ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2023, том 97, № 8, с. 1218–1224

БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 544.03

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НАТИВНОГО И ПОЛИМЕРНОГО β-ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ НА РАСТВОРИМОСТЬ И МЕМБРАННУЮ ПРОНИЦАЕМОСТЬ БАРИЦИТИНИБА

© 2023 г. Е. С. Делягина[a,b], А. А. Гарибян[a], И. В. Терехова[a,*]

[a] *Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, Иваново, Россия*

[b] *Ивановский государственный университет, Иваново, Россия*

**e-mail: ivt@isc-ras.ru*

Поступила в редакцию 19.01.2023 г.
После доработки 17.02.2023 г.
Принята к публикации 20.02.2023 г.

Исследовано влияние природного и полимерного β-циклодекстринов на растворимость и мембранную проницаемость барицитиниба – иммуномодулятора нового поколения. Обнаружено, что природный и полимерный β-циклодекстрины проявляют одинаковое солюбилизирующее действие по отношению к барицитинибу, в то время как их влияние на мембранную проницаемость лекарства является дифференцированным. Повышение растворимости барицитиниба обусловлено образованием комплексов включения, которые имеют одинаковую устойчивость, но при этом являются энтальпийно-энтропийно стабилизированными в случае природного β-циклодекстрина и энтальпийно стабилизированными в случае полимерного β-циклодекстрина. Влияние циклодекстринов на коэффициенты проницаемости барицитиниба через модельную мембрану обсуждается с точки зрения комплексообразования, изменения вязкости среды и состояния пограничного слоя воды вблизи поверхности мембраны.

Ключевые слова: растворимость, иммуномодулятор, барицитиниб, природный и полимерный β-циклодекстрины

DOI: 10.31857/S0044453723080046, **EDN:** QTSHUE

Ревматоидный артрит – это хроническое, нередко приводящее к инвалидизации аутоиммунное заболевание соединительных тканей [1]. Терапия ревматоидного артрита сводится к назначению базисных противовоспалительных препаратов, прием которых приводит к замедлению прогрессирования заболевания. Барицитиниб (BCN, рис. 1а) – новый иммуносупрессивный препарат, представляющий собой ароматическое полигетероциклическое соединение, принадлежащее к классу пирроло[2,3-*d*]пиримидинов и одобренное в 2018 году для перорального лечения ревматоидного артрита у взрослых пациентов, не отвечающих на доступные методы лечения [2]. BCN – мощный селективный и обратимый ингибитор янус-киназ, которые играют важную роль в работе сигнального пути с участием цитокинов.

Согласно литературным данным [3], BCN является липофильным соединением, которое ограниченно растворимо в водной среде [4]. В литературе [5] имеются данные по растворимости BCN в растворителях, некоторые из которых используются в фармацевтике. В частности, растворимость BCN в ДМСО была оценена как самая высокая, а минимальная растворимость наблюдалась в воде и этаноле.

Как правило, препараты с плохой растворимостью характеризуются низкой биодоступностью, что требует введения высоких доз, которые могут приводить к неблагоприятным последствиям. В 2018 году была рекомендована доза BCN 2 мг для лечения ревматоидного артрита, но не рекомендована доза 4 мг, вызывающая серьезные побочные эффекты [6]. В связи с этим, встает необходимость поиска эффективных солюбилизаторов для улучшения биологически значимых свойств BCN.

В литературе имеется большое количество работ, направленных на проведение клинико-биологических исследований BCN, и лишь небольшое число источников посвящено поиску путей повышения растворимости и разработке систем доставки этого лекарственного соединения. В частности, на основе полимолочной и гликолевой кислот были получены наночастицы BCN с эффектом пролонгированного действия [7]. Установлено, что инкапсуляция BCN в наноча-

