

К. П. Островский¹, Н. С. Осипова¹, Л. В. Ванчугова¹, Е. В. Шипуло¹,
Э. Р. Переверзева², И. Д. Трещалин², О. О. Максименко¹, С. Э. Гельперина¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ РАСТВОРИМОСТИ РИФАПЕНТИНА В ВОДЕ

¹ ООО "Научно-производственный комплекс "Наносистема", Россия, 115446, Москва, Коломенский проезд, д. 13а; e-mail: ostrovkp@mail.ru

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Россия, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11.

Разработаны инъекционные формы труднорастворимой субстанции противотуберкулёзного антибиотика рифапентина. Для получения водосовместимых форм рифапентина использованы белки: человеческий сывороточный альбумин, сукцинированный желатин и казеинат натрия. Водосовместимые формы рифапентина получали осаждением или гомогенизацией. Наиболее эффективным оказался метод ультразвуковой гомогенизации, позволивший получить устойчивые коллоидные суспензии с содержанием рифапентина в водной фазе, достигающим 9 – 10 мг/мл, то есть практически в 100 раз превышающим его растворимость в воде. Разбавление суспензий приводило к диссоциации агрегатов, образующихся в процессе сольubilизации, и образованию прозрачного раствора. Размер частиц при этом уменьшался до 10 – 20 нм, что соответствует размеру частиц в растворе белков той же концентрации, что исключает возможность эмболии при инфузионном введении подобной водосовместимой формы рифапентина. Полученные данные свидетельствуют о перспективности выбранного подхода к созданию инъекционной формы рифапентина.

Ключевые слова: белки; комплексобразование; рифапентин; сольubilизация; туберкулёз.

Разработка инъекционных форм труднорастворимых субстанций является одной из наиболее актуальных и сложных задач фармацевтической технологии. В то же время повышение растворимости таких субстанций крайне важно, поскольку именно растворимость является одним из наиболее значимых факторов, определяющих биодоступность и, в конечном счете, эффективность и безопасность лекарственных веществ. Для решения этой проблемы используют различные подходы, например, химическую модификацию, создание "самоэмульгирующихся систем" (SEDDS, SMEDDS) [1], добавление вспомогательных веществ (соразтворителей, восков, ПАВ и пр.) [2], получение нанокристаллов [3], технологию твёрдой дисперсии [4 – 7]. В то же время всё шире начинает применяться сольubilизация природными соединениями, в частности, белками, так как они менее токсичны, чем синтетические ПАВ, и обеспечивают более длительную стабильность коллоидных систем [8 – 22].

Рифапентин (Rp) — труднорастворимый противотуберкулёзный антибиотик, его растворимость в воде не превышает 1 мг/мл [23, 24]. Благодаря значительным преимуществам (более высокой ингибирующей активности в отношении *M. tuberculosis* и более длительному периоду полувыведения) по сравнению с рифампицином [25 – 31], Rp является основой стандартной схемы лечения лекарственно-чувствительных форм туберкулёза в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Несмотря на попытки повышения растворимости Rp (получение солей с галогеноводородными кислотами или однородных по структуре кристаллических форм, сплавление с полноксамерами и полиэтил-

ленгликолями) [32 – 34], инъекционная форма антибиотика до сих пор не существует, и он выпускается только в форме таблеток и капсул, например, priftin® (Sanofi), рифапекс® (Lupin Ltd).

Целью настоящего исследования стало изучение возможности получения водосовместимых форм Rp на основе белков: человеческого сывороточного альбумина (HSA), сукцинированного желатина (SuccGel) и казеината натрия (CasNa).

Экспериментальная часть

В работе использовали рифапентин (98,9 %, Luohe Nanjiecun Pharmaceutical Group Pharmacy, Китай), альбумин человеческий сывороточный (HSA, 20 % раствор, Baxter, Австрия), желатин сукцинированный (SuccGel, 4 % раствор, B. Braun, Германия), натрия казеинат (CasNa, Sigma, США), а также дихлорметан (DCM, х.ч., Химмед, Россия), ДМСО (х.ч., Химмед, Россия), ацетонитрил (AcCN, чистый для ВЭЖХ, J. T. Baker, Нидерланды).

