Kölcsönhatások liposzomális rendszerekben a nano-méretektől a sejtméretekig

Doktori tézisek

Mike-Kaszás Nóra

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Gróf Pál egyetemi docens, C.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Zelkó Romána egyetemi tanár, MTA doktora
Dr. Farkas Kornélia egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Monos Emil professzor emeritus, MTA doktora.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csempesz Ferenc egyetemi docens, C.Sc.
Dr. Mészáros Tamás egyetemi docens, Ph.D.

Budapest

2013

1. Bevezetés

A liposzóma-kutatások alapvetően két fontos témakört foglalnak magukba. Egyrészt a liposzómák membránmodellként alkalmazhatók: így a membránok tulajdonságai sokkal pontosabban meghatározott körülmények között tanulmányozhatók. Másrészt, már a kezdetektől fogva felismerték, hogy a liposzómák előnyösek lehetnek mint gyógyszerszállító rendszerek, amit az is indokolhat, hogy a liposzómáknak több típusa is megkülönböztethető méret, szerkezet és felépítés szempontjából. A különböző típusok eltérő tulajdonságú hatóanyagok bezárására lehetnek megfelelőek, illetve különböző módon alkalmazhatóak (belsőleg, külsőleg). A közforgalomban is elérhető, parenterális liposzómás készítmények többnyire legfeljebb néhány 100 nm átmérőjű kis és nagy unilamelláris vezikulákat (SUV, LUV) tartalmaznak. A nagyobb átmérőjű multilamelláris–, és *óriás vezikulák* (MLV-k, GUV-ok) *per os* a gyomor-bélrendszer gyógyítására vagy helyileg alkalmazva kaphatnak szerepet (pl. szemészet, bőrgyógyászat). Az óriás vezikulákat eddig elsősorban *modellmembránként* használták a *kutatásokban; gyógyszerszállító rendszer*ként kevésbé vizsgálták tulajdonságaikat.

Az, hogy egy hatóanyag bezárására melyik liposzómatípus a legmegfelelőbb, az alkalmazás módján túl függ a bezárandó hatóanyag lokalizációjától a vezikulában, amit döntően a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságai befolyásolnak, mint például a molekula mérete, töltése, vízoldhatósága, logP értéke és a lipidmolekulákkal kialakított kölcsönhatása. Lipofil (magas logP értékkel rendelkező) gyógyszermolekulák bezárása esetén nagyobb bezárási hatásfok érhető el a lipidfázist nagyobb arányban tartalmazó MLV-k alkalmazásával. Az unilamelláris vezikulákban (SUV, LUV, GUV) a nagyobb víz/lipid arány a vízoldékony hatóanyagok liposzómába zárásának kedvez. Különbség van a kis és óriás vezikulák között a membrán görbületében is, ami a lipidmolekulák elhelyezkedésének szorosságában, a közöttük kialakuló kölcsönhatások erősségében is megnyilvánul. Ebből kifolyólag különbség lehet a hatóanyag kötődésében és a külső hatásokkal (pl. enzimekkel, epesavakkal) szembeni ellenálló képességükben. Egy *hatóanyag vagy segédanyag* bevitele egy liposzomális rendszerbe *változást idézhet elő* mind a hatóanyag, mind a lipidrendszer tulajdonságaiban. Például megváltozhat a *vezikulák felületi töltéssűrűsége, fluiditása, ami a készítmény stabilitására, hatóanyag-leadására is hatással lehet, illetve megváltozhat a bezárt molekula látszólagos oldhatósága, stabilitása vagy pl. fényérzékenysége*. A hatóanyagoknak a lipidrendszerekben való oldékonyságát nemcsak a lipidösszetétellel, hanem különféle segédanyagokkal is befolyásolni lehet. Az önálló gyógyszerszállító rendszerként is gyakran alkalmazott különféle ciklodextrinek is viselkedhetnek segédanyagként, de elenyésző azon

vizsgálatok száma, amelyek a kombinált rendszernek a lehetséges előnyös tulajdonságait tanulmányozza.

