

На правах рукописи

Санжаков Максим Александрович

**НАНОСИСТЕМА ТРАНСПОРТА НА ОСНОВЕ ФОСФОЛИПИДОВ И
ЖИРНЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ
ГРУППЫ РИФАМИЦИНОВ**

03.01.04 – БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича” Российской академии медицинских наук (ФГБУ “ИБМХ” РАМН)

Научный руководитель доктор биологических наук
Ипатова Ольга Михайловна

Официальные оппоненты **Мошковский Сергей Александрович,**
доктор биологических наук, ФГБУ “ИБМХ” РАМН,
зав. отделом персонализированной медицины

Морозов Сергей Георгиевич,
доктор медицинских наук, член-корр. РАМН,
ФГБУ “НИИ общей патологии и патофизиологии”
РАМН, зам. дир. по науке

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства”

Защита диссертации состоится 28 ноября 2013 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича” Российской академии медицинских наук по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ “ИБМХ” РАМН по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

Автореферат диссертации разослан «__» октября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Д 001.010.01, кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Повышение эффективности существующих лекарств путём разработки для них систем транспорта с применением нанотехнологий – современное, активно развивающееся направление биомедицинских наук. Для ряда агентов, например, противоопухолевых, уже имеются формы с системами транспорта (липосомальные), которые широко востребованы. Однако для противотуберкулёзных препаратов и, в частности, для препаратов группы рифамицинов такие формы отсутствуют. Необходимость их разработки обусловлена такими фактами, как: (1) высокая распространённость туберкулёза и смертность от туберкулёза; (2) важное место, которое занимают лекарства группы рифамицинов в терапии этого заболевания; (3) существенные недостатки, ограничивающие использование этих препаратов; (4) отсутствие на фармацевтическом рынке новых антибиотиков, способных составить альтернативу рифамицинам. За последнее время появилось множество работ по конструированию различных систем транспорта для рифампицина, в меньшей степени, для его аналогов – рифабутина и рифапентина. Наиболее распространённый тип носителей для пероральных форм рифампицина – полимерные наночастицы, для инъекционных и ингаляционных форм – липосомы.

Ряд исследований показывает, что наночастицы (с размером менее 100 нм) имеют определённые преимущества при доставке лекарств перед более крупными частицами (Seki et al., 2004; Moghimi et al., 2001; Wang et al., 2010). Они способны дольше циркулировать в крови, лучше проникать в поражённые области и др. В ФГБУ “ИБМХ” РАМН разработана оригинальная фосфолипидная транспортная наносистема с размером частиц до 30 нм (Патент РФ №2391966, Патент РФ №2406537). Включение лекарственных субстанций в такие наночастицы оказывает существенное влияние на их фармакокинетику, способствуя повышению терапевтической эффективности (Ипатова и др., 2010; Широин и др., 2011; Zyкова et al., 2012). Однако включение соединений группы рифамицинов в наночастицы на основе только фосфатидилхолина не позволяло получить стабильную композицию с высоким содержанием транспортируемого лекарства. В связи с этим возникла необходимость оптимизировать состав фосфолипидной транспортной системы так, чтобы при

минимальном размере наночастиц (до 50 нм) включение в них лекарственных субстанций группы рифамицинов было максимальным. Это должно обеспечить прохождение транспортируемого лекарства через высоко гидрофобную клеточную стенку микобактерий для реализации специфического механизма действия рифамицинов, которое заключается в ингибировании бактериальной РНК-полимеразы. Свойства разрабатываемой системы должны способствовать повышению биодоступности рифамицинов, их накоплению в легких и доставке в альвеолярные макрофаги.

Настоящая работа выполнена в рамках госконтракта № 8338p/13241 от 31 августа 2010 года “Разработка технологии получения инновационных высокоэффективных противотуберкулёзных лекарственных средств на основе фосфолипидной транспортной наносистемы”.

Цель работы: на основе фосфолипидных наночастиц разработать систему транспорта для противотуберкулёзных препаратов группы рифамицинов и доказать ее эффективность.

Задачи:

1. Разработать на основе фосфолипидных наночастиц и жирных кислот систему транспорта для рифампицина, рифабутина и рифапентина и определить её физико-химические характеристики.

2. Определить условия максимального встраивания рифамицинов в разработанную транспортную наносистему. Получить соответствующие лекарственные композиции и исследовать их физико-химические свойства.

3. Провести исследования некоторых фармакокинетических параметров полученных лекарственных композиций (биодоступность, распределение по органам, связывание с компонентами плазмы крови и др.) в сравнении со свободными лекарственными субстанциями.

4. Исследовать в экспериментах *in vitro* и *in vivo* специфическую активность полученных композиций рифамицинов.

5. Оценить изменения токсичности на примере рифампицина при его встраивании в разработанную систему транспорта.

Научная новизна. Получена на основе фосфатидилхолина и олеата натрия принципиально новая система транспорта лекарств, которая представляет собой стабильную монодисперсную наноэмульсию с размером частиц менее 20 нм. Определены основные физико-химические характеристики этой системы. Разработаны условия включения рифампицина, рифабутина и

рифапентина в наносистему транспорта, и получены композиции этих лекарственных препаратов в сухом лиофилизированном виде.

Впервые удалось получить транспортную систему, способствующую максимальному увеличению противотуберкулёзной эффективности рифамицинов, наряду со снижением их токсического побочного действия. Предельно малый размер наночастиц транспортной системы обеспечивает доставку рифамицинов внутрь клетки и реализацию их механизма действия.

По результатам работы получено 2 патента.

Практическая значимость. Способ получения рифампицина, снабжённого фосфолипидно-олеатной наносистемой транспорта, масштабирован и оптимизирован в условиях опытного производства. Получены лекарственные композиции рифампицина для перорального и внутривенного введения, доклинические испытания которых проходят в настоящее время в рамках ФЦП “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу” (Госконтракт № 14.N08.11.0004 от 20.11.2012). Выполнение Госконтракта позволит в достаточно короткие сроки и с меньшими экономическими затратами вывести на фармрынок новую, оригинальную форму рифампицина, отличающуюся высокой противотуберкулёзной эффективностью и сниженными побочными действиями, что даст возможность уменьшить применяемые терапевтические дозы лекарства, разработать новую, эффективную схему химиотерапии туберкулёза.

Разработанная наносистема транспорта является универсальной и может быть использована для получения новых лекарственных форм препаратов других терапевтических групп.

