

Е. В. Шипуло¹, И. И. Любимов², О. О. Максименко¹, Л. В. Ванчугова¹,
Е. А. Оганесян¹, П. Г. Свешников¹, С. Ф. Бикетов², Е. С. Северин¹,
Л. Б. Хейфец³, С. Э. Гельперина¹

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МОКСИФЛОКСАЦИНА НА ОСНОВЕ ПОЛИБУТИЛЦИАНОАКРИЛАТА

¹ Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва;

² Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская область;

³ Национальный еврейский медицинский научный центр, Денвер, США

Показана возможность получения наносомальной формы моксифлоксацина на основе полибутилцианоакрилата. Разработанная методика позволяет получать наносомальные формы с высоким общим содержанием моксифлоксацина при значительной степени сорбции его в наночастицах ($\approx 45\%$); размер наночастиц составляет 380 ± 50 нм. На модели экспериментального туберкулеза у мышей показано, что эффективность наносомального моксифлоксацина более чем в 2 раза превышает эффективность стандартной лекарственной формы.

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают коллоидные системы доставки антибиотиков на основе различных биodeградируемых наночастиц (НЧ), показавшие высокую эффективность при лечении экспериментальных внутриклеточных инфекций [1 – 5].

К числу синтетических полимеров, часто используемых для получения НЧ, относятся полиалкилцианоакрилаты [6, 7]. Целесообразность применения полиалкилцианоакрилатов для получения коллоидных лекарственных форм обусловлена прежде всего их низкой токсичностью и биосовместимостью. Наночастицы получают путем полимеризации алкилцианоакрилатов; последние широко используются в медицине в качестве хирургических клеев (Sicomet®, Trufill®, Dermabond® и др.). В процессе получения наночастиц образуются низкомолекулярные полиалкилцианоакрилаты (3000 – 4000 Да), которые в организме подвергаются быстрой деградации в результате ферментативного гидролиза; продукты деградации выводятся из организма в течение нескольких суток.

При лечении различных экспериментальных внутриклеточных инфекций [1, 6], в том числе сальмонеллеза [8, 9] и листериоза [10], наносомальные формы антибиотиков на основе полиалкилцианоакрилатов значительно превосходят по эффективности стандартные препараты. Наносомальные формы обеспечивают также повышение активности рифампицина [9, 11] и фторхинолонового антибиотика цiproфлоксацина [12] в отношении микобактерий туберкулеза.

В настоящее время одним из наиболее перспективных препаратов для лечения туберкулеза является другой антибиотик из группы фторхинолонов — моксифлоксацин [13, 14]. Наносомальные формы этого антибиотика ранее не изучались.

Целью данной работы было получение наносомальной формы моксифлоксацина на основе полибутилцианоакрилата (ПБЦА), изучение влияния технологических параметров синтеза на сорбцию моксифлоксацина и размеры НЧ, а также исследование активности

этой лекарственной формы на моделях туберкулеза *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

В работе использованы моксифлоксацина гидрохлорид (Bayer, Германия); бутилцианоакрилат (Sicomet 6000, Sichel-Werke GmbH, Германия); декстран (70 кДа; Sigma, США), маннит (ICN Biomedicals Inc., США); диметилсульфоксид (х. ч., Химмед, Россия).

Получение наносомальной формы моксифлоксацина

Полибутилцианоакрилатные наночастицы с моксифлоксацином получали методом анионной полимеризации [6].

Метод I. К водному раствору соляной кислоты (рН 2 – 3), содержащему 1 % декстрана, добавляли моксифлоксацин до концентраций 0,25 – 2 мг/мл. Затем при перемешивании на магнитной мешалке в раствор медленно прибавляли бутилцианоакрилат до концентрации 1 %. Синтез продолжали в течение 3 ч, после чего рН смеси доводили до 6 раствором 0,2 N NaOH, фильтровали через стеклянный фильтр (диаметр пор 160 мкм), добавляли маннит (3 %) и лиофилизировали в течение 24 ч при давлении 0,340 Мбар (лиофильная сушка Alpha Christ 2 – 4, Германия).

