

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
РАСТВОРОВ

УДК 541.8

КОМПЛЕКСЫ ВКЛЮЧЕНИЯ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА
С ФИНГОЛИМОДОМ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2023 г. А. А. Гарибян^a, Е. С. Делягина^{a,b}, М. Л. Антипова^a, Е. Г. Одинцова^a,
В. Е. Петренко^a, И. В. Терехова^{a,*}

^aИнститут химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново, Россия

^bИвановский государственный университет, Иваново, Россия

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

Поступила в редакцию 01.08.2022 г.

После доработки 28.09.2022 г.

Принята к публикации 30.09.2022 г.

Впервые исследовано солюбилизирующее действие β -циклодекстрина по отношению к финголимоду — иммуносупрессанту нового поколения. Показано возможное повышение растворимости финголимоды в 20 раз за счет проникновения гидрофобного фрагмента молекулы лекарственного соединения в макроциклическую полость циклодекстрина. На основе данных ¹H ЯМР-спектроскопии и компьютерного моделирования предложена конфигурация образующихся комплексов включения. Рассчитаны константа устойчивости комплекса и энергия комплексообразования, рассмотрены процессы образования водородных связей между финголимодом и β -циклодекстрином.

Ключевые слова: циклодекстрин, финголимод, комплексообразование, солюбилизация

DOI: 10.31857/S0044453723030135, **EDN:** DXRADY

Финголимод (2-амино-2-[2-(4-октилфенил)этил]пропан-1,3-диол, FTY720, Gilenya, рис. 1) представляет собой синтетическое соединение на основе грибкового вторичного метаболита миреоцина [1]. FTY720 — мощный иммунодепрессант — одобрен в 2010 г. для лечения рассеянного склероза, который считается наиболее распространенным воспалительным заболеванием центральной нервной системы [2, 3]. Ингибируя выход лимфоцитов из лимфатических узлов в кровь и ЦНС, FTY720 связывается со сфингозин-1-фосфатными рецепторами, расположенными на лимфоцитах, и тем самым облегчает симптомы рассеянного склероза [4, 5]. FTY720 обладает высокой активностью и может быть также использован при лечении онкологических заболеваний [3]. FTY720 — эффективное противовоспалительное и антиоксидантное средство — подавляет выработку свободных радикалов кислорода, уменьшая фиброз миокарда и гибель кардиомиоцитов [6, 7]. Было отмечено развитие более легких симптомов протекания COVID-19 у больных, принимающих FTY720 [8, 9].

FTY720, использующийся в медицинской практике преимущественно перорально, плохо растворим в водных средах. Определено, что растворимость FTY720 в смеси этанол/фосфатный буфер (pH 7.2) состава 1 : 1 составляет 0.2 мг/мл, и

это значение достигается при растворении FTY720 сначала в этаноле с последующим добавлением буфера [10]. Поскольку FTY720 является основанием (pK = 7.82 [11]), его растворимость уменьшается с ростом pH. Гидрохлорид финголимоды свободно растворим в воде (более 100 мг/мл при 298.15 К) и в буферных растворах с pH 1.0, однако слабо растворим при pH 4.0 и практически нерастворим в фосфатном буферном растворе с pH 6.8 (менее 0.01 мг/мл при 298.15 К) [11]. Ввиду низкой растворимости системное применение FTY720 (≥ 0.5 мг каждые 24 ч [12]) ограничено из-за частых достаточно серьезных побочных эффектов [13].

Для повышения терапевтической активности и уменьшения токсичности FTY720 может быть предложено использование систем доставки лекарств. Как показал обзор литературы, количество таких исследований для FTY720 ограничено. В частности, авторами работ [14, 15] проведено инкапсулирование FTY720 в наночастицы на основе сополимера полимолочной и гликолевой кислот с целью достижения пролонгированного и pH-контролируемого высвобождения FTY720, а также улучшения показателей его цитотоксичности. Было показано, что FTY720, загруженный в липосомы, проявлял улучшенные фармакокинетические параметры и растворимость в водных

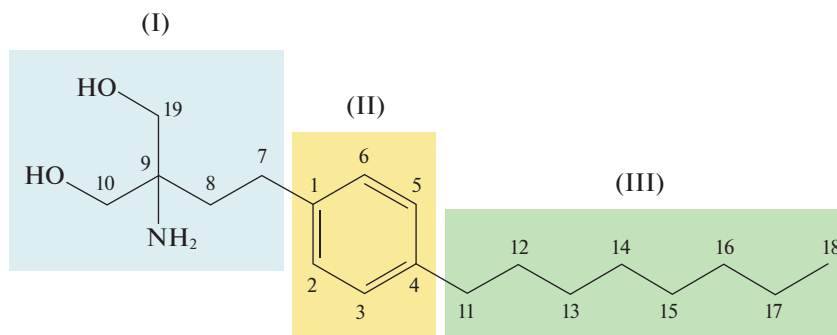


Рис. 1. Структурная формула финголимода.