Апробация. Основные положения диссертационной работы были доложены на XII международной научно-практической конференции “Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности” (Санкт-Петербург, Россия, 2011); на конкурсе молодых учёных международной научно-практической конференции “Фармацевтические и биомедицинские технологии” (Москва, Россия, 2012); на VII Московском международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития” (Москва, Россия, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах, определённых ВАК, 2 патента РФ, 3 публикации в сборниках докладов научных конференций.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 145 страницах печатного текста, содержит 15 рисунков и 21 таблицу, состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 190 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные материалы. Для приготовления наноэмульсий и лекарственных композиций использовали следующие вещества: соевый фосфолипид Lipoid S100 с содержанием фосфатидилхолина 94-96 % (Lipoid GmbH, Германия); мальтозы моногидрат (Merck, Германия); олеат натрия $\geq 82\%$, каприлат (октаноат) натрия $\geq 99\%$, капринат (деcanoат) натрия $\geq 98\%$, линолеат натрия $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Германия); соляную кислоту чистоты “хч” (Сигма Тек, Россия); лекарственные субстанции: рифампицин (Sandoz Pvt Ltd, Индия), рифабутин (Lupin Ltd, Индия), рифапентин (Nanjing Foreign Economic&Trade Development co., Ltd, Китай); лекарственный препарат “Рифампицин-Ферейн[®]” – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 0,15 г (ЗАО “Брынцалов-А”, г. Москва).

Получение композиций рифамицинов, встроенных в фосфолипидно-олеатную транспортную наносистему.

Фосфолипид (5 г) диспергировали в водном растворе мальтозы (20 г). При перемешивании добавляли 0,5 г соответствующей субстанции (рифампицина, рифабутина или рифапентина), затем 0,5 г олеата натрия. Полученную грубую эмульсию (200 мл) подвергали нескольким циклам (5-7) гомогенизации при давлении 1000 атм. и температуре 42-45°C на микрофлюидайзере M110EN30K (Microfluidics, США). Полученную ультратонкую эмульсию с рН, доведённым до значения 7,3-7,4 раствором 1М HCl, фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм (Millipore Corporation, США). Фильтрат разливали по 10 мл во флаконы объёмом 20 мл и высушивали с помощью лиофильной сушки Virtis AdVantage XL (США).

Определение физико-химических свойств.

Светопропускание определяли на спектрофотометре Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (Agilent Technologies, Германия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 660 нм, используя программу HP UV Visible ChemStation.

Размер наночастиц измеряли при помощи лазерного корреляционного спектрометра Beckman N5 Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter, США) с программным обеспечением PCS Control Software Version 3.02 в воде при температуре термостатируемой ячейки 20 °С и угле рассеяния 90°.

Дзета-потенциал (ζ -потенциал) определяли методом электрофоретического рассеяния света на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Процент включения лекарства в наночастицы определяли с помощью метода ультрафильтрации. Невстроенное лекарство отделяли на полиэфирсульфоновой мембране с порогом отсечения 10 кДа (Ultrafree-MS, Millipore Corporation, США). Количественный анализ содержания лекарства в исследуемом растворе (С) и в фильтрате (C_{ϕ}) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Милихром А-02 (Эконова, Россия) с колонкой 2x75 (Prontosil 120-5 С18, 5 мкм). Процент включения лекарства в наночастицы вычисляли по формуле:
$$(C - C_{\phi}) \times 100 / C.$$

Исследование влияния разработанной фосфолипидно-олеатной транспортной наносистемы на биологические свойства рифамицинов.

Биодоступность. Крысам-самцам породы Wistar вводили перорально композиции рифампицина, рифабутина и рифапентина или свободные субстанции (в виде суспензии) в дозе 6 мг/кг. Через заданные промежутки времени отбирали кровь, отделяли плазму. Избытком метанола осаждали белки и экстрагировали лекарство. Количественную оценку содержания лекарства проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent Technologies (1200 Series) с масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS (Agilent Technologies, США). Способ ионизации – электрораспыление при атмосферном давлении (API-ES).

Накопление в органах. Через час после перорального введения рифамицинов (рифампицина в дозе 12,1 мг/кг, рифапентина в дозе 8 мг/кг) в составе композиций или в виде свободных субстанций экспериментальных животных

забивали и извлекали органы (лёгкие, почки и печень) и готовили их гомогенаты. Лекарство экстрагировали метанолом. Содержание лекарства определяли методом хромато-масс-спектрометрии (LC/MS).

Распределение по компонентам плазмы крови. Цельную кровь инкубировали с композицией рифампицина или с его разбавленным раствором в метаноле (метанола не более 1%). Отделяли плазму и проводили ускоренное фракционирование в градиенте плотности NaBr её компонентов на ультрацентрифуге L8-M (Beckman Instrument Inc., США) в роторе Ty 65. Концентрацию рифампицина во фракциях определяли методом ВЭЖХ.

Антимикобактериальная активность *in vitro*. Исследование проводили совместно с ФГБУ “Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза” РАМН (г. Москва). Антибактериальное действие рифампицина в свободном виде и в составе композиции оценивали по его влиянию на рост клеток *M. tuberculosis H37Rv* в автоматизированной системе учёта роста культур ВАСТЕС MGIT 960 (Becton Dickinson, США), фиксирующей жизнеспособность клеток по потреблению ими кислорода в среде Middlebrook 7H9.

Специфическая активность *in vivo*. Исследования проводили совместно с ФГБУ “Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии” Министерства здравоохранения РФ. Белым нелинейным мышам-самцам в хвостовую вену вводили лабораторный тест-штамм *M. tuberculosis Erdman*. На 3-й день после заражения начинали лечение в режиме монотерапии композициями рифамицинов или свободными лекарствами. Препараты вводили внутривенно в течение 6 недель. Эффективность лечения определяли по стандартным показателям для оценки противотуберкулёзных препаратов: количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) из лёгких, индексу поражения лёгких, коэффициентам массы органов и среднему суммарному показателю поражённости (А.Е. Александрова, 1993).

Токсичность. Эксперименты проводили совместно с ФГУН “Институт токсикологии” ФМБА (г. Санкт-Петербург). Исследовали острую (LD₅₀) и субхроническую (подострую) токсичность композиции рифампицина по сравнению с его свободной формой при пероральном введении и острую токсичность при внутривенном введении на нелинейных грызунах (самцах и самках крыс и мышей). Для достижения больших доз препараты вводили животным многократно с интервалами 30 мин. Всех погибших и выживших

животных подвергали вскрытию (некропии), проводили макроскопическое описание внутренних органов и определение их массовых коэффициентов.

