

На правах рукописи

*Остр.*

**Островский Константин Петрович**

**РАЗРАБОТКА ВОДОСОВМЕСТИМЫХ ФОРМ АНТИБИОТИКОВ  
РИФАМИЦИНОВОГО РЯДА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Лаборатории систем доставки Общества с ограниченной ответственностью «Технология лекарств» и Лаборатории фармакологии и химиотерапии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»).

**Научные руководители:** **Гельперина Светлана Эммануиловна**  
доктор химических наук, начальник Лаборатории систем доставки ООО «Технология лекарств»

**Переверзева Элеонора Рафаиловна**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА»

**Официальные оппоненты:** **Ефременко Елена Николаевна**  
доктор биологических наук, профессор, заведующая Лабораторией эковиокатализа Кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

**Можокина Галина Николаевна**  
доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории инфекционной иммунологии, патологии и биотехнологии ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава РФ

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Защита состоится «17» апреля 2019 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ им. Д.И. Менделеева (125047, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева и на сайте <http://diss.muctr.ru/author/277/>.

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
Д 999.095.03, к.т.н.



И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Туберкулез – одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний. Для его более эффективного лечения необходимы инновационные разработки, которые включают не только поиск новых молекулярных мишеней и более активных субстанций, но и оптимизацию уже имеющихся препаратов.

Так, рифапентин, антибиотик рифамицинового ряда, обладает высокой бактерицидной активностью в отношении микобактерий, локализованных как внутри, так и вне эукариотических клеток. Рифапентин является эффективным средством для лечения туберкулеза; в частности, он обладает преимуществом перед рифампицином (препаратом I ряда для лечения лекарственно-чувствительных форм туберкулеза), что обусловлено его более высокой ингибирующей активностью в отношении *M. tuberculosis* и более длительным периодом полувыведения.

В связи с низкой растворимостью рифапентина в воде (менее 1 мг/мл) этот антибиотик выпускается только в форме таблеток и капсул. В то же время, разработка инъекционной формы рифапентина позволила бы расширить область его использования, обеспечив возможность применения у пациентов с сопутствующими острыми заболеваниями желудочно-кишечного тракта, а также в случаях плохой переносимости или трудностей при приеме внутрь.

С этой точки зрения, интерес представляет также другой труднорастворимый антибиотик рифамицинового ряда: рифаксимин, – который, обладая широким спектром действия в отношении многих грамотрицательных и грамположительных бактерий, применяется только для лечения инфекций желудочно-кишечного тракта, что обусловлено его крайне низкой биодоступностью.

Для получения внутривенных форм этих антибиотиков применялась технология солюбилизации с участием белков. Разработанная технология получения водосовместимых форм может быть применена также для антибиотиков других классов и прочих лекарственных веществ, имеющих низкую растворимость в воде.

**Цель и задачи исследования.** Цель исследования состояла в разработке водосовместимых форм рифамициновых антибиотиков на примере рифапентина и рифаксимины, пригодных для внутривенного введения, и оценке специфической активности и токсического действия водосовместимой формы рифапентина.

Для достижения поставленной цели в процессе исследования решались следующие *экспериментальные задачи*:

- разработать методы получения водосовместимых форм рифапентина и рифаксимины;
- оценить воспроизводимость технологических условий получения разрабатываемых лекарственных форм;
- исследовать взаимодействие между белками и антибиотиками, используемыми в работе;
- изучить эффективность внутривенной формы рифапентина на модели острого экспериментального туберкулеза у мышей;
- изучить острую и хроническую токсичность внутривенной формы рифапентина.

**Научная новизна.** Впервые разработаны водосовместимые коллоидные формы малорастворимых в воде антибиотиков рифапентина и рифаксимины. Впервые изучены закономерности процесса получения водосовместимых форм этих антибиотиков на основе различных белков.

Впервые изучено взаимодействие указанных антибиотиков с человеческим сывороточным альбумином, сукцинированным желатином и казеинатом натрия. Показано, что, несмотря на связывание с белком, рифапентин не утрачивал своей противомикробной активности, что характерно для многих антибиотиков. Показано, что роль белка заключается преимущественно в стабилизации суспензии наночастиц субстанции, образующихся в технологическом процессе.

Впервые изучена острая и хроническая токсичность водосовместимой формы рифапентина. Показано, что разработанная внутривенная форма рифапентина отличается отсутствием гастроинтестинальной токсичности и меньшей кардиотоксичностью по сравнению с перорально введенной субстанцией.

**Практическая значимость.** Разработаны водосовместимые лекарственные формы рифапентина и рифаксимины, пригодные для внутривенного введения, что обеспечивает альтернативный путь введения антибиотиков в случае невозможности перорального приема. Внутривенный путь введения антибиотиков позволит устранить недостатки, характерные для перорального введения, например, длительное всасывание из желудочно-кишечного тракта, влияние состава употребляемой пищи на всасывание.

