

На правах рукописи

Чистя

ЧИСТЯЧЕНКО ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

**ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ
ТВЕРДЫХ ДИСПЕРСИЙ ЛИПОФИЛЬНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ С ГИДРОФИЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ**

02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Душкин Александр Валерьевич, доктор химических наук

Официальные оппоненты:

Перлович Герман Леонидович, доктор химических наук, профессор, ФГБУН Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, заведующий лабораторией физической химии лекарственных соединений

Черняк Михаил Юрьевич, кандидат химических наук, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» Институт химии и химической технологии Сибирского отделения Российской академии наук - обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, старший научный сотрудник лаборатории комплексной переработки биомассы

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук

Защита состоится «19» сентября 2017 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.075.05 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50, стр. 24, конференц-зал ИХХТ СО РАН (факс +7(391)242-41-08, e-mail: dissovet@icct.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института химии и химической технологии СО РАН, www.icct.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Бурмакина Галина Вениаминовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Значительный процент коммерчески доступных и разрабатываемых лекарственных веществ (ЛВ) обладают крайне низкой растворимостью в водных средах. Это приводит к пониженной терапевтической эффективности препаратов на основе таких ЛВ. В настоящее время лидирующим инновационным направлением мировой фармации является исследование способов повышения фармакологической эффективности и безопасности применения уже используемых ЛВ, в том числе за счет их включения в так называемые средства доставки – системы, в которых молекулы ЛВ включаются в супрамолекулярные образования или наночастицы за счет формирования нековалентных связей и высвобождаются в определенных частях организма, обеспечивая целевое и регулируемое по времени действие.

В качестве вспомогательных веществ для получения таких супрамолекулярных систем – комплексов – часто используются гидрофильные растительные и синтетические полимеры. Однако для получения таких композиций в основном используются «жидкофазные» технологии, основанные на совместном плавлении или растворении компонентов и обладающие рядом существенных недостатков. В данной работе мы использовали механохимическую твердофазную технологию для синтеза таких систем, а также провели физико-химические исследования их свойств. Объекты исследования – малорастворимые лекарственные вещества, обладающие из-за этого недостаточной эффективностью и повышенной токсичностью.

Цель работы. Синтез твердых дисперсий лекарственных веществ – производных бензимидазола (албендазола и фенбендазола) и салицилатов (ацетилсалициловой и салициловой кислот) – а также стабильных нитроксильных радикалов с гидрофильными полимерами, обладающих повышенной водорастворимостью и исследование межмолекулярных взаимодействий в их твердых фазах и водных растворах.

Задачи исследования:

1. механохимическое получение твердых дисперсий албендазола, фенбендазола, ацетилсалициловой и салициловой кислот, а также стабильных нитроксильных радикалов с гидрофильными полимерами – полисахаридами арабиногалактаном и гидроксипропилкрахмалом, а также с поливинилпирролидоном – и физико-химическое исследование свойств их твердых фаз и водных растворов;
2. изучение образования межмолекулярных комплексов полимеров с молекулами лекарственных веществ в твердых фазах и водных растворах полученных твердых дисперсий;

3. синтез и изучение «спин-меченых» макромолекул полисахаридов и их межмолекулярных комплексов со стабильными радикалами для использования их в качестве «физических» зондов для исследований механизмов изменения мембранной проницаемости лекарственных веществ из растворов межмолекулярных комплексов;

4. подготовка и характеристика оптимизированных опытных образцов твердых дисперсий на основе албендазола, фенбендазола и ацетилсалициловой кислоты для фармакологических испытаний.

Научная новизна работы.

- Впервые механохимическим способом получены твердые материалы, т.н. твердые дисперсии, включающие супрамолекулярные образования полимеров арабиногалактана, гидроксиэтилкрахмала и поливинилпирролидона с лекарственными веществами албендазолом, фенбендазолом, ацетилсалициловой и салициловой кислотами, а также со стабильными нитроксильными радикалами.

- Получены данные о морфологии твердых частиц, их химическом и фазовом составе, а также о характере межмолекулярных взаимодействий в ТД албендазола, фенбендазола, ацетилсалициловой и салициловой кислот, а также стабильных нитроксильных радикалов с полимерами.

- По совокупности данных исследований химического состава, водорастворимости, ¹H ЯМР-спектроскопии, а также ИК-спектроскопии показано, что характер связей в межмолекулярных комплексах, включающих макромолекулы полимеров и липофильных ЛВ, не носит ковалентного или ионного характера. Получены сравнительные характеристики «прочности» связывания молекул в комплексах типа «гость-хозяин».

- Оптимизированы составы и условия получения ТД ЛВ и гидрофильных полимеров с целью достижения максимальных показателей химической стабильности компонентов и водорастворимости ЛВ.

- Впервые получены супрамолекулярные комплексы и «аддукты» полисахаридов арабиногалактана и гидроксиэтилкрахмала с молекулами стабильных нитроксильных радикалов и обоснован вероятный механизм увеличения мембранной проницаемости липофильных молекул из растворов их межмолекулярных комплексов с арабиногалактаном.

Практическая значимость работы состоит в том, что на основании физико-химических исследований получения и свойств межмолекулярных комплексов албендазола, фенбендазола и ацетилсалициловой кислоты с гидрофильными полимерами разработаны опытные образцы лекарственных средств повышенной фармакологической – антигельминтной и антиагрегационной – активности, продемонстрировавшие при испытаниях в специализированных организациях возможность снижения действующих доз ЛВ до 10 раз с сохранением высокой

базовой активности, а также уменьшение токсических эффектов, характерных для исследованных ЛВ. Составы композиций, способы их получения и достигнутые фармакологические характеристики защищены 3 патентами РФ.

На защиту выносятся:

- результаты физико-химических исследований механохимически полученных твердых дисперсий албендазола и фенбендазола, а также ацетилсалициловой и салициловой кислот с гидрофильными полимерами арабиногалактаном, гидроксипропилкрахмалом и поливинилпирролидоном;
- результаты физико-химических исследований супрамолекулярных комплексов вышеуказанных липофильных ЛВ и гидрофильных полимеров в водных растворах их твердых дисперсий;
- результаты исследования механохимического получения «спин-меченых» полисахаридов арабиногалактана и гидроксипропилкрахмала, ковалентно связанных с производными нитроксильных радикалов, а также межмолекулярных комплексов АГ с нитроксильными радикалами;
- результаты исследования вероятного механизма увеличения мембранной проницаемости липофильных молекул из их межмолекулярных комплексов с АГ с использованием метода спиновых зондов и меток.

Апробация работы. Результаты, изложенные в диссертационной работе, докладывались и обсуждались на следующих международных и российских научных конференциях: IX научной конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Красноярск, 2012); 4th Annual Russian-Korean Conference “Current Issues of Natural Products Chemistry and Biotechnology” (Novosibirsk, 2012); 50-ой и 51-ой международных научных студенческих конференциях «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2012, 2013); IV International Conference “Fundamental bases of mechanochemical technologies” (Novosibirsk, 2013); первой российской конференции по медицинской химии «MedChem Russia-2013» с международным участием (Москва, 2013); VI Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2014); междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии «МОБИ-Хим 2014» (Крым, пос. Новый Свет, 2014); International scientific and practical conference “Achievements and prospects for the development of phytochemistry” (Karaganda, 2015); 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry (Novosibirsk, 2015), 2016 Mogan mountain international summit on green pharmaceuticals (China, Hangzhou-Deqing, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 45 научных работ, в том числе 16 статей в рецензируемых научных журналах, 3 патента РФ, 26 тезисов докладов и материалов конференций.

