

На правах рукописи

**ЗАШИХИНА
Наталья Николаевна**

**БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ
СОПОЛИМЕРОВ α -АМИНОКИСЛОТ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ
ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**

Специальность 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург

2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высокомолекулярных соединений Российской академии наук

Научный руководитель:

Коржикова-Влах Евгения Георгиевна
кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич,
доктор химических наук, ведущий
научный сотрудник кафедры
высокомолекулярных соединений
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова».

Зорин Иван Михайлович, доктор
химических наук, доцент кафедры химии
высокомолекулярных соединений
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный
университет».

Ведущая организация:

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «06» июня 2019 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 002.229.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высокомолекулярных соединений Российской академии наук по адресу: 199004, Санкт-Петербург, Большой пр. В. О., 31, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высокомолекулярных соединений Российской академии наук и на сайте http://macro.ru/OLD_DOC/council/dis/ZashihinaNN/ZashihinaNN_dis.pdf

Автореферат разослан « » 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук

Виноградова Людмила Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Системы доставки лекарственных веществ являются чрезвычайно перспективным инструментом таких терапевтических подходов, как увеличение транспорта веществ через биологические барьеры, адресная доставка лекарств к конкретным органам, а также лечение онкологических заболеваний и генная терапия. Хорошо известно, что применение противоопухолевых препаратов связано с высокой токсичностью, отсутствием селективности и низкой биодоступностью, что приводит к ограничению их применения в медицинской практике. В свою очередь, клиническое применение природных биомолекул, таких как белки или пептиды, сопряжено с их низкой устойчивостью и быстрой инактивацией в организме вследствие ферментативной деградации и зачастую высокой иммуногенностью.

Разработка биодеградируемых полимерных носителей для доставки лекарственных веществ позволяет преодолеть имеющиеся недостатки. В частности, инкапсулирование лекарственных веществ внутрь полимерных частиц предохраняет биомолекулы от действия ферментов и защитных систем организма, а также позволяет доставить их в нужные ткани с возможностью поддержания желаемой концентрации за счет регулируемого высвобождения. Применение полимерных систем для доставки лекарственных веществ резко повышает эффективность терапии вследствие увеличения их биодоступности и снижения общей токсичности для организма. По этим причинам использование инкапсулированных форм лекарственных веществ представляет собой перспективную стратегию лечения различных заболеваний.

Особый интерес представляют собой частицы, полученные в результате самоорганизации амфифильных полимеров. Выбор природы и структуры амфифильного полимера позволяет управлять физико-химическими и биологическими свойствами формируемых частиц, такими как размер, морфология (мицеллы, полимеросомы или наносферы), стабильность, биосовместимость, способность к биодеградации, способность включать в себя те или иные вещества, наличие реакционноспособных групп, позволяющих проводить функционализацию поверхности, чувствительность к изменениям среды и т.д.

Среди разнообразных амфифильных сополимеров биосовместимые и биодеградируемые сополимеры являются наиболее перспективными для создания систем доставки лекарств. В качестве макромолекулярной основы для получения таких систем значительный интерес представляет использование биодеградируемых полимеров на основе α -аминокислот и их сополимеров с поливинилсахаридами (гликополимерами). Аминокислоты, являясь продуктами биодеградации соответствующих полимеров, усваиваются организмом или выводятся из него естественными метаболическими путями. В свою очередь, комбинирование полиаминокислот и поливинилсахаридов позволяет повысить устойчивость полимерных систем к биодеградации, а следовательно, обеспечить пролонгированное действие лекарственных форм. Кроме того, использование гликополимеров в качестве одного из блоков сополимера обеспечит возможность создания систем, способных к молекулярному распознаванию лектинов клеточной мембранны. Наличие реакционноспособных групп в полимерных блоках дает возможность проведения ковалентного связывания различных веществ с поверхностью носителей. Присутствие заряженных групп в боковых цепях аминокислот, содержащихся в структуре гидрофильного фрагмента, позволяет получать полимерные системы, чувствительные к pH, что, в свою очередь, важно для повышения специфичности доставки и достижения контролируемого высвобождения лекарственного вещества.

Принимая во внимание высокий потенциал полимерных биодеградируемых частиц на основе амифильных сополимеров аминокислот для применения в качестве систем доставки лекарств, разработка полимерных носителей и исследование влияния химического строения, молекулярно-массовых характеристик, гидрофобно-гидрофильного баланса полимера на размер формирующихся частиц, их стабильность к агрегации, скорость деградации и способность связывать биологически активные молекулы различной химической природы является **актуальной** проблемой, решение которой позволит приблизиться к получению новых лекарственных форм для лечения онкологических заболеваний и осложнений сахарного диабета.

Цель настоящей работы – разработка методов синтеза амифильных сополимеров α -аминокислот и получение на их основе частиц, обладающих комплексом свойств, необходимых для их использования в качестве систем доставки лекарственных веществ различной природы.

Достижение поставленной цели включало в себя решение **следующих задач**:

- синтез катионных и анионных биодеградируемых блок- и статистических сополимеров на основе α -аминокислот, содержащих в своей структуре реакционноспособные функциональные группы;
- разработка метода получения нового макроинициатора на основе синтетического гликополимера поли(2-деокси-2-метакриламидо-D-глюкозы) и синтез на его основе сополимеров с α -аминокислотами;
- оптимизация состава и структуры исходных полимеров с целью получения узкодисперсных частиц с необходимым набором характеристик и свойств (контролируемый размер, способность к биодеградации, способность связывать биологически активные вещества, стабильность в физиологических средах, отсутствие цитотоксичности);
- разработка методов модификации полимерных частиц за счет ковалентного связывания различных веществ с их поверхностью;
- изучение особенностей инкапсулирования веществ различной природы и исследование профилей их высвобождения из полимерных частиц;
- изучение скорости деградации полимерных материалов и частиц на их основе в модельных ферментативных средах, цитотоксичности полимерных частиц, скорости их накопления в клетках и биологической активности; оценка возможности применения формируемых частиц в качестве систем доставки лекарственных веществ.