Полученные результаты предполагают, что данный технологический подход может быть пригоден для разработки водосовместимых форм лекарственных веществ других классов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- разработан метод получения водосовместимых лекарственных форм рифапентина и рифаксимины;
- разработанные формы представляют собой устойчивые суспензии антибиотиков, стабилизированные белками с общим содержанием антибиотиков в водной фазе 10,23 и 3,26 мг/мл, что превышает их растворимость в воде в 94 и 1203 раза, соответственно;
- оптимальным солубилизатором для рифапентина из рассмотренных является человеческий сывороточный альбумин, для рифаксимины – казеинат натрия;
- полученная внутривенная водосовместимая форма рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина эффективна в отношении острого экспериментального туберкулеза у мышей;
- острая и субхроническая токсичность полученной внутривенной формы рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина не превышает токсичности субстанции, введенной перорально, при этом внутривенная форма отличается пониженной кардиотоксичностью и отсутствием гастроинтестинальной токсичности.

**Личный вклад автора.** Автором самостоятельно были выполнены анализ научной литературы, определение растворимости рифапентина и рифаксимины в воде и водных растворах белков, сравнительные исследования различных технологий получения водосовместимых форм этих антибиотиков. Автором самостоятельно получены экспериментальные партии препарата рифапентина для изучения биологических свойств. Токсикологические исследования были выполнены автором самостоятельно под руководством д.б.н. Переверзевой Элеоноры Рафаиловны. Личный вклад автора в выполнении исследования составляет более 80%.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность проведенных исследований подтверждается результатами статистической обработки всех экспериментальных данных, публикацией результатов работы в научных изданиях из списка ВАК, а также апробацией работы на международных и всероссийских конференциях.

Основные положения работы были представлены на: Конференции по разработке, исследованию и маркетингу фармацевтической продукции (Пятигорск, 2014); XXI Конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014; был награжден дипломом за лучший доклад); Международной фармацевтической конференции (Лиссабон, 2014); Научно-практической Конференции молодых ученых (Москва, 2017); Международной Конференции по фармацевтике и системам доставки лекарственных средств (Валенсия, 2017).

Результаты диссертационной работы докладывались на заседании Ученого Совета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» и на заседании экспертного совета Общества с ограниченной ответственностью «Технология лекарств» (2018).

**Публикации.** По результатам исследования опубликовано 3 печатные работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных работ.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Материалы диссертации изложены на 162 страницах, содержат 53 таблицы и 24 рисунка. Список литературы включает 184 источника, в том числе 145 на иностранном языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Введение

Во введении дано обоснование актуальности диссертационной работы, сформулированы цель и задачи исследований, научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Охарактеризованы основные положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, апробация и публикации представленной работы. Описана структура и объем диссертации.

### Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы представленной работы дает краткую справку о проблеме туберкулеза и далее переходит к рассмотрению современных перспектив разработки лекарственных форм противотуберкулезных антибиотиков. Основная его часть

посвящена методам получения инъекционных форм малорастворимых в воде антибиотиков.

## **Глава 2. Объекты и методы исследования**

Объектами исследования служили антибиотики рифамицинового ряда рифапентин (Рпт) производства Luohe Nanjiesun Pharmaceutical Group Pharmacy (Китай) и рифаксимин (Рфс) производства Sigma (США), а также белки: человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), желатин, модифицированный сукцинильными группами (СЖ), и казеин в форме натриевой соли (КН); водосовместимые формы антибиотиков для инфузий на основе этих белков.

Для оценки растворимости рифапентина и рифаксимиона в воде готовили заведомо перенасыщенный раствор и концентрацию антибиотика определяли спектрофотометрически на следующие сутки (спектрофотометр Helios Zeta, Thermo Fisher Scientific, США).

Для получения водосовместимых форм антибиотиков использовали два подхода: метод наноосаждения и различные методы гомогенизации – с помощью высокоскоростного диспергатора (диспергатор Ultra-Turrax T18, ИКА, Германия), гомогенизатора высокого давления (Emulsiflex-C5, Avestin, Канада) и ультразвукового гомогенизатора (Sonopuls HD2070, Bandelin, Германия).

Полученные образцы характеризовали с точки зрения ресуспендируемости, содержания в них рифапентина и рифаксимиона (общего в суспензии и в водной фазе) и распределения частиц суспензии по размерам.

Ресуспендируемость полученных лиофилизатов оценивали визуально. Образцы считали приемлемыми, если после добавления в них исходного объема воды (1 мл/флакон) после встряхивания образовывалась однородная суспензия, сохраняющая устойчивость в течение 3-4 ч (4 °С).

Количественное определение проводили спектрофотометрически и/или методом ВЭЖХ (Agilent Technologies 1200, США). Размеры частиц и распределение по размерам определяли методом фотонно-корреляционной спектроскопии (наносайзер NanoZS, Malvern Instruments, Великобритания).

Также методом капиллярного электрофореза (установка Капель 105 М, Люмэкс, Россия) определяли содержание белка в экспериментальных образцах. В качестве фонового электролита использовали тетраборатный буфер, pH = 9,2.

Взаимодействие между антибиотиками и белками изучали методом тушения флуоресценции.

Для биологических исследований была выбрана только водосовместимая форма рифапентина, на основе человеческого сывороточного альбумина (ЧСА-Рпт).