Личный вклад автора. Основные экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы. Материал работы изложен на 121 странице, включает 20 таблиц, 44 рисунка, список литературы из 165 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дается обоснование актуальности темы диссертационной работы, формулируются основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе рассмотрены основные физико-химические подходы к повышению растворимости лекарственных веществ. Наибольшее внимание уделено т.н. методу твердых дисперсий, исследованию их свойств и механизмов увеличения растворимости лекарственных веществ из этих материалов.

- Рассмотрены методы и результаты исследований супрамолекулярных комплексов малорастворимых лекарственных веществ с гидрофильными полимерами и циклодекстринами.

- Механохимический путь получения ТД рассмотрен как один из наиболее перспективных для получения твердых лекарственных форм. Механохимическая обработка может приводить к различным физико-химическим превращениям веществ – агрегация твердых частиц, образование химических связей, межмолекулярных/супрамолекулярных комплексов, фазовые трансформации и пр., что позволяет варьировать свойства получаемых материалов для достижения желаемых характеристик.

- Рассмотрен механизм увеличения водорастворимости малорастворимых ЛВ за счет их включения в межмолекулярные комплексы с водорастворимыми полимерами. При этом общая измеряемая концентрация в растворе складывается из концентрации «свободных» и входящих в комплексы молекул ЛВ

$$C_{\text{лв}} = [\text{ЛВ}_{\text{pp}}] + [\text{ЛВ в комплексе}].$$

А увеличение растворимости определяется как:

$$X = C_{\text{лв}} / [\text{ЛВ}_{\text{pp}}]$$

Молекулы ЛВ в растворе и в составе комплексов должны находиться в динамическом равновесии.

- Рассмотрены результаты исследований межмолекулярных комплексов в водных растворах с помощью динамической спектроскопии ^1H ЯМР. Изучение релаксационных параметров молекул ЛВ в растворах позволяет определять величины $K_{\text{к}}$ и их термодинамические параметры, а также стехиометрию комплексов.

• По результатам анализа публикаций определена цель и обоснован выбор объектов и методов исследования, намечены основные этапы выполнения работы.

Во второй главе приведены характеристики используемых реагентов, описаны методики получения, химических анализов, исследования растворимости полученных твердых дисперсий.

Арабиногалактан (АГ) – полисахарид из древесины лиственниц *Larix sibirica* и *Larix Gmelinii*, имеющий высоко разветвленное строение и молекулярную массу 9-18 кДа.

Гидроксиэтилкрахмал 200/0,5 (ГЭК) – полисахарид, получаемый химической модификацией крахмала.

Поливинилпирролидон К12 (ПВП) – синтетический водорастворимый полимер.

Использовались «фармакопейные» субстанции лекарственных веществ [5-(пропилтио)-1Н-бензимидазол-2-ил] карбаминовой кислоты метиловый эфир - **албендазол (АБЗ)**; [5-фенилтио-1Н-бензимидазол-2-ил] карбаминовой кислоты метиловый эфир - **фенбендазол (ФБЗ)**; 2-ацетилоксибензойная кислота - **ацетилсалициловая кислота (АСК)**; 2-гидроксибензойная кислота - **салициловая кислота (СК)**.

Также использовались **стабильные нитроксильные радикалы**, синтезированные в лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН им. Н.И.Ворожцова, г. Новосибирск.

Описаны используемые условия механохимической обработки и примененных физико-химических методов исследования - высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), гель-проникающая хроматография (ГПХ), рентгенофазовый и термический анализы, ИК спектроскопия, электронная микроскопия, лазерная гранулометрия, ¹Н ЯМР и ЭПР спектроскопии.

В третьей главе представлены результаты исследования механохимически полученных твердых дисперсий полимеров с малорастворимыми лекарственными веществами, а также условий их получения. В зависимости от липофильности ЛВ физико-химические свойства твердых фаз и водных растворов полученных ТД могут отличаться, поэтому представляет интерес их сравнение.

Механохимическое получение и свойства твердых дисперсий албендазола и фенбендазола с гидрофильными полимерами

В данном разделе приведены результаты исследования получения твердых дисперсий производных бензимидазола – лекарственных веществ антигельминтного действия АБЗ и ФБЗ – с гидрофильными водорастворимыми полимерами - АГ, ГЭК и ПВП (см. Рис.1).

Оба ЛВ обладают высокой липофильностью ($\log P_{O/W}$ (АБЗ) = 3,83, $\log P_{O/W}$ (ФБЗ) = 3,93) и практически нерастворимы в воде. Из-за этого при пероральном приеме они плохо абсорбируются из желудочно-кишечного тракта, что снижает их лекарственную эффективность.

Механохимическим способом были получены композиции АБЗ и ФБЗ с АГ, ГЭК и ПВП с массовыми соотношениями ЛВ:полимер 1:5, 1:10 и 1:20.

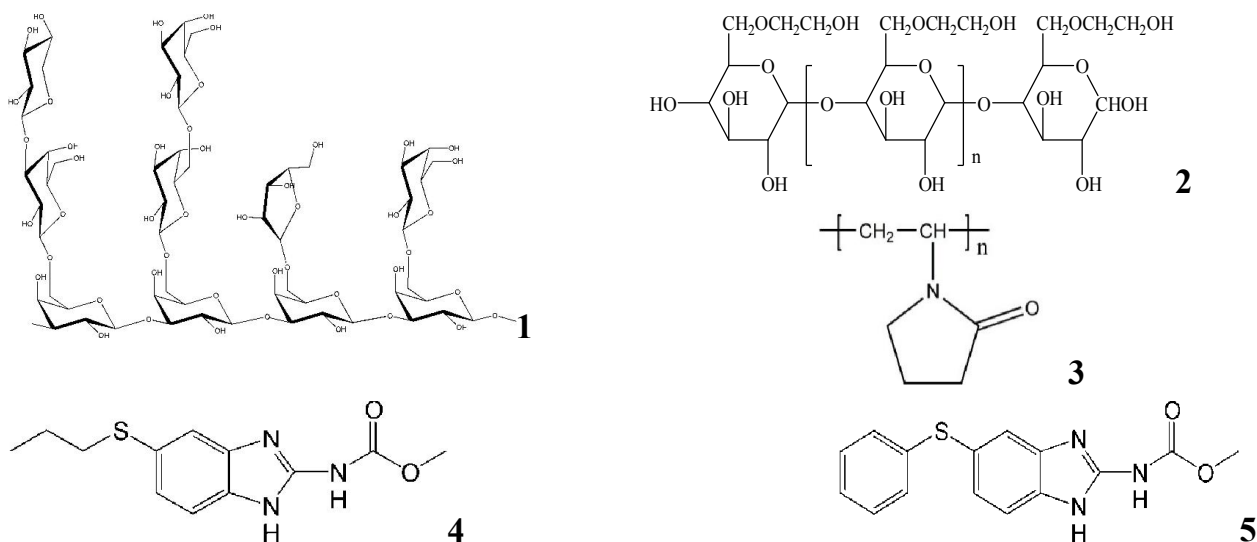


Рис. 1. Структурные формулы АГ (1), ГЭК (2), ПВП (3), АБЗ (4) и ФБЗ (5).