A *disszertációmban bemutatott kísérleteimmel az óriás vezikulák tulajdonságait kívántam vizsgálni, illetve egyes hatóanyagok és a liposzomális gyógyszerszállító rendszer kölcsönhatásának befolyását a különböző fizikai-kémiai paraméterekre.*

2. Célkitűzés

Munkám során különböző méretű és szerkezetű liposzómák és modell hatóanyagok közötti kölcsönhatásokat tanulmányoztam, különös tekintettel az óriás liposzómák, mint potenciális gyógyszerszállító rendszerek vizsgálatára. Két típusú – semleges és töltéssel rendelkező – hatóanyag bezárását tanulmányoztam többféle lipidösszetételű és méretű liposzómákba, különös tekintettel az óriás vezikulákra.

Munkám során a következő célokat tűztem magam elé:

1. Az óriás egyrétegű/többrétegű liposzómák preparálási körülményeinek optimalizálása annak érdekében, hogy a minták alkalmasak legyenek spektroszkópiai vizsgálatokra.
2. Modell hatóanyagok (töltéssel rendelkező fluorokinolonok, semleges töltésű koffein) beépülési tulajdonságainak leírása különböző méretű és rétegszámú liposzómák esetén.
3. A ciprofloxacinnak és a koffeinnek a lipidmembrán fluiditására kifejtett hatásának jellemzése ESR spektroszkópiai módszerrel.
4. A bezárt hatóanyagok és a lipidmolekulák közötti kölcsönhatás jellemzése a liposzóma felületi töltéssűrűségének megváltozásával.
5. Koffein−liposzóma, fizikai-kémiai tulajdonságok különbségének vizsgálata telített és/vagy telítetlen lipideket tartalmazó liposzómák esetén.
6. A hatóanyag-leadási kinetika és a hatóanyagoknak a liposzóma membránon keresztül történő permeabilitásának meghatározása és leírása egyszerű, dialízis mérések kiértékelésével.
7. Lomefloxacin fotostabilitásának meghatározása, illetve befolyásolása kombinált, liposzóma-ciklodextrin formulációk esetén.

3. Módszerek

Liposzóma minták készítése. A liposzómák előállításához tojás- és szójalecitint, L-dipalmitoil-foszfatidilkolint (DPPC), dimirisztoil-foszfatidilglicerolt (DMPG) és dioleoil-foszfatidilkolint (DOPC) használtunk. A multilamelláris molekulákat (MLV) vékonyréteg-hidratációs technikával állítottuk elő, a kis unilamelláris vezikulákat (SUV) extrúziós, illetve ultrahangos módszerrel nyertük MLV-ből. Az óriás vezikulák (GUV) előállítását a nagy felületű, vékony lipidfilm óvatos és több órán keresztül történő hidrálásával értük el. A méréseket két pH-értéken végeztük pH 5,4-en és 7,2-n.

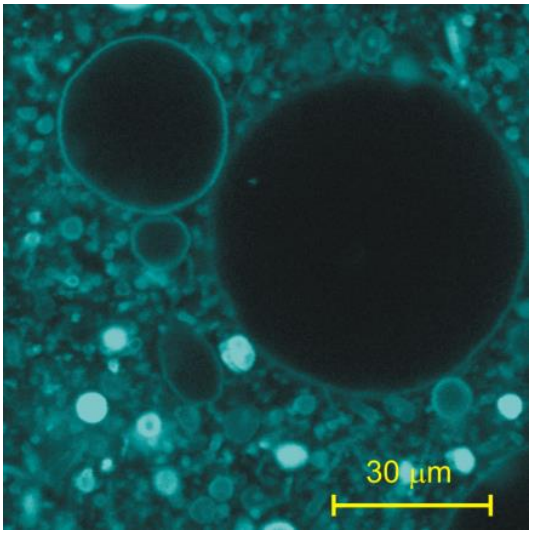
A keletkezett GUV-minták minőségét *konfokális mikroszkóp*pal vizsgáltuk. A *bezárási hatásfok meghatározásához* a mintákat megfelelő pórusátmérőjű membránon keresztül centrifugáltuk, majd a szűrését követően a liposzómába be nem záródott oldat koncentrációja alapján számoltuk. A hatóanyagok által kiváltott *fluiditásváltozás*t és felületi *töltéssűrűség-változás*t elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópiával (Bruker-EMX-6), illetve zéta-potenciál mérésével (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd.) vizsgáltuk. Az MLV-k és GUV-ok hatóanyagleadását egy 10 kDa-ig átengedő dializáló hártyát pufferbe helyezve vizsgáltuk.