Эффективность полученной внутривенной формы в сравнении с пероральной субстанцией исследовали *in vivo* на модели острого туберкулеза, вызванного стандартным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Исследование проводилось на самках мышей Balb/C (возрастом 6-8 недель, массой тела 20-22 г), зараженных внутривенно суспензией микобактерий вышеупомянутого штамма в дозе  $5,9 \times 10^6$  КОЕ/мышь. Животных разделяли на 7 групп по 10 особей: 3 группы получали перорально субстанцию (водно-спиртовой раствор) в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, соответственно, 3 группы получали коллоидную форму внутривенно (в боковую хвостовую вену) в тех же дозах, 1 группа состояла из инфицированных животных, не получавших лечение. Лечение мышей начинали на 7-е сутки после заражения и продолжали в течение 4 недель по схеме 3 введения в неделю. Антибактериальный эффект препарата в сравнении с субстанцией оценивали по снижению микробной обсемененности легких и селезенки на 35-е сутки после курса лечения. Данное исследование было проведено группой д.б.н. В.Д. Потапова в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (г. Оболенск).

Для изучения острой токсичности были взяты самки мышей  $B_6D_2F_1$ . ЧСА-Рпт вводили однократно внутривенно (в хвостовую вену) в диапазоне доз 100-500 мг/кг, ресуспендируя лиофилизат в воде для инъекций. Для сравнения перорально вводили субстанцию рифапентина в дозах 4000-14000 мг/кг, диспергированную в 1% крахмальном клейстере. В каждой группе было по 6 особей. Учитывали долю павших мышей в каждой группе. За животными наблюдали в течение 1 месяца после последнего случая гибели животного, отмечая изменения состояния и поведения. Расчет доз, характеризующих токсичность (МПД, ЛД<sub>50</sub> и ЛД<sub>100</sub>), производился согласно пробит-методу Литчфилда-Уилкоксона.

Хроническую токсичность ЧСА-Рпт изучали на беспородных крысах самцах массой тела 170-190 г. Был выбран режим 15-кратного ежедневного введения в дозах, суммарно составляющих МПД и ЛД<sub>50</sub>. Дозы растворимой лекарственной формы были рассчитаны, исходя из результатов исследования острой токсичности на мышах, с использованием метаболических коэффициентов пересчета. Поскольку при изучении



острой токсичности субстанции гибели мышей достигнуть не удалось, усредненные значения  $LD_{50}$  и МПД для крыс были взяты из имеющихся данных литературы. Каждая группа содержала по 10 животных. Препарат вводили интраперитонеально, субстанцию – перорально в 1% крахмальном геле.

Наблюдение за животными осуществляли в течение курса и 15 суток после курса; определение массы тела проводили каждые 5 дней; гематологическое исследование периферической крови на 0, 7 и 15-е сутки в ходе курса и на 3, 5, 7, 10 и 15-е сутки после окончания курса («Abacus Junior Vet» (Diatron, Австрия)), биохимическое исследование сыворотки крови на 1 и 15-е сутки после окончания курса (автоматический биохимический анализатор ChemWell (Awareness Technology Inc., США)); исследование мочи на 1 и 15-е сутки после окончания курса (автоматический анализатор мочи Laura Smart (Erba Лахема, Чехия)); электрокардиограмма – на 1 и 15-е сутки после окончания курса (электрокардиограф ЭК1Т-07 («Аксион», Россия)). На 1 и 15-е сутки по окончании курса введенный препарат по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии, определяли массовые коэффициенты тимуса, сердца, печени, почек, селезенки. Участки внутренних органов фиксировали в 10% нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин. Короткие серии срезов окрашивали гематоксилин-эозином и подвергали световой микроскопии.

### **Глава 3. Результаты и обсуждение**

#### **Получение водосовместимых форм рифапентина и рифаксими́на**

В данном исследовании вышеперечисленные белки (ЧСА, СЖ, КН) были использованы для получения водосовместимых форм рифапентина (Рпт) и рифаксими́на (Рфс).

Предварительно были оценены растворимости рифапентина и рифаксими́на. Растворимость рифапентина в воде составила  $0,108 \pm 0,006$  мг/мл ( $P = 0,05$ ;  $n = 10$ ), растворимость рифаксими́на составила  $0,00271 \pm 0,00041$  мг/мл ( $P = 0,05$ ;  $n = 10$ ), то есть практически на 2 порядка ниже.

Для получения водосовместимых форм, представляющих собой устойчивые суспензии субстанций в водных растворах белков, использовали два распространенных в фармацевтической технологии подхода: метод наноосаждения и метод гомогенизации. В первом случае водосовместимые формы получали путем высаживания антибиотика, растворенного в смешивающемся с водой растворителе

(ацетонитрил, этанол или ацетон), в водный раствор белка; во втором – гомогенизацией системы, состоящей из раствора рифапентина/рифаксимиона в дихлорметане/этилацетате (не смешивающийся с водой растворитель) и водного раствора белка с дальнейшим упариванием растворителя. Оба метода позволили получить устойчивые суспензии, в которых как общее содержание антибиотиков, так и их концентрации в водной фазе существенно превышали растворимость субстанций в воде.

Наиболее подробно влияние технологических параметров процесса получения водосовместимых форм указанных антибиотиков на основе белков было исследовано для рифапентина.