Метод II. Бутилцианоакрилат (1 %) при перемешивании добавляли к раствору соляной кислоты, содержащему 1 % декстрана. Через 5 – 30 мин в реакционную смесь добавляли моксифлоксацин. Перемешивание продолжали в течение 2,5 ч. Далее реакционную смесь обрабатывали, как описано выше.

Методы анализа

Средний размер НЧ определяли методом фотоновой корреляционной спектроскопии (наносайзер Coulter N4VD, Coulter Electronics, U. K.).

Общее содержание моксифлоксацина в лиофилизате. Для определения общего содержания моксифлоксацина во флаконе ($Q_{\text{общ}}$) к лиофилизату, полученному из 1 мл суспензии, добавляли 2 мл диметилсуль-

фоксиды и оставляли на 3 ч при комнатной температуре. Концентрацию моксифлоксацина в полученном растворе определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Helios Alpha, Thermospectronics, США) при длине волны 292 нм.

Степень сорбции моксифлоксацина наночастицами. Для определения содержания свободного (не связанного с наночастицами) моксифлоксацина ($Q_{\text{своб}}$) наночастицы отделяли методом ультрафильтрации. К лиофилизату, полученному из 1 мл суспензии, добавляли 1 мл воды; 0,4 мл полученной суспензии фильтровали через микрофильтр Microcon 30 кДа (Millipore, США) при центрифугировании в течение 30 мин при 4 °С и 13200 об/мин. Концентрацию моксифлоксацина в фильтрате определяли спектрофотометрически при длине волны 292 нм. Степень сорбции рассчитывали по формуле: $(Q_{\text{общ}} - Q_{\text{своб}})/Q_{\text{общ}} \times 100 \%$.

Изучение кинетики выделения моксифлоксацина из НЧ

К лиофилизату, полученному из 1 мл суспензии, прибавляли 1 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,4), встряхивали и количественно переносили в пластиковую пробирку (50 мл). Полученный коллоидный раствор разбавляли буфером в 25 раз, затем помещали пробирку в термостатируемый шейкер Environmental Shaker ES-20 Biosan (37 °С, 230 об/мин) и отбирали пробы объёмом 0,5 мл через установленные промежуточные времени: первую пробу отбирали немедленно, далее через 0,5, 1, 2, 6 и 24 ч. Для отделения наночастиц пробы фильтровали через микрофильтр Microcon 10 кДа при центрифугировании в течение 30 мин при 4 °С и 13200 об/мин. Концентрацию свободного моксифлоксацина в фильтрате определяли спектрофотометрически относительно буферного раствора, как описано выше. Для каждой точки проводили 3 параллельных определения. В качестве контроля использовали раствор моксифлоксацина, который термостатировали и центрифугировали так же, как и суспензии наночастиц.

Исследование антибактериальной эффективности наносомального моксифлоксацина на модели экспериментального туберкулеза у мышей

Модель экспериментального туберкулеза. В исследовании использовали самок мышей линии BALB/c в возрасте 6 – 8 недель. Мыши содержались в микроизоляторах и получали воду и пищу *ad libitum*. После недельного карантина мышей разделили на группы ($n = 8$). Микобактерии (стандартный вирулентный штамм *M. tuberculosis* H37Rv) вводили под наркозом (ксилазин в/м 7,5 мг/кг) в ретроорбитальный синус мышей в дозе $5 \times 10^6 - 10^7$ колониеобразующих единиц (КОЕ) в 0,1 мл физиологического раствора.

Лечение. Лечение начинали на четвертый день после заражения. Препарат вводили ежедневно внутривенно в латеральную хвостовую вену в дозе 3×10 мг/кг в течение 3 последовательных дней. Через сутки после окончания курса терапии животных подвергали эвтаназии. В асептических условиях выделяли и гомогенизировали легкое (правое) и делали высев с десятикратным шагом разведения на чашки со

средой 7Н11. Через 3 недели подсчитывали число КОЕ микобактерий.

Статистическая обработка результатов

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента при доверительной вероятности $P = 0,95$. Воспроизводимость результатов оценивали, находя доверительный интервал и относительное стандартное отклонение (s_r).

