

**Всероссийский конкурс юных исследователей
окружающей среды «Открытия 2030»**

**Институт химии растворов имени Г. А. Крестова
Российской академии наук,
Ивановский государственный
химико-технологический университет,
Россия, Ивановская область, город Иваново**

**СКРИНИНГ СОКРИСТАЛЛОВ И СОЛЕЙ
ХИНОЛОНОВ С ТИРАМИНОМ**

Выполнил:

Зайцев Марк Владимирович
11класс, МБОУ СШ № 20

Научный руководитель:

Бойцов Денис Евгеньевич
магистрант Ивановского государственного
химико-технологического университета

Оглавление

1. Введение	3 стр.
2. Методика исследований	6 стр.
3. Результаты исследований	7 стр.
4. Выводы	14 стр.
5. Заключение	15 стр.
6. Список литературы	16 стр.

1. Введение

1.1. Научная, исследовательская и практическая проблема, на решение которой направлена исследовательская работа

Человеческий организм это сложная открытая биологическая система с высоким уровнем организации, в которой, как и во всех природных системах материального мира протекают процессы эволюции. Как известно эволюция не может создавать совершенные системы, в которых одновременно запускаются механизмы, обеспечивающие полную работоспособность всех длинных биохимических циклов в организме. Следовательно, говорить о 100% здоровье человека невозможно. Сбой даже одного биохимического цикла может привести к разбалансировке организма, и как следствие к серьезным заболеваниям. Поэтому всегда существует необходимость прогноза степени выполнения этих циклов и помощи организму справляться с нарушением его баланса. Это задача медицины и интегрированных с ней областей медицинской химии и фармакологии. Одним из важных решений этой задачи является оптимизация или получение новых лекарств на основе биологически активных соединений.

Одной из проблем создания новых лекарственных препаратов является невозможность использования непосредственно активного фармацевтического ингредиента в “чистом виде”. Это, в первую очередь, связано с его низкой растворимостью в биологической среде и ограниченной мембранной проницаемостью. Возможны ситуации, когда активный фармацевтический ингредиент является или слишком токсичным, или недостаточно устойчивым. Такие препараты характеризуются невысоким терапевтическим эффектом, сопровождающимся нежелательными побочными реакциями. В настоящее время для решения такого рода проблем используется сокристалльная технология. Развитие новых методов исследований и последние достижения в области кристаллографии позволяют расширять диапазон новых сокристаллов для фармакологии. Преимущества сокристалльных фармацевтических систем состоят в том, что они отличаются хорошей скоростью и степенью растворения, высоким уровнем биодоступности, термической стабильностью без изменения химической структуры активных веществ и образованием твердофазных форм активного фармацевтического ингредиента (АФИ), которые не содержат ионизирующиеся функциональные группы, способствующие образованию солей. Сокристаллы по сравнению с другими фармацевтическими системами позволяют значительно разнообразить кристаллические формы, дают возможность “точной настройки” важных характеристик АФИ за счет вариации свойств коформера, выбора и синергии компонентов сокристалльных фармацевтических систем [1, 2].

Поиск новых лекарственных молекул процедура очень дорогостоящая, поэтому дешевле улучшить фармацевтические свойства уже известных АФИ

путем изменения, как поверхности, так и молекулярной упаковки в кристаллической решетке активного ингредиента.

Применение сокристалльной технологии способствует ускорению процесса поиска и получению новых биодоступных, а также модифицированию известных кристаллических форм АФИ. Сокристаллизация позволяет сократить стадии получения лекарственного препарата и напрямую использовать результаты научных исследований в фармацевтическое производство [3]. За счет этого фармацевтические предприятия могут снизить затраты на производство лекарственных препаратов и расширить торговую линейку лекарств.

Увеличение растворимости является чрезвычайно важным фактором, улучшающим клинические свойства фармацевтических соединений. С этой точки зрения, разработка методик скрининга и получение новых сокристаллов с высокой биодоступностью, а также целенаправленное корректирование фармакологических и физико-химических характеристик для известных антибактериальных препаратов группы хинолонов остается актуальным. Поэтому целью работы был поиск новых многокомпонентных кристаллов соединений хинолонового ряда с тирамином. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Проведение скрининга новых кристаллических форм хинолонов с тирамином.
2. Идентификация полученных форм различными физико-химическими методами.
3. Получение монокристаллов новых форм объектов исследования.