Статистическая обработка экспериментальных данных.

Использовали параметрические критерии Стьюдента и Фишера и непараметрический метод Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка новой транспортной системы для рифамицинов

Предварительные исследования показали, что разработанная в ФГБУ “ИБМХ” РАМН фосфолипидная наносистема транспорта (Патент РФ №2391966, Патент РФ №2406537) не позволяла получить стабильные композиции с высоким включением рифамицинов в наночастицы. Поэтому в её состав был введён новый компонент – натриевая соль жирной кислоты, которая обладала рядом необходимых свойств: (1) высоким сродством к фосфолипидам; (2) детергентными свойствами, способствующими увеличению растворимости рифамицинов и стабилизации получаемых дисперсий; (3) собственной биологической активностью (Aungst, 2000), антимикобактериальной активностью (Thorngar, 2011); (4) биосовместимостью и низкой токсичностью.

Экспериментально на примере рифампицина была показана принципиальная возможность получения устойчивой наноэмульсии на основе фосфолипидов и олеата натрия (в качестве соли жирной кислоты), с высоким включением лекарства. Лиофильное высушивание не оказывало существенного влияния на такие параметры образцов, как размер наночастиц и процент включения лекарственной субстанции. В таблице 1 приведены сравнительные данные размера наночастиц и процента включения в них лекарства в образцах композиций рифампицина до и после лиофильного высушивания.

Таблица 1. Характеристика композиций рифампицина, встроенных в фосфолипидно-олеатную транспортную наносистему (ФТН-О-Na) и в наносистему без олеата натрия (ФТН).

№	Наименование образца	До высушивания		После высушивания	
		Процент включения	Диаметр частиц, нм	Процент включения	Диаметр частиц, нм
1	Рифампицин + ФТН-О-Na	91±2,8*	25±3,2**	90±3,4**	26±2,7**
2	Рифампицин + ФТН	76±5,3	58±8,2	52±6,5	55±6,2

Достоверность различий средних значений характеристик в образце 1 по сравнению с образцом 2: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Как видно из таблицы 1, включение олеата натрия оказывало существенное влияние как на встраивание лекарственной субстанции (примерно 90%), так и на размер образующихся наночастиц (менее 30 нм).

С учётом нового компонента был оптимизирован состав транспортной системы и способ ее получения. Экспериментально было установлено, что содержание натриевой соли жирной кислоты должно составлять в среднем 10% от массы фосфолипида. При таком количестве жирная кислота полностью встраивается в наночастицы с образованием гомогенной монодисперсной системы. Увеличение массовой доли олеата натрия вызывает появление крупных частиц (гетерогенности) вплоть до образования масляных капель.

Для выбора жирной кислоты была проведена оценка влияния “энхансерных” свойств (способности повышать кишечное всасывание) натриевых солей некоторых жирных кислот на биодоступность рифампицина. Для этого были получены образцы рифампицина, включённого в фосфолипидные наночастицы, содержащие натриевые соли жирных кислот, наиболее часто применяемые в качестве энхансеров: длинноцепочечных с разной степенью ненасыщенности – олеиновой (C_{18:1}) и линолевой (C_{18:2}), среднецепочечных насыщенных – каприловой (C_{8:0}) и каприновой (C_{10:0}).

Образцы вводили крысам перорально в дозе 6 мг/кг. Через определённые промежутки времени отбирали кровь, в которой определяли концентрацию рифампицина. Полученные данные представлены на рисунке 1.

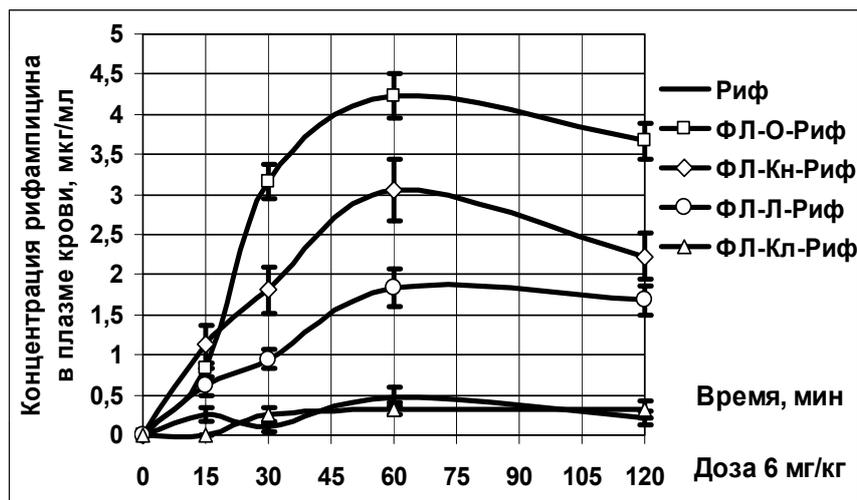


Рисунок 1.

Изменение содержания рифампицина в плазме крови крыс после его перорального введения в свободном виде и в составе наночастиц, образованных фосфолипидом и натриевыми солями жирных кислот.

Сокращения: ФЛ – фосфолипид; Риф – рифампицин; натриевые соли жирных кислот: О – олеиновой, Кн – каприновой, Л – линолевой, Кл – каприловой. Содержание рифампицина в образцах определяли с помощью хромато-масс-спектрометрии (LC/MS).

Из данных, представленных на рисунке 1, видно, что жирная кислота в составе транспортных наночастиц оказывала существенное влияние на всасывание рифампицина. Биодоступность рифампицина оценивали по значениям AUC_{0-120} – площади под кривой концентрация-время и C_{max} – максимальной достигаемой концентрации в крови. В образцах, содержащих линолеат, капрат и олеат значения AUC_{0-120} и C_{max} были существенно выше по сравнению со свободной лекарственной субстанцией: в 11,3 и 8,4 раза, в 7,7 и 6,2 раза, в 4,8 и 3,6 раза соответственно ($p \leq 0,01$). Максимальная разница в значениях AUC_{0-120} и C_{max} была отмечена для образца, содержащего олеат натрия. Учитывая полученные данные, а также антибактериальную активность в отношении *M. Tuberculosis* (Thormar, 2011) и коммерческую доступность, в качестве компонента новой транспортной системы был выбран олеат натрия.

С использованием лабораторно-испытательного (пилотного) комплекса был разработан регламент получения фосфолипидно-олеатной транспортной наносистемы. В соответствии с регламентом, основные технологические условия получения системы: 5 циклов гомогенизации на микрофлюидайзере при $T=45$ °C и давлении 1000 атм.

