

Климова Ольга Владимировна

**Разработка новой наносомальной лекарственной формы
лемефлоксацина на основе биodeградируемых
полимеров.**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

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

Москва – 2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (ГОУ ВПО Первый МГМУ) на кафедре биологической химии лечебного факультета (заведующий чл.-корр РАН, проф., д.х.н. Северин С. Е.)

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН,
доктор химических наук, профессор

Евгений Сергеевич Северин

Официальные оппоненты:

академик РАН,
доктор биологических наук, профессор

Алексей Михайлович Егоров

доктор биологических наук, профессор

Николай Николаевич Чернов

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН

Защита состоится «12» апреля 2011 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан «9» марта 2011 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Д.501.001.21,

кандидат биологических наук



Пискункова Н.Ф.

Общая характеристика работы

Актуальность темы.

В настоящее время лечение внутриклеточных инфекций и опухолевых заболеваний является одной из наиболее важных проблем современной медицины. На пути решения этой проблемы возникает немалое количество трудностей, так как используемые лекарственные вещества (ЛВ) обладают невысокой эффективностью наряду со значительной токсичностью, и к ним быстро развивается бактериальная резистентность. Поиск новых более эффективных лекарственных средств (ЛС) - это длительный и весьма дорогостоящий процесс. В связи с этим актуальной проблемой является разработка новых лекарственных форм (ЛФ) для повышения эффективности уже имеющихся и активно использующихся в клинической практике субстанций. Одним из перспективных направлений повышения эффективности, снижения побочных эффектов ЛВ и преодоления лекарственной резистентности представляется использование полимерных наночастиц (НЧ). Также с помощью НЧ становится возможным контролировать высвобождение ЛВ, что позволит, во-первых, создать на их основе пролонгированные ЛФ, во-вторых, поддерживать внутриклеточную концентрацию ЛВ на оптимальном уровне.

Данная концепция была неоднократно подтверждена экспериментально, и в настоящее время имеется значительное количество работ по этой тематике, в частности, публикации о высокой эффективности наносомальных препаратов в лечении туберкулеза, опухолевых заболеваний и т. д.

Среди используемых для получения НЧ полимеров особый интерес представляют сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA). НЧ из данного вида полимеров эффективно сорбируют различные ЛВ, быстро биodeградируют, высвобождая ЛВ, обладают низкой токсичностью и хорошо выводятся из организма. Они также способны образовывать устойчивые коллоидные системы, пригодные для парентерального введения. Таким образом, НЧ из сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) являются перспективным носителем для создания коллоидных систем доставки ЛВ.

При анализе литературных данных было выяснено, что наиболее часто встречающимися в научной литературе фторхинолонами, используемыми для создания микро- и наносомальных ЛФ направленного действия, являются ципрофлоксацин и моксифлоксацин. Однако, еще не было сделано ни одной попытки создания наносомальной ЛФ на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот такого фторхинолона, как ломефлоксацин. Ломефлоксацин является одним из наиболее активных современных антибактериальных препаратов группы фторхинолонов. Введение ломефлоксацина в состав НЧ позволит значительно изменить его свойства, существенно расширить антибактериальную активность и улучшить фармакокинетические свойства данного ЛВ. Наличие в молекуле ломефлоксацина двух атомов фтора и метильной группы в пиперазиновом ядре требует индивидуального подхода к созданию его наносомальной ЛФ, а также

разработки оригинальных методик его качественного и количественного определения как в составе наносомальной ЛФ, так и в биологических образцах. В виду изменения свойств данного ЛВ потребуется также тщательное изучение его специфической и антибактериальной активности и изменений в распределении по органам и тканям во времени.

Цель работы:

Целью данной работы является разработка биотехнологического получения ломефлоксацина, иммобилизованного на НЧ из биodeградируемых полимеров для повышения его эффективности, снижения выраженности побочных эффектов, а также обеспечения пролонгированного действия ЛВ.

Задачи:

-осуществить иммобилизацию ЛВ на НЧ и оптимизировать технологию синтеза наносомальной ЛФ.

-разработать методику качественного и количественного определения ломефлоксацина в наносомальной ЛФ, в биологических образцах. Изучить стабильность ломефлоксацина в условиях его иммобилизации на НЧ.

-изучить специфическую активность химиотерапевтического ЛП на выбранных моделях с использованием микроорганизмов в нативном состоянии, и после сорбции на НЧ.

- изучить скорость высвобождения ЛВ из матрицы полимера-носителя *in vitro* и *in vivo* (изучение пролонгированного эффекта).

-изучить распределение ЛВ по органам и тканям с целью выявления изменения фармакокинетических параметров ломефлоксацина, ассоциированного с полимерными НЧ, полученными на основе сополимеров молочной и гликолевой кислоты.

Научная новизна и практическая значимость работы.

Впервые разработан подход к созданию наносомальной ЛФ ломефлоксацина на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA), включающий в себя разработку оптимальных параметров синтеза для получения стабильной и воспроизводимой ЛФ, а также методики качественного и количественного определения ломефлоксацина в наносомальной ЛФ и в биологических образцах.

Впервые изучен механизм высвобождения лекарственного вещества из НЧ *in vitro* и *in vivo* и специфическая активность наносомальной ЛФ ломефлоксацина на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA).

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

Результаты изучения механизма высвобождения ЛВ из НЧ *in vitro* и *in vivo*, а также результаты изучения распределения наносомального ломефлоксацина по органам и

тканям могут быть использованы при выборе доз и режимов лечения в последующих биологических испытаниях наносомальной формы ломефлоксацина.

Связь Цели и задач исследования с федеральными целевыми программами РФ.

Работа выполнена в Первом МГМУ им. И.М. Сеченова на кафедре биологической химии лечебного факультета в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» по приоритетному направлению «**Индустрия наносистем и материалов**»

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Принципиальная возможность создания наносомальной ЛФ ломефлоксацина, получаемой на основе биodeградируемых полимеров и обладающей повышенной эффективностью, менее выраженными побочными эффектами, а также обеспечивающей пролонгированное действие ЛВ.

2. Иммуобилизованный на НЧ ломефлоксацин сохраняет, а в случае с некоторыми микроорганизмами даже увеличивает антибактериальную активность.

3. Иммуобилизация ломефлоксацина на НЧ приводит к его перераспределению по органам и тканям живого организма.

Личный вклад автора

Соискатель самостоятельно провела все эксперименты по получению НЧ с иммуобилизованным на них ломефлоксацином, в динамике оценила перераспределение ЛВ по органам и тканям в сравнении с контролем. Интерпретация полученных результатов и их статистическая обработка также осуществлены автором.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих конференциях, конгрессах и научных школах:

- Всероссийская научная школа для молодежи «Наномедицина и нанотоксикология» 2009

- VI международная конференция «Молекулярная медицина и биобезопасность» 2009

- Итоговая научная конференция молодых исследователей с международным участием «Татьянин день» 2010

- XVII Российский национальный конгресс «Человек и Лекарство» 2010

- VII международная конференция РАН «Молекулярная медицина и биобезопасность» 2010

Работа была награждена в 2010 году дипломом как лучшая научно-исследовательская работа в области диагностики и терапии социально-значимых заболеваний на основе достижений молекулярной медицины в рамках VII международной конференции РАН «Молекулярная медицина и биобезопасность».