средах [10]. Имобилизация FTY720 в наночастицы на основе сополимера гидроксибутирата и гидроксиалериата, иммобилизованного в матрикс, состоящий из замещенного альгината, способствовало замедленному высвобождению лекарства и повышению периода его полувыведения [16–18]. В настоящее время разработана чувствительная к pH система доставки FTY720 в виде наночастиц селена, покрытых фибриноим шелка, с помощью которой осуществляется транспорт лекарства в опухоль, и, таким образом, повышается способность к уничтожению раковых клеток [19].

В данной работе в качестве солюбилизатора и молекулярного контейнера был предложен β -циклодекстрин (β -CD). Циклодекстрины — это циклические природные олигосахариды, состоящие из разного количества глюкопиранозных остатков, связанных α -D-1,4-гликозидными связями. β -CD содержит семь субъединиц глюкозы в макроцикле и имеет диаметр внутренней полости ≈ 6.6 Å, который подходит для образования комплексов включения с большим количеством органических соединений [20–22]. Циклодекстрины получают путем ферментативного расщепления крахмала, и они являются полностью биодоступными соединениями [23]. В настоящее время β -CD зарегистрирован в качестве пищевой добавки E459 и применяется в различных областях, в том числе и в фармацевтике для повышения растворимости плохо растворимых лекарственных соединений [24].

Цель настоящей работы состояла в выявлении солюбилизирующего действия и комплексобразующей способности β -CD по отношению к FTY720 в фосфатном буферном растворе, который используется для моделирования физиологических жидкостей (кровь, кишечник) и в котором FTY720 практически нерастворим [11]. Для оценки деталей межмолекулярного взаимодействия между FTY720 и β -CD, а также определения способа связывания, были проведены исследования молекулярной стыковки и молеку-

лярно-динамическое моделирование системы β -CD/FTY720.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коммерчески доступные гидрохлорид финголимода и β -циклодекстрин (Sigma-Aldrich) использовали без дополнительной очистки. Стандартный буферный раствор, (фосфатный буфер, pH 6.8) готовили по общеизвестной методике ГОСТ 4919.2-77 (СТ СЭВ 808-77). Компоненты буферных растворов имели квалификацию “ч.д.а.”. Для приготовления растворов использовали свежеприготовленную бидистиллированную воду. Показатель pH буферного раствора контролировали с помощью pH-метра Five Easy (Mettler Toledo).

Для определения растворимости FTY720 использовали метод изотермического насыщения. Избыточное количество FTY720 суспензировали в 1 мл буферного раствора. Образцы встряхивали на шейкере (Eppendorf ThermoMixer) при постоянной температуре (298.15 K) в течение 3 суток для достижения равновесия. Далее образцы центрифугировали при 298.15 K (Thermo Scientific MicroCL 21 R) и анализировали спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu UV-1800). Все измерения проводили трижды.

Для изучения стехиометрии комплексов β -CD/FTY720 использовали метод изомольных серий (метод Жоба) [25]. Исходные растворы β -CD и FTY720 одинаковой концентрации (7×10^{-4} M) смешивали в разных соотношениях таким образом, что суммарные молярные концентрации (β -CD + FTY720) поддерживались постоянными, а отношение молярных концентраций $R = [\text{FTY720}]/([\text{FTY720}] + [\beta\text{-CD}])$ изменялось от 0 до 1. УФ-спектроскопические измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 при $\lambda = 272$ нм. На полученной зависимости интенсивности сигнала поглощения от параметра R точка экстремума соответствовала стехиометрии образующихся комплексов.

^1H ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker-AV-500. Измерения проводили при постоянной температуре 298.15 К, которую поддерживали с помощью терморегулятора Bruker BVT-3000. Во всех ^1H ЯМР экспериментах использовали дейтерированную воду с содержанием дейтерия не менее 99.9%.

Оптимизацию молекулярной структуры β -циклодекстрина и финголимода проводили в рамках DFT с использованием функционала B3LYP [26, 27] и базисного набора 6-31G. Отсутствие мнимых частот колебаний подтвердило стационарный характер полученных структур. Расчеты проводили в программном комплексе Gaussian 16 [28].

Предварительный поиск оптимальной конфигурации комплекса включения β -CD/FTY720 выполняли с использованием метода молекулярного докинга, реализованного в программном пакете Autodock (версия 4.2) [29]. Затем проводили оптимизацию структуры комплекса методом DFT–B3LYP/6-31G и определяли заряды на атомах.

Далее методом молекулярной динамики выполняли моделирование раствора, содержащего комплекс включения. Моделирование проводили в NVT-ансамбле с использованием программного пакета GROMACS 2019.6 [30] с GPU-ускорителями, позволяющими выполнять высокопроизводительные параллельные вычисления. Постоянную температуру системы поддерживали термостатом Нозе–Хувера [31, 32]. Использовали периодические граничные условия. Интегрирование уравнений движения проводили по алгоритму Верле [33]. Модифицированный метод суммирования по Эвальду [34, 35] применяли для учета поправок дальнедействующих электростатических взаимодействий с радиусом отсечки 1.5 нм. Такой же радиус отсечки выбирали для ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Для фиксации длины связей использовали алгоритм LINCS [36].

