

УДК 541.64:539.2

## СИСТЕМА ТИПА ЛИПОСОМЫ — ПОЛИМЕР. ВКЛЮЧЕНИЕ ЛИПОСОМ В ПОЛИМЕРНЫЙ ГЕЛЬ И ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРНОГО ГЕЛЯ ВНУТРИ ЛИПОСОМ

Торчилин В. П., Шларб Б., Клибанов А. Л.,  
Иванов Н. Н., Рингсдорф Х.

Исследована судьба липосом при их включении в модельный полимерный гель на основе акриламида. Получены липосомы, содержащие во внутренней водной фазе полимеризуемый мономер. Проведена полимеризация этого мономера с формированием микросферических частиц полимера, покрытых фосфолипидным бислоем. Оба вида полученных липосомальных полимерных препаратов могут оказаться полезными для создания новых систем контролируемого высвобождения лекарств, а также для создания новых типов иммунологических адъювантов.

Одним из возможных путей использования липосом в качестве носителей лекарств или иммунологических адъювантов — их внутримышечное или подкожное введение [1]. К сожалению, довольно быстрое разрушение липосомальной мембранны в физиологических условиях не позволяет создать таким образом долгодействующее лекарственное депо. С другой стороны, описаны многочисленные попытки создать подкожные или имплантируемые в мышечную ткань лекарственные депо на основе содержащих лекарственный препарат полимерных материалов [2]. В этом случае определенные сложности вызывают две проблемы: биоутилизация полимерного материала по прекращении терапевтического действия и возможность включения в полимерные гели низкомолекулярных лекарств, для которых скорость диффузии из полимерного носителя слишком велика.

Возможным решением проблемы могло бы быть создание носителей, сочетающих в себе стабильность полимера и малую проницаемость липосом. Естественным путем получения таких препаратов представляется включение соответствующего лекарства в липосому и последующее включение липосом, содержащих лекарство, в полимерный гель, полученный из биоразрушаемых полимеров, например из полисахаридов, полиаминокислот или синтетических полимеров с биоразрушающими связями [3, 4]. В этом случае диффузия лекарства из препарата протекала бы двустадийно, сначала происходило бы медленное выделение липосом из полимера, а затем более быстрое разрушение липосом и выход из них свободного лекарства. Возможность регуляции свойств липосом и полимерных материалов в самых широких пределах позволила бы широко варьировать параметры получаемых препаратов. Первые упоминания о включении липосом в полимерные гели уже имеются [4, 5].

Проведение полимеризации в водной фазе внутри липосом представляет интерес по нескольким причинам. Во-первых, полимеризация противоионов на внутренней стороне липосомальной мембранны без протекания полимеризации во всем внутреннем объеме липосомы позволяет создавать структуры, в определенной степени моделирующие структуры белков цитоскелета, прилегающих с внутренней стороны к клеточной мембрane; в частности, модель спектриновой сетки эритроцитов, что разрабатывается в работах Рингсдорфа и соавт. [6, 7]. Во-вторых, проведение полимеризации во всем объеме внутрилипосомальной водной фазы позволит получать наночастицы с достаточно узким распределением по

размерам. Эти наночастицы легко могут быть выделены обработкой дегидратом или органическим растворителем. В фосфолипидполимерные частицы легко могут быть включены различные физиологически активные соединения, скорость высвобождения которых определяется двумя диффузионными процессами — через полимерный гель и через фосфолипидный бислой и может регулироваться в самых широких пределах. Кроме того, благодаря возможности регуляции фосфолипидного состава и физико-химических свойств липосомальной мембранны открывается путь создания микросферических препаратов, обладающих разной эффективностью взаимодействия с разными клетками и тканями. Такие препараты пригодны для разнообразных медико-биологических исследований, включая создание новых систем с регулируемым высвобождением активного начала.

В настоящей работе предпринята попытка исследовать судьбу липосом при их включении в модельный полимерный гель на основе акриламида, а также получить липосомы, содержащие во внутренней водной фазе полимеризуемый мономер, и провести последующую полимеризацию этого мономера с формированием микросферических частиц полимера, покрытых фосфолипидным бислом.