Методы исследования:

- для синтеза и модификации полимеров использовались методы полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксиангидридов α -аминокислот, контролируемой радикальной полимеризации с обратимой передачей цепи по механизму присоединения-фрагментации и полимераналогичных превращений;
- для определения структуры, состава и молекулярно-массовых характеристик синтезированных полимеров применялись методы ЯМР-спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и гель-проникающей хроматографии (ГПХ);
- для определения физико-химических характеристик полученных полимерных частиц и изучения кинетики деградации полимерного материала использовались методы динамического рассеяния света (ДРС), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и ВЭЖХ;
- определение количеств инкапсулированных веществ проводили методами ВЭЖХ и/или УФ-спектроскопии;

- для определения биологических свойств исследуемых материалов использовались методы анализа цитотоксичности частиц, флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

Научная новизна работы состоит в том, что **впервые**:

- разработаны методы синтеза новых катионных и анионных статистических сополимеров на основе полиаминокислот с частичной заменой *L*-аминокислот на *D*-изомеры;
- предложен способ синтеза макроинициатора на основе поли(2-деокси-2-метакриламино-*D*-глюкозы) для полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксиангидридов α -аминокислот и синтезирован ряд новых амфи菲尔ных блок-сополимеров поли(2-деокси-2-метакриламино-*D*-глюкозы) с полиаминокислотами;
- получены углубленные научные представления о влиянии состава и гидрофильно-гидрофобного баланса сополимера на физико-химические свойства получаемых частиц, устойчивость к агрегации, скорость деградации, эффективность инкапсулирования различных веществ, цитотоксичность, способность проникать в клетки;
- проведена оценка эффективности инкапсулирования лекарственных субстанций различной природы, а также скорости их высвобождения из полимерных систем на основе α -аминокислот. Получены доказательства принципиальной возможности использования полученных полимерных частиц в качестве систем доставки биологически активных веществ различной природы (гидрофобных и амфи菲尔ных противоопухолевых веществ, пептидов).

Практическая значимость работы:

- полученные новые биодеградируемые частицы на основе амфи菲尔ных сополимеров α -аминокислот, а также сополимеров полиаминокислот с поли(2-деокси-2-метакриламино-*D*-глюкозой) перспективны для разработки систем доставки биологически активных веществ различной природы (амфи菲尔ное основание иринотекан, гидрофобный паклитаксел и анионный С-пептид), что позволяет расширить их применение в медицинской практике;
- установлена высокая цитотоксичность частиц на основе полиаминокислот с инкапсулированным паклитакселом на клетках рака легких и молочной железы, сопоставимая или превышающая таковую для коммерчески доступного лекарственного препарата – «паклитаксел-ЛЭНС», что обуславливает перспективность использования таких систем для лечения онкологических заболеваний;
- инкапсулированный и ковалентно связанный с поверхностью частиц С-пептид, обладающий биологической активностью, превышающей в два раза активность нативной формы молекулы, представляет практический интерес для разработки пролонгированных форм С-пептида при лечении осложнений сахарного диабета;
- полимерные частицы, модифицированные флуоресцентными красителями, для биовизуализации частиц в клетках могут быть использованы в целях диагностики и мониторинга течения онкологических заболеваний.

Обоснованность и достоверность результатов и выводов настоящей работы обеспечивается использованием современных методов синтеза и исследования полимеров и частиц на их основе, подтверждается хорошей воспроизводимостью всех полученных результатов, их согласованностью при использовании независимых методов исследования и соответствием полученных результатов с имеющимися литературными данными.

Положения, выносимые на защиту:

- использование комбинации методов контролируемой радикальной полимеризации с обратимой передачи цепи по механизму присоединения-фрагментации винилсахарида 2-деокси-2-метакриламино-*D*-глюкозы и полимеризации

с раскрытием цикла N-карбоксиангидридов α-аминокислот позволяет получать узкодисперсные сополимеры гликополимеров и полиаминонокислот различного состава;

- способность к самоорганизации в водных средах амфифильных сополимеров на основе полипептидов позволяет получать частицы различной структуры. Варьирование химической структуры полимеров (длина гидрофильного и гидрофобного блоков в случае блок-сополимеров или гидрофильно-гидрофобного баланса для статистических сополимеров), а также условий формирования (рН раствора) дает возможность регулирования гидродинамических размеров самоорганизованных структур;
- использование метода активированных эфиров для модификации поверхности частиц, содержащих карбоксильные группы, биологически активными веществами (белками и пептидами) обеспечивает сохранение активности нативной молекулы и позволяет получать системы доставки, способные к молекулярному распознаванию;
- структура и свойства поверхности частиц на основе полипептидов определяют склонность частиц к агрегации (или ее отсутствие) в присутствии белков, цитотоксичность полимерных систем, скорость биодеградации, скорость проникновения в клетки и скорость захвата макрофагами;
- перспективность использования полученных полимерных частиц в качестве систем доставки веществ различной природы определяется отсутствием цитотоксичности, варьируемой скоростью биодеградации полимерных частиц на основе полипептидов и их конъюгатов с полиглюкозой (поли(2-деокси-2-метакриламино-D-глюкозой), а также высокими степенями загрузки инкапсулируемых в них веществ.

Апробация результатов. Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на международных и российских конференциях и симпозиумах: 3rd International Research and Practice Conference «Nanotechnology and nanomaterials», Nano-2015 (2015, Lviv, Ukraine); 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry «MedChem-2015» (Новосибирск, 2015); Второй междисциплинарный симпозиум и молодежный форум по медицинской, органической и биологической химии – 2015, (Новый Свет, Крым, 2015); 11th, 12th, 13th, 14th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientists «Modern problems of polymer science» (Saint-Petersburg, 2015, 2016, 2017, 2018); XI, XIII Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2016, 2018), VI Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2016); X Международная конференция молодых ученых по химии «Менделеев-2017» (Санкт-Петербург, 2017); 9th International Symposium «Molecular Mobility and Order in Polymer Systems» (St. Petersburg, 2017); Baltic Polymer Symposium 2017 (Tallinn, Estonia, 2017); III, IV Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической, Биологической Химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма, (Севастополь, 2017, Новый Свет, Крым 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в международных журналах и тезисы 19 докладов.

