

*На правах рукописи*

**ОГАНЕСЯН ЕРВАНД АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ НАНОСОМАЛЬНОЙ  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ РИФАМПИЦИНА**

**03.00.23 - Биотехнология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва – 2005**



Работа выполнена в Московской Медицинской Академии имени И.М. Сеченова

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук  
кандидат химических наук

Воротников Игорь Константинович  
Гельперина Светлана Эммануиловна

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук  
доктор химических наук,  
академик РАМН, профессор

Никитина Зоя Кимовна  
Швец Виталий Иванович

**Ведущая организация:**

Российский Химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Защита состоится «10 » мая 2005 года в «14» часов на заседании диссертационного совета Д 006.070.01 при Всероссийском НИИ лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР) РАСХН по адресу: 117216, г. Москва, ул. Грина, 7.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВНИИ лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР) РАСХН по адресу: 117216, г. Москва, ул. Грина, 7.

Автореферат разослан «10» апреля 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 006.070.01  
канд. с./х. наук

*Кирцова* М.В. Кирцова

2005-4  
47950

2064552

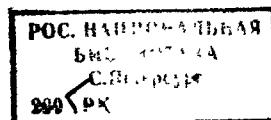
1

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Лечение внутриклеточных инфекций является серьезной проблемой, одним из решений которой может стать осуществление направленного транспорта антибиотиков в инфицированные клетки. Многие возбудители внутриклеточных инфекций, такие как *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* и др., способны выживать и размножаться в макрофагах, естественной функцией которых является захват и уничтожение микроорганизмов. В этом случае макрофаги становятся нишой для патогенных микроорганизмов и мишенью для химиотерапии, а результативность лечения зависит от того, удается ли доставить лекарственное вещество (ЛВ) в макрофаги в эффективных концентрациях.

Одним из путей решения этой проблемы является применение коллоидных систем доставки ЛВ на основе биодеградируемых наночастиц. Попадая в кровяное русло, наночастицы фактически повторяют путь бактерий, то есть фагоцитируются резидентными макрофагами в органах ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) и циркулирующими моноцитами, обеспечивая, таким образом, эффективный транспорт адсорбированных ЛВ в макрофаги. В клетке частицы подвергаются деградации под действием ферментов и выделяют ЛВ, что позволяет достичь высоких внутриклеточных концентраций. Кроме того, наночастицы способны проникать и накапливаться в очагах патологии, для которых характерны повышенная проницаемость капилляров и нарушения лимфотока (зоны воспаления и опухолевого роста). Эти свойства наночастиц, наиболее выраженные при внутривенном введении, легли в основу концепции о возможном повышении эффективности противобактериальных ЛВ с помощью наночастиц. Действительно, было показано, что наночастицы значительно повышают эффективность антибиотиков при лечении инфекций, для которых характерна внутриклеточная локализация возбудителей, таких как, например, сальмонеллез или листериоз (Pinto-Alphandary H et al., 2000).

В последнее время в литературе появились также данные о высокой активности наносомальных препаратов при лечении туберкулеза у мышей (Pandey R. et al., 2003). Однако эта область применения наночастиц мало изучена. В то же время, можно полагать, что создание наносомальных лекарственных форм позволит повысить эффективность и снизить токсичность применяемых в клинической практике противотуберкулезных средств. Это направление исследований приобретает особую актуальность в условиях



значительного роста заболеваемости туберкулезом легких во всех странах мира.

Среди синтетических биодеградируемых полимеров, используемых для получения наночастиц, интерес представляют полиалкилицианокрилаты. Наночастицы из полиалкилицианокрилатов обладают низкой токсичностью и эффективно сорбируют различные ЛВ (Vauthier C et al., 2003; Kreuter J., 1994). В водных растворах эти наночастицы образуют устойчивые коллоидные системы, пригодные для парентерального введения. Таким образом, наночастицы из полиалкилицианокрилатов являются перспективным носителем для создания коллоидных систем доставки ЛВ.

## ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать подходы к созданию наносомальной лекарственной форме рифампицина для внутривенного введения на основе наночастиц из полибутилцианоакрилата (ПБЦА); изучить фармакокинетику этой лекарственной формы.

*В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи.*

1. Разработать методику получения наносомальной формы рифампицина на основе наночастиц из ПБЦА; изучить влияние различных параметров процесса на характеристики наночастиц.
2. Изучить стабильность рифампицина в условиях формирования наночастиц.
3. Разработать методику анализа рифампицина в наносомальной форме и в биологических образцах.
4. Изучить фармакокинетику наносомального рифампицина в сравнении со стандартной лекарственной формой рифампицина.
5. Изучить влияние модификации поверхности наночастиц на фармакокинетику наносомального рифампицина.

## НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ

Впервые разработан подход к созданию наносомальной лекарственной формы на примере полибутилцианоакрилатных наночастиц с рифампицином.

Впервые изучены параметры процесса получения наносомальной лекарственной формы рифампицина путем анионной полимеризации бутилцианоакрилата в присутствии рифампицина.

Впервые изучена фармакокинетика наносомальной лекарственной формы рифампицина на основе наночастиц из ПБЦА. Показано, что модификация

наночастиц поверхностью-активными веществами (полоксамер 407 и полоксамин 908) позволяет целенаправленно менять биораспределение наносомального рифампицина.

## **ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ**

Показано, что применение наночастиц позволяет целенаправленно изменять фармакокинетику наносомального рифампицина, способствуя его распределению в органы ретикулоэндотелиальной системы. Можно полагать, что эта лекарственная форма будет эффективна при лечении инфекций, для которых характерна локализация возбудителей в органах РЭС (в том числе, туберкулеза).

Экспериментальные подходы, разработанные для оптимизации методов получения наносомальной формы рифампицина, могут быть использованы при создании других наносомальных препаратов.

Сформулирован ряд критериев для стандартизации наносомальных лекарственных форм для внутривенного введения и предложены соответствующие методы контроля качества.

Результаты фармакокинетического исследования могут быть использованы при выборе доз и режимов лечения в последующих биологических испытаниях наносомальной формы рифампицина.

