

К. П. Островский¹, Н. С. Осипова¹, Л. В. Ванчугова¹,
Е. В. Шипуло¹, В. Д. Потапов², Э. Р. Переверзева³,
И. Д. Трещалин³, О. О. Максименко¹, С. Э. Гельперина¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВНУТРИВЕННОЙ ФОРМЫ РИФАПЕНТИНА НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЁЗА У МЫШЕЙ

¹ ООО "Научно-производственный комплекс "Наносистема", Россия, Москва, 115193, ул. 7-я Кожуховская, д. 20; e-mail: ostrovkp@mail.ru

² ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Россия, 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск.

³ ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Россия, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11.

Солюбилизация рифапентина человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) позволила получить его водосовместимую форму, представляющую собой коллоидную суспензию с размером частиц (538 ± 9) нм. Разбавление суспензии в ≥ 20 раз приводило к диссоциации агрегатов, образующихся в процессе солюбилизации, и образованию прозрачного раствора. Размер частиц при этом уменьшался до 10–20 нм, то есть соответствовал размеру частиц в растворе ЧСА той же концентрации. Методом флуоресценции показано, что в суспензии присутствовал как свободный рифапентин, так и его комплекс с ЧСА. Исследование активности в отношении возбудителя туберкулеза штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv на модели острой инфекции у мышей Balb/C показало, что водосовместимая форма рифапентина при внутривенном введении проявляет высокую активность в отношении микобактерий, сопоставимую с активностью его субстанции, снижая обсеменённость микобактериями паренхиматозных органов с $10^6 - 10^7$ до $10^2 - 10^3$ КОЕ/орган. Таким образом, использование ЧСА в качестве солюбилизатора позволило получить внутривенную форму рифапентина при сохранении активности данного антибиотика в отношении микобактерий туберкулеза.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин; рифамицины; рифапентин; туберкулёз.

Рифамициновые антибиотики — рифампицин, рифабутин и рифапентин (Rp) — являются эффективными средствами для лечения туберкулёза. Механизм действия рифамицинов основан на ингибировании ДНК-зависимой РНК-полимеразы чувствительных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, при этом они обладают бактерицидной активностью в отношении микобактерий, расположенных как внутри, так и вне эукариотических клеток [1]. Преимуществом Rp по сравнению с другими рифамицинами является длительный период полувыведения (14–18 ч, по сравнению с 2–5 ч в случае рифампицина [2, 3]), что позволяет вводить препарат пациенту не чаще чем 1–2 раза в неделю и способствует повышению комплаентности пациентов.

До сих пор Rp выпускается только в виде таблеток и капсул (например, Priftin®, Sanofi; Рифапекс®, Lupin Ltd). Отсутствие инъекционных форм Rp связано, очевидно с его низкой растворимостью в воде, менее 1 мг/мл [4, 5]. Создание инъекционной формы Rp обеспечит данному препарату ряд преимуществ, в том числе: быстрое поступление в кровоток (при пероральном введении T_{\max} составляет 5–6 ч), оптимальный профиль биораспределения, отсутствие влияния принимаемой пищи (для Rp различие в скорости всасывания в зависимости от жирности пищи достигает 50 %) [3]. Как показали ранее проведённые нами исследования, водосовместимую форму Rp, пригодную

для внутривенного введения, можно получить путём солюбилизации его человеческим сывороточным альбумином (ЧСА).

Целью настоящего исследования стала оценка эффективности инъекционной формы Rp на модели экспериментального острого туберкулёза у мышей и исследование взаимодействия Rp с ЧСА.

Экспериментальная часть

В работе использовали рифапентин (98,9 %, Luohe Nanjiesun Pharmaceutical Group Pharmacy, Китай), альбумин человеческий сывороточный (20 % раствор, Baxter, Австрия), дихлорметан (х.ч., Химмед, Россия) и питательную среду Middlebrook 7H9 и 7H11 (Himedia, Индия).