Личный вклад автора состоял в непосредственном участии на всех этапах работы: постановке задач, выполнении всех экспериментальных исследований, анализе, интерпретации и обобщении полученных результатов, а также подготовке докладов и публикаций.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение), заключения, выводов, списка используемой литературы (157 наименований). Работа изложена на 151 странице и включает 32 таблицы и 61 рисунок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во ВВЕДЕНИИ обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цели и задачи работы, отражены научная новизна и практическая значимость полученных результатов, изложены основные положения, выносимые на защиту.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор содержит анализ современного состояния исследований в области создания и применения природных и синтетических полимеров в качестве систем доставки лекарственных веществ, в частности, биодеградируемых полимеров. Рассматриваются основные методы получения и характеристики полимерных частиц, обсуждается влияние их физико-химических характеристик на биологические свойства систем доставки. Обсуждаются возможные методы синтеза полипептидных материалов. Формулируется постановка задач диссертационной работы.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава содержит описание методов синтеза и модификации амфи菲尔ных блок- и статистических сополимеров на основе α -аминокислот, а также их сополимеров с полиг(2-деокси-2-метакриламино-D-глюкозой). Приведены методы оценки состава сополимеров и представлены методы исследования физико-химических и биологических свойств формируемых полимерных частиц.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках данной работы был синтезирован ряд амфи菲尔ных блок- и статистических сополимеров на основе α -аминокислот, а также их сополимеров с полиг(2-деокси-2-метакриламино-D-глюкозой), не описанных в литературе, получены биодеградируемые частицы различной структуры и изучены характеристики и свойства данных систем. Проведена модификация поверхности полимерных частиц пептидами, а также флуоресцентными красителями.

Широкий диапазон полученных биодеградируемых полимерных частиц позволил сравнить их потенциал в качестве систем доставки и разработать прототипы лекарственных форм веществ различной химической природы.

3.1. Синтез амфи菲尔ных сополимеров на основе α -аминокислот

Для синтеза полииаминокислот в данной работе был использован метод полимеризации с раскрытием цикла (Ring-opening polymerization, ROP) N-карбоксиангидридов (N-КА) α -аминокислот. В качестве инициатора (I) для синтеза гомополимеров и статистических сополимеров α -аминокислот использовали N-гексиламин. Выбор лизина и глутаминовой кислоты в качестве гидрофильных звеньев сополимеров был обусловлен наличием функциональных групп в боковой цепи данных аминокислот, которые обеспечивали pH-чувствительность амфи菲尔ного сополимера и возможность проведения ковалентной модификации поверхности частиц.

3.1.1. Синтез блок-сополимеров на основе природных α -аминокислот

Получение амфи菲尔ных блок-сополимеров полиг(L-лизин)-б-полиг(L-лейцин) (PLys-*b*-PLeu) и полиг(L-глутаминовая кислота)-б-полиг(L-фенилаланин) (PGlu-*b*-PPhe) проводили в три этапа. На первом этапе синтезировали гомополимер защищенной аминокислоты – полиг(ϵ -карбоксибензил-L-лизин) (P(Lys(Z)) или полиг(γ -бензил-L-глутамат) (P(Glu(OBzl)), представляющей в конечном блок-сополимере гидрофильный блок

(Рисунок 1, I). Гомополимер, содержащий свободную концевую аминогруппу, использовали в качестве макроинициатора (macrol) для полимеризации N-KA гидрофобной аминокислоты (Рисунок 1, II). На указанном этапе полученный блок-сополимер характеризовался гидрофобной природой и приобретал амфи菲尔ные свойства после деблокирования защитных групп (Рисунок 1, III).

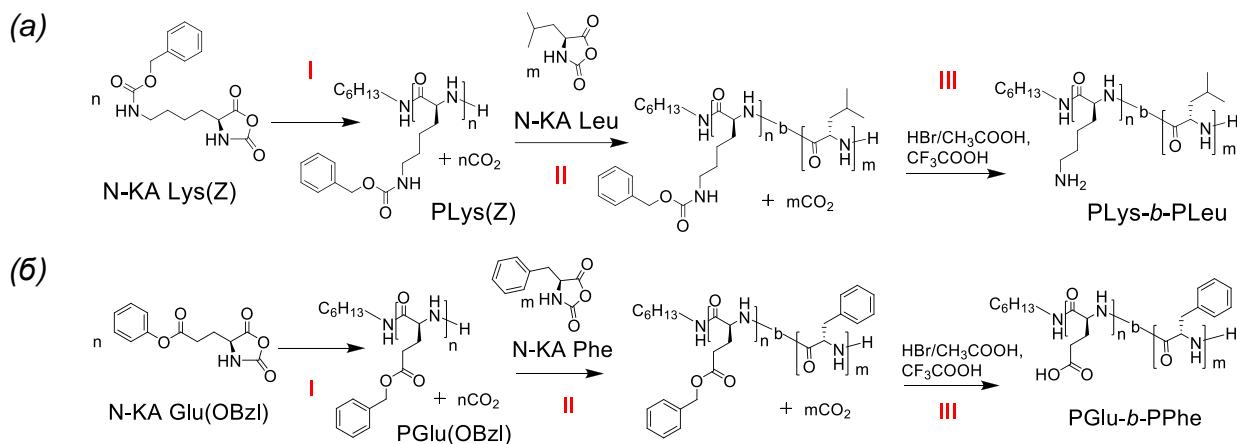


Рисунок 1 – Схема синтеза блок-сополимеров PLys-*b*-PLeu (a) и PGlu-*b*-PPhe (б).

Молекулярные массы (M_n) и дисперсность (\mathcal{D}) синтезированных гомополимеров определяли методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ). Количество мономерных звеньев в цепи гомополимеров рассчитывали по спектрам ^1H ЯМР. Состав деблокированных блок-сополимеров определяли по мольному соотношению аминокислот, полученных после кислотного гидролиза сополимера (Таблицы 1–2). Количественный анализ аминокислот проводили методом ионообменной ВЭЖХ.

Таблица 1 – Характеристики блок-сополимеров PLys_n-*b*-PLeu_m.

Образец	macrol (PLys(Z))		[N-KA Leu]/ [macrol]	ВЭЖХ [Leu]/[Lys]	n_{Lys}^*	m_{Leu}^{**}
	M_n	\mathcal{D}				
PLys- <i>b</i> -PLeu-1	800	1.08	25	4.4	6	26
PLys- <i>b</i> -PLeu-2	800	1.08	50	6.1	6	37
PLys- <i>b</i> -PLeu-3	800	1.08	125	14.3	6	86
PLys- <i>b</i> -PLeu-4	1200	1.13	25	2.7	9	24
PLys- <i>b</i> -PLeu-5	1200	1.13	50	3.7	9	33
PLys- <i>b</i> -PLeu-6	1200	1.13	125	11.4	9	103
PLys- <i>b</i> -PLeu-7	30700	1.25	100	0.9	-	-

* рассчитаны на основании данных, полученных методом ^1H ЯМР-спектроскопии;

** рассчитаны на основании данных, полученных методами ^1H ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ.

Таблица 2 – Характеристики блок-сополимеров PGlu_n-*b*-PPhe_m.

