

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПОЛИМЕРНЫХ ФОРМ РИФАБУТИНА С РАЗЛИЧНЫМ ХАРАКТЕРОМ СВЯЗИ ПОЛИМЕР–АНТИБИОТИК

© А. А. Вагин^{1,2}, М. С. Борисенко^{2,*}, М. В. Соловский², Е. Б. Тарабукина²

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), 190013, г. Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26

² Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О., д. 31

* E-mail: aarghm@yandex.ru

Поступила в Редакцию 29 июня 2022 г.

После доработки 28 ноября 2022 г.

Принята к публикации 27 декабря 2022 г.

*Получены водорастворимые полимерные формы противотуберкулезного препарата рифабутин на основе сополимеров акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой и N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом, обладающие ионным и ковалентным типом связи полимер–рифабутин. Методом радикальной сополимеризации в спиртах при 60°C синтезированы полимерные носители с молекулярной массой 7.5–98 кДа, гидродинамические радиусы R_{h-D} полимерного комплекса рифабутина и исходного полимера-носителя составили 2.6 и 2.35 нм. Содержание рифабутина в полимерных системах составило 14.1–43.4 мол%. Оценена кинетика высвобождения рифабутина из полимерных форм в модельной среде. Получены высокие значения активности исследуемых полимерных систем в отношении культуры *M. smegmatis* ATCC-607 для обоих типов полимерных форм.*

Ключевые слова: физиологически активные полимеры; рифабутин; противотуберкулезные препараты; радикальная сополимеризация

DOI: 10.31857/S0044461822090043; EDN: PRUICU

Рифабутин, являющийся объектом проведенного исследования, представляет собой спиро-пиперидил дериват рифампицина SV, обладающий высокой антимикобактериальной активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, а также группы нетуберкулезных микобактерий *M. avium complex* (MAC). Существенным недостатком рифабутина является плохая растворимость в воде, что затрудняет его введение в кровоток и значительно снижает биодоступность препарата. В настоящее время на рынке противотуберкулезных препаратов существуют только пероральные лекарственные формы рифабутина,* характеризующиеся малой биодоступностью ввиду

преждевременного выведения лекарственного средства из зоны всасывания в желудочно-кишечном тракте, а также в связи с его деструкцией в организме [1]. Таким образом, представляет интерес разработка препаратов рифабутина для парентерального введения, создание которых требует перевод лекарственного средства в водорастворимую форму. Это может быть достигнуто модификацией рифабутина водорастворимыми нетоксичными полимерами-носителями путем создания полимерных систем, содержащих рифабутин, связанный ионной или ковалентной связью с полимерной основой.

Цель работы — создание полимерных форм рифабутина на основе водорастворимых полимеров-носителей с различной природой связи полимер–

* <https://grls.rosminzdrav.ru>

рифабутин, исследование их антимикобактериальной активности и скорости высвобождения действующего вещества из полимерной формы в модельных средах.

Методом получения искомым форм был выбран синтез путем комплексообразования рифабутина и водорастворимого синтетического сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой, а также конъюгирования рифабутина и сополимера N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом. Соплимеры N-винилпирролидона и акриламида достаточно хорошо изучены и успешно используются в качестве носителей многих лекарственных средств [2]. Значения острой токсичности LD₅₀ предлагаемых носителей при внутрибрюшинном введении мышам известны и составляют >5000 мг·кг⁻¹ [3] для сополимеров акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой и 328 мг·кг⁻¹ [4] для сополимеров N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом, что позволяет отнести их к нетоксичным и умеренно токсичным веществам соответственно. В связи с предполагаемым способом введения полимерных форм рифабутина существенно, что полиакриламид и поливинилпирролидон, ввиду своей гидрофильности и неионогенности, являются гемосовместимыми полимерами [5, 6]. Аналогичных свойств следует ожидать и от сополимеров, содержащих преобладающее количество соответствующих звеньев. Сульфосодержащие сополимеры, как носители биологически активных веществ, интересны также за счет наличия собственной противовирусной [7, 8], антибактериальной и противогрибковой [9] активности, что необходимо при профилактике и терапии вторичных инфекций небактериальной природы.

Экспериментальная часть

Для синтеза полимеров-носителей использовали акриламид (99.9%, кат. номер A1090, AppliChem), 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислоту (99%, кат. номер 282731, Sigma-Aldrich), гидрохлорид 2-аминоэтилметакрилата (90%, кат. номер 516155, Sigma-Aldrich), N-винилпирролидон (99%, кат. номер V3409, Sigma-Aldrich). В качестве инициатора сополимеризации применяли 2,2'-азобисизобутиронитрил (ч., ООО ТД «ХИММЕД»).

В качестве источника рифабутина использовали препарат ФАРБУТИН® в капсулах, содержащих 150 мг действующего вещества (АО «ФАРМАСИНТЕЗ»). Содержимое капсул извлекали, оболочку удаляли и рассчитывали массовое содержание рифабутина в препарате. Дополнительную очистку реагента не проводили.

В качестве вспомогательных реагентов применяли HNO₃ (ч.д.а., АО «Вектон»), CH₃COONa (ч.д.а., АО «ЛенРеактив»), NaOH (х.ч., АО «ЛенРеактив»), NaCl (х.ч., АО «Вектон»), NaNO₃ (ч.д.а., ООО «ЭКРОСХИМ»), K₂HPO₄ (ч., ООО «ЭКРОСХИМ»), K₂CO₃ (ос.ч., АО «Вектон»), стандарт-титры 0.1 М HCl и 0.1 М AgNO₃ (оба — АО «УРАЛХИМИНВЕСТ»). В качестве растворителей использовали этанол (96%, ООО ТД «ХИММЕД»), пропанол-2, 1,2-дихлорэтан, трихлорметан (все — х.ч., АО «Вектон»), диэтиловый эфир (ч.д.а., ООО «Кузбассоргхим»). Дистиллированную воду с удельной электропроводностью 0.17 мСм·м⁻¹ получали при помощи дистиллятора АЭ-14-«Я-ФП»-01 (ООО «Ферропласт Медикал»).

Чистоту используемых мономеров подтверждали элементным анализом с помощью анализатора C, H, N, S Elemental Vario EL (Abacus Analytical Systems GmbH). Показатель преломления определяли на рефрактометре ИРФ-22 (АО «КОМЗ», СССР). Чистоту гидрохлорида 2-аминоэтилметакрилата, а также состав сополимеров N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата подтверждали определением содержания хлора в образцах методом потенциометрического титрования 0.01 М AgNO₃. Рабочий электрод — серебряный, электрод сравнения — стандартный хлоридсеребряный. Навеску образца перетирали с 20–50-кратной по массе навеской K₂CO₃ и прокаливали в платиновом тигле при 800°C. После охлаждения плав растворяли в горячей 0.5 М HNO₃, не содержащей хлорид-ионов, и оттитровывали аликвоту полученного раствора. HNO₃ была предварительно проверена на содержание Cl⁻ стандартной качественной реакцией с AgNO₃. Дополнительная очистка реагента не требовалась.