## **АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

Российском Национальном Конгрессе «Человек и Лекарство» (Москва, 2004);

VII Российском съезде фтизиатров «Туберкулез сегодня» (Москва, 2003);

III Конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» (Москва, 2004);

I-ой Международной Конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2004 год)

31<sup>st</sup> Meeting of the Controlled Release Society (Honolulu, USA, 2004)

## **ПУБЛИКАЦИИ**

Основное содержание диссертации опубликовано в 6 печатных работах.

## СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты и их обсуждение», заключения и выводов. Диссертация изложена на ~~109~~ листах машинописного текста и содержит ~~38~~ рисунка, ~~3~~ таблицы. Список литературы состоит из ~~108~~ наименований.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение наночастиц и определение их физико-химических характеристик

Наночастицы получали методом эмульсионной полимеризации бутилцианоакрилата в водной среде. Для этого бутилцианоакрилат (Sicomet, Sichel-Werke GmbH, Германия) при перемешивании прибавляли к раствору стабилизатора (декстран-70 и/или плюроник F68) в водной соляной кислоте (pH 1,5-3). Рифампицин (0,27÷2,7 мг/мл) вводили в реакционную смесь до начала полимеризации или через 30 мин после прибавления мономера. Общее время полимеризации составляло 3 ч, после чего реакционную смесь нейтрализовали 0,1N NaOH; затем добавляли криопротектор маннит (3% в/о), фильтровали через стеклянный пористый фильтр, разливали по флаконам, замораживали и лиофилизовали в течение 24 ч (Alpha Christ 2-4).

Размер наночастиц определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) (Coulter N4MD, Coulter Electronics).

Степень сорбции рифампицина определяли как отношение количества рифампицина, связанного с наночастицами, к общему количеству рифампицина в лекарственной форме. Для этого после нейтрализации реакционной смеси или после ресуспенсирования лиофилизата наночастицы отделяли методом ультрафильтрации (микрофильтры Microcon 30 kDa) или ультрацентрифугирования (20000 об/мин, ультрацентрифуга J21, Beckman), затем проводили количественный анализ рифампицина в фильтрате/супернатанте методом спектрофотометрии или ВЭЖХ.

Относительную степень сорбции ЛВ наночастицами (% от концентрации ЛВ в полимеризационной среде) вычисляли как:

$$\text{Относительная сорбция ЛВ} = 100\% \times (C_i - C_f)/C_i, \text{ где}$$

$C_i$  - начальная концентрация рифампицина (мг/мл),

$C_f$  - концентрация рифампицина в супернатанте/фильтрате (мг/мл).

Количественное определение рифампицина в лиофилизированном препарате проводили методом УФ-спектрофотометрии после разрушения наночастиц в смеси диметилформамид/вода.

Стабильность рифампицина определяли методом обращеннофазной ВЭЖХ (хроматограф SP-800, Spectra Physics), длина волны детекции 254 нм, подвижная фаза – ацетонитрил-вода 1:1, трифторуксусная кислота 0,1%, ЭДТА 0,01%.

**Фармакокинетическое исследование.** В исследовании использовали экспериментальный образец наносомального рифампицина со следующими характеристиками: размер частиц – 620 нм, степень сорбции рифампицина 60%, соотношение ЛВ/полимер 1/7.

Использовали мышей самцов линии BALB/c массой 24-25 г (питомник РАМН «Столбовая», Москва). Животных разделили на четыре группы ( $n = 6$ ) и вводили внутривенно следующие лекарственные формы рифампицина: 1) стандартную лекарственную форму (рифампицин – лиофильный порошок для инъекций, Ферейн, Россия) [РИФ]; 2) наносомальный рифампицин [РИФ-НЧ]; 3) наносомальный рифампицин, модифицированный полоксамером 407 [РИФ-НЧ+Р407]; 4) наносомальный рифампицин, модифицированный полоксамином 908 [РИФ-НЧ+Р908].

Для модификации лиофилизированные наночастицы перед опытом ресуспендировали в 0,125% растворе ПАВ; раствор выдерживали 30 мин при 20°C.

Доза рифампицина составляла 27 мг/кг, доза ПАВ (полоксамера 407 или полоксамина 908) - 35 мг/кг, объем инъекции – 0,7 мл.

Через 5 мин; 1,0; 3,0; 5,0; 15,0 и 24,0 ч после введения препаратов животных умерщвляли декапитацией. Органы (легкие, печень, селезенка) отделяли, готовили навески  $100 \pm 1$  мг, прибавляли 0,5 мл дистиллированной воды и 50 мкл 0,1М фосфатного буфера (рН 7.4) и гомогенизировали. Гомогенат количественно переносили в пробирки, приливали 3,0 мл ацетонитрила и помещали в ультразвуковую баню на 15 мин для разрушения наночастиц. Аналогично готовили образцы плазмы. Затем все образцы центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин, фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и определяли концентрацию рифампицина в фильтрате методом ВЭЖХ (состав подвижной фазы: ацетонитрил - вода (65:35), трифторуксусная кислота 0,1%, ЭДТА Na-соль 0,075%).

Для характеристики фармакокинетики рифампицина в крови и органах мышей рассчитывали интегральный показатель площади под фармакокинетической кривой (AUC) (программа «Фарма», Холодов Л.Е., Дорохов В.В., 1989). Результаты приведены как «среднее арифметическое  $\pm$  доверительный интервал» ( $n = 6$ , уровень значимости 0,95).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительные эксперименты, проведенные нашей группой, продемонстрировали принципиальную возможность создания наносомальной лекарственной формы рифампицина на основе наночастиц из полибутилцианоакрилата. Наносомальный рифампицин проявил высокую эффективность при лечении сальмонеллеза и сепсиса у мышей (Скидан И.И. с соавт., 2003). Однако влияние технологических параметров на свойства наночастиц и стабильность рифампицина в условиях образования наночастиц не были изучены, также не было исследовано распределение наносомального препарата в организме.

Таким образом, целью настоящего исследования являлась оптимизация метода получения наносомальной лекарственной формы рифампицина для внутривенного введения, а также стандартизация экспериментальных образцов.

Сложность поставленных перед нами задач была обусловлена тем что, поскольку наносомальные препараты еще не вошли в клиническую практику, нет и нормативно-технической документации, определяющей требования к наносомальным формам для внутривенного введения. В соответствии с поставленными задачами мы сформулировали ряд критериев, позволяющих на данном этапе исследований стандартизовать экспериментальные образцы наносомальной лекарственной формы рифампицина, а также соответствующие методы контроля.