Результаты и их обсуждение

Влияние технологических параметров на характеристики НЧ

Одними из наиболее важных параметров наносомальной лекарственной формы, определяющих ее фармакокинетические и фармакодинамические параметры, являются степень сорбции лекарственного вещества в НЧ и их размер. Наночастицы из полиалкилцианоакрилатов получают методом анионной полимеризации в водной среде [6, 7]. Процесс формирования НЧ с размерами нужного диапазона и высоким содержанием лекарственного вещества зависит от многих параметров, прежде всего от рН полимеризационной среды, а также от физико-химических свойств лекарственного вещества, времени введения его в реакцию и его концентрации. С целью оптимизации процесса получения наносомальной формы моксифлоксацина на основе полибутилцианоакрилата было изучено влияние перечисленных выше параметров на степень сорбции моксифлоксацина и размер НЧ.

Выбор рН реакционной среды. В водной среде полимеризация бутилцианоакрилата происходит спонтанно при комнатной температуре. Инициаторами полимеризации служат анионы OH^- , образующиеся в результате диссоциации молекул воды. Очевидно, что рН реакционной среды является важнейшим фактором, определяющим характеристики как полимера, так и образующихся наночастиц. В нейтральных условиях, то есть в заведомом избытке инициатора, полимеризация происходит обвално с образованием агрегатов. По этой причине для получения наночастиц, реакцию проводят в кислой среде.

Результаты изучения влияния рН полимеризационной среды на степень сорбции моксифлоксацина и размеры НЧ представлены на рис. 1. Эксперименты показали, что максимальная степень сорбции достигается при рН 2; при этом воспроизводимость результатов (s_r) составляет 5 – 7 %. В интервале рН 1,5 – 2,5 образуются близкие по размеру НЧ (350 – 400 нм). При рН 3 размер частиц уменьшается до ≈ 250 нм. Эти данные коррелируют с результатами других авторов, наблюдавших увеличение размеров НЧ с уменьшением рН в этом интервале для пустых наночастиц, полученных из различных алкилцианоакрилатов [15], а также при синтезе НЧ из изобутилцианоакрилата с ципрофлоксацином [16]. Можно предположить, что с уменьшением рН полимеризация замедляется, это приводит к частичной коагуляции НЧ и, как следствие, к увеличению их размера. С ростом рН полимеризационный процесс ускоряется, что приводит к агрегации полимера; об этом свидетельствует осаждение по-

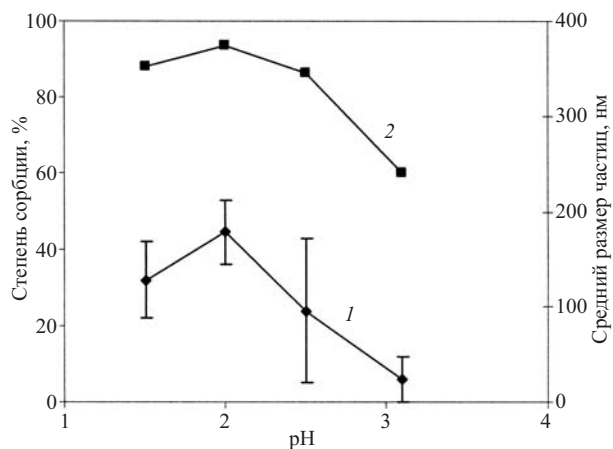


Рис. 1. Зависимость степени сорбции моксифлоксацина и размера наночастиц от pH ($C_{\text{исх}}^{\text{Мокс}} = 1 \text{ мг/мл}$, $C_{\text{ПБЦА}} = 1 \%$; $n = 3$; $P = 0,95$): 1 – степень сорбции, 2 – средний размер НЧ

лимера на стенках реактора и на фильтре при увеличении pH до 2,5 – 3. В связи с этим потери полимера при синтезе возрастают, что приводит к существенному ухудшению воспроизводимости результатов определения степени сорбции ($s_r \geq 20 \%$).

Поскольку эффективность сорбции ЛВ является одним из основных критериев при выборе оптимальных условий синтеза наносомальных лекарственных форм, дальнейшие эксперименты проводили при pH 2, позволяющем достичь максимальной степени сорбции моксифлоксацина.