N-Винилпирролидон очищали перегонкой в вакууме. Отбирали фракцию с T_{кип} = 67°C (2 мм рт. ст.), n_D²⁰ 1.5110. Очистку 2,2'-азобисизобутиронитрила осуществляли двойной перекристаллизацией в смеси хлороформа и этанола. T_{пл} = 103°C, выход 55%. Найдено (%): С 57.97, Н 7.27. Предполагаемая брутто-формула: C₈H₁₂N₄. Вычислено (%): С 58.53, Н 7.31. Гидрохлорид 2-аминоэтилметакрилата очищали перекристаллизацией из 1,2-дихлорэтана. Найдено (%): Cl 21.26. Предполагаемая брутто-формула: C₆H₁₂ClNO₂. Вычислено (%): Cl 21.32. Остальные мономерные дополнительные очистки перед синтезом не подвергались. Для акриламида найдено (%): С 50.81, Н 6.60, N 19.40. Предполагаемая брутто-формула: C₃H₅NO. Вычислено (%): С 50.70, Н 7.04, N 19.72. Для 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислоты найдено (%): С 40.91, Н 6.50, N 6.86. Предполагаемая

брутто-формула: $C_7H_{13}NO_4S$. Вычислено (%): С 40.58, Н 6.28, N 6.76.

Сополимеры акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой (I). В ампулу загружали 0.1556 г 2,2'-азобисизобутиронитрила, 2 г акриламида, 1.4579 г 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислоты и 24.8 мл этилового спирта. Ампулу предварительно продували аргоном (ВЧ, ООО «НОРД ГАЗ»), запаивали, выдерживали в термостате в течение 24 ч при температуре 60°C. Сополимер осаждали диэтиловым эфиром, собирали на фильтре Шотта и сушили в вакуумной сушилке в течение 5 сут.

Сополимеры N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата (II). В ампулу загружали 3.36 мл N-винилпирролидона, 1.3 г гидрохлорида 2-аминоэтилметакрилата, 0.2155 г 2,2'-азобисизобутиронитрила и 54.8 мл изопропилового спирта. Ампулу продували аргоном, запаивали и помещали в термостат, нагретый до температуры 60°C. Полимеризацию проводили в течение 48 ч. Для осаждения сополимера использовали диэтиловый эфир, образец собирали на фильтре Шотта и сушили в вакуумной сушилке в течение 5 сут.

Сополимеры N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом (III). 0.7709 г сополимера N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата растворяли в 30 мл дистиллированной воды, раствор вводили в ионообменную колонку с анионитом ЭДЭ-10П (ПАО «Уралхимпласт») в ОН-форме, одновременно определяя рН фильтрата при помощи универсальной индикаторной бумаги (ООО «ЭКРОСХИМ»). Когда рН фильтрата стал щелочным, его собирали в стакан до тех пор, пока рН снова не станет нейтральным. Собранный щелочной фильтрат замораживали и подвергали лиофильной сушке. Для дополнительной очистки образцов от остатков щелочи был проведен диализ против воды через полупроницаемую мембрану с MWCO 1000.

Гидрохлорид рифабутина. К 0.6 г содержимого капсул ФАРБУТИН® приливали 17.2 мл 0.1 М HCl, взвесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Осадок отделяли фильтрованием через бумажный фильтр, раствор гидрохлорида рифабутина подвергали лиофильной сушке. Лиофилизат имел темно-фиолетовый оттенок.

Полимерные комплексы рифабутина и сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой (IV). 0.5 г сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой растворяли в 16 мл дистиллированной воды, в раствор добавляли 0.2417 г содержимого капсул ФАРБУТИН®. Полученную взвесь перемешивали в течение 8 ч.

Осадок отделяли от смеси на бумажном фильтре. Раствор полимерного комплекса подвергали лиофильной сушке. По истечении сушки получали лиофилизат фиолетового цвета.

Полимерные конъюгаты рифабутина и сополимера N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом (V). 0.3 г сополимера N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом растворяли в 30 мл дистиллированной воды и добавляли при перемешивании раствор 0.15 г гидрохлорида рифабутина в 5 мл дистиллированной воды. Навеску гидрохлорида рифабутина брали исходя из 6 моль на 0.3 г сополимера. Образовался раствор малинового цвета с рН 7.1. Реакцию вели при рН 8.5–9.0, регулируя рН добавлением к реакционной смеси 0.1 М NaOH, в течение 4 ч перемешивая реакционную смесь. Затем рН реакционного раствора устанавливали в пределах 7.0–7.4, замораживали и подвергали лиофильной сушке.

Физические и физико-химические методы исследования. Определение характеристической вязкости $[\eta]$ сополимеров осуществляли вискозиметрическим методом при 30°C в 1 М NaNO₃ [сополимеры (I)] и при 25°C в 0.1 М CH₃COONa [сополимеры (II)].

Молекулярную массу сополимеров (I) (<23 мол%) рассчитывали по формуле*

$$[\eta]_{1 \text{ M NaNO}_3}^{30^\circ\text{C}} = 3.73 \cdot 10^{-4} M_w^{0.66}. \quad (1)$$

Молекулярную массу сополимеров (II) (<23 мол%) рассчитывали по формулам [10] для $MM_{\text{ПВП}} < 40\,000$

$$[\eta]_{1 \text{ M NaAc}}^{25^\circ\text{C}} = 5.0 \cdot 10^{-4} M_w^{0.56}, \quad (2)$$

для $MM_{\text{ПВП}} > 40\,000$

$$[\eta]_{1 \text{ M NaAc}}^{25^\circ\text{C}} = 8.86 \cdot 10^{-5} M_w^{0.74}. \quad (3)$$

Молекулярную массу сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой (I-5) и сополимера N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата (II-1) определяли методом седиментационно-диффузионного анализа. Скоростную седиментацию выполняли на аналитической центрифуге ProteomeLab XL-I/XL-A (Beckman Coulter) при частоте вращения ротора 40 000 об·мин⁻¹. Седиментацию регистрировали с помощью интерференционной оптической системы. Проводили сканирование интерференционной картины каждые 90 с. Полученные данные преобразовывали в дифференциальные кривые распределения по коэффициентам

* Энциклопедия полимеров. Т. 1 / Под ред. В. А. Каргина. М.: Сов. энциклопедия, 1972. С. 30.

