

УДК 577.355

## ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА БИОДОСТУПНОСТИ НАНОЧАСТИЦ С ГАТИФЛОКСАЦИНОМ

Е.В. Блынская<sup>1,2</sup>, К.В. Алексеев<sup>2</sup>, С.Э. Кондаков, Р.Н. Аляутдин<sup>1</sup>,  
В.Ю. Балабаньян<sup>1</sup>

(кафедра химической кинетики; e-mail: ksekse@mail.ru)

Изучена фармакокинетика новой транспортной формы противотуберкулезного препарата гатифлоксацина в виде наночастиц. В опытах *in vivo* на лабораторных животных показано, что лекарственная форма гатифлоксацина в виде наночастиц на сополимере DL-молочной и гликолевой кислот по сравнению с лекарственной формой, выпускаемой промышленностью, имеет измененный фармакокинетический профиль. Для полученного в виде наночастиц препарата в плазме крови увеличивается период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) и среднее время удерживания лекарственного вещества в организме (MRT). Показано, что площадь под фармакокинетической кривой “концентрация – время” ( $AUC_{(0 \rightarrow 36)}$ ) увеличивается в основном за счет терминального участка кривой.

**Ключевые слова:** наночастицы, гатифлоксацин, сополимер молочной и гликолевой кислот, полимерный носитель.

Проблема лечения туберкулеза становится все более актуальной, так как появились его новые формы, которые не поддаются лечению существующими лекарственными средствами [1]. Под лекарственно устойчивыми штаммами в настоящее время понимаются микробактерии туберкулеза, устойчивые к двум и более противотуберкулезным препаратам, прежде всего к изониазиду и рифампицину. Есть основания полагать, что такое положение является результатом, с одной стороны, появления штаммов возбудителей, резистентных по отношению к применяемым лекарствам, с другой – снижением общего уровня иммунитета населения и недостаточным лекарственным обеспечением [2, 3]. Одним из перспективных подходов к лекарственной терапии таких штаммов является создание новых транспортных форм фармацевтических препаратов в виде наночастиц с контролируемым высвобождением действующего вещества на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях [4]. Высокая эффективность терапии новых транспортных форм, содержащих наночастицы, основана прежде всего на их способности обеспечивать эффективный транспорт лекарственных веществ в макрофаги [5]. Кроме того, биоразлагаемые наночастицы обладают более низкой токсичностью по сравнению с обычной лекарственной формой [6]. Все это делает использование наночастиц одним из наиболее перспективных на-

правлений создания инновационных транспортных форм доставки лекарственных веществ [7].

В настоящее время одним из наиболее перспективных противотуберкулезных препаратов для использования против мультирезистентных штаммов является гатифлоксацин (ГТФК) (рис. 1) (7-(3-метилпиперазин-1-ил)-8-метокси-4-оксо-6-фтор-1-циклопропил-1,4-дигидро-хинолин-3-карбоновой кислоты сесквигидрат) (8-метоксифторхинолон).

Цель настоящей работы – исследование фармакокинетических параметров ГТФК с помощью наночастиц и в традиционной форме.

В работе использовали промышленно выпускаемый гатифлоксацина сесквигидрат (НД 42-13523-05), сополимер DL-молочной и гликолевой кислот

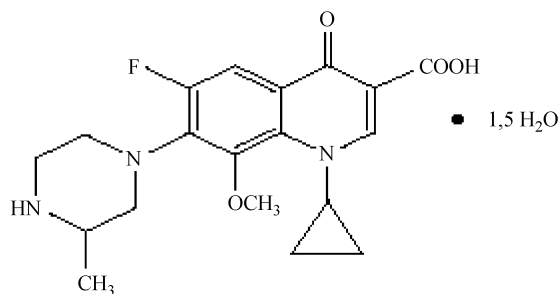


Рис. 1. Структурная формула ГТФК

<sup>1</sup> ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, <sup>2</sup> ГУ НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва.