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ (3 из них – в рецензируемых журналах из списка ВАК, 6 - тезисы докладов)

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 154 страницах, содержит 3схемы, 9 рисунков, 20 таблиц, 37 графиков.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

В работе использовали реактивы фирм без дополнительной очистки, такие как бутилцианоакрилат (Sichel Werke, Германия), сополимеры молочной и гликолевой кислот 50:50 (PLGA 50:50), 75:25 (PLGA 75:25) и сополимер молочной и гликолевой кислот со свободной карбоксильной группой (PLGA-COOH) фирмы (Lactel, Absorbable Polymers International, США); полимеры молочной кислоты (PLA) (Lactel, Absorbable Polymers International, США), ломефлоксацин (Sigma-Aldrich, США), полксамер(Sigma-Aldrich, США), гликохолата калия гидрат (ХимМед, Россия), альбумин (Reanal, Венгрия), твин-80 (Ferak, Германия), декстран с мол. массой 70000 (Sigma-Aldrich, США), соляная кислота (ХимМед, Россия), хлороформ (ХимМед, Россия), поливиниловый спирт (ПВС), 87÷90 % hydrol., average mol. wt 30,000–70,000; (Sigma-Aldrich, США), D-маннит (ICN, Biomedicals), гидрокарбонат натрия (ХимМед, Россия), ацетонитрил(Sigma-Aldrich, США), хлористый метилен(Sigma-Aldrich, США). Электронные спектры в ультрафиолетовой и видимой области спектра записывали на спектрофотометре Ultrospec 2000 (Pharmacia, Швеция). Для ВЭЖХ использовали жидкостной хроматограф серии «Gold» (Beckman, США), а также насосы высокого давления М 302, градиентный смеситель М 811В, инжектор 7125i (Rheodyne, США) фотометрический детектор «microUVIS20» (Carlo Erba Instruments, Италия). Для хроматографического определения действующих веществ использовали колонку диасорб – 130 – С18Т размер 4.0X150 мм.

Удаление органических растворителей производили на роторном испарителе LABAROTA 4000-efficient. Гомогенизацию проводили на погружном диспергаторе

(гомогенизаторе) Ultra-Turrax[®] T-25 (IKA[®], ФРГ) с диспергирующим элементом (S25N – S25F; S10N – S10F). Центрифугирование осуществляли с помощью центрифуг Labofuge A (Heraeus, Германия) и J2-21 (Beckman, США). Лиофилизацию осуществляли на сушке HETOSICC (Heto Ltd., Denmark).

НЧ получали методом преципитации и методами двойных и одинарных эмульсий.

Полученные НЧ оценивались по размеру, степени включения ЛВ в НЧ. Анализ полученных НЧ проводился с помощью различных физико-химических методов. Качественное и количественное определение ломефлоксацина в качестве действующего вещества проводилось с помощью спектрофотометрии в УФ-области и ВЭЖХ. Размер получаемых НЧ изучали с помощью фотонной электронной спектроскопии. Также была изучена скорость высвобождения ЛВ из НЧ в водных средах *in vivo* и *in vitro*.

Определение специфической активности проводили *in vitro* на культурах микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* spp., *Staphylococcus aureus*, штамм 906, *Salmonella enteritidis* ATCC 9640, *Salmonella infantis* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* spp. Исследование выполнено по стандартной методике с использованием стерильных дисков.

Определение острой токсичности проводили *in vivo* на мышах линии Black, прошедших двухнедельный карантин. Животные содержались в стационарных условиях вивария, получали стандартный корм и воду без ограничения. Наносомальный ломефлоксацин вводили внутрижелудочно с помощью атравматического зонда в дозах, рассчитанных с учетом массы тела и максимально допустимого количества жидкости, которое можно ввести внутрижелудочно белым мышам однократно. В каждой серии использовалось по 5 животных. Проведено 5 серий экспериментов. Критериями оценки острой токсичности служили картина интоксикации и выживаемости животных. Наблюдения проводили в течение двух недель. Контролем служили животные, которым внутрижелудочно вводили соответствующие массы композита без действующего вещества (пустые НЧ), либо субстанцию ломефлоксацина, растворенную в эквивалентном объеме физиологического раствора.

Исследование высвобождения ломефлоксацина из полимерной матрицы и его распределение по органам и тканям организма проводилось *in vivo* на крысах линии Wistar. Животные содержались в стационарных условиях вивария, получали стандартный корм и воду без ограничения, прошли двухнедельный карантин. Наносомальный ломефлоксацин вводили внутрижелудочно в дозах, рассчитанных с учетом массы тела и максимально допустимого количества жидкости, которое можно ввести внутрижелудочно крысам однократно. Для сравнения готовился раствор, содержащий эквивалентное количество чистого ломефлоксацина, растворенного в том же объеме дистиллированной воды. Далее через определенные промежутки времени забивались экспериментальные и контрольные крысы. Для каждой определяемой временной точки использовалось по 5 крыс. У крыс осуществлялся забор

биологического материала. Полученные после пробоподготовки образцы анализировались с помощью ВЭЖХ.

Результаты исследования и их обсуждение

В литературе описаны методы получения НЧ из PLGA с использованием различного оборудования и дополнительных вспомогательных веществ. Наиболее часто используемыми и широко известными методами получения НЧ являются такие методы, как преципитация, методы двойного и одинарного эмульгирования с использованием гомогенизаторов с высоким давлением и без него, а также с использованием ультразвука.

Были опробованы такие методы получения НЧ, как метод преципитации, метод двойных и одинарных эмульсий. В качестве носителя были использованы следующие полимеры: БЦА, PLGA50:50, PLGA75:25 и PLGA со свободной карбоксильной группой, PLA.

При изучении влияния технологических параметров синтеза НЧ на свойства получаемой ЛФ (размер получаемых частиц и степень сорбции ломефлоксацина в полимерную матрицу) было найдено оптимальное сочетание параметров синтеза для получения эффективной и стабильной ЛФ.

Наиболее предпочтительным для получения наносомальной ЛФ ломефлоксацина является метод двойных эмульсий, который обеспечивает оптимальный размер НЧ и наиболее высокую степень сорбции ЛВ. При использовании метода преципитации, метода одинарного и двойного эмульгирования были получены НЧ не сильно отличающиеся по размеру, но с существенно различающейся степенью сорбции ЛВ. Наибольшую степень сорбции имеют НЧ, полученные методом двойных эмульсий ($42\% \pm 3$). Для НЧ, полученных методом преципитации степень сорбции ЛВ равна $11\% \pm 1$. НЧ, синтезированные методом одинарных эмульсий не сорбировали ЛВ в полимерную матрицу.

Для того, чтобы выявить зависимость свойств получаемых НЧ от природы полилактида в работе были использованы PLA, PLGA 50:50, PLGA 75:25 и PLGA со свободной карбоксильной группой. Полилактиды с различной природой использовались для получения НЧ методом эмульгирования. Влияние вида полимера на свойства будущей композиции с ЛВ является первостепенным. От этого зависят многие физико-химические свойства: размер частиц, степень включения ЛВ в полимерную матрицу, стабильность при хранении, защита от воздействия различных факторов внутри организма (особенно ферментов) и т.д. Но особенно важно, что от вида полимера зависят лекарственные свойства будущего препарата: токсичность, пролонгированность действия, эффективность и многие другие. Для всех образцов в этой серии экспериментов, равно как и для всех других, была определена степень сорбции ЛВ в НЧ и размер получаемых частиц. Полученные данные свидетельствуют о том, что наилучшая степень сорбции ЛВ в НЧ достигнута при использовании PLGA 50:50, и она составила $42\% \pm 0,57$ от общего количества введенного ломефлоксацина,

что близко по значению с показателем степени сорбции ЛВ в НЧ при использовании PLGA75:25 $33\% \pm 0,57$. Самая низкая степень сорбции была отмечена при использовании PLA, как более гидрофобного $10\% \pm 1,53$. По всей видимости, степень сорбции ломефлоксацина в некоторой мере связана с гидрофобностью полимера-носителя. Также экспериментальным путем было установлено, что природа используемого полимера оказывает влияние также и на размер получаемых НЧ, хотя последнее намного менее выражено. Сополимеры молочной и гликолевой кислот как со свободной карбоксильной группой так и с этерифицированной дают чуть более крупные НЧ, чем препараты с полилактидом.