Получение водосовместимой формы рифапентина. Водосовместимую форму Rp на основе ЧСА получали методом ультразвуковой гомогенизации. Раствор 100 мг Rp в 0,9 мл дихлорметана добавляли к 3 % водному раствору ЧСА (12,5 мл). Смесь эмульгировали с помощью ультразвукового гомогенизатора (Sonopuls HD2070, Bandelin, Германия) с мощностью 70 Вт в течение 6 мин, затем перемешивали в течение 1 ч при скорости вращения 450 об/мин для удаления органического растворителя. Образовавшуюся в результате суспензию фильтровали через пористый стеклянный фильтр с размером пор № 1, добавляли в качестве крио-

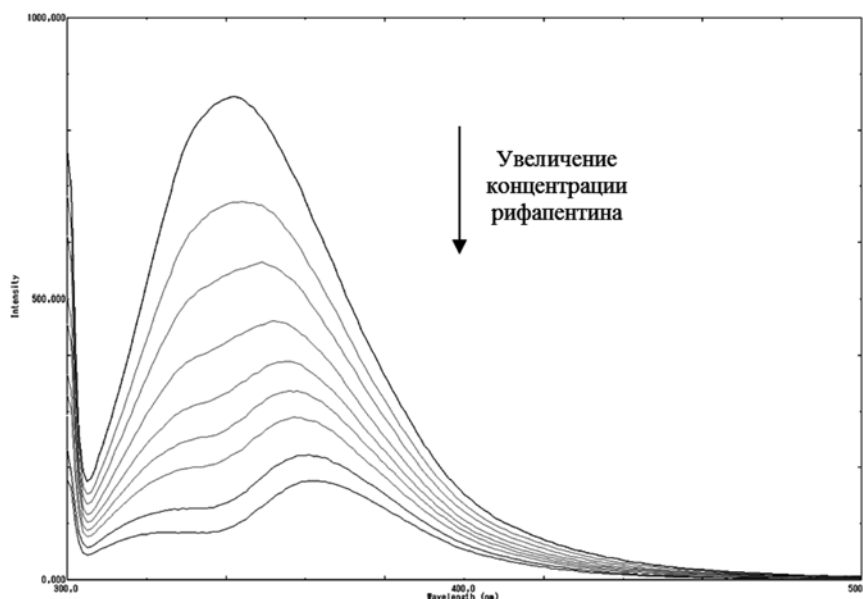


Рис. 1. Флуоресцентные спектры человеческого сывороточного альбумина в присутствии Rp (PBS, pH = 7,4).

протектора 1 % маннит, замораживали и высушивали в лиофильной сушилке Alpha-Christ 2 – 4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Германия).

Определение физико-химических характеристик водосовместимой формы рифапентина. Агрегационную устойчивость (ресуспендируемость) образцов препарата после лиофилизации считали удовлетворительной, если после добавления исходного объёма воды в лиофилизат образовывалась однородная коллоидная система без видимых агрегатов и осадка, устойчивая не менее 4 ч при температуре 4 °С.

Содержание Rp в лиофилизате определяли спектрофотометрическим методом. Лиофилизат растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), обрабатывали на ультразвуковой бане, осадок отделяли центрифугированием при 13200 об/мин в течение 30 мин (5415R, Eppendorf) и проводили определение Rp в супернатанте по предварительно построенной калибровочной кривой в ДМСО ($\lambda = 482$ нм; $A = 0,0193 \cdot C$; $C = 5 - 50$ мкг/мл).

Для определения содержания ЧСА в лиофилизате использовали систему капиллярного электрофореза Капель 105 М (Льюмэкс, Россия) с детектором светопоглощения при длине волны $\lambda = 214$ нм. В качестве фонового электролита использовали тетраборатный буфер, pH = 9,2. Рабочее напряжение составляло 15 кВ, давление ввода пробы равно 30 мбар, капилляр кварцевый с диаметром 75 мкм и соотношением общей и эффективной длины 60 см/50 см. Предварительно была проведена калибровка при 25 °С ($C = 1 - 15$ мкмоль/л) и по ней, на основании площади пика ЧСА, определяли содержание ЧСА в водосовместимой форме Rp.

