

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДИФЛУНИЗАЛА И ТАФАМИДИСА

Батрева Т.Г.*, Генералова Ю.Э., Снетков П.П., Морозкина С.Н., Успенская М.В.

Национальный исследовательский университет ИТМО

*batrevatatana@gmail.com

В ходе работы проведены исследования динамической вязкости растворов полимерных матриц на основе гиалуроновой кислоты с добавлением дифлунизала и тафамидиса. Была исследована кинетика высвобождения лекарственного средства из полимерной матрицы при различных концентрациях дифлунизала и тафамидиса.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, динамическая вязкость, дифлунизал, кинетика высвобождения биологически активных веществ, системы доставки лекарственных препаратов, тафамидис.

THE INVESTIGATION OF PROPERTIES OF POLYMER MATRICES SOLUTIONS BASED ON HYALURONIC ACID FOR THE DELIVERY OF DIFLUNISAL AND TAFAMIDIS

Batreva T.G., Generalova Yu.E., Snetkov P.P., Morozkina S.N., Uspenskaya M.V.

ITMO University

The dynamic viscosity of solutions of polymer matrices based on hyaluronic acid with the addition of diflunisal and tafamidis was investigated. The drug release from the polymer matrix was studied at different concentrations of diflunisal and tafamidis.

Keywords: diflunisal, drug delivery systems, dynamic viscosity, hyaluronic acid, release of biologically active substances, tafamidis.

Введение

В настоящее время актуальной задачей является создание и исследование свойств систем доставки лекарственных препаратов на основе биосовместимых и безопасных полимерных матриц, которые позволяют обеспечить стабильность препаратов и их направленное действие, что позволяет снизить побочные эффекты лекарственного средства, а также, в идеальном случае, обеспечивает синергизм действия, что позволяет существенно снизить дозу, упростить метод введения лекарственного средства, и понизить его стоимость. Преимуществом таких систем является их улучшенная биодоступность, селективность действия, биоразлагаемость, и безопасность.

В нашей работе в качестве лекарственных препаратов были выбраны дифлунизал и тафамидис. В последние годы они получили пристальное внимание, поскольку клинически доказана их эффективность для лечения амилоидоза сердца [1].

Дифлунизал, производное салициловой кислоты, является нестероидным противовоспалительным препаратом, обладает обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным действием. Дифлунизал не был одобрен для лечения транстиретиновой семейной амилоидной полинейропатии, несмотря на то, что была доказана его клиническая эффективность [2], так как он обладает рядом побочных эффектов, например, вызывает поражение функций почек и печени, развитие сердечно-сосудистых заболеваний [3]. К тому же, дифлунизал плохо растворим в воде, что ухудшает его биораспределение и приводит к неблагоприятным фармакокинетическим профилям.

Тафамидис – представляет собой лекарственное средство, используемое для замедления прогрессирования заболевания у взрослых с некоторыми формами транстиретинового амилоидоза.

Он может быть использован для лечения как наследственных форм семейной амилоидной кардиомиопатии и семейной амилоидной полинейропатии, так и транстиретинового амилоидоза «дикого» типа, который ранее назывался сенильным системным амилоидозом [1]. Тафамидис обеспечивает стабилизацию четвертичной

структуры белка транстиретина. У людей с транстиретиновым амилоидозом транстиретин распадается и образует скопления, называемые амилоидными, которые повреждают ткани, включая нервные окончания и сердце.

Тафамидис был одобрен в Европейском Союзе в 2011 г. для лечения транстиретинового амилоидоза с полинейропатией и в Японии в 2013 г. [4].

Тафамидис используется в клинической практике для лечения транстиретинового амилоидоза с кардиомиопатией. Он был одобрен для лечения этой формы заболевания в США в 2019 г. и в Европейском Союзе в 2020 г. В США одобрено два препарата: тафамидис меглумин (Виндакель) и тафамидис (Виндамакс).