седиментации. Коэффициенты седиментации рассчитывали по скорости движения максимума седиментационной границы при различных концентрациях и экстраполировали к бесконечному разбавлению, определяя таким образом константу седиментации S_0 . Распределение по коэффициентам седиментации рассчитывали с помощью программы Sedfit.*

Поступательную диффузию изучали в поляризационном диффузомере Цветкова (ФГБУН Институт высокомолекулярных соединений РАН). Коэффициенты диффузии рассчитывали методом площади — максимальной ординаты. Константу диффузии D_0 принимали равной коэффициенту диффузии, измеренному при малой концентрации $c < 0.1$ г/100 см³, поскольку концентрационная зависимость коэффициента диффузии в области сильно разбавленных растворов полимеров незначительна [11]. Парциальный удельный объем v определяли пикнометрически. Гидродинамические молекулярные массы (M_{SD}) рассчитывали по уравнению Сведберга.

Значения молекулярной массы и гидродинамического радиуса R_{h-D} макромолекул сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфонокислотой и комплекса рифабутина на его основе получены методами статического и динамического рассеяния света в водных растворах 0.1 М NaCl при 21°C. Светорассеяние изучали на установке Photocor Complex (ООО «Фотокор»), источником света служил диодный лазер Photocor-DL (мощность от 5 до 30 мВт, длина волны $\lambda = 632.8$ нм). Калибровку прибора проводили по толуолу ($R_V = 1.38 \cdot 10^{-5}$ см⁻¹). Корреляционную функцию интенсивности рассеянного света получали с помощью коррелятора Photocor-PC2 с числом каналов 288 и обрабатывали с помощью программного обеспечения DynaLS. Средневесовые молекулярные массы M_w полимеров получали методом Дебая. Все растворы полимера фильтровали через фильтры Chromafil PA с диаметром пор 0.45 мкм, а растворитель — с диаметром пор 0.20 мкм. Инкременты показателя преломления растворов сополимера и комплекса сополимера с рифабутином измеряли на рефрактометре Refractometer RA-620 (КЕМ) в водно-солевом растворе 0.1 М NaCl при 21°C.

Состав сополимеров акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфонокислотой определяли методом потенциометрического титрования сульфогрупп на рН-метре HI 2210 (HANNA Instruments) со стеклянным комбинированным электродом ЭСЛК-01.7 (АО «Аквилон») путем растворения навески сополимера в 0.1 М NaOH и последующим титрованием 0.1 М HCl. Состав сополимеров N-винилпирролидона

с 2-аминоэтилметакрилатом подтверждали определением содержания аминогрупп в образцах методом потенциометрического титрования 0.1 М HCl на электроде ЭСЛК-01.7.

Спектры ЯМР для синтезированных сополимеров регистрировали в D₂O на спектрометре Bruker Avance II — 400 (¹H 400.1 МГц, ¹³C, 100.6 МГц, Bruker). ИК-спектры сополимеров и полимерных форм рифабутин регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Bruker JFS 88 (Bruker) в таблетках с KBr, а также методом нарушенного полного внутреннего отражения. УФ-спектры записывали на спектрофотометре СФ-256 УВИ (ООО «ЛОМО Фотоника»).

Содержание рифабутин в полимерных формах определяли методом УФ-спектроскопии ($\lambda = 316$ нм) по калибровочному графику гидрохлорида рифабутин. Калибровочный график гидрохлорида рифабутин строили путем измерения оптической плотности его водного раствора при разных концентрациях.

Скорость высвобождения рифабутин из полимерных форм оценивали методом диализа через полупроницаемую мембрану с MWCO 1000. В левую ячейку установки для диализа вносили раствор полимерной формы определенной концентрации в модельной среде, представляющей собой фосфатный буфер с рН 7.4, соответствующий рН крови (7.35–7.45),** в правую ячейку вносили чистый буферный раствор. Установку помещали в термостат с температурой 37°C и отмечали время начала реакции. Затем через 2, 4, 6, 8, 24, 30, 48, 54, 72 ч отбирали пробы из правой ячейки и определяли в них содержание рифабутин методом УФ-спектроскопии при длине волны $\lambda = 316$ нм.

Антимикробактериальную активность полимерных форм рифабутин изучали методом двукратных разведений препарата при добавлении тест-культуры *M. smegmatis* ATCC-607, взятой из коллекции культур микроорганизмов кафедры вирусологии и микробиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова. Питательная среда Сотона (кат. номер M1276, HiMedia Laboratories Pvt.). После добавления микроорганизмов пробы инкубировали в течение трех недель при 37°C, мутность в пробирках с пробами и микроорганизмами определяли визуально по общепринятой методике.*** Микробная нагрузка составляла 10⁵ микробных клеток в миллилитре.

* * * Нормальная физиология. Ч. 1 / А. И. Кубарко, А. А. Семенович, В. А. Переверзев. М.: Высш. шк., 2013. С. 490.

* * * Навашин С. М., Фомина И. П. Справочник по антибиотикам. М.: Медицина, 1974. С. 36–45.

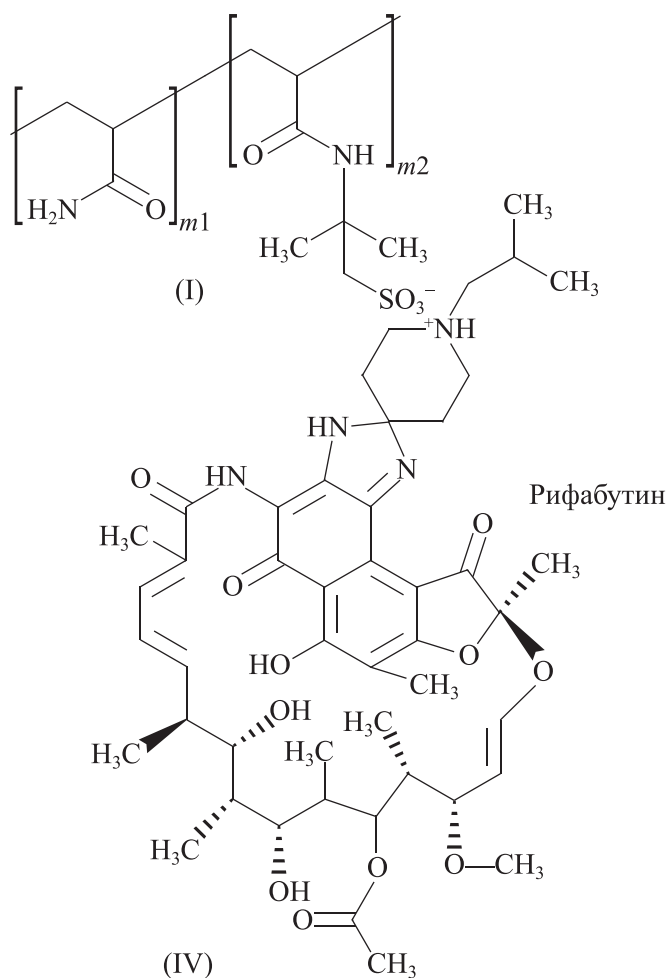
* <https://spsrch.cit.nih.gov/default.aspx/>