Образец	macrol (PGlu(OBzI))		[N-KA Phe]/ [macrol]	ВЭЖХ [Phe]/[Glu]	n_{Glu}^*	m_{Phe}^{**}
	M_n	\mathcal{D}				
PGlu- <i>b</i> -PPhe-1	13800	1.2	50	0.5	75	38
PGlu- <i>b</i> -PPhe-2	13800	1.2	150	1.3	75	98
PGlu- <i>b</i> -PPhe-3	25800	1.4	100	0.7	-	-

* рассчитаны на основании данных, полученных методом ^1H ЯМР-спектроскопии;

** рассчитаны на основании данных, полученных методами ^1H ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ.

Варьирование мольного соотношения [мономер]/[макроинициатор] ($[M]/[macroI]$) позволило получить блок-сополимеры α -аминокислот, степень полимеризации которых отличалась от теоретически рассчитанной не более, чем на 35%.

3.1.2. Сополимеры с повышенной устойчивостью к биодеградации

Введение *D*-аминокислот, некодируемых аминокислот, а также частично деградируемых или недеградируемых блоков в полипептидную цепь позволяет создавать новые биоматериалы, более устойчивые к ферментативной деградации, что способствует пролонгированному действию лекарственных форм на их основе.

3.1.2.1. Синтез блок-сополимеров, содержащих некодируемую α -аминокислоту

Поскольку α -аминоизомасляная кислота (Aib) не участвует в стандартном биосинтезе белка, содержащие ее в своей структуре пептиды демонстрируют повышенную устойчивость к биодеградации. В данном исследовании были синтезированы (Рисунок 2) и охарактеризованы (Таблица 3) амфи菲尔ные блок-сополимеры на основе *L*-лизина и α -аминоизомасляной кислоты (PLys-*b*-PAib), ранее не описанные в литературе.

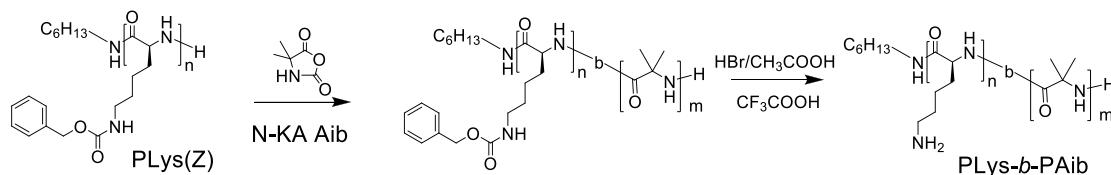


Рисунок 2 – Схема синтеза амфи菲尔ных блок-сополимеров PLys-*b*-PAib.

Таблица 3 – Характеристики блок-сополимеров PLys_n-*b*-PAib_m.

Образец	macrol (PLys(Z))		[N-KA Aib]/ [macrol] [Aib]/[Lys]	ВЭЖХ	n_{Lys}^*	m_{Aib}^{**}
	M_n	\mathcal{D}				
PLys- <i>b</i> -PAib-1	6200	1.24	50	0.5	30	15
PLys- <i>b</i> -PAib-2	6200	1.24	75	0.7	30	21
PLys- <i>b</i> -PAib-3	6200	1.24	100	1.0	30	30

* рассчитаны на основании данных, полученных методом ¹H ЯМР-спектроскопии;

** рассчитаны на основании данных, полученных методами ¹H ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ.

В данном случае количество мономерных звеньев Aib сильно отличалось от такового, заданного соотношением $[M]/[macroI]$ в исходной смеси. При получении Aib-содержащих блок-сополимеров максимально достигнутая степень полимеризации Aib составила 30 мономерных звеньев (вместо рассчитанных 100), что, по-видимому, связано с низкой активностью мономера N-KA Aib вследствие стерических затруднений, вызванных наличием двух заместителей в α -положении данной аминокислоты.

3.1.2.2. Синтез статистических сополимеров, содержащих α -*D*-аминокислоту

Другим способом снижения скорости биодеградации полимерных материалов является частичная замена *L*-аминокислот на *D*-изомеры.

Были синтезированы две серии сополимеров, а именно поли(*L*-лизин-*co*-*D*-фенилаланин) (P(Lys-*co*-DPhe)) и поли(*L*-глутаминовая кислота-*co*-*D*-фенилаланин) (P(Glu-*co*-DPhe)), содержащие различное соотношение Lys/Phe и Glu/Phe (Рисунок 3). Мольное соотношение мономеров друг к другу (N-KA Lys(Z) (Glu(OBzl)) [M_1] к N-KA DPhe [M_2]) варьировали от 1 до 8 при заданном мольном соотношении $[M_1+M_2]/[I]$, равном 50.

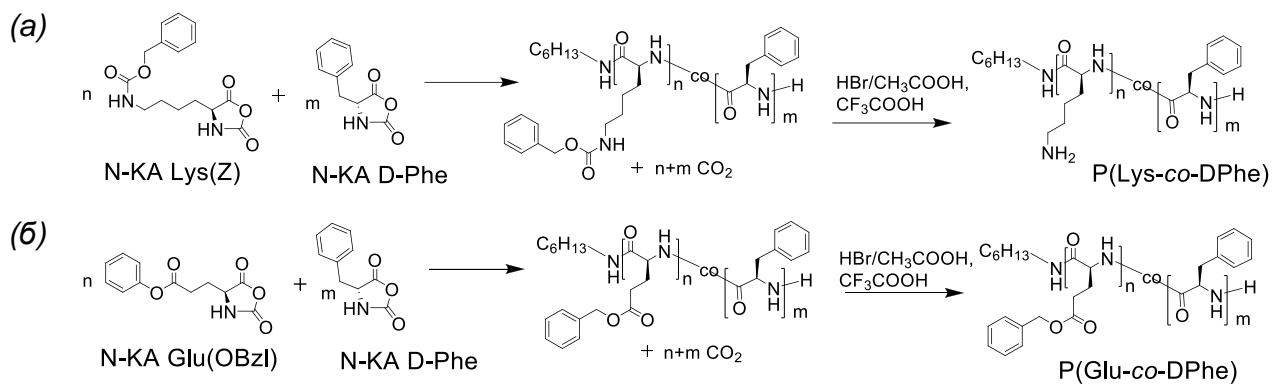


Рисунок 3 – Схема синтеза амфи菲尔ных статистических сополимеров P(Lys-co-DPhe) (a) и P(Glu-co-DPhe) (б).

Молекулярно-массовые характеристики и состав сополимеров определяли методами ГПХ, ВЭЖХ и ¹Н ЯМР-спектроскопии (Таблицы 4–5).