Исследование ТД методом электронной микроскопии показало, что во время совместной механохимической обработки ЛВ с полимерами происходит разрушение частиц ЛВ и полимеров и образуется полидисперсный порошок, размер частиц которого варьируется в зависимости от используемого полимера, но не превышает 100 мкм.

На рис. 2 представлены дифрактограммы твердых дисперсий на примере композиций с ГЭК в массовом соотношении ЛВ:ГЭК 1:10. Видно, что в результате механохимической обработки, интенсивности рефлексов кристаллических фаз АБЗ и ФБЗ существенно уменьшаются, что свидетельствует о снижении степени кристалличности ЛВ в получаемых ТД.

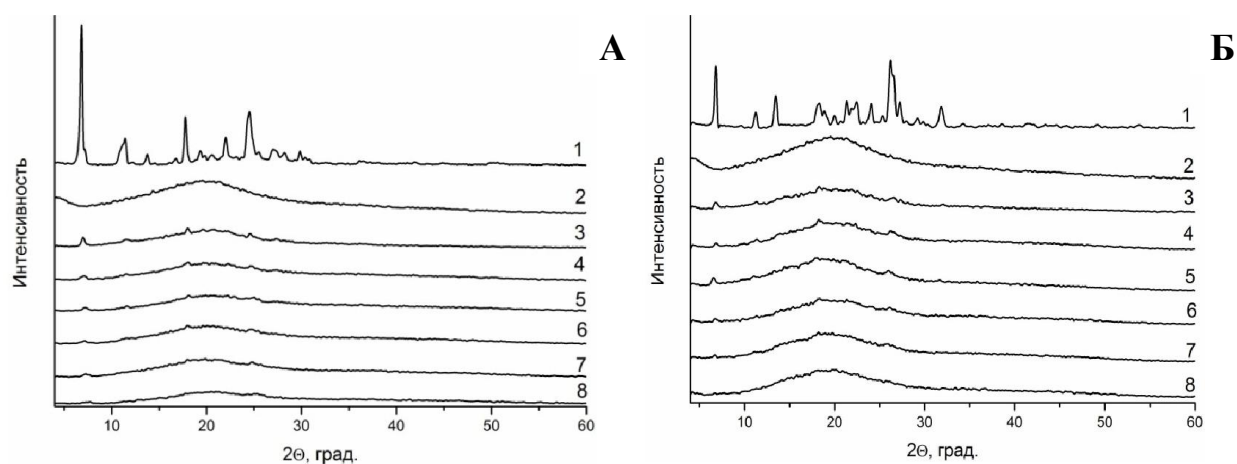


Рис. 2. Дифрактограммы твердых дисперсий АБЗ (А) и ФБЗ (Б) с ГЭК в массовом соотношении ЛВ:полимер 1:10: 1 – ЛВ; 2 – ГЭК; 3 – физическая смесь ЛВ:ГЭК; 4, 5, 6, 7, 8 – композиции ЛВ:ГЭК, обработанные в шаровой мельнице в течение 2ч, 4ч, 8ч, 16ч и 24ч, соответственно.

Результаты анализа гранулометрического состава водных суспензий полученных твердых дисперсий ЛВ с полимерами приведены в таблице 1. При этом нерастворенные частицы ЛВ, вероятно, образуются путем его осаждения из пересыщенного раствора полученных ТД. Наблюдаемое уменьшение размеров частиц ЛВ также может служить фактором повышения фармакологической активности.

Таблица 1. Массовая (объемная) доля частиц (%) в водных суспензиях АБЗ и его твердых дисперсий с АГ.

Состав твердой дисперсии, массовое соотношение	Размер частиц, мкм		
	< 1,8 мкм	< 5,5 мкм	< 16,6 мкм
АБЗ исходный	18,9	49,4	85,4
АБЗ:АГ 1:5	35,4	88,5	100,0
АБЗ:АГ 1:10	40,9	95,4	100,0
АБЗ:АГ 1:20	28,2	84,8	100,0

В таблице 2 приведены величины растворимости АБЗ из его твердых дисперсий с полимерами. Во всех случаях мы наблюдаем увеличение растворимости ЛВ из его твердых дисперсий с полимерами, что является наиболее существенным доказательством образования межмолекулярных комплексов в водных растворах. После механической обработки исходных ЛВ не происходит увеличения их растворимости, значит, комплексообразование является основной составляющей, которая дает вклад в растворимость. Также во всех случаях

растворимость ЛВ из механохимически полученных ТД многократно выше, чем в случае физических смесей.

Таблица 2. Растворимость АБЗ из его физических смесей (ф/с) и твердых дисперсий (м/а) с АГ, ГЭК и ПВП в воде. Погрешность анализа $\pm 3\%$.*

Состав композиции, массовое соотношение, способ получения	Концентрация ЛВ в воде, мг/л	Увеличение растворимости	Содержание действующего вещества, % от теоретического
Исходный АБЗ	1,0	-	100
АБЗ:АГ 1:10 ф/с	12	12	-
АБЗ:АГ 1:10 м/а	38	38	98
АБЗ:АГ 1:20 ф/с	12	12	-
АБЗ:АГ 1:20 м/а	40	40	100
АБЗ:ГЭК 1:10 ф/с	5,3	5,3	-
АБЗ:ГЭК 1:10 м/а	30	30	99
АБЗ:ПВП 1:10 ф/с	2,2	2,2	-
АБЗ:ПВП 1:10 м/а	8,3	8,3	100

* - время совместной обработки ЛВ и полимеров оптимизировалось с точки зрения достижения максимальной растворимости и стабильности ЛВ при механохимическом синтезе

Аналогичные данные по растворимости были получены и для твердых дисперсий ФБЗ – увеличение растворимости составило от 2 до 15 раз в зависимости от полимера, наибольшие величины растворимостей получены для твердых дисперсий с ГЭК.

Для подтверждения наличия межмолекулярных образований типа «гость-хозяин» были измерены времена спин-спиновой релаксации T_2 ароматических протонов АБЗ водных растворов при pH=1,2. Было показано, что кинетика спада сигнала эха протонов АБЗ ускоряется в комплексе по сравнению с чистым раствором АБЗ (рис. 3, табл. 3). Уменьшение времени релаксации указывает на уменьшение подвижности молекул АБЗ и может служить доказательством образования межмолекулярных комплексов. В случае комплексов с ПВП и с АГ время релаксации ниже, наблюдается моноэкспоненциальный спад сигнала спинового «эхо», что указывает на наличие «быстрого» обмена (по сравнению с временем релаксации) молекулами «гостя» между комплексом и раствором. В случае комплексов АБЗ с ГЭК наблюдаемая кинетика спада сигнала носит биэкспоненциальный характер, что указывает на «медленный» обмен между комплексом и раствором. При этом только 20% АБЗ находится в комплексе.