Таким образом, была разработана новая наносистема транспорта для рифамицинов, состоящая из фосфолипида (с содержанием фосфатидилхолина 95 %) и олеата натрия в соотношении (по массе) 10:1.

2. Характеристика физико-химических свойств разработанной наносистемы транспорта

Учитывая, что разработанная транспортная наносистема предназначена для получения лекарственных композиций, для оценки её (системы) свойств были выбраны следующие физико-химические характеристики: светопропускание (необходимый параметр для инъекционных форм), размер наночастиц (оказывающий влияние на эффективность транспорта), дзета-потенциал (характеризующий стабильность системы в целом). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристики фосфолипидно-олеатной наносистемы транспорта (ФОТН).

Характеристика	Фосфолипидно-олеатная наносистема
Диаметр частиц, нм	16±2,6
Светопропускание (660 нм), %	82±0,7
ζ-потенциал, мВ	-36±6,3

Как видно из таблицы 2, светопропускание эмульсии разработанной наносистемы составляло 82%, что свидетельствует об ультрадисперсности образца и его гомогенности.

Гомогенность разработанной наносистемы транспорта подтверждается данными анализа размера частиц, полученными методом лазерной корреляционной спектроскопии (рисунок 2).

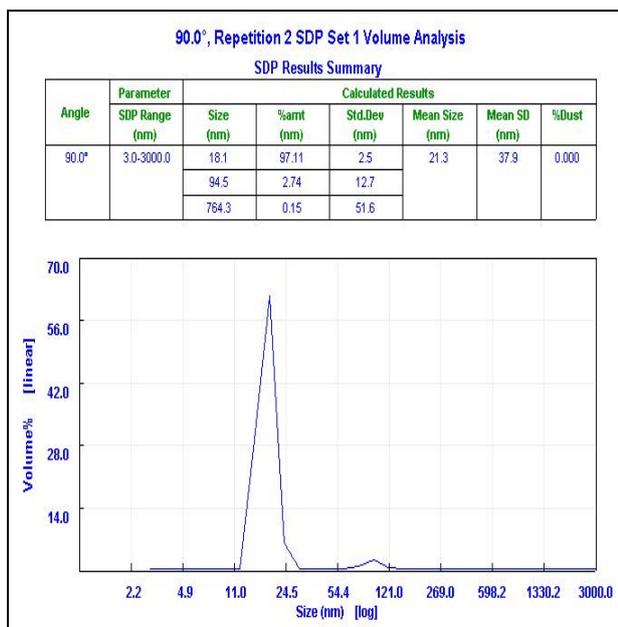


Рисунок 2.

Результаты анализа размера частиц методом лазерной корреляционной спектроскопии.

Как видно из рисунка 2, более 90% всех частиц в объёме образца имели размер 18 нм. Минимальный размер частиц-переносчиков, как показано рядом авторов, способствует повышению специфической активности транспортируемого лекарства (Seki et al., 2004; Moghimi et al., 2001; Wang et al., 2010).

Агрегационную устойчивость частиц в растворе характеризует дзета-потенциал (ζ). Считается, что агрегация заряженных частиц наименее вероятна при $|\zeta| > 30$ мВ (Heurtault et al., 2003). Для разработанной системы величина дзета-потенциала составила $-36 \pm 6,3$ мВ.

Анализ образцов после хранения в течение двух недель при комнатной температуре и при температуре 40°C, в условиях “ускоренного старения”, подтвердил стабильность системы и её агрегационную устойчивость.

Таким образом, разработанная фосфолипидно-олеатная транспортная наносистема представляет собой монодисперсную гомогенную наноэмульсию с размером частиц менее 20 нм, стабильную при хранении и лиофильном высушивании.

Получение композиций рифамицинов на основе разработанной транспортной наносистемы, их физико-химические свойства

Для лекарственных композиций рифамицинов, снабжённых разработанной системой транспорта, определяли максимальное количество лекарственной субстанции, которое встраивается в наночастицы и не оказывает существенного влияния на такие характеристики системы, как размер частиц,

светопропускание и стабильность. В результате проведённых исследований было определено оптимальное соотношение (по массе) основных компонентов композиции: фосфолипид (с содержанием фосфатидилхолина 95%) : олеат натрия : лекарственная субстанция – 10:1:1. Мальтозу в качестве криопротектора добавляли в соотношении к фосфолипиду как 4:1.

Способ получения лекарственных композиций рифамицинов на основе разработанной системы также был оптимизирован. С использованием этого способа были получены образцы композиций рифампицина, рифабутина и рифапентина, снабжённых разработанной фосфолипидно-олеатной транспортной наносистемой (ФОТН-рифамицинов). Они представляли собой лиофильно высушенный порошок, который при регидратации образовывал ультратонкую эмульсию с размером наночастиц не более 50 нм.

Учитывая, что процесс лиофильного высушивания оказывает влияние на связывание лекарственной субстанции с наночастицами (Широнин, 2011), основные характеристики полученных лекарственных композиций определяли сразу после их получения и после лиофильного высушивания и регидратации. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. Физико-химические характеристики композиций рифамицинов, включённых в разработанную систему транспорта (ФОТН).

Композиция	До/после высушивания	Диаметр частиц, нм	Свето-пропускание, %	Процент включения лекарства	Дзета-потенциал, мВ
ФОТН-рифампицин	до	17±1,2	69±0,4	90±1,4	-24±1,2
	после	26±3,2*	67±0,5**	91±2,1	-25±1,3
ФОТН-рифапентин	до	17±1,3	79±0,1	92±2,7	-29±1,9
	после	33±0,7**	71±0,2**	93±1,8	-31±1,0
ФОТН-рифабутин	до	20±0,6	71±0,6	90±1,3	-22±1,1
	после	48±1,7**	50±0,5**	91±1,8	-21±0,9

Достоверность различий средних значений характеристик до и после высушивания:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Как видно из данных, представленных в таблице 3, средний диаметр частиц полученных лекарственных композиций до высушивания был близок к

размеру частиц системы без лекарства и составлял менее 20 нм. Светопропускание эмульсий было более 60%. Включение рифамицинов в наночастицы составило более 90%. Среднее значение дзета-потенциала находилось в интервале от -20 до -30 мВ. Из данных, представленных в таблице 3, также видно, что лиофильное высушивание оказывало влияние на размер частиц наноэмульсий и светопропускание. Наиболее существенные изменения наблюдали для композиции рифабутина. Тем не менее, процент включения лекарства и дзета-потенциал оставались прежними.

