

М. В. Соловский^{1, 2}, М. С. Борисенко^{1, 2}, Е. Н. Власова², Е. Б. Тарабукина²,
Н. В. Захарова², Т. А. Праздникова²

ПОЛИМЕРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ОФЛОКСАЦИНА И ИХ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

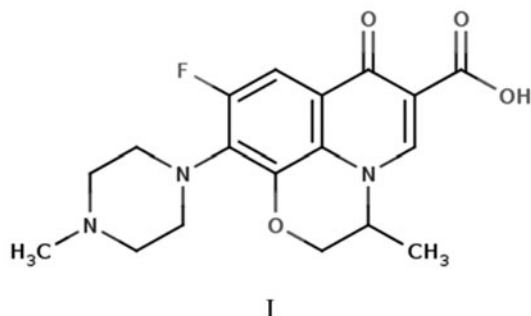
¹ Санкт-Петербургский политехнический университет, Россия, Санкт-Петербург.

² ФБУН Институт высокомолекулярных соединений РАН, Россия, 199004,
Санкт-Петербург, Большой пр., 31.

Для создания новых пролонгированных форм офлоксацина (увеличение продолжительности их действия возможно вследствие изменения метаболизма и замедления элиминации) были получены его полимерные комплексы на основе сополимеров N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата с молекулярными массами 25000 – 87000, содержащие 25 – 35 % офлоксацина. Установлено, что полученные полимерные комплексы обладали высокой активностью в отношении *Micobacterium tuberculosis* H₃₇Rv и характеризовались постепенным (~ 45 – 57 % за 50 ч) высвобождением офлоксацина из полимерного комплекса в буферном растворе (рН 2,0) при температуре 37 °С.

Ключевые слова: офлоксацин; сополимеры N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата; полимерные комплексы; противотуберкулезная активность.

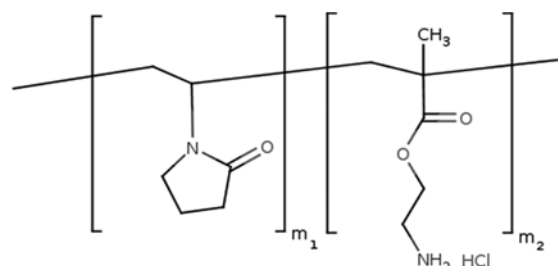
Монофторхинолон офлоксацин (I) активен в отношении микобактерий туберкулеза [1].



Пролонгирование активности I может иметь важное значение, поскольку позволяет снизить число приёмов лекарственного препарата, сократить его потребление. Актуальность данной задачи подтверждается работами [2, 3]. Авторы [2] решали проблему пролонгирования постепенного высвобождения лекарственного вещества, вплоть до 12 ч, созданием новой полимерной плавающей (флотирующей) лекарственной формы, постепенно растворяющейся в желудке. В статье [3] описана работа по созданию глазных вставок на базе гуаровой камеди для достижения устойчивого поступления I в течение 24 ч. Также вопросами модификации I путём включения его в полимерные системы для пролонгации терапевтического действия занимались авторы [4, 5]. Как известно [6], эффективным приемом получения пролонгированных форм лекарственных веществ (ЛВ) с высокой биоспецифической активностью является их модификация водорастворимыми биосовместимыми полимерами.

В качестве метода получения таких форм I, содержащего карбоксильную группу, было выбрано комплексообразование его с катионными полимерами — носителями — сополимерами N-винилпирролидона

(ВП) с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата (2-АЭМ), имеющими в боковых цепях реакционно-способные $-N^+H_3Cl^-$ группы (II).

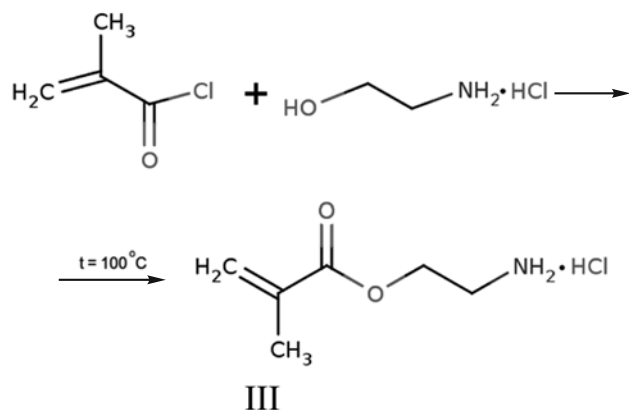


$m_1 + m_2 = 100$ мол. %

Целью работы был синтез в качестве полимеров-носителей ЛВ сополимеров II и получение на их основе водорастворимых полимерных комплексов I, исследование их противотуберкулезной активности и скорости высвобождения I из полимерных комплексов в модельных средах.