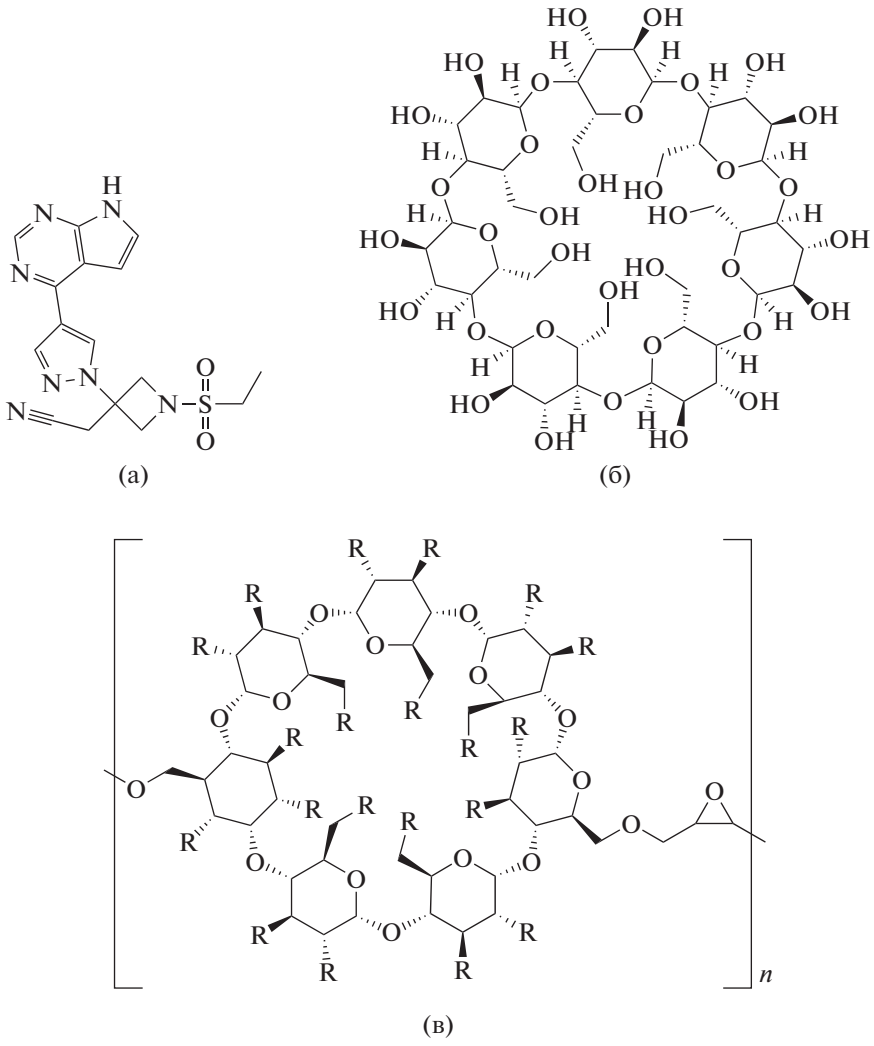


Рис. 1. Структурные формулы барицитиниба (а), нативного β-циклодекстрина (б) и полимерного β-циклодекстрина (в).

стицы приводит к замедленному высвобождению препарата, но не оказывает существенного эффекта на его растворимость. Для лечения воспалительных процессов при острых травмах спинного мозга был разработан инъекционный термочувствительный гидрогель на основе блоксополимера с содержанием BCN [8]. Высвобождение BCN из приготовленного гидрогеля проходило с постоянной скоростью и приводило к апоптозу нейронов и функциональному восстановлению.

В нашей предыдущей работе [4] для солюбилизации BCN были использованы нативные циклодекстрины. Циклодекстрины (CD, рис. 1б) – циклические олигосахариды, которые благодаря наличию внутренней гидрофобной полости способны образовывать внутримолекулярные комплексы включения и таким образом значительно улучшать физико-химические свойства закомплексованных соединений [9–11]. В частности, было обнаружено, что комплексы BCN с β-CD более стабильны по сравнению с комплексами, образованными α-CD и γ-CD [4]. Полученные данные указывают на то, что размер полости β-CD лучше подходит для включения BCN. Комплексообразование BCN с β-CD приводило к заметному повышению растворимости лекарственного вещества. Однако, сам β-CD обладает ограниченной растворимостью в воде, что затрудняет его использование в фармацевтических целях. Относительно недавно были получены полимерные β-CD [12], преимуществом которых является более высокая растворимость в воде по сравнению с нативным β-CD. В ряде исследований [13–15] было показано, что полимерные β-CD обладают более выраженным солюбилизирующим эффектом, чем природный β-CD. В частности, авторами работы [13] было исследовано влияние ряда новых полимерных β-CD на растворимость и кинетику растворения гидрокортизона. Все рас-