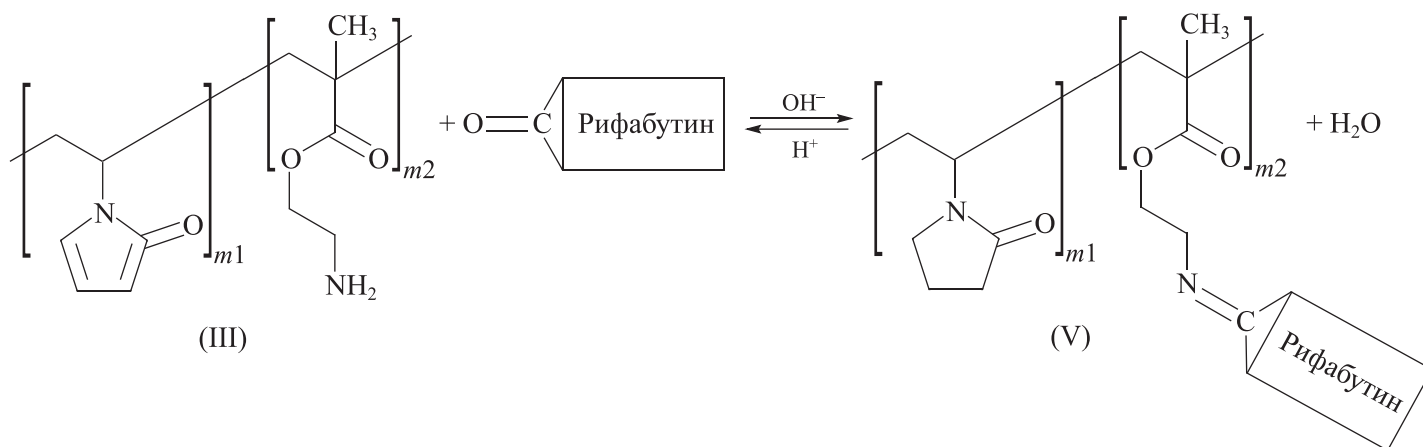
Обсуждение результатов

Предварительно осуществляли синтез сополимеров (I) и (II). Сополимеры (II) переводили в аминную форму посредством ионного обмена, получая таким образом целевой сополимер (III). Сополимеры (I), за счет наличия в своем составе сильнокислотных SO_3H -групп, могут образовывать ионные связи с веществами катионной природы. В молекуле рифабутина способны к ионизации азот имидазольного цикла и пиперидиновой группы, а также гидроксильная группа нафтольного цикла [12]. В водной среде могут образовываться дикатионная, катионная, цвиттер-ионная и анионная формы рифабутина, соотношение которых изменяется в зависимости от pH среды. При физиологическом значении pH преобладает цвиттер-ионная форма рифабутина [13], обуславливающая его гидрофобные свойства за счет наибольшей электронейтральности среди упомянутых ионизованных форм. Можно предположить, что образующиеся ионные связи между SO_3H -группами сополимера (I) и азотом пиперидиновой группы рифабутина будут стабилизироваться гидрофобными взаимодействия-

ми между основной углеводородной цепью полимера-носителя и рифабутином в цвиттер-ионной форме, приводя к получению полимерного комплекса. Возможность существования дикатионной формы рифабутина с ионизованными азотами как пиперидиновой группы, так и имидазольного кольца позволяет предположить образование также внутри- и межмолекулярных комплексов с полимером-носителем при взаимодействии искомой формы рифабутина с двумя сульфогруппами, находящимися как на одной, так и на разных макромолекулярных цепях.

В случае сополимеров (III) взаимодействие полимер–рифабутин осуществляется в результате образования азометиновых связей между первичными аминогруппами сополимера N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом и двумя стерически доступными карбонильными группами рифабутина. Азометиновая связь достаточно лабильна и обладает высокой способностью к гидролизу в кислых и нейтральных средах за счет протонирования атома азота, таким образом высвобождая действующее вещество из полимерной формы.





Сополимеры акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой и N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата (табл. 1) синтезировали путем гетерофазной и гомофазной сополимеризации мономеров соответственно, иницируемой 2,2'-азобисизобутиронитрилом, в атмосфере аргона в среде этилового и изопропилового спиртов при 60°C. Спирты использовали в качестве регулятора молекулярной массы сополимеров. Образцы, полученные в изопропиловом спирте, характеризовались меньшей молекулярной массой. Снижение молекулярной массы сополимеров также достигается уменьшением концентрации сомономеров в реакционной смеси. Сополимеры (I) получали с высоким выходом (>99%), в случае же сополимеров (II) наблюдается снижение выхода (33.9–65.6%) даже при увеличении

продолжительности синтеза, что связано с более низкой реакционной способностью винильного радикала по сравнению с акрилатным.

Содержание SO₃H-групп в образцах (I-1)–(I-5) составило 18.2–31.1 мол%, содержание NH₃Cl-групп в образцах (II-1), (II-3) — 17.8–20.8 мол%. Молекулярная масса полученных образцов составила 7.5–98 кДа.