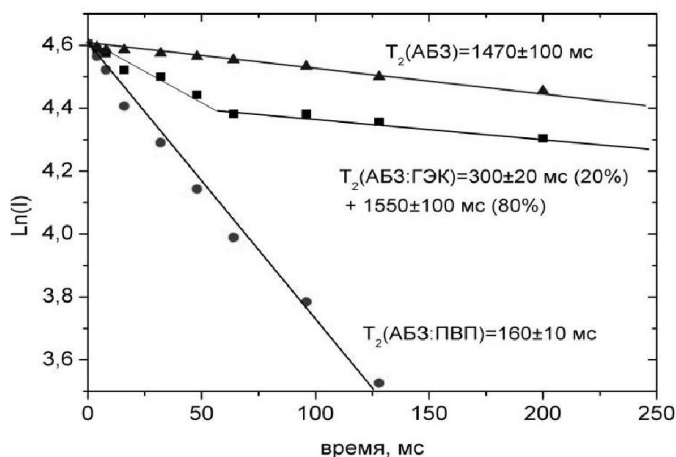


Рис. 3. Зависимости интенсивности сигнала эха (в логарифмическом масштабе) ароматических протонов албендазола от времени при 300 К для исходного АБЗ и его межмолекулярных комплексов с ПВП и ГЭК в водном растворе при рН = 1.2.

Таблица 3. Времена релаксации (T_2 , сек) ароматических протонов албендазола в водных растворах в чистом виде и в составе комплексов с АГ, ПВП и ГЭК.

Состав дисперсии, соотношение	твердой массовой	АБЗ	АБЗ:ПВП 1:10	АБЗ:АГ 1:10	АБЗ:ГЭК 1:20
		1,47±0,05	0,16±0,01	0,83±0,02	0,30±0,02 (20%) 1,55±0,10 (80%)

Согласно данным об увеличении растворимости АБЗ и ФБЗ из их твердых дисперсий с полимерами, прочность комплексов для АБЗ возрастает в ряду ПВП<ГЭК<АГ, а для ФБЗ в ряду ПВП<АГ<ГЭК. С другой стороны, по данным ЯМР, для АБЗ этот ряд составляет ГЭК<АГ<ПВП. Различия, вероятно, обусловлены условиями проведения анализов – концентраций и рН исследуемых растворов. Тем не менее, оба подхода подтверждают факт образования межмолекулярных комплексов.

Молекулы полимеров содержат полярные группы, такие как, например, гидроксильные, молекулы АБЗ и ФБЗ также содержат карбонильные и имино-группы, между такими группами возможно образование водородных связей. Однако, при исследовании ИК спектров механохимически полученных ТД, сдвига характеристичных полос для групп, отвечающих за образование водородных связей (C=O и NH-), не наблюдалось.

По-нашему мнению, комплексы типа гость-хозяин образуются путем «проникновения» молекул ЛВ в объемную структуру макромолекул полимеров за счет т.н. гидрофобных взаимодействий, которые описываются в литературе как одни из основных движущих сил при образовании комплексов «включения» ЛВ с циклодекстринами.

Механохимическое получение и исследование свойств твердых дисперсий ацетилсалициловой и салициловой кислот с полисахаридом арабиногалактаном

В данном разделе приведены результаты исследования возможности механохимического получения твердых дисперсий арабиногалактана с АСК и ее первичного метаболита СК (Рис. 4), молекулы которых являются менее липофильными ($\log P_{O/W}$ (АСК)=1,18, $\log P_{O/W}$ (СК)=2,19) по сравнению с веществами, которые исследовались в предыдущем разделе. Были получены композиции АСК и СК с АГ с массовыми соотношениями ЛВ:АГ 1:10 и 1:20.

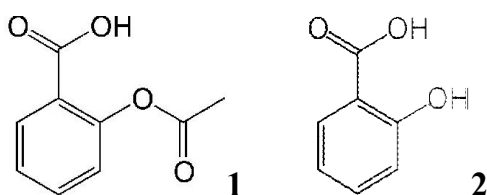


Рис. 4. Структурные формулы АСК (1) и СК (2).

С помощью метода электронной микроскопии была исследована морфология исходных веществ и полученных ТД (рис. 5). При механохимической обработке происходит разрушение кристаллических частиц ЛВ и сферообразных частиц АГ и образуется полидисперсный порошок, состоящий из частиц размером 5-20 мкм и их агрегатов.

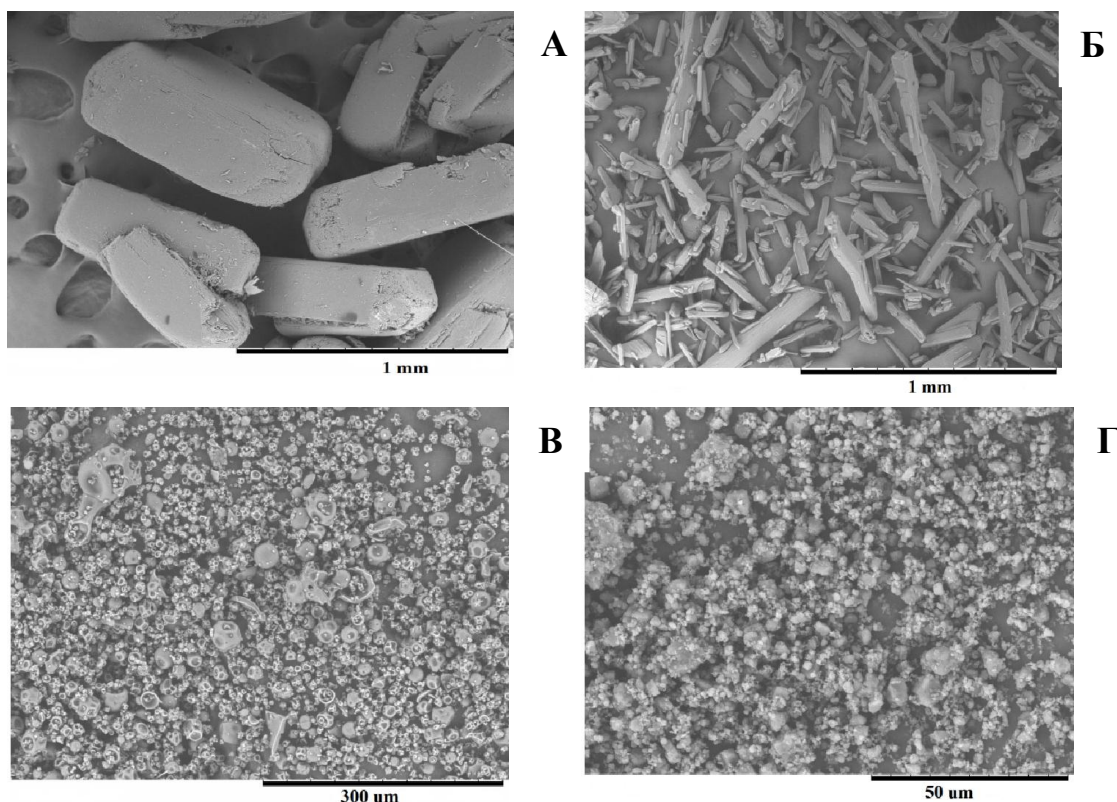


Рис.5. Электронные микрофотографии: А – АСК исходная, Б – СК исходная, В – АГ исходный, Г – твердая дисперсия АГ/СК в массовом соотношении 10/1.