сматриваемые полимерные β-CD проявляли превосходные солюбилизирующие свойства по сравнению с нативным β-CD. Другим примером может быть образование комплексов включения эбселена с полимерным β-CD, которое приводило к повышению растворимости лекарства в 3–4 раза [14]. В работе [15] комплексообразование гиперицина с полимерным β-CD в стехиометрии 1 : 2 способствовало улучшению растворимости биологически активного соединения в воде. Таким образом, полимерный β-CD может быть использован в качестве эффективного солюбилизатора.

В данной работе исследовано солюбилизирующее действие полимерного β-CD (polyβ-CD, рис. 1в) по отношению к BCN. С этой целью растворимость BCN была измерена в присутствии полимерного β-CD переменной концентрации в фосфатном буферном растворе (pH 6.8), определены термодинамические параметры комплексообразования BCN с полимерным β-CD и изучено влияние образования комплексов включения на коэффициенты проницаемости BCN через модельную мембрану. Проведен сравнительный анализ процессов комплексообразования BCN с природным и синтетическим полимерным β-циклодекстринами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерчески доступные BCN, нативный β-CD и полимерный β-CD (Sigma-Aldrich, Россия). Буферные растворы были приготовлены на основе бидистиллированной воды и химически чистых Na_2HPO_4 и KH_2PO_4. pH растворов контролировали с помощью pH-метра Five Easy (Mettler Toledo).

Растворимость (*S*) была измерена методом изотермического насыщения. Для этого в пробирки Эппендорфа помещали избыточное количество BCN и заливали фосфатным буферным раствором (pH 6.8) с варьируемым содержанием полимерного β-CD (0–5 мас. %). Выбор буферного раствора с pH 6.8 основан на том, что он моделирует кислотность тонкого кишечника и согласно методическим рекомендациям используется при проведении тестов “растворение” [16]. Как известно, BCN применяется перорально, и растворение данного препарата происходит преимущественно в тонком кишечнике.

Пробирки встряхивали на шейкере (Eppendorf ThermoMixer C) при постоянной температуре (290.15, 298.15, 303.15, 310.15 K) в течение трех дней до достижения термодинамического равновесия, которое контролировали по установлению постоянного значения оптической плотности растворов за этот временной период. После этого растворы центрифугировали (Thermo Scientific MicroCL 21R) при заданной температуре, а затем анализировали спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu UV-1800). Каждое измерение проводили как минимум два раза.

Определение коэффициентов мембранной проницаемости BCN проводили с помощью диффузионной ячейки Франца вертикального типа (PermeGear, США) при температуре 310.15 K. Донорную камеру объемом 5 мл заполняли раствором BCN с варьируемым содержанием полимерного β-CD. Акцепторную камеру заполняли фосфатным буферным раствором (pH 7.4), который моделировал pH крови. В экспериментах использовали мембрану из регенерированной целлюлозы (Spectra/Por®), имеющую отсечку по молекулярной массе до 12 кДа. Мембрану устанавливали между донорной и акцепторной камерами диффузионной ячейки Франца. Пробы из акцепторной камеры отбирали каждые 30 мин и тут же добавляли эквивалентное количество буферного раствора. Концентрацию BCN определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu UV-1800). Эксперименты проводили как с перемешиванием (500 об./мин), так и без перемешивания раствора в донорной камере.

На основе полученных данных строили зависимости количества лекарственного средства (*Q*, моль), прошедшего через площадь поверхности мембраны (*A*, см^2), от времени (*t,* с). Поток вещества (*J*) рассчитывали по наклону линейной части кривой по уравнению:

$$J = \frac{dQ}{Adt}. \quad (1)$$

Коэффициенты проницаемости BCN (P_{app}) рассчитывали по уравнению:

$$P = \frac{J}{C}, \quad (2)$$

где *C* – начальная концентрация BCN в донорной камере (M).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растворимость – важнейшее свойство лекарственных препаратов, предназначенных для перорального введения. От этой характеристики напрямую зависит биодоступность лекарственного средства. BCN является амфолитом [17], проявляющим свойства слабой кислоты и слабого основания. Как было определено в нашей предыдущей работе [4], катионная форма BCN, существующая в водном растворе при pH 1–4, и анионная форма BCN, присутствующая при pH > 12, обладают большим сродством к воде как к полярному растворителю по сравнению с нейтральной формой BCN, преобладающей в достаточно широком диапазоне pH 4–12. В связи с этим, раствори-