*Lomefloxacin-ciklodextrin-liposzóma rendszer*ben határoztuk meg a lomefloxacin (LMFX) bomlástermékeinek arányát. Az LMFX komplexálására β-ciklodextrint és (B-CD) 2-hidroxipropil-β-ciklodextrint (HP-CD) használtunk. A DPPC vagy DPPC/DOPC (70/30) lipidfilmek hidrálása az LMFX, illetve a komplexek oldatával történt. UV-sugárforrásként VL-UVA, T-15.L típusú UVA-lámpával, illetve FS20, széles spektrumú UVB-lámpákkal dolgoztunk. A besugárzási dózist és a besugárzási intenzitást VLX-3W típusú dózismérővel mértük, amihez CX-365 ill. CX-312 típusú szenzort csatlakoztattunk. A különböző tömegű bomlástermékek detektálása egy Agilent 1260 HPLC-vel kapcsolt 6460 QQQ tömegspektrométerrel történt. Az LMFX bomlási sebességi állandójának (k_D) meghatározásához az LMFX-járulék dózis-függő kinetikáját Weibull-függvénnyel illesztettük.

4. Eredmények

Óriás vezikulák előállítása. Spektroszkópiai célokra is megfelelő minőségű mintákat sikerült előállítani tojáslecitinből, illetve DPPC/DMPG (90/10) keverékéből. Kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a GUV-ok képződésének a magasabb pH (>~pH 7,0), a töltött lipidek jelenléte és a kálcium-ion-mentes puffer, ami 20 mM szacharózt, 0,1 mM EDTÁ-t és 20 mM TRIS-t tartalmazott, az optimális. A keletkezett GUV-ok minőségét konfokális mikroszkóppal (1. ábra) vizsgáltuk.

Bezárási hatásfok. A *ciprofloxacin (CPFX) bezárási hatásfok*ában nem volt különbség a tojáslecitin és a DPPC/DMPG (90/10) GUV-ok között. A vizsgált két pH-értéken (*pH 5,4 és 7,2*) *a bezárási hatásfok közel azonos* volt. A GUV és MLV minták kötőkapacitásának összehasonlítására használható az egységnyi lipidkoncentrációra jutó bezárási hatásfok megadása, ami GUV-ok esetén 20,5 bezárt-hatóanyag-százalék/(mg/ml lipid), míg MLV-k esetén ez az érték 3,4 bezárt-hatóanyag-százalék/(mg/ml lipid) volt. A telítetlen lipidek nagyobb arányú jelenléte nem befolyásolta a *koffein bezárás*át, a szója- és tojáslecitin MLV-k esetén is ~ *30% volt* a bezárási hatásfok.

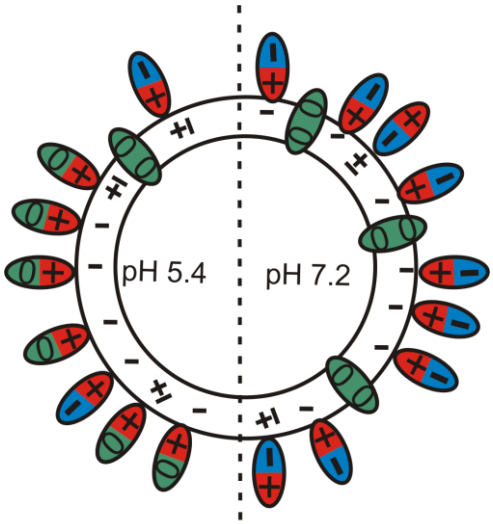


1. ábra Rhodaminnal jelölt, tojáslecitinből készített GUV-minta konfokális mikroszkópos képe.