Зависимость степени сорбции ЛВ в НЧ от соотношения ЛВ:полимер исследовалась с применением только метода двойных эмульсий. Представленные выше образцы в процессе их получения были двукратно гомогенизированы в следующем режиме: и первая и вторая гомогенизации проводились троекратно по 1 минуте с перерывом 1 минута при скорости 24 000 об/мин. В качестве ПАВ использовался 1% раствор поливинилового спирта. От соотношения ЛВ:полимер во многом зависит степень включения ЛВ в полимерную матрицу. Представляется очевидным, что степень сорбции ЛВ будет тем выше, чем большим окажется соотношение ЛВ:полимер, но это неизбежно приведет к снижению содержания ЛВ в конечном препарате. Целью данной серии экспериментов было установить при каком соотношении ЛВ:полимер степень сорбции ЛВ будет оптимальной. Все образцы получались при прочих равных параметрах, изменению подвергалось лишь соотношение ЛВ:полимер. Было выявлено, что наибольшая сорбция ломефлоксацина в НЧ достигается при соотношении ЛВ:полимер 1:7, при дальнейшем увеличении этого соотношения степень сорбции остается практически неизменной. Увеличение этого соотношения нецелесообразно, так как это неминуемо приведет к уменьшению содержания ломефлоксацина в ЛФ, что нежелательно. Соотношение ЛВ:полимер оказывает также некоторое, хотя и незначительное влияние на размер получаемых НЧ. Однако четкой закономерности между изменениями соотношения ЛВ:полимер и размером получаемых НЧ не выявлено.

Следует отметить, что данная закономерность не зависит от режима гомогенизации. Оптимальное соотношение ЛВ:полимер остается равным 1:7 как при 24 000 об/мин., так и при 6 000 об/мин.

Для того, чтобы выявить зависимость свойств получаемых НЧ от типа используемого стабилизатора эмульсии при прочих равных условиях использовались различные ПАВы для стабилизации эмульсии: 1% водные растворы TWIN-80, декстрана, альбумина, поливинилового спирта. Наилучший результат был получен при использовании в качестве стабилизатора поливинилового спирта; при этом степень сорбции ЛВ в полимерную матрицу составила $42\% \pm 0,57$, а размер полученных НЧ $246\text{нм} \pm 7,21$. В случае применения TWEEN-80 и декстрана частицы не были получены вовсе из-за возникновения агрегации и образования относительно крупных конгломератов.

Для того, чтобы выявить зависимость степени сорбции ЛВ в НЧ от способа предварительного растворения ломефлоксацина в ходе исследовательской работы ломефлоксацин растворялся либо в дистиллированной воде, либо в водном растворе 0,01 м HCl (метод двойных эмульсий), либо непосредственно в водном растворе 1% PVA (метод преципитации). Наилучшие результаты были достигнуты при получении НЧ методом двойных эмульсий с использованием в качестве первичного растворителя для ломефлоксацина раствора 0,01 М HCl. Степень сорбции ЛВ в полимерную матрицу при этом составила $42\% \pm 0,57$, а размер полученных НЧ $246\text{нм} \pm 7,21$. Следует отметить также, что при получении НЧ методом двойных эмульсий, но с использованием в качестве первичного растворителя для ломефлоксацина $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ и при получении НЧ методом преципитации, где в качестве первичного растворителя был взят 1% раствор PVA, были получены практически идентичные результаты: степень сорбции ЛВ составила $7\% \pm 0,57$, а размер НЧ $245\text{нм} \pm 3,60$; степень сорбции ЛВ составила $10\% \pm 1$, размер НЧ $267\text{нм} \pm 4,39$ соответственно.

Для изучения зависимости степени сорбции ЛВ в НЧ от способа предварительного растворения полимера в качестве первичных растворителей для полимера использовали хлороформ, хлористый метилен и ацетонитрил. Растворители выбирались исходя из свойств полимера и метода получения НЧ. Наилучший результат был достигнут при использовании хлороформа, как в случае получения НЧ методом преципитации, так и в случае получения НЧ методом двойных эмульсий, так как в данном случае степень сорбции ЛВ была максимальной. Однако, применение хлороформа и использование метода двойных эмульсий даст возможность получить НЧ с лучшими характеристиками.

Зависимости степени сорбции ЛВ в НЧ и размера НЧ от введения в синтез в качестве противоиона гликохолата калия гидрохлорида изучалась также с применением метода двойных эмульсий. Было показано, что если противоион включался в синтез совместно с полимером, то включение ЛВ не происходило вовсе, а если противоион включался в синтез совместно с ломефлоксацином, то степень сорбции была чуть ниже, чем у образцов, полученных без применения противоиона. Присутствие противоиона не оказало влияния на размер получаемых НЧ, он варьировался в пределах 245-246 нм. Из выше изложенного можно сделать вывод о том, что в данном конкретном синтезе использование противоиона нецелесообразно.

Было изучено влияние режима первичной и вторичной гомогенизации на свойства получаемой наносомальной ЛФ ломефлоксацина. Гомогенизация может оказывать существенное влияние как на размер получаемых НЧ, так и на степень сорбции ЛВ в полимерную матрицу. Данную серию экспериментов проводили при двух различных условиях гомогенизации. Было выявлено, что изменение числа оборотов гомогенизации оказывает существенное влияние как на степень сорбции ЛВ в НЧ, так и на размер получаемых НЧ. Снижение интенсивности гомогенизации приводит к значительному укрупнению НЧ и существенному снижению степени сорбции ЛВ в НЧ. При различных режимах гомогенизации сохраняются зависимости, описанные ранее, а именно: увеличение степени сорбции ЛВ в НЧ с выходом на плато на фоне

увеличения соотношения ЛВ:полимер и отсутствие закономерности во влиянии данного параметра на размер получаемых НЧ. Таким образом, при незначительной разнице в размере НЧ степень сорбции ЛВ различается практически в 4 раза, то есть в данном случае прямая зависимость между размером НЧ и степенью сорбции ЛВ не наблюдается. Все вышеизложенное отражено на рисунках № 1,2.

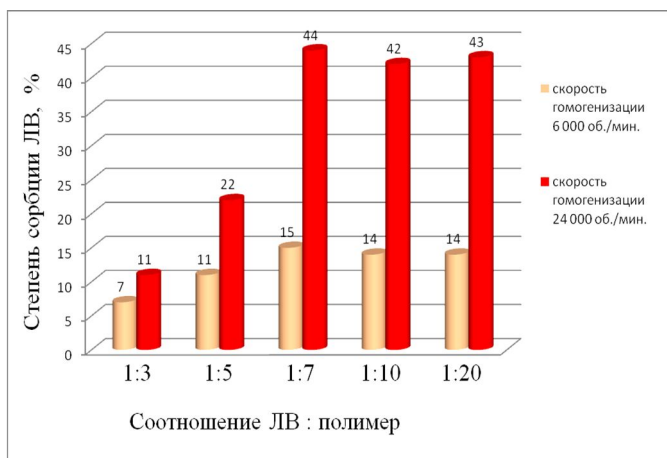


Рисунок 1.

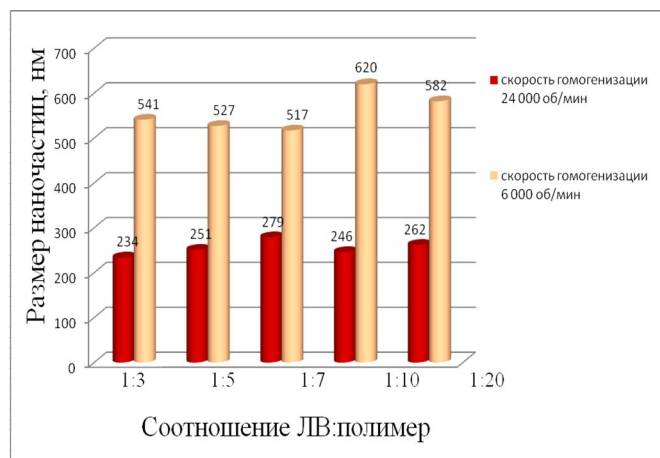


Рисунок 2.

Для изучения зависимости свойств получаемых НЧ от времени первичной гомогенизации проводилась серия экспериментов с применением метода двойных эмульсий; в качестве полимера носителя был использован PLGA 50:50, первичным растворителем для полимера был хлороформ, первичным растворителем для ломефлоксацина был 0,01 М раствор HCl, в качестве ПАВ применяли 1% раствор поливинилового спирта. При прочих равных параметрах синтеза для всех образцов изменялся только режим первичной гомогенизации. Гомогенизацию проводили при скорости 24 000 об./мин. в интервале времени от 1 минуты до 4 минут. Так как при проведении процесса гомогенизации выделяется достаточное количество тепла за счёт трения вращающихся деталей, длительность одного цикла не должна превышать 1 мин. и между последующими циклами эмульгирования необходимо соблюдать паузы по 1 или более мин. Дальнейшее увеличение времени гомогенизации (> 4 мин.) будет требовать внешнего охлаждения. Экспериментальным путем было установлено, что время первичной гомогенизации сказывалось на степени включения ЛВ в полимерную матрицу и на размере получаемых НЧ. Увеличение времени гомогенизации приводило к небольшому увеличению степени сорбции и уменьшению размера частиц. Наилучший результат был достигнут при трех кратном гомогенизировании в течение 1 минуты с минутными интервалами. Степень сорбции при этом равнялась $44\% \pm 0,57$, размер НЧ составил $279\text{ нм} \pm 8,08$.