Таблица 4 – Характеристики статистических сополимеров P(Glu_n-co-DPhe_m).

Образец	[N-KA Glu(OBzI)]/[N-KA DPhe]	ГПХ*		¹ Н ЯМР*		ВЭЖХ [Glu]/[DPhe]
		M _n	D	n _{Glu}	m _{DPhe}	
P(Glu-co-DPhe)-1	1	5600	1.15	16	16	0.9
P(Glu-co-DPhe)-2	4	6700	1.20	37	12	2.8
P(Glu-co-DPhe)-3	8	7100	1.29	45	8	5.4

* значения определены для P(Glu(OBzI)-co-DPhe).

Таблица 5 – Характеристики статистических сополимеров P(Lys_n-co-DPhe_m).

Образец	[N-KA Lys(Z)]/[N-KA DPhe]	ГПХ*		ВЭЖХ [Lys]/[DPhe]
		M _n	D	
P(Lys-co-DPhe)-1	1	14000	1.10	1.0
P(Lys-co-DPhe)-2	4	21500	1.13	4.3
P(Lys-co-DPhe)-3	8	24300	1.15	9.5

* значения определены для P(Lys(Z)-co-DPhe).

Варьирование мольного соотношения мономеров позволило получить сополимеры α-аминокислот в широком диапазоне составов. В литературе отсутствуют работы по изучению статистических сополимеров высоких молекулярных масс, поэтому исследования закономерностей «состав полимера – свойства формируемых частиц» представляло значительный интерес.

3.1.2.3. Синтез гибридных блок-сополимеров

Использование недеградируемого полимера в качестве одного из блоков сополимера также позволяет снизить скорость биодеградации полипептидных материалов. В данной работе были получены гибридные блок-сополимеры, в которых полиаминокислотные гидрофобные блоки сочетались с гидрофильным синтетическим гликополимером полигиоксиламидо-D-глюкозой (PMAG). После биодеградации полиаминокислотного блока такой водорастворимый поливинилсахарид может полностью выводиться из организма.

Стратегия получения подобных амфи菲尔ных полимеров была основана на (1) синтезе гликополимера PMAG методом контролируемой радикальной полимеризации с обратимой передачей цепи по механизму присоединения-фрагментации (Reversible Addition Fragmentation chain Transfer, RAFT), (2) модификации его концевой дитиобензоатной группы с целью введения первичной алифатической аминогруппы и (3)

использовании модифицированного гликополимера в качестве макроинициатора для полимеризации с раскрытием цикла (ROP) N-KA α -аминокислот.

Для синтеза гомополимеров PMAG с заданной молекулярной массой (не более 30000) и $\bar{D} < 1.2$ использовали различные соотношения мономер (2-деокси-2-метакриламидо-D-глюкоза)/ RAFT-агент (дитиобензоат 4-цианопентановой кислоты)/ инициатор (динитрил азо-бис-изомасляной кислоты).

Для введения концевых первичных аминогрупп в состав полимерной цепи проводили последовательное восстановление дитиобензоатных групп до тиольных групп с дальнейшей *in situ* реакцией с 2-аминоэтантиол гидрохлоридом (цистеамином) с образованием дисульфидной связи (Рисунок 4).

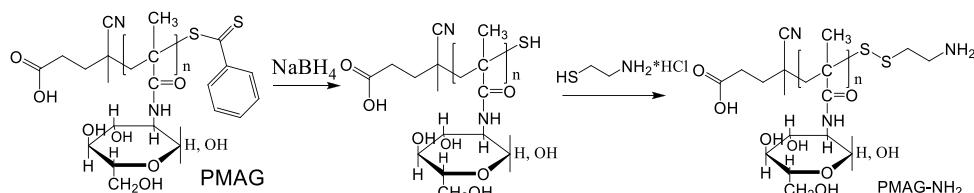


Рисунок 4 – Схема получения макроинициатора PMAG-NH₂.

После проведения реакции модификации PMAG в спектре ¹H ЯМР наблюдалось исчезновение сигналов ароматических протонов тиокарбонилтио-групп, что подтверждает полное удаление концевой группы из полимерной цепи. Кроме того, появление уширенных сигналов при 3.05 и 3.40 м.д. также указывает на восстановление дитиобензоатной группы и присоединение цистеамина. Сравнение хроматограмм, полученных методом ГПХ, исходных PMAG и PMAG-NH₂, полученных после модификации полимера, подтвердило отсутствие димеризации в ходе реакции модификации PMAG.

Полученный гомополимер PMAG-NH₂ впервые был использован в качестве макроинициатора для полимеризации N-KA α -(L-аминокислот) и синтезированы на его основе не описанные в литературе блок-сополимеры с полифенилаланином (PMAG-*b*-PPhe) и поли(γ -бензил-L-глутаматом) (PMAG-*b*-PGlu(OBzl)) (Рисунок 5). Состав и молекулярно-массовые характеристики сополимеров представлены в Таблице 6.

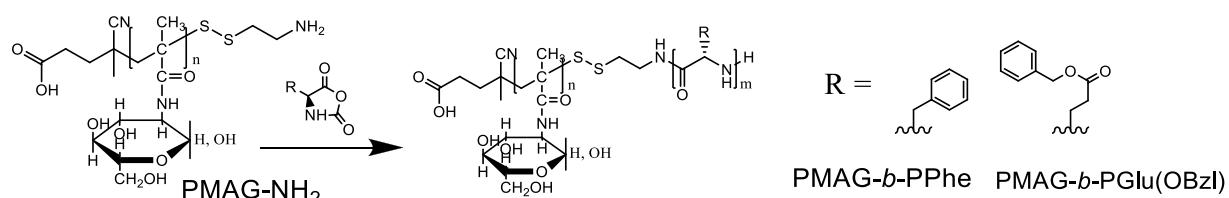


Рисунок 5 – Схема синтеза блок-сополимеров PMAG-*b*-PPhe и PMAG-*b*-PGlu(OBzl).

Таблица 6 – Характеристики блок-сополимеров PMAG_n-*b*-PPhe_m и PMAG_n-*b*-PGlu(OBzl)_m.