Флуоресцирующие липосомы были получены методом обращения фаз [7] из смеси лецитина (Харьковский завод бактериальных препаратов, СССР) и холестерина («Сигма») в весовом соотношении 2 : 1 при суммарной концентрации 10 мг/мл в 0,15 м. забуференном физиологическом растворе (ЗФР) (0,15 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л фосфата), pH 7,4 в присутствии 1 ммоль/л флуоресцентного красителя эозина («Мерк») и 0,5 или 1,5 м. раствора глюкозы (для последующего включения в 3 и в 10%-ный полимерный гель соответственно). Для этой цели 20 мг яичного лецитина и 10 мг холестерина растворяли в 9 мл безводного эфира и полученный раствор смешивали с 3 мл 0,15 м. ЗФР, содержащего 1 ммоль/л эозина и требуемое количество глюкозы. Смесь подвергали кратковременному озвучиванию на ультразвуковом дезинтеграторе «Брансон», образовавшуюся эмульсию упаривали на роторном испарителе при давлении 30 мбар до образования геля, колбу с гелем встряхивали на приборе «Вортекс», после чего продолжали упаривание смеси при давлении 40 мбар до исчезновения запаха эфира и образования опалесцирующей жидкости.

Липосомы отделяли от невключенного красителя гель-фильтрацией на колонке ПД-10 в растворе 6 г акриламида и 0,3 г метилен-бис-акриламида (оба фирмы «Мерк») или в растворе 20 г акриламида и 1 г метилен-бис-акриламида в 200 мл ЗФР для последующего получения 3- и 10%-ного полиакриламидного геля соответственно. В обоих случаях колонку предварительно уравновешивали соответствующим раствором мономера и в этом же растворе проводили отделение красителя. Включение в липосомы соответствующих концентраций глюкозы необходимо для избежания гиперосмотического разрушения липосом.

После гель-фильтрации по 1 мл суспензии липосом (липосом с 0,5 м. глюкозой в 3%-ном растворе мономеров и липосом с 1,5 м. глюкозой в 10%-ном растворе мономеров) смешивали с 2 мкл тетраметилэтilenдиамина и 15 мкл 10%-ного раствора персульфата натрия в ЗФР. Затем проводили полимеризацию образцов их нагреванием при 50° в течение 30 мин в водяной бане.

Для получения липосом, содержащих мономер внутри, также использовали метод обращения фаз [7]. В качестве водной фазы здесь использовали 3 мл ЗФР, содержащего 0,2 г акриламида, 0,02 г метилен-бис-акриламида, 3 мкл тетраметилэтilenдиамина и 1 мг инициатора полимеризации — 4,4-азо-бис-(4-цианопентановой) кислоты.

2,5 мл полученной суспензии липосом наносили на колонку ПД-10 («Фармация») и собирали фракцию с 2,5 по 6 мл. Колонку уравновешивали 2м. раствором глюкозы в ЗФР во избежание осмотического лизиса липосом. Элюирование проводили 3,5 мл этого же раствора. Фракцию липосом делили на две равные части, одну из которых использовали в качестве контроля, а вторую подвергали полимеризации в тонкостенной пробирке действием облучения от ртутной лампы в течение 30 мин.

Контроль за состоянием липосом в гелях осуществляли визуально с использованием флуоресцентного микроскопа «Цейсс ИМ-35». Раствор липосом или мелкие кусочки полимерного геля помещали на предметный столик между стеклами. Фотографирование образцов проводили с экрана соединенного с микроскопом видеомагнитофона фирмы «Сони».

Контроль образования липосом и образования полимерных гранул внутри них проводили с помощью динамического светорассеивания на приборе «Наносайзер» (ФРГ), на оптическом микроскопе в режиме фазового контраста (Цейсс ИМ-35) и с помощью сканирующей электронной микроскопии [8].