Силовое поле β -CD и FTY720 создавали с помощью LigParGenServer [37–39]. Заряды брали из квантово-химического расчета комплекса включения. Молекулярная геометрия и параметры взаимодействия для воды соответствовали модели TIP4P в силовом поле OPLS-AA [40]. Подготавливали МД-ячейку, содержащую 5832 молекулы воды при температуре 298 К и плотности 0.997 г/см³. Ячейку минимизировали по энергии и уравнивали в течение 2 нс. На следующем этапе в ячейку с растворителем помещали оптимизированный комплекс включения. Одновременно корректировали длину ребра ячейки для сохранения заданной плотности. Процесс минимизации энергии составлял 10 нс. Для расчета свойств исследуемых систем получа-

ли траектории в течение 150 нс с шагом 1 фс. Анализ рассчитываемых траекторий проводили с помощью графической программы VMD [41].

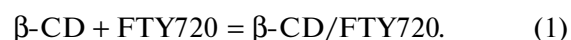
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растворимость — одно из важных физико-химических свойств, определяющих биодоступность лекарственного соединения. Исследования растворимости FTY720 и возможности ее повышения проводили в фосфатном буферном растворе (pH 6.8), поскольку в данном буфере растворимость лекарства минимальна и, как было нами определено, не превышает 4×10^{-5} М (298.15 К).

Для повышения растворимости FTY720 было предложено использование β -CD. С этой целью растворимость FTY720 определяли в буферных растворах (pH 6.8) с переменным содержанием β -CD (0–0.14 М). Обнаружено, что растворимость FTY720 линейно возрастает с ростом концентрации β -CD (рис. 2). В присутствии максимально возможного количества β -CD (0.014 М) растворимость FTY720 повышается в 20 раз. Полученная фазовая диаграмма растворимости FTY720 линейна, и по классификации, предложенной Хигучи и Коннорсом [42], относится к A_L -типу, который характеризует образование водорастворимых комплексов β -CD/FTY720 преимущественно состава 1 : 1 [43]. Наклон диаграммы растворимости используется для определения стехиометрии и устойчивости комплексов. Установлено [43], что наклон диаграммы растворимости <1 соответствует образованию водорастворимых комплексов состава 1 : 1. В нашем случае наклон равен 0.06, что позволяет считать, что одна молекула β -CD связывается с одной молекулой FTY720.

Дополнительно стехиометрию комплексов определяли методом изомолярных серий (метод Жоба) [25]. Данный метод основан на определении отношения изомолярных концентраций реагирующих веществ, отвечающего максимальному выходу образующегося комплексного соединения. Кривая зависимости выхода комплекса от состава раствора характеризуется экстремальной точкой (рис. 3). Объемное соотношение компонентов изомолярных серий, относящееся к точке экстремума на данной кривой, соответствует стехиометрическому соотношению реагирующих веществ. На полученной кривой минимум был получен при $R = 0.5$, что подтверждает образование комплексов состава 1 : 1.

Процесс комплексообразования описывается уравнением:



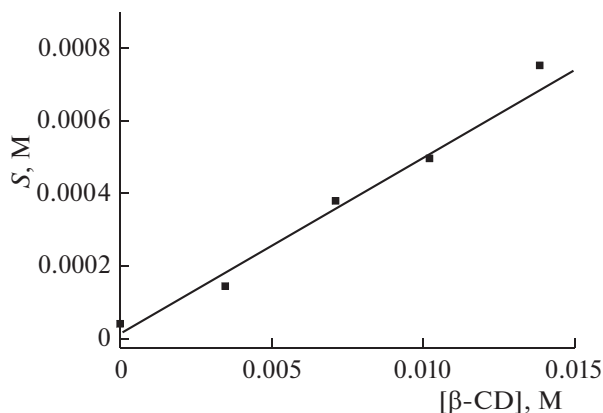


Рис. 2. Растворимость (S) FTY720 в присутствии β -CD в фосфатном буферном растворе (pH 6.8, $T = 298.15$ K).

Константа равновесия процесса комплексообразования выражается как

$$K = \frac{[\beta\text{-CD}/\text{FTY720}]}{[\beta\text{-CD}][\text{FTY720}]} \quad (2)$$

и может быть рассчитана на основе фазовой диаграммы растворимости [43]:

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

где *slope* — наклон фазовой диаграммы, S_0 — растворимость чистого FTY720. Полученное значение константы устойчивости составило $1503 \pm \pm 100 \text{ M}^{-1}$. Обычно константы устойчивости 1 : 1 комплексов β -CD с различными органическими молекулами находятся в диапазоне $50\text{--}20000 \text{ M}^{-1}$ [44], на основании чего комплекс с FTY720 можно считать достаточно стабильным.