Выбор времени добавления моксифлоксацина в реакционную среду. Наличие в молекуле моксифлоксацина нуклеофильных групп (рис. 2) предполагало, что он может влиять на параметры образующихся при анионной полимеризации наночастиц. Однако, как видно из результатов, приведенных на рис. 3, время введения моксифлоксацина в реакционную среду оказывает незначительное влияние на степень сорбции. При введении моксифлоксацина в реакционную среду до начала полимеризации степень сорбции несколько выше ($\approx 45 \%$), чем в случае введения лекарства после начала полимеризации ($\approx 38 \%$). Поэтому в дальнейших исследованиях мономер вводили в реакционную среду, содержащую моксифлоксацин. На размеры получаемых НЧ порядок введения реагентов практически не влияет (рис. 3).

Выбор концентрации моксифлоксацина. Влияние исходной концентрации моксифлоксацина на эффективность его сорбции наночастицами и их размер изучали в диапазоне 0,25 – 2 мг/мл при pH 2. Исходная концентрация бутилцианоакрилата во всех опытах составляла 1 %. Как видно из данных, приведенных на рис. 4, степень сорбции возрастает с уменьшением концентрации моксифлоксацина, достигая максимального значения при концентрации 0,25 мг/мл. При этом независимо от исходной концентрации моксифлоксацина, получают НЧ приблизительно одного размера (350 – 410 нм).

Важным параметром наносомальной формы является также содержание лекарственного вещества в на-

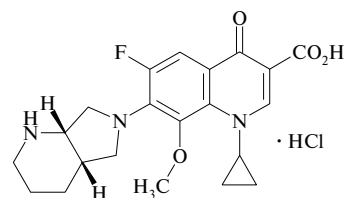


Рис. 2. Химическая структура моксифлоксацина

ночастицах (нагрузка на полимер). Следует отметить, что, в отличие от степени сорбции, нагрузка на полимер растет с ростом соотношения концентраций моксифлоксацин/полимер в реакционной смеси (рис. 5). Так, в условиях эксперимента максимальная степень сорбции достигается в интервале концентраций 0,25 – 0,5 мг/мл, однако нагрузка на полимер при концентрациях $< 1 \text{ мг/мл}$ невысока. При исходной концентрации моксифлоксацина $> 1 \text{ мг/мл}$ возрастают потери полимера в процессе синтеза и значительно ухудшается воспроизводимость результатов определения степени сорбции ($s_r \approx 17 \%$). Таким образом, как видно из рис. 5, оптимальные параметры лекарственной формы (степень сорбции $\approx 45 \%$ и нагрузка 50 мкг моксифлоксацина/мг ПБЦА) достигаются при концентрации моксифлоксацина в полимеризационной среде 1 мг/мл.

Стабильность. Следует отметить, что полибутилцианоакрилатные наночастицы с моксифлоксацином выдерживают лиофилизацию (в качестве криопротектора используется маннит). После добавления растворителя (воды) лиофилизат легко редиспергируется с образованием устойчивой в течение 24 ч гомогенной суспензии. Предварительные эксперименты показали, что при хранении в течение 6 месяцев при 4 °С лиофилизированная наносомальная форма сохраняет агрегационную и седиментационную устойчивость. Общее содержание моксифлоксацина, степень сорбции и размеры НЧ в течение этого периода практически не изменяются.

Исследование кинетики выделения моксифлоксацина из наночастиц. Кинетика выделения лекарственного вещества является одним из важнейших параметров системы доставки, позволяющим моделировать ее поведение в организме. Как видно из рис. 6, а, около 55 % моксифлоксацина оказывается в водной фазе практически сразу после разбавления наносуспензии. Если учесть, что исследуемые образцы содержат как связанный с НЧ ($\approx 45 \%$), так и свободный моксифлоксацин, причем свободного лекарства около 55 % от общего его содержания в образце, можно предположить, что в первые минуты в водную фазу переходит именно свободное лекарственное вещество. Затем медленное высвобождение моксифлоксацина продолжается в течение всего периода наблюдений (2 сут) (рис. 6, б). В течение первых суток скорость выделения моксифлоксацина составила 37 мкг/сут (22 % в 1 сут), в течение последующих суток — 12 мкг/сут (2 % в 1 сут). При этом через 48 ч в наночастицах остается около 26 % моксифлоксацина. Следует отме-