Водосовместимые формы Rp получали осаждением или гомогенизацией с помощью высокоскоростного диспергатора (Ultra-Turrax T18, IKA, Германия), гомогенизатора высокого давления (Emulsiflex-C5, Avestin, Канада) или ультразвукового гомогенизатора (Sonopuls HD2070, Bandelin, Германия).

Метод осаждения. Раствор Rp в AcCN по каплям при перемешивании добавляли в водный раствор белка, далее перемешивали его ещё 3 ч. Полученную суспензию фильтровали через пористый стеклянный фильтр (пор № 1), добавляли в качестве криопротектора маннит (1 %), замораживали и лиофилизировали

(лиофильная сушилка Alpha-Christ 2 – 4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Германия).

Метод гомогенизации. Раствор Rp в DCM добавляли в водный раствор белка и гомогенизировали. Затем суспензию перемешивали в течение 1 ч для удаления органического растворителя, фильтровали и лиофилизировали в присутствии 1 – 5 % маннита, как указано выше.

Условия экспериментов приведены в табл. 1. Каждым из вышеперечисленных методов в одинаковых условиях получали по 3 серии образцов.

Физико-химические характеристики. Физико-химические параметры определяли для образцов, сохранивших агрегационную устойчивость (ресуспендируемость) после лиофилизации. Удовлетворительными считали образцы, которые после добавления исходного объема воды в лиофилизат образовывали однородную коллоидную систему без видимых агрегатов и осадка, устойчивую в течение не менее 4 ч при 4 °С. Образцы были охарактеризованы с точки зрения общего содержания в них Rp, содержания Rp в водной фазе, среднего диаметра частиц и индекса полидисперсности. Общее содержание Rp в лиофилизате и содержание Rp в водной фазе определяли спектрофотометрическим методом (спектрофотометр Helios Zeta, Thermo Fisher Scientific, США) по предварительно построенным калибровкам в ДМСО ($\lambda = 482$ нм; $A = 0,0193 \cdot C$; $C = 5 - 50$ мкг/мл) или в воде ($\lambda = 474$ нм; $A = 0,0198 \cdot C$; $C = 5 - 50$ мкг/мл). Для определения общего содержания лиофилизат растворяли в ДМСО, обрабатывали 3 мин на ультразвуковой бане (UC-02, Lab Companion, Корея), осадок отделяли центрифугированием (13 200 об/мин; 30 мин; центрифуга 5415R, Eppendorf, Германия) и проводили определение в супернатанте. Для определения содержания Rp в водной фазе лиофилизат ресуспендировали в исходном объеме воды, осадок отделяли центрифугированием (13200 об/мин; 30 мин) и проводили определение в супернатанте.

Средний диаметр частиц и индекс полидисперсности определяли методом фотон-корреляционной спектроскопии с помощью анализатора наночастиц (Malvern Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments, Великобритания).

Все измерения повторяли 4 раза. Серии были сопоставлены по вышеперечисленным характеристикам. Для сравнения использовали критерии Фишера и Крускала — Уоллиса, ориентируясь на уровень значимости, равный 0,05 [35].

Результаты и их обсуждение

HSA, желатин и казеин широко используются в медицине и фармацевтической промышленности. HSA, основной белок плазмы крови, является универсальным переносчиком как эндогенных, так и экзогенных веществ [17]. Он используется для лечения шока, ожогов, в качестве плазмозаменителя и т.д. [15]. Структура HSA представляет собой гибко соединённые друг с другом 3 домена, по 2 субдомена в каждом (рис. 1). Известно о 2 участках, обеспечивающих достаточно прочное связывание различных соединений, расположенных в субдоменах IIА и IIIА. Конъюгаты или наноразмерные агрегаты HSA используют как средство доставки лекарственных веществ. Наиболее известный пример эффективного использования HSA в качестве носителя труднорастворимой субстанции — это препарат абраксан®, наноразмерный комплекс HSA с паклитакселом [12 – 15]. Описано также связывание некоторых рифамицинов с HSA. Так, для рифамицина SV, исходного соединения, из которого получили рифампицин и Rp, константа связывания с HSA составляет $\sim 10^6$ л/моль, при этом стехиометрия комплекса приблизительно равна 1, что говорит о сильном взаимодействии белка и антибиотика [16 – 19].