Для определения способа взаимодействия органических субстратов с циклодекстринами широко используется ^1H ЯМР-спектроскопия. Однако очень низкая растворимость FTY720 в фосфатном буферном растворе ограничила применение этого метода, и лишь качественные ^1H ЯМР-эксперименты были проведены в дейтерированной воде. На рис. 4а приведены фрагменты спектров β -CD без и с содержанием FTY720. Протоны β -CD: Н(2), Н(4) и Н(6) находятся на внешней поверхности молекулы макроцикла, в то время как протоны Н(3) и Н(5) расположены внутри макроциклической полости и чувствительны к образованию комплекса включения. Сравнительный анализ приведенных спектров показывает, что химические сдвиги протонов Н(3) и Н(5) заметно смещаются в сильное поле в присутствии FTY720, и этот факт указывает на проникновение FTY720 в полость макроцикла и образование комплексов включения β -CD/FTY720.

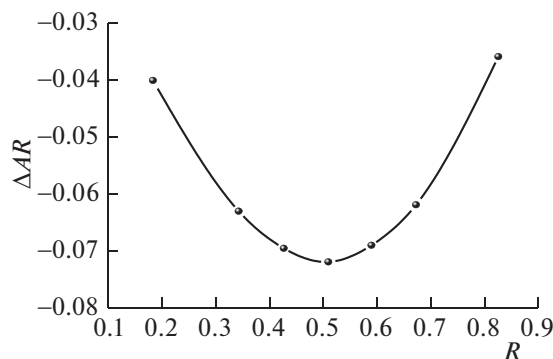


Рис. 3. График Жоба для комплексообразования FTY720 с β -CD в буферном растворе при pH 6.8 (298.15 K).

Для выявления центров комплексообразования FTY720 с β -CD были определены изменения химических сдвигов протонов лекарственного соединения ($\Delta\delta$), обусловленные присутствием β -CD:

$$\Delta\delta = \delta_{\beta\text{-CD}/\text{FTY720}} - \delta_{\text{FTY720}}. \quad (4)$$

Значения $\Delta\delta$ приведены на рис. 4б. Как видно, наибольшие изменения наблюдаются для протонов FTY720: Н2, Н3, Н5 и Н6, принадлежащих бензольному кольцу. Вероятно, именно этот фрагмент молекулы FTY720 как наиболее гидрофобный располагается в макроциклической полости. Полярный фрагмент молекулы FTY720 с NH_2 - и OH -группами располагается снаружи и потенциально может участвовать в образовании водородных связей с OH -группами, окружающими полость.

Для установления более точной конфигурации комплекса β -CD/FTY720 использовались методы компьютерного моделирования. На рис. 5 представлена в разных ракурсах конфигурация комплекса включения β -CD/FTY720, оптимизированная методом DFT-B3LYP/6-31G. Энергия связывания составляет -67.7 кДж/моль . Для комплекса включения характерно образование водородных связей через OH - и NH_2 -группы FTY720 и OH -группы обода β -CD.

Поведение комплекса включения в водном растворе было исследовано методом молекулярной динамики. Как известно, глубина полости циклодекстринов (расстояние между ободами) составляет 0.78 нм [45, 46], т.е. расстояние от центра полости циклодекстрина до ободов равно 0.39 нм . На рис. 6 представлено изменение расстояния $R_{\text{ц.м}}$ между центром масс молекулы FTY720 и центром полости β -CD в течение всего времени наблюдения (150 нс). Как можно видеть, $R_{\text{ц.м}}$ всегда было меньше 0.39 нм , т.е. центр масс молекулы-гостя постоянно находился в полости молекулы-хозяи-

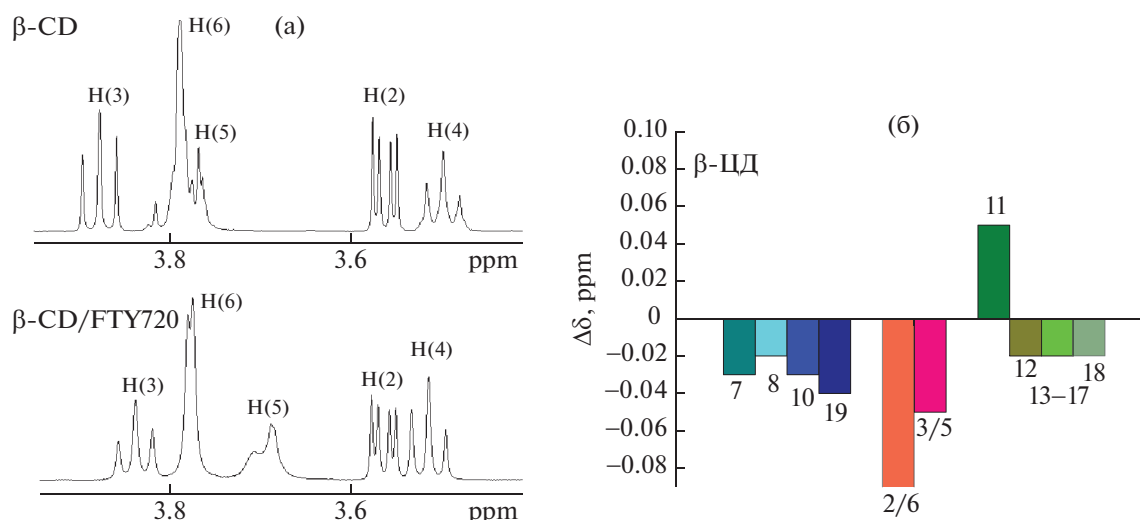


Рис. 4. Данные ^1H ЯМР для комплексообразования β -CD с FTY720 (D_2O , 298.15 K): а – фрагменты спектров чистого β -CD и β -CD в присутствии FTY720; б – изменения химических сдвигов протонов FTY720.