(“Boehringer Ingelheim”), а также блок-сополимеры окиси этилена и окиси пропилена – плуроник Ф68 (BASF) без дополнительной очистки. Размеры полученных наночастиц в растворе определяли при помощи наносайзера “Nicomp 380 submicron Particle Sizer” (“Particle Sizing Systems”, США). Чистоту исходного ГТФК и его определение в фармакокинетических исследованиях проводили при помощи жидкостного хроматографа “Series 200” (“Perkin Elmer”, США) с петлевым краном-дозатором фирмы “Rheodyne” (модель 7125, США).

Наночастицы ГТФК получали методом двойного эмульгирования. В 20 мл дихлорметана растворяли 400 мг DL-молочной и гликолевой кислот сополимера, в 10 мл очищенной воды растворяли 400 мг ГТФК. При непрерывном перемешивании на магнитной мешалке (350 об/мин) к полученному раствору по каплям добавляли раствор сополимера DL-молочной и гликолевой кислот в дихлорметане. Перемешивание продолжали в течение 3–5 мин (эмульсия № 1). Готовили 1%-й водный раствор плуроника Ф68 (сополимеры окиси этилена и пропилена). Эмульсию № 1 по каплям прибавляли к приготовленному 1%-у раствору плуроника Ф68 (100 мл), проводя при этом непрерывное перемешивание на магнитной мешалке при 400 об/мин (эмульсия № 2). Процесс перемешивания осуществляли в течение 3 ч до полного удаления дихлорметана из раствора. Приготовленную смесь фильтровали через пористый фильтр (0,22 мкм), разливали по флаконам и подвергали лиофилизации в течение 24 ч на лиофильной сушке “Alpha Christ 2-6” (Германия). Полученные флаконы с препаратом отправляли на радиационную стерилизацию при дозе облучения 15 кГр.

Размер полученных наночастиц определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии на приборе “Nicomp 380” (“Particle Sizing Systems”, США). Лиофилизат растворяли в 2 мл очищенной воды, отбирали аликвоту (50 мкл) и помещали в кювету, содержащую 3 мл воды. Размер частиц определяли сразу после растворения при следующих рабочих параметрах: угол рассеяния 90°, температура 25°C, вязкость 0,001 Па, показатель преломления 1,333. Полученные результаты по распределению частиц по размерам приведены в табл. 1.

Степень сорбции определяли как отношение количества ГТФК, включенного в полимерную матрицу, к общему количеству ГТФК в лекарственной форме. Свободный и включенный ГТФК разделяли методом ультрацентрифугирования на центрифуге “J21” фирмы

Таблица 1

Распределение наночастиц ГТФК по размерам (рН 2,6)

Номер эмульсии	Размер, нм	Стандартное отклонение, нм	Количество, % (по массе)
1	5	0,8	1,1
2	339	22	97,3
3	423	31	1,6

“Beckman”. Лиофилизат ресуспендировали, добавляя исходный объем очищенной воды. В пробирку помещали 3 мл суспензии и центрифугировали 70 мин при 20000g. Степень сорбции определяли по формуле:

$$\text{степень сорбции, \%} = 100\% \times (C_{\text{исх}} - C_{\text{своб}}) / C_{\text{теор}}$$

где  $C_{\text{исх}}$  – исходная концентрация ГТФК в среде образования матрицы,  $C_{\text{своб}}$  – концентрация ГТФК в надосадочной жидкости. Концентрацию ГТФК в супернатанте определяли спектрофотометрически в фосфатном буфере.

Количественное содержание ГТФК в надосадочной жидкости определяли методом ВЭЖХ. Пробоподготовку осуществляли следующим образом: к содержимому флакона добавляли 3 мл диметилформаида, взвесь количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, объем доводили до метки диметилформаидом и проводили интенсивное встряхивание в течение 30 с на аппарате “358S” (Польша). После этого отбирали 1,0 мл образца, разбавляли в пять раз смесью вода:диметилформаид (2:3) и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Фармакокинетические исследования проводили на лабораторных животных (12 здоровых кроликов-самцов породы шиншилла). Животных содержали в стационарных условиях при естественном световом режиме и стандартном рационе (комбикорм, вода). За 12 ч до начала эксперимента животных лишали пищи, оставляя свободный доступ к воде. Непосредственно перед началом эксперимента кроликов помещали в специальные станки и проводили катетеризацию краевой ушной вены. Исследуемые субстанции ГТФК вводили животным однократно путем внутривенной инфузии в дозе 2,86 мг/кг.