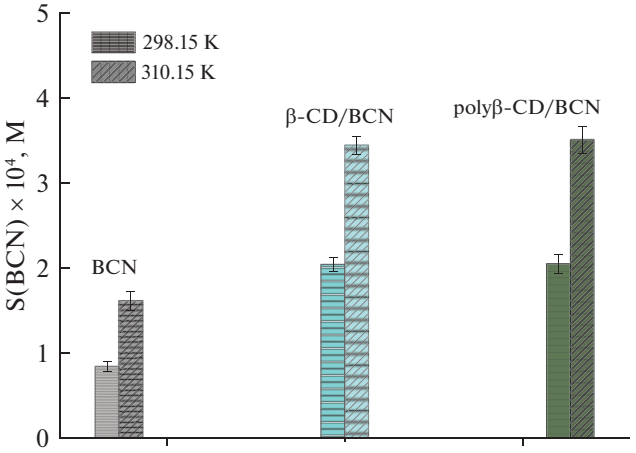


Рис. 2. Растворимость BCN в присутствии природного и полимерного β-циклодекстринов (1 мас. %) в фосфатном буферном растворе (pH 6.8) при 298.15 и 310.15 K.

мость BCN зависит от pH среды и в интервале pH 4–12 является минимальной.

В данной работе проведено сравнительное исследование солюбилизирующего действия природного и полимерного β-циклодекстринов по отношению к BCN в фосфатном буферном растворе (pH 6.8) при температурах 290.15–310.15 K. На основе экспериментально полученных данных были построены диаграммы, иллюстрирующие влияние природного и полимерного β-циклодекстринов, взятых в количестве 1 мас. %, на растворимость BCN при стандартной температуре (298.15 K) и физиологической температуре (310.15 K). Как видно из рис. 2, солюбилизирующее действие обоих циклодекстринов одинаковое, наблюдается повышение растворимости в 2.5 раза при 298.15 K и в 2 раза при 310.15 K.

Зависимости растворимости BCN от молярной концентрации циклодекстринов приведены на рис. 3. Фазовые диаграммы растворимости BCN в растворах β-циклодекстринов линейны в рассматриваемом температурном диапазоне и по классификации Хигучи и Коннорса [18] относятся к A_L-типу, который соответствует образованию водорастворимых комплексов включения. Стехиометрия образующихся комплексов BCN с нативным β-CD была ранее установлена методом изомолярных серий (метод Жоба) [4]. Полученные графики Жоба проявляли экстремум при молярном соотношении компонентов $R = 0.5$, что говорит о связывании 1 : 1 в буферном растворе pH 6.8. Таким образом, в “корзинку” β-CD способна включаться только одна молекула BCN.

Константы устойчивости комплексов (K) BCN с циклодекстринами можно рассчитать по наклону диаграмм растворимости [18]:

$$K = \frac{slope}{S_0\,(1 - slope)}, \qquad (3)$$

где S_0 – растворимость BCN в отсутствие CD. Значения K приведены в таблице 1.

Изменение энтальпии комплексообразования определяли методом Вант-Гоффа по наклону зависимостей $\ln K = f(1/T)$ (рис. 4). Значения K и $\Delta_c H^\circ$ далее использовались для расчета $\Delta_c G^\circ$ и $T\Delta_c S^\circ$. Термодинамические параметры комплексообразования BCN с циклодекстринами представлены в таблице 1.