Результаты РФА полученных твердых дисперсий на примере композиций СК и АГ представлены на рис. 6. Композиции АСК и АГ имеют аналогичные качественные характеристики. При механической обработке исходных лекарственных субстанций в шаровой мельнице в течение 30 минут происходит незначительное разупорядочение кристаллической структуры ЛВ. В результате механохимической обработки смесей ЛВ с АГ интенсивности рефлексов РФА ЛВ существенно уменьшаются, следовательно, происходит значительная потеря кристалличности твердых фаз исследованных ЛВ, вплоть до их почти полного разупорядочения.

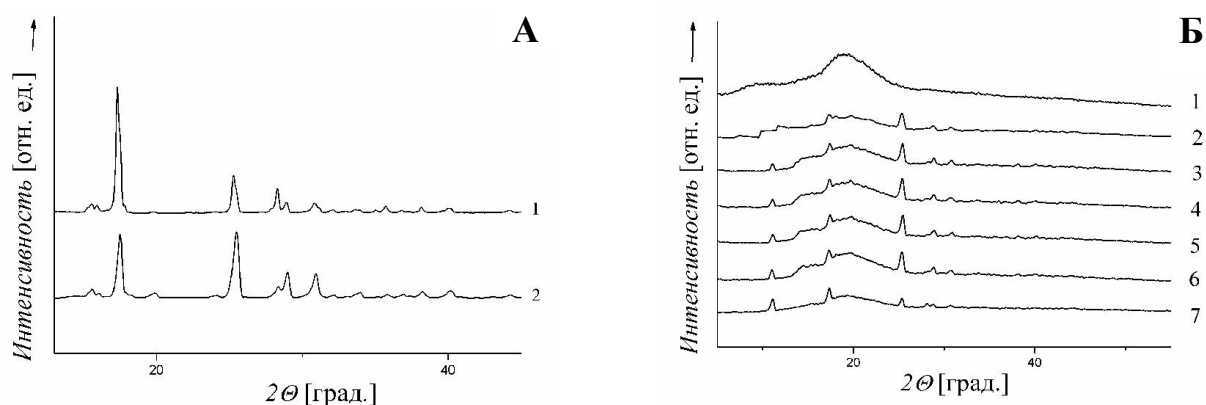


Рис. 6. Дифрактограммы: А – СК исходная – (1), обработанная в мельнице в течение 30 мин. – (2); Б - АГ исходный – (1), АГ/СК в массовом соотношении 10/1, без обработки – (2), обработанные в мельнице в течение 2 часов – (3), 4 часов – (4), 8 часов – (5), 16 часов – (6), 24 часов – (7).

Более детально были изучены тепловые эффекты, а именно, динамика изменения удельной теплоты плавления в зависимости от времени механической обработки, рассчитанная по данным ДСК (рис. 7).

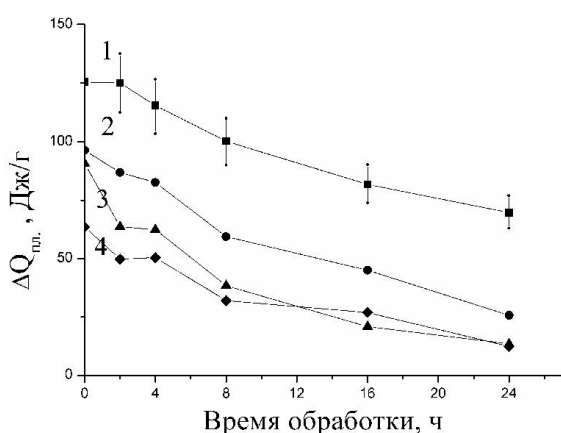


Рис. 7. Изменение удельной теплоты плавления, нормированной на количество ЛВ в образце, в зависимости от времени обработки в мельнице: 1 - АГ/АСК в массовом соотношении 10/1; 2 - АГ/СК в массовом соотношении 10/1; 3 - АГ/АСК в массовом соотношении 20/1; 4 - АГ/СК в массовом соотношении 20/1.

Потеря кристалличности ЛВ по нашему мнению может быть связана с диспергированием его молекул в объем твердой фазы АГ, образованием твердых

растворов и межмолекулярных комплексов. Данные ДСК позволяют оценить долю такого диспергированного ЛВ, по-видимому, находящегося в комплексе с АГ. Так, доля комплексов в твердой фазе может составлять 58 и 92% для комплексов АГ/АСК 1/10 и 1/20, соответственно, и 86 и 93% для комплексов АГ/СК 1/10 и 1/20. Комплексы СК с АГ вероятно образуются легче, чем комплексы АСК.

Исследование полученных дисперсий методом ИК-спектроскопии не выявило существенных изменений в спектрах в результате обработки. Это может указывать на то, что при механохимическом получении ТД не образуются новые ковалентные, ионные и водородные связи. Поскольку исследуемые кислоты являются достаточно гидрофильными молекулами, значительного увеличения их растворимости из ТД также не происходит (см. таблицу 4).

Таблица 4. Растворимость ЛВ из полученных твердых дисперсий.

Состав твердой дисперсии, массовое соотношение	Растворимость ЛВ из твердой дисперсии, г/л / увеличение растворимости по отношению к исходному ЛВ
АГ/СК 10/1	2,4/1,1
АГ/АСК 10/1	2,8/1,1
АГ/СК 20/1	2,7/1,2
АГ/АСК 20/1	3,3/1,3

Поэтому для доказательства образования межмолекулярных комплексов СК и АСК с АГ типа «гость-хозяин» и исследования их количественных характеристик был применен метод ^1H ЯМР-релаксации в растворах и были проведены измерения времен спин-спиновой релаксации T_2 ароматических протонов СК и АСК в водных растворах, а также их комплексов с АГ, полученных при совместной механохимической активации и путем смешения компонентов в растворе. Отметим, что все измеренные кинетики описываются моноэкспоненциальной зависимостью, что в случае комплексов означает наличие быстрого обмена молекулами «гостя» между комплексом и раствором. Более короткие времена T_2 указывают на замедление вращательной подвижности молекулы «гостя» и, соответственно, ее более «прочное» связывание с макромолекулой полимера.

Кинетика спада сигнала эхо протонов СК существенно укорачивается в присутствии АГ по сравнению с чистым водным раствором (рис. 8). Это является доказательством образования комплекса. Аналогичные зависимости были получены и для АСК в присутствии АГ. Также оценены величины констант стабильности исследуемых комплексов.

Из данных таблицы 5 можно сделать вывод, что комплексы, приготовленные путем смешения водных растворов СК или АСК с АГ, обладают меньшей

стабильностью/прочностью. Наблюдаемое время релаксации протонов молекул «гостя» в таких растворах значительно длиннее, чем в растворах композиций полученных механохимическим способом.