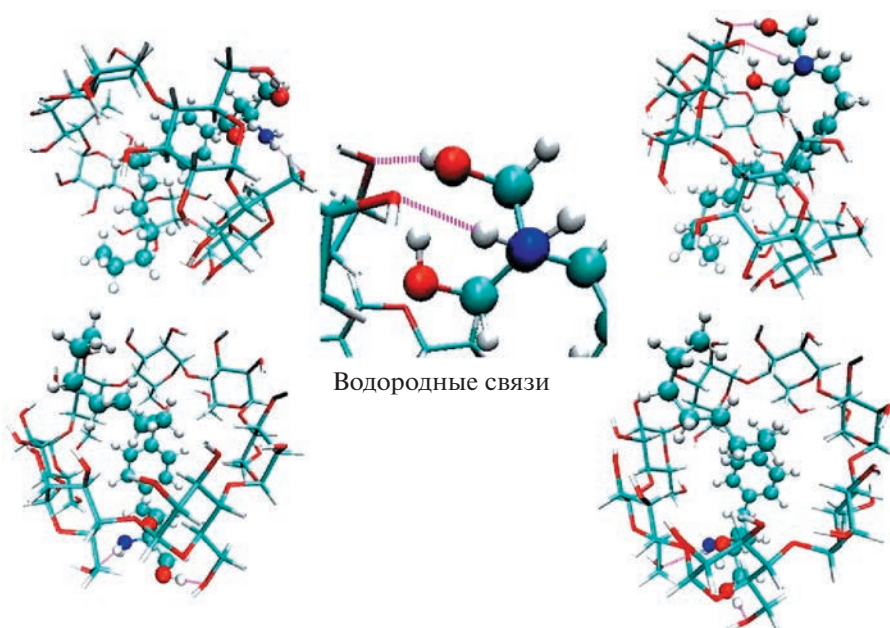


Рис. 5. Оптимизированная методом DFT–B3LYP/6-31G конфигурация комплекса β -CD/FTY720 (разные ракурсы, фиолетовым цветом обозначены водородные связи между β -CD и FTY720).

на, и комплекс включения не разрушился в водной среде.

Молекулу FTY720 можно условно разделить на три фрагмента: I – разветвленный заместитель, содержащий OH- и NH_2 -группы, II – бензольное кольцо, III – *n*-октильный радикал (рис. 1). Чтобы выяснить, насколько отдельные фрагменты молекулы FTY720, находящейся в полости β -CD, контактируют с водой (вододоступность этих фрагментов), мы построили атом-атомные функ-

ции радиального распределения (ФРР) $g(r)$ кислорода воды $\text{O}_\text{В}$ относительно атомов FTY720: атомов углерода $\text{C}_\text{Ф}(\text{I})$, $\text{C}_\text{Ф}(\text{II})$, $\text{C}_\text{Ф}(\text{III})$, принадлежащих отдельным фрагментам молекулы, атомов кислорода $\text{O}_\text{Ф}$ и азота $\text{N}_\text{Ф}$. Графики ФРР представлены на рис. 7.

Как можно видеть, высота всех пиков на ФРР, за исключением первого пика ФРР $\text{O}_\text{Ф}\text{O}_\text{В}$ (рис. 7а), меньше единицы. Это показывает, что в ближайшем окружении FTY720 значительно

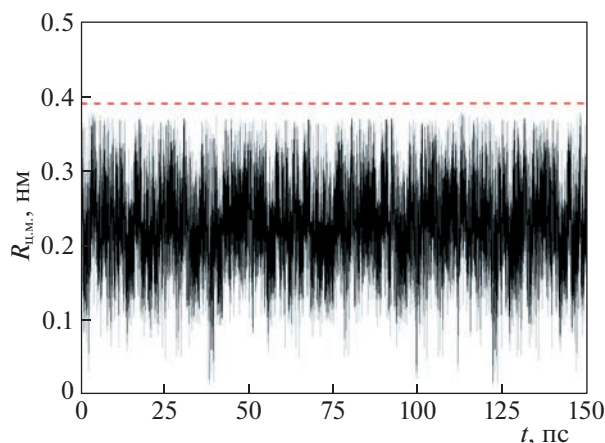


Рис. 6. Изменение расстояния $R_{\text{ц.м.}}$ между центром масс молекулы FTY720 и центром полости β -CD в течение наблюдения (t — время наблюдения).