Следует отметить, что молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение являются важными физико-химическими характеристиками получаемых носителей, что связано с ограничением по максимальному значению молекулярной массы небiodeградируемых носителей, к которым относятся искомые карбоцепные сополимеры, равному 50 кДа [14]. Использование высокомолекулярных карбоцепных

Таблица 1

Сополимеризация акриламида (M₁) с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой (M₂, I) и N-винилпирролидона (M₁) с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата (M₂, II) в спиртах в присутствии 2,2'-азобисизобутиронитрила (АИБН)

Образец	Состав реакционной смеси				Свойства сополимеров			
	[M ₂], мол%	[M ₁ + M ₂], мас%	[АИБН], мас%	растворитель	содержание звеньев мономера m ₂ , мол%	характеристическая вязкость [η] ^{30°C} _{1 н NaNO₃} ([η] ^{25°C} _{1 н NaAc}), дл·г ⁻¹	молекулярная масса M _n (M _{SD})	выход, %
(I-1)	20	15	4.5	Этанол	19.3	0.21	16000	99.6
(I-2)	20	15	0.5	Этанол	18.2	0.14	7500	99.9
(I-3)	20	30	4.5	Пропанол-2	22.4	0.22	16500	99.9
(I-4)	20	40	4.5	Этанол	18.5	0.38	36000	99.8
(I-5)	30	25	4.5	Этанол:пропанол-2 = 1:1	31.1	0.35	(33000)	99.4
(II-1)	15	10	4.5	Этанол	17.8	(0.30)	(35000)	65.6
(II-2)	20	10	4.5	Пропанол-2	—	(0.43)	98000	33.9
(II-3)	25	15	4.5	Пропанол-2	20.8	(0.13)	20100	48.7

полимеров может привести к их накоплению в органах и тканях, что зачастую вызывает нежелательные явления [15]. В то же время полимеры с молекулярной массой 10 кДа и ниже достаточно быстро выводятся из организма, не обеспечивая пролонгированного действия полимерной формы лекарственного средства.* Исходя из этого наибольший интерес в качестве носителей представляют сополимеры с молекулярной массой, равной 15 000–40 000 Да, и достаточно узким молекулярно-массовым распределением с целью недопущения накопления не выводящихся из кровотока высокомолекулярных фракций полимера.

Состав полученных сополимеров (III) (21.1–21.5 мол%, табл. 2) определен методом потенциометрического титрования NH₂-групп и хорошо соотносится с составом, полученным ранее для сопо-

лимеров (II), что может говорить о полном переводе сополимеров (II) в аминную форму.

В ИК-спектре сополимера (I-3) присутствует интенсивная полоса поглощения валентных колебаний карбонильной группы звена акриламида при 1660 см⁻¹ и деформационных колебаний амидной группы при 1206 см⁻¹, а также полоса поглощения, относящаяся к валентным колебаниям связи S=O, входящей в состав сульфогруппы звена 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислоты, при 1039 см⁻¹. Спектр ЯМР ¹³C образца (I-3) (рис. 1, а), D₂O, δ, м. д.: 24.09 (CH₃); 61.89 (CH₂); 175.47 (CONH); 175.53 (CONH₂).

В ИК-спектре сополимера (III-2) присутствуют полосы поглощения, относящиеся к валентным колебаниям карбонильной группы лактамного кольца звена N-винилпирролидона, при 1660 см⁻¹, а также валентных колебаний связей C=O и C—O—C сложноэфирной группы звена 2-аминоэтилметакрилата при 1722 и 1290 см⁻¹ соответственно. Спектр ЯМР ¹³C образца (III-2) (рис. 1, б), D₂O, δ, м. д.: 17.65

* Физиология человека. В 2 т. Т. 2 / В. М. Покровский, Г. Ф. Коротько. М.: Медицина, 1997. С. 149.

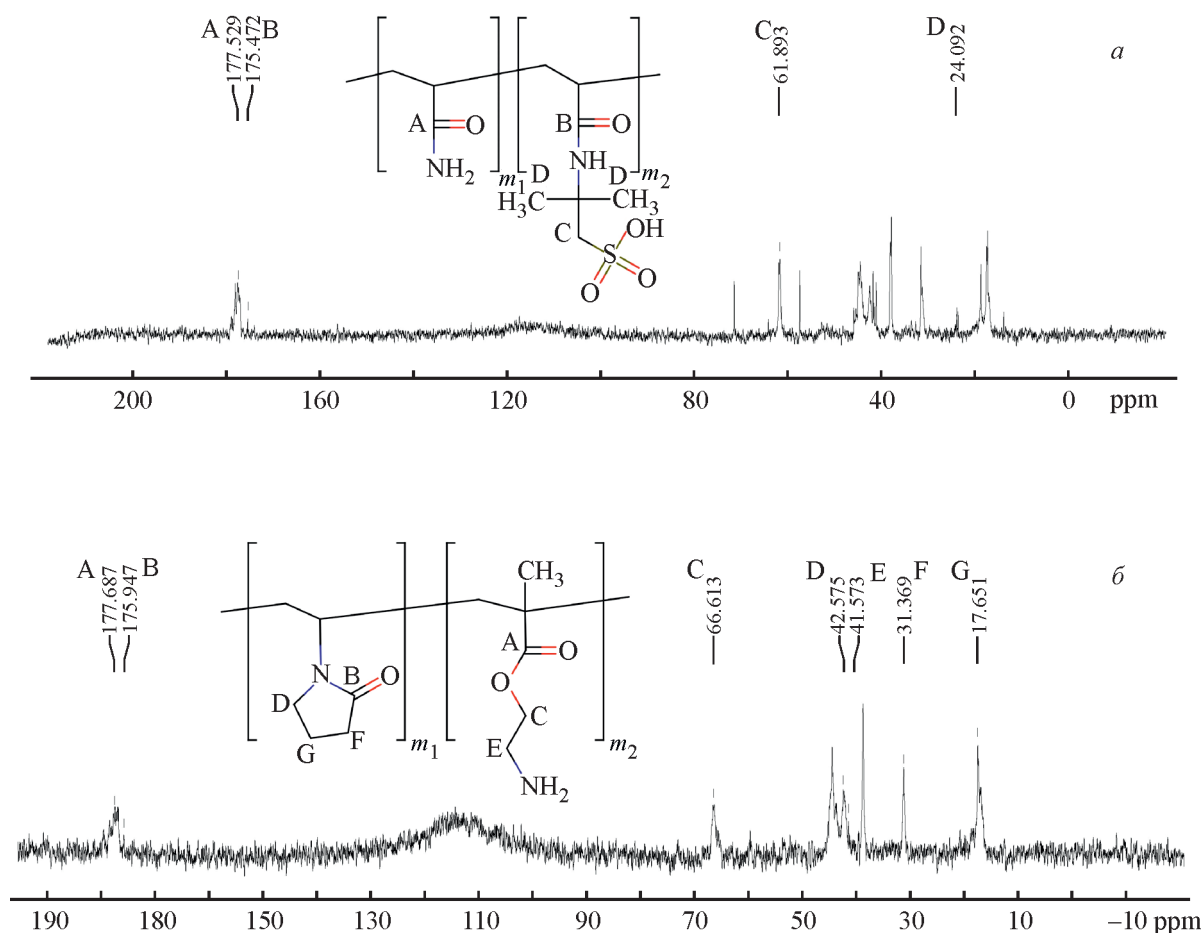


Рис. 1. Спектры ЯМР ¹³C в D₂O.