Для изучения зависимости свойств получаемых НЧ от времени вторичной гомогенизации проводилась серия экспериментов с теми же условиями, что и в предыдущей серии опытов. При прочих равных параметрах синтеза для всех образцов изменялся только режим вторичной гомогенизации. Гомогенизацию проводили при скорости 24 000 об./мин. в интервале времени от 1 минуты до 5 минут. Было выявлено,

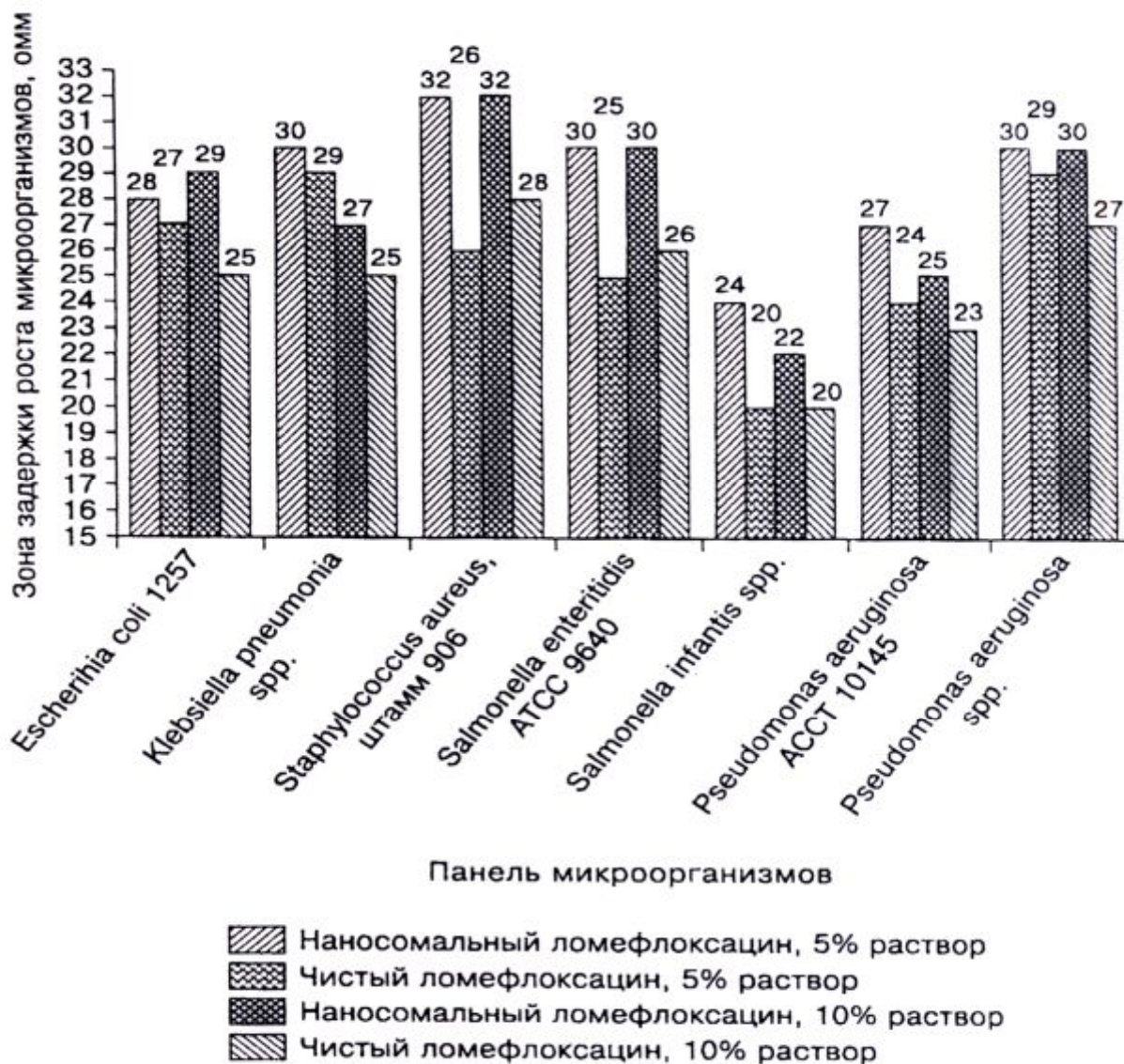
что время вторичной гомогенизации не оказывает существенного влияния на степень сорбции ЛВ в полимерную матрицу, но отражается на размере получаемых НЧ. Чем более интенсивный и долговременный режим гомогенизации, тем меньше размер получаемых НЧ. В качестве оптимального был выбран временной режим гомогенизации в течение 1 минуты трехкратно с минутными интервалами. Данный режим позволит получить НЧ с наилучшими показателями степени сорбции и оптимальным размером, не требуя бо́льших временных и энергетических затрат.

Было более подробно исследовано влияние времени совместного перемешивания растворов ЛВ и PLGA перед первой гомогенизацией на степень сорбции ЛВ в НЧ. Время перед вторичным гомогенизированием при этом составляло 20 минут и не изменялось. Максимальная степень сорбции ($44\% \pm 0,57$) была достигнута при совместном перемешивании двух растворов не менее 20 минут, затем она практически не изменялась. На размер получаемых НЧ данный технологический параметр оказывает незначительное влияние.

При изучение зависимости свойств получаемых НЧ от времени совместного перемешивания перед вторичным гомогенизированием в ходе экспериментов было выявлено, что сокращение времени перемешивания смеси перед вторичной гомогенизацией сказывается на степени сорбции ЛВ в НЧ намного меньше, чем сокращение времени перемешивания смеси перед первичной гомогенизацией.

Таким образом, был подобран оптимальный состав наносомальной ЛФ ломефлоксацина и оптимизированы технологические параметры ее получения, что позволило перейти к биологическим методам тестирования наносомального ломефлоксацина.

Результаты изучения специфической антимикробной активности, проведенного *in vitro* на культурах микроорганизмов с использованием указанной выше оптимизированной наносомальной ЛФ ломефлоксацина: *Escherihia coli*, *Klebsiella pneumoniae* spp., *Staphylococcus aureus*, штамм 906, *Salmonella enteritidis* ATCC 9640, *Salmonella infantis* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* spp. приведены на рис. № 3. Из рис. № 3 видно, что включение ломефлоксацина не только не уменьшило его антибактериальной активности, но и в некоторой степени даже увеличило ее (до 14 %). Заключение ЛВ в наносомальную ЛФ также не повлекло за собой исчезновения бактерицидной активности ломефлоксацина. Чуть более эффективным по сравнению с чистым ломефлоксацином оказался наносомальный ломефлоксацин при воздействии на такие микроорганизмы как *Salmonella enteritidis* ATCC 9640. Практически во всех опытах было отмечено, что вторичная зона роста бактерий отсутствует там, где в качестве испытуемого образца был взят наносомальный ломефлоксацин, что может свидетельствовать о пролонгированном действии данного препарата. Особенно это явление было выражено в опыте, где в качестве испытуемых бактерий использовали *Escherihia coli*.



Специфическая активность наносомального ломефлоксацина в сравнении с чистым.

Рисунок 3.

Было проведено определение острого токсического эффекта. При однократном пероральном введении максимально возможных доз полимера, содержащего ломефлоксацин, в количестве $\frac{1}{2}$ от LD_{50} (LD_{50} для мышей=4г/кг) и введении эквивалентного количества чистого ломефлоксацина не было отмечено летальных исходов среди мышей, также не отмечалось визуально явного токсического воздействия и побочных эффектов как в контрольной, так и в испытываемой группах. Более детальное исследование токсических эффектов при однократном и систематическом введении сополимера молочной и гликолевой кислоты не проводилось, хотя имеются литературные данные об их наличии.