Для проведения фармакокинетических экспериментов экстракцию ГТФК из образца крови лабораторного животного осуществляли по следующей методике. К пробам плазмы крови (0,5 мл) добавляли 2,5 мл этилацетата, пробирку встряхивали в течение

15 мин в аппарате для встряхивания и центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин. Органическую фазу отделяли и выпаривали на водяной бане при 70°C в токе азота. Сухой остаток растворяли в 0,1 мл подвижной фазы. 50 мкл полученного раствора вводили в хроматографическую колонку с помощью петлевого крана-дозатора. Процент экстракции ГТФК из плазмы крови определяли по формуле:

$$K_{\text{экстр}} = \text{tg}\alpha/\text{tg}\beta \times 100\%,$$

где  $\text{tg}\alpha$ ,  $\text{tg}\beta$  – тангенс угла наклона соответственно внутренней и внешней калибровочных кривых по отношению к оси абсцисс.

Хроматографический анализ содержания ГТФК в плазме крови кроликов проводили на жидкостном хроматографе “Series 200”, оснащенном градиентным насосом, спектрофотометрическим детектором на компьютере с программным обеспечением “MultiChrom”. Условия хроматографирования: стационарная фаза – колонка “X Terra MS” фирмы “Waters” с обращенно-фазным сорбентом C18 (3×50 мм; 5 мкм); подвижная фаза – смесь ацетонитрила и 0,025 М раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  с pH 3; (20:80, по объему); скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин; изократический режим работы насоса; детектирование на УФ-спектрофотометре при  $\lambda = 293$  нм, соответствующей максимуму поглощения вещества; объем петли хроматографа 50 мкл; температура хроматографирования 21°C. Перед хроматографированием подвижную фазу фильтровали и дегазировали на ультразвуковой бане. Такая система очистки позволила избежать появления дополнительных пиков во время анализа. Предел обнаружения разработанной методики ~25 нг/мл.

По результатам экспериментов была проведена оценка качества разработанной лекарственной формы ГТФК в виде лиофилизата наночастиц для приготовления раствора для инъекций. Анализ полученных данных позволил установить, что лиофилизат ГТФК для приготовления инъекций на основе сополимера DL-молочной и гликолевой кислот значительно медленнее выводится и соответственно дольше находится в кровяном русле после введения тест-препарата ( $T_{1/2} = 17,32 \pm 1,05$  ч), а не референс-препарата ( $T_{1/2} = 10,13 \pm 2,83$  ч). Полученные графики приведены на рис. 2. Дополнительным подтверждением более интенсивной элиминации ГТФК из системного кровотока животных после введения референс-препарата являются также низкая величина среднего времени удерживания ГТФК в организме ( $\text{MRT} = 9,44 \pm 1,25$  ч); более высокий клиренс

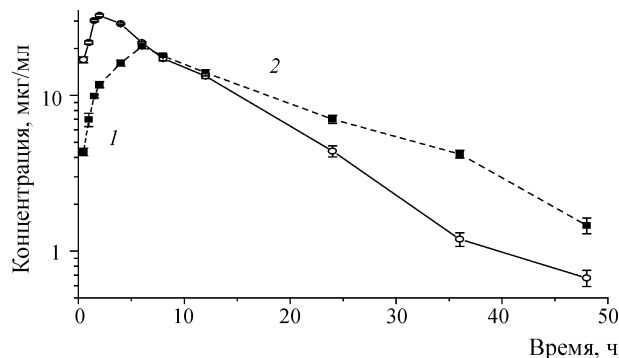


Рис. 2. Фармакокинетические кривые усредненных концентраций ГТФК в плазме крови кроликов после однократного перорального введения таблеток и капсул препарата в дозе 68,3 мг/кг ( $n = 6$ ,  $M \pm SD$ ): 1 – капсулы гатифлоксацина (200 мг), 2 – таблетки гатифлоксацина (200 мг)