Средний диаметр частиц ($Z_{ave}D$) и распределение частиц по размерам (индекс полидисперсности, PDI) определяли методом фотонно-корреляционной спектроскопии с помощью анализатора наночастиц (Malvern Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments, Великобритания). Все измерения повторяли 4 раза и расчи-

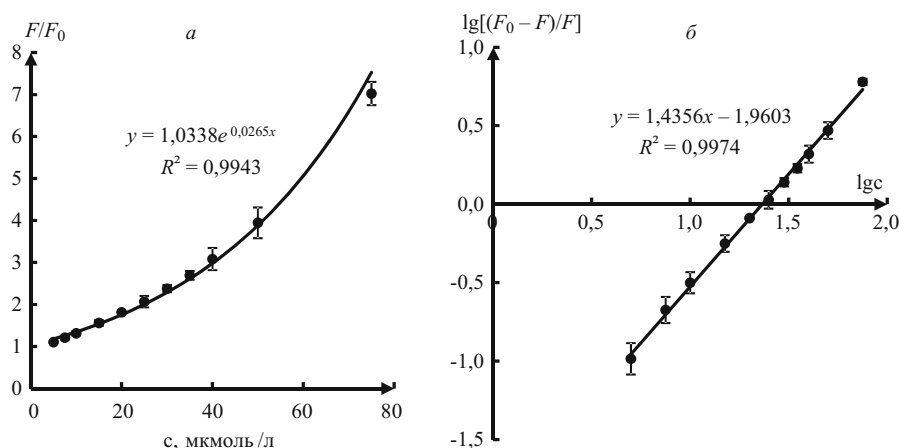


Рис. 2. Зависимость тушения флуоресценции ЧСА от концентрации Rp: а — вид зависимости тушения от концентрации по методу Штерна — Фольмера; б — график для расчёта константы ассоциации комплекса.

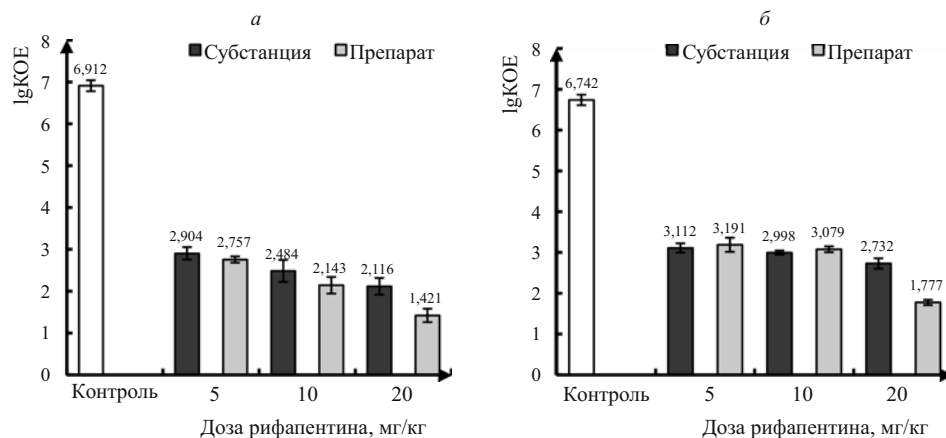


Рис. 3. Количество КОЕ (lg) микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv, высеваемых из органов мышей через 35 – 38 сут после завершения лечения ($n = 10$): а — лёгкие; б — селезёнка.

тывали доверительный интервал, используя критерий Стьюдента с уровнем значимости, равным 0,05 [6].

Флуориметрическое исследование. Готовили серию растворов с различным молярным соотношением антибиотика и белка (от 0,5:1 до 7,5:1) и регистрировали спектры флуоресценции растворов ЧСА ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ нм). Полученные данные обрабатывали согласно уравнению Штерна — Фольмера [7], из которого следует расчёт константы ассоциации комплекса [8].