Hatóanyagok jelenlétének hatása a liposzómák tulajdonságaira. A tojáslecitinből előállított liposzómák *fluiditása 39 ^{o}C fölött megnőtt a CPFX jelenlétében* a fejcsoportok és a zsírsavláncok közötti régióban a kontroll mintákéhoz képest. A hőmérséklet további emelésével azonban a fluiditásváltozás mértéke csökkent, ami azt jelzi, hogy a CPFX által kiváltott hatás a lipidmolekulák megnövekedett hőmozgását már csak kevésbé tudja módosítani. Tojás-, illetve a szójalecitinből készített *koffeines minták* esetén viszont azt

tapasztaltam, hogy a *koffein jelenléte nem okozott változást a membrán fluiditásában* sem a szénlánc ötödik szénatomjának, sem pedig a lipidmembrán/víz-fázis határán mérve.

A CPFX különböző hatással volt a tojáslecitin vezikulák felületi töltéssűrűségére pH 5,4-en és 7,2-n, bár a bezárási hatásfok közel azonos volt. A vezikulák mindkét pH-értéken eredetileg negatív *zéta-potenciál*lal rendelkeztek: -18 és -30 mV-tal pH 5,4-en és pH 7,2-n. A CPFX hozzáadása a liposzóma mintákhoz az alacsonyabb pH-értéken a zéta-potenciál abszolút értékének csökkenését okozta, ami a lamellák és a vezikulák közötti elektrosztatikus taszítás csökkenéséhez vezetett. Ez a hatás a CPFX-et tartalmazó minták mikroszkópos képén is megmutatkozott: a vezikulák kisebb átmérőjűek voltak, részben multilamelláris szerkezetűek és csoportokban helyezkedtek el. A magasabb pH-értéken nem volt tapasztalható változás sem a zéta-potenciálban, sem a mikroszkópos képeken. A koffein liposzómákhoz adása sem volt hatással a vezikulák felületi töltéssűrűségére. Ez a jelenség a modell hatóanyagok különböző töltési tulajdonságával magyarázható. A CPFX-molekulák lehetséges *mikrospeciációs állapotai* különböző pH-értékeken eltérő *járulékokkal* vannak jelen. Az alacsonyabb pH-értéken 80 %-ban pozitív töltésű, míg a magasabb pH-értéken a molekulák több, mint 60 %-a ikerionos szerkezetű. Így a CPFX molekulák mindkét esetben pozitív felükkel fordulva a vezikulák eredetileg negatív töltése felé egyik esetben leárnyékolja azt, míg a másik esetben nem okoz változást, mivel a vezikula nettó töltése negatív marad (2. ábra). *Az eltérő járulékú mikrospeciációs állapotokkal értelmezhető a különböző pH-értéken mért közel azonos bezárási hatásfok és a zéta-potenciálban mért különbség.*



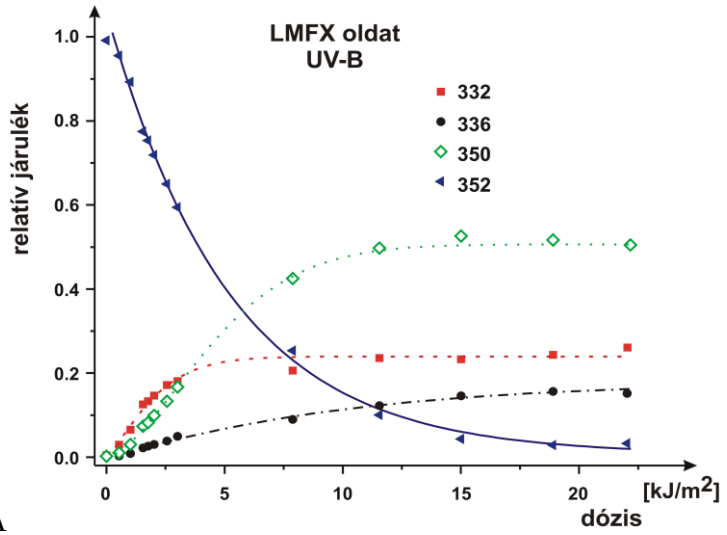
2. ábra A CPFX molekulák liposzómához történő kötődése a két vizsgált pH-értéken. A +, 0 és – jelek utalnak a CPFX töltésére.

A koffein a vizsgált pH-értéken (pH 5,6) semleges, ezért nem befolyásolta a vezikulák felületi töltéssűrűségét.