Для исследования возможности включения липосом в полимерный акриламидный гель использовали флуоресцирующие липосомы. Эти липосомы легко отделяются от избытка не включившегося красителя гель-

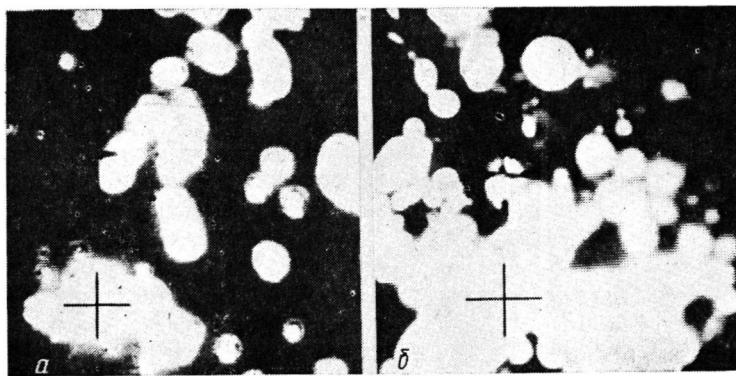


Рис. 1. Липосомы, содержащие эозин в неполимеризованном 10%-ном растворе акриламида (а) и в нем же сразу после полимеризации (б)



Рис. 2. Липосомы, содержащие эозин, в 3%-ном полиакриламидном геле после двухнедельного хранения



Рис. 3. 10%-ный гель с содержащими эозин липосомами через 4 ч после обработки тритоном X-100

фильтрацией и остаются интактными (не выделяют красителя) в течение по крайней мере несколько часов (типичная картина на рис. 1, а).

Полимеризация также не нарушает интактности липосом, и они отчетливо просматриваются в 3- и в 10%-ном полиакриламидном геле, хотя в последнем случае образование геля вызывает некоторую агрегацию липосом (рис. 1, б).

Интактные липосомы могут быть обнаружены в образцах гелей даже через две недели хранения, хотя в обоих случаях гели приобретают некоторую флуоресценцию по всему объему, что свидетельствует о постепенном выходе красителя из липосом (рис. 2).

Добавление к содержащим липосомы полиакриламидным гелям избытка 0,2%-ного раствора детергента тритона X-100 приводит к немедленно-

#### Размеры частиц в нм (результаты динамического лазерного светорассеяния)

Образец, №	Характеристика образца	Размер частиц	
		[липид] = 6 мг/мл	[липид] = 10 мг/мл
1	Общая смесь после приготовления липосом	587, 624, 671	688, 638, 643
2	Образец 1 + тритон X-100	—	Частицы не обнаружены
3	Липосомы, отделенные от невключенного мономера гель-фильтрацией	681, 595, 646	654, 678, 646
4	Образец 3 + тритон X-100	—	Частицы не обнаружены
5	Липосомы после УФ-облучения	615, 630, 684	707, 767, 671
6	Образец 5 + тритон X-100	554, 567, 493	508, 575, 564

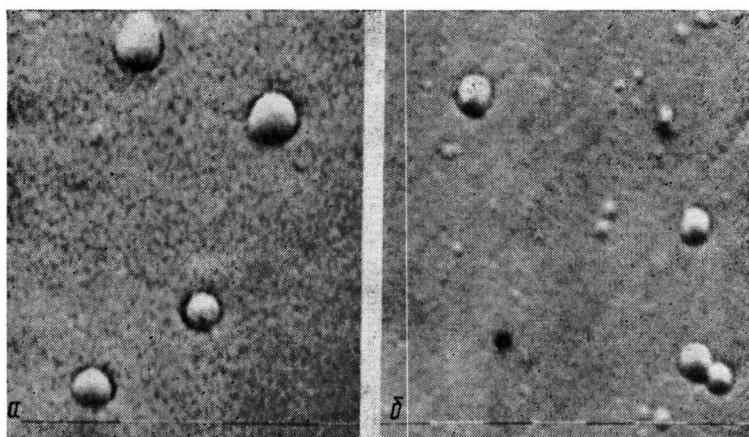


Рис. 4. Полимеризованные липосомы перед (а) и после (б) добавления раствора тритона Х-100. Масштаб 1 мкм

му разрушению всех липосом в 3%-ном геле и к равномерному распределению флуоресценции по всему объему образца, тогда как в случае 10%-ного полиакриламида даже через несколько часов можно различить отдельные липосомы или, во всяком случае, локальные участки с повышенной флуоресценцией (рис. 3).