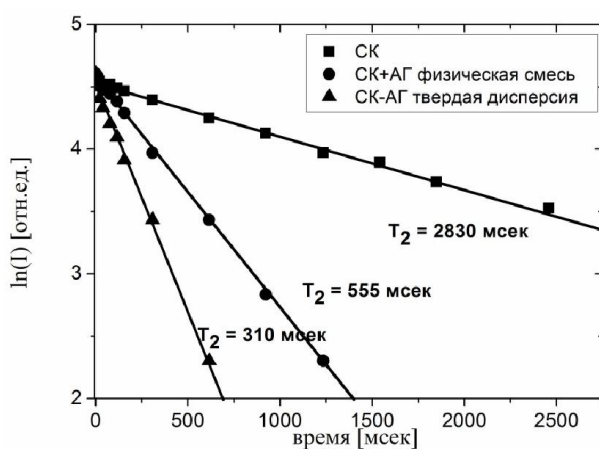


Рис. 8. Зависимости интенсивности сигнала эхо (в логарифмическом масштабе) ароматических протонов СК от времени в водных растворах механохимически полученной твердой дисперсии СК-АГ в массовом соотношении 1:10, физической смеси исходных компонентов и СК без добавления АГ (■ – эксперимент, сплошные линии – расчет).

Таблица 5. Времена релаксации T_2 (в мсек) ароматических протонов СК и АСК в чистом виде и в комплексах с АГ приготовленных механохимическим методом (м/х) и смешением компонентов в растворе (ж/ф). Погрешность расчета T_2 составляет 3-4%.

Состав твердой дисперсии, массовое соотношение, способ получения	1:20, м/х	1:10, м/х	1:20, ж/ф	1:10, ж/ф	Растворы без АГ
АСК	435	860	885	1000	4300
СК	240	310	490	555	2830

По нашему мнению, именно в процессе механохимического получения ТД, аналогично результатам, изложенным в предыдущем разделе, происходит образование комплексов ЛВ с АГ в твердых фазах. Образованию комплексов способствуют импульсные механические нагрузки, вызывающие деформацию макромолекул и облегчающие «проникновение» небольших молекул ЛВ в объем макромолекулы «хозяина». При смешении исходных компонентов в растворе взаимодействие липофильных молекул ЛВ с макромолекулами АГ затруднено, вероятно, из-за образования гидратной оболочки его макромолекул.

Исследование возможных механизмов увеличения трансмембранного переноса лекарственных веществ из растворов их межмолекулярных комплексов

Несмотря на значительный массив фармакологических и физико-химических данных о полученных комплексах, механизм повышения фармакологической

активности ЛВ остается неясным. Одно из возможных объяснений данного явления это повышение биодоступности ЛВ за счет прямой абсорбции комплексов из ЖКТ в кровеносную систему и доставка ЛВ к чувствительным рецепторам. Другое объяснение состоит в увеличении трансмембранного транспорта ЛВ за счет создания повышенной концентрации молекул ЛВ в пристеночном водном слое мембран ЖКТ в свободном виде и в виде комплексов. При этом убыль свободных абсорбированных молекул ЛВ восполняется за счет диссоциации комплексов. Так как выделение макромолекул полисахаридов из крови и биологических жидкостей затруднено, для их функционализации был использован метод спиновых меток и зондов – введение стабильных нитроксильных радикалов. Для этого нами были получены «спин-меченые» полисахариды АГ и ГЭК и изучено распределение парамагнитных центров радикалов в организме лабораторных животных.

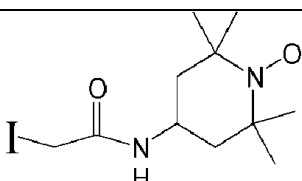
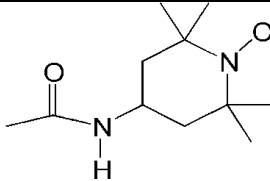
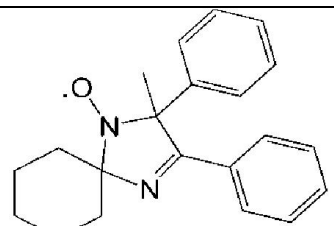
Введение спиновой метки в полисахариды методом ковалентной «пришивки» производилось в планетарной мельнице (40g) путем реакции этерификации по схеме:



Далее рассмотрим полученные данные на примере «спин-меченого» АГ.

В таблице 6 приведены характеристики использованных в работе стабильных нитроксильных радикалов, способ их связывания с макромолекулами полисахарида, а также растворимость для некоторых радикалов, с которыми были получены межмолекулярные комплексы.

Таблица 6. Характеристики стабильных нитроксильных радикалов

Способ связывания радикала с полисахаридом, сокращенное обозначение	Структурная формула	Растворимость радикала исходного/в комплексе с АГ, г/л
образование ковалентной связи («аддукт») R1- I		не определялись
межмолекулярный комплекс R2		> 6 / > 6
межмолекулярный комплекс R3		0,0002 / 0,19

В Таблице 7 приведены характеристики «спин-меченых» продуктов АГ. Спектры ЭПР полученных «аддуктов» и межмолекулярных комплексов в твердых фазах и в растворах приведены на рис. 9. В твердых образцах исходных радикалов наблюдается синглетная линия, обусловленная спиновым обменом близко расположенных ПЦ. Для твердых фаз «аддуктов» и комплексов радикалов характерны спектры от хаотично ориентированных матрично-изолированных нитроксильных радикалов. В их водных растворах спектр ЭПР состоит из триплета, обусловленного изотропным электронно-ядерным спин-спиновым взаимодействием. Причем для «свободных» или слабо связанных радикалов спектр симметричен. Напротив, для «аддуктов» R1-АГ проявляется существенная асимметрия линий за счет ограничений диффузионной подвижности радикалов. Это свидетельствует об иммобилизации радикала эфирной связью с макромолекулой АГ. В ЦКП НИОХ СО РАН были проведены исследования распределения спиновых меток из полученных «аддуктов» и комплексов в организме лабораторных животных - крыс. Для этого образцы «спин-меченого» АГ вводились животным внутрижелудочно и внутривентриально, затем регистрировались спектры ЭПР крови и биологических жидкостей. Сравнивалась форма спектра и концентрации ПЦ при различных моделях – «аддукт» R1-АГ и комплексы АГ с гидрофильным (R2) и гидрофобным (R3) радикалами.

Таблица 7. Характеристики «аддуктов» и межмолекулярных комплексов АГ с радикалами, рассчитанные по данным ЭПР в твердой фазе.