При разработке требований мы руководствовались следующими соображениями (таблица 1):

- 1) размер частиц должен быть значительно меньше диаметра наиболее мелких капилляров кровеносной системы, который, по разным оценкам, составляет 4 – 7 мкм;
- 2) по литературным данным, наиболее устойчивыми являются суспензии с размером частиц <1 мкм;
- 3) эффективность наносомального препарата в существенной степени зависит от того, насколько полно ЛВ сорбировано наночастицами. Таким образом, степень сорбции ЛВ (доля ЛВ, содержащегося в наночастицах) является одним из основных критериев для оптимизации процесса;
- 4) стабильность рифампицина: при разработке требований к содержанию примесей в лекарственной форме мы руководствовались нормативной документацией для существующих лекарственных форм рифампицина;
- 5) использование твердой (лиофилизированной) наносомальной формы рифампицина позволяет увеличить сроки ее хранения. Срок хранения лиофилизированной наносомальной формы рифампицина при 4°C не менее 6 месяцев.

## Изучение стабильности рифампицина, определение примесей.

Образование наночастиц и включение в них рифампицина происходит в результате полимеризации бутилцианоакрилата. Процесс происходит в относительно мягких условиях (водная среда, pH 2-3, 20°C, время реакции 2-3 ч). В то же время известно, что рифампицин может в кислой среде подвергаться гидролизу с образованием дезоксиформил-рифампицина (РИФ-SV), а в слабощелочной среде – окисляться до хинона. Кроме того, бутилцианоакрилат обладает высокой реакционной способностью и может вступать в реакцию с рифампицином, что приведет к образованию побочных продуктов. В связи с этим необходимо было изучить стабильность рифампицина в кислой среде и в условиях полимеризации бутилцианоакрилата.

**Таблица 1.** Основные характеристики наносомальной лекарственной формы рифампицина для внутривенного введения

№	Параметр	Норма	Тест
1	Средний размер частиц в суспензии	Не превышает 700 нм; частицы >1000 нм отсутствуют	ФКС
2	Стабильность наносуспензии	Не менее 8 часов при 20°C	ФКС
3	Степень сорбции рифампицина в наночастицах	Не менее 50% при соотношении рифампицин/полимер не менее 1:20	ВЭЖХ или спектрофотометрия
4	Стабильность рифампицина	Общее содержание примесей не превышает 6%	ВЭЖХ
5	Устойчивость наночастиц к лиофилизации	При добавлении растворителя к лиофилизату образуется устойчивая коллоидная система (опалесцирующая жидкость) без видимых агломератов и/или осадка. Размер частиц соответствует требованию №1	Визуальный контроль, ФКС

Стабильность рифампицина изучали методом ВЭЖХ. Показано, что рифампицин относительно устойчив в кислой среде (рН 1,68, комнатная температура): убыль площади его пика на хроматограмме не превышала 3-4% в течение 3 часов.

Стабильность рифампицина в условиях полимеризации оценивали по количеству примесей в лиофилизированном препарате. Показано, что площадь посторонних пиков на хроматограмме не превышала 3%, при этом хинон и дезоксиформилрифампицин обнаруживались в следовых количествах.

Таким образом, можно ожидать, что в указанных условиях содержание примесей рифампицина в наносомальном препарате не превысит значений, установленных для существующих лекарственных форм рифампицина (ФСП 420053171901; НД 42-9301-98; ФС 42-2058-97) – до 3% рифампицина хинона и 1,5±4% прочих примесей).

**Изучение стабильности наносуспензии.** Методом ФКС было показано, что при хранении супензии в течение 24 ч при 20°C размер частиц практически не менялся, что свидетельствует об устойчивости коллоидной системы в данных условиях.

**Определение степени сорбции.** Для определения степени сорбции необходимо отделить наносомальный (то есть сорбированный наночастицами) рифампицин от «свободного». Для отделения наночастиц использовали ультрафильтрацию или ультрацентрифугирование. Мы провели ряд экспериментов по сравнению этих методов. В первом случае мембранные фильтры подбирали таким образом, чтобы: а) сорбция рифампицина была минимальной; б) фильтр не пропускал наночастицы; в) можно было анализировать образцы объемом не более 0,5 мл. Мембранные микрофильтры Microcon 30 kDa полностью удовлетворяли этим условиям; потери ЛВ на фильтре были сопоставимы с ошибкой спектрофотометрического определения (3-5%). Недостатком метода является его неэкономичность, обусловленная высокой стоимостью мембранных фильтров.

В случае ультрацентрифугирования, в режиме, необходимом для отделения наночастиц (50 мин, 20000g), концентрации свободного вещества в супернатанте оказываются выше (в 1,5-2 раза для образцов с исходным содержанием рифампицина 0,27-2,72 мг/мл), а степень сорбции, соответственно, ниже значений, получаемых при ультрафильтрации. Возможно, это связано с деформацией наночастиц при большом ускорении. Другим объяснением может быть неполное осаждение наночастиц.

В связи с этим для определения степени сорбции ЛВ в наночастицах использовали ультрафильтрацию.

**Количественное определение рифампицина** в лиофилизированном препарате проводили методом УФ-спектрофотометрии после разрушения наночастиц в смеси диметилформамид/вода.

## Влияние технологических параметров на свойства наночастиц

Наночастицы из ПАЦА получают методом анионной полимеризации в водной среде. Для того чтобы формировались наночастицы, полимеризация должна проходить медленно и в присутствии стабилизаторов; тогда при достижении определенной молекулярной массы полимера образуется наносусспензия. Однако в водной среде этот процесс инициируется гидроксильными ионами, в связи с чем реакцию, как правило, проводят при  $pH \leq 3$  (Kreuter, 1994). В полимеризации могут также принимать участие нуклеофильные агенты (например, лекарственные вещества с нуклеофильными группами). Кроме того, процесс полимеризации и формирования наночастиц зависит от таких параметров как тип/концентрация мономера, стабилизатора, ЛВ, очередность добавления компонентов. Очевидно, что оптимизация получения наночастиц является сложной задачей.

Поскольку наиболее важными показателями качества наносомального препарата, определяющими его эффективность и поведение в организме, являются размер частиц и степень сорбции ЛВ, мы изучили влияние некоторых технологических параметров синтеза на эти свойства наночастиц.