Желатин (частично гидролизованный коллаген, в аминокислотной последовательности которого преобладают глицин, пролин и оксипролин) также обладает свойствами эмульгатора [36] и может выступать в качестве средства доставки лекарственных веществ. Например, наночастицы на основе желатина обеспечивают контролируемое высвобождение Rp, более высокую эффективность лечения и лучшие фармакокинетические показатели по сравнению с пероральной формой этого антибиотика [11, 20, 21]. SuccGel, менее вязкий по сравнению с обычным желатином, используют в качестве плазмозаменителя [21]. Наличие в его молекулах сукцинильного остатка приводит к появлению дополнительного отрицательного заряда, что в принципе может способствовать стабилизации наносуспензии Rp.

Казеин (входящий в состав коровьего молока сложный белок из группы фосфопротеидов) используют как стабилизатор пищевых и лекарственных эмульсий. CasNa — натриевая соль смеси различных казеинов (α_{s1} -, α_{s2} -, β - и κ -), лучше растворима в воде, чем сам казеин. Молекула казеина обладает ярко выраженными амфифильными свойствами, что способствует

Таблица 1
Условия получения водосовместимых форм рифапентина

Метод	Условия	Органическая фаза	Водная фаза
Осаждение	450 об/мин; 3 ч	Раствор 20 мг Rp в 0,9 мл AcCN	12,5 мл 3 % HSA; 1 % SuccGel или 1 % CasNa
Диспергирование	24 000 об/мин; 2 мин	Раствор 80 мг Rp в 0,9 мл DCM	12,5 мл 3 % HSA; 1 % SuccGel или 1 % CasNa
Гомогенизация высокого давления	12 000 psi; 5 мин	Раствор 150 мг Rp в 0,9 мл DCM	12,5 мл 3 % HSA; 1 % SuccGel или 1 % CasNa
Ультразвуковая гомогенизация	70 Вт; 6 мин; 0 °С	Раствор 200 мг Rp в 0,9 мл DCM	12,5 мл 3 % HSA; 1 % SuccGel или 1 % CasNa

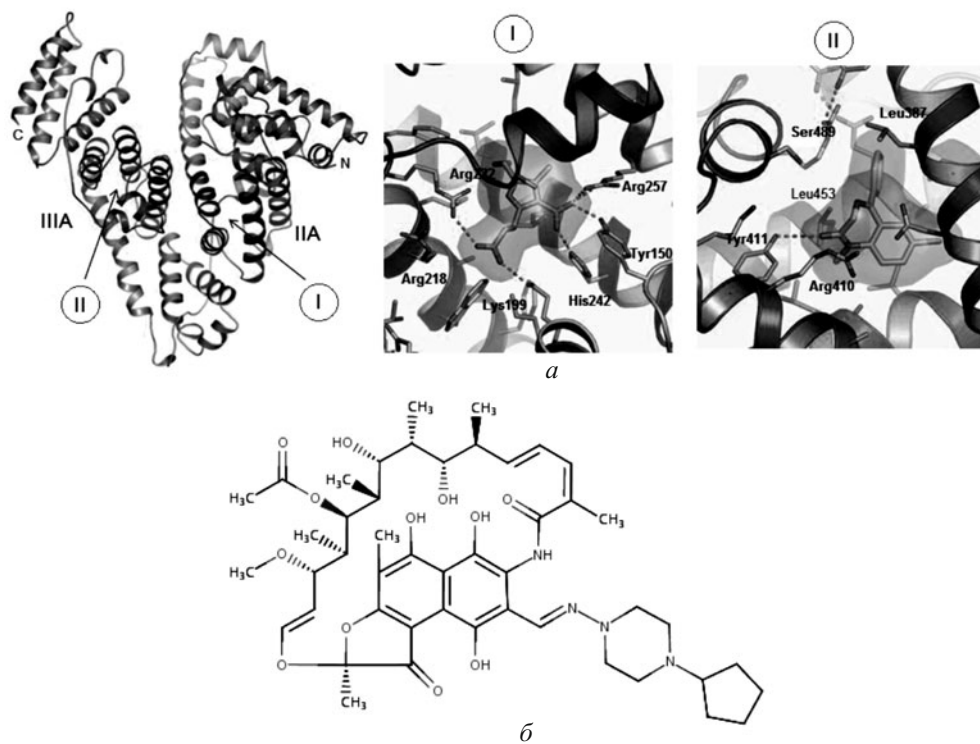


Рис. 1. Модель молекулы HSA с участками связывания (а) и химическая структура Rp (б).