Образец	Число спинов в твердом виде, спин/мг	M _w , кДа	Количество парамагнитных центров, приходящихся на макромолекулу
R1-I	$1,48 \times 10^{18}$	-	-
R1-АГ «аддукт»	$5,14 \times 10^{16}$	10,1	0,82
АГ/R2 межмолекулярный комплекс	$1,8 \times 10^{16}$	16,1	0,5
АГ/R3 межмолекулярный комплекс	$1,42 \times 10^{16}$	16,3	0,4

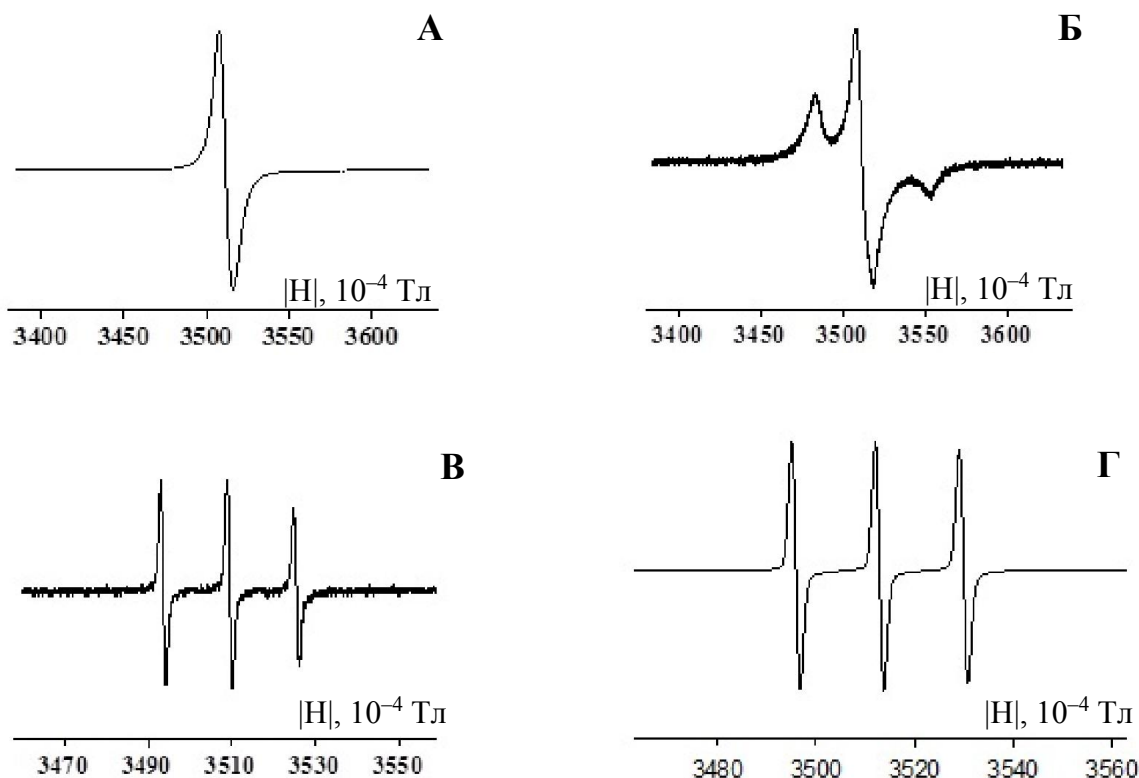


Рис. 9. Спектры ЭПР в твердой фазе (А, Б) и в растворе (В, Г): А - R1-I; Б – аддукт R1-АГ; В – аддукт R1-АГ; Г – комплекс R2-АГ.

Из проведенных экспериментов были сделаны следующие выводы:

- при внутрижелудочном введении «аддукта» R1-АГ он подвергается пресистемному метаболизму, и происходит высвобождение радикала R1-ОН, который всасывается в ЖКТ и проявляет характерные «симметричные» спектры ЭПР в крови и моче. При внутрибрюшинном введении R1-АГ, когда вещества поступают напрямую в кровоток, в крови и моче животного обнаруживается исходный «аддукт» R1-АГ («несимметричный» спектр ЭПР). Полученные данные указывают, что макромолекулы спин-меченого АГ не абсорбируются в ЖКТ, а «аддукт» R1-АГ может существовать в кровотоке только если он вводится внутрибрюшинно. По результатам данного эксперимента можно заключить, что АГ не способен в заметной степени попадать в кровоток из ЖКТ при пероральном введении и, тем самым, не может служить средством целевой доставки ЛМ к чувствительным рецепторам;
- в результате эксперимента с межмолекулярными комплексами АГ с гидрофильным и гидрофобным радикалом было выявлено, что абсорбция радикала R2, обладающего достаточной растворимостью в воде, не меняется в присутствии АГ. При пероральном введении практически нерастворимого в воде радикала R3 он слабо абсорбируется, но введенный в составе комплекса с АГ, абсорбируется

полнее, о чем свидетельствует повышение его концентрации в моче (в ~7 раз) по сравнению с исходным радикалом.

Таким образом, можно заключить, что комплексообразование малорастворимых лекарственных веществ с АГ способствует повышению абсорбции/мембранной проницаемости лекарственных веществ из ЖКТ по т.н. «концентрационному» механизму – повышению общей концентрации свободных и находящихся в комплексах молекул ЛВ в «пристеночном» слое мембран и последующем «пассивном» трансмембранном транспорте. Аналогичный механизм ускорения трансмембранного переноса описан в литературе для комплексов ЛВ с циклодекстринами.