1.2. Анализ представленных в литературе исследований по тематике работы и обзор существующих решений

При разработке лекарственных препаратов на стадии исследований свойств АФИ отмечено, что факторами, сильно влияющими на терапевтическую эффективность лекарств, являются скорость растворения, растворимость, биодоступность, химическая нестабильность. Нежелательными также являются механическая сыпучесть и детализация фармацевтической системы [4-7]. В качестве стратегии, направленной на оптимизацию физико-химических свойств АФИ и устранение нежелательных факторов, может успешно выступать кристаллоинженерия [8-11].

Для увеличения скорости и степени растворимости кристаллов существуют различные подходы в кристаллоинженерии. Широко используются полиморфизм [12, 13], получение комплексов с циклодекстринами [14], полимерами [15], аморфизация веществ [16], образование гидратов [17] и многие другие. В последнее время большое внимание уделяется получению сокристаллов [18].

Сокристаллы — это кристаллические материалы, состоящие из двух или более разных молекул, обычно активного фармацевтического ингредиента (АФИ) и сокристаллических формеров («коформеров»), в одной

и той же кристаллической решетке, которые находятся в строго стехеометрическом соотношении и удерживаются вместе нековалентным взаимодействием, предпочтительно водородными связями [19, 20].

Популярность производства дженериков стимулирует интерес к сокристалльной технологии и новым путям ее развития. Например, к 1990 году было известно 20 сокристаллов, а уже в 2003 году их число выросло до 140 [18]. История успеха сокристалла и обращения на себя внимания связана с низкочастотным получением новых кристаллических форм с значимыми лекарственными свойствами. По достоинству оценены учеными – фармацевтами сокристаллы для комплексного препарата сакубитрил/валсартан, успешно используемого в терапии сердечной недостаточности [21].

Методы получения сокристаллов разнообразны и хорошо известны в литературе [22]. Наиболее распространенный метод - это медленное выпаривание. Однако он длительный, трудоемкий, требует больших затрат растворителя и не является экологически безопасным. Высокую скорость получения и анализа сокристаллов имеют методы перемолки и кристаллизации из расплава [1, 22]. Поэтому именно они могут эффективно использоваться в технологии скрининга. Эти методы не связаны с большим использованием растворителя, они низкочастотные, имеют минимальное количество вредных отходов и с точки зрения экологии более перспективны.

Как уже отмечалось выше, образуются сокристаллы с помощью водородных связей, возникающих в результате диффузии. Эти связи определяют структурные особенности молекулярных кристаллов, а также набор их физико-химических свойств. Различные многокомпонентные твердые формы могут быть разработаны на основе наличия функциональных групп, способных к образованию водородных связей. По агрегатному состоянию среды различают следующие механизмы сокристаллизации:

1. Сокристаллизация с использованием газа в качестве диффузионной среды. Процесс идет быстро за счет увеличения удельной поверхности компонентов и активирования поверхностного слоя.

2. Сокристаллизация с использованием жидкости в качестве диффузионной среды. В этом случае компоненты получают путем кристаллизации из растворителя, который в свою очередь может встраиваться в молекулярную упаковку сокристалла или катализировать процесс сокристаллизации [23]. При таком способе возможно образование сокристаллосольватов или нестабильной эвтектической (легкоплавкой) фазы.

3. Сокристаллизация с использованием аморфной фазы в качестве диффузионной среды. Этот способ применяется для твердых нелетучих компонентов, которые способны образовывать водородные связи. Именно по этому механизму идет образование большинства сокристаллов.

2. Методика исследований

2.1. Методы получения и скрининга

Для получения двухкомпонентных кристаллов использовались:

Перемол с добавлением растворителя (gr) – получение новой формы путём механохимической обработки в планетарной микромельнице Fritsch, Pulverisette. Смесь компонентов в стехиометрическом соотношении помещалась в агатовые ячейки с 10 шариками. Далее добавлялось 20 мкл растворителя и проводился перемол в планетарной микромельнице Fritsch, Pulverisette 72 раза по 10 минут, причём в перерыве добавлялся такой же объём растворителя.

Суспензионный метод (slurry) – получение посредством образования пастообразной формы, в которой находятся в равновесии твёрдая и жидкая фаза. К навеске веществ массой 50 мг добавлялось небольшое количество растворителя для смачивания образца, и образовавшаяся суспензия помещалась в ультразвуковую ванну на 30 минут (сонификация (sonic)). Однородность суспензии контролировалась на всём протяжении эксперимента.