меньше воды, чем в объеме раствора, и подтверждает, что молекула-гость находится в полости β -CD. В то же время ОН-группы FTY720 окружены молекулами воды, т.е. выходят за пределы полости. Основной пик на ФРР $N_{\text{Ф}}O_{\text{В}}$ расположен на 0.474 нм (рис. 7б), т.е. вклад в него дают молекулы воды, локализованные у ОН-групп FTY720 и наружного обода β -CD. Молекулам воды, находя-

щимся в окружении самой NH_2 -группы, соответствует предшествующее этому пику “плечо” в области 0.37–0.41 нм. Аналогично, на всех ФРР $C_{\text{Ф}}O_{\text{В}}$ (рис. 7в–7д) основной пик на расстоянии 0.47 нм и более обусловлен молекулами воды вокруг ОН-групп β -CD. Присутствие воды в ближайшем окружении углеродов финголимода характеризуют первый, более низкий пик на ФРР $C_{\text{Ф}}(I)O_{\text{В}}$ (рис. 7в) и “плечо” на ФРР $C_{\text{Ф}}(II)O_{\text{В}}$ и $C_{\text{Ф}}(III)O_{\text{В}}$ (рис. 7г, 7д).

Атомы бензольного кольца (фрагмент II) в наименьшей степени контактируют с водой, что мы видим из поведения ФРР $C_{\text{Ф}}(II)O_{\text{В}}$ (рис. 7г): пики на этой ФРР самые низкие. Перед слабовыраженным пиком выделяется “плечо” на 0.35–0.39 нм. Как следует из его малой высоты, вода вокруг бензольного кольца FTY720 присутствует в очень незначительном количестве.

Рисунок 7д характеризует распределение воды вокруг гидрофобного алкильного радикала FTY720 (фрагмент III). Этот фрагмент в полости циклодекстрина находится ближе к ободу, чем бензольное кольцо, поэтому более доступным для воды, о чем свидетельствуют более высокие “плечо” и пик (на 0.39–0.42 и 0.476 нм, соответственно).

В окружении атомов углерода, принадлежащих заместителю с полярными ОН- и NH_2 -группами (фрагмент I), локализовано значительно

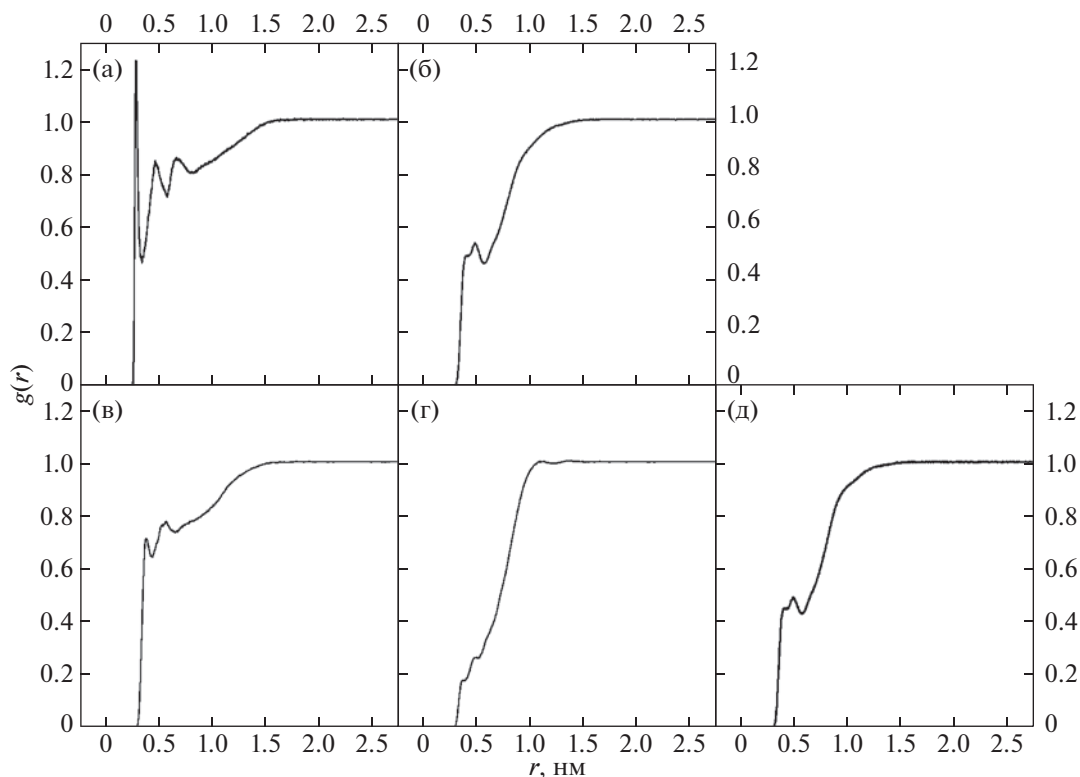


Рис. 7. Атом-атомные ФРР $g(r)$ финголимода — вода: а — $O_{\text{Ф}}O_{\text{В}}$, б — $N_{\text{Ф}}O_{\text{В}}$, в — $C_{\text{Ф}}(I)O_{\text{В}}$, г — $C_{\text{Ф}}(II)O_{\text{В}}$, д — $C_{\text{Ф}}(III)O_{\text{В}}$.