Эффективность водосовместимой формы рифапентина на модели острого туберкулёза. Все исследования на животных выполнены в соответствии с принятыми в России правилами проведения экспериментов [9]. В исследовании использовали самок мышей линии Balb/C в возрасте 6 – 8 недель массой тела 20 – 22 г. Мышей содержали в микроизоляторах, при этом они получали воду и стандартный корм *ad libitum*.

Микобактерии вирулентного штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv культивировали в среде Middlebrook 7H9 в соответствии с Внутривлабораторным регламентом ФБУН ГНЦ ПМБ. Суспензию микобактерий в физиологическом растворе, содержащем 0,05 % Твин-80, вводили в боковую хвостовую вену в дозе $5,9 \cdot 10^6$ КОЕ/мышь. На 7 сут после заражения животных разделяли на 7 групп по 10 особей: 3 группы получали перорально субстанцию в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, соответственно, 3 группы получали внутривенную форму в тех же дозах, 1 группа состояла из инфицированных животных, не получавших лечение.

Исходный раствор водосовместимой формы Rp готовили, растворяя лиофилизат в 1 мл воды для инъекций. Исходный раствор субстанции готовили, растворяя 30 мг рифапентина в 0,3 мл этанола и доводя объём до 5 мл дистиллированной водой. Перед введением животным исходные растворы разбавляли водой для инъекций так, чтобы объём вводимой дозы составлял 0,1 мл. Препараты вводили с интервалом в 48 ч в течение 4 недель.

Через 35 – 38 сут по окончании курса терапии животных подвергали эвтаназии с помощью углекислого газа. Лёгкое (правое) и селезёнку выделяли и гомогенизировали в асептических условиях с добавлением 1 мл физиологического раствора. Для определения обсеменённости гомогенаты высевали на среду Middlebrook 7H11. Количество КОЕ микобактерий подсчитывали через 25 сут после инкубации при температуре 37 °С. Для подтверждения специфичности колонии микобактерий окрашивали по Цилю — Нильсону и исследовали с помощью световой микроскопии.

Антибактериальный эффект оценивали по числу КОЕ микобактерий в лёгких и селезёнке. Экспериментальные группы сравнивали между собой и с контролем, используя критерии Стьюдента и Манна — Уитни, ориентируясь на уровень значимости, равный 0,05 [6].

Результаты и их обсуждение

Результаты и их обсуждение

Благодаря поверхностной активности и адсорбционной способности белки широко используются в фармацевтической технологии в качестве солубилизаторов и стабилизаторов [10, 11]. В частности, ЧСА используется для стабилизации терапевтических белков: интерлейкинов, эритропоэтина, интерферона, иммуноглобулина и др. Также ЧСА используется как стабилизатор в вакцинах, например, в противогриппозной вакцине и в вакцине MMRV [12]. Наиболее успешным примером “нанотехнологического” препарата на основе альбумина является абраксан® (Celgene Int., Sarl., Швейцария) — наноразмерный комплекс ЧСА с паклитакселом. Применение ЧСА взамен токсичного полусинтетического солубилизатора кремофора EL (ингредиент препарата таксол®) позволило значительно повысить безопасность и эффективность паклитаксела [13]. На основе этой технологии разработаны также внутривенные формы доцетаксела и рапамицина [14, 15].

В данном исследовании ЧСА использован в качестве солубилизатора труднорастворимого противотуберкулёзного антибиотика Rp. Водосовместимую коллоидную форму Rp получали методом ультразвуковой гомогенизации органического раствора Rp и водного раствора ЧСА с последующим удалением растворите-

ля. Ранее проведённые эксперименты показали, что, по сравнению с другими опробованными методами (осаждением, гомогенизацией с помощью высокоскоростного диспергатора, гомогенизацией высокого давления), метод ультразвуковой гомогенизации позволяет достичь наиболее высокого содержания Рр в водной фазе: вплоть до 10 мг/мл, что в десятки раз выше его растворимости в воде.