Хранение при комнатной температуре эмульсии полученной композиции рифампицина показало её стабильность в течение 6 дней. Затем происходило уменьшение процента включения лекарства, возрастала величина дзета-потенциала.

Таким образом, были получены композиции рифамицинов на основе разработанной транспортной наносистемы в лиофильно высушенном виде. Определены основные физико-химические свойства композиций: средний диаметр частиц после регидратации не превышал 50 нм, процент встраивания лекарства составлял более 90%.

3. Влияние встраивания рифамицинов в разработанную транспортную наносистему на некоторые их фармакокинетические свойства

Биодоступность. Низкая биодоступность при пероральном введении является основным недостатком рифамицинов, особенно рифампицина. Причиной этого является частичное разложение в кислой среде желудка и низкая, переменная абсорбция в ЖКТ. Встраивание в фосфолипидные наночастицы может оказать существенное влияние на этот процесс за счёт активации кишечной абсорбции (усиление трансклеточного и лимфатического всасывания и др.). Более того, доказано, что включение лекарственной субстанции в фосфолипидные наночастицы защищает его от агрессивной среды желудка.

Для определения изменения биодоступности рифамицинов после включения в систему транспорта оценивали динамику их концентраций в плазме крови крыс после перорального введения соответствующих лекарственных композиций и свободных субстанций. Биодоступность оценивали по значениям AUC_{0-120} . Результаты для композиций рифампицина и рифапентина представлены на рисунке 3.

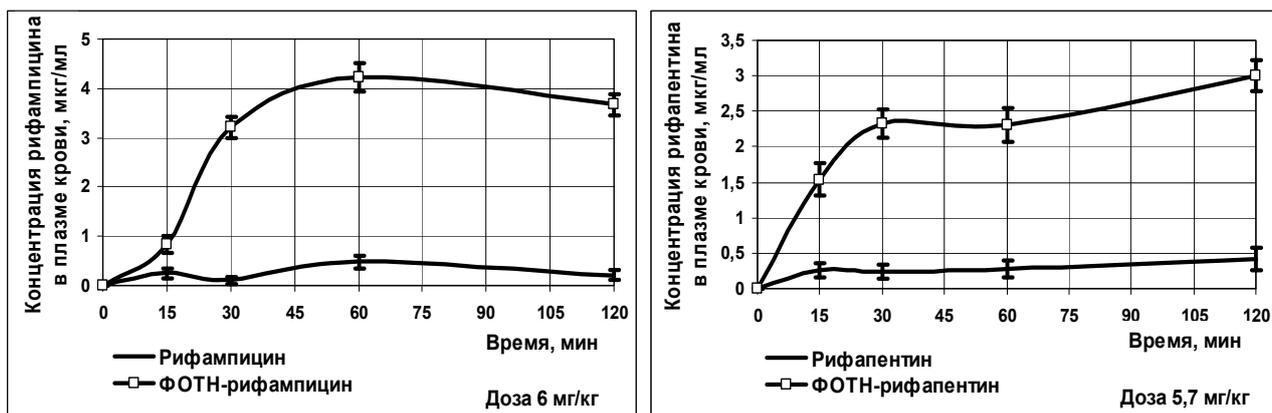


Рисунок 3. Изменение содержания рифамицинов в плазме крови крыс после их перорального введения в составе композиций и в свободном виде.

Из рисунка 3 видно, что включение рифампицина и рифапентина в фосфолипидно-олеатную транспортную наносистему приводило к существенному увеличению их биодоступности. Так, AUC_{0-120} для рифампицина, встроенного в наночастицы, была в 11,3 раза выше ($p \leq 0,01$), чем для свободного лекарства, а для рифапентина – в 7,7 раза выше ($p \leq 0,01$). Для рифампицина концентрация в плазме крови через 1 час после его введения в составе композиции была в 8,4 раза выше ($p \leq 0,01$) по сравнению со свободным лекарством, для рифапентина – в 8,2 раза выше ($p \leq 0,01$).

Низкую и вариабельную биодоступность рифампицина связывают с особенностями этого антибиотика – снижением липофильности по мере возрастания pH в тонком кишечнике (Agrawal и Panchagnula, 2005; Mariappan et al., 2007). Полученные нами данные свидетельствуют о преодолении этого недостатка за счет встраивания рифамицинов в фосфолипидно-олеатные наночастицы.

Для рифабутина, встроенного в разработанную наносистему, достоверного изменения биодоступности по сравнению со свободным лекарством выявлено не было (данные не приведены).

Таким образом, включение рифамицинов в систему транспорта оказывало существенное влияние на их фармакокинетику. Так, биодоступность рифампицина и рифапентина при включении в наносистему транспорта увеличивалась в 11,3 и 7,7 раза соответственно по сравнению со свободным лекарством.

Накопление в тканях. Существенным фактором, контролирующим проникновение лекарства в клетки-мишени, является, наряду с

биодоступностью, степень поступления его в ткани, для противотуберкулёзных препаратов – в лёгкие. Фосфолипидные наночастицы, способствуя транспорту рифамицинов в кишечные клетки, не могут не оказывать влияния и на их накопление в органах и тканях. Для оценки изменения накопления рифампицина и рифапентина в органах и тканях при включении в систему транспорта были проведены эксперименты по определению их содержания в тканях лёгких, почек и печени крыс после перорального введения в составе транспортной системы и в свободном виде. Забор органов и их анализ проводили через 1 час после перорального введения препаратов. Полученные результаты представлены на рисунке 4.