*Выбор времени добавления рифамицина в реакционную среду.* ЛВ можно сорбировать на готовых частицах, но наиболее эффективным методом сорбции является проведение полимеризации в присутствии ЛВ. Однако введение рифамицина в полимеризационную среду до бутилцианоакрилата оказалось невозможным, поскольку приводило к образованию аморфной полимерной массы. Возможной причиной может быть следующее. Известно, что при добавлении мономера в водную среду он образует неустойчивую эмульсию, однако уже через 30 минут реакционная смесь становится гомогенной (Behan N et al., 2001). При этом собственно полимеризация и процесс образования наночастиц к этому времени еще далеко не завершены. Вероятно, рифамицин диффундирует в первичные капли мономера, инициируя обвальную полимеризацию.

Исходя из этого, рифамицин вводили в реакционную среду через 30 мин после начала полимеризации, когда весь мономер растворен в реакционной среде. Этот прием позволил избежать больших потерь полимера, наночастицы же получались удовлетворительного размера.

*Выбор pH полимеризационной среды.* Из рисунка 1 видно, что снижение pH среды с 3 до 1,5 приводит к повышению среднего размера наночастиц с 250 до 500 нм. Подобная зависимость типична для наночастиц из ПАЦА (Kreuter 1994).

Как видно из рисунка 2, при повышении pH с 2 до 3 степень сорбции рифамицина значительно падает. Возможно следующее объяснение.

Поскольку повышение pH ускоряет процесс формирования наночастиц, то при pH~3 к моменту добавления рифампицина частицы уже в основном сформировались, и диффузия рифампицина внутрь частицы затруднена. В этом случае сорбция становится менее эффективной. В связи с этим, в дальнейших экспериментах мы проводили полимеризацию при pH 2, то есть в условиях, когда степень сорбции рифампицина максимальна.

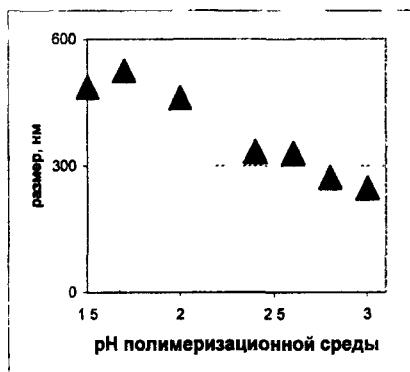


Рисунок 1. Влияние pH полимеризационной среды на средний размер наночастиц (с (РИФ) = 1 мг/мл)

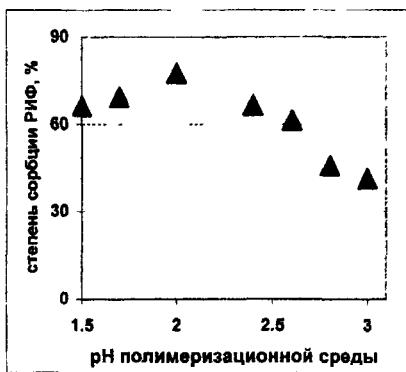


Рисунок 2. Влияние pH полимеризационной среды на степень сорбции рифампицина (с (РИФ) = 1 мг/мл)

*Выбор концентрации рифампицина.* Основной критерий для выбора оптимальных условий синтеза наносомальной лекарственной формы – это эффективность сорбции рифампицина наночастицами.

Мы изучили зависимость сорбции рифампицина от его исходной концентрации в реакционной среде (pH2) в диапазоне 0,27÷2,7. Исходная концентрация бутилцианоакрилата во всех опытах составляла 10 мг/мл.

На рисунке 3 показана зависимость степени сорбции от исходного соотношения рифампицина/полимер в реакционной смеси. Видно, что с ростом этого соотношения степень сорбции падает. В то же время, с ростом соотношения рифампицина/полимер растет и нагрузка рифампицина на наночастицы.

Изотерма сорбции (зависимость количества сорбированного рифампицина от концентрации свободного рифампицина) носит линейный характер (рисунок 4), т.е. в исследованном диапазоне концентраций не достигается насыщения полимерной матрицы рифампицином.

Несмотря на высокую степень сорбции, синтез наночастиц при концентрациях рифампицина  $<1$  мг/мл сочли нецелесообразным, т.к. соотношение рифампицин/полимер в этих условиях слишком низко (менее 1/10); с другой стороны, с повышением исходной концентрации рифампицина ( $\geq 0,72$  мг/мл) снижалась его растворимость в полимеризационной среде. В связи с этим, оптимальной исходной концентрацией рифампицина в полимеризационной среде мы сочли 1,5 мг/мл.

Следует отметить, что в присутствии рифампицина размер наночастиц несколько увеличивается по сравнению с «пустыми» наночастицами, полученных в тех же условиях (250-300 нм) (рисунок 5). Необходимо отметить, что при любой концентрации в исследованном диапазоне размер наночастиц оказывается удовлетворительным для внутривенного введения.

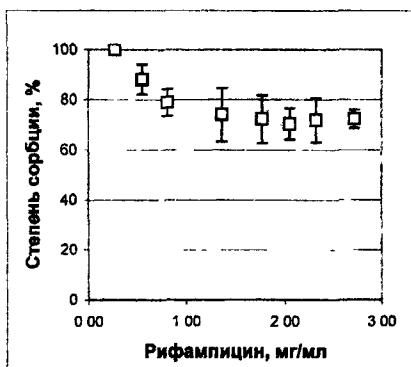


Рисунок 3. Влияние исходной концентрации рифампицина на степень сорбции (рН полимеризационной среды = 2),  $n=3$

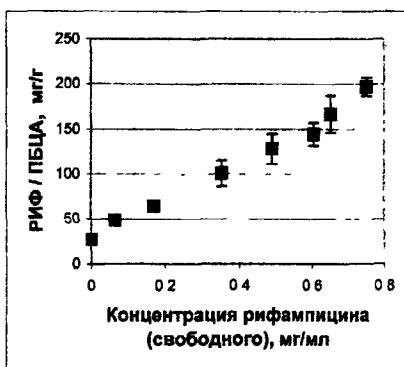


Рисунок 4. Изотерма сорбции рифампицина (рН полимеризационной среды = 2),  $n=3$

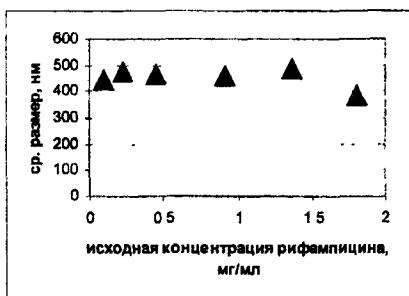


Рисунок 5. Зависимость размера наночастиц от исходной концентрации рифампицина (рН полимеризационной среды = 2)