Кристаллизация из раствора. Навеска компонентов растворялась в наименьшем объёме соответствующего растворителя или смеси растворителей в небольшой баночке при перемешивании. После растворения навески баночка накрывалась парафиновой плёнкой, в которой были сделаны несколько отверстий.

ДСК скрининг и термомикроскопия – методы получения и подтверждения образования двухкомпонентного кристалла из расплава физической смеси (p.m.). Навеска образца однородной физической смеси компонентов массой 1.5-2.5 мг нагревалась со скоростью 10 К·мин⁻¹ в интервале от 20°C до температуры плавления наиболее тугоплавкого компонента в инертной атмосфере азота.

Метод Кофлера при исследовании системы: норфлоксацин + тирамин.

2.2. Физико-химические методы идентификации образования новых форм биологически активных соединений

Для подтверждения образования новых форм использовались следующие физико-химические методы:

1. **Анализ с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии.** Проводился также, как и ДСК скрининг, но плавилась не физическая смесь компонентов, а заранее полученный многокомпонентный кристалл.

2. **Термомикроскопия.**

3. **Рентгенофазовый анализ (XPRD)** поликристаллических веществ, полученных различными методами, проводили в геометрии Брегга-Брентано на отражение с использованием дифрактометра D8 Advance (Bruker Axs, 73 Германия). Съемка образцов проводилась с использованием Cu-K α излучение ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Напряжение на рентгеновской трубке составляло 40 кВ, сила тока 40 мА. Данные собирались в диапазоне $5\text{-}30^\circ 2\theta$, с шаг сканирования 0.03° .

4. **Рентгеноструктурный анализ** проводился на монокристалльном дифрактометре Bruker SMART APEX-II с использованием графитового монохроматора с Mo-K α -излучением ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) в режиме ω -сканирования. Все структуры были решены при 298 К прямым методом и уточнены методом наименьших квадратов в полноматричном анизотропном приближении неводородных атомов. Все атомы водорода были локализованы из разностных Фурье-синтезов и уточненные изотропные тепловые параметры.

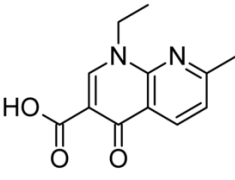
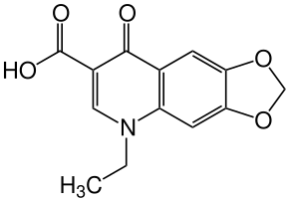
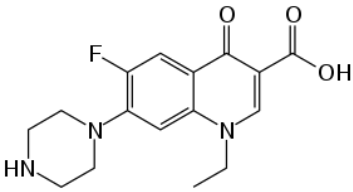
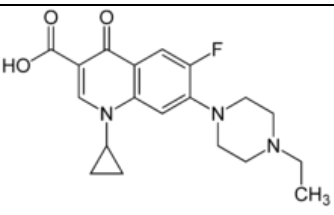
2.3. Оборудование, используемое в исследовательской работе

1. Планетарная микромельница Fritsch, Pulverisette;
2. Дифрактометр D8 Advance (Bruker Axs, 73 Германия);
3. Поляризационный микроскоп Альтами ПОЛАР 312;
4. Столик нагревательный «Микростат Н-350» предназначен для поддержания стабильной температуры в исследовательских и диагностических работах в медицине, биологии, химии при манипуляциях с препаратами и веществами.
5. Монокристалльный дифрактометр Bruker SMART APEX-II;
6. DSC Pyris 4000.

3. Результаты исследований и их обсуждение

Для создания препаратов с улучшенными фармацевтическими свойствами в данной работе представлены исследования, касающиеся получения новых хорошо растворимых сокристаллических форм хинолонов (налидиксиновая кислота (NDX), оксолиновая кислота (ОХС)), норфлоксацин (NXC) и энрофлоксацин (ЕХС) с тирамином (TyrAm) и их идентификация различными методами. Выбор объектов исследования (табл.1) обоснован разнообразием набора и расположения функциональных групп, а также соотношением доноров и акцепторов водородных связей в этих соединениях. Интерес к хинолонам связан с тем, что они оказывают бактерицидный эффект, ингибируя два жизненно важных фермента микробной клетки - ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, нарушают синтез ДНК.