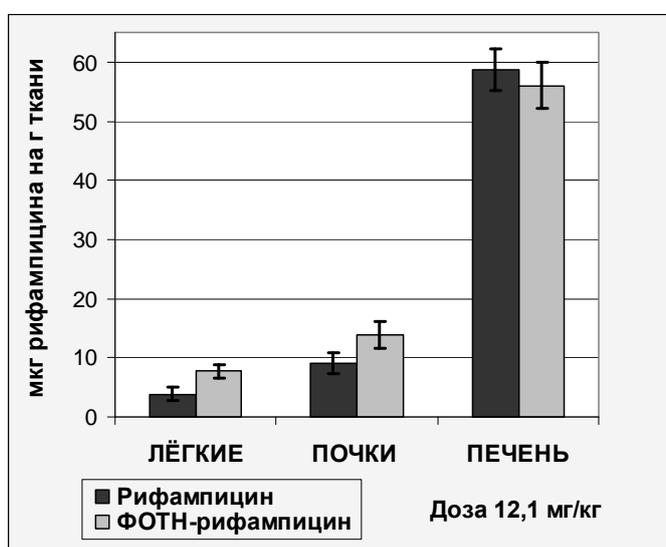
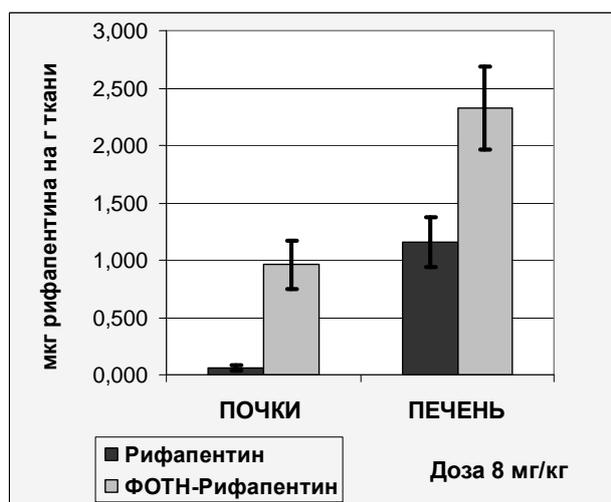
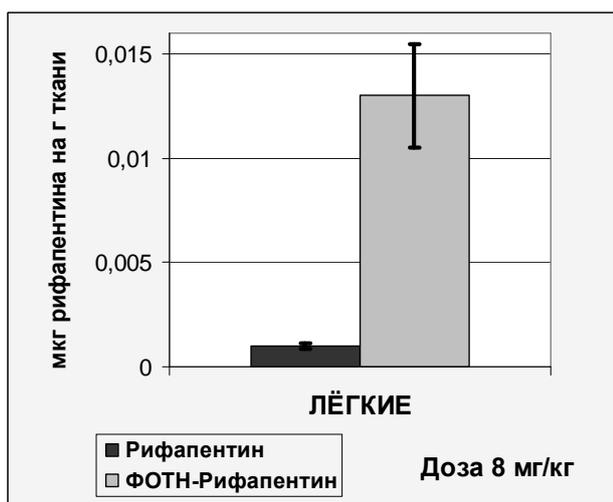


Рисунок 4.

Накопление в органах рифампицина и рифапентина после их перорального введения крысам в свободном виде и в составе разработанной системы транспорта.



Из рисунка 4 видно, что во всех тканях исследованных органов (за исключением рифампицина в ткани печени) количество лекарства возросло при введении его в составе разработанной транспортной наносистемы по

сравнению со свободной лекарственной субстанцией. Особенно следует отметить повышение уровня исследуемых препаратов в лёгких: благодаря системе транспорта количество в них рифампицина возросло в 2 раза ($p \leq 0,05$), рифапентина – в 13 раз ($p \leq 0,01$). Выявленная способность разработанной транспортной наносистемы существенно повышать накопление рифампицина и рифапентина в лёгких должна в дальнейшем оказать влияние на терапевтическую эффективность этих препаратов при лечении наиболее распространённой лёгочной формы туберкулёза.

Увеличение накопления рифапентина в почках и печени также свидетельствует об изменении его фармакокинетики при включении в систему транспорта, что необходимо учесть при разработке готовой формы препарата.

Таким образом, включение рифампицина и рифапентина в разработанную наносистему оказывает существенное влияние на их транспорт и способствует их накоплению в органах, в частности, в лёгких.

Распределение по компонентам плазмы крови. При внутривенном введении лекарства существенным фактором, определяющим на его терапевтическую эффективность, является взаимодействие с компонентами крови. Особый вклад, влияющий на фармакокинетику, вносит связывание с белками плазмы, а также с липопротеинами, в частности, с липопротеинами низкой плотности (ЛНП). Последние, связываясь с клеточными рецепторами, способствуют естественному транспорту лекарства внутрь клетки [Masquelier et al., 2000; Palanisamy et al., 2012]. Активация ЛНП-рецепторов показана и для макрофагов в условиях воспаления и при инфицировании *M. tuberculosis* (Palanisamy et al., 2012; Ye et al., 2009). Поэтому связывание рифампицина с ЛНП будет способствовать его доставке в макрофаги и действию на персистирующие в них бактерии [Mankertz et al., 1997].

Результаты сравнительной оценки распределения рифампицина, включённого в систему транспорта, и в свободном виде, по компонентам плазмы крови при инкубации *in vitro* представлены на рисунке 5.

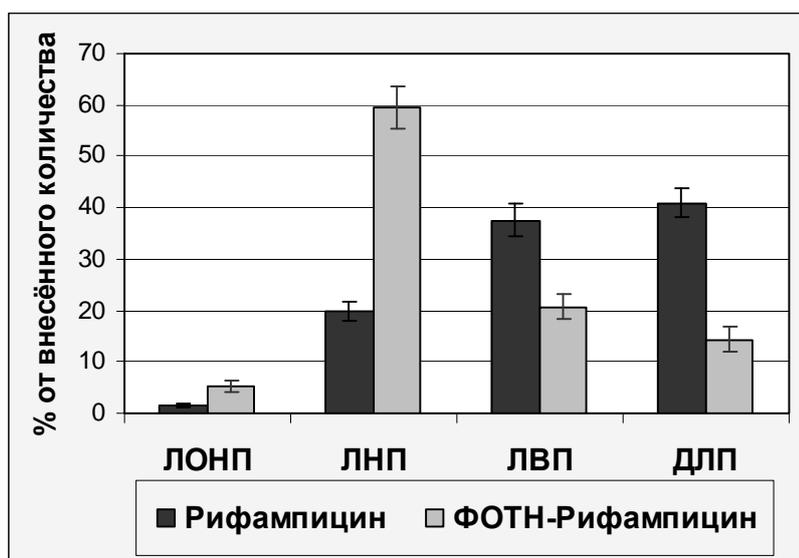


Рисунок 5.

Содержание рифампицина во фракциях плазмы крови после инкубации *in vitro*.

ЛОНП, ЛНП, ЛВП – липопротеины очень низкой, низкой и высокой плотности соответственно, ДЛП – делипидированная (белковая) фракция плазмы крови

Как видно из рисунка 5, свободный рифампицин связывается в основном с белковой фракцией и ЛВП (41% и 38% соответственно). Рифампицин, включённый в транспортную наносистему, связывается в основном с ЛНП (60% по сравнению с 21% для свободного рифампицина, $p \leq 0,01$), что подтверждает возможность его повышенного рецепторно-опосредованного транспорта в макрофаги.