Образец	[N-KA Phe (Glu(OBzl))]/[PMAG]	ГПХ		n_{PMAG}^*	m_{Phe} ($m_{(Glu(OBzl))}$)
		M_n	\bar{D}		
PMAG- <i>b</i> -PPhe-1	50	19400	1.21	41	15*
PMAG- <i>b</i> -PPhe-2	100	-	-	41	28**
PMAG- <i>b</i> -PGlu(OBzl)	100	13500	1.26	22	45*

* рассчитаны на основании данных, полученных методом ¹H ЯМР-спектроскопии;

** рассчитаны на основании данных, полученных методами ¹H ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ.

Для получения pH-чувствительных сополимеров на основе PMAG в структуру сополимера также была введена аминокислота L-лизин. Схема синтеза тройных сополимеров поли(2-деокси-2-метакриламидо-D-глюкоза)-*b*-поли(L-лизин-ко-L-фенилаланин) (PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)) представлена на Рисунке 6.

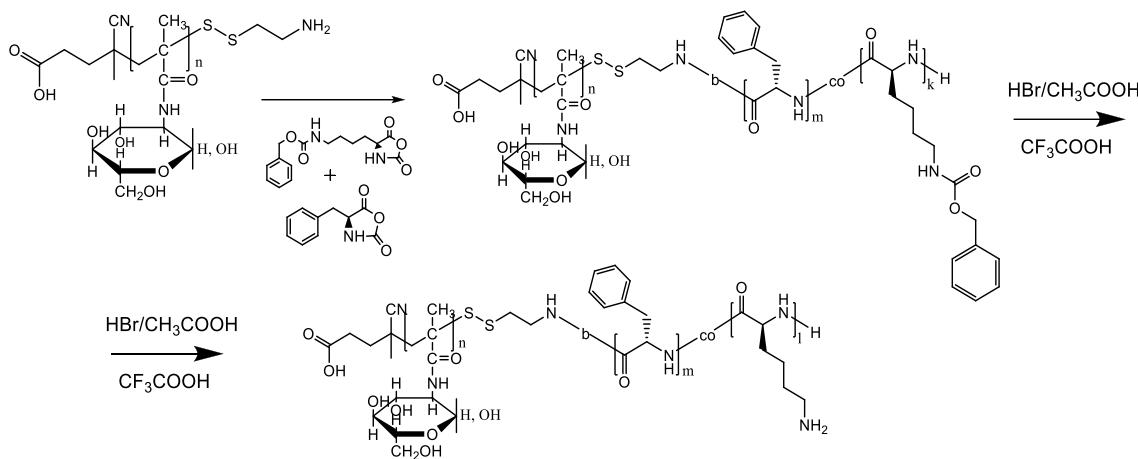


Рисунок 6 – Схема синтеза тройных сополимеров PMAG-*b*-P(Lys-*co*-Phe).

Состав сополимеров рассчитывали на основании данных, полученных методом ¹H ЯМР-спектроскопии. Также мольное соотношение аминокислот в сополимере определяли методом ВЭЖХ. Данные, полученные двумя методами, находятся в согласовании друг с другом (Таблица 7). Дисперсность (D) синтезированных образцов не превышала 1.5.

Таблица 7 – Характеристики тройных сополимеров PMAG_n-*b*-P(Lys_m-*co*-Phe_k).

Образец	[M ₁ +M ₂]/ [PMAG]	[M ₁]/ [M ₂]	¹ H ЯМР		
			ВЭЖХ [Lys]/[Phe]	[MAG]/[Lys(Z)]/[Phe]	n _{MAG} :m _{Lys} :k _{Phe}
PMAG- <i>b</i> - P(Lys- <i>co</i> -Phe)	1	75	2/1	1:0.4	0.4:1:0.5
	2	75	1/1	1:0.9	0.8:1:0.8
	3	75	1/2	1:1.6	1.1:1:1.5
	4	150	1/1	1:0.9	0.4:1:0.9
	5	75	1/1	1:0.9	2.8:1:0.8

M₁ = N-KA Lys(Z), M₂ = N-KA Phe.

Таким образом, был разработан системный подход к получению новых гибридных блок-сополимеров на основе винилсахаридов и α -аминокислот, заключающийся в последовательном использовании методов RAFT-полимеризации и полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксиангидридов α -аминокислот.

3.2. Получение полимерных частиц и изучение их свойств

3.2.1. Характеристики частиц в зависимости от состава сополимера и условий получения

На данном этапе работы было изучено влияние различных параметров, связанных как с получением частиц (рН раствора), так и с характеристиками используемого сополимера (состав, молекулярная масса, гидрофильно-гидрофобный баланс) на свойства образующихся частиц (гидродинамический размер, ζ -потенциал, морфология, стабильность к агрегации). Получение частиц проводили методом инверсии растворителя. Характеристики получаемых частиц определяли методами динамического рассеяния света (ДРС) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Морфологию полученных частиц оценивали на основании анализа микрофотографий, полученных методом ПЭМ. В случае катионных и анионных блок-сополимеров на основе PGlu-*b*-PPhen, PLys-*b*-PLeu и PLys-*b*-PAib наблюдалось формирование полимеросом – частиц, состоящих из гидрофобной мембранны и водного ядра (Рисунок 7а). В то же время, частицы на основе гибридных блок-сополимеров PMAG и гидрофобных полиаминокислот представляли собой сферические мицеллы с диаметром порядка 20-80 нм (Рисунок 7б). Частицы на основе статистических

сополимеров α -аминокислот P(Lys-co-DPhe) и P(Glu-co-DPhe) и гибридных тройных сополимеров PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe) представляли собой сферические наночастицы с диаметром 20–100 нм (Рисунок 7 ϵ – σ).