Сравнительный анализ полученных термодинамических параметров комплексообразования (таблица 1) показывает, что константы устойчивости 1 : 1 комплексов BCN с природным и полимерным β-циклодекстринами близки. Комплексообразование BCN с циклодекстринами характеризу-

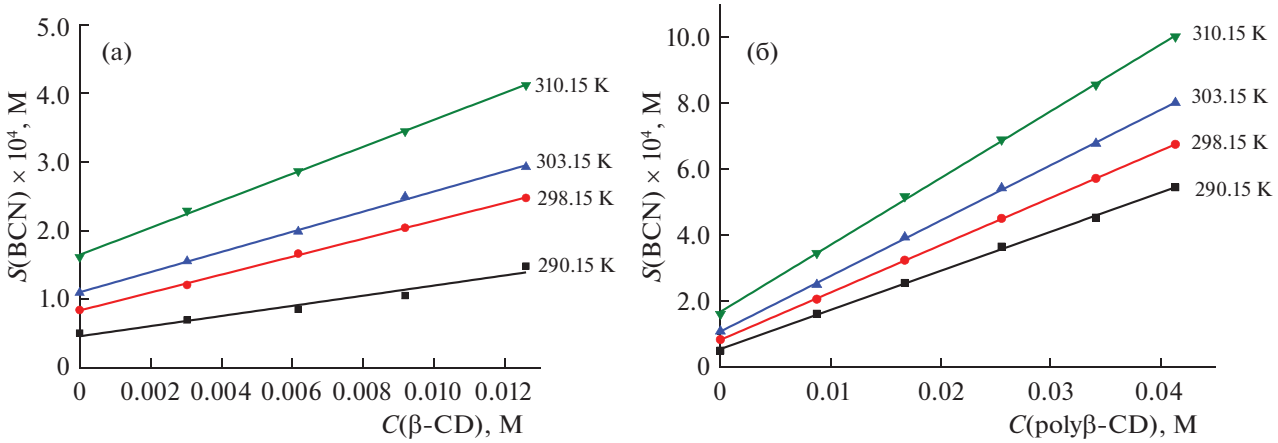


Рис. 3. Диаграммы растворимости BCN в присутствии нативного β-CD [4] (а) и полимерного β-CD (б) в фосфатном буферном растворе (pH 6.8) при температурах 290.15–310.15 K (молярная концентрация полимера рассчитывалась на его мономерное звено).

Таблица 1. Термодинамические параметры образования комплексов BCN с нативным и полимерным β-циклодекстринами в буферном растворе (pH 6.8) при 298.15 K

Комплекс	K, M^{-1}	$\Delta_c G°$,	$\Delta_c H°$,	$T\Delta_c S°$,
		кДж/моль		
β-CD/BCN [4]	159 ± 3	−12.6 ± 0.2	−11.4 ± 1.9	1.2 ± 0.3
polyβ-CD/BCN	174 ± 3	−12.8 ± 0.3	−20.7 ± 1.8	−7.9 ± 0.9

Примечание. Погрешности стандартных термодинамических функций рассчитывались как среднеквадратичное отклонение.

ется отрицательными изменениями энтальпии, причем экзотермичность связывания BCN с полимерным β-CD выше по сравнению с нативным β-CD, что может быть обусловлено стерическим фактором и определенным расположением полимерной цепочки в растворе. Как было доказано с привлечением данных ^{1}H ЯМР в работе [4], более гидрофобный пироллопиримидиновый фрагмент молекулы BCN предпочтительнее включается в макроциклическую полость β-CD, при этом оставшаяся часть, сформированная полярными группами, находится снаружи и может участвовать в образовании дополнительных водородных связей с OH-группами циклодекстрина. Поскольку полимерный β-CD представляет собой последовательно связанные “корзинки”, и полимерная цепочка ориентирована определенным образом в растворе, то есть основание полагать, что полярная часть молекулы BCN, которая не попадает в макроциклическую полость, взаимодействует посредством водородных связей с гидроксильными группами расположенных поблизости соседних макроциклов. Водородное связывание подтверждается отрицательными изменениями энтропии комплексообразования BCN с полимерным β-CD (таблица 1). Напротив, $\Delta_c S°$ положительно для комплексообразования с природным β-CD, что обусловлено процессами дегидратации при включении пироллопиримидинового фрагмента молекулы лекарства в макроциклическую полость и гидрофобными взаимодействиями с ней. Таким образом, комплекс BCN с β-CD энтальпийно-энтропийно стабилизирован, в то время как образование комплекса с полимерным β-CD определяется лишь энтальпийным вкладом в изменение энергии Гиббса.

