

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 54.05.7

ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ СОПОЛИМЕРОВ N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА И N-ОКСИДА 2-МЕТИЛ- 5-ВИНИЛПИРИДИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ИММУНОАДЬЮВАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

**Е.В. Ворфоломеева[@], ведущий инженер, С.А. Кедик,
заведующий кафедрой, А.В. Панов, доцент, Д.В. Васильева, студент**

*Кафедра биотехнологии и промышленной фармации
МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия*

[@] Автор для переписки, e-mail: vorfolomeeva.e.v@yandex.ru

Синтезированы частично и полностью N-окисленные сополимеры N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина. Выявлено влияние pH среды на протекание реакции N-окисления. Проведены биологические испытания полученных субстанций.

Ключевые слова: N-винилпирролидон, 2-метил-5-винилпиридин, N-оксид, иммуноаdjувантная активность.

PREPARING WATER-SOLUBLE N-VINYLPYRROLIDONE-2-METHYL- 5-VINYLPYRIDINE N-OXIDE COPOLYMERS AND RESEARCH ON THEIR IMMUNOADJUVANT ACTIVITY

E.V. Vorfolomeeva[@], S.A. Kedik, A.V. Panov, D.V. Vasilyeva

*M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies,
Moscow, 119571 Russia*

[@] Corresponding author e-mail: vorfolomeeva.e.v@yandex.ru

In this work partially and completely N-oxidized N-vinylpyrrolidone-2-methyl-5-vinylpyridine copolymers were synthesized. The influence of pH on the reaction course was studied. For obtaining the copolymer N-oxidized by 100% it is necessary to carry out the reaction in an acetate buffer solution. If obtaining the partially N-oxidized copolymer, a citrate buffer solution should be used, which allows carrying out the reaction at a smaller speed and as a result enables to stop the reaction in the necessary range. The dependence of biological activity on the extent of N-oxidation was studied. An immunostimulating effect of N-vinylpyrrolidone-2-methyl-5-vinylpyridine N-oxide copolymers with various extent of N-oxidation was revealed in vivo with an anthrax vaccine.

Keywords: N-vinylpyrrolidone, 2-methyl-5-vinylpyridine, N-oxide, immunoadjuvant activity.

Введение

Сополимеры N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина используют в качестве иммуноаdjувантов для вакцин [1]. Показано, что с ростом числа пиридиновых звеньев биологическая активность данного сополимера возрастает, однако при этом снижается его растворимость в воде. Это явление связано с повышением гидрофобности молекулы сополимера из-за увеличения в ней числа пиридиновых звеньев. Одним из способов увеличения растворимости является модификация сополимера

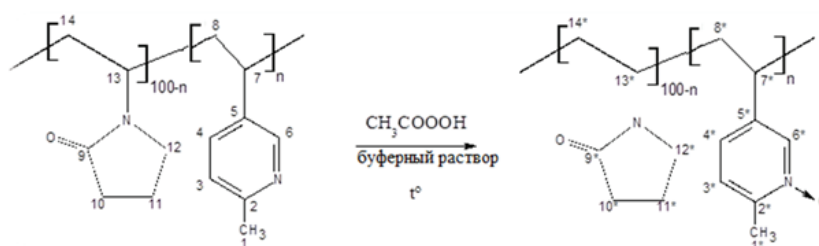
путем N-окисления, за счет увеличения полярности пиридиновых фрагментов. В работе [2] было показано, что N-оксиды пиридина также обладают собственной биологической активностью. Отмечено, что N-оксиды могут активировать синтез РНК и белков, влиять на мембранные процессы, активный транспорт ионов и систему регуляции H⁺-АТФ-азы и Na⁺, K⁺-АТФ-азы [3]. Было высказано предположение, что N-оксиды сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина также будут обладать биологической активностью и лучшей растворимостью в воде по сравнению с исходным сополимером.