образованию мицелл, также стабилизирующихся фосфатными группами и вкраплениями фосфата кальция [37]. Описана мицеллярная форма противоопухолевого препарата митоксантрона на основе казеина. Подобная мицелла состояла из 15 – 60 молекул казеина и вмещала в себя 90 – 360 молекул митоксантрона [11, 22].

В данном исследовании все перечисленные белки (HSA, SuccGel, CasNa) использованы для получения водосовместимой формы Rp. Можно было ожидать, что свойства получаемой водосовместимой формы Rp будут во многом определяться свойствами используемого белка, его способностью связывать Rp и стабилизировать свободный Rp. Очевидно, что тем большим

будет его содержание в препарате. Для получения водосовместимых форм Rp использовали 2 метода: осаждения и гомогенизации [36]. В первом случае водосовместимые формы получали путём осаждения антибиотика, растворённого в AcCN, в водный раствор белка; во втором — гомогенизацией системы, состоящей из раствора Rp в DCM и водного раствора белка. Условия получения водосовместимых форм были определены в предварительных экспериментах.

Установлено, что методы в целом воспроизводятся, различия между сериями статистически незначимы или значимы, но невелики. При этом статистически достоверным оказалось сходство в содержании Rp, в то время как размеры частиц различались чаще. На-

Таблица 2
Физико-химические параметры водосовместимых форм Rp, полученных разными методами (среднее значение ± доверительный интервал)

Метод получения	Белок	Общее содержание Rp, мг/мл	Содержание связанного Rp, мг/мл	Средний диаметр частиц, нм	Индекс полидисперсности
Осаждение	HSA	1,13 ± 0,03	0,647 ± 0,022	404 ± 11	0,252 ± 0,013
	SuccGel	1,14 ± 0,04	0,262 ± 0,006	4494 ± 645	0,533 ± 0,065
	CasNa	1,04 ± 0,03	0,671 ± 0,026	203 ± 3	0,346 ± 0,024
Диспергирование	HSA	4,90 ± 0,07	0,755 ± 0,013	1567 ± 66	0,616 ± 0,056
	SuccGel	4,69 ± 0,07	0,338 ± 0,004	5309 ± 1029	0,466 ± 0,102
	CasNa	4,38 ± 0,14	0,548 ± 0,013	2791 ± 151	0,342 ± 0,032
Гомогенизация высокого давления	HSA	6,58 ± 0,11	0,666 ± 0,010	290 ± 5	0,186 ± 0,017
	SuccGel	6,66 ± 0,13	0,333 ± 0,003	6099 ± 1149	0,690 ± 0,114
	CasNa	6,78 ± 0,13	0,666 ± 0,023	574 ± 26	0,336 ± 0,025
Ультразвуковая гомогенизация	HSA	9,93 ± 0,14	0,673 ± 0,014	453 ± 15	0,239 ± 0,013
	SuccGel	9,43 ± 0,14	0,332 ± 0,005	7956 ± 793	0,797 ± 0,071
	CasNa	10,13 ± 0,18	0,681 ± 0,018	648 ± 8	0,233 ± 0,011

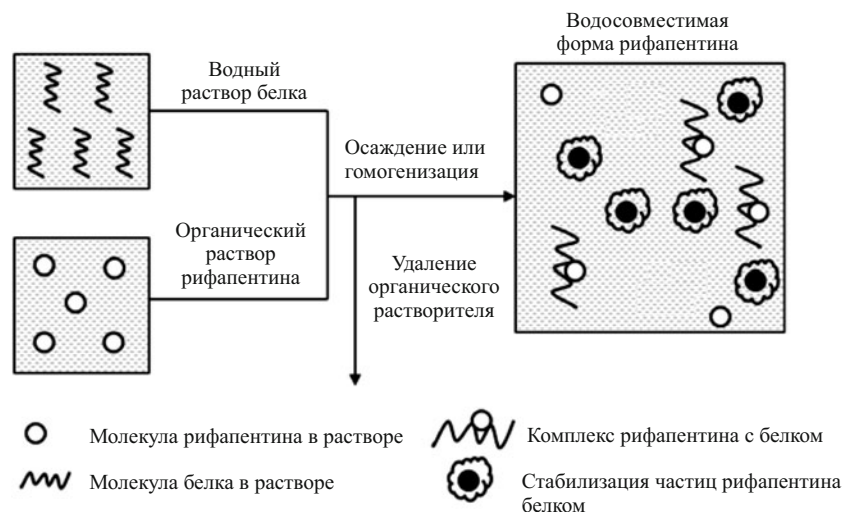


Рис. 2. Схематическое изображение получения и состава водосовместимых форм Rp на основе белков.