Выбор реакционно-способных сополимеров N-винилпирролидона для модификации I неслучаен, поскольку ввиду биосовместимости, высокой гидрофильности они широко и успешно используются в качестве полимеров-носителей многих ЛВ [7]. Следует отметить, что в литературе не было обнаружено сведений о полимерных производных фторхинолонов, в частности I.

На предварительной стадии работы получали гидрохлорид 2-аминоэтилметакрилата (2-АЭМ · HCl) (III) по методу [8] путем ацилирования гидрохлорида моноэтаноламина (ОН-СН₂СН₂-NH₂ · HCl) метакрилоилхлоридом в присутствии ингибитора радикальной полимеризации — гидрохинона.



Кроме того, I переводили в его натриевую соль путем добавления в водный раствор навески I эквимолярного количества 1 н. раствора NaOH.

Радикальную сополимеризацию ВП с 2-АЭМ · HCl проводили в пропанол-2 при 65 °С, иницируемую азо-бис(изобутиронитрилом) (АИБН). Сополимеры II получены с выходом 63,6 – 80,2 % с молекулярными массами (ММ) 26000 – 87000 с содержанием реакционно-способных NH₂ · HCl групп в боковых цепях, равным 10,9 – 35,8 мол. %. Составы полученных сополимеров установлены по содержанию Cl, а их ММ (MSD) — седиментационно-диффузионным методом [9].

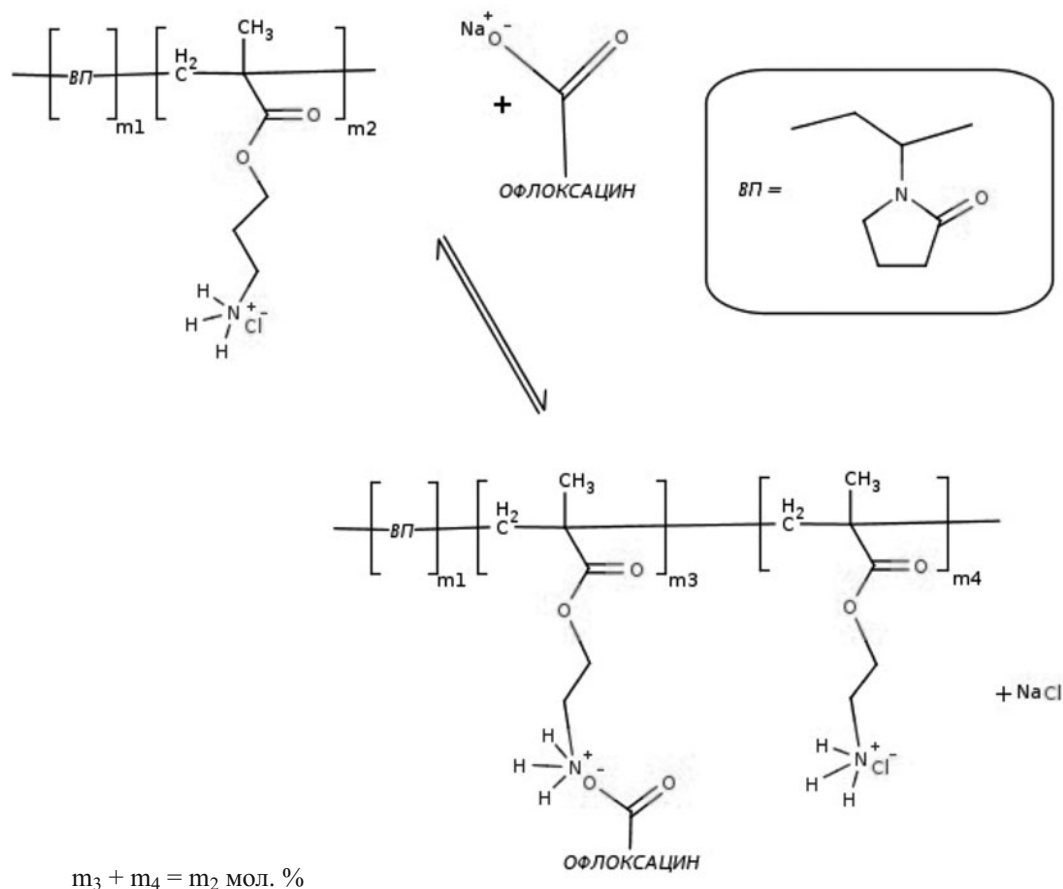
Строение полученных сополимеров II — носителей I — подтверждали методом ИК-спектроскопии (рис. 1). В ИК-спектре сополимера II-2 обнаруживается интенсивная полоса поглощения в области 1653 см⁻¹, характерная для (C=O) пирролидинового цикла звеньев ВП, полоса при 1727 см⁻¹ (C=O) сложноэфирной группы, а также ряды почти непрерывных полос поглощения в области 2800 – 2500 см⁻¹, характерные для гидрохлоридов аминокислот и первичных аминов [10].