В связи с этим, целью данной работы является получение водорастворимых сополимеров *N*-винилпирролидона и *N*-оксида 2-метил-5-винилпиридина и исследование их иммуноадъювантной активности *in vivo* на вакцине против сибирской язвы.

Результаты и их обсуждение

Для проведения модификации сополимера *N*-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (средневязкостная молекулярная масса 29 кДа [4], содержание пиридиновых звеньев 37%) в качестве среды первоначально была выбрана уксусная кислота с добавлением пероксида водорода. Пероксид водорода не реагирует с азотсодержащими гетероароматиче-

скими соединениями, окисление обычно включает промежуточную стадию образования надкислоты. В присутствии уксусной кислоты пероксид водорода находится в равновесии с надуксусной кислотой, что приводит к *N*-оксидированию 2-метил-5-винилпиридина [5]. Ранее было показано, что атаку на атом азота пиридина проводят два электрона наиболее дальнего атома кислорода надуксусной кислоты [5]. Надуксусная кислота, образующаяся в процессе реакции, также позволяет провести *N*-оксидирование сополимера. Поэтому нами был предложен способ *N*-оксидирования, при котором окисляющим агентом выступает надуксусная кислота, а средой – водный буферный раствор (рисунок).



Химическая схема *N*-оксидирования сополимера *N*-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина в водном буферном растворе.

Степень полноты протекания реакции оценивали методом УФ-спектрофотометрии [6]. По данным [7], гипсохромный сдвиг полос поглощения обусловлен процессами кватернизации и *N*-окисления. Соплимер *N*-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина имеет максимум поглощения при длине волны $\lambda = 269$ нм, а его *N*-оксид – при 256 нм. Структуру веществ определяли методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии [8], этот метод также дополнял оценку полноты протекания реакции, и корреляция между методами составила более 0.9. Для соотношения сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР полимера и его *N*-оксида регистрировали двумерный спектр гетероядерной корреляции $\{^{13}\text{C};^1\text{H}\}$ HETCOR. Была предложена формула для расчета степени *N*-оксидирования:

$$C_{NO} = \frac{I_2^*}{I_2^* + I_2} \cdot 100\% \quad (1)$$

где I_2 – сигнал C_2 пиридинового кольца; I_2^* – сигнал C_2 пиридинового кольца в *N*-оксиде.

Оценивая влияние pH, было обращено внимание, что при проведении реакции в уксусной кислоте при добавлении надуксусной кислоты величина pH падает и при pH 2.5 реакция останавливается. В то же время было показано [9], что при значении pH 5.5 сополимер имеет низкую растворимость в данной среде. Отсюда были установлены пределы значений pH протекания реакции: от 2.5 до 5.5.

Поддержание оптимального значения pH возможно разными способами. Первый предложенный нами способ заключался в постоянном контроле pH реакционной среды с помощью микроэлектрода, и при достижении значений pH, близких к 2.5, корректировали его 1 М раствором NaOH. При проведении реакции в среде уксусной кислоты наблюдается ступенчатый характер зависимости, обусловленный добавлением раствора щелочи при остановке реакции (табл. 1).

Второй способ проведения реакции заключался в исходном растворении сополимеров в водных буферных растворах, приготовленных согласно Государственной фармакопее XII (часть 1, с. 445–447). Для растворения навески 1 г сополимера использовали по 2.3 мл следующих буферных растворов [10]: 0.25 М цитратный, pH 3.0; ацетатный, pH 4.4; фосфатный, pH 5.0.

N-Оксидирование проводили при термостатировании (50, 65 или 80°C) при постоянном перемешивании с помощью верхнеприводной мешалки, добавляя приготовленную по методике [11] надуксусную кислоту, по 100 мкл каждые 10 мин в течение всего времени синтеза. Этот способ не требует pH-контроля реакции. Результаты зависимости степени *N*-оксидирования от времени проведения реакции представлены в табл. 1. При использовании фосфатного буфера не происходит полного растворения сополимера, в цитратном буфере реакция замедляется, при растворении образца в ацетатном буфере реакция проходит достаточно быстро и pH системы удовлет-

воряет вышеуказанным требованиям.