а — сополимер акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой (I-3), б — сополимер N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом (III-2).

Таблица 2

Характеристики сополимеров N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата до и после перевода их в аминную форму

Сополимеры N-винилпирролидона с гидрохлоридом 2-аминоэтилметакрилата		Сополимеры N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом		
образец	содержание NH ₃ Cl-групп, мол%	образец	содержание NH ₂ -групп, мол%	выход
(II-1)	17.8	(III-1)	21.1	75.6
(II-2)	Не определяли	(III-2)	53.1	79.7
(II-3)	20.8	(III-3)	21.5	94.1

(CH₂); 31.37 (CH₂); 41.57 (CH₂); 42.58 (CH₂); 66.61 (CH₂); 175.95 (CO); 177.69 (COOR).

Полимерные комплексы рифабутина и сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфо-кислотой получали в гетерофазных условиях, добавляя к водному раствору сополимера (I) нерастворимый в воде рифабутин, при комнатной температуре в течение 8 ч. Кетимин рифабутина и сополимера N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом получали взаимодействием водных растворов гидрохлорида рифабутина и сополимера (III-3) при pH 8.5–9.0 в течение 4 ч с постоянным перемешиванием (табл. 3). Предварительно для синтеза полимерного кетимина был получен гидрохлорид рифабутина взаимодействием содержимого капсулы препарата ФАРБУТИН® с 0.1 М HCl. Выход систем полимер-рифабутин составил 50.4–75.1%.

Содержание рифабутина в полимерных формах составило 14.1–43.4 мас%. Наибольшее содержание рифабутина обнаружено в образце (IV-4), что может быть связано с большей продолжительностью указанного в методике времени синтеза комплексов,

поэтому большее количество рифабутина связалось с полимером-носителем. Значения минимальной подавляющей концентрации исследованных полимерных систем низки, что с учетом их содержания в полимерной форме позволяет судить об их высокой антимикробактериальной активности в отношении культуры *M. smegmatis* (табл. 3).

Большее значение M_w полимерного комплекса рифабутина на основе сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфо-кислотой (IV-5) по сравнению с исходным полимером-носителем (I-3) (табл. 4) подтверждает комплексообразование. Значения M_w образца (I-3) сопоставимы с его M_n , полученной вискозиметрическим методом. Положительные, достаточно большие по величине значения второго вириального коэффициента A_2 свидетельствуют о хорошем термодинамическом качестве растворителя. Молекулярная дисперсность растворов полимерного комплекса и исходного носителя подтверждается унимодальными распределениями по гидродинамическим радиусам (рис. 2). Гидродинамические размеры образцов не зависят

Таблица 3

Характеристики полимерных форм рифабутина на основе сополимеров акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфо-кислотой (IV) и N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом (V)

Образец	На основе сополимера	Масса отфильтрованного осадка, г	Выход		Содержание рифабутина, мас%		Минимальная подавляющая концентрация, мкг·мл ⁻¹ <i>M. smegmatis</i> ATCC-607
			г	%	в реакционной смеси	в продукте	
(IV-1)	(I-5)	0.1190	0.358	50.4	30	25.4	0.07
(IV-2)	(I-5)	0.0817	0.409	61.0	25	21.6	0.30
(IV-3)	(I-5)	0.0507	0.420	67.2	20	17.7	0.15
(IV-4)	(I-2)	—	0.533	75.1	45	43.4	3.1
(IV-5)	(I-3)	0.2260	0.489	65.9	33	14.6	6.1
(V-1)	(III-3)	—	0.303	67.3	33	14.1	6.1
Гидрохлорид рифабутина (контроль)							1.5

Примечание. Исходное количество сополимеров акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфо-кислотой для приготовления водорастворимых полимерных комплексов рифабутина — 0.5 г.

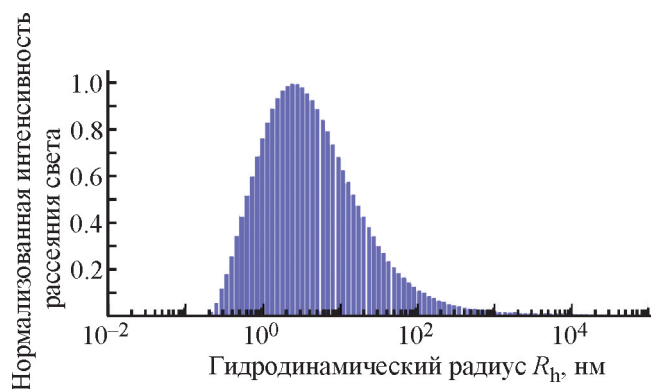


Рис. 2. Распределение по гидродинамическим размерам сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой (I-3) в 0.1 М NaCl.