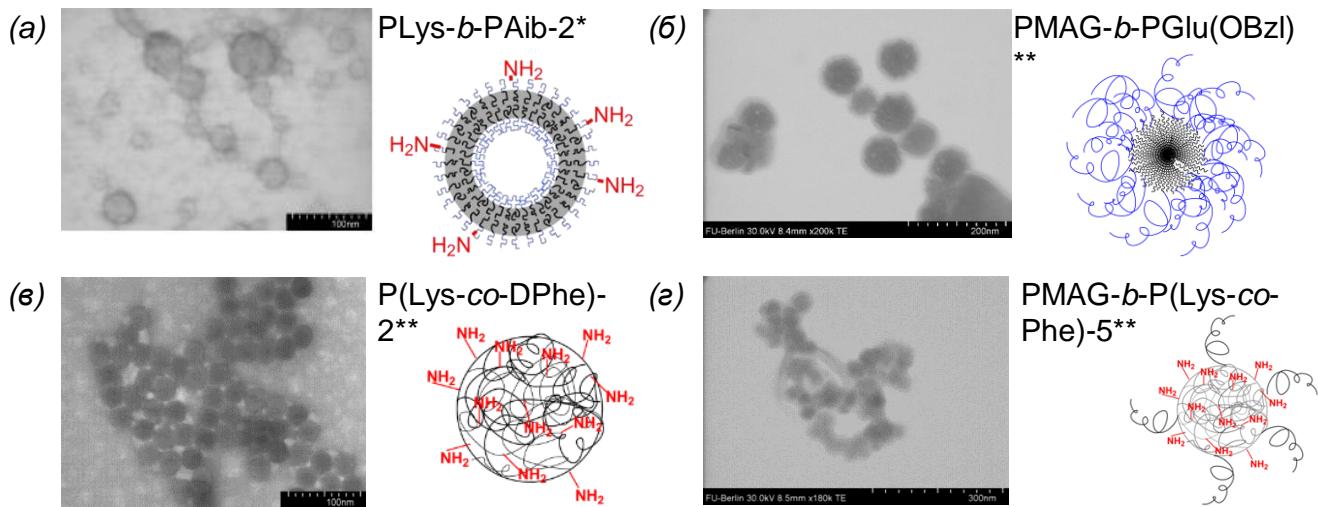


Рисунок 7 – Микрофотографии и схематичное изображение структуры полученных частиц. Условия получения частиц: * 0.1 М цитратный буферный раствор, pH 3.0; ** 0.01 М фосфатный буферный раствор, pH 7.4.

Было изучено влияние условий получения частиц на их гидродинамический размер. Согласно данным, полученным методом ДРС, частицы на основе блок-сополимера PLys-*b*-PLeu с наименьшим гидродинамическим диаметром (D_h) образовывались в кислом буферном растворе с pH 3.0 (Рисунок 8 a), что обусловлено большим отталкиванием одноименно заряженных цепей полилизина. При увеличении pH раствора, используемого при формировании частиц, наблюдалось увеличение D_h . Напротив, для частиц на основе PGlu-*b*-PPhe гидродинамический размер уменьшался при формировании частиц в более щелочных средах (Рисунок 8 b), что связано с увеличением степени ионизации карбоксильных групп.

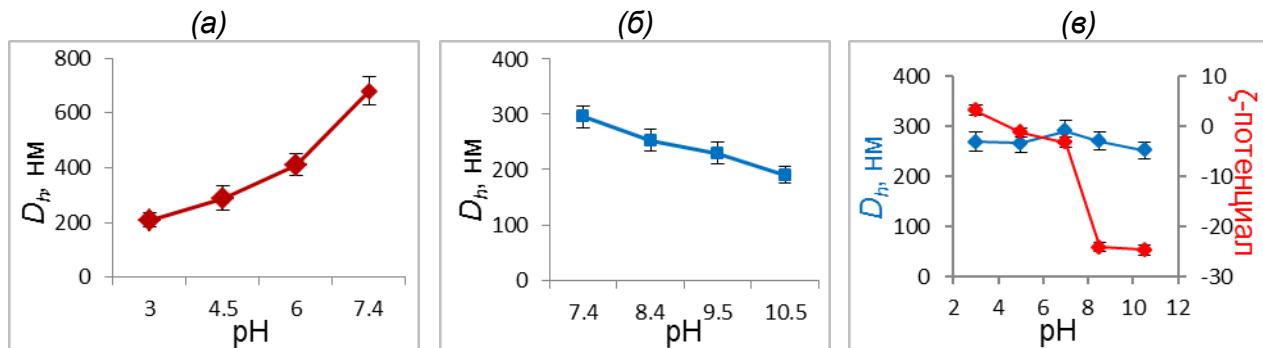


Рисунок 8 – Зависимость гидродинамического диаметра частиц на основе блок-сополимеров PLys-*b*-PLeu-7, (а) PGlu-*b*-PPhe-1 (б) и PMAG-*b*-PPhe-2 (в) от pH раствора, используемого при формирования частиц.

Гидродинамический диаметр частиц на основе PMAG-*b*-PPhe не зависел от pH раствора из-за отсутствия значительного количества ионизируемых групп. Тем не менее, получение частиц в щелочных условиях способствовало более высокой ионизации концевых карбоксильных групп (COOH-группа использованного RAFT-агента), что было доказано увеличением поверхностного ζ -потенциала (Рисунок 8 c).

Гидродинамический размер частиц на основе статистических сополимеров P(Lys-co-DPhe) и P(Glu-co-DPhe), в отличие от катионных и анионных блок-сополимеров, практически не зависел от pH раствора. Резкое увеличение D_h наблюдалось при

значениях pH выше 11 (Рисунок 9а) или ниже 4 (Рисунок 9б), что связано с депротонированием боковых аминогрупп лизина или протонированием карбоксильных групп глутаминовой кислоты, соответственно, и агрегацией частиц.

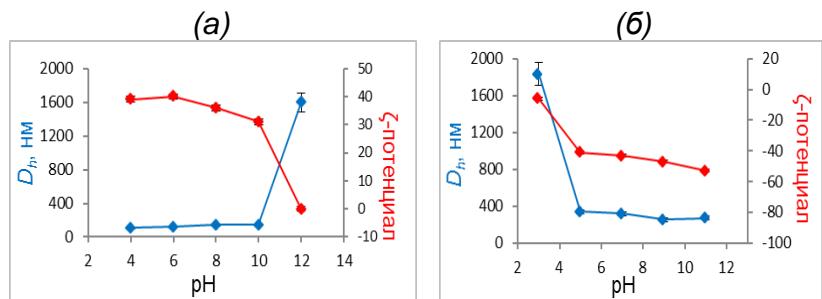


Рисунок 9 – Зависимость гидродинамического диаметра и ζ -потенциала частиц на основе статистических сополимеров P(Lys-co-DPhe) (а) и P(Glu-co-DPhe) (б) от pH раствора, используемого при формировании частиц.

Изучение влияния длины гидрофильного и гидрофобного блоков на гидродинамический размер частиц позволило установить, что D_h частиц на основе блок-сополимеров α -аминокислот возрастал при увеличении длины гидрофобного блока при постоянной длине гидрофильного. Увеличение длины гидрофильного блока (при примерно равном составе гидрофобного), напротив, приводило к уменьшению D_h частиц (Рисунок 10а), что связано с увеличением отталкивания одноименно заряженных цепей полимера. В данном случае замена буферного раствора, в котором формировали частицы, на другие среды (0.01 М фосфатный буферный раствор (ФБР), pH 7.4; культуральная клеточная среда, содержащая эмбриональную бычью сыворотку) не приводила к заметному изменению гидродинамического размера образовавшихся частиц. Из этого следует, что D_h частиц зависит от условий их получения, а сами частицы остаются стабильными при изменении внешней среды.