Так, метод наноосаждения с использованием в качестве солубилизатора человеческого сывороточного альбумина либо казеината натрия позволил получить водосовместимую форму рифапентина с общим содержанием рифапентина около 1 мг/мл (органическая фаза ацетонитрил) и его концентрацией в водной фазе, превышающей 0,6 мг/мл (что более чем в 6 раз превосходит растворимость рифапентина в воде). В то же время использование в качестве солубилизатора сукцинированного желатина было менее эффективным – при близком общем содержании рифапентина в суспензии ее частицы были значительно крупнее (около 4 мкм), а концентрация рифапентина в водной фазе суспензии едва превысила 0,2 мг/мл.

Метод гомогенизации, и особенно – ультразвуковой гомогенизации – оказался наиболее эффективным. Общее содержание рифапентина в образцах суспензии, полученной данным методом, достигало 10 мг/мл, размер частиц составлял около 500 нм. Интересно, что в данном случае, как и при использовании метода осаждения, наилучшие (и близкие между собой) результаты были получены при использовании в качестве солубилизатора либо альбумина, либо казеината натрия. В то же время сукцинированный желатин оказался худшим из исследованных солубилизаторов: размеры частиц рифапентина в суспензии, полученной с использованием сукцинированного желатина, превышали 4 мкм, а концентрация рифапентина в водной фазе была вдвое ниже, чем при использовании других исследованных белков (около 0,3 мг/мл против 0,6 мг/мл).

Наличие в системе криопротектора маннита оказывало положительное влияние на ресуспендируемость образцов и устойчивость суспензий: благодаря повышению

его содержания в системе удавалось сохранить устойчивость суспензий с более высоким содержанием антибиотика. Так с использованием метода ультразвуковой гомогенизации при концентрации маннита 1% было достигнуто содержание рифапентина 5 мг/мл рифапентина, а при 5% маннита – 10 мг/мл.

Стабильность рифапентина в полученных водосовместимых формах была подтверждена методом ВЭЖХ, а человеческого сывороточного альбумина – методом нативного электрофореза (без SDS). Она была признана удовлетворительной.

При разработке водосовместимой формы рифаксимины были в значительной степени использованы данные, полученные при разработке водосовместимой формы рифапентина, однако структурные отличия между этими антибиотиками отразились и на свойствах получаемых суспензий рифаксимины, стабилизированных указанными белками.

Так, оказалось, что из всех использованных методов и всех трех использованных белков только метод наноосаждения и только казеинат натрия и позволил получить устойчивую суспензию рифаксимины, причем как общее содержание рифаксимины в суспензии (2,91 мг/мл), так и его концентрация в водной фазе суспензии (1,16 мг/мл) существенно уступали соответствующим характеристикам водосовместимых форм рифапентина. Между тем, следует отметить, что, поскольку экспериментально определенная растворимость в воде данного антибиотика составляет всего 0,00271 мг/мл, то в полученной форме общее содержание рифаксимины превышает его растворимость более чем в 1000 раз, а концентрация рифаксимины в водной фазе превышает его растворимость более чем в 600 раз.

Характеристики водосовместимых форм рифапентина и рифаксимины представлены в Табл. 1. Исходя из соотношений между содержанием антибиотиков в водной фазе и общим содержанием антибиотиков можно полагать, что образование водосовместимой формы обусловлено преимущественно коллоидной стабилизацией антибиотиков белками.

Для оценки вклада связывания с белками в повышение растворимости рифапентина и рифаксимины было проведено флуориметрическое исследование процесса комплексообразования рифапентина и рифаксимины с использованными белками. Параметры связывания антибиотиков с белками определяли методом тушения флуоресценции. Данный метод основан на том, что в результате связывания флуоресцентной молекулы (в данном случае – белка) с лигандом (антибиотиком)

происходит тушение флуоресценции, причем изменение интенсивности флуоресценции характеризует прочность образовавшегося комплекса.

Экспериментальные данные обрабатывали, согласно модели Штерна-Фольмера. Рассчитывали константу ассоциации и стехиометрию комплекса. Полученные параметры связывания рифапентина с белками и приведены в Табл. 2.

Для сравнения, комплексы ЧСА с некоторыми экзогенными соединениями, например, варфарином, фенилбутазоном, индометацином, имеют порядок константы в области  $\sim 10^5$ - $10^7$  л/моль. Таким образом, полученные данные говорят о взаимодействии средней силы между ЧСА либо казеином и рифапентином и о еще менее сильном взаимодействии рифапентина с желатином, что соответствует и параметрам водосовместимых форм рифапентина с данными белками.