Полученная форма представляет собой коллоидную суспензию, средний диаметр частиц в которой составляет (538 ± 9) нм, а индекс полидисперсности равен $(0,239 \pm 0,016)$. Среднее содержание Рр в лиофилизате составило $(4,97 \pm 0,17)$ мг/мл (11 % от массы лиофилизата). Разбавление суспензии в ≥ 20 раз приводило к диссоциации агрегатов, образующихся в процессе солиubilизации, и образованию прозрачного раствора. Размер частиц при этом уменьшался до 5 – 10 нм, то есть соответствовал размеру частиц в растворе ЧСА той же концентрации. Таким образом, при инфузионном введении подобной водосовместимой формы Рр исключается возможность эмболии.

Известно, что связывание антибиотиков белками крови (в основном ЧСА) в значительной мере определяет фармакокинетические параметры, в том числе время циркуляции, концентрацию в крови, скорость диффузии в органы и ткани, метаболизм, скорость выведения из организма. Антибактериальной активностью и способностью к диффузии обладает лишь не связанная с белками фракция антибиотика [16, 17]. Поэтому имеет значение прочность комплекса, то есть способность его к диссоциации. В связи с этим особый интерес представляло изучение взаимодействия между Рр и ЧСА. Для изучения характера этого взаимодействия использовали флуориметрический метод, основанный на тушении флуоресценции белка, которое закономерно связано с концентрацией тушителя, в результате образования им комплекса с лигандом. Флуоресценцию белка обеспечивают ароматические аминокислоты, в особенности, триптофан. Антибиотики рифамицинового ряда способны связываться с остатком триптофана, благодаря водородному, гидрофобному и ван-дер-ваальсову взаимодействию. Такое взаимодействие вызывает тушение флуоресценции триптофана [18]. Следует отметить, что метод даёт приближённые значения в силу сложности строгого соблюдения его ограничений: эквимолярное соотношение веществ в комплексе, образование нефлуоресцирующего комплекса, нулевое поглощение лиганда при длине волны возбуждения, — однако этого достаточно для оценки силы взаимодействия веществ [19, 20]. О характере тушения флуоресценции ЧСА в присутствии Рр судили, используя уравнение Штерна — Фольмера, связывающего исходную флуоресценцию без тушителя, флуоресценцию в присутствии тушителя и его концентрацию. Интенсивность флуоресценции растворов ЧСА и Рр определяли для растворов с молярным соотношением антибиотика и белка в диапазоне от 0,5:1 до 7,5:1. Константу ассоциации, согласно рекомендациям [8], рассчитывали, исходя из произ-

водного уравнения Штерна — Фольмера, коэффициентами которого и являются параметры связывания:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q], \quad (1)$$

где F_0 — исходная интенсивность флуоресценции (у.е.); F — интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя (у.е.); $[Q]$ — концентрация тушителя (моль/л); n — стехиометрия комплекса; K_A — константа ассоциации (л/моль).

Эксперимент показал, что тушение флуоресценции ЧСА ($\lambda_{em} = 350$ нм) становится более заметным с ростом концентрации Рр в растворе (рис. 1).

Полученные данные с высокой корреляцией ($R^2 > 0,99$) описываются уравнением Штерна — Фольмера. Интересно, что до молярного соотношения Рр и ЧСА менее 2:1 (точка 20 мкмоль/л, рис. 2, а), начальный участок кривой оказывался линейным, а при большем избытке Рр возникала нелинейная зависимость между тушением флуоресценции и концентрацией тушителя. Такой вид функции говорит о смешанном характере тушения (стагического и динамического), то есть в данном случае тушение, вероятно, происходит за счёт образования комплекса и, отчасти, прочих факторов (например, теплового движения молекул или самотушения).

