

УДК 544.33; 544.35

DOI: 10.15372/KhUR20150514

## Комплексообразование $\beta$ -циклодекстрина и гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина с биологически активным соединением на основе 1,2,4-тиадиазола

М. А. БРУСНИКИНА<sup>1</sup>, М. В. ЧИСЛОВ<sup>1</sup>, О. И. СИЛЮКОВ<sup>1</sup>, Т. В. ВОЛКОВА<sup>1</sup>, А. Н. ПРОШИН<sup>2</sup>, И. В. ТЕРЕХОВА<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН, ул. Академическая, 1, Иваново 153045 (Россия)

E-mail: ivt@isc-ras.ru

<sup>2</sup>Институт физиологически активных веществ РАН, Северный пр., 1, Черноголовка 142432 (Россия)

### Аннотация

С привлечением методов изотермического насыщения и УФ-спектроскопии в фосфатном буферном растворе (рН 7.4) исследовано комплексообразование производного 1,2,4-тиадиазола, проявляющего биологическую активность в терапии болезни Альцгеймера, с  $\beta$ - и гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстринами. Показано, что при образовании комплексов стехиометрического состава 1 : 1 происходит включение бензольного кольца молекулы “гостя”, которое удерживается в макроциклической полости “хозяина” преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий. Гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин проявляет более высокую по сравнению с  $\beta$ -циклодекстрином комплексообразующую и сольбилизирующую способность по отношению к рассматриваемому биологически активному соединению.

**Ключевые слова:** циклодекстрины, 1,2,4-тиадиазолы, супрамолекулярные комплексы, растворимость

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера – неуклонно прогрессирующее заболевание, в основе которого лежат атрофические процессы в головном мозге, связанные с потерей нейронов и синаптических связей и приводящие к нарушению памяти, мышления и поведения. Сегодня невозможно полностью излечить эту патологию; современные методы терапии позволяют только замедлить развитие дегенеративных изменений в клетках коры головного мозга. В связи с этим нейропротекторная терапия, направленная на предотвращение, уменьшение, а в ряде случаев и на обратимость процессов гибели нейрональных клеток, – одно из перспективных направлений предупреждения болезни Альцгеймера. Лекарственные средства нейропротекторного действия позволяют существенно повысить жизнеспособность нейронов, поэтому сфера их применения неуклонно расширяется.

Производные тиадиазолов зарекомендовали себя как препараты, способные приостановить протекание нейродегенеративных заболеваний. По результатам проведенных биологических тестов установлено [1, 2], что эти соединения могут ингибировать нарушение нейронных клеток, а потому их можно отнести к лекарственным средствам нейропротекторного действия. В эту группу веществ входит синтезированный нами 1-[(5-3-хлорфениламино)-1,2,4-тиадиазол-3-ил]-пропан-2-ол **I** (рис. 1) – производное 1,2,4-тиадиазола, обладающее нейропротекторными свойствами, которые выявлены с привлечением теста по глутамат-индуцированному захвату изотопа  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  в синапсомы коры мозга крыс [3]. Другой важной характеристикой любого лекарственного средства является растворимость. Растворимость соединения **I** в фосфатном буферном растворе (рН 7.4), определенная ранее методом изотермического насыщения при 298.15 К, составляет  $1.02 \cdot 10^{-5}$  мол. д.