( $\text{Cl} = 122,67 \pm 13,27$  мл/кг/ч) в сравнении с аналогичными фармакокинетическими параметрами, рассчитанными для тест-препарата ( $\text{MRT} = 12,8 \pm 0,40$  ч;  $\text{Cl} = 74,45 \pm 4,29$  мл/кг/ч). Полученные данные для тест-препарата и препарата сравнения приведены в табл. 2. Сравнение абсолютных величин параметров  $\text{AUC}_{(0 \rightarrow 36)}$  и  $C_{\text{макс}}$  показало, что  $C_{\text{макс}}$  ГТФК после внутривенного введения тест и референс-препарата путем константной инфузии не различаются ( $4,105 \pm 0,880$  и  $3,903 \pm 0,355$  мкг/мл соответственно), однако величина  $\text{AUC}_{(0 \rightarrow 36)}$  выше для тест-препарата ( $30,342 \pm 1,570$  ч·мкг/мл) по сравнению с референс-препаратом ( $21,717 \pm 2,077$  ч·мкг/мл), в основном за счет терминального участка фармакокинетической кривой.

Таким образом, проведенное на кроликах исследование особенностей фармакокинетики разработанной лекарственной формы ГТФК в виде наночастиц на сополимере DL-молочной и гликолевой кислот по сравнению с лекарственной формой, выпускаемой промышленностью (“KRKA”, Словения), показало, что введение ГТФК в виде наночастиц DL-молочной и гликолевой кислот приводит к изменению фармакокинетического профиля препарата в плазме крови: увеличивается период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) и среднее время удерживания лекарственного вещества в организме ( $\text{MRT}$ ), площадь под фармакокинетической кривой “концентрация–время” ( $\text{AUC}_{(0 \rightarrow 36)}$ ) также возрастает (в основном за счет терминального участка кривой).

Полученные данные свидетельствуют о более длительном нахождении препарата в кровяном русле в концентрациях, достаточных для эффективного воздействия, что позволяет предположить пролонгацию действия ГТФК в виде наночастиц на сополимере DL-молочной и гликолевой кислот.

Таблица 2

Значения фармакокинетических параметров ГТФК после однократного внутривенного введения изучаемых лекарственных форм кроликам в дозе 2,86 мг/кг

Тест-препарат										
Номер образца	$T_{\max}$	$C_{\max}$	$AUC_{(0 \rightarrow 36)}$	$AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$	Cl	$V_d$	$V_{ss}$	$T_{1/2}$	$k_{el}$	MRT
	ч	мкг/мл	ч×мкг/мл	ч×мкг/мл	мл/ч/кг	л/кг	л/кг	ч	ч <sup>-1</sup>	ч
1	0,5	2,786	29,242	38,196	74,88	1,97	1,87	18,26	0,038	13,58
2	0,5	4,361	31,737	39,435	72,52	1,67	1,56	15,97	0,043	12,44
3	0,5	3,283	28,204	35,038	81,63	1,92	1,79	16,28	0,043	12,82
4	0,5	4,931	30,931	39,293	72,79	1,85	1,67	17,62	0,039	12,57
5	0,5	4,910	29,649	37,604	76,06	1,89	1,74	17,23	0,040	12,75
6	0,5	4,356	32,286	41,535	68,86	1,85	1,64	18,58	0,037	12,66
M	0,5	4,105	30,342	38,517	74,45	1,86	1,71	17,32	0,040	12,80
SD	–	0,880	1,570	2,172	4,29	0,10	0,11	1,05	0,002	0,40
Доверительный интервал $\alpha = 0,05$	–	0,704	1,257	1,738	3,43	0,08	0,09	0,84	0,002	0,32
Референс-препарат										
Номер образца	$T_{\max}$	$C_{\max}$	$AUC_{(0 \rightarrow 36)}$	$AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$	Cl	$V_d$	$V_{ss}$	$T_{1/2}$	$k_{el}$	MRT
	ч	мкг/мл	ч×мкг/мл	ч×мкг/мл	мл/ч/кг	л/кг	л/кг	ч	ч <sup>-1</sup>	ч
7	0,5	3,783	25,812	29,787	96,01	1,86	1,69	13,44	0,052	11,84
8	0,5	4,201	21,451	22,117	129,31	1,39	1,26	7,45	0,093	8,63
9	0,5	3,796	21,175	22,815	125,36	1,63	1,52	9,02	0,077	9,29
10	0,5	3,357	20,915	21,740	131,56	1,51	1,29	7,94	0,087	8,35
11	0,5	3,912	21,065	22,299	128,26	1,66	1,50	9,00	0,077	9,51
12	0,5	4,371	19,885	22,781	125,54	2,53	1,88	13,94	0,050	9,03
M	0,5	3,903	21,717	23,590	122,67	1,76	1,53	10,13	0,073	9,44
SD	–	0,355	2,077	3,063	13,27	0,41	0,24	2,83	0,018	1,25
Доверительный интервал $\alpha = 0,05$	–	0,284	1,662	2,451	10,62	0,32	0,19	2,26	0,014	1,00