Расчёт по уравнению (1) показывает, что $K_A = (0,92 - 1,30) \cdot 10^4$ л/моль ($p = 0,05$; $n = 3$). Комплексы ЧСА с экзогенными соединениями, характеризующиеся достаточно сильной связью, имеют порядок константы $\sim 10^5 - 10^7$ л/моль. Такие значения характерны, например, для варфарина, фенилбутазона, индометацина [21]. Таким образом, полученные данные говорят о взаимодействии средней силы между ЧСА и Рр. Подобные данные получены для рифабутина [22]. Эти авторы также наблюдали восходящий нелинейный участок на кривой тушения флуоресценции, что, помимо вмешательства динамического механизма тушения, объясняли участием 2, а не 1 остатка триптофана в процессе. Авторы получили значение константы ассоциации, на порядок большее, чем для рифапентина и ЧСА. Однако они использовали бычий сывороточный альбумин и, в силу вышеупомянутых недостатков метода, значение может быть завышенным.

Для водосовместимой формы, помимо общего содержания Рр, определяли содержание Рр в водной фазе (данные не приводятся), и оно составляло 0,6 – 0,7 мг/мл. Можно полагать, что эта величина складывается из содержания свободного и связанного с белком Рр в растворе. Как показали ранее проведённые исследования, растворимость субстанции Рр в воде и растворимость в 3 % ЧСА составляли $\sim 0,1$ мг/мл и $\sim 0,2$ мг/мл соответственно. То есть в полученной коллоидной суспензии степень связывания Рр с белком выше, чем в случае инкубации Рр в растворе ЧСА.

Общее содержание ЧСА в лиофилизате составило 27 мг/мл, что практически равно исходной концентрации, использованной в синтезе. То же значение получено для супернатанта, отделённого после осаждения суспензии. Таким образом, весь белок оказывается в водной фазе в свободном виде и в виде комплекса с Rp. Осадок же не содержит белка. Это означает, что полученная форма представляет собой систему из комплекса ЧСА с Rp и наночастиц Rp, стабилизированных белком. Молярное соотношение между общим содержанием антибиотика и содержанием белка составило 14,04, а между содержанием антибиотика в водной фазе и содержанием белка — 1,97. То есть водосовместимая форма существует преимущественно за счёт стабилизирующих свойств белка и в меньшей степени — благодаря комплексообразованию.

Исследование антибактериального эффекта инъекционной формы Rp в сравнении с субстанцией, вводимой перорально, проводили на модели острой туберкулёзной инфекции у мышей, вызванной внутривенным введением микобактерий в дозах $\sim 10^4 - 10^7$ КОЕ/мышь. Эта модель генерализованного туберкулёза характеризуется выраженными патологическими изменениями лёгких, селезёнки и печени экспериментальных животных и широко используется исследователями для определения чувствительности микобактерий к антибиотикам и эффективности противотуберкулёзных препаратов и вакцин [23 – 26]. Для определения активности в отношении *M. tuberculosis* инъекционную форму Rp вводили инфицированным мышам в дозах 5, 10 и 20 мг/кг с интервалом в 48 ч в течение 4 недель. В качестве положительного контроля использовали субстанцию рифапентина, которую вводили перорально в том же режиме. Известно, что среди рифамициновых антибиотиков Rp обладает наивысшей активностью в отношении *M. tuberculosis* (МБК 0,06 – 0,25 мг/л) и наибольшим временем полужизни в плазме [27]. Так, показано, что через 48 ч после однократного перорального введения мышам Rp в диапазоне доз 7,5 – 20 мг/кг концентрации его в плазме крови превышают МБК более чем в 10 раз [28]. Таким образом, можно полагать, что выбранный режим введения обеспечивал поддержание бактерицидных концентраций Rp в крови в течение всего периода лечения.