Оценку растворимости полученных сополимеров проводили согласно требованиям Государствен-

ной фармакопеи (табл. 2). Видно, что при увеличении степени *N*-окисления растворимость сополимеров увеличивается.

Таблица 1. Зависимость степени *N*-окисления сополимера от времени проведения реакции

t, мин	Степень полноты реакции, %		
	Уксусная кислота	Ацетатный буферный раствор, рН 4.4	0.25 М цитратный буферный раствор, рН 3.0
0	0	0	0
10	39	18	8
20	70	46	8
30	73	66	15
40	85	77	38
50	85	100	54
60	85	100	54
70	100	100	54

Таблица 2. Изменение растворимости при модификации сополимеров *N*-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина

Степень <i>N</i> -окисления	0%	50%	100%
Растворимость в воде (ГФ XII, ч.1, с. 92)	Плохо растворим	Хорошо растворим	Очень хорошо растворим

Для оценки биологической активности полученных сополимеров были проведены сравнительные исследования иммуностимулирующего действия сополимеров *N*-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина, один из которых был *N*-окислен на 50% (далее обозначенный как «ИМ1»), а другой – на 100% («ИМ2»), в экспериментах *in vivo* на вакцине против сибирской язвы. Биологические испытания проводились на базе Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии).

Опытными животными выступали морские свинки. Исследования проводились после однократного введения субстанции за 14 дней до вакцинации и одновременно с вакцинацией, контролировали величину изменения средне-эффективной иммунизирующей дозы (ED_{50}), защищающей 50% привитых животных от заражения сибирезычным рефе-

ренс-штаммом 71/12 в дозе 200 LD_{50} . Метод основан на сравнительном определении 50%-ной средне-эффективной иммунизирующей дозы (ED_{50}) вакцины с применением и без применения иммуностимулятора.

Вначале была определена LD_{50} для морских свинок референс-заражающей культуры штамма 71/12. Величина LD_{50} рассчитывается по формуле Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \delta(\Sigma L_i - 0.5), \quad (2)$$

где: D_N – максимальная из испытанных доз;
 δ – логарифм кратности испытанных разведений;

L_i – отношение числа животных, павших от введения данной дозы, к общему числу животных, которым эта доза была введена.

Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Определение LD_{50} референс-заражающей культуры штамма 71/12

Доза заражения, тыс. спор	Кол. голов	Дни наблюдения (пало)										Пало/всего	L_i	ΣL_i
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
625	5	-	-	3	2							5/5	1	
125	5	-	-	3	2							5/5	1	
25	5	-	-	1	2	1						4/5	0.8	4.4
5	5	-	-	1	3	1						5/5	1	
1	5	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	2/5	0.4	
0.2	5	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1/5	0.2	

Таким образом, LD₅₀ штамма 71/12 для морских свинок составляет 1180 спор.

Далее была проведена количественная оценка иммуногенной активности сополимеров «ИМ1» и «ИМ2», входящих в состав вакцины из штамма

55-ВНИИВВиМ *B. anthracis*, на морских свинках по изменению величины средне-эффективной иммунизирующей дозы, защищающей 50% животных после введения 200 LD₅₀ референс-заражающей сибиреязвенной культуры. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4. Результаты определения ED50 на морских свинках