пример, в случае HSA и CasNa общее содержание Rp составило $(9,93 \pm 0,14)$ и $(10,13 \pm 0,18)$ мг/мл, а размеры частиц (453 ± 15) и (648 ± 8) нм, соответственно. По-видимому, это объясняется тем, что образуются агрегаты белковых молекул, которые могут иметь переменный состав. Полученные лиофилизаты с лёгкостью ресуспендировались, образуя однородные системы, которые оставались такими в течение около 4 ч при 4 °С. Наибольшая устойчивость была отмечена у суспензий, стабилизированных CasNa (при 4 °С они оставались однородными не менее 4 ч). Экспериментальные данные представлены в табл. 2. В силу хорошей сходимости между сериями образцов (статистически незначимые или несущественные различия) выборки объединяли и рассчитывали общий доверительный интервал (соответственно, уже не для 4, а для 12 значений).

Содержание Rp. Наиболее высокое содержание Rp в суспензии, достигающее 9–10 мг/мл, то есть практически в 100 раз превышающее его растворимость в воде $(0,108 \pm 0,006)$ мг/мл, было достигнуто методом ультразвуковой гомогенизации. Наименее эффективным методом оказалось осаждение. Содержание Rp составило всего около 1 мг/мл, хотя и это значение превышает его растворимость приблизительно в 10 раз (табл. 2). Интересно, что в этом случае влияние природы белка практически не выражено. Для всех ис-

следованных белков наивысший результат по содержанию Rp в устойчивой суспензии достигнут методом гомогенизации, особенно ультразвуковой; наименее эффективным оказался метод осаждения.

Интересно также отметить, что содержание в водной фазе (то есть фактически в растворе) Rp в образцах, полученных разными методами и с использованием различных белков, отличалось не так значительно и составляло 0,6–0,7 мг/мл для HSA и CasNa и $\approx 0,3$ мг/мл для желатина, хотя даже в этом случае растворимость Rp была превышена втрое против его растворимости в воде. Возможно, в отличие от альбумина, молекула желатина не обладает участками сильного связывания [16, 17].

Размеры, полидисперсность. Частицы наименьшего размера также получены методами гомогенизации высокого давления для HSA (280–300 нм) и ультразвуковой гомогенизации для CasNa (530–630 нм, хотя с большей полидисперсностью). Очевидно, что, чем меньше размер частиц, тем стабильнее получаемая суспензия, однако метод ультразвуковой гомогенизации выигрывает с точки зрения общего содержания Rp ≈ 10 против ≈ 7 мг/мл. При использовании методов диспергирования и гомогенизации высокого давления устойчивые суспензии и ресуспендируемые лиофилизаты получались при содержании Rp не более 5 и 7 мг/мл соответственно. В методе осаждения коллоидные системы были устойчивыми, но повысить содержание Rp в этом случае не удавалось из-за его меньшей растворимости в AcCN, по сравнению с DCM.

Что касается воспроизводимости предложенных методов, то наибольшие расхождения наблюдаются во всех методах в случае использования SuccGel. Возможно, это связано с тем, что для получения желатина используется гидролиз, в результате чего его структура оказывается нерегулярной и различается от партии к партии. Расхождения проявлялись, прежде всего, в высоких (вплоть до величины 0,797) значениях индек-

Таблица 3
Растворимость субстанции рифапентина в воде и водных растворах белков

Растворитель	Концентрация насыщенного раствора Rp*, мг/мл
Вода	$0,108 \pm 0,006$
HSA, 3 % водный раствор	$0,263 \pm 0,002$
SuccGel, 1 % водный раствор	$0,137 \pm 0,001$
CasNa, 1 % водный раствор	$0,140 \pm 0,003$

* $p = 0,05$; $n = 10$.

