

І. А. Дронь¹, С. І. Винницька¹, В. В. Олекса, С. В. Хом'як², Д. Д. Остапів³

Національний університет „Львівська політехніка”,

¹кафедра органічної хімії,²кафедра технології біологічно-активних сполук,

фармації та біотехнології,

³Інститут біології тварин НААН

СИНТЕЗ І ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ПЕГІЛЬОВАНИХ ЕНРОФЛОКСАЦИНІВ

© Дронь І. А., Винницька С. І., Олекса В. В., Хом'як С. В., Остапів Д. Д., 2018

Розроблено методику введення фрагментів поліетиленгліколю у структуру антибактеріального препарату енрофлоксацину через проміжне утворення хлорангідриду. Важливо за такої модифікації, щоб пегільований енрофлоксацин мав принаймні не менші бактерицидні властивості, ніж вихідний антибіотик. Антибактеріальну активність пегільованих сполук досліджено методом серійних розведень з використанням культури *Pseudomonas aeruginosa*. Показано, що активність сполук енрофлоксацину, ковалентно з'єднаних з поліетиленгліколем, є вищою порівняно з вихідним антибіотиком.

Ключові слова: енрофлоксацин, антибіотик, антибактеріальна активність, ветеринарія, поліетиленгліколь.

I. A. Dron, S. I. Vynnytska, V. V. Oleksa, S. V. Khomyak, D. D. Ostapiv

SYNTHESIS AND STUDY OF THE ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF PEGYLATED ENROFLOXACINES

© Dron I. A., Vynnytska S. I., Oleksa V. V., Khomyak S. V., Ostapiv D. D., 2018

The method of insert of polyethylene glycol fragments into the antibiotic enrofloxacin via the intermediate formation of its chloranhydride was developed. It is important for such a modification that the obtained PEGylated enrofloxacin hadn't, at least, less bactericidal properties than the original antibiotic. Antibacterial activity of PEGylated compounds was investigated by serial dilutions using *Pseudomonas aeruginosa* culture. It has been shown that the activity of the enrofloxacin covalently bonded to the polyethylene glycol is higher compared to the initial antibiotic.

Key words: enrofloxacin, antibiotic, antibacterial activity, veterinary, polyethylene glycol.

Постановка проблеми. Актуальною проблемою у медицині є феномен антибіотикорезистентності – розвитку стійкості штаму збудників інфекції до дії одного або кількох антибактеріальних препаратів. Лікарські препарати, які ще кілька років тому були ефективними, на жаль, сьогодні неефективні та їх використання обмежується. У зв'язку з цим доцільними сьогодні є розроблення і впровадження нових антибіотиків або покращення транспорту вже відомих препаратів у клітину. Пегілювання є одним з найуспішніших шляхів поліпшення доставки у клітину терапевтичних молекул, таких як білки, макромолекулярні носії, лікарські засоби, олігонуклеотиди та інші біомолекули [1, 2]. Перспективним є дослідження процесу введення

фрагментів поліетиленгліколя (PEG) у структуру вже відомих антибактеріальних препаратів зі збереженням їх біологічної активності.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Одним зі шляхів підвищення ефективності лікарських препаратів є хімічна модифікація їх молекул, що досягається приєднанням вихідної молекули до поліетиленгліколю. Подібна хімічна модифікація фармакологічних препаратів пептидної структури спрямована на покращення їх переносимості, зниження імуногенності, підвищення періоду напіввиведення препаратів [1]. У [2] показано, що пегілювання збільшує розмір і молекулярну масу кон'югованих біомолекул, підвищує їх фармакокінетику, фармакодинаміку, розчинність у воді, захист від ферментативної деградації, зниження кліренсу у нирках і обмеження імуногенних та антигенних реакцій. Досліджено також процес пегілювання ліпосом, внаслідок якого покращується не тільки стабільність і час циркуляції, але й “пасивна” орієнтація на пухлинні тканини, що здатна покращувати терапевтичний ефект і зменшувати токсичність інкапсульованого препарату. Під час терапії раку деякі пегілювані білки, зокрема ферменти, можуть успішно використовуватись внаслідок їх здатності зменшувати побічні ефекти хіміотерапії [3].