При создании наносомального ЛП необходимо добиться максимального включения ЛВ в полимерную матрицу, но не менее важно затем оценить насколько полным будет высвобождение лекарственной субстанции из НЧ в условиях живого организма, и каким образом будет изменяться концентрация ЛВ в плазме крови и различных органах и тканях во времени. Именно с этой целью была проведена серия опытов по изучению высвобождения ЛВ из полимерной матрицы *in vivo* на крысах линии Wistar.

Сравнительная фармакокинетика свободного и наносомального ломефлоксацина изучалась с использованием крыс-самцов линии Wistar массой 240-250 г (питомник РАМН «Столбовая», Москва). Животные содержались на обычном пищевом рационе. Лекарственные формы ломефлоксацина и наносомальный ломефлоксацин растворяли в воде для инъекций. Экспериментальные животные были разделены условно на две группы. Животным из первой группы вводили перорально однократно наносомальный ломефлоксацин (с содержанием действующего вещества 5,8% от общей массы) в дозе 270 мг/кг); животным второй группы, взятой в качестве сравнения вводили субстанцию ЛВ в эквивалентных количествах. Далее через определенные промежутки времени умерщвлялись экспериментальные и контрольные крысы. Выборка для каждой определяемой временной точки составляла 5 крыс. У крыс забирали органы и цельную кровь из полости сердца без использования гепарина. Полученный в результате пробоподготовки биологического материала образец анализировали с помощью ВЭЖХ.

Для характеристики изменения концентрации ломефлоксацина в крови и органах крыс во времени рассчитывали интегральный показатель площади под фармакокинетической кривой. Процент от дозы рассчитывали, исходя из значений масс органов (как правило масса навески составляла 1,8-2,1 г органа. Объем крови принимали равным 7% от массы животного. Адекватность выбранной модели для описания распределения исследуемых препаратов в организме экспериментальных животных подтверждаются полученными графиками, из которых следует, что фармакокинетическая зависимость, построенная по экспериментальным данным, практически полностью совпадает с зависимостью, моделирующей типичную кинетику второго порядка (двухчастевая математическая модель фармакокинетике).

Основные фармакокинетические константы субстанции ломефлоксацина, и ломефлоксацина, ассоциированного с полимерными наночастицами, обработаны с помощью двухчастевой математической модели и представлены в таб.№ 1.

Как видно из представленных данных, фармакокинетические константы, а именно время полувыведения ($T_{1/2}$) и среднее время удерживания (MRT) антибиотика, связанного с наночастицами, увеличилось по сравнению с константами антибиотика сравнения в случаях с некоторыми органами в 3,2 раза, что свидетельствует о наличии пролонгированного эффекта у наносомального ломефлоксацина.

| | печень | | почки | | Легкие | | селезенка | | сердце | | предстат. железа | | кровь | |
|--|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-----------|--------|--------|-------|------------------|-------|--------|-------|
| | чист. | нано | чист. | нано | чист. | Нано | чист. | нано | чист. | нано | чист. | нано | чист. | нано |
| T max, часы | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| C max | 68 | 25 | 100 | 70 | 40 | 27 | 90 | 100 | 50 | 50 | 132 | 62 | 19 | 15 |
| AUC _(0→48) | 341,9 | 611,1 | 665 | 835,4 | 307,3 | 696 | 467,72 | 1317,8 | 195,3 | 452,3 | 836,8 | 591,9 | 172,91 | 222,5 |
| T _{1/2} | 2,13 | 8,85 | 6,98 | 9,57 | 2,12 | 9,21 | 3,64 | 7,32 | 7,49 | 9,97 | 6,9 | 8,7 | 2,83 | 6,68 |
| C max/AUC (0→48) | 0,198 | 0,040 | 0,150 | 0,083 | 0,013 | 0,039 | 0,192 | 0,072 | 0,256 | 0,110 | 0,158 | 0,104 | 0,109 | 0,067 |
| Cl, л/час | 1.024 | 0.558 | 0.524 | 0.408 | 1.139 | 0.489 | 0.748 | 0.263 | 1.782 | 0.752 | 0.416 | 0.583 | 2.024 | 1.56 |
| MRT (среднее время удерживания) | 4,63 | 13,21 | 6,66 | 15,03 | 4,62 | 14,9 | 5,34 | 10,6 | 5,31 | 13,07 | 7,34 | 7,34 | 4,64 | 8,68 |
| Kp (коэф. Распределения) AUC ткани/AUCкрови | 1,97 | 2,75 | 3,85 | 3,75 | 1,78 | 3,13 | 2,7 | 5,91 | 1,3 | 2,3 | 4,84 | 2,66 | | |

Таблица № 1

Приведенные в таблице №1 фармакокинетические константы будут проанализированы далее для каждого из исследуемых органов отдельно.

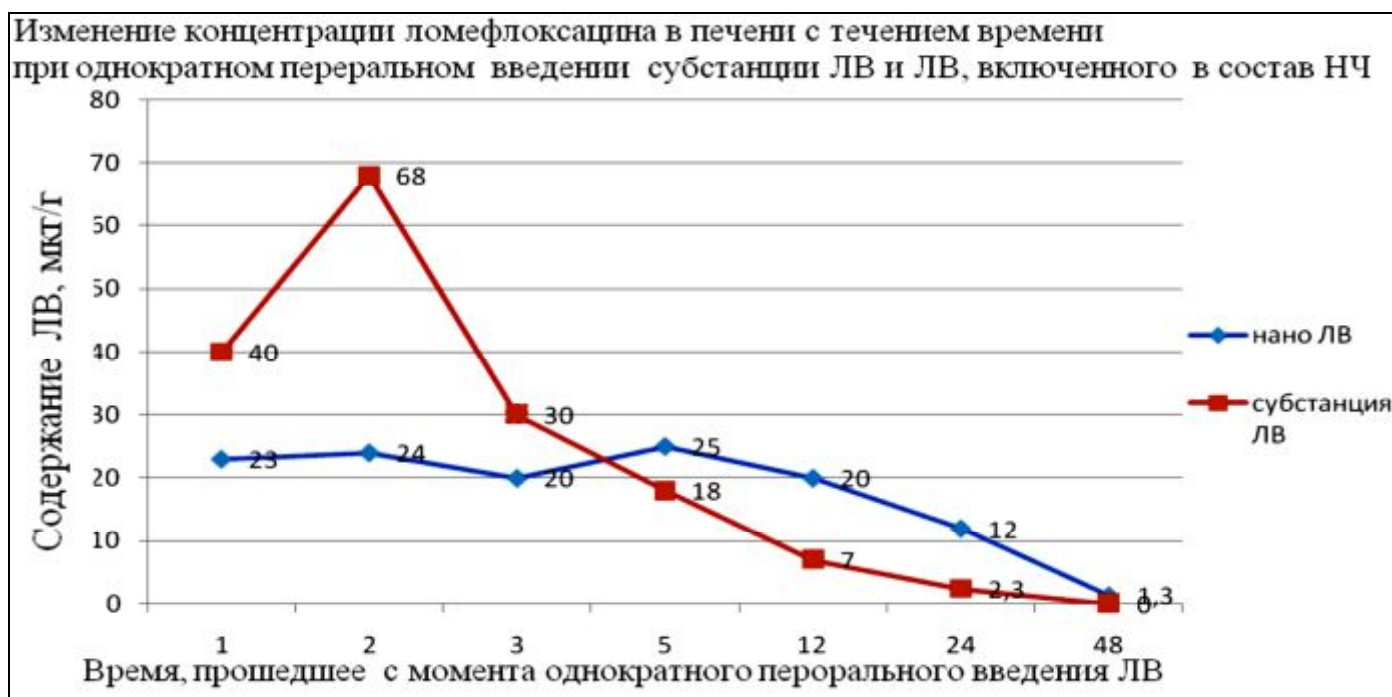


Рисунок 4.