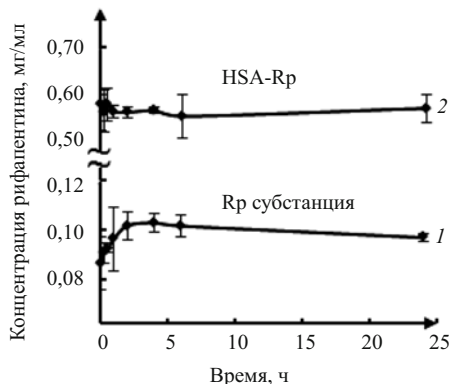


Рис. 3. Скорость растворения Rp из его субстанции (1) и водосовместимой формы на основе HSA (2).

са полидисперсности — в случае SuccGel в любом методе, особенно при использовании метода гомогенизации, он оказывался весьма значительным и превышал аналогичные значения для систем, полученных с использованием альбумина и казеина. Однако и для него выборки решено объединить, поскольку из-за такого большого разброса доверительные интервалы для всех серий в любом случае перекрываются, и нельзя однозначно судить о достоверности различий между ними.

Разбавление суспензий в 10 – 50 раз (в зависимости от общего содержания в них Rp) во всех случаях приводило к диссоциации агрегатов, образующихся в процессе солюбилизации, и образованию прозрачного раствора. Следует отметить, что размер частиц при этом уменьшался до 10 – 20 нм, то есть соответствовал размеру частиц в растворе белков той же концентрации. Таким образом, при инфузионном введении подобной водосовместимой формы Rp исключается возможность эмболии.

Достигнутый эффект повышения растворимости Rp, по-видимому, можно объяснить его связыванием с белками (то есть образованием комплекса той или иной природы) и солюбилизацией ими. Также можно предполагать существование в системе наночастиц Rp (на что указывает, например, достаточно высокий индекс полидисперсности), окруженных молекулами белка и стабилизированных таким образом. Подобный механизм был предложен в случае препарата абраксан®, который получают по аналогичной технологии [38]. Предполагаемая схема образующейся системы приведена на рис. 2.

Молярное соотношение между общим содержанием антибиотика и содержанием белка в образцах с наибольшим количеством Rp равно 28,08, а между содержанием антибиотика в водной фазе и содержанием белка — 1,97. Напротив, в случае препарата абраксан® более 6 молекул паклитаксела приходится на 1 молекулу белка в комплексе [39]. То есть водосовместимая форма Rp существует преимущественно за счёт стабилизации белком и, в меньшей степени, благодаря комплексообразованию.

Этот вывод подтверждают также данные по влиянию белков на растворимость Rp в условиях длитель-

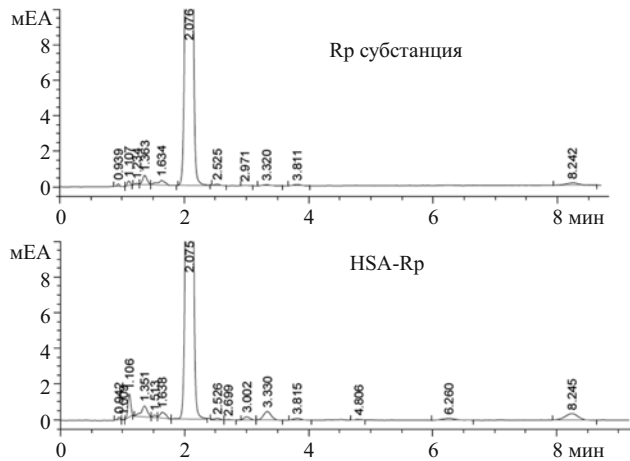


Рис. 4. Хроматограммы растворов проб рифапентина (а) и его водосовместимой формы (б). Подвижная фаза — 0,02 М KH_2PO_4 :AcCN = 21:33, детектирование при 478 нм.

ной инкубации растворов, содержащих белки и Rp в количестве, превышающем его растворимость. Действительно, без дополнительного воздействия белки лишь незначительно повышали концентрацию Rp в водной фазе, растворимость субстанции в присутствии HSA возрастала в 2,5 раза, SuccGel и CasNa вызывали лишь незначительное её повышение (табл. 3).

Также была изучена скорость растворения субстанции Rp в сравнении с его водосовместимой формой на основе HSA (в фосфатном солевом буфере с pH = 7,4 при температуре 37 °С). Очевидно (рис. 3), что и для субстанции Rp, и для его водосовместимой формы предел растворимости в водной фазе достигается достаточно быстро. Однако в случае субстанции равновесная концентрация Rp (около 0,1 мг/мл) достигается за несколько часов, в то время как для водосовместимой формы равновесная концентрация Rp (около 0,6 мг/мл) достигается за несколько минут.