У [4] описано метод одержання нового біобезпечного амфіфільного полімеру mPEG-OA, де олеїнова кислота (OA) була з'єднана з монометоксиполіетиленгліколем (mPEG). Ванкоміцин, інкапсульований у mPEG-OA, визнаний перспективним наноантибіотиком проти метицилін-резистентних *S. aureus* інфекцій, антибактеріальна активність якого *in vitro* виявилась у 42 рази вищою порівняно з вихідним ванкоміцином. У [5] порівнюється ефективність препарату офлоксацину (OFX), що поставляється у формі вільного лікарського засобу та наночастинок mPEG-PLGA (диблок-полімер метоксиполіетиленгліколь-блок-полі(молочна-ко-гліколева кислота) з інкапсульованим лікарським засобом на бактеріальне поглинання та антибактеріальну активність. Оскільки PEG має здатність зв'язувати ДНК [6, 7], автори вважають, що, використовуючи наночастинок mPEG-PLGA, можна підвищити ефективність антибіотика. Показано, що антибактеріальна активність OFX-mPEG-PLGA щодо різних бактеріальних збудників людини (*Escherichia coli* та ін.) значно вища порівняно з неpegілюваним OFX-PLGA. У [8] описано модифікацію антибіотиків ципрофлоксацину та норфлоксацину за допомогою PEG, що приводить до одержання препаратів з кращою антимікробною активністю, ніж у вихідних сполук. У [9] повідомляється про збільшення активності пегілюваних інтерферонів, які показують високий рівень антивірусної, антипроліферативної та імуномодулюючої активності на різних типах клітин. У [10] показано, що ліпосомна форма пегілюваного доксорубіцину, яка може бути використана для лікування метастатичного раку молочної залози, має таку саму ефективність, як і вихідний доксорубіцин, але забезпечує значно менший ризик кардіотоксичності.

Мета роботи – розробити умови модифікації енрофлоксацину поліетиленгліколями з різною молекулярною масою (200, 400 г/моль), дослідити антибактеріальну активність пегілюваних антибіотиків.

Виклад основної інформації. Об'єктом досліджень був обраний енрофлоксацин (рис. 1), антимікробний засіб з групи фторхінолонів третього покоління, що є похідними 4-хінолону і містять у своєму складі піперазиновий цикл та атом фтору, наявність якого істотно розширює спектр їх антибактеріальної дії. Енрофлоксацин сьогодні успішно використовується у ветеринарній медицині для лікування багатьох бактеріальних захворювань [11]. Наявність у молекулі енрофлоксацину реакційноздатної карбоксильної групи робить можливим проведення модифікації його структури з одержанням нових сполук.

Під час створення методу одержання таких модифікованих енрофлоксацинів розглядалися такі реакції: пряма естерифікація карбоксильних груп, естерифікація за реакцією Стегліха та одержання естерів через проміжне утворення хлорангідридів. Вихід продукту за прямої естерифікації та за реакцією Стегліха не перевищував 20–25 %, при цьому спостерігали велику

кількість продуктів осмолення (у разі прямої естерифікації) та продуктів перегрупування (у разі реакції Стегліха), що унеможливило виділити пегільований антибіотик.

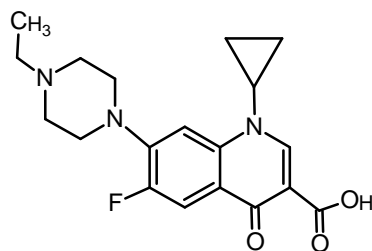


Рис. 1. 1-циклопропіл-6-фтор-7-(4-етил-1-піперазиніл)-1,4-дигідро-4-оксо-3-хінолін-карбонова кислота (енрофлоксацин)

Отже, встановлено, що синтез пегільованого енрофлоксацину доцільно проводити через проміжне утворення його хлорангідриду у дві стадії.

На *першій стадії* одержували хлорангідрид енрофлоксацину (рис. 2) за методикою, розробленою з урахуванням особливостей перебігу цієї реакції.