Тафамидис и дифлунизал были выбраны для введения в полимерную матрицу для обеспечения пролонгированного действия препаратов, увеличения терапевтической эффективности лечения и снижения возникновения побочных эффектов, за счет увеличения селективности действия.

В качестве полимерной матрицы нами была выбрана гиалуроновая кислота, которая является естественным полимером, присутствующим в организме человека, и которая является идеальным полимером для создания систем направленной доставки лекарственного вещества в органы-мишени, так как является полностью биосовместимым, нетоксичным, неиммуногенным и полностью биodeградируемым полимером [5]. Дополнительным преимуществом гиалуроновой кислоты является присутствие в организме человека специфических рецепторов, связываясь с которыми, обеспечивается селективность действия гиалуроновой кислоты [6].

Гиалуроновая кислота и ее производные широко используются в медицине, например, для лечения остеоартрита, в глазной и пластической хирургии, в тканевой инженерии, и для доставки лекарственных веществ. Также описаны различные способы доставки с помощью полисахарида генных и пептидных/белковых лекарственных средств [7]. Формы доставки лекарственных средств включают в себя: наночастицы, мицеллы, наногели, липосомы и нанокапсулы [8] для различных путей введения, таких как парентеральный, глазной, кожный, назальный и пероральный [9–11].

Так, например, гиалуроновая кислота используется как часть системы трансдермальной доставки для улучшения проникновения лекарств при лечении псориаза [12] и атопического дерматита [13] или для доставки лекарств для лечения карциномы мочевого пузыря [14]. Также была разработана перспективная система доставки 4-метилумбеллиферона с помощью наночастиц на основе гиалуроновой и фолиевой кислот для лечения рака легких [15] и система на основе ГК-ириноктанов для лечения пациентов с метастатическим колоректальным раком, которая исследуется во II фазе клинических испытаний [16].

Исследование реологических свойств получаемых матриц является неотъемлемой частью разработки и дальнейшего развития систем доставки лекарственных препаратов. Изучив реологические свойства данных растворов, можно предположить, получатся ли на основе исследуемых растворов нановолокна [17]. Кроме того, данные о реологических свойствах могут служить методом контроля качества и стабильности получаемых систем.

Нами ранее также было установлено, что наиболее стабильный процесс формирования нановолокон наблюдался при концентрации гиалуроновой кислоты 1,9 % и при соотношении воды и ДМСО 50:50 [18].

Поэтому в ходе работы была исследована динамическая вязкость водно-органического раствора гиалуроновой кислоты с концентрацией полимера 1,9 масс. % и растворов с добавлением дифлунизала и тафамидиса в соотношении ГК:БАВ 7,6:1 (по массе). Также была изучена динамика высвобождения дифлунизала и тафамидиса из полимерной матрицы для растворов с различной концентрацией активного вещества.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

В работе использовались следующие реактивы: гиалуроновая кислота, Bloomage Freda Biopharm Co., Ltd (Китай) с ММ 1,29 МДа; диметилсульфоксид (ДМСО, ХЧ, 99,5 %), АО «ЭКОС1» (РФ); дифлунизал (98 %, SigmaAldrich, Германия), тафамидис (95 %, SigmaAldrich, Германия), дистиллированная вода.

Измерение динамической вязкости проводили на реометре Anton Paar Physica MCR 502 (Австрия) с цилиндрической измерительной системой CC27/T200/SS при скорости сдвига от 0,1 до 100 с⁻¹. Температурный диапазон от 25 до 40 °С.

Оценка реологических характеристик

Для исследования реологических свойств были приготовлены следующие растворы гиалуроновой кислоты:

1. Водно-органический раствор 1,9 масс. % ГК. ГК растворяли в бинарной системе растворителей дистиллированная вода: ДМСО в соотношении 50:50 (по объему).
2. Раствор ГК с добавлением дифлунизала в соотношении 7,6:1.
3. Раствор ГК с добавлением тафамидиса в соотношении 7,6:1.