Как видно из данных, представленных на рис. 3, при использованном режиме лечения как водосовместимая форма Rp, так и его субстанция проявили высокую, и практически равную, активность в отношении *M. tuberculosis*. Высеваемость микобактерий из лёгких и селезёнки всех леченных животных снизилась на несколько порядков по сравнению с контролем: с $\sim 10^6 - 10^7$ до $\sim 10^2 - 10^3$ КОЕ/орган. Зависимость эффекта от дозы в выбранном диапазоне доз в целом оказалась незначительной, однако у 3 животных, получавших водосовместимую форму Rp в высшей дозе 20 мг/кг, в лёгких наблюдали лишь единичные микобактерии. У всех животных, получавших субстанцию Rp в той же дозе, данный показатель составил не ме-

нее 10^2 КОЕ/орган. Эти данные коррелируют с результатами исследования активности перорального Rp на аналогичной модели туберкулёзной инфекции [29].

Интересно, что эффективность Rp не снизилась в результате использования предложенной технологии. Как отмечалось выше, есть наблюдения об обратной зависимости между противомикробной активностью антибиотиков и степенью связывания их с белками. Вместе с тем есть и примеры, когда образование комплексов с белками не приводило к снижению активности: например для олигосахаридных и полиеновых антибиотиков она сохраняется [30, 31].

Таким образом, разработанная технология [32] позволила получить водосовместимую форму Rp на основе ЧСА, причём её активность оказалась сопоставимой с активностью перорально вводимой субстанции и в наибольшей из лечебных доз (20 мг/кг) превосходила её.

ЛИТЕРАТУРА

1. W. Wehrli and M. Staehelin, *Bacteriol. Rev.*, **35**(3), 290 – 309 (1971).
2. Rifapentine — a new edge to tuberculosis therapy, *Latest Reviews*, **1**(3), URL: <http://www.pharmainfo.net/latest-reviews> (2005).
3. W. J. Burman, K. Gallicano, and C. Peloquin, *Clin. Pharmacokin.*, **40**(5), 327 – 341 (2001).
4. Rifapentine, электронная база данных DrugBank, URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01201>.
5. Rifapentine (Priftin), электронный каталог Selleckchem, URL: [http://www.selleckchem.com/products/Rifapentine\(Priftin\).html](http://www.selleckchem.com/products/Rifapentine(Priftin).html).
6. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, пер. с англ. Ю. А. Данилова, Практика, Москва (1999), сс. 81 – 122, 323 – 365.
7. Учебное пособие, Н. М. Эмануэль и М. Г. Кузьмин (ред.), *Кинетика люминесценции*, Изд-во МГУ, Москва (1985), сс. 184 – 187.
8. M. R. Eftink and C. A. Ghiron, *Anal. Biochem.*, **114**(2), 199 – 227 (1981).
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях, Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачёва (ред.), Москва (2010), сс. 26 – 30, 123 – 159, 161 – 181, 191 – 223, 268 – 289, 318 – 336.
10. F. Kratz, *J. Control. Rel.*, **132**, 171 – 183 (2008).
11. E. Bouyer, G. Mekhloufi, and V. Rosilio, et al., *Int. J. Pharm.*, **436**(1 – 2), 359 – 378 (2012).
12. Y. J. Wang and M. A. Hanson, *Parenteral formulations of proteins and peptides: stability and stabilizers*, Parenteral Drug Association (1988), pp. S9 – S12.
13. Q. Fu, J. Sun, and W. Zhang, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **4**(3), 262 – 272 (2009).
14. B. Elsadek and F. Kratz, *J. Control. Rel.*, **157**, 4 – 28 (2012).
15. M. J. Hawkins, P. Soon-Shiong, and N. Desai, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**(8), 876 – 885 (2007).
16. S. Schmidt, K. Röck, and M. Sahre, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**(11), 3994 – 4000 (2008).
17. M. A. Zeitlinger, H. Derendorf, and J. W. Mouton, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**(7), 3067 – 3074 (2011).
18. J.-D. Yang, S.-X. Deng, and Z.-F. Liu, et al., *Luminescence*, **22**(6), 559 – 566 (2007).
19. M. F. Brown, S. Omar, R. A. Raubach, et al., *Biochemistry*, **16**(5), 987 – 992 (1977).
20. M. van de Weert, *J. Fluoresc.*, **20**(2), 625 – 629 (2010).
21. U. Kragh-Hansen, V. T. G. Chuang, and M. Otagiri, *Biol. Pharm. Bul.*, **25**(6), 695 – 704 (2002).