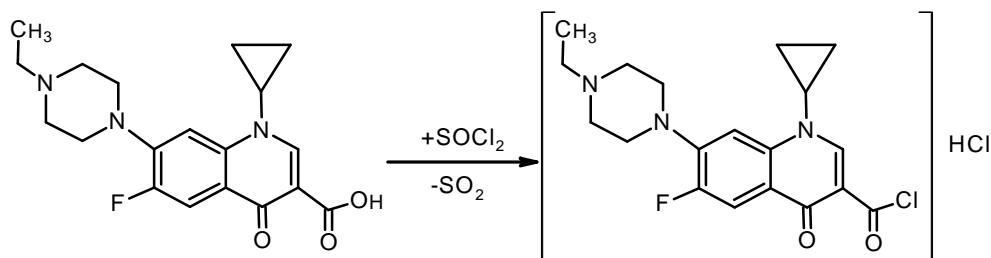


Рис. 2. Одержання хлорангідриду 1-циклопропіл-6-фтор-7-(4-етил-1-піперазиніл)-1,4-дигідро-4-оксо-3-хінолінкарбонової кислоти

Встановлено, що на перебіг реакції (рис. 2) істотно впливає порядок завантаження реагентів: за додавання розчину тіонілхлориду до розчину енрофлоксацину у диметилформаміді (ДМФА) спостерігали випадіння антибіотика в осад, що перешкождало подальшому утворенню продукту.

Наведемо оптимізовану методику синтезу хлорангідриду енрофлоксацину. До тіонілхлориду (0,53 г; 0,0044 моль), розчиненого в 20 мл ДМФА за температури 313 К та перемішування додавали по краплях енрофлоксацин (1г; 0,0028 моль), розчинений у 40 мл ДМФА. Нагрівали до температури 323 К і витримували реакційну суміш за такої температури і постійного перемішування, впродовж 5 год. Після цього суміш витримували у вакуумі водоструминного насоса для видалення летких побічних продуктів реакції. Одержаний хлорангідрид з реакційної суміші не виділяли.

На *другій стадії* одержували пегільовані енрофлоксацини з різною довжиною оксиметиленового фрагмента (рис. 3).

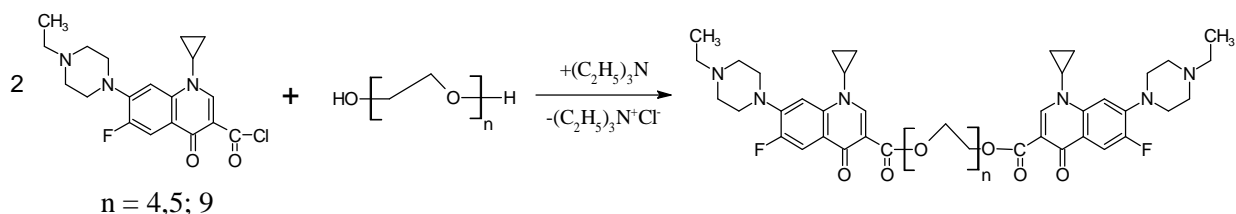


Рис. 3. Одержання енрофлоксацину, модифікованого різними PEG (200, 400)

До реакційної суміші після першої стадії під час перемішування та кімнатної температури додавали по краплях триетиламін (8,43 г; 0,0835 моль). Нагрівали до температури 313 К, додавали по краплях при перемішуванні 0,0014 моль поліетиленгліколю (0,28 г – у разі використання PEG-200; 0,56 г – PEG-400), витримували за температури 343 К протягом 10–12 год. Далі реакційну суміш упарювали у вакуумі, промивали 5 % розчином карбонату натрію, водну фазу екстрагували бутаном. З одержаної органічної фази відганяли розчинник, сушили у вакуумі до постійної маси. Вихід пегільованих енрофлоксацинів становив 70 % (у разі використання PEG-200); 86 % (PEG-400).