Наряду с растворимостью, проницаемость фармакологически активных ингредиентов через биологические мембраны является еще одной важной характеристикой, определяющей биодоступность перорально вводимых лекарственных форм. Коэффициент мембранной проницаемости показывает, с какой скоростью лекарственное вещество абсорбируется в желудочно-кишечном тракте и достигает большого круга кровообращения. В связи с этим, интересно проследить влияние образования комплексов включения с рассматриваемыми циклодекстринами на мембранную проницаемость BCN. В экспериментах по проницаемости была использована модельная целлюлозная мембрана, имеющая молекулярную отсечку 12 кДа и допускающая диффузию BCN и его комплексов с природным β-CD. Однако комплексы BCN с полимерным β-CD не проходят через мембрану, и это было доказано с привлечением ^{1}H ЯМР.

На рис. 5 приведены значения коэффициентов мембранной проницаемости чистого BCN, а также в присутствии природного β-CD и полимерного β-CD концентрации 1 мас. %. Как видно, введение в раствор обоих циклодекстринов приводит к понижению P_{app}, поскольку прохождение комплексов через поры мембраны затруднительно по сравнению с исходным (незакомплексованным) BCN. При использовании полимерного β-CD коэффициент проницаемости уменьшается в большей степени (рис. 5), что можно объяснить, во-первых, наличием длинных цепей полимера, взаимодействие с которыми препятствует проникновению BCN через поры мембраны, и, во-вторых, повышением вязкости раствора полимерного β-CD, которое тормозит движение молекул лекарства к поверхности мембраны.

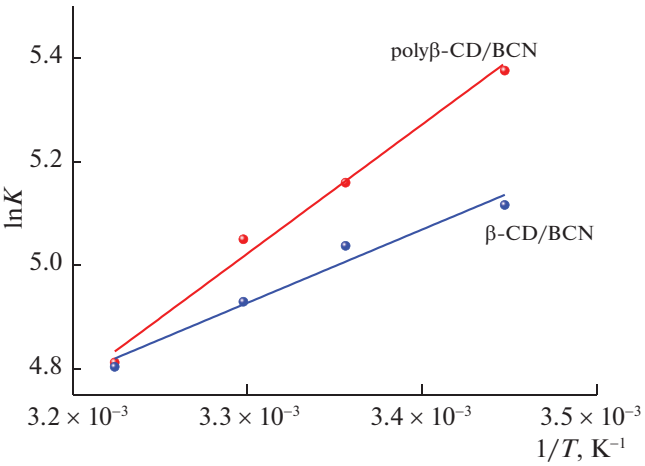


Рис. 4. Зависимости $\ln K$ от $1/T$ для комплексов BCN с нативным и полимерным β-циклодекстринами, образующихся в фосфатном буферном растворе (pH 6.8).

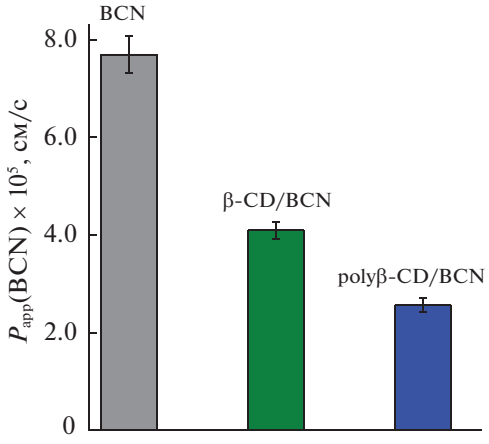


Рис. 5. Влияние природного и полимерного β-циклодекстринов (1 мас. %) на коэффициенты проницаемости барицитиниба через модельную целлюлозную мембрану (фосфатный буфер pH 7.4, температура 310.15 K).