Методом ВЭЖХ (хроматограф модели 1200, Agilent Technologies, США) была подтверждена сохранность рифапентина. Количество примесей в водосовместимой форме и субстанции отличалось несущественно (рис. 4).

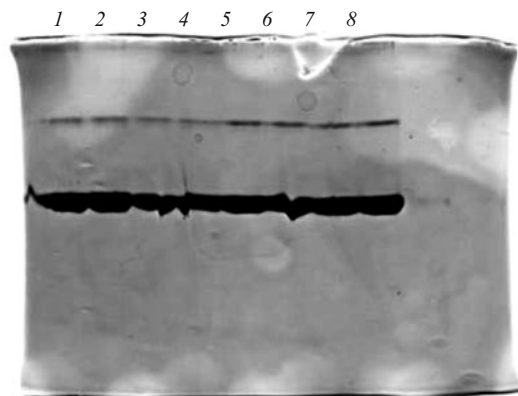


Рис. 5. Данные нативного электрофореза на примере HSA: 1 – 6 — HSA в образцах водосовместимой формы Rp; 7 – 8 — аптечный HSA.

Белок также не претерпевает изменений в ходе получения препарата, как показал нативный электрофорез (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности выбранного подхода к созданию инъекционной формы Рр. В рамках данного исследования наиболее эффективным оказался метод ультразвуковой гомогенизации водной суспензии Рр в присутствии HSA или CasNa. Этот метод позволил достичь наибольшего содержания Рр в водной фазе (до 10 мг/мл) при сохранении однородности и устойчивости коллоидной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. G. Nielsen, *Abstr. Pharm. Technol. Eur.*, **23**(3), 1 – 4 (2010).
2. R. G. Strickley, *Pharm. Res.*, **21**(2), 201 – 230 (2004).
3. S. Kattaboinaa, V. S. R. Chandrasekhar, and P. Balaji, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **1**(3), 682 – 694 (2009).
4. P. Koshy, *Pharmacia Lettre*, **2**(4), 65 – 76 (2010).
5. A. B. Nighute and S. B. Bhise, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **1**(2), 142 – 148 (2009).
6. K. Kalra, S. Sharma, and D. A. Jain, *Int. J. Pharm. Life Sci.*, **3**(3), 1503 – 1506 (2012).
7. J. J. Schwegman, *The Online Industry Standard*, URL: <http://www.pharmaceuticalonline.com/doc/basic-cycle-development-techniques-for-0002> (2010).
8. S. J. Lee, S. J. Choi, and Y. L. i, et al., *J. Agric Food Chem.*, **59**(1), 415 – 427 (2011).
9. P. W. Caessens, H. H. De Jongh, W. Norde, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**(1), 73 – 83 (1999).
10. D. E. Graham and M. C. Phillips, *J. Colloid Interface Sci.*, **80**, 403 – 414 (1979).
11. E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio, et al., *Int. J. Pharm.*, **436**(1 – 2), 359 – 378 (2012).
12. T. Peters, *Adv. Protein Chem.*, **37**, 161 – 245 (1985).
13. J.-E. Chang, W. S. Shim, S. G. Yang, et al., *Pharm. Res.*, **29**(3), 795 – 805 (2012).
14. S. Jain, R. Mathur, M. Das, et al., *Nanomedicine*, **6**(10), 1733 – 1754 (2011).
15. F. Kratz, *J. Control. Rel.*, **132**(3), 171 – 183 (2008).
16. S. Curry, *Sojo Univ Publishing Centre*, 1 – 29 (2011).
17. U. Kragh-Hansen, V. T. Chuang, and M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bul.*, **25**(6), 695 – 704 (2002).
18. J.-D. Yang, S. X. Deng, Z. F. Liu, et al., *Luminescence*, **22**(6), 556 – 566 (2007).
19. C.-X. Wang, F.-F. Yan, Y.-X. Zhang, et al., *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **192**, 23 – 28 (2007).
20. G. K. Saraogi, P. Gupta, U. D. Gupta, et al., *Int. J. Pharm.*, **385** (1 – 2), 143 – 149 (2010).
21. B. Braun sharing expertise, *Gelofusine, modified fluid gelatin*, pp. 2 – 3.
22. Y. D. Livney, A. Shapira, and Y. G. Assaraf, *Abstr. of the 16th International Conference on Bioencapsulation*, Dublin (2008), pp. 1 – 4.
23. Rifapentine, *электронная база данных DrugBank*; URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01201>.
24. Rifapentine (Priftin), *электронный каталог Selleckchem*; URL: [http://www.selleckchem.com/products/Rifapentine\(Priftin\).html](http://www.selleckchem.com/products/Rifapentine(Priftin).html).
25. S. Riva and L. G. Silvestri, *Annu Rev. Microbiol.*, **26**, 199 – 224 (1972).
26. W. Wehrli and M. Staehelin, *Bacteriol. Rev.*, **35**(3), 290 – 309 (1971).
27. W. Wehrli, F. Knüsel, K. Schmid, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**(2), 667 – 673 (1968).
28. I. M. Rosenthal, K. Williams, and S. Tyagi, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **174**(1), 94 – 101 (2006).
29. V. Arioli, M. Berti, G. Carniti, et al., *J. Antibiot.*, **34**(8), 1026 – 1032 (1981).
30. N. Rastogi, K. S. Goh, M. Berchel, et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**(4), 565 – 570 (2000).
31. W. J. Burman, K. Gallicano, and C. Peloquin, *Clin. Pharmacokin.*, **40**(5), 327 – 341 (2001).
32. Патент США 4002752 (1977); *Espacenet*, URL: <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&I=0&ND=3&adjacent=true&locale=en EP&FT=D&date=19770111&CC=US&NR=4002752A&KC=A>.
33. Международный патент 9000553 (1990); *Espacenet*; URL: <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&I=1&ND=3&adjacent=true&locale=en EP&FT=D&date=19900125&CC=WO&NR=9000553A1&KC=A1>.
34. Международный патент 9200302 (1992); *Espacenet*, URL: <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&I=3&ND=3&adjacent=true&locale=en EP&FT=D&date=19920109&CC=WO&NR=9200302A1&KC=A1>.
35. С. Гланц, пер. с англ. Ю. А. Данилова, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1999), сс. 81 – 122, 323 – 365.
36. Geliko brochure, *Kosher gelatin: functional & nutritional properties*, pp. 1 – 3.
37. A. O. Elzoghby, W. S. A. El-Fotoh, and N. A. Elgindy, *J. Control. Rel.*, **153**(3), 206 – 216 (2011).
38. Q. Fu, J. Sun, and W. Zhang, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **4**(3), 262 – 272 (2009).
39. K. Paál, J. Müller, and L. Hegedús, *Eur. J. Biochem.*, **268**(7), 2187 – 2191 (2001).