*Влияние ПАВ на свойства наночастиц.* Размер наночастиц является важным параметром, в значительной степени определяющим их судьбу в организме, поэтому мы изучили возможность получения наночастиц различного размера. Известно, что присутствие неионных ПАВ в полимеризационной среде влияет на размеры образующихся полиакрилцианоакрилатных наночастиц (Reddy, 2004). В качестве ПАВ часто используют блоксополимеры оксиэтилена и оксипропилена – полоксамины или полоксамеры (Moghimi, 2001).

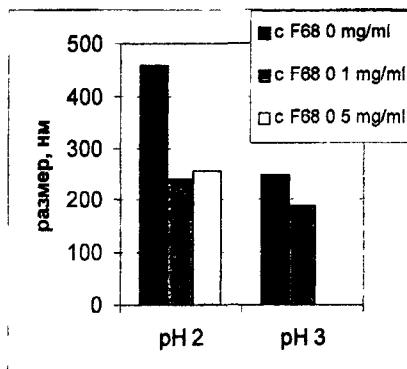


Рисунок 6 Влияние концентрации плюроника F68 на размер наночастиц (с (РИФ) = 1мг/мл)

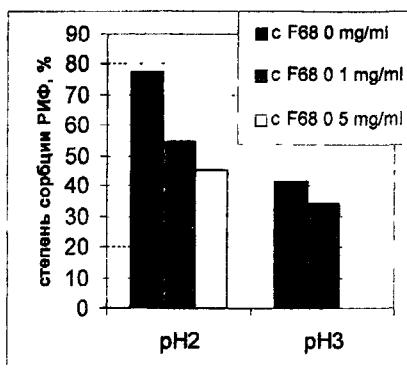


Рисунок 7. Влияние концентрации плюроника F68 на степень сорбции рифампицина (с (РИФ) = 1мг/мл)

Мы изучили влияние полоксамера 188 (плюроника F68) на размер полибутилцианоакрилатных наночастиц с рифампицином. Как показали наши эксперименты, использование плюроника F68 позволяет значительно снизить размер наночастиц (с 450 нм до 200-250 нм) (рисунок 6), что коррелирует с данными Seijo B. с соавт. Однако с введением плюроника F68 в полимеризационную среду падает степень сорбции рифампицина (рисунок 7). Известно, что полоксамеры способны сорбироваться на поверхности наночастиц, создавая гидрофильную оболочку, что, вероятно, и влияет на сорбцию рифампицина.

Поэтому, исходя из того, что степень сорбции ЛВ в наночастицах является одним из основных параметров, определяющих эффективность наносомальных препаратов, на данном этапе работы мы отказались от полимеризации в присутствии плюроника F68.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют рекомендовать следующие условия получения наносомальной формы рифампицина на основе наночастиц из ПБЦА:

состав полимеризационной среды 0,01N HCl, дектран 1%;

концентрация бутилцианоакрилата 1%;

концентрация рифампицина 1,5 мг/мл;

время добавления рифампицина – через 30 минут после начала полимеризации.

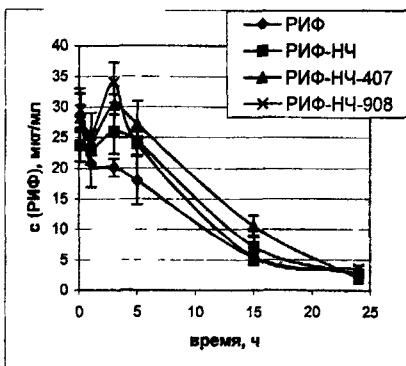


Рисунок 8. Уровень рифампицина в плазме крови.

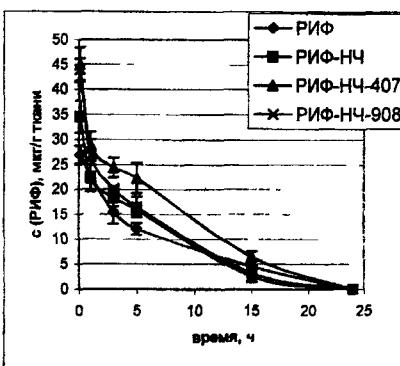


Рисунок 9. Уровень рифампицина в легочной ткани.

Следует отметить, что методика отличается хорошей воспроизводимостью: средний размер 400-600 нм, степень сорбции 55-65%, выход по рифампицину 85-90%.

Предварительная оценка стабильности наносомальной формы рифампицина показала, что через 12 месяцев хранения лиофилизата при 4°C и естественной влажности размер частиц несколько увеличился (на 20-30%), однако не превысил установленного нами предела (<1 мкм).

### Изучение фармакокинетики наносомального рифампицина

#### I. Сравнительная фармакокинетика стандартной и наносомальной лекарственных форм.

Известно, что при внутривенном введении коллоидные частицы распределяются в тканях и органах РЭС, в основном в печени, селезенке и легких. При внутриклеточных инфекциях (в том числе и туберкулезе) эти

органы являются очагом инфекции. Нашей задачей было выяснить, можно ли с помощью наночастиц повысить концентрацию рифампицина в РЭС-органах.