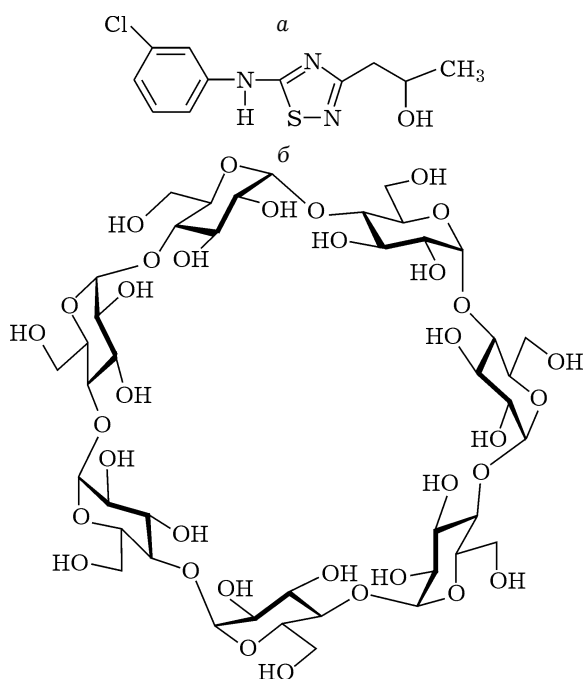


Рис. 1. Схематичное представление объектов исследования: а – 1-[(5-3-хлорфениламино)-1,2,4-тиадиазол-3-ил]-пропан-2-ол; б –  $\beta$ -циклодекстрин.

[4]. Соединение **I** плохо растворимо в водной среде, что значительно снижает его биодоступность и активность. В связи с этим поиск подходящих носителей, способствующих повышению растворимости и эффективности **I**, имеет актуальное значение.

Циклодекстрины (ЦД, см. рис. 1) – циклические олигосахариды природного происхождения, широко используются в фармацевтике в качестве носителей фармакологически активных ингредиентов, с которыми они могут образовывать комплексы включения [5, 6]. Кластратообразование благоприятно для хранения, транспортировки и улучшения свойств лекарственных веществ. Таким образом, за счет комплексообразования **I** с ЦД можно получить лекарственные композиции, в которых фармакологически активный ингредиент будет обладать хорошей растворимостью, стабильностью и высокой терапевтической эффективностью.

Цель данной работы – изучение комплексообразования **I** с  $\beta$ - и гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстринами ( $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД соответственно). Выбор этих ЦД обусловлен тем, что они образуют наиболее устойчивые комплексы включения с большинством органических субстратов и одобрены фармакопеей ряда стран.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались коммерческие образцы  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД (Aldrich), которые представляли собой устойчивые кристаллогидраты с содержанием воды 10.2 и 6.8 % соответственно. Соединение **I** синтезировано по методике, описанной в работе [3].  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр **I** (200 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ), м. д.: 1.30 (д,  $J = 6.17$  Гц, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.68–3.11 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.30 (м, 1H, CH), 4.37 (ус., 1H, OH), 7.14 (д,  $J = 7.50$  Гц, 2H,  $\text{CH}_2$ , HAr), 7.27 (с, 1H, CH, HAr), 7.30–7.46 (м, 1H, CH, HAr), 9.02 (уш. с, 1NH). Фосфатный буферный раствор (pH 7.4) приготовлен на основе солей  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (квалификации “ч. д. а.”) и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (“ч. д. а.”) и свежеприготовленной бидистиллированной воды. Величину pH контролировали с помощью pH-метра (Mettler Toledo FiveEasy-20).

Метод изотермического насыщения основан на измерении растворимости вещества при постоянной температуре. Ампулы, заполненные соединением **I** и фосфатным буфером, помещались в термостатируемый бокс. Насыщенные растворы, всегда находящиеся в равновесии с донной фазой, непрерывно перемешивались в боксе в течение 2 сут при 298.15 К. Предварительные измерения оптической плотности растворов показали, что это время достаточно для достижения равновесия. Растворы отделялись от донной фазы центрифугированием и анализировались спектрофотометрически. Расчет концентрации **I** проводили на основе предварительно построенного калибровочного графика ( $\epsilon(282 \text{ нм}) = 17618 \text{ кг}/(\text{см} \cdot \text{моль})$ ). Донная фаза анализировалась калориметрически с привлечением дифференциального сканирующего калориметра Perkin-Elmer (DSC 4000). Кривые ДСК снимали со скоростью нагрева  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$  в атмосфере азота.

Спектрофотометрические измерения проводили с применением спектрофотометра UNICO 2800 в фосфатном буферном растворе (pH 7.4) при комнатной температуре. В работе использовались кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см. Стехиометрия комплексов определена по методу изомольных серий (метод Жоба) [7]. С этой целью исходные растворы ЦД и **I** одинаковой концентрации ( $6.5 \cdot 10^{-5} \text{ моль}/\text{кг}$ ) смешивались в различных соотношениях, но объем смеси ос-

тавался постоянным. На зависимости измеряемого свойства (оптической плотности) от соотношения концентраций компонентов раствора ( $R = [I]/([I] + [ЦД])$ ) проявляется экстремум, соответствующий стехиометрическому составу образующихся комплексов.