Поступила 26.03.15

USE OF PROTEINS FOR INCREASING AQUEOUS SOLUBILITY OF RIFAPENTINE

K. P. Ostrovskii^{1*}, N. S. Osipova¹, L. V. Vanchugova¹, E. V. Shipulo¹, E. R. Pereverzeva², I. D. Treshchalin², O. O. Maksimenko¹, and S. E. Gel'perina¹

¹ Nanosystem Research and Production Corporation, Moscow, 115193 Russia;

² G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia;

* e-mail: ostrovk@mail.ru

Development of parenteral formulations for poorly soluble drug substances is among key problems of the pharmaceutical technology. In the present study, parenteral forms of poorly soluble antituberculous antibiotic rifapentine were obtained using human serum albumin, succinylated gelatin, and sodium caseinate as solubilizing excipients. These formulations were produced via precipitation or homogenization. The best result – stable colloidal suspensions containing up to 9 – 10 mg/mL rifapentine (100 times higher than the aqueous solubility of parent substance) – were obtained by ultrasonic homogenization. Note that dilution of these suspensions led to dissociation of the aggregates and formation of clear solutions with a particle size of 10 – 20 nm, which means that the proposed formulation is safe and will not cause embolization of blood vessels upon infusion. On the whole, the obtained results suggest that the use of proteins for solubilization of rifapentine is a promising approach to the development of the parenteral formulation of this antibiotic.

Keywords: antibiotics; tuberculosis; rifapentine; proteins; complexation; solubilization.