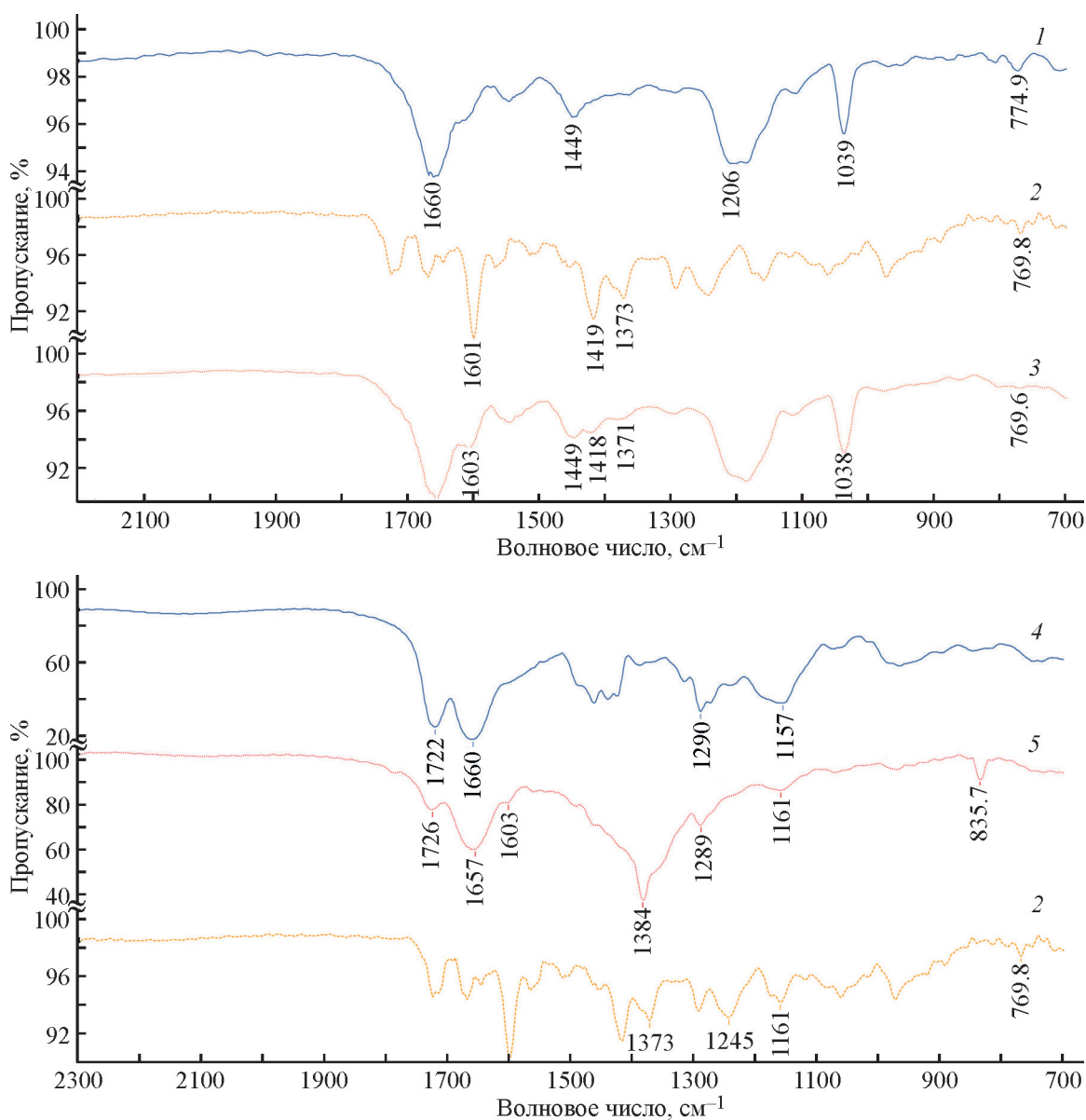


Рис. 3. ИК-спектры сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфокислотой (1), гидрохлорида рифабутина (2), полимерного комплекса рифабутина (3), сополимера N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом (4) и полимерного кетимина рифабутина (5).

Таблица 4

Молекулярно-массовые и гидродинамические характеристики образцов сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфоукислотой (I-3) и полимерного комплекса рифабутина на его основе (IV-5)

Образец	Растворитель	Инкремент показателя преломления dn/dc , $\text{см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$	Средневесовая молекулярная масса M_w , кДа	Второй вириальный коэффициент $A_2 \cdot 10^3$, $\text{см}^3 \cdot \text{моль} \cdot \text{г}^{-2}$	Гидродинамический радиус R_{h-D} , нм	Константа диффузии $D_0 \cdot 10^7$, $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$
(I-3)	0.1 M NaCl	0.1640	17.9	2.6	2.35 ± 0.1	10.3
(IV-5)		0.1647	19.1	1.9	2.6 ± 0.1	9.38

от концентрации растворов. Наблюдается корреляция полученных M_w и R_{h-D} исследуемых образцов. Гидродинамические радиусы R_{h-D} сополимера (2.35 ± 0.1 нм) и его комплекса с рифабутином (2.6 ± 0.1 нм) близки по значениям и не превышают размер пор базальной мембраны (3–6.4 нм*), что позволяет говорить о возможности выведения сополимера из крови посредством гломерулярной фильтрации, не приводя к накоплению носителя.

Строение полученных полимерных форм подтверждали методом ИК-спектроскопии. На ИК-спектре полимерного комплекса рифабутин [(IV-5) на основе сополимера (I-3), рис. 3] появились три полосы поглощения: 1603, 1418, 1371 см^{-1} , отсутствующие на спектре исходного сополимера, но проявляющиеся на спектре гидрохлорида рифабутин и относящиеся к деформационным колебаниям связей N—H, C—N и O—H соответственно.

На ИК-спектре полимерного кетимина рифабутин [(V-1) на основе сополимера (III-3), рис. 3] также можно зафиксировать наличие новых полос поглощения: 1603 см^{-1} , относящейся к деформационным колебаниям связей N—H, 1384 см^{-1} , соответствующей деформационным колебаниям CH_3 -групп, и 835 см^{-1} , характерной для деформационных колебаний связей C—N в составе ненасыщенных групп рифабутин. Определение полос поглощения колебаний азометиновой связи $\text{R}_2\text{C}=\text{NR}$ затруднено, что связано с перекрыванием полос поглощения искомой и карбонильных групп в составе как исходного сополимера, так и рифабутин.

При оценке кинетики высвобождения рифабутин (рис. 4) из полимерных форм определено, что азометиновая связь полимерного кетимина при гидролизе разрушается быстрее, чем ионная связь, что говорит о большей стабильности комплексов рифабутин и сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфоукислотой, а также пред-

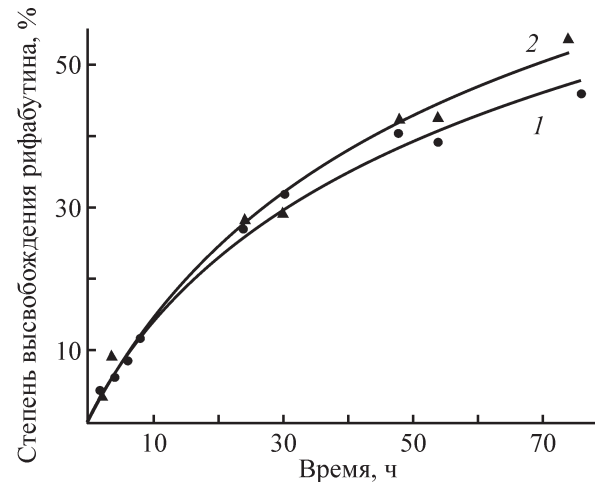


Рис. 4. Кратковременный диализ полимерных форм рифабутин в модельной среде: полимерный комплекс рифабутин (IV-5) (1), полимерный кетимин рифабутин (V-1) (2).

почтительности их использования в качестве средства с пролонгированным эффектом. В то же время степень высвобождения рифабутин из полимерной формы выше у его кетимина на основе сополимера N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом, что свидетельствует о достижении большей концентрации рифабутин в тканях и органах человека при использовании полимерного кетимина.

Обе полимерные формы обладают достаточно высокими степенями высвобождения действующего вещества, равными 26.9% за 24 ч и 45.9% за 76 ч для полимерного комплекса, а также 27.9% за 24 ч и 53.7% за 74 ч для полимерного кетимина, что позволит поддерживать необходимую концентрацию рифабутин для подавления роста микобактерий.