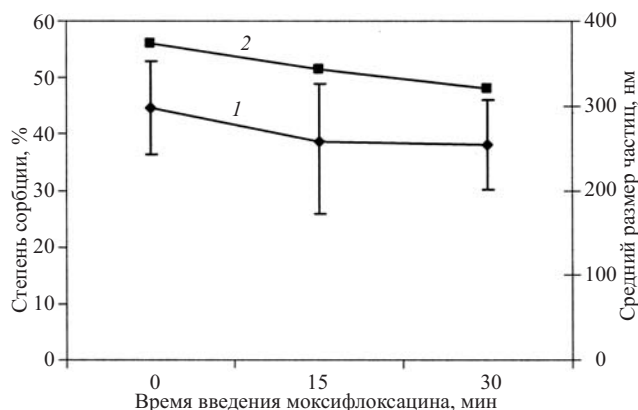


Рис. 3. Влияние времени введения моксифлоксацина на степень его сорбции и размеры наночастиц (рН 2; $C_{\text{мокс}} = 1$ мг/мл; $C_{\text{ПБЦА}} = 1$ %; $n = 3$; $P = 0,95$): 1 – степень сорбции, 2 – средний размер НЧ

тить, что аналогичную картину наблюдали при изучении полиизобутилцианоакрилатных НЧ с ципрофлоксацином [16]: спустя сутки в наночастицах оставалось 15 – 25 % ципрофлоксацина. В случае полиэтиленцианоакрилатных НЧ с пefлоксацином и офлоксацином через сутки в НЧ также оставалось от 15 до 70 % лекарственного вещества (в зависимости от природы используемого стабилизатора) [17].

Эффективность наносомального моксифлоксацина при лечении экспериментального туберкулеза у мышей

Для исследования использовали модифицированный метод “быстрого” скрининга, описанный в работе [18]. В отличие от “классической” схемы тестирования противотуберкулезных препаратов, когда терапию проводят в течение 4 – 8 недель, в исследовании [18] лечение начинали через один день после заражения, а его длительность составляла 2 дня. Адекватность “быстрого” метода для оценки эффективности противотуберкулезных препаратов была подтверждена предва-

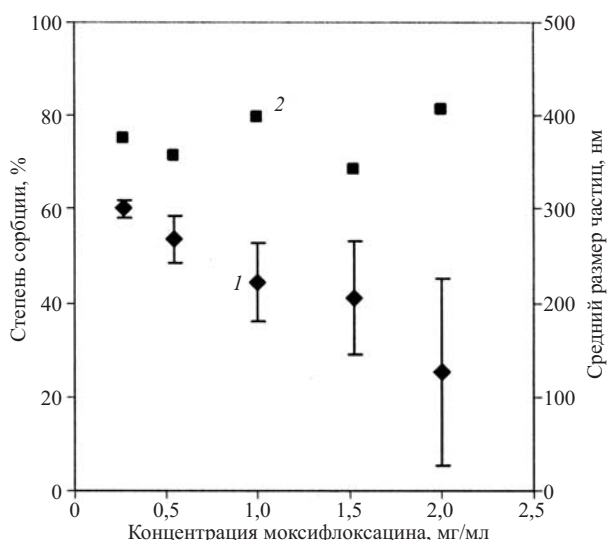


Рис. 4. Влияние концентрации моксифлоксацина на степень его сорбции и размеры наночастиц (рН 2; $C_{\text{ПБЦА}} = 1$ %; $n = 3$; $P = 0,95$): 1 – степень сорбции, 2 – средний размер НЧ

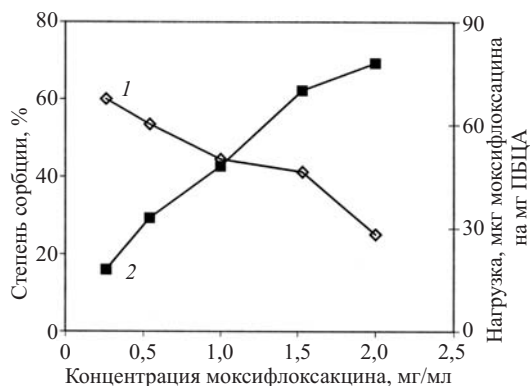


Рис. 5. Зависимость степени сорбции и теоретической нагрузки моксифлоксацина на полимер от его концентрации (рН 2; $C_{\text{ПБЦА}} = 1$ %): 1 – степень сорбции, 2 – нагрузка на полимер

рительными исследованиями, в которых сравнивали результаты лечения по классической 4-х недельной схеме и 2-х дневной схеме [18].