Результаты исследований представлены в виде графиков на рис. 1–3.

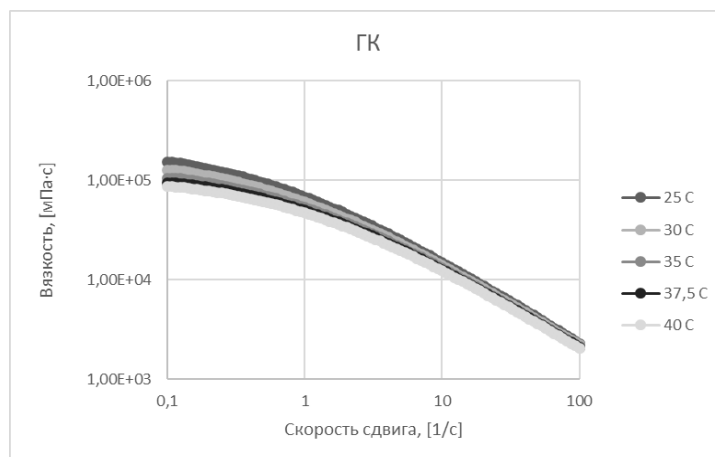


Рис. 1. Зависимость динамической вязкости водно-органического раствора ГК с концентрацией 1,9 масс. % от скорости сдвига при различных температурах

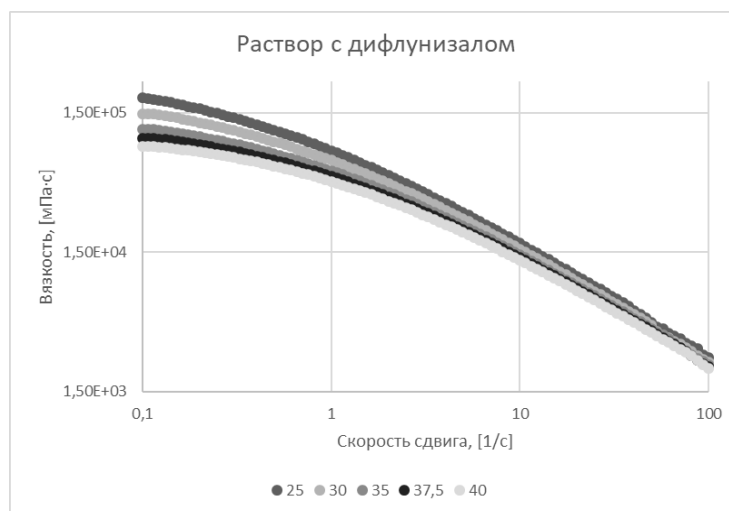


Рис. 2. Зависимость динамической вязкости водно-органического раствора ГК с концентрацией 1,9 масс. % с добавлением дифлунизала от скорости сдвига при различных температурах

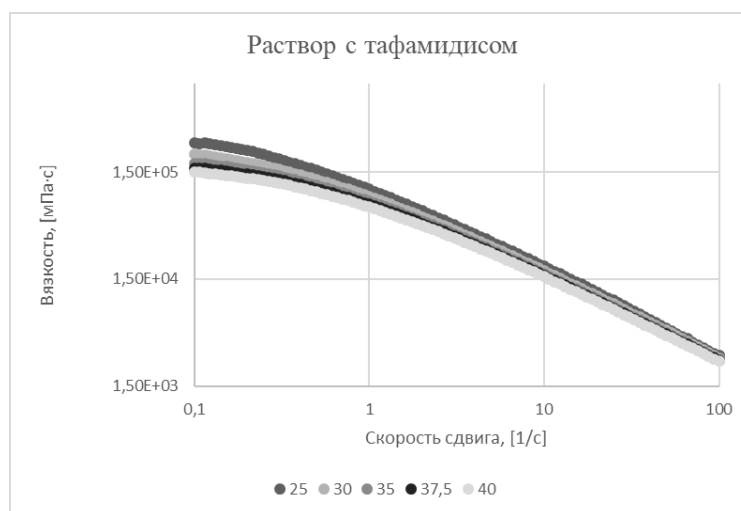


Рис. 3. Зависимость динамической вязкости водно-органического раствора ГК с концентрацией 1,9 масс. % с добавлением тафамидиса от скорости сдвига при различных температурах