Табл. 1. Объекты исследования

налидиксиновая кислота	
оксолиновая кислота	
норфлоксацин	
энрофлоксацин	

Механизм действия этих препаратов обеспечивает их активность в отношении устойчивых штаммов микроорганизмов, в том числе полирезистентных. Хинолоны различаются по структуре, активности, фармакокинетике и широте показаний к применению. Они делятся на четыре поколения. Налидиксовая кислота и оксолиновая кислота относятся к нефторированным хинолонам I поколения, а норфлоксацин и энрофлоксацин (аналог цiproфлоксацина) – это фторхинолоны II поколения (табл.1). Наиболее часто в клинической практике применяются хинолоны II поколения [24]. Поэтому целью работы был поиск новых многокомпонентных кристаллов соединений хинолонового ряда с тирамином. Выбор тирамина основан на том, что он участвует в образовании сокристалла при минимальной концентрации и в организме окисляется ферментом моноаминоксидазой до безвредного тирозина.

Принцип улучшения растворимости методом сокристаллизации идет по механизму, изображенному на схеме 1

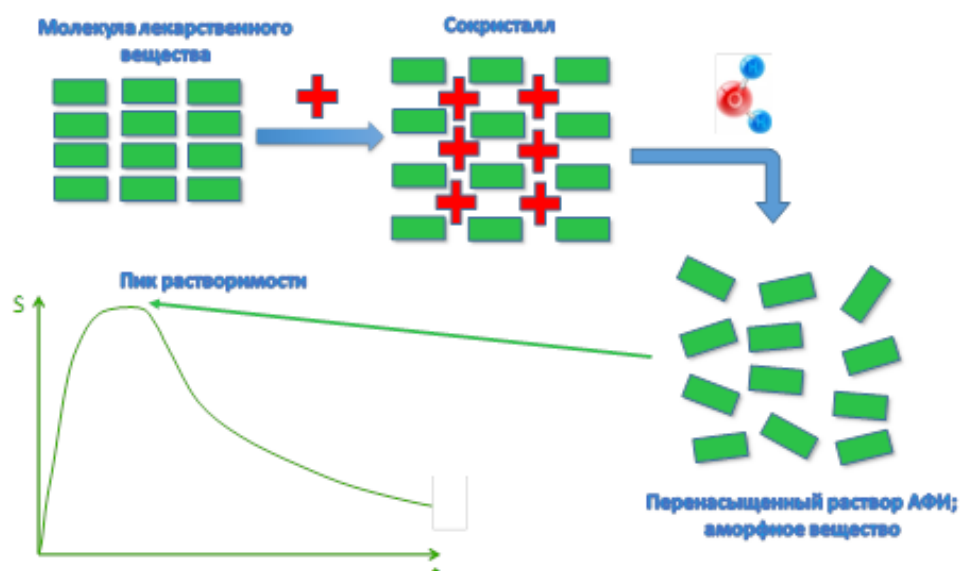


Схема1

Из чистой формы в присутствии второго компонента получали сокристалл и помещали его в воду. Там молекула второго компонента переходит в раствор, а кристалл активного ингредиента частично разрушается, образуя перенасыщенный раствор лекарственного соединения, где его концентрация резко повышается. Такой скачок концентрации характеризуется пиком растворимости.

Скрининг многокомпонентных кристаллов проводился методами перемолла с тремя различными растворителями: этанолом, ацетонитрилом и водой. Образование новых многокомпонентных кристаллов хинолонов с тирамином было подтверждено методами термомикроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии и рентгенофазового анализа.

Для систем налидиксиновой кислоты и норфлоксацина с тирамином был проведён ДСК анализ физических смесей компонентов в соотношении 1:1 с целью доказательства образования сокристалла (рис. 1, 2.).

На рентгенограмме системы налидиксиновой кислоты с тирамином появляются новые пики, которые не относятся к чистым веществам (рис.1, а). ДСК анализ физической смеси показывает наличие экзопика и пика между температурами плавления чистых компонентов, что также говорит об образовании нового вещества (рис. 1, б). Следует отметить, что перемол с этанолом позволяет нам получить чистый сокристалл.

Похожая ситуация наблюдается для системы с норфлоксацином, но при перемолле с добавлением воды видны новые пики (рис. 2). Скорее всего, в этих условиях, образуется гидрат сокристалла.