В отличие от предложенного в статье [18] интраназального метода заражения, в нашем исследовании заражение мышей микобактериями проводили внутривенным способом, т. к. в условиях короткого эксперимента интраназальное заражение приводило к разбросу данных по КОЕ. Учитывая динамику накопления микобактерий в легких при внутривенном способе заражения, период от момента заражения до начала лечения увеличили до 3 дней. Лекарственные препараты вводили внутривенно. В связи с высокой противотуберкулезной активностью моксифлоксацина

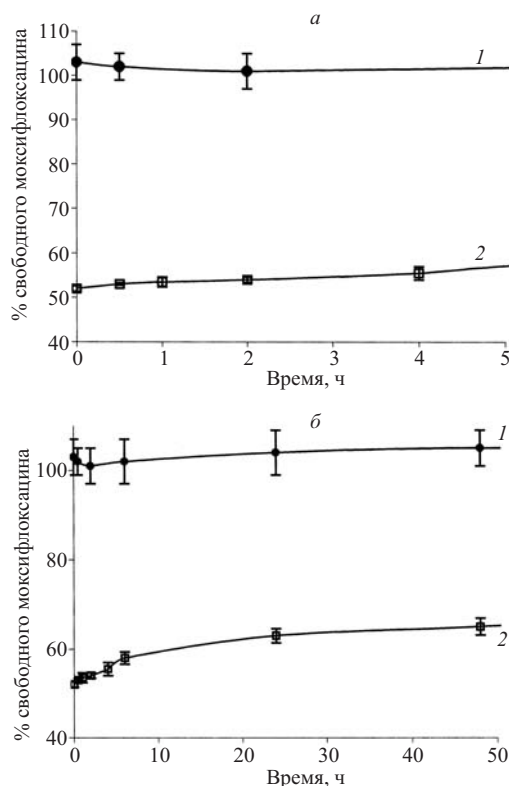


Рис. 6. Кинетика высвобождения моксифлоксацина из наночастиц ($n = 3$; $P = 0,95$): 1 – моксифлоксацин, 2 – НЧ с моксифлоксацином

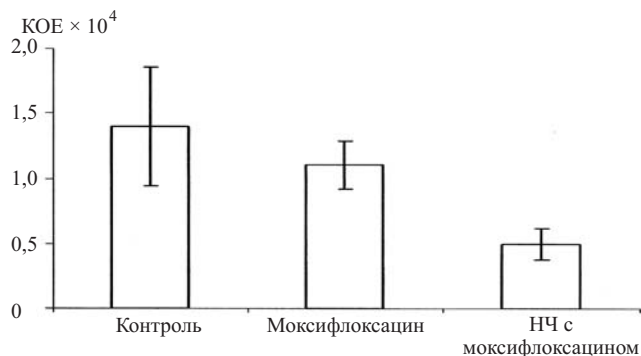


Рис. 7. Число колониеобразующих единиц (КОЕ) в легких мышей, инфицированных *M. tuberculosis*, после лечения стандартной и наносомальной лекарственными формами моксифлоксацина ($n = 6$; $P = 0,95$)

для выявления различий между лекарственными формами в опыте использовали субтерапевтическую дозу препарата.

Как видно из рис. 7, число КОЕ в легких мышей, леченных наносомальным моксифлоксацином, уменьшилось в 2,2 раза по сравнению со стандартной лекарственной формой. Эти результаты позволяют предположить, что наносомальный моксифлоксацин проявит более высокую противотуберкулезную активность по сравнению со стандартным препаратом.

Полученные результаты с использованием модифицированного метода подтверждают адекватность “быстрого” скрининга для тестирования противотуберкулезных антибиотиков. Очевидно, что предложенная модель экспериментального туберкулеза не отражает в полной мере картину острой формы заболевания. В то же время, эта модель позволяет оценивать активность противотуберкулезных препаратов в условиях целого организма, но без активного подключения Т-клеточного ответа, который часто наслаивается на антибиотический эффект. Полученные результаты предполагают, что использование “быстрого” метода тестирования противотуберкулезной активности позволяет не только проводить скрининг новых противотуберкулезных антибиотиков, но и сравнивать по эффективности различные лекарственные формы уже применяющихся в

клинической практике антибиотиков. Следует отметить, что быстрый скрининг является также более экономичным по сравнению со стандартными методами.