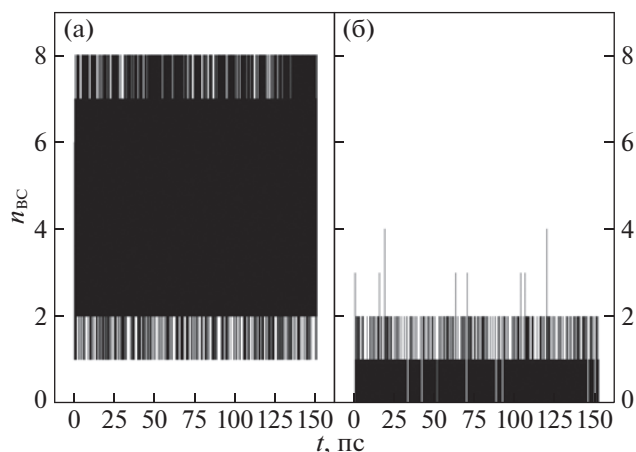


Рис. 8. Изменение в течение наблюдения (t — время наблюдения) количества водородных связей n_{BC} , образованных молекулой FTY720 с водой (а) и с β -CD (б).

большее количество воды. Первую координационную сферу характеризует не “плечо”, а выраженный пик на 0.378 нм, а второй пик расположен на 0.547 нм (рис. 7в). Поведение ФРР $O_{\Phi}O_{\Phi}$ показывает, что ОН-группы FTY720 окружены водой и находятся за пределами полости β -CD, следовательно, связанные с ними атомы углерода находятся на границе полости, вблизи обода циклодекстрина. Вторая координационная сфера этих атомов — молекулы воды, связанные с ОН- и NH_2 -группами FTY720 и с ОН-группами β -CD. Второй пик ФРР $C_{\Phi}(I)O_{\Phi}$ шире и расположен на больших расстояниях, чем пики ФРР $C_{\Phi}(II)O_{\Phi}$ и $C_{\Phi}(III)O_{\Phi}$.

Используя геометрический критерий: $r_{XX} \leq 0.35$ нм, $r_{XH} \leq 0.26$ нм, $\angle(H-X \cdots X) \leq 30^\circ$ (X — кислород воды и кислород либо азот FTY720), мы оценили количество водородных связей n_{BC} , образованных молекулой FTY720 с водой и β -CD на каждом шаге наблюдения (рис. 8). Как можно видеть, FTY720 образует от 1 до 8 водородных связей с водой и от 0 до 2 (в единичных случаях более двух) водородных связей с β -CD. Средние числа водородных связей FTY720—вода и FTY720— β -CD составили 4.74 и 0.24 соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании представлен механизм инкапсуляции FTY720 с помощью β -CD. С использованием ЯМР-анализа, молекулярного докинга и молекулярно-динамического моделирования показан наиболее возможный способ взаимодействия между FTY720 и β -CD и предложена конфигурация образующихся комплексов включения. При исследовании методом МД поведения комплекса включения β -CD/FTY720 уста-

новлено, что молекула FTY720 в течение всего времени наблюдения не покидала полости циклодекстрина, но ОН-группы FTY720 находились за пределами полости. Водородные связи ОН- и NH_2 -групп финголимода с ОН-группами обода циклодекстрина, характерные для комплекса включения в вакууме, были разрушены, при этом FTY720 и β -CD образовывали водородные связи с водой. Гидрофобные фрагменты молекулы FTY720 находились внутри макроциклической полости, причем наименее вододоступными были атомы бензольного кольца, т.е. молекулы воды в глубину полости β -CD не проникали.

Работа выполнена в соответствии с планами по темам госзадания ИХР РАН (тема № 122040500044-4 — экспериментальное исследование комплексообразования и тема № 122040600072-6 — моделирование процессов образования комплексов включения).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salem H., Abo Elsoud F.A., Heshmat D. // Spectrochim. Acta. A: Mol. Biomol. Spectrosc. 2021. V. 250. P. 119331. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119331>
2. Jaafar N., Zeineddine M., Massouh J. et al. // Mult. Scler. Relat. 2019. V. 36. P. 101437. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101437>
3. Strader C.R., Pearce C.J., Orberlies N.H. // J. Nat. Prod. 2011. V. 74. № 4. P. 900. <https://doi.org/10.1021/np2000528>
4. Al-Izki S., Pryce G., Jackson S.J. et al. // Mult. Scler. J. 2011. V. 17. № 8. P. 939. <https://doi.org/10.1177/1352458511400476>
5. Pelletier D., Hafler M.D., Hafler D.A. // N. Engl. J. Med. 2012. V. 366. P. 339. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1101691>
6. Aytan N., Choi J.-K., Carreras I. // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 1. P. 24939. <https://doi.org/10.1038/srep24939>
7. Nasser A. // J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. 2019. V. 30. № 5. P. 31469655. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0063>
8. Medeiros da Silva M., Odebrecht de Souza R., Gonçalves M.V.M. // J. Neuroimmunol. 2022. V. 2. P. 100071. <https://doi.org/10.1016/j.nerep.2022.100071>
9. Gomez-Mayordomo V., Montero-Escribano P., Matías-Guiu J.A. et al. // J. Med. Virol. 2020. V. 93. № 1. P. 546. <https://doi.org/10.1002/jmv.26279>
10. Mona J., Kuo C.-J., Perevedentseva E. et al. // Diam. Relat. Mater. 2013. V. 39. P. 73. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2013.08.001>
11. Center for drug Evaluation and Research. 2010. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022527orig1s000clinpharmr.pdf
12. Tamakuwala M., Stagni G. // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2016. V. 17. P. 907. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0415-9>