Константы устойчивости комплексов определены методом молярных отношений. В этом случае концентрация **I** была постоянной ( $6.5 \cdot 10^{-5}$  моль/кг), а концентрация ЦД изменялась от 0 до 0.01 моль/кг. Расчет констант устойчивости комплексов проводили с помощью программы ФТМТ, предназначенной для обработки данных спектрофотометрических измерений [8]. В основу расчета заложен поиск минимума функции  $F$ :

$$F = \sum_{m=1}^M \sum_{l=1}^L (A'_{k, \text{эксп}} - A'_{k, \text{расч}})^2 W_l \quad (1)$$

где  $A'_{\text{эксп}}$  и  $A'_{\text{расч}}$  – экспериментально определенная и рассчитанная оптические плотности соответственно;  $M$  – число длин волн;  $L$  – число растворов одного состава;  $W_l$  – весовые множители, учитывающие неравноточность измерения оптической плотности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексообразование **I** с ЦД в фосфатном буферном растворе (рН 7.4) исследовано методами изотермического насыщения и УФ-спектроскопии. При использовании первого метода растворимость **I** определяли в присутствии переменной концентрации  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД. Согласно полученным диаграммам (рис. 2), рас-

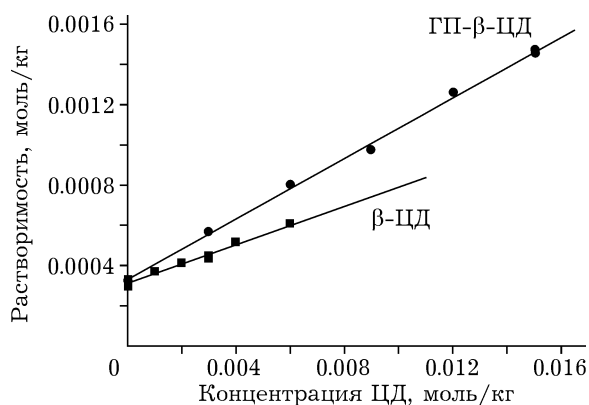


Рис. 2. Зависимости растворимости **I** от концентрации  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД (298.15 К, фосфатный буфер, рН 7.4).

творимость **I** повышается с увеличением концентрации ЦД. Термический анализ донной фазы показал, что она полностью соответствует соединению **I**. В частности, температуры начала разложения индивидуального **I** (118.9 °С) и донной фазы (119.9 °С) близки. Следовательно, донная фаза представляет собой вещество **I**, с которым во время эксперимента не произошло никаких превращений.

В рассматриваемом диапазоне концентраций ЦД диаграммы растворимости являются линейными и по классификации, предложенной Хигучи и Коннорсом [9], относятся к  $A_L$ -типу. Согласно подходу авторов [9],  $A_L$ -диаграммы соответствуют образованию водорастворимых комплексов включения. По-видимому, бензольное кольцо с боковым хлорзаместителем проникает в полость ЦД, экранируясь тем самым от водного окружения, благодаря чему растворимость **I** повышается.

Стехиометрический состав и константы устойчивости образующихся комплексов  $K$  можно определить по наклону диаграмм растворимости [9]:

$$K = \alpha/S_0(1 - \alpha) \quad (2)$$

где  $S_0$  – растворимость **I** в отсутствие ЦД;  $\alpha$  – наклон. Полученное нами значение растворимости  $S_0$  ( $3.2 \cdot 10^{-4}$  моль/кг) и приведенное в работе [4] в фосфатном буфере (рН 7.4) хорошо согласуются между собой. Для обеих систем величина наклона диаграмм растворимости  $\alpha < 1$ , что указывает на стехиометрический состав комплексов (1 : 1) [9]. Дополнительно стехиометрия и константы устойчивости комплексов **I** с ЦД подтверждены с привлечением УФ-спектроскопии.