За перебігом реакції утворення пегільованого енрофлоксацину відслідковували за допомогою ІЧ-спектроскопії. В ІЧ-спектрі енрофлоксацину спостерігається багато характерних смуг поглинання. Це сигнал від карбонілу карбоксильної групи (валентні коливання, 1720 см⁻¹, с.), карбонілу 4-оксохінолінового кільця (валентні, 1628 см⁻¹, с.), коливання хінолінового кільця (1504 і 1468 см⁻¹, ср, деф.) та коливання третинних амінів (1388 см⁻¹, сер., деф.). Важливими для контролю реакції є деформаційні коливання метиленових груп циклопропанового кільця, які проявляються у спектрі енрофлоксацину при 1024 см⁻¹ смужкою середньої інтенсивності. Спектр пегільованого енрофлоксацину відрізняється від спектра вихідної сполуки появою смуг, характерних для поліоксиетиленового ланцюга: смуга поглинання метиленових груп (1496 см⁻¹, сер, деф.) та коливання естерного зв'язку при 1124 см⁻¹ (сер., деф.). Про входження пегільованих фрагментів у структуру молекули енрофлоксацину через формування естерної групи свідчить про зміщення смуги поглинання карбонілу карбоксильної групи з 1720 до 1744 см⁻¹ та поява у спектрі характерних сигналів деформаційних коливань цієї групи (1392 та 1044 см⁻¹, сер, шир, деф.). Важливим є збереження у спектрі (з цією ж відносною інтенсивністю до сигналу карбонільної групи кільця) смуги поглинання метиленових груп циклопропанового кільця (1024 см⁻¹), що свідчить про те, що запропонована методика одержання пегільованого енрофлоксацину перебігає без розкриття цього кільця. Чистота продуктів за даними високоефективної рідинної хроматографії становила 98 %.

Результати і обговорення. Пегільовані енрофлоксацини, одержані за наведеною методикою, містять у своїй структурі фрагменти антибактеріального препарату енрофлоксацину та поліоксиетиленові ланцюги (рис. 3). Важливо за такої модифікації, щоб одержаний пегільований енрофлоксацин проявляв принаймні не менші бактерицидні властивості, ніж вихідний антибіотик, тому необхідно було дослідити антибактеріальну активність пегільованих препаратів.

Антибактеріальну активність досліджували з використанням модельної сполуки енрофлоксацин PEG-400 методом серійних розведень, де вихідні розчини досліджуваних сполук розводили дистильованою водою до серій розчинів, у яких відносна концентрація енрофлоксацину та енрофлоксацин PEG-400 становила: 0,19–50 мкг/мл (таблиця) [12].

Антибактеріальна активність вихідного антибіотика та енрофлоксацину, модифікованого PEG-400

| № | Концентрація антибіотика (мкг/мл) | Концентрація мікробних клітин, МФ | | | |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | | енрофлоксацин | | енрофлоксацин – PEG-400 | |
| | | 22 год | 44 год | 22 год | 44 год |
| 1 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 12,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 6,25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 3,12 | 0,06 | 0,06 | 0 | 0 |
| 6 | 1,56 | 0,2 | 0,63 | 0 | 0 |
| 7 | 0,78 | 0,66 | 2,20 | 0 | 0 |
| 8 | 0,39 | 1,7 | 5,16 | 0,03 | 0,06 |
| 9 | 0,19 | 2,33 | 5,7 | 0,1 | 0,16 |
| 10 | 0 | 4,53 | 7,23 | 4,2 | 6,83 |

До кожного з розчинів додавали культуру *Pseudomonas aeruginosa* та поміщали у термостат на 44 год інкубації за температури 310 К. Після 22 та 44 год інкубації у кожному розчині за

допомогою денсіламетра вимірювали кількість клітин *Pseudomonas aeruginosa*, виражених в одиницях Макфарланда $1\text{МФ} = 300$ млн мікробних клітин.

Згідно з результатами визначення антибактеріальної активності найменша концентрація антибактеріального препарату, що запобігає росту мікроорганізмів (т. зв. мінімальна інгібуюча концентрація – МІК), енрофлоксацину після 22 год інкубації дорівнює 6,25 мкг/мл, у той час, як для пегільованого антибіотика МІК становить 0,78 мкг/мл. Після 44 год інкубації також найбільшу антибактеріальну активність має енрофлоксацин – PEG-400, МІК якої є незмінною – 0,78 мкг/мл та у 8 разів меншою порівняно з вихідним антибіотиком, що свідчить про дуже високу антимікробну активність пегільованого енрофлоксацину. Ймовірно, таке збільшення антибактеріальної активності може бути зумовлене наявністю у структурі модифікованого енрофлоксацину ланок поліетиленгліколю, який за деякими літературними даними [13] може впливати на проникність мембран збільшенням кількості пор, тим самим збільшуючи поглинання антибіотика клітинами. Окрім того, є дані про здатність PEG зв'язувати ДНК, що, своєю чергою, може підсилювати антибіотичну активність модифікованого антибіотика, оскільки принцип дії фторхінолонів полягає саме у порушенні синтезу ДНК інгібуванням ферментів ДНК-гірази та топоізомерази II [5].