**Таблица 1.** Характеристика водосовместимой формы рифапентина и рифаксимиона

Состав	Метод	$c_{\text{общ.}}$ , мг/мл	$c_{\text{вод.}}$ , мг/мл	$\eta$ , масс. %	$d_z$ , нм	$I_p$
ЧСА-Рпт	Наноосаждение	$1,13 \pm 0,03$	$0,647 \pm 0,022$	70,83	$404 \pm 11$	$0,252 \pm 0,013$
СЖ-Рпт		$1,14 \pm 0,04$	$0,262 \pm 0,006$	71,25	$4494 \pm 645$	$0,533 \pm 0,065$
КН-Рпт		$1,04 \pm 0,03$	$0,671 \pm 0,026$	62,51	$203 \pm 3$	$0,346 \pm 0,024$
ЧСА-Рпт	Диспергирование	$4,90 \pm 0,07$	$0,755 \pm 0,013$	76,51	$1567 \pm 66$	$0,616 \pm 0,056$
СЖ-Рпт		$4,69 \pm 0,07$	$0,338 \pm 0,004$	73,28	$5309 \pm 1029$	$0,466 \pm 0,102$
КН-Рпт		$4,38 \pm 0,14$	$0,548 \pm 0,013$	68,44	$2791 \pm 151$	$0,342 \pm 0,032$
ЧСА-Рпт	Гомогенизация высокого давления	$6,58 \pm 0,11$	$0,666 \pm 0,010$	54,83	$290 \pm 5$	$0,186 \pm 0,017$
СЖ-Рпт		$6,66 \pm 0,13$	$0,333 \pm 0,003$	55,50	$6099 \pm 1149$	$0,690 \pm 0,114$
КН-Рпт		$6,78 \pm 0,13$	$0,666 \pm 0,023$	56,50	$574 \pm 26$	$0,336 \pm 0,025$
ЧСА-Рпт	Ультразвуковая гомогенизация	$9,93 \pm 0,14$	$0,673 \pm 0,014$	62,04	$453 \pm 15$	$0,239 \pm 0,013$
СЖ-Рпт		$9,43 \pm 0,14$	$0,332 \pm 0,005$	58,98	$7956 \pm 793$	$0,797 \pm 0,071$
КН-Рпт		$10,13 \pm 0,18$	$0,681 \pm 0,018$	63,31	$648 \pm 8$	$0,233 \pm 0,011$
КН-Рфс	Наноосаждение	$2,91 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,03$	72,75	$282 \pm 7$	$0,307 \pm 0,023$

Во всех случаях:  $P = 0,05$ ;  $n = 12$ .  
 $c_{\text{общ.}}$  – общее содержание антибиотика;  $c_{\text{вод.}}$  – содержание антибиотика в водной фазе;  $\eta$  – выход по антибиотику от теоретического значения;  $d_z$  – средний диаметр частиц;  $I_p$  – индекс полидисперсности

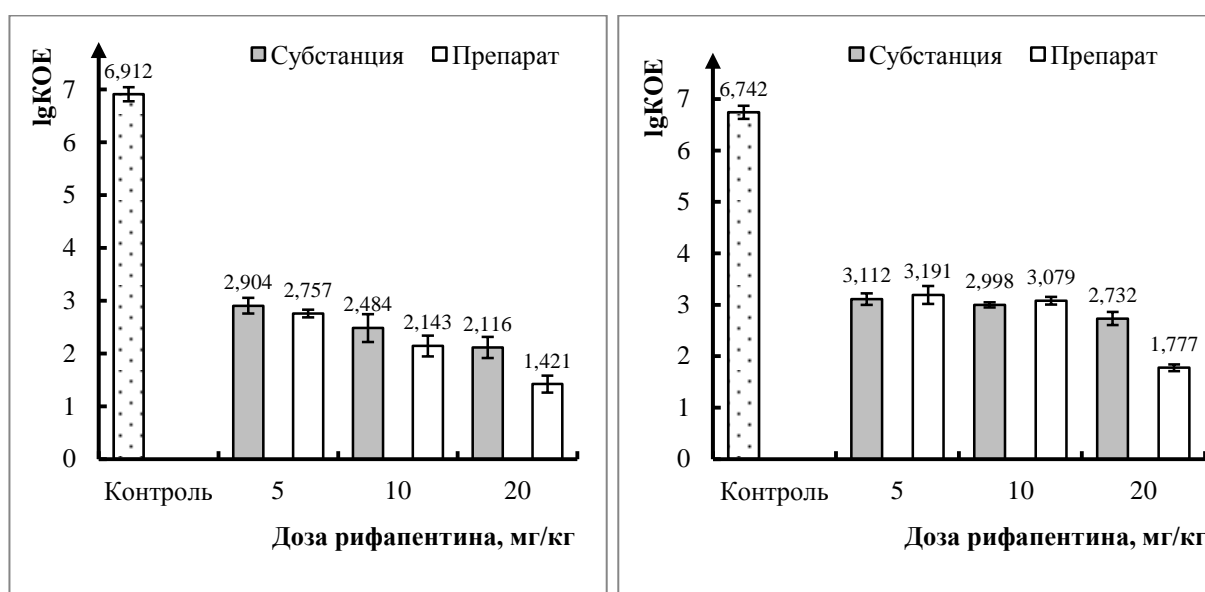
**Таблица 2.** Параметры связывания антибиотиков с белками

Состав	Стехиометрия n	Константа ассоциации $K_A$ , л/моль
ЧСА-Рпт	$1,44 \pm 0,05$	$(0,92 \div 1,30) \times 10^4$
СЖ-Рпт	$1,54 \pm 0,10$	$(5,73 \div 10,48) \times 10^3$
КН-Рпт	$1,07 \pm 0,07$	$(5,92 \div 9,35) \times 10^4$
КН-Рфс	$1,01 \pm 0,10$	$(3,47 \div 6,53) \times 10^4$

### Определение противотуберкулезной активности водосовместимой формы рифапентина

Для испытания специфической активности на модели острого туберкулеза получали экспериментальную партию препарата с содержанием рифапентина 5 мг/мл, в расчете на вводимые дозы 5, 10 и 20 мг/кг.