13. Ward M.D., Jones D.E., Goldman M.D. // Expert Opin. Drug Saf. 2014. V. 13. P. 989.
<https://doi.org/10.1517/14740338.2014.920820>
14. Miranda R.R., Ferreira N.N., de Souza E.E. et al. // ACS Appl. Bio Mater. 2022. V. 5. P. 3371.
<https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00349>
15. Zeraatpisheh Z., Mirzaei E., Nami M. et al. // Eur. J. Neurosci. 2021. V. 54. № 4. P. 5620.
<https://doi.org/10.1111/ejn.15391>
16. Shirmard L.R., Ghofrani M., Javan N.B. et al. // Drug Dev. Ind. Pharm. 2020. V. 46. № 2. P. 318.
<https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1721524>
17. Shahsavari S., Shirmard L.R., Amini M. et al. // J. Pharm. Sci. 2016. V. 106. P. 176.
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.07.026>
18. Javan N.B., Shirmard L.R., Omid N.J. et al. // J. Microencapsul. 2016. V. 33. № 5. P. 1.
<https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1108982>
19. Zou X., Jiang Z., Li L. et al. // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2021. V. 49. № 1. P. 83.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1871620>
20. Jacob S., Nair A.B. // Drug Dev. Res. 2018. V. 79. № 5. P. 201.
<https://doi.org/10.1002/ddr.21452>
21. Terekhova I., Kritskiy I., Agafonov M. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 23. P. 9102.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239102>
22. Garibyan A., Delyagina E., Agafonov M. et al. // J. Mol. Liq. 2022. V. 360. P. 119548.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119548>
23. Saokham P., Muankaew C., Jansook P. et al. // Molecules. 2018. V. 23. № 5. P. 1161.
<https://doi.org/10.3390/molecules23051161>
24. dos Passos Menezes P., de Araújo Andrade T., Frank L.A. et al. // Int. J. Pharm. 2019. V. 559. P. 312.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.041>
25. Job P. // Annual Chemistry. 1928. V. 9. P. 113.
26. Becke A.D. // Phys. Rev. A. 1988. V. 38. P. 3098.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098>
27. Lee C., Yang W., Parr R.G. // Phys. Rev. B. 1988. V. 37. P. 785.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>
28. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et al. // Wallingford, CT, USA, 2016
29. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W. et al. // J. Comp. Chem. 2009. V. 16. P. 2785.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
30. GROMACS 2019.6. <https://manual.gromacs.org/documentation/2019.6>
31. Nose S. // Mol. Phys. 1984. V. 52. P. 255.
<https://doi.org/10.1080/00268978400101201>
32. Hoover W.G. // Phys. Rev. A. 1985. V. 31. P. 1695.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevA.31.1695>
33. Allen M.P., Tildesley D.J. // Computer Simulation of Liquids, Clarendon Press, London, 1987.
34. Darden T., York D., Pedersen L. // J. Chem. Phys. 1993. V. 98. P. 10089.
35. Essmann M.U., Perera L., Berkowitz M.L. et al. // J. Chem. Phys. 1995. V. 103. P. 8577.
<https://doi.org/10.1063/1.470117>
36. Hess M.B., Bekker H., Berendsen H.J.C. et al. // J. Comput. 1997. V. 18. № 12. P. 1463.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H)
37. Jorgensen W.L., Tirado-Rives J. // PNAS. 2005. V. 102. P. 6665.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0408037102>
38. Dodda L.S., Vilseck J.Z., Tirado-Rives J. et al. // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. P. 3864.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b00272>
39. Dodda L.S., de Vaca I.C., Tirado-Rives J. et al. // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. Web Server issue W331.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx312>
40. Jorgensen W.L., Maxwell D.S., Tirado-Rives J. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 11225.
<https://doi.org/10.1021/ja9621760>
41. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graph. 1996. V. 14. P. 33.
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
42. Higuchi T., Connors K. // Adv. Anal. Chem. Instrum. 1964. V. 4. P. 117.
43. Saokham P., Muankaew C., Jansook P. et al. // Molecules. 2018. V. 23. № 5. P. 1161.
<https://doi.org/10.3390/molecules23051161>
44. Prajapati M., Loftsson T. // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2022. V. 69. P. 103106.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103106>
45. Szejtli J. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1743.
<https://doi.org/10.1021/cr970022c>
46. Jacob S., Nair A.B. // Drug Dev. Res. 2018. V. 79. P. 201.
<https://doi.org/10.1002/ddr.21452>