ДСК скрининг физических смесей налидиксиновой кислоты и норфлоксацина с тирамином показал, что для данных систем образуется двухкомпонентный кристалл.

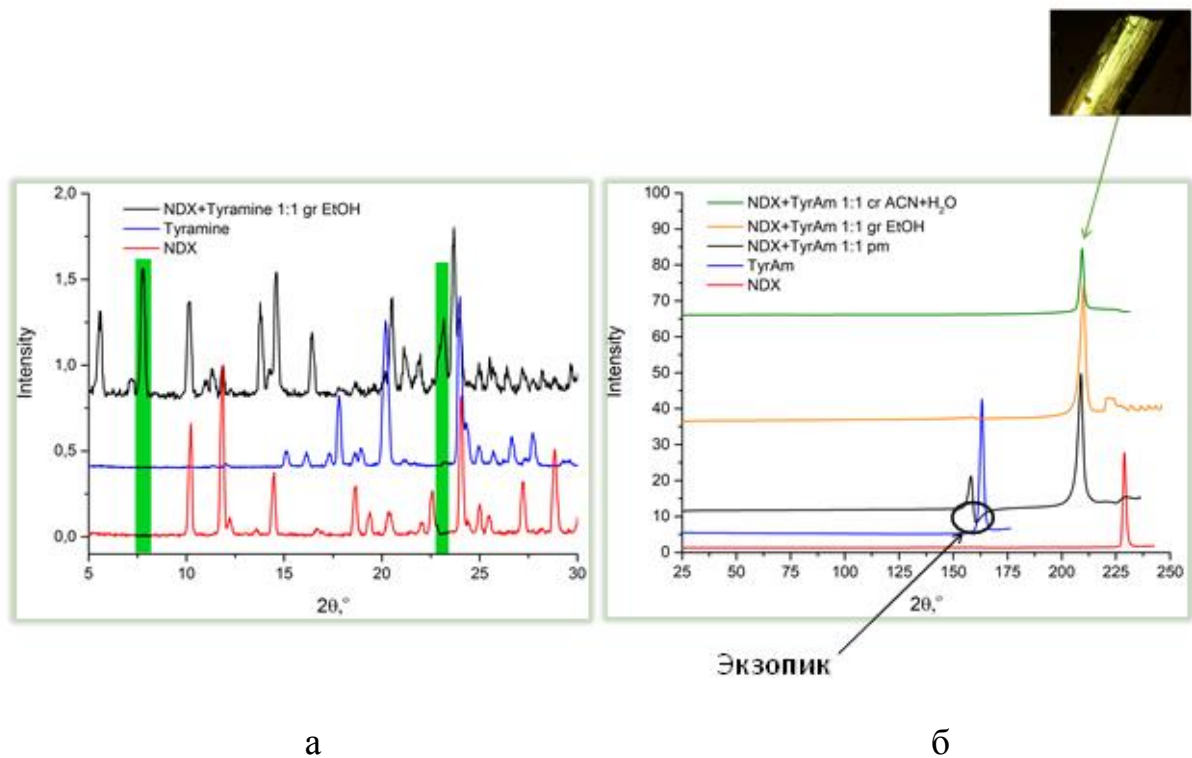


Рис.1. Рентгенограмма (а) и ДСК кривые для плавления физической смеси налидиксиновой кислоты с тирамином (б).