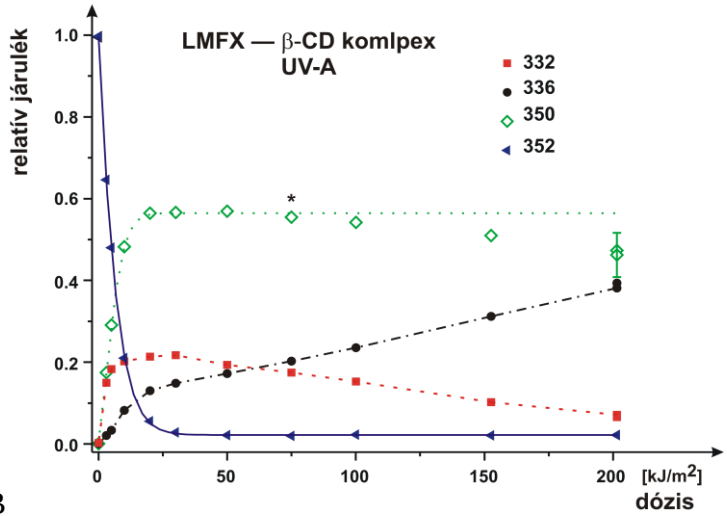
GUV és MLV hatóanyag-leadásának vizsgálata dialízissel. A dializáló zsákba tett CPFX (ami a liposzómán belüli és kívüli térből, illetve a lipidhez kötődött mennyiségből származhatott) 97 %-a jutott ki MLV-k esetén, míg GUV-oknál csak 70 %-a. A kiértékeléshez használt háromrekeszes modell figyelembe veszi a hatóanyagnak a liposzóma membránon és a dializáló hártyán át történő diffúzióját. A kísérleti adatok kiértékelése alapján a GUV-ok membránján át történő diffúzió felezési ideje nagyobb volt (54 óra), mint az MLV-kén keresztül (18 óra). Az eltérő felezési idők értelmezhetők a két liposzomális szerkezet által bezárt- és a felülethez kötött hatóanyagok mennyiségével, valamint a lipidrétegek szerkezetével és az azonos átmérőjű vezikulák által bezárt víz- illetve lipidfázisok arányával.

Fényérzékeny hatóanyag fotostabilitásának vizsgálata ciklodextrin, illetve ciklodextrin-liposzóma rendszerben. Az UV-B fényforrással történt besugárzás hatására a különböző tömegű bomlástermékek (m/z=332, 336, 350) járuléka a dózis függvényében ábrázolva telítésbe ment. A nagyobb dózisú UV-A besugárzás során egy bizonyos dózist elérve a bomlástermékek járuléka csökkent vagy tovább nőtt, vagyis átmeneti termékként viselkedtek. Erre mutat példát a 3. ábra.

Az LMFX fotobomlásának sebességi állandójában különbséget tapasztaltunk a kétféle fényforrással történt megvilágítás során. A szélesspektrumú UV-B fényforrás esetén, két HP-CD-t tartalmazó liposzómás készítmény kivételével, az eltérés nem volt releváns az LMFX oldat k_D-értékéhez képest. Az UV-A besugárzás során a DPPC-ből előállított liposzomális mintákban minden esetben szignifikánsan nagyobb volt a k_D értéke, mint az azonos típusú, DOPC-t 30 %-ban tartalmazóakban. Az LMFX a leggyorsabb bomlását UV-A sugárzás esetén a DPPC liposzómákba zárva szenvedte el, amit lassított a ciklodextrinek jelenléte. Az LMFX CD-komplexbevitele (lipidek nélkül) gyorsította az LMFX bomlását UV-B sugárzás esetén, míg UV-A sugárzásnak kitéve nem okozott változást.



