотекана по методу «градиента pH» позволяет получить более стабильную лекарственную липосомальную форму препарата в срав-

нении с технологией «градиента аммония», что будет использовано в дальнейшем, при проведении фармацевтической разработки липосомальной формы иринотекана.

Литература

1. Prakash, O. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review [Text] / O. Prakash, A. Kumar, P. Kumar, A. Ajeet // American Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol. 1, Issue 6. – P. 104–115. doi: 10.12691/ajps-1-6-1
2. Xu, Y. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity [Text] / Y. Xu // Annals of Oncology. – 2002. – Vol. 13, Issue 12. – P. 1841–1851. doi: 10.1093/annonc/mdf337

3. Ramsay, E. C. Irinophore C: A liposome formulation of irinotecan with substantially improved therapeutic efficacy against a panel of human xenograft tumors [Text] / E. C. Ramsay, M. Anantha, J. Zastre, M. Meijs, J. Zonderhuis, D. Strutt et. al. / *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol. 14, Issue 4. – P. 1208–1217. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-0780
4. West-Ward Pharmaceuticals Corp. Irinotecan prescribing information [Electronic resource]. – Drugs.com. – 2016. – Available at: <https://www.drugs.com/pro/irinotecan.html>
5. Fassberg, J. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues [Text] / J. Fassberg, V. J. Stella // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1992. – Vol. 81, Issue 7. – P. 676–684. doi: 10.1002/jps.2600810718
6. Li, W. Y. Stability of irinotecan hydrochloride in aqueous solutions [Text] / W. Y. Li., R. Koda // *Am J Health-Syst Pharm*. – 2002. – Vol. 59, Issue 6. – P. 539–544.
7. Tardi, P. G. Drug ratio-dependent antitumor activity of irinotecan and cisplatin combinations in vitro and in vivo [Text] / P. G. Tardi, N. Dos Santos, T. O. Harasym, S. A. Johnstone, N. Zisman, A. W. Tsang et. al. // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2009. – Vol. 8, Issue 8. – P. 2266–2275. doi: 10.1158/1535-7163.mct-09-0243
8. Ramsay, E. A novel liposomal irinotecan formulation with significant anti-tumour activity: Use of the divalent cation ionophore A23187 and copper-containing liposomes to improve drug retention [Text] / E. Ramsay // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2008. – Vol. 68, Issue 3. – P. 607–617. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.08.011
9. Egusquiaguirre, S. P. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research [Text] / S. P. Egusquiaguirre, M. Igartua, R. M. Hernández, J. L. Pedraz // *Clinical and Translational Oncology*. – 2012. – Vol. 14, Issue 2. – P. 83–93. doi: 10.1007/s12094-012-0766-6
10. Messerer, C. L. Liposomal Irinotecan. Formulation Development and Therapeutic Assessment in Murine Xenograft Models of Colorectal Cancer [Text] / C. L. Messerer // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10, Issue 19. – P. 6638–6649. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-0221
- American Journal of Pharmacological Sciences, 1 (6), 104–115. doi: 10.12691/ajps-1-6-1
2. Xu, Y. (2002). Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Annals of Oncology*, 13 (12), 1841–1851. doi: 10.1093/annonc/mdf337
3. Ramsay, E. C., Anantha, M., Zastre, J., Meijs, M., Zonderhuis, J., Strutt, D. et. al. (2008). Irinophore C: A Liposome Formulation of Irinotecan with Substantially Improved Therapeutic Efficacy against a Panel of Human Xenograft Tumors. *Clinical Cancer Research*, 14 (4), 1208–1217. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-0780
4. West-Ward Pharmaceuticals Corp. Irinotecan prescribing information (2016). Drugs.com. Available at: <https://www.drugs.com/pro/irinotecan.html>
5. Fassberg, J., Stella, V. J. (1992). A kinetic and Mechanistic Study of the Hydrolysis of Camptothecin and Some Analogues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81 (7), 676–684. doi: 10.1002/jps.2600810718
6. Li, W. Y., Koda, R. (2002). Stability of irinotecan hydrochloride in aqueous solutions. *Am J Health-Syst Pharm*, 59 (6), 539–544.
7. Tardi, P. G., Dos Santos, N., Harasym, T. O., Johnstone, S. A., Zisman, N., Tsang, A. W. et. al. (2009). Drug ratio-dependent antitumor activity of irinotecan and cisplatin combinations in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8 (8), 2266–2275. doi: 10.1158/1535-7163.mct-09-0243
8. Ramsay, E. (2008). A novel liposomal irinotecan formulation with significant anti-tumour activity: Use of the divalent cation ionophore A23187 and copper-containing liposomes to improve drug retention. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68 (3), 607–617. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.08.011
9. Egusquiaguirre, S. P., Igartua, M., Hernández, R. M., Pedraz, J. L. (2012). Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clinical and Translational Oncology*, 14 (2), 83–93. doi: 10.1007/s12094-012-0766-6
10. Messerer, C. L. (2004). Liposomal Irinotecan: Formulation Development and Therapeutic Assessment in Murine Xenograft Models of Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10 (19), 6638–6649. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-0221

References

1. Prakash, O., Kumar, A., Kumar, P., Ajeet, A. (2013). Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review.

Дата надходження рукопису 25.05.2016

Стадниченко Александр Викторович, кандидат фармацевтических наук, кафедра "Биотехнология, биофизика и аналитическая химия", Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», ул. Багалея, 21, г. Харьков, Украина, 61002
E-mail: alstn@mail.ru

Краснопольский Юрий Михайлович, доктор фармацевтических наук, профессор, кафедра "Биотехнология, биофизика и аналитическая химия", Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», ул. Багалея, 21, г. Харьков, Украина, 61002
E-mail: biotech_ntu_khpi@ukr.net

Швец Виталий Иванович, доктор химических наук, профессор, Академик РАН, кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии, Моковский Государственный университет тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, пр. Вернадского, 86, г. Москва, Россия, 119571
E-mail: bt@mitht.ru

Ярных Татьяна Григорьевна, доктор фармацевтических наук, профессор, Заслуженный деятель науки и техники Украины, кафедра технологии лекарств, Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина, 61002
E-mail: tl.@nuph.edu.ua