ВЫВОДЫ

1. Механохимическим путем впервые получены и исследованы твердые дисперсии липофильных лекарственных веществ – албендазола, фенбендазола, ацетилсалициловой и салициловой кислот – а также стабильных нитроксильных радикалов с водорастворимыми полимерами – арабиногалактаном, гидроксиэтилкрахмалом и поливинилпирролидоном – образующие в водных растворах межмолекулярные комплексы, изучены их физико-химические характеристики в твердых фазах и водных растворах.
2. Методом динамической спектроскопии ^1H ЯМР, а также на основании анализов химического состава и увеличения водорастворимости, показано существование межмолекулярных комплексов молекул полимеров и исследованных липофильных ЛВ в водных растворах. Показано преимущество механохимического пути их синтеза для достижения наибольшего увеличения растворимости (до 40 раз) лекарственных веществ и большей стабильности комплексообразования.
3. Впервые синтезированы и охарактеризованы методом спектроскопии ЭПР межмолекулярные комплексы и «аддукты» полисахаридов арабиногалактана и гидроксиэтилкрахмала с молекулами стабильных нитроксильных радикалов.
4. При использовании метода спектроскопии ЭПР обоснован механизм увеличения мембранной проницаемости липофильных молекул – стабильных нитроксильных радикалов – из их межмолекулярных комплексов с арабиногалактаном. Показано, что макромолекулы арабиногалактана не являются переносчиками молекул лекарственных веществ через мембраны ЖКТ.
5. Продемонстрирована возможность снижения действующих доз ЛВ до 10 раз и снижение токсических эффектов при проведении фармакологических испытаний полученных опытных образцов композиций албендазола и фенбендазола с АГ, ГЭК и ПВП, а также ацетилсалициловой кислоты с АГ в НИОХ СО РАН, ИЦиГ СО РАН и ВНИИ паразитологии им. К.И. Скрябина.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Душкин А.В., Метелева Е.С., Чистяченко Ю.С., Халиков С.С. Механохимическое получение и свойства твердых дисперсий, образующих водорастворимые супрамолекулярные системы // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 1, ч. 3. – С. 741-749.
2. Душкин А.В., Метелева Е.С., Чистяченко Ю.С., Поляков Н.Э. Химические трансформации и молекулярная динамика полисахаридов и их межмолекулярных комплексов с лекарственными веществами в растворах и твердых фазах // *Фундаментальные исследования*. – 2013 – № 1, ч. 3. – С. 789-795.
3. Душкин А.В., Чистяченко Ю.С., Толстикова Т.Г., Хвостов М.В., Поляков Н.Э., Ляхов Н.З., Толстиков Г.А. Фармакологические и физико-химические свойства механохимически синтезированных супрамолекулярных комплексов ацетилсалициловой кислоты и полисахарида арабиногалактана из лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii* // *Доклады академии наук*. – 2013. – Т. 451, № 1. – С. 107-109.
4. Чистяченко Ю.С., Хвостов М.В., Белоусов А.И., Жукова Н.А., Пахарукова М.Ю., Катохин А.В., Халиков С.С., Толстикова Т.Г., Душкин А.В., Мордвинов В.А., Ляхов Н.З. Физико-химические свойства и противоопиоидное действие механохимически синтезированных супрамолекулярных комплексов албендазола и полисахарида арабиногалактана из лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii* // *Доклады академии наук*. – 2014. – Т. 456, № 6. – С.741-743.
5. Chistyachenko Yu.S., Dushkin A.V., Polyakov N.E., Khvostov M.V., Tolstikova T.G., Tolstikov G.A., Lyakhov N.Z. Polysaccharide arabinogalactan from larch *Larix sibirica* as carrier for molecules of salicylic and acetylsalicylic acid: Preparation, physicochemical and pharmacological study // *Drug Delivery*. – 2015. – Vol. 22, N 3. –P. 400-407.
6. Душкин А.В., Чистяченко Ю.С., Комаров Д.А., Хвостов М.В., Толстикова Т.Г., Журко И.Ф., Кирилук И.А., Григорьев И.А., Ляхов Н.З. О механизме увеличения мембранной проницаемости веществ из их межмолекулярных комплексов с полисахаридом арабиногалактаном из лиственниц *Larix Sibirica* и *Larix Gmelinii* // *Доклады академии наук*. – 2015. – Т. 460, № 1. – С. 107-110.
7. Chistyachenko Yu.S., Meteleva E.S., Pakharukova M.Y., Katokhin A.V., Khvostov M.V., Varlamova A.I., Glamazdin I.I., Khalikov S.S., Polyakov N.E., Arkhipov I.A., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A., Dushkin A.V., Lyakhov N.Z. Physicochemical and pharmacological study of the newly synthesized complex of albendazole and polysaccharide arabinogalactan from larch wood // *Current Drug Delivery*. – 2015. –Vol. 12, N. 5. –P. 477-490.

8. Халиков С.С., Чистяченко Ю.С., Душкин А.В., Метелева Е.С., Поляков Н.Э., Архипов И.А., Варламова А.И., Гламаздин И.И., Данилевская Н.В. Создание антигельминтных препаратов повышенной эффективности на основе межмолекулярных комплексов действующих веществ с водорастворимыми полимерами, в том числе с полисахаридами // Химия в интересах устойчивого развития. – 2015.- № 5. – С. 567-577.

Патенты РФ:

1. Пат. 2545797 РФ. Композиция на основе албендазола с противоописторхозной фармакологической активностью / А.В. Душкин, Е.С. Метелева, Н.З. Ляхов, Ю.С. Чистяченко, С.С. Халиков, Т.Г. Толстикова, М.В. Хвостов, Д.С. Баев, Н.А. Жукова, В.А. Мордвинов, А.В. Катохин, М.Ю. Пахарукова // Бюл. – 2015. – № 10.

2. Пат. 2546535 РФ. Противопаразитарное средство на основе альбендазола и способ его использования для лечения кишечных гельминтозов млекопитающих / А.В. Душкин, Ю.С. Чистяченко, М.С. Халиков, С.С. Халиков, И.А. Архипов, И.И. Гламаздин, И.М. Одоевская, Н.З. Ляхов // Бюл. – 2015. – № 10.

3. Пат. 2558922 РФ. Антигельминтное средство и способ его получения / А.И. Варламова, И.А. Архипов, С.С. Халиков, А.В. Душкин, Ю.С. Чистяченко, М.С. Халиков, М.В. Данилевская // Бюл. – 2015. – № 22.

Тезисы докладов и материалы конференций:

1. *Chistyachenko Yu.S., Dushkin A.V., Polyakov N.E., Tolstikova T.G., Khvostov M.V.* Mechanochemical obtaining of solid dispersions of salicylic and acetylsalicylic acids with polysaccharide arabinogalactan and investigation of their properties in solid phases and water solutions // Book of abstracts of IV International Conference “Fundamental bases of mechanochemical technologies”. Novosibirsk, June 25-28, 2013. P. 31.

2. *Чистяченко Ю.С., Хвостов М.В., Белоусов А.И., Жукова Н.А., Пахарукова М.Ю., Катохин А.В., Халиков С.С., Толстикова Т.Г., Душкин А.В., Мордвинов В.А., Ляхов Н.З.* Противоописторхозный препарат на основе супрамолекулярных комплексов албендазола и полисахарида арабиногалактана из лиственниц *Larix Sibirica* и *Larix Gmelinii* // Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». Барнаул, 22-24 марта 2014г. С.171-172.

3. *Chistyachenko Yu.S., Dushkin A.V., Tsyrenova B.D., Tolstikova T.G., Polyakov N.E.* Arabinogalactan from larch wood as drug carrier // Book of abstracts of International scientific and practical conference “Achievements and prospects for the development of phytochemistry”. Karaganda, April 10-11, 2015. P. 134.

4. *Chistyachenko Yu.S., Dushkin A.V., Meteleva E.S., Pakharukova M.Y., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Polyakov N.E., Khvostov M.V., Tolstikova T.G.*

Physicochemical properties and anti-opisthorchosis effect of mechanochemically synthesized supramolecular complexes of albendazole with polysaccharide arabinogalactan from larch wood // Book of abstracts of 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry “MedChem-2015”. Novosibirsk, July 5-10, 2015. P. 160.

5. *Chistyachenko Yu.S., Dushkin A.V., Polyakov N.E., Khalikov S.S., Khvostov M.V., Tolstikova T.G., Komarov D.A., Arkhipov I.A.* Mechanochemical preparation of pharmaceutical solid dispersions of low soluble drugs // Conference abstract 2016 Mogan mountain international summit of green pharmaceuticals. China, Hangzhou-Deqing, November 3-4, 2016. P.53.

Список сокращений

АБЗ – албендазол; **АГ** – полисахарид арабиногалактан из лиственницы Сибирской и Гмелина; **АСК** – ацетилсалициловая кислота;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГПХ – гель-проникающая хроматография; **ГЭК** – гидроксипроксиэтилкрахмал;

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия;

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

ЛВ – лекарственное вещество;

ПВП – поливинилпирролидон; **ПЦ** – парамагнитный центр;

РФА – рентгенофазовый анализ;

СК – салициловая кислота;

ТД – твердая дисперсная система/твердая дисперсия;

ФБЗ – фенбендазол;

M_w – средневесовая молекулярная масса полимера;

P_{o/w} – коэффициент распределения вещества в системе н-октанол – вода.