Как известно, у поверхности мембраны формируется пограничный слой воды, и коэффициент проницаемости включает в себя прохождение лекарства через этот водный слой (P_{aq}) и непосредственно через саму мембрану (P_m) [19]. Циклодекстрины могут оказывать влияние на толщину пограничного слоя воды и таким образом понижать P_{aq}. Для выявления этого эффекта были проведены дополнительные эксперименты по определению P_{app} без перемешивания раствора в донорной камере ячейки Франца. Результаты для обоих циклодекстринов представлены на рис. 6. Сравнительный анализ полученных данных позволяет отметить следующее. Коэффициент проницаемости чистого BCN заметно ниже при отсутствии перемешивания, что свидетельствует о влиянии пограничного слоя воды у поверхности мембраны на продвижение молекул лекарства. При перемешивании раствора пограничный слой частично или полностью разрушается, за счет чего BCN проходит через мембрану быстрее. При добавлении небольших количеств циклодекстринов эта разница сохраняется, но с дальнейшим ростом концентрации как природного, так и полимерного β-CD она исчезает и становится в пределах погрешности эксперимента. Таким образом, с одной стороны, циклодекстрины способны разрушать пограничный слой воды и облегчать диффузию BCN, но с другой стороны, молекулам лекарства, находящимся в составе комплексов включения, сложнее проходить через мембрану. В результате, второй из перечисленных факторов становится преобладающим, и коэффициенты мембранной проницаемости уменьшаются.

Изменение коэффициентов мембранной проницаемости BCN в присутствии переменных количеств полимерного β-CD показано на рис. 7. Как видно из рис. 6 и 7, с ростом концентрации β-циклодекстринов происходит резкое понижение коэффициентов проницаемости BCN через целлюлозную мембрану, постепенно выходящее на плато. Полученные результаты согласуются с процессами комплексообразования BCN с β-CD. С ростом концентрации β-CD доля незакомплексованных молекул BCN, способных свободно проходить через мембрану, понижается, а доля молекул, связанных в комплекс с CD, увеличивается. В результате происходит ослабление концентрационного градиента и понижение коэффициентов проницаемости.

Таким образом, растворимость BCN может быть улучшена за счет образования супрамолекулярных комплексов включения с природным и

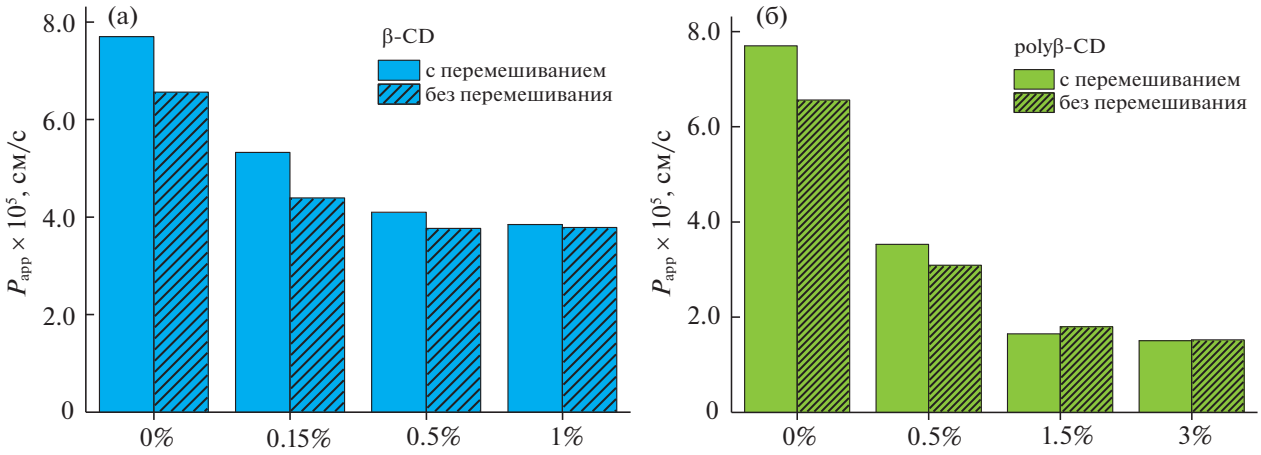


Рис. 6. Коэффициенты проницаемости BCN в присутствии природного (а) и полимерного (б) β-циклодекстринов переменной концентрации в донорном растворе с перемешиванием (500 об./мин) и без перемешивания (фосфатный буфер pH 7.4, температура 310.15 K).