Фармакокинетическое исследование стандартной лекарственной формы рифампицина, проведенное на мышах Balb/c, показало, что концентрация антибиотика в плазме крови плавно убывала в течение 24 ч (рисунок 8). Применение наночастиц привело к изменению параметров фармакокинетики рифампицина: в интервале от 5 мин до 5 ч наблюдалось некоторое повышение концентрации рифампицина в плазме, и только после этого концентрация антибиотика начинала снижаться

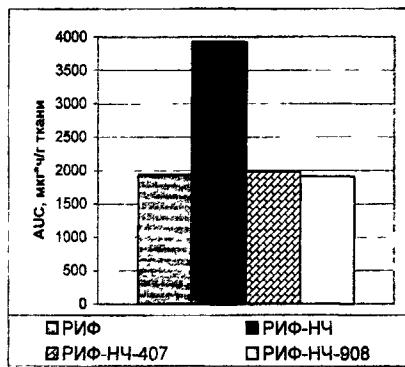


Рисунок 10. Площадь под фармакокинетической кривой (AUC) рифампицина для печени

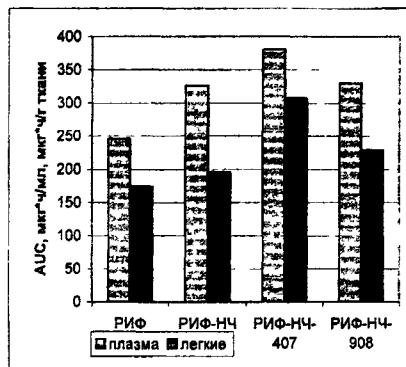


Рисунок 11. Площадь под фармакокинетической кривой рифампицина (AUC) для плазмы и легких

Как и следовало ожидать, наночастицы способствуют накоплению рифампицина в органах РЭС: отмечено увеличение интегрального показателя AUC для легких, печени и селезенки (рисунки 10 - 12). Рост интегрального показателя накопления антибиотика AUC в легких составил 13% по сравнению со стандартной лекарственной формой. В то же время, накопление печени было более значительным - в два раза по сравнению со стандартной лекарственной формой. Следует отметить, что максимальная концентрация рифампицина в печени достигалась через 1 ч после введения, в то время как пиковая концентрации в плазме достигается позже - в интервале от 3 до 5 ч. Возможно, это объясняется медленным высвобождением рифампицина из печени, которая играет роль своеобразного депо. Для свободного же рифампицина процесс распределения, как указано выше, проходит быстро.

В связи с этим целью была поставлена задача повысить концентрацию рифампицина в легких при одновременном снижении его концентрации в печени.

## II. Влияние модификации поверхности наночастиц на биораспределение наносомального рифампицина.

Эффективным способом уменьшить накопление наночастиц в печени является модификация их поверхности веществами, препятствующими опсонизации НЧ белками плазмы. Такая модификация предотвращает быстрый захват НЧ макрофагами и тем самым уменьшает их накопление в органах РЭС (Moghimi, 2003). За счет этого время циркуляции наночастиц увеличивается (так называемый эффект стерической стабилизации НЧ). Одними из наиболее эффективных модификаторов являются блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида. Их макромолекулы содержат гидрофильные и гидрофобные сегменты, что позволяет этим веществам, с одной стороны, удерживаться на гидрофобной поверхности частиц, а с другой - создавать стерическое «облако», препятствующее контакту частиц с белками плазмы.

Среди соединений этого ряда, предложенных для стерической стабилизации наночастиц, интерес представляют полоксамер 407 (Pluronic F127) и полоксамин 908 (Tetronic 908), поскольку из литературы известно, что эти ПАВы позволили снизить концентрацию пустых полистирольных частиц в печени в 10 раз (Armstrong, 1997). На основании этого для дальнейших исследований нами были выбраны полоксамер 407 (P407) и полоксамин 908 (P908).

Для того чтобы изучить, каким образом модификация полибутилцианоакрилатных наночастиц этими ПАВ влияет на фармакокинетику рифампицина, наночастицы перед введением инкубировали в течение 30 мин в 1% растворе ПАВ (РИФ-НЧ+P407) и (РИФ-НЧ+P908).

Полученные результаты представлены на рисунках 8 - 13. Видно, что полоксамер 407 и полоксамин 908 существенно меняют фармакокинетику наносомального рифампицина в плазме крови. У групп животных, получавших модифицированные наночастицы, интегральный показатель AUC в плазме повысился на 30 – 50% по сравнению с группами, получавшими стандартный препарат. Рост концентрации рифампицина в плазме сопровождался повышением его накопления в легких: на 75% для лекарственной формы, модифицированной полоксамером 407, и на 30% - полоксамином 908 (рисунок 11). При этом накопление в печени значительно снизилось - в два раза по сравнению с немодифицированным наносомальным рифампицином (рисунок 10).

Таким образом, модификация наночастиц исследованными ПАВ позволяет добиться повышения концентрации рифампицина в легких при одновременном снижении его накопления в печени. Насколько нам известно, подобные данные получены впервые. Предыдущие исследователи изучали влияние блок-сополимеров на биораспределение пустых наночастиц, но не связанного с ними ЛВ.

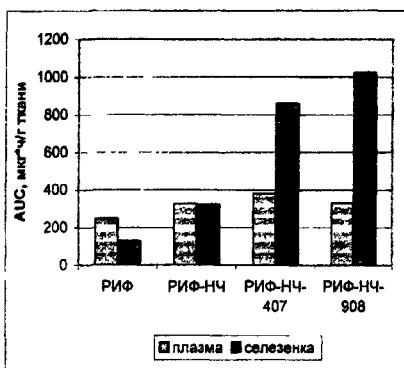


Рисунок 12. Площадь под фармакокинетической кривой (AUC) рифампицина для селезенки

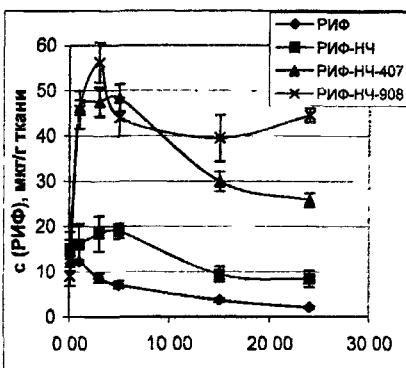


Рисунок 13. Накопление рифампицина в селезенке.

Интересно, что модификация НЧ полоксамином 908 и полоксамером 407 приводит также и к необычно высокому накоплению РИФ в селезенке по сравнению как со свободным, так и с немодифицированным наносомальным рифампицином (рисунки 12, 13). Площадь под кривой для группы РИФ-НЧ-П908 была в 8 раз, а для группы РИФ-НЧ-Р407 – в 6-7 раз выше, чем для группы РИФ, в то время как у животных, получивших РИФ-НЧ, этот показатель только в 2,5 раз выше, чем у группы РИФ (рисунок 12). Подобный эффект наблюдали также для пустых полистирольных наночастиц, модифицированных этими ПАВ (Armstrong, 1997).