Получение полимерных комплексов I (IV) проводили в водном растворе при массовом соотношении полимер-носитель — фторхинолон, равном 0,25 – 0,35/1 (схема).

Некоторые характеристики полимерных комплексов IV-1 – IV-3 приведены в таблице. Комплексы получены с выходом 75 – 91 % на основе сополимеров II, содержащих 10,9 – 28,3 мол. % реакционно-способных -NH₂ · HCl групп. Содержание I в комплексе, вычисленное по загрузке компонентов, удовлетворительно совпадало с содержанием I, определенным методом УФ-спектроскопии.

Наличие комплексообразования сополимеров II с натриевой солью I подтверждено вискозиметрическим методом. Определение характеристической вязкости [η] полимерного комплекса IV-3 дало значение

Схема



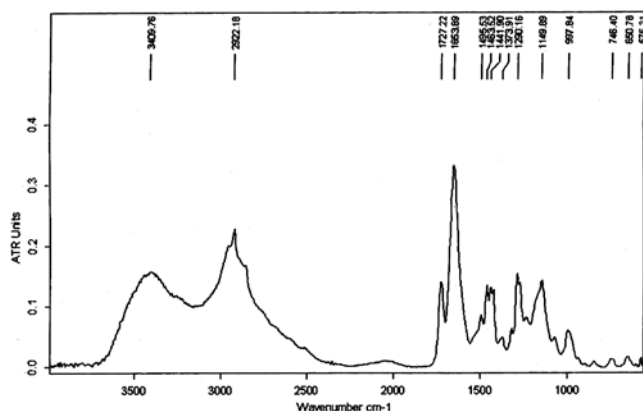


Рис. 1. ИК-спектр в таблетке с КВг сополимера ВП-2-АЭМ · НСІ ІІ-3

$[\eta] = 12 \text{ см}^3/\text{г}$. В тех же условиях $[\eta]$ исходного сополимера ІІ-3 составила $27 \text{ см}^3/\text{г}$. Наблюдаемое явление связано с компактизацией макромолекул носителя в результате его комплексообразования с І. При этом гидродинамические размеры клубка макромолекул сополимера уменьшаются, что приводит к снижению характеристической вязкости раствора сополимера.

При микробиологическом исследовании *in vitro* І — контроля выявлено его выраженное действие на *M. tuberculosis* (МПК = 3,1 мкг/мл). Полученные полимерные комплексы ІV-1 – ІV-3 проявили также высокую активность в отношении *M. tuberculosis* (МПК = 6,2 мкг/мл), которая не зависела от содержания І в комплексе и его молекулярной массы (таблица). Высокая противотуберкулезная активность комплексов ІV обусловлена эффектом повышенных локальных концентраций І на макромолекулах полимера-носителя, облегчающих его транспорт в микробную клетку. Следствием этого эффекта является то, что высокая активность в отношении *M. tuberculosis* обнаружена у комплекса ІV-3, содержащего всего 25 % І. Исходный катионный полимер-носитель ІІ-3 оказался не активным в отношении *M. tuberculosis*. Вместе с тем катионные полиэлектролиты типа ІІ являются мембранотропными веществами и действуют на стафилококк и кишечную палочку (в зависимости от состава) в концентрациях 125 – 1000 мкг/мл [11]. В отли-

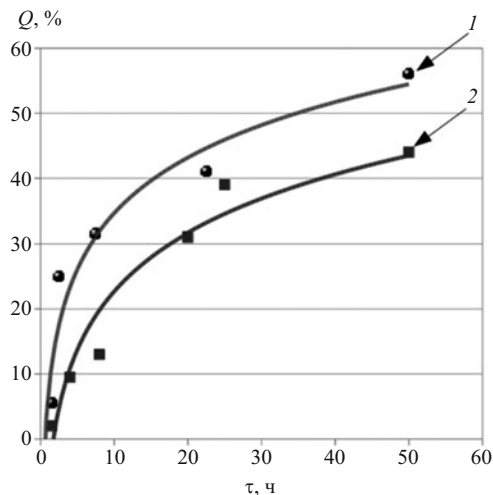


Рис. 2. Степень высвобождения (Q) офлоксацина из его полимерных комплексов ІV-1 (1) и ІV-2 (2).