На рис. 3 представлены спектры поглощения **I** в буферном растворе (рН 7.4) с различным содержанием  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД. Видно, что наличие в растворе ЦД не оказывает существенного влияния на характер спектров поглощения. Можно отметить уменьшение оптической плотности с ростом концентрации  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД, при этом положение максимума поглощения не смещалось. В обеих системах появляется изобестическая точка, указывающая на образование комплекса. Зависимости оптической плотности растворов **I** от концентрации  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД (рис. 4) нелинейные, на кривых наблюдается изгиб, плавно выходящий на плато. Харак-

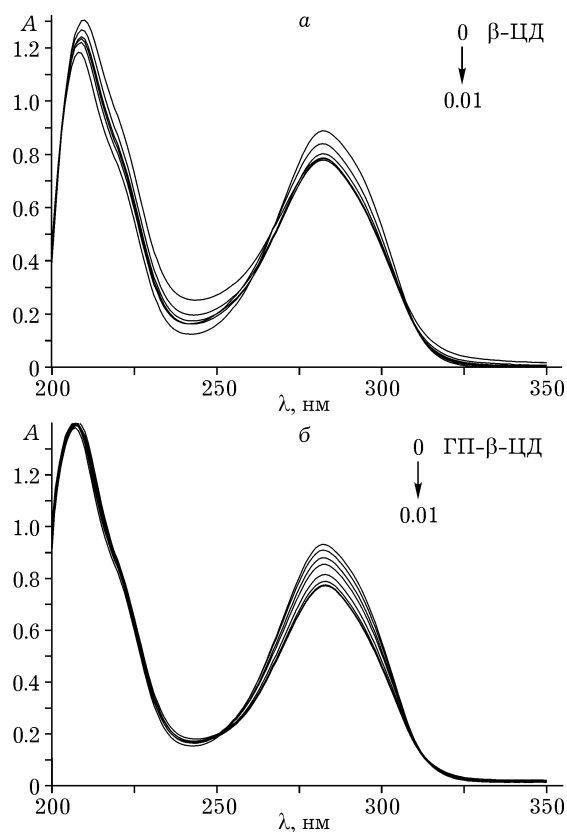


Рис. 3. УФ-спектры **I** в присутствии переменной концентрации  $\beta$ -ЦД (а) и ГП- $\beta$ -ЦД (б) ( $\sim 295$  К, фосфатный буфер, pH 7.4).

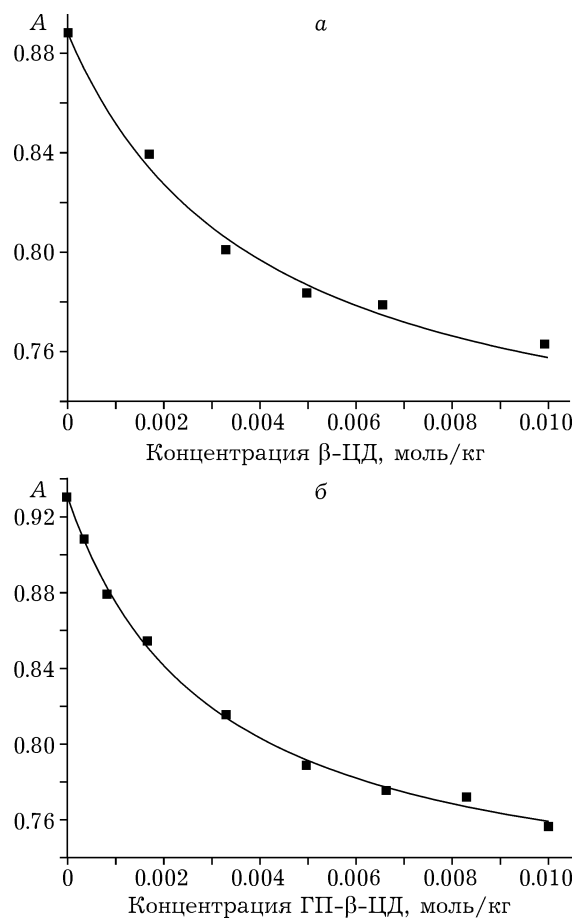


Рис. 4. Зависимости оптической плотности растворов **I** от концентрации  $\beta$ -ЦД (а) и ГП- $\beta$ -ЦД (б) ( $\sim 295$  К, фосфатный буфер, pH 7.4).