Таким образом, полоксамер 407 и полоксамин 908 существенно влияют на фармакокинетику наносомального рифампицина, позволяя повысить его концентрацию в легких и в плазме и снизить его накопление в печени (по сравнению с немодифицированной наносомальной лекарственной формой). Последнее особенно важно, поскольку одним из побочных эффектов рифампицина является его гепатотоксичность.

Значительное повышение концентрации антибиотика в легких, печени и селезенке позволяет предположить, что модифицированная наносомальная лекарственная форма рифампицина проявит высокую активность при лечении внутриклеточных инфекций, в том числе туберкулеза.

### Выводы

1. Разработаны подходы к стандартизации экспериментальных наносомальных лекарственных форм. Для стандартизации предложены следующие параметры и аналитические методы контроля: размер частиц (фотонная корреляционная спектроскопия), степень сорбции (спектрофотометрическое определение свободного рифампицина после отделения наночастиц методом ультрафильтрации); количественное определение рифампицина (ВЭЖХ или спектрофотометрия после растворения полимерной матрицы и других ингредиентов).

2. Отработана методика получения наносомальной лекарственной формы рифампицина на основе биодеградируемых наночастиц из полибутилцианоакрилата. Оптимизация ряда технологических параметров (рН полимеризационной среды, концентрация рифампицина, концентрация ПАВ) позволила получить лекарственную форму, удовлетворяющую установленным нами критериям: размер частиц не превышал 1 мкм при степени сорбции 60%.

3. Показано, что рифампицин стабилен в процессе полимеризации; наносомальный препарат можно лиофилизировать.

4. Применение неионогенного ПАВ (плюроник F68) в качестве стабилизатора позволяет значительно снизить размеры НЧ, однако в случае РИФ приводит также к снижению степени сорбции.

5. Впервые изучена фармакокинетика наносомальной лекарственной формы рифампицина на основе наночастиц из ПБЦА. Показано, что применение наночастиц позволяет модифицировать фармакокинетику антибиотика при внутривенном введении. Основным местом локализации наносомального рифампицина при внутривенном введении являются печень и селезенка. Интегральные показатели накопления AUC по сравнению со свободным рифампицином возрастают в печени в 2 раза, в селезенке в 2,5 раз. Интегральный показатель накопления в плазме повышается в 1,3 раза по сравнению со стандартным рифампицином.

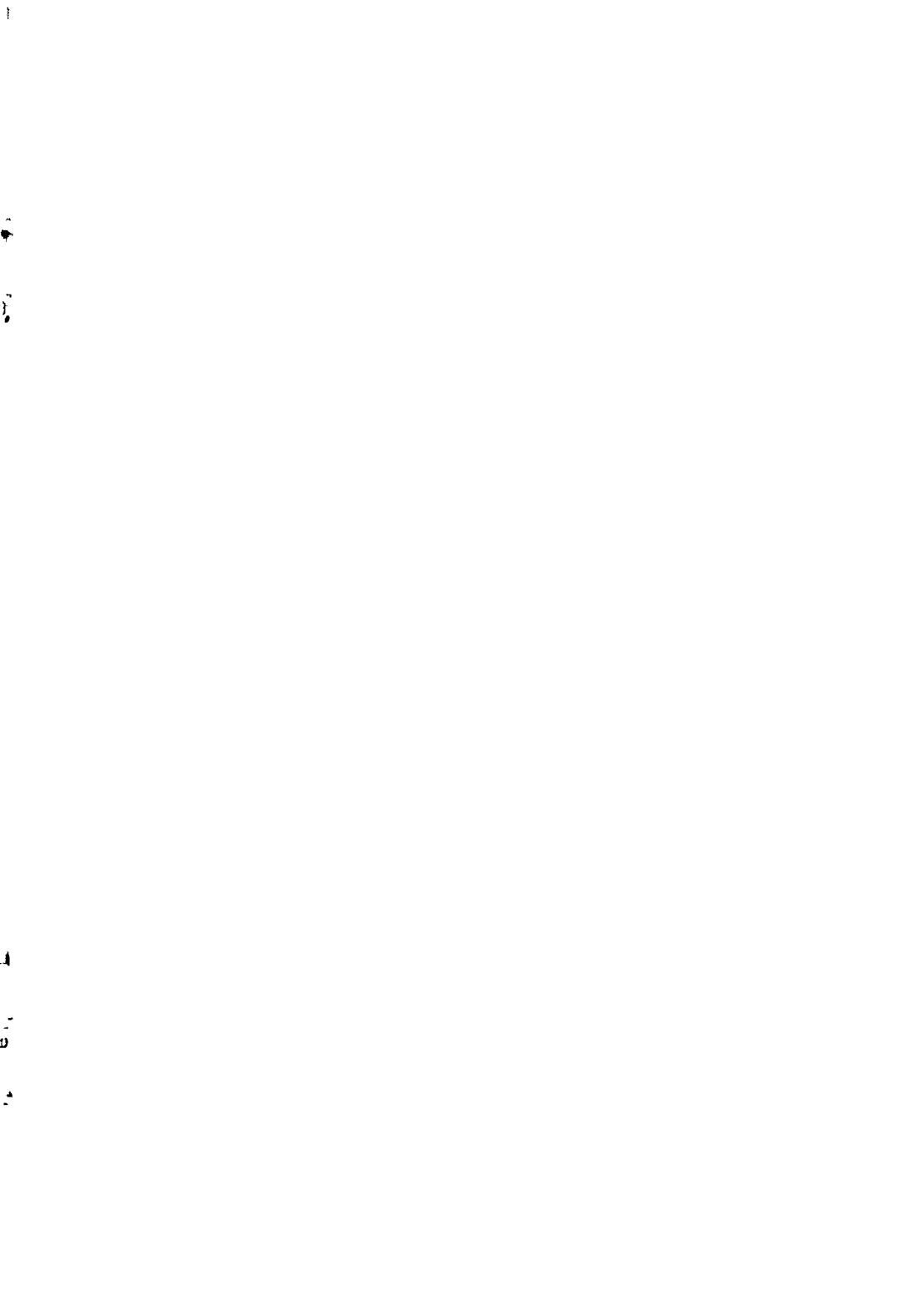
6. Впервые показано, что модификация поверхности наночастиц полоксамером 407 позволяет повысить уровень антибиотика в легких (в 1,8 раз), при этом значительно снижается накопление наносомального рифампицина в печени. Аналогичный эффект получен при модификации