Таким образом, встраивание рифампицина в разработанную транспортную наносистему снижает степень его ассоциации с белками плазмы крови и обеспечивает преимущественное, в 3 раза большее связывание с ЛНП.

4. Специфическая активность рифамицинов, включённых в систему транспорта

Сравнительная оценка минимальной ингибирующей концентрации рифампицина, включённого в систему транспорта. Сравнительную оценку минимальной ингибирующей концентрации (МИК) рифампицина, включённого в фосфолипидно-олеатную наносистему транспорта, проводили в экспериментах *in vitro*, на лабораторном штамме *M. tuberculosis H37Rv*. Результаты оценки влияния препаратов на рост клеток микобактерий в течение 42 дней приведены в таблице 4.

Таблица 4. Влияние свободного рифампицина и снабжённого наносистемой транспорта на рост клеток *M. tuberculosis H37Rv*.

ПРЕПАРАТ	КОНЦЕНТРАЦИЯ РИФАМПИЦИНА В СРЕДЕ		
	1 мг/мл	0,5 мг/мл	0,25 мг/мл
Свободный рифампицин	Нет роста клеток	Рост клеток на 40-42-ой дни	Рост клеток на 26-27-ой дни
ФОТН-Рифампицин	Нет роста клеток	Нет роста клеток	Рост клеток на 42-ой день
Без добавления рифампицина	Рост клеток с 7-8 дня		

Как видно из данных, представленных в таблице 4, при добавлении в среду рифампицина до концентрации 1 мг/мл, как свободного, так и включённого в разработанную транспортную наносистему, роста клеток не наблюдали в течение всего эксперимента (42 дней), т. е. происходило 100%-ное ингибирование роста микобактерий. При концентрации 0,5 мг/мл в среде с добавлением свободного рифампицина в последние 2-3 дня (на 40-42-ой дни) наблюдался небольшой рост клеток, менее процента от такового в среде без лекарства. Следовательно, для свободного рифампицина МИК составляла 1 мг/мл. В среде же с добавлением рифампицина, встроенного в транспортную наносистему (ФОТН-рифампицина), при концентрациях 1 мг/мл и 0,5 мг/мл роста клеток до конца эксперимента не наблюдали. Лишь при снижении концентрации до 0,25 мг/мл в последний 42-ой день фиксировали небольшой рост микобактерий (менее 1%). Следовательно, величина МИК для рифампицина, включённого в систему транспорта, составила 0,5 мг/мл, что в 2 раза меньше, чем для свободного лекарства.

Снижение МИК для рифампицина, включённого в наносистему транспорта, свидетельствует о его большем проникновении в клетки по сравнению со свободной субстанцией. Одной из причин этого может быть афинность компонентов наночастиц – фосфолипидов и олеата – к высоко гидрофобной клеточной стенке *M. tuberculosis* (Sosnik et al., 2010).

Таким образом, рифампицин в составе разработанной транспортной наносистемы проявлял более высокую активность по отношению к

M. tuberculosis H37Rv. Его МИК была в 2 раза меньше по сравнению со свободным лекарством.

Специфическая противотуберкулёзная активность рифамицинов, включённых в систему транспорта. В экспериментах *in vivo* на модели генерализованного туберкулёза у мышей, вызванного штаммом *M. tuberculosis* Erdman, исследовали специфическое действие рифамицинов, включённых в наносистему транспорта, в сравнении с соответствующими свободными субстанциями. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Противотуберкулёзная активность композиций рифамицинов.

Лекарство	Форма лекарства	Вводимая доза, мг/кг	Количество КОЕ из лёгких	Средний суммарный показатель поражённости
Рифампицин	Свободная	10	37,4±15,6	9,06
	Композиция с ФОТН		1,7±1,1 p<0,05	1,66
Рифапентин	Свободная	10	20,5±2,66	7,6
	Композиция с ФОТН		1,8±0,11 p<0,001	1,52
Рифабутин	Свободная	7,5	250±17,7	84,59
	Композиция с ФОТН		32,3±4,18 p<0,001	11,66

Из данных, представленных в таблице 5, видно, что рифамицины, включённые в систему транспорта, оказывали более выраженное специфическое действие по сравнению со свободными субстанциями. Наиболее значительными оказались различия в числе колониеобразующих единиц (КОЕ). Этот принятый в бактериологии показатель, дающий информацию о степени обсеменённости объекта (в данном случае лёгких), является основным критерием по экспериментальной оценке действия противотуберкулёзных препаратов. Лечение с применением композиции рифампицина привело к достоверному снижению количества КОЕ из лёгких в 22 раза по сравнению со свободным лекарством, для рифапентина – в 11,4 раза, для рифабутина – в 7,7

раза. Средний суммарный показатель поражённости органов был в 5-7 раз ниже, чем у животных, получавших свободную форму лекарства.

Повышение противотуберкулёзной активности полученных композиций рифамицинов связано с изменением их фармакокинетики за счёт встраивания в разработанную транспортную наносистему. Для рифампицина и рифапентина эти изменения проявлялись в увеличении их пероральной биодоступности и накопления в тканях. Для выявления влияния фосфолипидно-олеатной транспортной наносистемы на фармакокинетику рифабутина требуются дополнительные исследования.

Таким образом, встраивание рифампицина, рифапентина и рифабутина в разработанную транспортную наносистему приводило к существенному повышению их противотуберкулёзного действия при монотерапии экспериментального генерализованного туберкулёза у мышей.

5. Токсичность композиции рифампицина

Учитывая полученные данные по изменению фармакокинетики рифамицинов при их включении в разработанную наносистему транспорта, представлялось целесообразным оценить изменения токсичности полученных композиций. Исследования проводили на примере рифампицина в сравнении со свободной субстанцией или препаратом-аналогом без системы транспорта.

Пероральное введение. Результаты определения ЛД₅₀ при исследовании острой токсичности приведены в таблице 6.

Таблица 6. ЛД₅₀ (в мг/кг) для мышей и крыс обоих полов при пероральном введении рифампицина в составе композиции и в свободной форме.

Препарат	Мыши		Крысы	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
ФОТН-Рифампицин	3900±100	3400±60	5000±300	5000±300
Рифампицин	1750±150	1650±50	2750±150	2100±200

Как видно из таблицы 6, значения ЛД₅₀ для композиции рифампицина, были почти в 2 раза больше, чем для его свободной формы. Это свидетельствует о том, что включение рифампицина в фосфолипидно-олеатную

транспортную наносистему снижает его острую токсичность приблизительно в 2 раза.