Группа животных	Доза, спор/см ³	Количество животных	Пало после вакцинации	Количество зараженных животных	Выжило/всего	ΣL _i	ED ₅₀ [*] тыс. спор
«ИМ1» за 14 дней до вакцинации	10 млн.	4	0	3	3/3	3.0	90.0
	2 млн.	4	1	3	3/3		
	400 тыс.	4	1	3	1/3		
	80 тыс.	3	0	3	2/3		
«ИМ2» за 14 дней до вакцинации	10 млн.	4	0	3	3/3	2.66	150.0
	2 млн.	4	0	3	3/3		
	400 тыс.	4	0	3	1/3		
	80 тыс.	3	0	3	1/3		
«ИМ1» одновременно с вакцинацией	10 млн.	4	1	3	3/3	3.33	50.0
	2 млн.	4	0	3	2/3		
	400 тыс.	4	0	3	3/3		
	80 тыс.	3	0	3	2/3		
«ИМ2» одновременно с вакцинацией	10 млн.	4	1	3	3/3	2.33	240.0
	2 млн.	4	1	3	2/3		
	400 тыс.	4	1	3	1/3		
	80 тыс.	4	1	3	1/3		
Вакцина	10 млн.	4	0	3	3/3	2.33	240.0
	2 млн.	4	0	3	2/3		
	400 тыс.	4	0	3	1/3		
	80 тыс.	3	0	3	1/3		
Контроль	-	3	-	3	0/3	-	-

Биологические испытания показали, что введение морским свинкам вакцины, содержащей в качестве иммуноадъюванта сополимер *N*-винилпирролидона и *N*-оксида 2-метил-5-винилпиридина со степенью *N*-оксидирования 50% в дозе 1 мг/кг как за 14 дней до вакцинации, так и одновременно с вакцинацией, снижает показатель ED₅₀ вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ *B. anthracis* в 2.66 и 4.8 раза, соответственно. Величина средне-эффективной дозы вакцины при применении сополимера *N*-винилпирролидона и *N*-оксида 2-метил-5-винилпиридина со степенью *N*-оксидирования 100% незначительно снижалась только в случае его введения за 14 дней до вакцинации (в 1.6 раза). Указанный факт свидетельствует о снижении иммуноадъювантной активности сополимера *N*-винилпирролидона и *N*-оксида 2-метил-5-винилпиридина с ростом степени *N*-оксидирования. Наиболее перспективным для применения в составе вакцин является сополимер *N*-винилпирролидона и *N*-оксида 2-метил-5-винилпиридина со степенью *N*-оксидирования 50%.

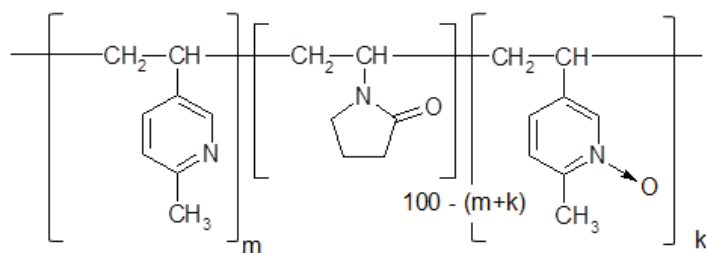
Экспериментальная часть

Объекты исследования

В качестве исходного соединения для реакции *N*-оксидирования использовали сополимер *N*-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина, синтезированный ранее по методике [1].

В работе использовались следующие реактивы: ледяная уксусная кислота (CH₃COOH) х. ч. («Химмед»); пероксид водорода (H₂O₂) 37% раствор («Химмед»); надуксусная кислота (CH₃COOOH) была синтезирована по методике, описанной в [11]; 0.25 М цитратный буферный раствор, pH 3.0; ацетатный буферный раствор, pH 4.4; фосфатный буферный раствор, pH 5.0 были приготовлены в соответствии с [10].

Конечный продукт, используемый для биологических испытаний, представлял собой сополимер *N*-винилпирролидона и *N*-оксида 2-метил-5-винилпиридина с содержанием мономерных звеньев (m+k) 37%:



Методы исследования

Диализ сополимеров проводили при помощи диализной трубки марки Servaprog (диаметр 29 мм, предел отсечения 12.5 кДа).