чие от обычных бактерий, микобактерии характеризуются повышенным содержанием липидов и наличием воска. Это затрудняет воздействие катионных полимеров на липидный матрикс и, возможно, является причиной обнаруженного у них отсутствия активности в отношении *M. tuberculosis*.

Важным представлялось изучение устойчивости полученного комплекса І. Поскольку при низких значениях рН ионная связь наиболее подвержена разрыву (ввиду большой концентрации ионов H^+) [12], в качестве такой среды выбран гликоколовый буфер (рН 2,0). Температура эксперимента $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Исходная концентрация І в составе комплексов ІV-1 – ІV-2 в буферном растворе составляла 160 – 180 мкг/мл. Результаты этого эксперимента (рис. 2) свидетельствуют о достаточно медленном высвобождении І из полимерных комплексов в модельной среде: 13 – 32 % — за 10 ч, 34 – 44 % — за 24 ч и 43 – 54 % — за 48 ч, что позволяет обеспечить пролонгирование противотуберкулезного действия І при его использовании. Следует отметить, что по сравнению с комплексом ІV-2 І быстрее высвобождается из полимерного комплекса ІV-1, имеющего меньшую ММ и меньшее количество функциональных $\text{N}^+\text{H}_3\text{Cl}^-$ групп, связывающих фторхино-

Физико-химические и противотуберкулезные свойства полимерных комплексов офлоксацина

Сополимер-носитель ІІ			Полимерный комплекс офлоксацина ІV				
обозначение	m_2 , мол. %	M_{SD}	обозначение	выход, %	Содержание монофторхинолона, %, определено:		МИК* в отношении <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv
					УФ-спектроскопией	по загрузке компонентов	
ІІ-1	10,9	26 000	ІV-1	91,0	36,2	35,0	6,2
ІІ-2	28,3	87 000	ІV-2	74,8	32,3	30,0	6,2
ІІ-3	17,8	55 000	ІV-3	82,1	26,1	25,0	6,2
Офлоксацин (контроль)		ММ 361	Офлоксацин	—	98,4	100	3,1
ІІ-3 — носитель (контроль)		55000	—	—	0	0	Неактивен

* МИК — минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл.

лон. При этом необходимо принимать во внимание время прохождения полимера-носителя через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). По имеющимся данным [13], катионный сополимер ВП (ММ = 55 000), близкий по структуре сополимеру П-2, содержащий радиоуглеродную метку, за 72 ч полностью выводится из ЖКТ крыс при пероральном введении и не всасывается в кровь.

Таким образом, в результате проведенной работы впервые получены водорастворимые полимерные производные I, обладающие высоким противотуберкулезным действием с возможным его пролонгированием.

Экспериментальная химическая часть

Пропанол-2 (абсолютизированный фирмы «Вектон»), N,N'-дициклогексилкарбодиимид фирмы "Fluka" и офлоксацин фирмы "Zentiva" использовали без дополнительной очистки. АИБН перекристаллизовывали 3 раза из этанола.

УФ-спектры водных растворов I и его полимерных комплексов записывали на спектрофотометре СФ-256 УФИ в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см. ИК-спектр сополимера II снимали на спектрометре Bruker IFS в таблетках с бромидом калия.

Сополимеры II синтезировали свободно-радикальной полимеризацией ВП с гидрохлоридом III в пропанол-2 при 65 °С в присутствии АИБН по стандартной методике [14]. Сополимер из полимеризата выделяли осаждением в ацетон. Очищали переосаждением из этанола в диэтиловый эфир.

Пример получения полимерного комплекса IV-3.