Было отмечено, что при используемом режиме лечения как водосовместимая форма рифапентина, так и его субстанция проявили высокую, и практически равную, активность в отношении *M. tuberculosis* (Рис. 1). Высеваемость микобактерий из легких и селезенки всех леченых 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 нескольких животных, получавших водосовместимую форму рифапентина в высшей дозе 20 мг/кг, в легких наблюдали лишь единичные микобактерии. У всех животных, получавших субстанцию рифапентина в той же дозе, данный показатель составил не менее  $10^2$  КОЕ/орган.



Субстанцию вводили внутривенно, препарат – перорально; слева – легкие, справа – селезенка

**Рис. 1.** Количество КОЕ (Ig) микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv, высеваемых из органов мышей Balb/C через 35 суток после завершения лечения

### Токсикологическое исследование водосовместимой формы рифапентина

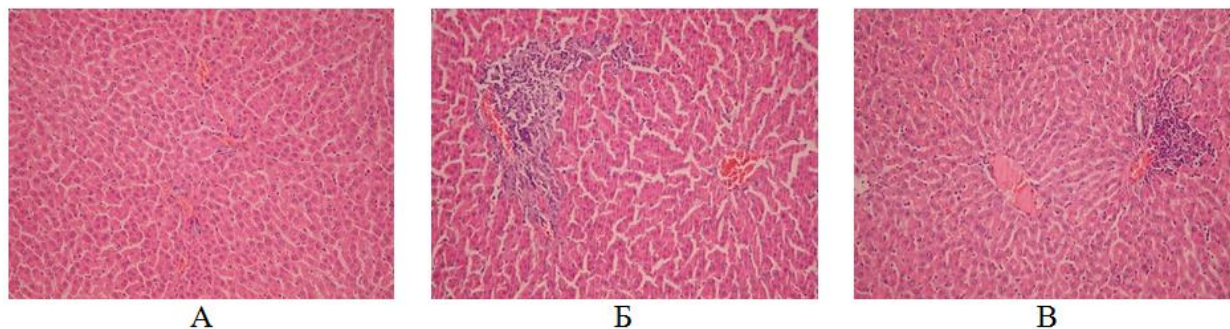
Острая токсичность была изучена на мышах самках  $B_6D_2F_1$ . При пероральном введении субстанции Рпт в диапазоне доз от 4000 до 14000 мг/кг гибели животных достигнуть не удалось. Изменений в состоянии и поведении мышей отмечено не было. При внутривенном введении ЧСА-Рпт в смертельных дозах гибель животных наступала в течение 1,5 часов после инъекции. Более низкие дозы препарата приводили к гибели животных в течение 1 суток. Исходя из картины гибели, можно предположить, что при введении высоких доз причиной смерти животных является нейротоксичность, а при применении более низких доз – сердечно-легочная недостаточность.

При расчете токсикометрических показателей установлено, что при внутривенном введении ЧСА-Рпт самкам мышей  $B_6D_2F_1$   $LD_{50} = 340,0$  (308,9 ÷ 371,1) мг/кг;  $LD_{10}$  (МПД) = 273,3 мг/кг;  $LD_{100} = 418,1$  мг/кг. Таким образом, токсические дозы ЧСА-Рпт при внутривенном введении, по крайней мере, на порядок выше токсических доз Рпт при пероральном применении. При этом в случае внутривенной формы диапазон токсических и переносимых доз весьма узок, однако, терапевтическая широта препарата достаточно велика, т.к. лечебная доза для мышей составляет 20 мг/кг.

Исследование хронической токсичности показало, что и Рпт, и ЧСА-Рпт хорошо переносятся животными. В течение эксперимента ни в одной из групп не было отмечено гибели, отклонений в поведенческих реакциях, изменений состояния кожи и волосяного покрова. У крыс, получавших Рпт, видимые слизистые оболочки и подкожная жировая ткань окрашивались в желтый цвет. У крыс, получавших ЧСА-Рпт, видимые слизистые оболочки оставались бледно-розового цвета, влажность их не изменялась, симптомы бронхита, конъюнктивита и ринита отсутствовали, что свидетельствует об отсутствии у препарата ярко выраженного общетоксического действия.

При исследовании периферической крови, ЭКГ, суточного диуреза и состава мочи во всех подопытных группах показатели статистически значимо не отличались от контроля. При биохимическом исследовании сыворотки крови животных, получавших перорально субстанцию рифапентина, на 1-е сутки после окончания введения было выявлено повышение содержания прямого и общего билирубина и щелочной фосфатазы, которое не зависело от дозы субстанции. Повышение уровня щелочной фосфатазы было отмечено и у животных, получавших водосовместимую лекарственную форму рифапентина в высокой дозе. К концу эксперимента биохимические показатели во всех подопытных группах не отличались от контроля. Повышение этих показателей, а также увеличение массового коэффициента печени на 15-е сутки после курса, – свидетельство гепатотоксического действия рифапентина, которое подтвердилось при патоморфологическом исследовании. В печени крыс, получавших как Рпт, так и ЧСА-Рпт, были выявлены множественные очаги микронекроза различных размеров, расположенные вблизи портальных трактов (Рис. 2).