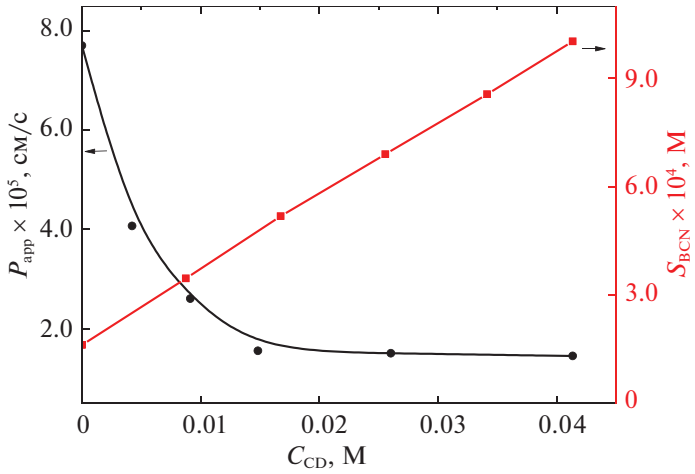


Рис. 7. Зависимости растворимости и коэффициентов проницаемости барицитиниба от концентрации полимерного β-CD в буферном растворе при 310.15 K.

полимерным β-CD. Природный и полимерный β-CD проявляют одинаковое солюбилизирующее действие по отношению к BCN, но их влияние на мембранную проницаемость является дифференцированным. Более заметное уменьшение коэффициентов мембранной проницаемости в присутствии полимерного β-CD обусловлено не только комплексообразованием, но и повышением вязкости раствора.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 21-73-00119).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Aletaha D., Neogi T., Silman A.J. et al.* // Arthritis Rheumatol. 2010. V. 62. P. 2569. https://doi.org/10.1002/art.27584
2. Drug Approval Package: Olumiant (baricitinib). 2018. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/207924Orig1s000TOC.cfm
3. Olumiant product information, European public assessment report. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/olumiant#authorisation-details-section.
4. *Garibyan A.A., Delyagina E.S., Agafonov M.A. et al.* // J. Mol. Lig. 2022. V. 360. P. 119548. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119548
5. *Alshetaili A.S.* // Z. Phys. Chem. 2018. V. 233. https://doi.org/10.1515/zpch-2018-1323
6. FDA Briefing, Arthritis Advisory Committee Meeting document, AAC Brief NDA 207924 (2018).
7. *Ansari M.J., Alschahrani S.M.* // Saudi Pharm. J. 2019. V. 27. P. 491. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.01.012
8. *Zheng X.-Q., Huang J.-F., Lin J.-L. et al.* // Colloids Surf. B. 2021. V. 199. P. 111532. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111532
9. *Braga S.S.* // Biomolecules. 2019. V. 9. P. 801. https://doi.org/10.3390/biom9120801
10. *Allahyari S., Trotta F., Valizadeh H. et al.* // Expert Opin. Drug Deliv. 2019. V. 16. P. 467. https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1591365
11. *Mura P.* // Int. J. Pharm. 2020. V. 579. P. 119181. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119181
12. *Renard E., Deratani A., Volet G. et al.* // Eur. Polum. J. 1997. V. 33. P. 49. https://doi.org/10.1016/S0014-3057(96)00123-1
13. *Di Cagno M., Nielsen T.T., Larsen K.L. et al.* // Int. J. Pharm. 2014. V. 468. P. 258. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.029
14. *Vartak R., Patki M., Menon S. et al.* // Ibid. 2020. V. 589. P. 119863. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119863
15. *Zhang W., Gong X., Cai Y. et al.* // Carbohydr. Polum. 2013. V. 95. P. 366. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.020
16. *Дружининская О.В., Смехова И.Е.* // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. Т. 20. № 3. С. 144.
17. *Amrhein J., Drynda S., Schlatt L. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 6632. https://doi.org/10.3390/ijms21186632
18. *Higuchi T., Connors K.* // Adv. Anal. Chem. Instrum. 1965. V. 4. P. 117.
19. *Dahan A., Miller J.M., Hoffman A. et al.* // J. Pharm. Sci. 2010. V. 99. P. 2739–2749. https://doi.org/10.1002/jps.22033