Выводы

Получены полимерные комплексы рифабутин на основе сополимеров акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфоукислотой с ионным типом связи полимер-рифабутин и поли-

* Физиология человека. В 2 т. Т. 2 / В. М. Покровский, Г. Ф. Коротько. М.: Медицина, 1997. С. 149.

мерный кетимин рифабутин на основе сополимера N-винилпирролидона с 2-аминоэтилметакрилатом с ковалентно связанным рифабутином, растворяющиеся в воде. Искомые полимерные формы обладали высокой антимикобактериальной активностью в отношении модельной культуры *M. smegmatis*, что свидетельствует об их потенциале в качестве препаратов парентерального введения при терапии туберкулеза. Значение гидродинамического радиуса R_{h-D} сополимера акриламида с 2-акриламидо-2-метилпропансульфонокислотой оказалось меньше размера пор базальной мембраны почечного клубочка. Этот факт свидетельствует о возможности выведения полимера-носителя из организма, что позволит избежать накопления бионеразлагаемого сополимера в органах и тканях.

Исследование кинетики высвобождения рифабутин из полученных полимерных форм выявило большую стабильность полимерного комплекса по сравнению с полимерным кетимином, достигаемую за счет влияния гидрофобных взаимодействий между рифабутином и гидрофобной частью полимера-носителя, что говорит о предпочтительности его использования в качестве средства пролонгированного действия. Обе системы полимер–антибиотик характеризуются достаточно высокими степенями высвобождения рифабутин из систем обоих типов, свидетельствующими об эффективности разрушения связей полимер–рифабутин в модельной среде и обеспечении высоких локальных концентраций препарата в тканях и органах организма человека.

Благодарности

Авторы статьи выражают благодарность коллективу кафедры микробиологии и вирусологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова, оказавшему помощь в проведении микробиологических испытаний полученных полимерных форм; профессору, д.х.н. Н. А. Лаврову за критический анализ текста статьи.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122012100171-8 «Наноструктурирование и модификация биологически активных веществ синтетическими и природными полимерами»).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Информация об авторах

Вагин Артём Андреевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3891-3601>

Борисенко Максим Сергеевич, к.х.н., н.с. лаборатории гидрофильных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9335-5932>

Соловский Михаил Васильевич, д.х.н., в.н.с. лаборатории гидрофильных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7950-0873>

Тарабукина Елена Борисовна, к.ф.-м.н., доцент, с.н.с. лаборатории молекулярной физики полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0656-6673>

Список литературы

- [1] Skinner M. H., Hsieh M., Torseth J., Pauloin D., Bhatia G., Harkonen S., Merigan T. C., Blaschke T. F. Pharmacokinetics of rifabutin // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989. V. 33. N 8. P. 1237–1241. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.8.1237>
- [2] Панарин Е. Ф., Лавров Н. А., Соловский М. В., Шальнова Л. И. Полимеры-носители биологически активных веществ. СПб: ЦОП «Профессия», 2014. С. 304.
- [3] Соловский М. В., Ерошкин М. Ю., Ерошкина Е. М., Смирнова М. Ю., Белохвостова А. Т. Исследование токсичности *in vitro* и *in vivo* полиакриламида и некоторых анионных сополимеров акриламида // *Токсикол. вестн.* 2012. Т. 113. № 2. С. 24–26.
- [4] Ананьева Е. П., Баранов С. С., Караваева А. В., Борисенко М. С., Соловский М. В., Захарова Н. В., Праздников Т. А., Тарабукина Е. Б. Полимерные комплексы офлоксацина и их антибактериальная активность // *Антибиот. химиотер.* 2014. Т. 59. № 11–12. С. 3–6.
- [5] Lee J. H., Kopeckova P., Kopecek J., Andrade J. D. Surface properties of copolymers of alkyl methacrylates with, methoxy (polyethylene oxide) methacrylates and their application as protein-resistant coatings // *Biomaterials*. 1990. V. 11. N 7. P. 455–464. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(90\)90058-x](https://doi.org/10.1016/0142-9612(90)90058-x)
- [6] DeFife K. M., Shive M. S., Hagen K. M., Clapper D. L., Anderson J. M. Effects of photochemically immobilized polymer coatings on protein adsorption, cell adhesion, and the foreign body reaction to silicone

- rubber // *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. V. 44. N 3. P. 298–307. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19990305\)44:3<298::aid-jbm8>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19990305)44:3<298::aid-jbm8>3.0.co;2-n)
- [7] *Bianculli R. H., Mase J. D., Schulz M. D.* Antiviral polymers: Past approaches and future possibilities // *Macromolecules*. 2020. V. 53. N 21. P. 9158–9186. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01273>
- [8] *Gantlett K. E., Weber J. N., Sattentau Q. J.* Synergistic inhibition of HIV-1 infection by combinations of soluble polyanions with other potential microbicides // *Antiviral Res.* 2007. V. 75. N 3. P. 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.03.004>
- [9] *Farag R. K., Atta A. M., Labena A., AlHawari S. H., Safwat G., Diab A.* Antibacterial and anti-fungal biological activities for acrylonitrile, acrylamide and 2-acrylamido-2-methylpropane sulphonic acid crosslinked terpolymers // *Materials*. 2020. V. 13. N 21. P. 4891–4905. <https://doi.org/10.3390/ma13214891>
- [10] *Павлов Г. М., Панарин Е. Ф., Корнеева Е. В., Курочкин К. В., Байков В. Е., Ушакова В. Н.* Гидродинамические свойства молекул поливинилпирролидона по данным седиментационно-диффузионного анализа и вискозиметрии // *Высокомолекуляр. соединения*. 1990. Т. 32А. № 6. С. 1190–1196.
- [11] *Цветков В. Н.* Жесткоцепные полимерные молекулы. Л.: Наука, 1986. С. 70.
- [12] *Шакина Ю. Н., Востриков В. В., Сорокоумова Г. М., Селищева А. А., Швец В. И.* Зависимость свойств рифабутина и его включения в липосомы от pH среды // *Антибиот. химиотер.* 2005. Т. 50. № 7. С. 3–7.
- [13] *Востриков В. В., Селищева А. А., Сорокоумова Г. М., Швец В. И.* Коэффициент распределения рифабутина и его ионизированных форм в различных системах // *Биол. мембраны*. 2007. Т. 24. № 2. С. 169–174.
- [14] *Платэ Н. А., Васильев А. Е.* Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986. С. 13.
- [15] *Фрисс С. А.* К вопросу о применении полимерных соединений и их влиянии на организм человека // *Медицинская экспертиза и право*. 2011. № 6. С. 9–11.
-