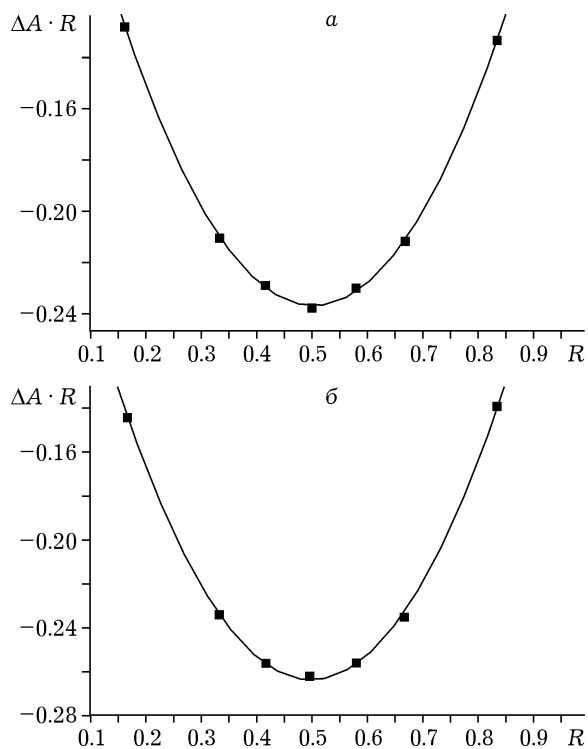


Рис. 5. Графики Жоба для комплексообразования **I** с  $\beta$ -ЦД (а) и ГП- $\beta$ -ЦД (б) ( $\sim 295$  К, фосфатный буфер, pH 7.4).

тер этих зависимостей также указывает на протекание комплексообразования в рассматриваемых системах.

На рис. 5 приведены графики Жоба для комплексообразования **I** с  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД. В обоих случаях зависимости симметричны и проявляют четко выраженный минимум при  $R = 0.5$ , который соответствует составу комплексов 1 : 1. Таким образом, при расчете констант устойчивости на основе данных УФ-спектроскопии (см. рис. 4) необходимо учитывать модель связывания, которая описывается уравнением

$$\text{ЦД} + \text{I} = \text{ЦД} \cdot \text{I} \quad (3)$$

Данные о величине  $K$ , полученные двумя независимыми методами, приведены в табл. 1. Видно, что комплексы **I** с ЦД характеризуются невысокой стабильностью ( $\lg K < 3$ ). Заметны небольшие различия в константах, определенных по растворимости и УФ-спектроскопии, что может быть связано

ТАБЛИЦА 1

Константы устойчивости комплексов **I** с  $\beta$ - и гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстринами (ГП- $\beta$ -ЦД) в фосфатном буферном растворе (рН 7.4)

Комплексы	K, кг/моль	
	Метод изотермического насыщения <sup>a</sup>	УФ-спектроскопия <sup>b</sup>
$\beta$ -ЦД/ <b>I</b>	197 $\pm$ 8	248 $\pm$ 12
ГП- $\beta$ -ЦД/ <b>I</b>	272 $\pm$ 10	332 $\pm$ 22

<sup>a</sup>298.15 К.

<sup>b</sup>Комнатная температура (~295 К).

с разными условиями проведения эксперимента и способами обработки экспериментальных данных. В частности, спектры поглощения снимались при комнатной температуре (~295 К), а измерения растворимости выполнялись при 298.15 К. Как известно [10], комплексы включения ЦД с органическими соединениями образуются за счет невалентных взаимодействий. В большинстве случаев проникновение “гостя” в полость  $\beta$ -циклодекстринов сопровождается экзотермическим эффектом [11]. Для комплексов, стабилизированных энтальпийным вкладом в энергию Гиббса, характерно понижение устойчивости при возрастании температуры, при которой протекает процесс.