Эта работа была поддержана грантом по программе БИО Промышленная Инициатива (ВII проект № 2440) Государственного департамента США.

Исследования были выполнены при поддержке гранта ISTC/ВII № 2440.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Pinto-Alphandary, A. Andremont, and P. Couvreur, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **13**(3), 155 – 168 (2000).
2. R. Pandey and GK. Khuller, *Indian J. Exp. Biol.*, **44**(5), 357 – 366 (2006).
3. R. Pandey, S. Sharma, and GK. Khuller, *Tuberculosis (Edinb)*, **85**(5 – 6), 415 – 420 (2005).
4. R. Rastogi, Y. Sultana, A. Ali, et al., *Curr. Drug Deliv.*, **3**(1), 121 – 128 (2006).
5. S. Gelperina, K. Kisich, MD. Iseman, et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **15**, **172**(12), 1487 – 1490 (2005).
6. J. Kreuter (ed.), *Nanoparticles*, in: *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 219 – 342.
7. C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**(4), 519 – 548 (2003).
8. E. Fattal, M. Youssef, P. Couvreur, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**(9), 1540 – 1543 (1989).
9. И. Н. Скидан, С. Э. Гельперина, С. Е. Северин и др., *Антибиотики и химиотерапия*, **48**(1), 23 – 26 (2003).
10. M. Youssef, E. Fattal, M.-J. Alonso, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**(8), 1204 – 1207 (1988).
11. Е. А. Оганесян, А. П. Будько, Ю. В. Стукалов и др., *Антибиотики и химиотерапия*, **50**(8 – 9), 15 – 19 (2005).
12. F. Fawaz, F. Bonini, J. Maugein, et al., *Int. J. Pharm.*, **168**, 225 – 259 (1998).
13. М. И. Перельман, Г. Б. Соколова, Г. Н. Можохина и др., *Антибиотики и химиотерапия*, **49**(6), 20 – 24 (2004).
14. Л. С. Страчунский, В. А. Кречиков, *Клини. микробиол. и антимикроб. химиотер.*, **3**, 3 – 40 (2001).
15. S. J. Douglas, L. Illum, S. S. Davis, et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **101**(1), 149 – 175 (1984).
16. F. Fawaz, M. Guyot, A. M. Lagueny, et al., *Int. J. Pharm.*, **154**, 191 – 203 (1997).
17. M. Fresta, G. Puglisi, G. Giammona, et al., *J. Pharm. Sci.*, **84**(7), 895 – 901 (1995).
18. C. M. Shoen, M. S. DeStefano, M. R. Sklaney, et al., *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **53**(4), 641 – 645 (2004).

Потупила 07.08.06

DEVELOPING A NANOSOMAL FORMULATION OF MOXIFLOXACIN BASED ON POLY(BUTYL-2-CYANOACRYLATE)

E. V. Shipulo¹, I. I. Lyubimov², O. O. Maksimenko¹, L. V. Vanchugova¹, E. A. Oganeyan¹, P. G. Sveshnikov¹, S. F. Biketov², E. S. Severin¹, L. B. Heifets³, S. E. Gelperina

¹ Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow, Russia

² State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow oblast, Russia

³ National Jewish Medical Research Center, Denver, USA

Nanosomal formulation of moxifloxacin has been prepared by anionic polymerization of poly(butyl-2-cyanoacrylate) in the presence of the drug. Poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles enables effective sorption of moxifloxacin with a high total content and considerable capacity of nanoparticles (>45%). The influence of the reaction parameters such as pH and drug-to-polymer ratio on the characteristics of the nanoparticles has been studied. Efficacy of the novel formulation has been evaluated in mice infected with *M. tuberculosis*. It is shown that the efficacy of the proposed nanosomal formulation for intravenous administration evaluated by a decrease in the mycobacteria count in lungs is more than twice greater as compared to that of a reference preparation.