Как видно из рисунка № 4 фармакокинетические кривые субстанции ЛВ и ее наносомальной формы резко различаются между собой. В случае однократного перорального введения субстанции ломефлоксацина, его концентрация в печени возрастает до максимума через 2 часа и быстро падает практически до нуля. В случае применения наносомальной лекарственной формы резкого скачка концентрации не наблюдается, определенный концентрационный уровень антибиотика поддерживается на протяжении всего изучаемого временного отрезка. О пролонгации нахождения антибиотика в исследуемом органе свидетельствует изменение среднего времени удержания (MRT), для наносомальной ЛФ этот показатель выше в 2,85 раза, а также площадь под фармакокинетической кривой (AUC), для наносомальной ЛФ этот показатель выше в 1,78 раза. Время полувыведения у испытуемого образца и контроля также значительно различалось. Для наносомальной ЛФ ломефлоксацина $T_{1/2}$ составило 8,85 часа, а для субстанции ЛВ 2,13 часа. Показатели клиренса, константы характеризующей способность организма к элиминации (удалению) препарата, в данном случае также различаются более чем в 2 раза, что также указывает на более длительное присутствие ЛВ в печени по сравнению с чистым веществом.

Профили графиков изменения концентрации ломефлоксацина в почках с течением времени при однократном пероральном введении экспериментального образца и контроля оказались различны. Максимальная концентрация ЛВ при введении ломефлоксацина в наносомальной ЛФ достигается в почках уже через 1 час после перорального введения, однако она несколько ниже, максимальной концентрации препарата при его введении в виде чистой субстанции. Затем, в случае введения контрольного образца, концентрация ломефлоксацина резко возросла и падала практически до нуля в течение первых 12 часов, в то время как при введении наносомальной ЛФ концентрация ломефлоксацина оставалась постоянной на оптимально высоком уровне и очень плавно снижалась в течение первых 24. Время полувыведения ломефлоксацина, значения клиренса и коэффициенты распределения в почках как для чистой субстанции, так и для наносомальной ЛФ приведены в таблице №1.

В легких при введении наносомального ломефлоксацина максимальная концентрация действующего вещества достигается через 1 час после однократного перорального приема и поддерживается на достигнутом уровне практически на протяжении 24 часов. При аналогичном введении контрольного образца, максимальная концентрация ЛВ достигается через два часа и в 1,5 раза превышает максимальную концентрацию, достигаемую при введении нано-формы, но значительно быстрее снижается и после 24 часов практически равна нулю. На рисунке № 5 четко видно наличие пролонгированного эффекта наносомального ломефлоксацина, о наличии которого также свидетельствует время полувыведения; для чистой субстанции время полувыведения составило 2,12 часа, а для нано-формы – 9,21 часа. Показатели клиренса и время удерживания для наносомального препарата в случае с легкими в три раза ниже, чем для чистой субстанции, введенной в качестве контроля.

Изменение концентрации ломефлоксацина в легких с течением времени при однократном пероральном введении субстанции ЛВ и ЛВ, включенного в состав НЧ

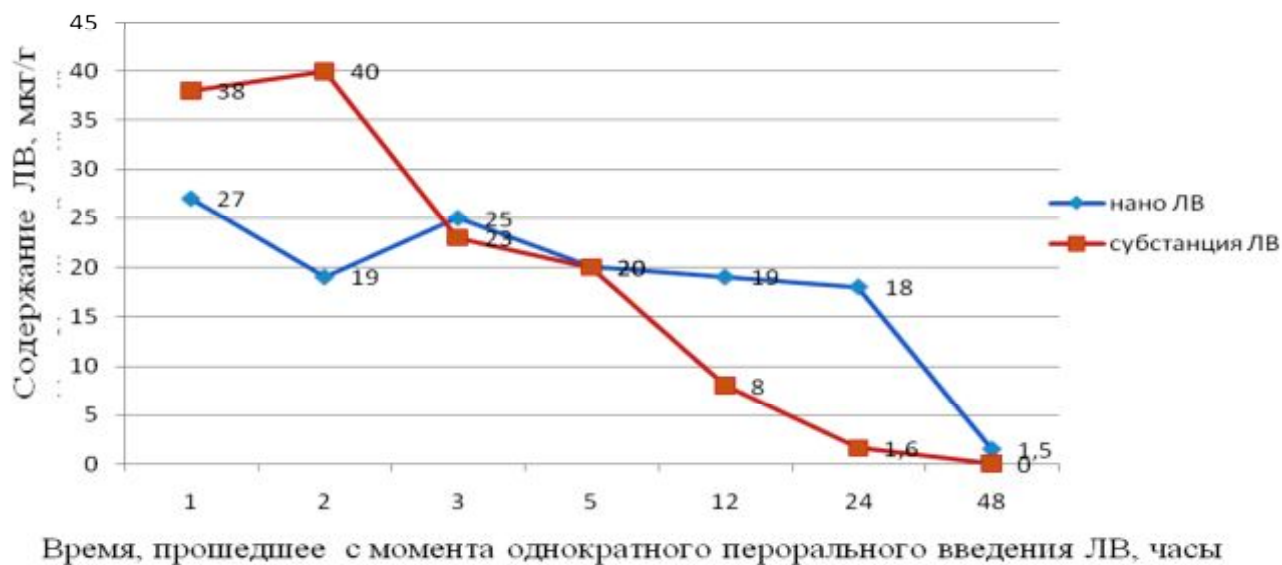


Рисунок 5.

Изменение концентрации ломефлоксацина в селезенке с течением времени при однократном пероральном введении субстанции ЛВ и ЛВ, включенного в состав НЧ

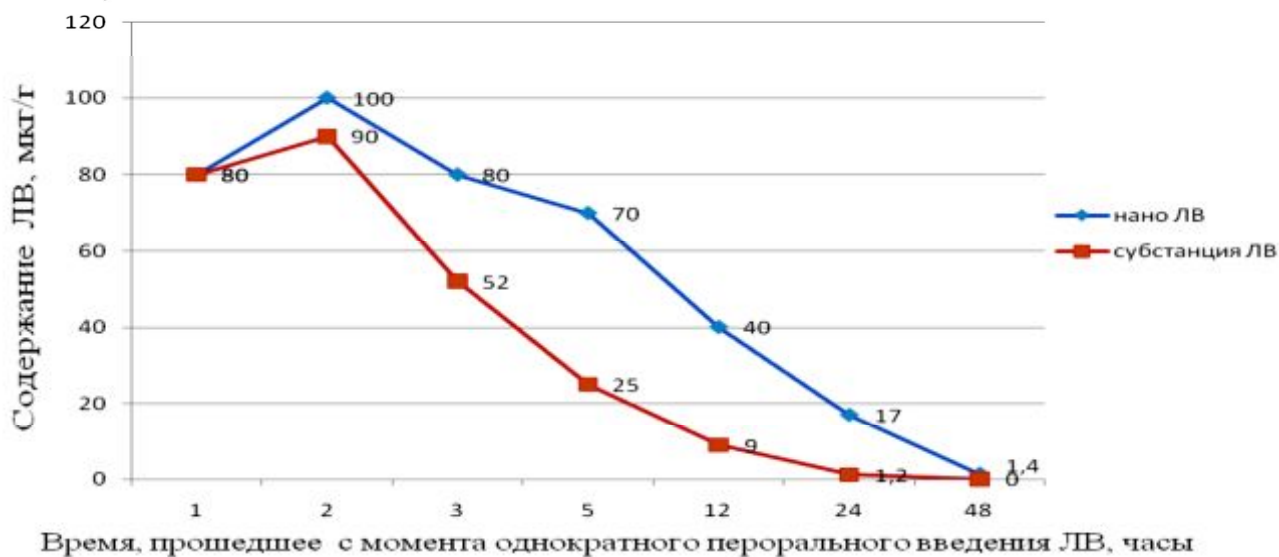


Рисунок № 6.