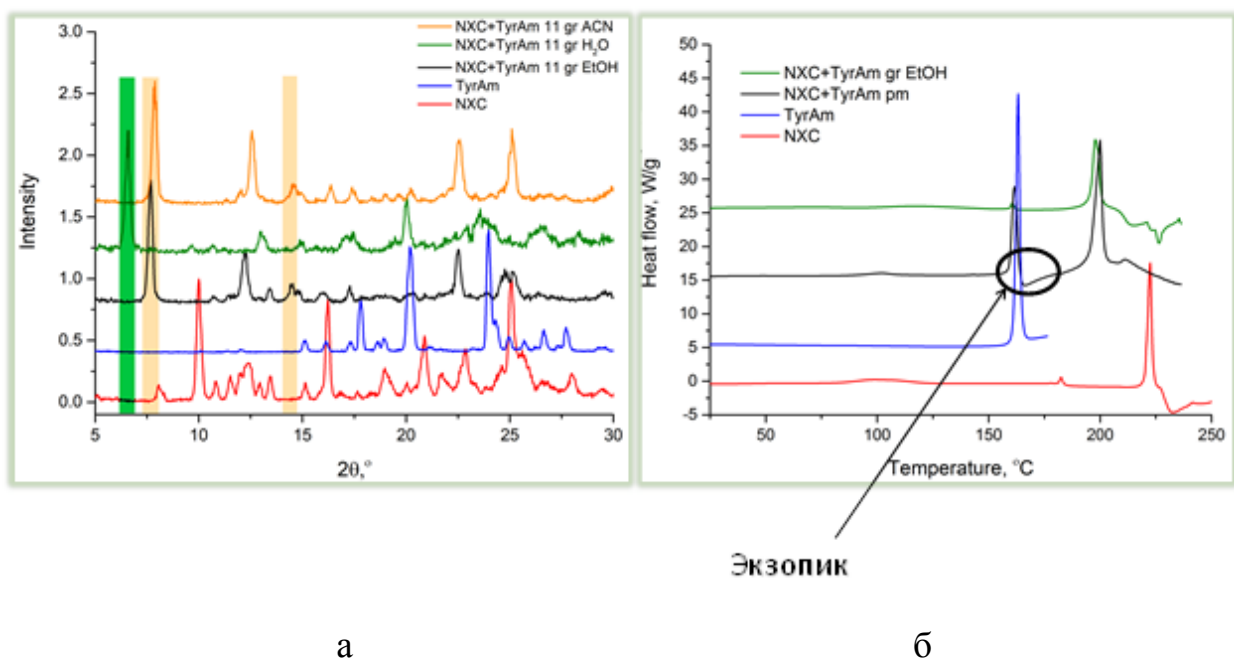
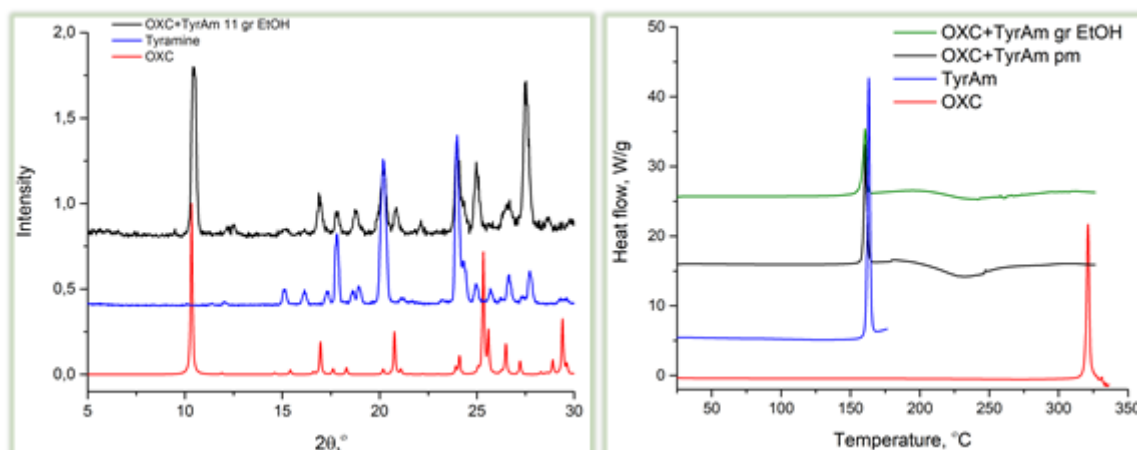


Рис. 2. Рентгенограмма (а) и ДСК кривые для плавления физической смеси норфлоксацина с тирамином (б).

Для системы оксолиновой кислоты с тирамином на рентгенограмме не появляются новые пики, а ДСК анализ физической смеси повторяет перемолотую (рис. 3). Это говорит о том, что сокристалл не образуется.



а

б

Рис. 3 Рентгенограмма (а) и ДСК кривые для плавления физической смеси оксолиновой кислоты с тирамином (б).

Для подтверждения образования сокристалла использовались также методы термомикроскопии (рис. 4) и Кофлера (рис. 5). Как можно видеть, из плавящейся смеси компонентов образуется сокристалл (рис. 4).