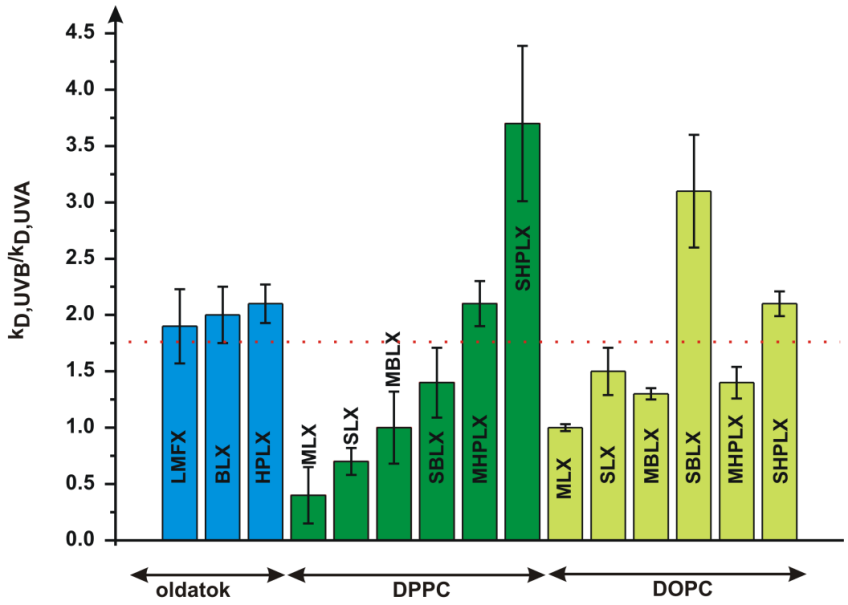
A



B

3. ábra Az LMFX bomlásának függése az UV-besugárzás dózisától és típusától. A: LMFX-oldat UV-B; B: BLMFX–BCD komplex UV-A besugárzása során. Az UV-A besugárzásra vonatkozó kinetikai görbe utal az egyes termékek átmeneti jellegére, a bomlási folyamatok összetettségére.

A 4. ábra szerint a liposzómás minták többsége érzékenyebb volt UV-A-ra, mint UV-B-re, illetve a SUV-ok érzékenyebbek voltak az UV-B sugárzásra, mint az azonos összetételű MLV-k.



4. ábra Az UV-B és UV-A sugárzásra jellemző sebességi állandók aránya az egyes minták esetén. A pontozott vonal az LMFX abszorpciós spektruma alapján számolt UV-B/UV-A aktinikus hatásnak felel meg. Az LMFX érzékenyebb az UV-B sugárzásra azon mintákban, amelyek esetén az arány 1,75-nél nagyobb. LX: LMFX oldat, BLX/HPLX: β-CD/HP-β-CD és LMFX komplexe, M/S: MLV/SUV, DPPC: DPPC-ből előállított liposzómás minták, DOPC: 30 mol%-ban DOPC-t is tartalmazó DPPC minták.

5. Következtetések

Doktoranduszi munkám során vizsgáltam az óriás egyrétegű vezikulák képződésének optimális körülményeit, modell hatóanyagok kötődését különböző szerkezetű liposzómákhoz, és az azok fluiditásában, zéta-potenciáljában a kötődés következtében végbemenő változásokat, illetve a liposzóma-ciklodextrin rendszernek egy fotodegradábilis hatóanyagra gyakorolt esetleges védőhatását.

Mérési eredményeim alapján a következő megállapításokat teszem:

1. *Spektroszkópiai vizsgálatokra is alkalmas, óriás vezikulák*at tartalmazó minta szója-, illetve tojáslecitinből történő *előállítás*ának az *alacsony ionerősség*, az 1 mM-nál kisebb *kétértékű kation-koncentráció* kedvez. Utóbbi szempontjából a jelenlévő *negatív töltésű lipidek* koncentrációját is figyelembe kell venni.

2. a) A *kötődés*i vizsgálatok alapján a multilamelláris vezikulák esetén *hasonló bezárási hatásfok*ot értünk el a két, vélhetően *más kölcsönhatás által kötődő molekulára*: a neutrális koffeinre és a töltést hordozó CPFX-re.

   b) *Az óriás vezikulák nagyobb fajlagos kötőkapacitással rendelkeznek hidrofil hatóanyagra nézve (CPFX), mint az MLV-k.*

3. a) A semleges molekula (koffein) kötődése nem befolyásolja a vezikulák felületi töltéssűrűségét, az esetleg kialakuló hidrogén-hidas kötés ellenére sem.

b) A különböző pH-értékeken különböző mikrospeciációs állapotokban jelenlévő hatóanyagok (CPFX) a pH-tól függően megváltoztathatják a vezikulák zéta-potenciálját, befolyásolva ezzel azok szerkezetét, a készítmény stabilitását.