22. C.-X. Wang, F.-F. Yan, and Y.-X. Zhang, et al., *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **192**, 23 – 28 (2007).
23. B. V. Nikonenko and C. Hanrahan, *Rus. J. Immunol.*, **7**(4), 307 – 322 (2002).
24. B. V. Nikonenko, R. Samala, and L. Einck, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**(12), 4550 – 4555 (2004).
25. P. J. Cardona, A. Cooper, M. Luquin, et al., *Scand. J. Immunol.*, **49**(4), 362 – 366 (1999).
26. D. Young, *Eur. J. Immunol.*, **39**(8), 2011 – 2014 (2009).
27. L. Heifets, *Drugs of Today*, **35**(8), 7 – 16 (1999).
28. I. M. Rosenthal, K. Williams, S. Tyagi, et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **174**(1), 94 – 101 (2006).
29. A. M. J. A. Lenaerts, S. E. Chase, A. J. Chmielewski, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**(10), 2356 – 2360 (1999).
30. Патент США № 5,776,912 (1998); Espacenet, URL: <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en EP&FT=D&date=19980707&CC=US&NR=5776912A&KC=A>.
31. Международный патент № 2000047187 A1 (2000); Espacenet, URL: <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=worldwide.espacenet.com&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en EP&FT=D&date=20000817&CC=WO&NR=0047187A1&KC=A1>.
32. К. П. Островский, Н. С. Осипова, Л. В. Ванчугова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **50**(6), 39 – 44 (2016); *Pharm. Chem. J.*, **50**(6), 407 – 412 (2016).

Поступила 19.10.15

EVALUATION OF THE EFFICACY OF RIFAPENTINE INTRAVENOUS INJECTION FORM AGAINST EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS ON MURINE MODEL

K. P. Ostrovskii^{1*}, N. S. Osipova¹, L. V. Vanchugova¹, E. V. Shipulo¹, V. D. Potapov², E. R. Pereverzeva³, I. D. Treshchalin³, O. O. Maksimenko¹, and S. E. Gelperina¹

¹ Nanosystem Co. Ltd., Moscow, 115193 Russia

² State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov Region, 142279 Russia

³ G. F. Gauze Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

* e-mail: ostrovkp@mail.ru

Rifamycin antibiotics are among the most effective antituberculosis drugs. Rifapentine can substitute the first-line drug rifampicin in the standard treatment regimen due to possessing comparable potency and better pharmacokinetic parameters. The present work was aimed at the development of an intravenous injection form of rifapentine based on human serum albumin (HSA) and the evaluation of its efficacy against experimental acute tuberculosis. The parenteral form of rifapentine was obtained by ultrasonic homogenization and represented colloidal suspension of particles with dimensions 538 ± 9 nm. A 20-fold dilution led to dissociation of aggregates formed in the course of solubilization and the formation of a transparent solution, with the particles size reduced to 10 – 20 nm (which corresponded to particles size in HAS solution of the same concentration). The fluorescent analysis showed that both free rifapentine and its complex with HSE were present in the suspension. The obtained preparation contained about 5 mg/mL rifapentine, which exceeded more than times the initial aqueous solubility of the parent drug and was stable with respect to freeze-drying. The activity against acute tuberculosis was studied in female Balb/C mice infected intravenously with *M. tuberculosis* H37Rv strain. The treatment doses were 5, 10 and 20 mg/kg, administered i.v. 3 times per week during 4 weeks. The efficacy of the proposed intravenous form of rifapentine was comparable to that of drug administered per os and ensured decrease in the mycobacterial counts in lungs and spleen from $10^6 - 10^7$ CFU to $10^2 - 10^3$ CFU. These results suggest good potential of the injectable form of rifapentine for the treatment of tuberculosis.

Keywords: human serum albumin; rifamycins; rifapentine; tuberculosis.