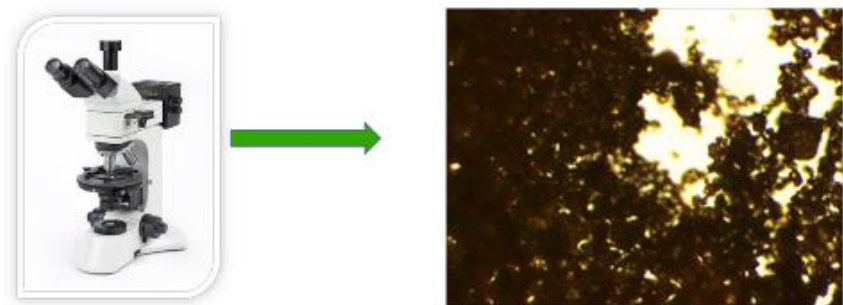


Рис. 4. Термоскопия сокристалла NXC с тирамином

Метод Кофлера заключается в совместной кристаллизации компонентов А и В. На месте их смешения образуется новая форма С (рис. 5).

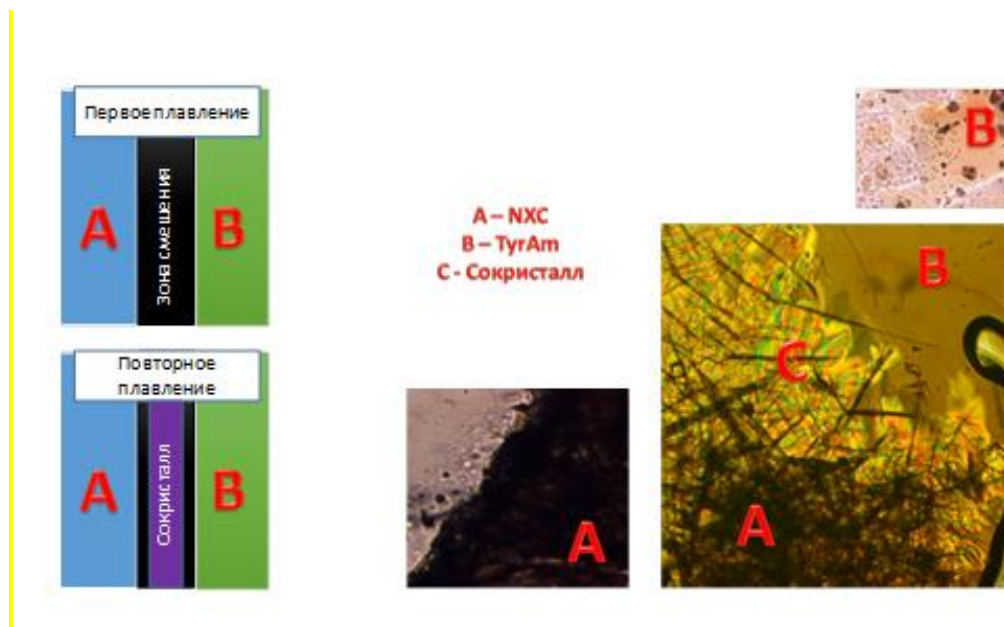


Рис. 5. Метод Кофлера при исследовании системы NXC с тирамином.

С целью получения монокристалла был проведен эксперимент по кристаллизации (рис. 6).

Кристаллизация



Рис. 6. Процесс кристаллизации.

Методом кристаллизации из этанола был выращен монокристалл гидрата соли энрофлоксацина, однако безводной соли энрофлоксацин+тирамин получить выбранными методами не удалось. Для решения этой проблемы был выбран суспензионный метод, который дал положительный результат в виде чистого гидрата соли.

В дальнейшем будут проведены исследования, посвященные поиску условий получения монокристаллов новых кристаллических форм норфлоксацина и налидиксиновой кислоты с хорошей растворимостью.

4. Выводы

1. Осуществлен поиск двухкомпонентных кристаллов в системах с налидиксиновой кислотой, норфлоксацином, энрофлоксацином и оксолиновой кислотой.

2. Получены 4 новые формы двухкомпонентных кристаллов хинолонов с тирамином:

[Норфлоксацин+тирамин] (1:1)

[Норфлоксацин+тирамин+H₂O] (1:1:1)

[Налидиксиновая кислота+тирамин] (1:1)

[Энрофлоксацин+тирамин+H₂O] (1:1:1)

3. Образование данных солей подтверждено различными физико-химическими методами.