Для комплексов **I** с ГП- $\beta$ -ЦД значения K заметно выше по сравнению с  $\beta$ -ЦД (см. табл. 1). За счет того, что гидроксипропильные группы частично замещают внешние гидроксильные группы ЦД, полость становится менее полярной, что благоприятно для включения бензольного кольца **I**. В этом случае гидрофобные взаимодействия усиливаются и, как следствие, константа устойчивости комплекса **I** с ГП- $\beta$ -ЦД возрастает.

Таким образом, на основе полученных данных можно предположить структуру комплексов, которые образуются при взаимодействии **I** с  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД в фосфатном буферном растворе с рН 7.4 (рис. 6). Предпочтение отдается включению бензольного кольца с боковым Cl-заместителем, которое становится изолированным от внешнего окружения. За счет гидрофильной внешней поверхности комплексов ЦД растворимость соединений, вклю-

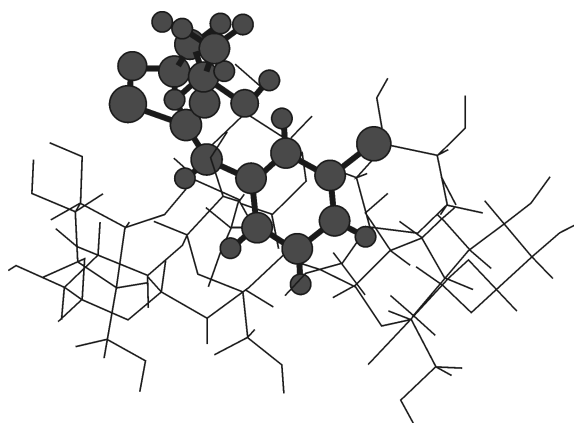


Рис. 6. Схематичное изображение комплекса включения **I** с  $\beta$ -ЦД.

ченных в гидрофобную макроциклическую полость, возрастает.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что растворимость соединения **I**, проявляющего активность в терапии болезни Альцгеймера, можно заметно повысить за счет комплексообразования с  $\beta$ -ЦД и ГП- $\beta$ -ЦД. При образовании супрамолекулярных комплексов гидрофобный фрагмент молекулы **I** включается в макроциклическую полость. ГП- $\beta$ -ЦД образует более устойчивые по сравнению с  $\beta$ -ЦД комплексы с **I** и служит более эффективным солюбилизатором для соединения **I**.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №15-13-10017).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gupta A., Mishra P., Pandeya S. N., Kashaw S. K., Kashaw V., Stables J. P. // Eur. J. Med. Chem. 2009. Vol. 44. P. 1100.
- Castro A., Castano T., Encinas A., Porcal W., Gil C. // Bioorg. Med. Chem. 2006. Vol. 14. P. 1644.
- Perlovich G. L., Proshin A. N., Volkova T. V., Petrova L. N., Bachurin S. O. // Mol. Pharm. 2012. Vol. 9. P. 2156.
- Surov A. O., Bui C. T., Volkova T. V., Proshin A. N., Perlovich G. L. // PCCP. 2015. DOI 10.1039/C5CP03263F.
- Brewster M. E., Loftsson T. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2007. Vol. 59. P. 645.
- Rapolu K., Aatipamula V., Reddy K. J., Voruganti S. // Int. J. Pharm. 2012. Vol. 2. P. 109.
- Job P. // Ann. Chim. 1928. Vol. 9. P. 113.
- Васильев В. П., Бородин В. А., Козловский Е. В. Применение ЭВМ в химико-аналитических расчетах. М.: Высш. шк., 1993. 110 с.

- 9 Higuchi T., Connors K. A. // *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* / C. N. Reilly (Ed.). NY: Wiley-Interscience, 1965. Vol. 4. P. 117.
- 10 Liu L., Guo Q.-X. // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2002. Vol. 42. P. 1.
- 11 Терехова И. В. Комплексообразование циклодекстринов с некоторыми биологически активными соединениями в водных растворах: дис. ... д-ра хим. наук. Иваново, 2013. 301 с.