Графики изменения концентрации ломефлоксацина в селезенке с течением времени при однократном пероральном введении субстанции ЛВ и ЛВ, включенного в состав НЧ, схожи по профилю (рис. №6). Время достижения максимальной

концентрации ЛВ в органе совпало как для образца, так и для контроля (2 часа с момента перорального введения). Важно отметить, что в случае с селезенкой максимальная концентрация ЛВ при введении наносомального препарата незначительно превышает максимальную концентрацию, достигнутую при ведении чистой субстанции ломефлоксацина. В данном случае также имеет место пролонгированный эффект, о котором свидетельствуют такие показатели, как клиренс и среднее время удержания ЛВ. Для наносомального ломефлоксацина в случае изучения селезенки указанные параметры в 2-3 раза ниже, чем для контроля. Сходные данные были получены при изучении сердечной мышцы и крови.

При однократном пероральном введении наносомальной ЛФ в предстательной железе максимальная концентрация ЛВ оказалась ниже, чем при введении чистой субстанции (рис. №7). Клиренс и среднее время удерживания совпадали как в случае с образцом, так и в случае с контролем.

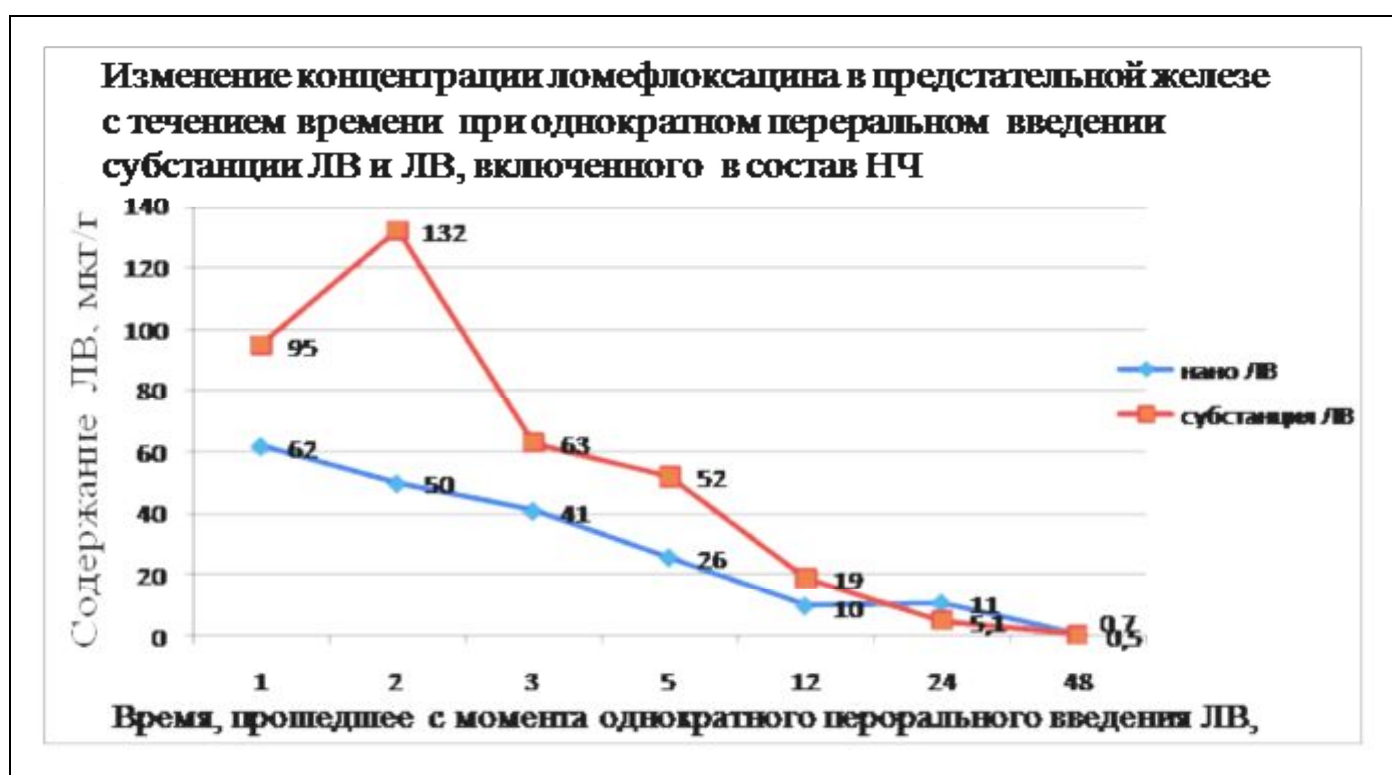


Рисунок № 7.

Значимого пролонгированного эффекта, сопровождающегося поддержанием концентрации ЛВ в исследуемом органе на терапевтически значимом уровне для наносомального ломефлоксацина в случае с предстательной железой не отмечено.

После описания изменений в распределении исследуемого ломефлоксацина, вводимого в различных ЛФ, по отдельным органам необходимо остановиться на общей картине распределения антибиотика в организме экспериментальных животных. В ходе данного исследования отмечено перераспределение ЛВ в зависимости от ЛФ, в составе которой был введен. Полученные данные представлены на рис. № 8.

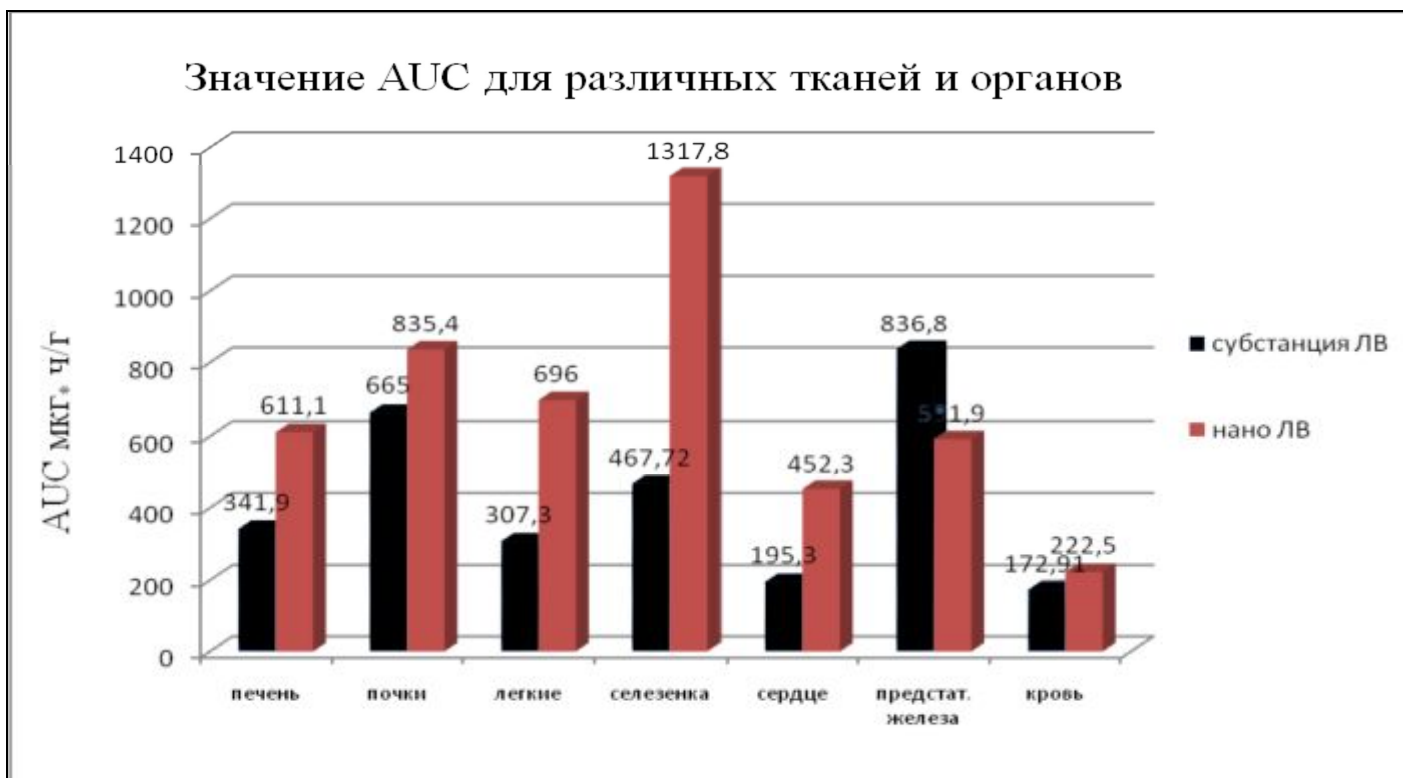


Рисунок № 8

Из рисунка № 8 видно, что при введении ломефлоксацина в виде его наносомальной ЛФ удастся увеличить степень его проникновения в печень, легкие и селезенку, т. е. в органы РЭС, а также в сердечную мышцу, в отличие от предстательной железы, степень проникновения ЛВ в которую снизилась.