   Ezért a liposzomális készítmények stabilitásának megtartásához vagy növeléséhez a hatóanyagok olyan vegyületeit érdemes használni, amelyek mellett megfelelő értékű zéta-potenciál tartható fenn. Amennyiben ez nem lehetséges, megoldást jelenthet a töltéssel rendelkező lipidek használata.

4. ESR mérések alapján a koffein kötődése nem okoz kimutatható változást a fejcsoportokhoz közeli régió fluiditásában, míg a CPFX magasabb hőmérsékleteken (39 ^{o}C felett) mérhető fluiditásnövekedést okoz.

   Egy hatóanyag bevitele egy adott összetételű liposzomális rendszerbe hatással lehet a membrán fluiditására, ami a liposzóma és lokális környezete közötti kölcsönhatások változásához vezethet. Egyes esetekben a fluiditásban létrehozott változás hőmérsékletfüggő, aminek gyakorlati jelentősége lehet a különböző

alkalmazási módok esetén (pl. a CPFX csak a bőr-, illetve a fiziológiás testhőmérséklet fölött növeli a membrán fluiditását).

5. *A hatóanyag leadását a hatóanyagok elektromosan töltött/töltetlen formái, azok kötődése a membránhoz, valamint a bezárt vizes térfogat nagysága és a liposzómák szerkezete is nagymértékben befolyásolja. A hatóanyag-leadásnak a liposzóma membránjára vonatkozó sebességi állandója egyszerű dialízis-kinetikai mérés alapján meghatározható, ha a dialízist leíró modellel mind a bezárt vizes fázis térfogatát, mind a liposzómamembránhoz kötődött anyagmennyiséget, valamint az esetleges inhomogén mintavételt is figyelembe vesszük.* Az általános farmakokinetikai elvekkel összhangban, a megfelelő tárolási kapacitású és leadási sebességű rendszer kiválasztásához adott liposzomális formulációk esetén külön-külön meg kell vizsgálni a hatóanyagok megoszlási és permeabilitási tulajdonságait.

6. *Kísérleti eredményeim arra utalnak, hogy egy fényérzékeny hatóanyagnak, pl. a modellként használt lomefloxacinnak, a fotobomlását befolyásolni lehet az LMFX-ciklodextrin-komplex liposzómába zárásával.* A lomefloxacin fotobomlását, valamint bomlási állandójának spektrális érzékenységét nemcsak a liposzómák jelenléte változtatja meg, hanem a ciklodextrin típusa, a CD-kel együtt jelenlévő liposzóma összetétele és szerkezete is. Ez arra utal, hogy a lomefloxacin és/vagy fototermékei olyan speciális kölcsönhatásba léphetnek a jelenlévő CD-kel vagy lipidekkel, amik a fotobomlás lezajlásában meghatározó szerepet játszó elektroneloszlást a lomefloxacinban és fototermékeiben megváltoztathatják.

   Megfigyeléseim szerint a lomefloxacin bomlási sebességének és esetleg a fototoxikus mellékhatások kialakulásának csökkentésére alkalmas lehet a DOPC-t tartalmazó lipidrendszer, illetve kis unilamelláris vezikulák használata.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Kaszás N, Bozó T, Budai M, Gróf P. (*2013*) Ciprofloxacin encapsulation into giant unilamellar vesicles: Membrane binding and release. J Pharm Sci, 102: 694-705. IF: 3,13

Budai L, Kaszás N, Gróf P, Lenti K, Maghami K, Antal I, Klebovich I, Petrikovics I, Budai M. (2013) Liposomes for topical use: Physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin. Sci Pharm, 81: *1151-1166.*

Kaszás N, Budai M, Budai L, Gróf P, Zimmer A, Klebovich I. (*2008*) A bezárási hatásfok növelésének lehetőségei liposzómába zárt lomefloxacinnál. Acta Pharm Hung, 78: 69-74.