Полученные сополимеры лиофильно высушивали на аппарате «Иней».

Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-104 в спектрофотометрическом режиме в диапазоне длин волн от 190 до 350 нм при постоянной температуре 20°C.

¹³C-ЯМР-спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре Avance Bruker DPX-300 при 40°C с рабочей частотой 75 МГц на атомах углерода. Для полного широкополосного подавления протонов в отсутствие ядерного эффекта Оверхаузера использовали режим Inverse Gate. Двумерная гетероядерная корреляция осуществлялась в прямом режиме с наблюдением на ядрах ¹³C-¹H НЕТCOR. Образцы для регистрации спектров готовили, растворяя 10 мг сополимера в 0.5 мл D₂O.

Биологические эксперименты

Определение LD₅₀ для морских свинок референс-заражающей культуры штамма 71/12. 30-ти клинически здоровым морским свинкам массой 300±50 г, содержащимся на полноценном рационе, однократно подкожно в области живота вводят по 0.5±0.05 см³ суспензии спор, содержащей 625 тыс., 125 тыс., 25 тыс., 5 тыс., 1 тыс. спор и 200 спор штамма 71/12. Заболевшими сибирской язвой считаются только те животные, от которых из внутренних органов была выделена культура *B. anthracis* [12]. Величина LD₅₀ рассчитывается по формуле Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (см. выше), результаты представлены в табл. 3.

Определение иммуностимулирующего действия сополимеров «ИМ1» и «ИМ2» по изменению показателя средне-эффективной иммунизирующей дозы (ED₅₀) было изучено на морских свинках [13].

Морских свинок разбили на пять групп по 15 голов в каждой:

- первой и второй группам животных вещества «ИМ1» и «ИМ2», соответственно, вводили за 14 дней до вакцинации в объеме 0.5 мл в дозе 1 мг/кг;
- третьей и четвертой группам животных вещества

«ИМ1» и «ИМ2», соответственно, вводили одновременно с вакцинацией в объеме 0.5 мл в дозе 1 мг/кг;

- пятой группе вещества «ИМ1» и «ИМ2» не вводили.

Вакцину разводили стерильным физиологическим раствором до рабочего разведения. Затем делали разведения на стерильном физиологическом растворе с содержанием 10 млн., 2 млн., 400 тыс. и 80 тыс. живых спор в 1 см³.

Приготовленными разведениями суспензий спор вакцины иммунизировали по 15 (на каждую группу) клинически здоровых морских свинок массой 300±50 г подкожно в области живота в объеме по 0.5 см³. Триema первыми дозами споровой культуры вакцинировали по 4, а одной меньшей последней дозой – по 3 головы, с тем, чтобы ко времени заражения в живых осталось не менее 3 морских свинок в каждой группе.

Через 14 суток после вакцинации по 3 морских свинки, привитых каждой дозой спорных культур, и по 3 непривитых клинически здоровых морских свинки заражали стандартной референс-заражающей сибиреязвенной культурой – подкожно в области живота вводили по 0.5±0.05 см³ в дозе 200 LD₅₀. Наблюдение за животными осуществляли в течение 10 суток после заражения.

Всех погибших животных вскрывали и делали высевы методом отпечатков печени, селезенки, легких, лимфатических узлов на плотную питательную среду. Заболевшими сибирской язвой считались только те животные, от которых из внутренних органов была выделена культура *B. anthracis*. Результаты представлены в табл. 4.

Список литературы:

1. Кедик С.А., Панов А.В., Сакаева И.В., Кочкина Ю.В., Еремин Д.В., Суслов В.В. // Хим.-фарм. журн. 2012. Т. 46. № 8. С. 19–22.
2. Богданская Н.И., Толгская М.С. // Гигиена и санитария. 1973. № 4. С. 102–104.
3. Пономаренко С.П. Регуляторы роста растений на основе N-оксидов производных пиридина. Киев: Техника, 1999. 270 с.
4. Кедик С.А., Сакаева И.В., Кочкина Ю.В., Еремин Д.В., Панов А.В., Суслов В.В. // Хим.-фарм.