При исследовании субхронической (подострой) токсичности рифампицин в свободной форме вводили крысам в дозах 10 мг/кг (максимальная терапевтическая доза для человека) и 300 мг/кг. Для композиции рифампицина, ввиду уменьшения его острой токсичности в 2 раза, эти дозы удваивали. Ежедневное введение образцов рифампицина (как в свободном виде, так и включённого в транспортную наносистему) в течение 21 дня не вызвало гибели животных и не выявило заметных сдвигов жизненных, физиологических и др. показателей. Также не отмечены какие-либо изменения внутренних органов.

Внутривенное введение. Результаты определения ЛД₅₀ при исследовании острой токсичности приведены в таблице 7.

Таблица 7. ЛД₅₀ (в мг/кг) для крыс обоих полов при внутривенном введении композиции рифампицина и препарата-аналога.

Препарат	Самцы	Самки
Рифампицин-Ферейн [®]	590±40	530±30
ФОТН-Рифампицин	710±50	710±50

Из таблицы 7 видно, что значения ЛД₅₀ для композиции рифампицина на 20-30% выше, чем для его аналога Рифампицин-Ферейн[®]. Одной из причин снижения токсичности может быть известное гепатопротекторное действие основного компонента транспортной системы, фосфатидилхолина, снижающее гепатотоксичность рифампицина.

Следовательно, при пероральном введении животным композиция рифампицина проявляла примерно в 2 раза меньшую токсичность, чем субстанция рифампицина, а при внутривенном введении – на 20-30% меньшую, чем препарат-аналог Рифампицин-Ферейн[®].

Таким образом, разработанная в данном исследовании фосфолипидно-олеатная наносистема транспорта оказала существенное влияние на фармакокинетику рифамицинов и их противотуберкулёзную активность.

Ключевыми моментами, обеспечивающими эффективность разработанной транспортной системы, являются оптимально подобранный состав и минимальный размер составляющих её наночастиц. Помимо липофильности и детергентных свойств, олеиновая кислота и фосфатидилхолин, входящие в состав системы транспорта, обладают выраженными биологическими свойствами, что проявилось как в повышении специфической активности, так и в снижении токсичности разработанных композиций. Предельно малый размер частиц транспортной наносистемы способствовал изменению биодоступности и внутриклеточному транспорту лекарства, его повышенному накоплению в лёгких. Разработанная наносистема транспорта может быть в дальнейшем использована для труднорастворимых лекарственных соединений других терапевтических групп.

ВЫВОДЫ

1. На основе фосфолипидов (с содержанием фосфатидилхолина 95%) и натриевой соли олеиновой кислоты разработана наносистема транспорта для рифампицина, рифабутина и рифапентина, которая представляет собой ультрадисперсную гомогенную наноэмульсию, с размером частиц менее 20 нм, стабильную при лиофилизации и в условиях длительного хранения.
2. На основе фосфолипидно-олеатной транспортной наносистемы получены композиции рифампицина, рифабутина и рифапентина с массовым соотношением фосфолипид : олеат натрия: лекарственная субстанция – 10:1:1.
3. Включение рифампицинов в разработанную систему транспорта оказывает существенное влияние на их фармакокинетику: биодоступность рифампицина и рифапентина при пероральном введении крысам достоверно ($p \leq 0,01$) увеличивается в 11,3 и 7,7 раз соответственно; накопление в лёгких увеличивается в 2 раза ($p \leq 0,05$) для рифампицина и 13 раз ($p \leq 0,01$) для рифапентина; в 3 раза ($p \leq 0,01$) увеличивается связывание рифампицина с липопротеинами низкой плотности.
4. Включение рифамицинов в разработанную систему транспорта оказывает существенное влияние на их специфическую (противотуберкулёзную) активность: число колониеобразующих единиц (КОЕ) в лёгких мышей с моделью туберкулёза при лечении полученными композициями рифампицина, рифабутина и рифапентина уменьшается в 22 ($p < 0,05$), в 11,4 ($p < 0,001$) и в 7,7 ($p < 0,001$) раза соответственно.
5. Показано снижение токсичности рифампицина (увеличение ЛД₅₀) при включении в разработанную транспортную наносистему как при пероральном, так и при внутривенном введении.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Санжаков М.А., Ипатова О.М., Торховская Т.И., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Дружиловская О.С., Медведева Н.В. Наночастицы как системы транспорта для противотуберкулёзных лекарств // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т.8 – С. 37-44.
2. Санжаков М.А., Прозоровский В.Н., Ипатова О.М., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Торховская Т.И. Система транспорта на основе

фосфолипидных наночастиц для рифампицина // Биомедицинская химия. – 2013. – Т.59, № 5. – С. 585-590.

3. Патент РФ №2 472 512, МПК А61К31/685, А61К9/127, В82В3/00, А61Р 31/06. Противотуберкулёзная композиция и способ её получения / Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Санжаков М.А., Тихонова Е.Г., Дружиловская О.С., Минаев С.А., Кюркчан П.А.; заявитель и патентообладатель ООО “ИБМХ-ЭкоБиоФарм” – №2011149543/15; заявл. 06.12.2011; опубл. 20.01.2013, Бюл. №2.

4. Патент РФ №2463056, МПК А61К31/685, А61К9/127, А61К47/44, В82В1/00. Композиция для встраивания лекарственных субстанций в липидную матрицу, композиция лекарственного средства с фосфолипидно-жирнокислотной системой и способы их получения / Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Санжаков М.А., Тихонова Е.Г., Попков И.А., Стрекалова О.С., Широинин А.В.; заявитель и патентообладатель ООО “ЭкоБиоФарм” – №2011114573/15; заявл. 15.04.2011; опубл. 10.10.2012, Бюл. №28.

Материалы трудов конференций:

5. Санжаков М.А., Торховская Т.И., Тихонова Е.Г., Прозоровский В.Н., Ипатова О.М. Фосфолипидно-олеатные наночастицы для транспорта рифампицина // Материалы VII Московского международного конгресса “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. – Москва, 2013. – Т.1. – С. 125-126.

6. Санжаков М.А., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Ипатова О.М. Фосфолипидная наносистема транспорта для препаратов рифамицинового ряда // Материалы Московской международной научно-практической конференции “Фармацевтические и биомедицинские технологии”. – Москва, 2012. – С. 256-257.

7. Санжаков М.А., Прозоровский В.Н., Ипатова О.М. Наносистема для транспорта рифамицинов // Сборник статей XII международной научно-практической конференции “Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности”. – Санкт-Петербург, 2011. – Т. 2. – С. 293.