Отже, показано, що найвищу антибактеріальну активність мають сполуки енрофлоксацину, ковалентно з'єднаного з поліетиленгліколем, що може бути зумовлено наявністю у його складі фрагментів PEG, здатного впливати на проникність мембран, тим самим збільшуючи поглинання антибактеріального препарату клітинами.

Висновки. Запропоновано метод одержання модифікованих енрофлоксацинів з поліоксietenіленовими фрагментами різної довжини. Показано, що одержані сполуки мають у 8 разів вищу антибактеріальну активність порівняно з вихідним антибіотиком.

1. Никитин И. Г., Байкова И. Е., Гогова Л. М. Пегилированные лекарственные препараты: современное состояние проблемы и перспективы // *Лечебное дело*. – 2005. – № 4. – С. 18–24. 2. Paola Milla, Franco Dosio and Luigi Cattell. PEGylation of proteins and liposomes, a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery // *Current Drug Metabolism*. – 2012. – Vol.13, 1. – P. 105–119(15). 3. Gianfranco Pasut, Mauro Sergi, Francesco M. Veronese. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60. – 2008. – P. 69–78. 4. Omolo, Rahul S. Kalhapure Mahantesh Jadhav, Sanjeev Rambharose, Chunderika Mocktar. Valence M. K. Ndesendo, Thirumala Govender. Pegylated oleic acid: A promising amphiphilic polymer for nanoantibiotic Delivery // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2017. – 112. – P. 96–108. 5. Gregory Marslin, Ann Mary Revina, Vinoth Kumar Megraj Khandelwal, Krishnamoorthy Balakumar, Caroline J. Sheeba, Gregory Franklin. PEGylated ofloxacin nanoparticles render strong antibacterial activity against many clinically important human pathogens // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2015. – Vol. 132. – P. 62–70. 6. N. Elmarzugli, T. Adali, A. Bentaleb, E. Keleb, A. Mohamed, A. Hamza. Spectro-scopical characterization of PEG–DNA biocomplexes by FTIR // *J. Appl. Pharm. Sci.* – 2014. – 4 (08). – P. 6–10. 7. E. Froehlich, J.S. Mandeville, C.M. Weinert, L. Kreplak, H.A. Tajmir-Riahi // *Bundling and aggregation of DNA by cationic dendrimers // Biomacromolecules*. – 2011. – 12. – P. 511–517. 8. Gabor Pinter, Pal Horvath, Sandor Bujdoso, Ferenc Sztaricskai, Sandor Keki, Miklos Zsuga, Szilvia Kardos, Ferenc Rozgonyi and Pa'l Herczegh. Synthesis and antimicrobial activity of ciprofloxacin and norfloxacin permanently bonded to polyethylene glycol by a thiourea linker // *The Journal of Antibiotics*. – 2009. – 62. – P. 113–116. 9. Yu-Sen Wang, Stephen Youngster, James Bausch, Rumin Zhang, Charles McNemar, and Daniel F. Wyss Identification of the Major Positional Isomer of Pegylated Interferon Alpha // *Biochemistry*. – 2000. – 39. – P. 10634–10640. 10. Christian F. Jehn, Philipp Hemmati, Silvia Lehenbauer-Dehm, Sherko Kummel, Bernd Flath, Peter Schmid. Biweekly Pegylated Liposomal Doxorubicin (Caelyx) in Heavily Pretreated Metastatic Breast Cancer: A Phase 2 Study // *Clinical Breast Cancer*. – Vol. 16, No. 6. – P. 514. 11. Tessa Trouchon, Sébastien Lefebvre. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use, Scientific Research Publishing Inc. - USC 1233 INRA. - *Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon*. – Marcy l'Etoile. – France, 2016. – P. 20. 12. Ковалев В. Ф., Волков И. Б., Виолин Б. В. и др. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии. – М.: Агропромиздат, 1988. – 223 с. 13. B. Chakrabarty, A.K. Ghoshal, M.K. Purkait. Effect of molecular weight of PEG on membrane morphology and transport properties // *Journal of Membrane Science*. – 2008. – Vol. 309. – P. 209–221.