журн. 2013. Т. 47. № 10. С. 54–56.

5. Katritzky A.R., Lagowski J.M. Chemistry of the heterocyclic N-oxides. London, N.Y.: Acad. Press, 1971. 587 p.

6. Гармаш А.В. Современные методы аналитической химии. М.: Техносфера, 2003. 412 с.

7. Бородулина С.Н., Постовский И.Я., Аронова Г.В. [и др.] N-Оксиды амидов полиметакриловой кислоты, обладающие способностью ингибировать цитоксическое и фиброгенное действие свободной двуокиси кремния : патент РФ на изобретение № 927803. Заявка от 11.02.1980, опубл.15.05.1982. Бюл. № 18.

8. Спектральная база данных для органических соединений SDBS. <http://sdb.sdb.aist.go.jp/> (2015).

9. Кедик С.А., Панов А.В., Суслов В.В., Еремин Д.В., Иванова Т.Е., Кочкина Ю.В., Малиновская Г.О. // Хим.-фарм. журн. 2013. Т. 47. № 6. С. 33–34.

10. Государственная фармакопея Российской Федерации XII. Ч. 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. 704 с.

11. Zhao X.-B., Zhang T., Zhou Y.-J. // Chin. J. Process Eng. 2008. V. 8(1). P. 35–41.

12. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.

13. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

References:

1. Kedik S.A., Panov A.V., Kochkina Yu.V., Sakaeva I.V., Eremin D.V., Suslov V.V. // Pharm. Chem. J. 2012. V. 46. № 8. P. 478–481.

2. Bogdanskaya N.I., Tolgskaya M.S. // Gigiena i sanitariya (Hygiene and sanitation). 1973. № 4. P. 102–104.

3. Ponomarenko S.P. Reguljatory rosta rastenij na osnove N-oksidov proizvodnyh piridina. Kiev: Tehnika, 1999. 270 p.

4. Kedik S.A., Sakaeva I.V., Kochkina Yu.V., Eremin D.V., Panov A.V., Suslov V.V. // Pharm. Chem. J. 2014. V. 47. № 10. P. 569–571.

5. Katritzky A.R., Lagowski J.M. Chemistry of the heterocyclic N-oxides. London, N.Y.: Acad. Press, 1971. 587 p.

6. Garmash A.V. Sovremennye metody analiticheskoj himii. M.: Tehnosfera, 2003. 412 p.

7. Borodulina S.N., Postovskij I.Ya., Aronova G.V. [et al.] N-oksidy amidov polimetakrilovoj kisloty, obladajushhie sposobnost'ju ingibirovat' citoksicheskoe i fibrogennoe dejstvie svobodnoj dnuokisi kremnija : patent № 927803 RF. Appl. 11.02.1980, publ.15.05.1982. Bull. № 18.

8. Spektral'naja baza dannyh dlja organicheskikh soedinenij SDBS (Spectral Data Base for Organic Substances). <http://sdb.sdb.aist.go.jp/> (2015).

9. Kedik S.A., Panov A.V., Suslov V.V., Eremin D.V., Ivanova T.E., Kochkina Yu.V., Malinovskaya G.O. // Pharm. Chem. J. 2013. V. 47. № 6. P. 318–320.

10. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XII Ch.1. M.: Nauchnyj centr jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija, 2008. 704 p.

11. Zhao X.-B., Zhang T., Zhou Y.-J. // Chin. J. Process Eng. 2008. V. 8(1). P. 35–41.

12. Habriev R.U. Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv. M.: Medicina, 2005. 832 p.

13. Mironov A.N., Bunatyan N.D. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Part 1. M.: Grif i K, 2012. 944 p.