Во всех трех случаях наблюдается уменьшение динамической вязкости с увеличением температуры и с увеличением скорости сдвига. Причём при увеличении скорости сдвига вязкость стремится к одному значению. Таким образом, в случае раствора чистой ГК вязкость уменьшилась в 1,8 раза при увеличении температуры с 25 до 40 °С. В случае дифлунизала наблюдалось уменьшение вязкости в 2,2 раза, а при добавлении тафамидиса в 1,9 раз. При этом при скорости сдвига 100 с⁻¹ значение вязкости у всех растворов составило в среднем 2400 мПа·с.

При добавлении дифлунизала вязкость увеличивается в 1,5 раза по сравнению с чистой ГК, а при добавлении тафамидиса в 1,8 раза.

Так как динамическая вязкость полученных растворов с БАВ отличается от вязкости раствора нативной гиалуроновой кислоты в допустимых пределах, то можно предположить, что на основе растворов с добавлением дифлунизала и тафамидиса возможно получить бездефектные волокна. Однако необходимо учитывать ряд других физических характеристик, например, поверхностное натяжение и электропроводность, чтобы иметь более полную картину для прогнозирования.

Изучение кинетики высвобождения дифлунизала и тафамидиса из полимерной матрицы

Используемое оборудование:

- аналитические весы САРТОГОСМ CE224-С (ООО «Сартогосм», Россия);
- спектрофотометр Shimadzu UV-1240 mini (Shimadzu, Япония);
- хроматограф жидкостной Миллихром-А02, оснащённый ультрафиолетовым детектором (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия);
- хроматографическая колонка Prontosil 120-5, C18, 75×2 мм (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия).

Объекты анализа приведены в табл. 1.

Таблица 1

Объекты анализа

Дифлунизал	10 мг (0,094 %) 15 мг (0,14 %) 20 мг (0,19 %) 25 мг (0,23 %)	Тафамидис	10 мг (0,094 %) 15 мг (0,14 %) 20 мг (0,19 %) 25 мг (0,23 %)
Вода	5 мл	Вода	5 мл
Гиалуроновая кислота	190 мг	Гиалуроновая кислота	190 мг
ДМСО	5 мл	ДМСО	5 мл

На основании данных обзора литературных источников и изученных спектральных характеристик аналитов, были выбраны оптимальные хроматографические условия для определения дифлунизала и тафамидиса (табл. 2, 3).

Таблица 2

Оптимальные хроматографические условия для определения дифлунизала

Колонка	ProntoSIL 120-5-C18 AQ 75 мм × 2 мм, 5 мкм
Подвижная фаза	фосфатный буферный раствор pH 3,0: ацетонитрил (40:60)
Скорость потока	0,1 мл/мин
Температура колонки	40 °С
Длины волн детектора	230, 270, 310 нм
Объём вводимой пробы	5 мкл

Таблица 3

Хроматографические условия для определения тафамидиса

Колонка	ProntoSIL 120-5-C18 AQ 75 мм × 2 мм, 5 мкм
Подвижная фаза	фосфатный буферный раствор pH 6,85: ацетонитрил (50:50)
Скорость потока	0,1 мл/мин
Температура колонки	40 °С
Длины волн детектора	230, 270, 310 нм
Объём вводимой пробы	5 мкл

Результаты исследования кинетики высвобождения дифлунизала из полимерной матрицы при использовании фосфатно-буферного раствора с pH 7,6 в качестве среды растворения (табл. 4 и рис. 4).