Из приведенного выше материала можно сделать вывод о том, что НЧ из сополимеров молочной и гликолевой кислот, используемые в качестве носителя для действующего ЛВ, существенно меняют фармакокинетику ломефлоксацина в организме крыс. Установлено, что биodeградируемые и биосовместимые НЧ, использованные в качестве полимера-носителя при пероральном применении увеличивали биодоступность ЛВ, пролонгировали время его нахождения в организме, за счет его более длительного удержания в органах РЭС (эффект депонирования) и изменяли его распределение между тканями и органами, о чем свидетельствуют такие показатели, как площадь под фармакокинетической кривой (AUC), клиренс, среднее время удерживания (MRT), и коэффициент распределения Кр.

Заключение

В данной работе был разработан метод включения противомикробного антибиотика широкого профиля фторхинолонового ряда – ломефлоксацина в состав частиц субмикронного размера на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, с целью повышения эффективности и безопасности ЛВ, а также обеспечения его пролонгированного эффекта. Отбор оптимального состава и технологических параметров получения полимерных композиций проводился с использованием таких критериев, как размер полимерных частиц и степень включения в них ломефлоксацина. Удовлетворительными считались результаты позволяющие получать частицы с размерами от 100 до 500 нм и степенью включения ЛВ > 30 %.

В ходе выполнения работы было установлено, что оптимальным является состав наносомальной ЛФ ломефлоксацина, указанный в таблице № 2.

Таблица № 2 Состав лекарственного препарата (ЛП)

| Наименование компонента | Содержание в ЛФ, % от общей массы компонентов |
|--------------------------------|--|
| Ломефлоксацин | 5,8 |
| PLGA 50:50 | 40,6 |
| D-маннит | 24,3 |
| ПВС | 29,2 |
| Poloxamer 188 | 0,1 |
| Итого: | 100 % |

В ходе выполнения данной научно-исследовательской работы была оптимизирована технология получения наносомальной ЛФ ломефлоксацина. Оптимальным является использование в качестве растворителей 1) для ломефлоксацина -0,01 М раствор соляной кислоты, 2) для полимера – хлороформ; соотношение водной и органической фазы 1:2,5; соотношение полимер:ЛВ 7:1; использование стабилизатора первичной эмульсии Poloxamer 188. Кроме того, было установлено, что время совместного перемешивания компонентов перед первичным и вторичным гомогенизированием смеси должно составлять 20 минут; рекомендуемый режим первичной и вторично гомогенизации заключается в следующем: 1. скорость вращения ротора гомогенизатора – 24 000 об./мин; 2. время гомогенизации – трехкратно по одной минуте с минутными интервалами. Показана стабильность ЛФ при хранении более 1 года.

Полученная наносомальная ЛФ ломефлоксацина была охарактеризована с помощью различных физико-химических методов: уф-спектроскопии, ВЭЖХ, фотонной-корреляционной спектроскопии и т. д. Была также изучена кинетика

высвобождения ЛВ из полимерной матрицы в модельных опытах в условиях равновесного диализа. Время полного высвобождения ЛВ из наночастиц составило 96 часов. Полученная наносомальная ЛФ может храниться без признаков разложения антибиотика в течение 1 года при 5-8 °С в защищенном от света месте.

Было проведено изучение антибактериальной активности полученной новой ЛФ на культурах микроорганизмов: *Escherihia coli*, *Klebsiella pneumonia spp.*, *Staphylococcus aureus*, штамм 906, *Salmonella enteritidis ATCC 9640*, *Salmonella infantis spp.*, *Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145*, *Pseudomonas aeruginosa spp.*, которое показало некоторое увеличение активности ЛВ в ЛФ по сравнению с субстанцией ломефлоксацина.

В опытах *in vivo* на крысах линии Wistar наносомальная лекарственная форма проявила пролонгированность действия, в сравнении с чистым ломефлоксацином.

Изучение общего токсического воздействия наносомального ломефлоксацина на организм мышей не показало его увеличения, а также усиления токсических эффектов, равно как и возникновения новых ранее не описанных нежелательных явлений.

Полученная новая композиция ломефлоксацина может быть использована в виде суспензии для внутримышечного или подкожного введения, кроме того она может быть использована для получения таблеток, капсул и других лекарственных форм перорального применения.

Таким образом, полученная полимерная композиция не уступает по большинству параметров используемым в настоящее время ЛФ ломефлоксацина, а по некоторым из них превосходит. В дальнейшем после определенной доработки новая наносомальная ЛФ ломефлоксацина может стать предметом для внедрения в промышленное производство.

Выводы

1. В ходе проведенного исследования разработаны подходы к созданию наносомальной ЛФ ломефлоксацина в виде наноразмерных частиц на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот; оптимизированы технологические параметры получения ломефлоксацина, иммобилизованного на НЧ.

2. Изучены физико-химические свойства полученной наносомальной ЛФ ломефлоксацина методами УФ-спектроскопии, ВЭЖХ, фотонно-корреляционной спектроскопии и др.

3. Показано, что иммобилизованный ломефлоксацин превосходит по специфической антимикробной активности субстанцию ломефлоксацина..

4. В опытах *in vivo* на крысах линии Wistar было показано пролонгированное действие иммобилизованного ЛВ по сравнению с субстанцией ломефлоксацина.

5. Изучено распределение по органам и тканям наносомального ломефлоксацина, полученного на основе сополимеров молочной и гликолевой кислоты.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Климова О. В., Воронцов Е. А. Изучение влияния технологических параметров синтеза на физико-химические свойства наночастиц, получаемых на основе биодegradуемых полимеров. // Наномедицина и токсикология. Сборник тезисов и статей. – М., 2009.- с. 16

2. Климова О. В., Воронцов Е. А. Влияние технологических параметров синтеза на физико-химические свойства наночастиц с ломефлоксацином на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот. // Материалы VI Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность». – М., 2009.- с. 122

3. Климова О.В. Подходы к разработке наносомальной лекарственной формы ломефлоксацина. // Тезисы итоговой научной конференции молодых исследователей с международным участием «Татьянин день». – М.: Издательский дом «Бионика», 2010. –с. 75

4. Климова О.В. Разработка методов получения наносомальной лекарственной формы рифампицина на основе полиалкилцианоакрилатов. // Приложение к журналу «Вестник Российской Академии медицинских наук» № 6, 2008.–с.195

5. Климова О. В., Воронцов Е. А., Кузнецов С. Л., Северин С. Е. Разработка технологии получения наносомальной лекарственной формы ломефлоксацина на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот. // Сборник материалов XVII конгресса «Человек и лекарство». – М., 2010

6. Климова О. В. Влияние некоторых параметров синтеза на свойства наносомальной лекарственной формы ломефлоксацина. // Фармация, 2010, № 2.-с. 37-39

7. Климова О. В., Воронцов Е.А., Семенов С. Ю., Северин С. Е., Северин Е. С. Влияние некоторых параметров синтеза на свойства наносомальной лекарственной формы, получаемой на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2010, № 4.-с. 27-33

8. Климова О. В., Годованный А.В., Рябцева М.С., Воронцов Е. А. , Северин Е.С. Изучение наносомальной лекарственной формы ломефлоксацина, полученной на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот на наличие специфической активности и пролонгированного эффекта. // Молекулярная медицина, 2010, № 5

9. Климова О. В. Изучение наносомальной лекарственной формы ломефлоксацина, полученной на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот на наличие специфической активности и пролонгированного эффекта. // Материалы VII Международной конференции РАН «Молекулярная медицина и биобезопасность». – М., 2010.- с. 94