К раствору 0,3 г сополимера П-3 с III в 40 мл воды добавляют на кальке 0,1 г Na соли I. Реакционный раствор перемешивают 30 мин при комнатной температуре и проводят диализ против воды в течение 3 ч. Диализованный раствор подвергают лиофильной сушке в сублимационной сушилке "FreeZone 6" (Labconco, USA). Получено 0,325 г (74,7 %) водорастворимого продукта, содержащего 32,3 % I. Содержание I в полимерном комплексе определяют методом УФ-спектроскопии. Скорость высвобождения I из комплекса оценивают методом диализа через полупроницаемую целлофановую мембрану Spectra/Por с MWCO 500 [15], пропускающую молекулы I и задерживающую макромолекулы полимера-носителя. Процесс проводят в гликоколовом буфере (рН 2,0) при температуре 37 °С.

Экспериментальная биологическая часть

Противотуберкулезную активность I и его полимерных комплексов изучали методом двукратных серийных разведений препарата при добавлении тест-микроба *Micobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. Питательная среда — Сотона. После добавления микробов пробы инкубировали 24 дня при 37 °С и учитывали результаты по наличию мутности. Микробная нагрузка составляла 10⁵ микробных клеток/мл.

Авторы выражают благодарность профессору В. В. Тецу за определение противотуберкулезной активности I и его полимерных комплексов и профессору Е. Ф. Панарину за дискуссию.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2005).
2. Rani Kirti, Garg Veera, Goswami Dhruba Sankar, *World J. Pharm. Res.*, **2**(3), 631 – 645 (2013).
3. Kumar Sunil, Issarani Roshan, Nagori B. P., Ahuja Munish, *Asian J. Pharmaceutics*, **6**(3), 198 – 203 (2012).
4. A. Md. Sajid, A. Javed, A. Alka, A. Md. Sarfaraz, *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2**(11), 114 – 119 (2012).
5. J. Ramesh Babu, S. Vidyadhara, Anwar Basha, *Pharmacia Lettre*, **5**(5), 82 – 92 (2013).
6. Н. А. Платэ, А. Е. Васильев, *Физиологически активные полимеры*, Химия, Москва (1986).
7. Е. Ф. Панарин, В. Н. Ушакова, *Полимеры медицинского назначения*, ИНС АН СССР, Москва (1988), сс. 69 – 94.
8. М. А. Коршунов, М. С. Михлин, *Ж. орган. химии*, **5**(2), 254 – 256 (1969).
9. М. В. Соловский, М. Ю. Смирнова, Е. Б. Тарабукина, Н. В. Захарова, *Ж. общей химии*, **82**(10), 1650 – 1655 (2012).
10. Л. Беллами, *Инфракрасные спектры молекул*, Издательство иностранной литературы, Москва (1957).
11. Г. Е. Афиногенов, Е. Ф. Панарин, *Антимикробные полимеры*, Гиппократ, Санкт-Петербург (1993).
12. В. М. Таланов, Г. М. Житный, *Ионные равновесия в водных растворах*, Академия Естественных наук, Москва (2007).
13. В. В. Копейкин, *Автореф. дис. докт. хим. наук*, Санкт-Петербург (1999).
14. М. В. Соловский, Е. Б. Тарабукина, А. А. Шпырков и др., *Ж. приклад. химии*, **78**(4), 642 – 646 (2005).
15. М. В. Соловский, Н. В. Никольская, Н. А. Заикина, *Хим.-фарм. журн.*, **39**(2), 16 – 19 (2005); *Pharm. Chem. J.*, **39**(2), 70 – 73 (2005).

Поступила 15.07.14

POLYMERIC COMPLEXES OF OFLOXACIN AND THEIR ACTIVITY WITH RESPECT TO TUBERCULOSIS MICOBACTERIA

M. V. Solovskii^{1,2}, M. S. Borisenko^{1,2}, E. N. Vlasova², E. B. Tarabukina², N. V. Zakharova², and T. A. Prazdnikova²

¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

² Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences. St. Petersburg, 199004 Russia

The available oral forms of anti-tubercular drug ofloxacin do not ensure its long-term supply to the blood system. New polymeric complexes of ofloxacin, based on copolymers of N-vinylpyrrolidone and 2-aminoethylmethacrylate hydrochloride with molecular weights of 25,000 – 87,000, were obtained with the purpose of creating effective prolonged release forms of ofloxacin. The polymeric complexes contained about 25 – 35% ofloxacin, exhibited high activity with respect to *Micobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, and ensured gradual release of ofloxacin (about 45 – 57% for 48 h) in pH 2.0 buffer at a temperature of 37°C.

Keywords: ofloxacin; prolonged release; copolymer of N-vinylpyrrolidone and 2-aminoethylmethacrylate hydrochloride; polymeric complexes; antitubercular activity.