Таблица 4

Кинетика высвобождения дифлунизала

t, мин	Образец	10 мг	15 мг	20 мг	25 мг
		0,094 %	0,14 %	0,19 %	0,23 %
		Массовая доля дифлунизала, %			
0		0	0	0,0031	0,0084
30		0,053	0,074	0,116	0,126
60		0,081	0,091	0,162	0,178
120		0,079	0,115	0,169	0,207
180		0,086	0,134	0,181	0,219
Максимальный % высвобождения		91,6	95,4	95,0	95,0

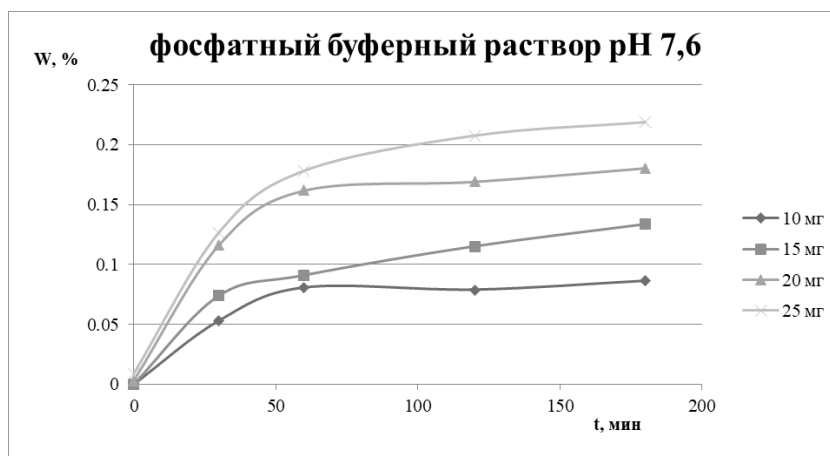


Рис. 4. Кинетика высвобождения дифлунизала

Обнаружено, что независимо от концентрации кинетика высвобождения дифлунизала во всех образцах одинакова, процент высвобождения соединения для всех концентраций в последней анализируемой точке превышает 90 %.

Ввиду того, что кривые высвобождения для всех образцов сопоставимы, то изучение кинетики высвобождения при pH 5,5 проводили на одном объекте анализа, содержащем 20 мг (0,19 %) дифлунизала (рис. 5).

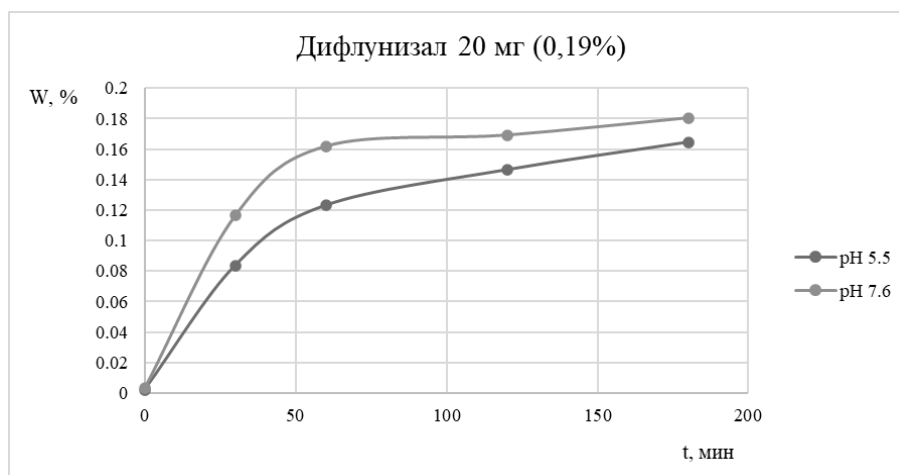


Рис. 5. Кинетика высвобождения дифлунизала при pH 5,5 и 7,6

При изменении pH среды наблюдается сохранение общего вида кривой высвобождения, но кривая более пологая, что может быть связано с более медленным процессом высвобождения и, следовательно, для достижения тех же значений высвобождения требуется больше времени.