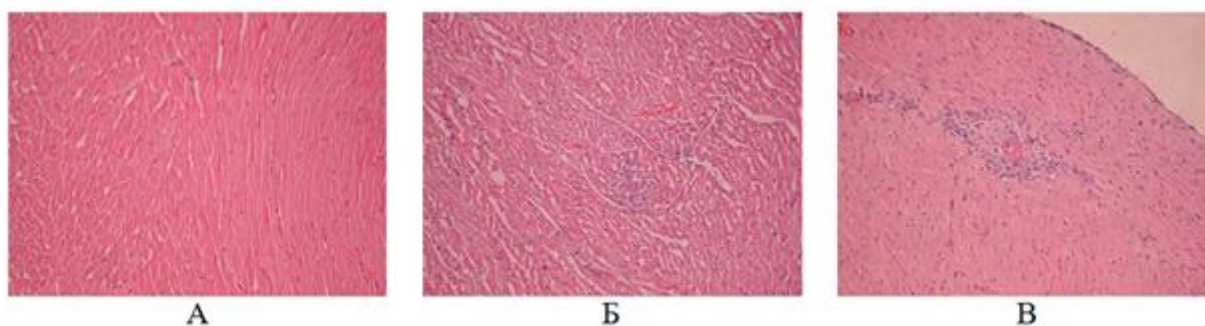
Нефротоксические свойства Рпт и ЧСА-Рпт выражались в повышении массовых коэффициентов почек на 1-е сутки после курса введений препаратов. Морфологически они проявлялись лишь у части животных. В отличие от субстанции, растворимая лекарственная форма препарата оказывала повреждающее действие не только на канальцевую, но и на клубочковую систему почек.



а – интактный контроль; б – субстанция рифапентина,  $\Sigma$ ЛД<sub>50</sub>, 1-е сутки после курса: очаг микро-некроза вблизи портального тракта; в – водосовместимая форма рифапентина,  $\Sigma$ ЛД<sub>50</sub>, 1-е сутки после курса: очаг микро-некроза вблизи портального тракта

**Рис. 2.** Микрофотографии печени крысы (x 20)

Кардиотоксическое действие Рпт выявилось только при патоморфологическом исследовании. Оно сохранялось длительно и выражалось в умеренном очаговом отеке интерстиция, очаговой токсической кардиомиопатии и деструкции кардиомиоцитов (Рис. 3). При применении коллоидной формы умеренные мелкоочаговые изменения были выявлены только у 1 животного, получавшего препарат в высокой дозе.



а – интактный контроль; б – субстанция рифапентина,  $\Sigma$ ЛД<sub>50</sub>, 1-е сутки после курса: умеренный отек интерстиция, мелкий очаг деструкции кардиомиоцитов; в – субстанция рифапентина,  $\Sigma$ ЛД<sub>50</sub>, 15-е сутки после курса: некроз кардиомиоцитов вокруг артерии

**Рис. 3.** Микрофотографии миокарда крысы (x 20)

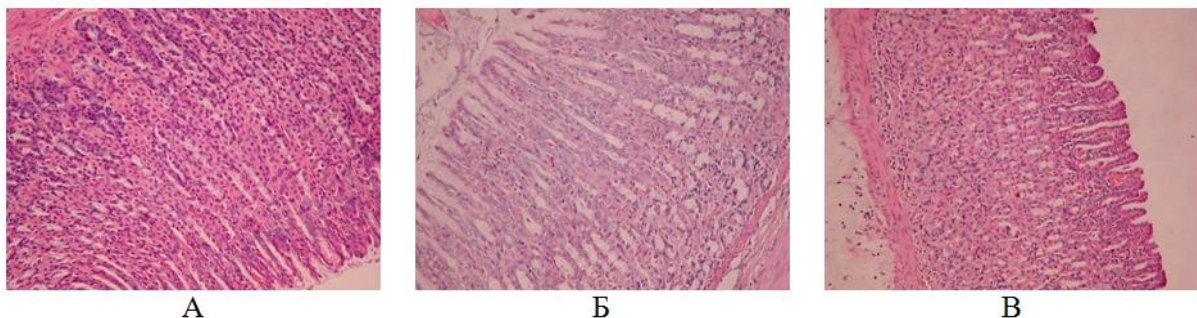
Патоморфологическое исследование показало, что 15-кратное пероральное введение Рпт, как и внутрибрюшинное введение ЧСА-Рпт, в дозе, суммарно составляющей ЛД<sub>50</sub>, вызывает также повреждения тканей легкого и поджелудочной

железы. Патологические изменения в этих органах по характеру повреждающего действия, его интенсивности и длительности аналогичны.

Хотя при проведении общего анализа периферической крови признаков гематотоксичности выявлено не было, при патоморфологическом исследовании были отмечены умеренные атрофические изменения лимфоидной ткани фолликулов селезенки и лимфоузлов у животных, получавших Рпт и ЧСА-Рпт в высокой дозе.

Пероральное введение Рпт оказывало повреждающее действие на слизистую оболочку всех отделов желудочно-кишечного канала. В желудке оно выражалось в глубоких и длительных атрофических и деструктивных изменениях (Рис. 4).

При применении ЧСА-Рпт в дозе, суммарно составляющей МПД, повреждающее действие препарата проявлялось только в печени и экзокринной части поджелудочной железы. По морфологическим проявлениям оно было идентично воздействию Рпт и выражалось в виде единичных мелкоочаговых деструктивных изменений, которые в печени носили стойкий характер, а в поджелудочной железе в течение 15 суток подвергались репарации.