По данным электронной микроскопии (рис. 4) и динамического светорассеивания (таблица), при полимеризации, происходящей во внутренней водной фазе липосом, образуются микросферические частицы размером  $\sim 600$  нм. Условия выделения и полимеризация не сказываются на внешнем виде и размере частиц. Добавление к образцу неполимеризованных липосом 10%-ного раствора тритона Х-100 приводит к просветлению образца и исчезновению в нем частиц, регистрируемых микроскопически или с помощью динамического светорассеяния. В то же время детергент не влияет на частицы в полимеризованном образце. Образование в этом случае фазово-разделенных полимерных наночастиц свидетельствует также о сохранении липосомами интактности в процессе всех манипуляций и об отсутствии вытекания мономера в среду. Действие детергента в обоих случаях должно приводить к полной солюбилизации липидов, но если для незаполимеризованных липосом это вызывает распределение внутрилипосомальной водной фазы (раствора мономеров) по всему объему образца, то в случае полимеризованных липосом детергент только удаляет внешний фосфолипидный бислой и не влияет на полимерные наночастицы, образовавшиеся внутри липосом.

Таким образом, нами рассмотрены способы формирования полимерного геля во внутренней водной фазе липосом, а также включения липосом в полимерный гель. Включенные в гель липосомы могут длительно сохраняться в нем, медленно выделяя свое содержимое. Изменение концентрации геля позволяет регулировать доступность липосом для внешних повреждающих факторов.

По-видимому, оба вида полученных липосомальных полимерных препаратов могут оказаться полезными для создания новых систем контролируемого высвобождения лекарств, а также для создания новых типов иммунологических адъювантов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Liposomes and Immunobiology/Ed. by Tom B. H., Six H. R. N. Y., 1980.
2. Controlled Drug Delivery. V. I-II/Ed. by Bruck S. D. Boca Raton, 1983.
3. Kopecek J., Rejmanova P. // Controlled Drug Delivery V. I./Ed. by Bruck S. D. Boca Raton, 1982. P. 81.
4. Weiner A. L., Carpenter-Green S. S., Soehngen E. C., Lenk R. P., Popescu M. C. // J. Pharm. Sci. 1985. V. 74. № 9. P. 922.
5. Popescu M. C., Weiner A. L., Carpenter-Green S. S. PCT Intern. Appl. WO 85 03 640. 1985.

6. Bader H., Dorn K., Hupfer B., Ringsdorf H. // Advances Polymer Sci. 1985. V. 64. P. 1.
7. Szoka F., Papahadjopoulos D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 9. P. 4194.
8. Chazov E. I., Alexeev A. V., Antonov A. S., Koteliansky V. E., Leytin V. L., Lyubimova E. V., Repin V. S., Sviridov D. D., Torchilin V. P., Smirnov V. N. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 9. P. 5603.

Институт экспериментальной кардиологии  
Всесоюзного кардиологического научного  
центра АМН СССР

Институт органической химии  
Университета им. Гутенберга,  
Майнц, ФРГ

Поступила в редакцию  
20.V.1987

**LIPOSOMES — POLYMER SYSTEMS.  
INTRODUCING OF LIPOSOMES INTO THE POLYMER GEL  
AND PREPARATION OF THE POLYMER GEL INSIDE LIPOSOMES**

**Torchilin V. P., Shlarb B., Klibanov A. L., Ivanov N. N.,  
Ringsdorf H.**

**S u m m a r y**

The evolution of liposomes after their introducing into the model polymer gel on the basis of acrylamide has been studied. Liposomes containing the polymerizable monomer in the internal aqueous phase have been obtained. The polymerization of this monomer with formation of microspheric polymer particles coated with phospholipide bilayer has been performed. Both types of obtained liposomal polymer specimens can be useful for creation of new systems of controlled drug release and new types of immunological adjuvants.