Результаты исследования кинетики высвобождения тафамидиса из полимерной матрицы при использовании ФБР с pH 7,6 в качестве среды растворения (табл. 5 и рис. 6).

Таблица 5

Кинетика высвобождения тафамидиса

t, мин	Образец	10 мг	15 мг	20 мг	25 мг
		0,094 %	0,14 %	0,19 %	0,23 %
		Массовая доля тафамидиса, %			
		0,0045	0,022	0,032	0,032
30		0,0324	0,0842	0,1065	0,1555
60		0,0561	0,1224	0,1487	0,1941
120		0,0702	0,1250	0,1735	0,2166
180		0,089	0,1389	0,1823	0,2256
Максимальный % высвобождения		94,7	99,2	95,9	98,1

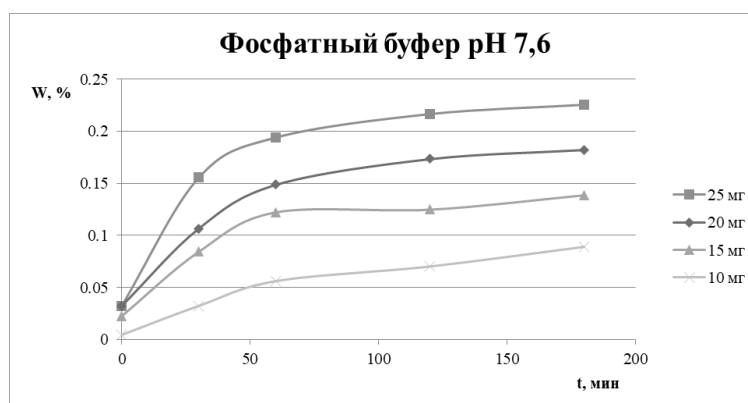


Рис. 6. График кинетики высвобождения тафамидиса

Обнаружено, что независимо от концентрации БАВ кинетика высвобождения тафамидиса во всех образцах одинакова, процент высвобождения соединения для всех концентраций в последней анализируемой точке превышает 90 %.

При растворении образца в растворе с pH 5,5 наблюдалось выпадение осадка, полученные результаты недостоверны и непредставительны.

Заключение

При исследовании динамической вязкости водно-органического раствора гиалуроновой кислоты с концентрацией полимера 1,9 масс. % и растворов с добавлением дифлуназала и тафамидиса в соотношении ГК:БАВ 7,6:1 (по массе) установлено, что с увеличением скорости сдвига и с увеличением температуры динамическая вязкость уменьшается; с увеличением скорости сдвига при разных температурах динамическая вязкость стремится к одному значению. При добавлении тафамидиса и дифлуназала в раствор ГК происходит увеличение динамической вязкости, причём в случае с тафамидисом, увеличение вязкости более значительное. При увеличении температуры вязкость раствора, содержащего дифлунизал, увеличивается сильнее.

Результаты анализа высвобождения лекарственных препаратов показывают, что независимо от концентрации кинетика высвобождения тафамидиса и дифлуназала во всех образцах одинакова, процент высвобождения соединения для всех концентраций в последней анализируемой точке превышает 90 %.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, номер проекта 21-74-20093.