а – интактный контроль; б – субстанция рифапентина,  $\Sigma$ ЛД<sub>50</sub>, 1-е сутки после курса: глубокая атрофия эпителия желез с замещением покровно-ямочным эпителием; в – субстанция рифапентина,  $\Sigma$ ЛД<sub>50</sub>, 15-е сутки после курса: истончение слизистой оболочки

**Рис. 4.** Микрофотографии желудка крысы (x 20)

Таким образом, преимущество растворимой лекарственной формы рифапентина заключается в отсутствии гастроинтестинальной и кардиотоксичности. При значительной передозировке парентеральной лекарственной формы необходимо учитывать возможность нарушения фильтрационной функции почек. В остальном, побочные реакции, возникающие при применении рифапентина, не зависят от пути и формы введения препарата.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На стадии фармацевтической разработки в будущий продукт закладываются те свойства, которые в конечном счете будут определять его пользу и вред для пациента. Это подразумевает не только изыскание лекарственных веществ с улучшенными характеристиками, но и совершенствование лекарственных форм.

Одним из важнейших свойств лекарственного вещества является его растворимость. Разнообразные технологии повышения истинной или коллоидной растворимости субстанций не только улучшают профиль их биораспределения, эффективности и безопасности, но и позволяют расширить показания к применению, создав дополнительные пути введения.

В данном исследовании для получения парентеральной формы противотуберкулезного антибиотика рифапентина была использована «nab-технология» с применением в качестве солюбилизатора человеческого сывороточного альбумина. Аналогичная технология была использована и при получении водосовместимых форм рифапентина, а также рифаксимины, с другими белками: сукцинилизированным желатином и казеинатом натрия.

В результате была получена коллоидная форма рифапентина для парентерального введения с повышенной эффективностью и сниженной токсичностью. Было показано, что данный подход, в общем, применим и для рифаксимины, родственного антибиотика рифамицинового ряда – что, помимо основного назначения – лечения желудочно-кишечных инфекций, потенциально создает возможность его внутривенного применения для терапии туберкулеза.

Можно полагать, что разработанная технология в дальнейшем окажется применимой в отношении большого количества активных фармацевтических субстанций, для которых целесообразна разработка инъекционных форм.

## ВЫВОДЫ

- Разработаны методы получения водосовместимых форм антибиотиков, позволяющие достичь общего содержания рифапентина и рифаксимины в суспензии около 10 и 3 мг/мл, соответственно. Показано, что для рифапентина это метод ультразвуковой гомогенизации с применением в качестве стабилизатора человеческого сывороточного альбумина или казеината натрия. Для рифаксимины наилучшим является метод наноосаждения в присутствии

казеината натрия. Размеры частиц в этих случаях не превышают 300-700 нм, что позволяет осуществлять внутривенное введение.

- Проведена оценка воспроизводимости технологических условий получения разрабатываемых лекарственных форм. Показано, что разработанные технологии хорошо воспроизводятся в лабораторном масштабе.
- Изучено взаимодействие между белками и антибиотиками. Установлено, что рифапентин образует сравнительно непрочные комплексы с человеческим сывороточным альбумином, сукцинированным желатином и казеинатом натрия (константы ассоциации  $\sim 10^3$ - $10^4$  л/моль), а рифаксимин – с казеинатом натрия (константа ассоциации  $\sim 10^5$  л/моль).
- Изучена эффективность внутривенной формы рифапентина на модели экспериментального туберкулеза мышей. Показано, что в дозах 5 и 10 мг/кг внутривенная форма равноэффективна перорально вводимой субстанции, а в дозе 20 мг/кг ее эффективность достоверно превышает эффективность субстанции.
- Изучена острая и хроническая токсичность внутривенной формы рифапентина. Показано, что величина максимальной переносимой дозы более чем на порядок превышает лечебные дозы. Профили токсического действия перорально вводимой субстанции и внутривенной формы близки. Преимущество внутривенной формы рифапентина заключается в ослаблении гепатотоксических свойств антибиотика и отсутствии кардио- и гастроинтестинальной токсичности.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Островский К.П., Осипова Н.С., Ванчугова Л.В., Шипуло Е.В., Переверзева Э.Р., Трещалин И.Д., Максименко О.О., Гельперина С.Э. Использование белков для повышения растворимости рифапентина в воде // Хим.-фарм. журнал. 2016. Т. 50. № 6. С. 39-44.
- 2 Островский К.П., Переверзева Э.Р., Трещалин И.Д., Осипова Н.С., Трещалин М.И., Возняковская Е.В., Балабаньян В.Ю., Максименко О.О., Гельперина С.Э. Токсикологическое исследование внутривенной формы рифапентина // Антибиотики и химиотерапия. 2016. Т. 61. № 7-8. С. 15-21.
- 3 Островский К.П., Осипова Н.С., Ванчугова Л.В., Шипуло Е.В., Потапов В.Д., Переверзева Э.Р., Трещалин И.Д., Максименко О.О., Гельперина С.Э. Эффективность внутривенной формы рифапентина на модели экспериментального туберкулеза у мышей // Хим.-фарм. журнал. 2017. Т. 51. № 7. С. 54-59.