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Нечаева О.Б.* // Уральское медицинское обозрение. 2001. № 1. С. 16.
2. *Мачнева Л.А.* // Фармац. вестн. 2000. № 13. С. 9.
3. *O'Brien R.J., Nunn P.P.* // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2001. **163**. P. 1055.
4. *Krishna K. et al.* // J. Drug Targeting. 2008. **16**. P. 311.
5. *Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А., Хуцян С.С., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г.* // Российские нанотехнологии. 2008. **3**. № 3-4. С. 162.
6. *Минько Н.И., Нарцев В.М.* Методы получения и свойства нанообъектов. Белгород, 2007.
7. *Себякин Ю.Л., Буданова У.А., Колоскова О.О., Миرون А.Ф.* // Российские нанотехнологии. 2009. **4**. № 5-6. С. 108.
8. *Алексеев К.В., Аляутдин Р.Н., Бlynская Е.В., Квинх Б.Т.* // Вестник новых медицинских технологий. 2009. **16**. № 2. С. 142.
9. *Гусева А.Ф., Нейман А.Я., Нохрин С.С.* Методы получения наноразмерных материалов. Екатеринбург, 2008.

Поступила в редакцию 20.01.10

**SYNTHESIS OF THE NANO PARTICLES OF GATIFLOXACINE WITH THE (D,L-LACTIDE GLYCOLIDE) CARRIER. COMPARATIVE PHARMACOLOGICAL KINETICS INVESTIGATION.**

**Ye.V. Blynskaya, K.V. Alekseyev, S.E. Kondakov, R.N. Alyautdin, V.Yu. Balabaniyan**

*(Division of Kinetic Chemistry)*

**Synthesis and investigation of the nano particles of gatifloxacin with the (D,L-lactide glycolide) as a carrier was described. The differences of pharmacological kinetics of gatifloxacin in nano particles and as is forms was investigated.**

**Key words:** *nanoparticles, gatifloxacin, D,L-lactide glycolide, polymer carrier.*

**Сведения об авторах:** *Бlynская Евгения Викторовна* – аспирант кафедры фармакологии ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, мл. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм ГУ НИИ им. В.В. Закусова РАМН; *Кондаков Сергей Эмильевич* – ст. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ, докт. фарм. наук (ksekse@mail.ru); *Алексеев Константин Викторович* – зав. лаб. готовых лекарственных форм ГУ НИИ им. В.В. Закусова РАМН, докт. фарм. наук; *Аляутдин Ренад Николаевич* – зав. кафедрой фармакологии ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, докт. фарм. наук; *Балабаньян Вадим Юрьевич* – доцент кафедры фармакологии ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, канд. фарм. наук.