4. Использование суспензионного метода позволило получить чистый (безводный) гидрат соли энрофлоксацин+тирамин

5. Методом кристаллизации из этанола был выращен монокристалл гидрата соли энрофлоксацина с тирамином.

6. Новых кристаллических форм оксолиновой кислоты с тирамином не обнаружено.

5. Заключение

Результаты работы могут быть использованы на следующем этапе создания форм активного фармацевтического ингредиента, а именно на этапе получения монокристаллов полученных форм и их характеристик.

В дальнейшем будут проведены исследования, нацеленные на поиск условий получения монокристаллов новых кристаллических форм норфлоксацина и налидиксиновой кислоты с хорошей растворимостью.

Перспективы работы заключаются в исследовании физико-химических свойств этих монокристаллов, а также в поиске дизайна и изучении свойств новых сокристаллов фармацевтического назначения.

Исполнитель выражает благодарность своему научному руководителю Бойцову Денису Евгеньевичу за профессиональную помощь при проведении исследований, ознакомлении с тематической литературой, обсуждении результатов и в оформлении работы.

6. Список литературы

1. Karki S, Friscic T, Jones W, et al // *Mol. Pharm.* 2007. V. 4 (3). P. 347-354.
2. Bhattacharya B., Das S., Lal G., et al // *Journal of Molecular Structure* 2020. 11991. P. 1-10
3. Trask A. V. // *Mol. Farm.* 2007. V. 4 (3). P. 301-309.
4. R. Thakuria, A. Delori, W. Jones, M.P. Lipert, L. Roy, N. Rodríguez Hornedo, // *Int. J. Pharm.* 2013. V. 453. P. 101-125.
5. J.M. Ting, W.W. Porter III, J.M. Mecca, F.S. Bates, T.M. Reineke, // *Bioconjug.Chem.* 2018. V. 29. P. 939-952.
6. L. Peltonen, J. Hirvonen, // *Int. J. Pharm.* 2018. V. 537. P. 73-83.
7. B. Bhattacharya, A. Mondal, S.R. Soni, S. Das, S. Bhunia, K.B. Raju, A. Ghosh, C.M. Redd // *Cryst. Eng. Comm.* 2018. V.20. P. 6420-6429.
8. G.R. Desiraju // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V.135. P. 9952-9967.
9. G. Bolla, A. Nangia // *Chem. Commun.* 2016. V. 52 P. 8342-8360.
10. M. Malamatari, S.A. Ross, D. Douroumis, S.P. Velaga // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. V. 117. P. 162-177.
11. Loftsson, T. *Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development* / T. Loftsson, M.E. Brewster // *J. Pharm. Pharmacol.* 2010. V. 62. N. 11. P. 1607-1621.
12. Kato Y., Okamoto Y., Nagasawa S. // *Chem. Pharm. Bull.* 1984. V. 32(10). P. 855-864.
13. Singhal D., Curatolo W. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004. V.56. P. 335-347.
14. M. Liu, L. Dong, A. Chen, Y. Zheng, D. Sun , X. Wang , B. Wang // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2013 V. 115. P. 854–860.
15. Volkova T.V., Domanina E.N., Kumeev R.S., Proshin A.N, Terekhova I.V. // *J. Mol. Liq.* 2018. V. 269. P. 492-500.
16. Skieneh J.M., Sathisaran I., Dalv S.V.i, Rohani S. // *Cryst. Growth Des.* 2017. V. 17. N. 12. - P. 6273-6280.
17. Healy A.M., Worku Z.A., Kumar D, Madi A.M. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. V. 117. P. 25-46.
18. Visshweshwar R., McMahon J. A., // *J. Pharm. Sci.* 2006. V. 95(3). P. 499-516.
19. Bolla G, Nangia A. // *Chem Commun.* 2016. V.52 (54). P.8342.
20. Aitipamula S., Banerjee R., Bansal A.K., Biradha K. et al // *Cryst. Growth Des.* 2012. V. 12. N. 5. P. 2147-2152.
21. www.entrestohcp.com. Entresto Tablet. [14 June 2019]; Available from: <https://www.entrestohcp.com/>
22. Ulrich J. // *Cryst. Growth Des.* 2004. V. 4(5). P. 879-880.
23. Friscic T., Jones W. // *Cryst Growth Des.*-2009-P. 1621-1637.
24. Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов *Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей.* – М.: Боргес, 2002. с. 432.