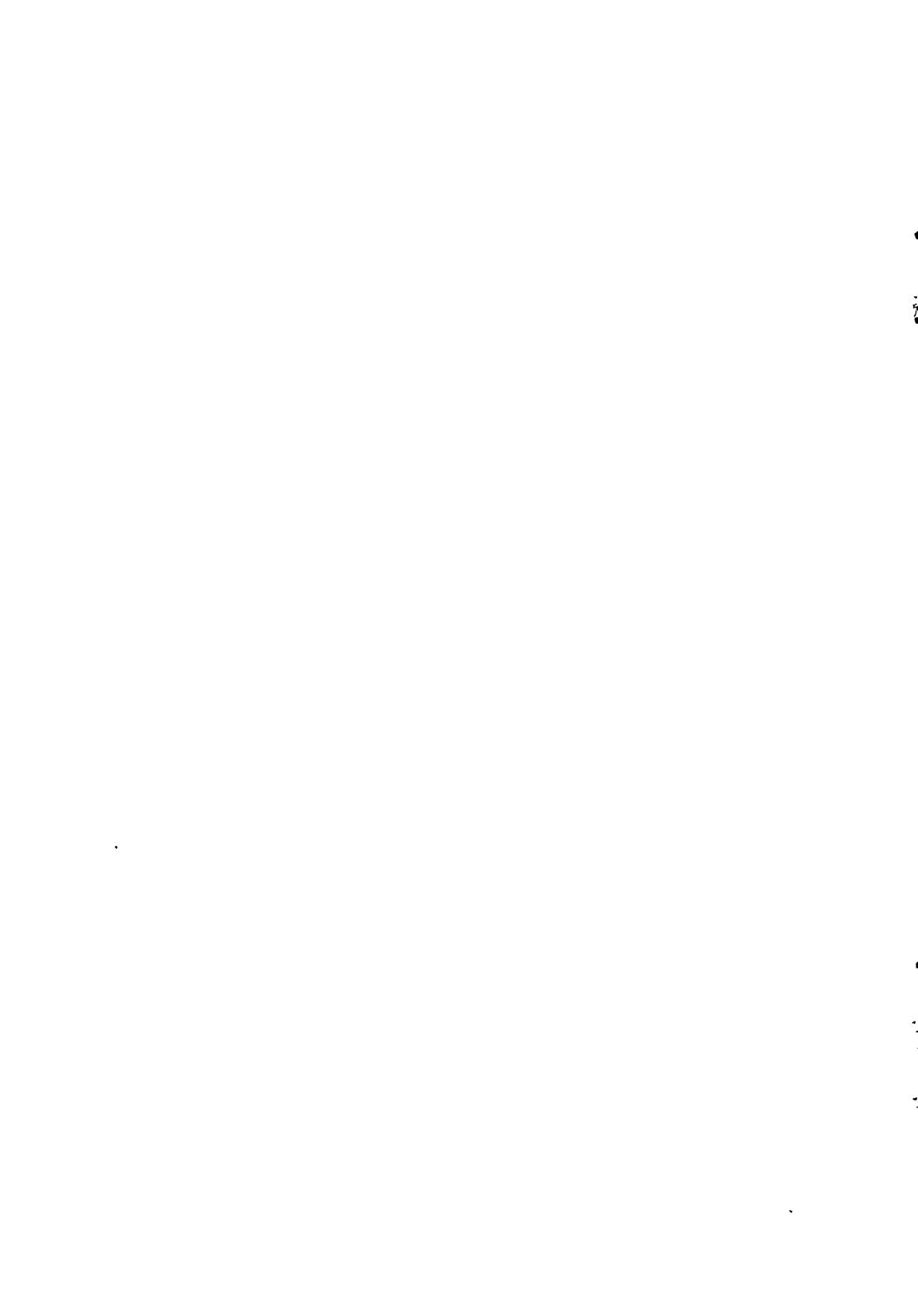
наночастиц полоксамином 908: накопление рифампицина в легких повышается в 1,5 раза.

7 Наносомальный рифампицин, модифицированный полоксамером 408, можно рекомендовать для дальнейшего изучения возможности доставки антибиотиков в легочную ткань.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации.**

1. Гельперина С.Э., Скидан И.Н., Анисимова Е.В., Максименко О.О., Оганесян Е.А., Хейфец Л.Б. Повышение активности антибиотиков с помощью биодеградируемых полимерных наночастиц // Материалы VII Российского съезда фтизиатров. – Москва, 2003. – С.331.
2. Оганесян Е.А. Новая лекарственная форма рифампицина для направленного транспорта в альвеолярные макрофаги // Материалы III Конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины». – Москва, 2004. – С.354-355.
3. Оганесян Е.А., Максименко О.О., Свешников П.Г., Будько А.П., Северин Е.С., Хейфец Л.Б., Гельперина С.Э. Разработка наносомальных лекарственных форм антибиотиков на основе полиалкилцианоакрилатов // Тезисы докладов XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва, 2004. – С. 212.
4. Gelperina S., Budco A., Oganesyan E., Maximenko O., Vanchugova L., Shipulo E., Sveshnikov P., Severin E., Kisich K., Heifets L. Biodistribution study of rifampicin bound to poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles // Transact. 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the Controlled Release Society.- Honolulu, 2004. – № 518.
5. Оганесян Е.А., Максименко О.О., Свешников П.Г., Будько А.П., Северин Е.С., Хейфец Л.Б., Гельперина С.Э. Разработка наносомальной лекарственной формы рифампицина на основе полиалкилцианоакрилатов // Материалы I Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность». – Москва, 2004. – С. 91.
6. Гельперина С.Э., Оганесян Е.А., Свешников П.Г, Северин Е.С., Хейфец Л.Б. Применение наносомальных препаратов для лечения внутриклеточных инфекций // Ремедиум. – № 12. – 2004. – С. 43-44.





Принято к исполнению 08/04/2005  
Исполнено 09/04/2005

Заказ № 748  
Тираж: 100 экз..

---

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900  
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93  
(095) 747-64-70  
(095) 318-40-68  
[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

РНБ Русский фонд

2005-4  
47950

2490  
22 АПР 2005