Библиография

1. Sekijima Y. Recent progress in the understanding and treatment of transthyretin amyloidosis // Journal of clinical pharmacy and therapeutics. 2014. V. 39, N 3. P. 225–233.
2. Berk J.L., Suhr O.B., Obici L., Sekijima Y., Zeldenrust S.R., Yamashita T. Diflunisal Trial Consortium. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial // JAMA. 2013. V. 310, N 24. P. 2658–2667.
3. Sekijima Y., Dendle M.A., Kelly J.W. Orally administered diflunisal stabilizes transthyretin against dissociation required for amyloidogenesis // Amyloid. 2006. V. 13, N 4. P. 236–249.
4. Waddington Cruz M., Benson M.D. A review of tafamidis for the treatment of transthyretin-related amyloidosis // Neurology and therapy. 2015. V. 4, N 2. P. 61–79.
5. Vasvani S., Kulkarni P., Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies // International journal of biological macromolecules. 2020. V. 151. P. 1012–1029.
6. Luo Z., Dai Y., Gao H. Development and application of hyaluronic acid in tumor targeting drug delivery // Acta Pharmaceutica Sinica B. 2019. V. 9, N. 6. P. 1099–1112.
7. Sun Y., Mao S. Applications of hyaluronic acid and its derivatives-based nanoparticles in drug delivery // Polysaccharide Nanoparticles. Elsevier. 2022. P. 281–311.
8. Oyarzun-Ampuero F.A., Rivera-Rodriguez G.R., Alonso M.J., Torres D. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013. V. 49, N 4. P. 483–490.
9. Gao Y., Cheng X., Wang Z., Wang J., Gao T., Li P., Chen X. Transdermal delivery of 10,11-methylenedioxycamptothecin by hyaluronic acid based nanoemulsion for inhibition of keloid fibroblast // Carbohydrate polymers. 2014. V. 112. P. 376–386.
10. Jin Y.J., Ubonvan T., Kim D.D. Hyaluronic acid in drug delivery systems // Journal of Pharmaceutical Investigation. 2010. V. 40. P. 33–43.
11. Widjaja L.K., Bora M., Chan P.N.P.H., Lipik V., Wong T.T., Venkatraman S.S. Hyaluronic acid- based nanocomposite hydrogels for ocular drug delivery applications // Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2014. V. 102, N 9. P. 3056–3065.
12. Wan T., Pan W., Long Y., Yu K., Liu S., Ruan W., Xu Y. Effects of nanoparticles with hydrotropic nicotinamide on tacrolimus: permeability through psoriatic skin and antipsoriatic and antiproliferative activities // International journal of nanomedicine. 2017. V. 12. P. 1485.

13. Zhuo F., Abourehab M.A.S., Hussain Z. Hyaluronic acid decorated tacrolimus-loaded nanoparticles: Efficient approach to maximize dermal targeting and anti-dermatitis efficacy // *Carbohydrate polymers*. 2018. V. 197. P. 478–489.
14. Bassi P.F., Volpe A., D'Agostino D., Palermo G., Renier D., Franchini S., Racioppi M. Paclitaxel-hyaluronic acid for intravesical therapy of bacillus Calmette-Guerin refractory carcinoma in situ of the bladder: results of a phase i study // *The Journal of urology*. 2011. V. 185, N 2. P. 445–449.
15. Essa M.L., Elashkar A.A., Hanafy N.A., Saied E.M., El-Kemary M. Dual targeting nanoparticles based on hyaluronic and folic acids as a promising delivery system of the encapsulated 4-Methylumbelliferone (4-MU) against invasiveness of lung cancer in vivo and in vitro // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. V. 206. P. 467–480.
16. Gibbs P., Clingan P.R., Ganju V., Strickland A. H., Wong S.S., Tebbutt N.C., Brown T.J. Hyaluronan-Irinotecan improves progression-free survival in 5-fluorouracil refractory patients with metastatic colorectal cancer: a randomized phase II trial // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011. V. 67, N 1. P. 153–163.
17. Снетков П.П., Захарова К.С., Ганзий М.И., Морозкина С.Н., Олехнович Р.О., Успенская М.В. Исследование физических свойств водно-органических растворов гиалуроновой кислоты // *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)*. 2020. № 55. С. 16–21.
18. Снетков П.П., Успенская М.В., Воронов В.С., Олехнович Р.О. Получение нановолокон на основе нативной гиалуроновой кислоты из водно-органических растворов методом электроформования // *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)*. 2019. № 51. С. 47–50.