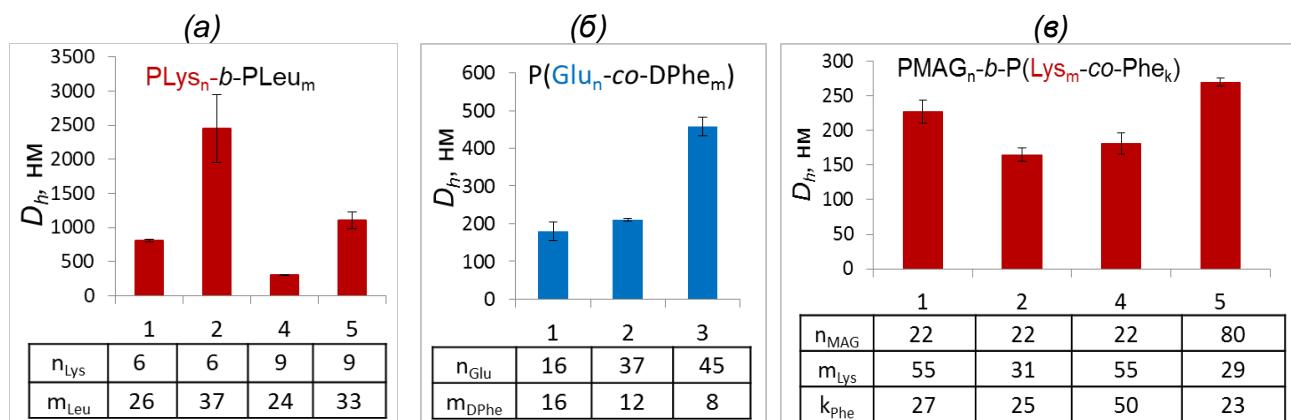


Рисунок 10 – Гидродинамический диаметр частиц на основе PLys-*b*-PLeu (0.1 М цитратный буферный раствор, pH 3.0) (а), P(Lys-co-DPhe) (б) и PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe) (в) (0.01 М фосфатный буферный раствор, pH 7.4).

Гидродинамический размер частиц на основе статистических сополимеров α -аминокислот, в отличие от размеров катионных и анионных частиц на основе блок-сополимеров, уменьшался при увеличении доли гидрофобного фрагмента (Рисунок 10б), что связано с различием структуры формируемых частиц. Увеличение доли гидрофобного фрагмента в данном случае приводит к компактизации частиц за счет гидрофобных взаимодействий. В свою очередь, гидрофильный фрагмент обеспечивает стабилизацию гидрофобного ядра, а также формирует более рыхлую структуру частицы, что приводит к увеличению их D_h при повышении доли гидрофильной аминокислоты (Lys или Glu).

Тройные сополимеры на основе PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe) использовали как для введения функциональных заряженных групп в структуру частиц на основе PMAG, так и для частичной нейтрализации зарядов статистических сополимеров на основе α -аминокислот. Структура подобных частиц приведена на Рисунке 7г: они состоят из

гидрофобного ядра, образуемого PPhе, и гидрофильной мембранны, свойства которой определяются как заряженным фрагментом PLys, так и нейтральным блоком PMAG, который частично экранирует внешний заряженный слой от взаимодействия с окружающей средой.

Гидродинамический размер частиц на основе PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe), как и в случае статистических сополимеров P(Lys-co-DPhe), уменьшался при увеличении доли гидрофобной α -аминокислоты (Рисунок 10 ϵ). Увеличение длины деградируемого полиаминокислотного фрагмента при его примерно равном составе вызывало лишь незначительное увеличение размера частиц: частицы на основе образцов PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-2 и PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-4 с примерно равным соотношением Phe/Lys в составе полимера, имели практически идентичный D_h . Увеличение длины PMAG при сохранении длины и состава полиаминокислотного фрагмента (PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-2 и PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-5) вызывало, в свою очередь, возрастание D_h частиц.

Из Рисунка 11 следует, что гидродинамический размер анионных и нейтральных частиц на основе статистических сополимеров P(Glu-co-DPhe), гибридных сополимеров PMAG-*b*-PGlu(OBzl) и PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-5 при замене буферного раствора, используемого при формировании частиц, на культуральную клеточную среду, содержащую эмбриональную бычью сыворотку, менялся незначительно, и частицы оставались стабильны к агрегации. Напротив, частицы, имеющие положительный заряд поверхности, агрегировали, тем в большей степени, чем большим ζ -потенциалом они обладали: P(Lys-co-DPhe)-1 (36 ± 6 мВ) > PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-1 (8 ± 1 мВ) > PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-3 (2 ± 1 мВ). Агрегация частиц в присутствии белков сыворотки вызвана наличием в культуральной среде отрицательно заряженных белков и может являться одним из факторов, обуславливающих цитотоксичность частиц. В отличие от частиц на основе статистических сополимеров P(Lys-co-DPhe), частицы на основе блок-сополимера PLys-*b*-PLeu-7 не агрегировали в присутствии белков сыворотки. Таким образом, можно заключить, что на взаимодействие частиц с белками влияет не только поверхностный заряд, но и структура полимерной частицы.

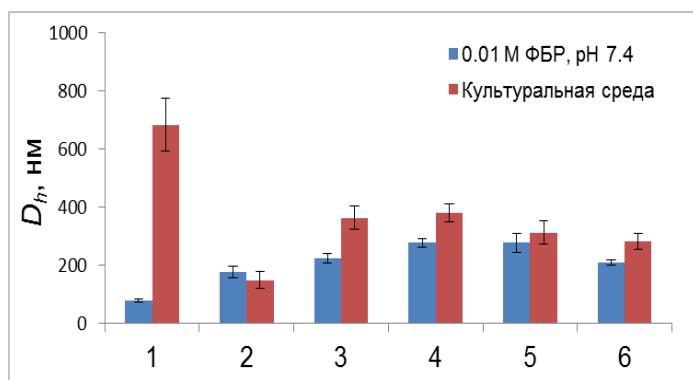


Рисунок 11 – Изменение гидродинамического диаметра частиц в культуральной среде, содержащей эмбриональную бычью сыворотку.
 1 – P(Lys-co-DPhe)-1;
 2 – P(Glu-co-DPhe)-1;
 3 – PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-1;
 4 – PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-3;
 5 – PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-5;
 6 – PMAG-*b*-PGlu(OBzl).

Таким образом, было показано, что в водных средах полученные сополимеры обладают способностью к самоорганизации в упорядоченные структуры различной морфологии. Варьирование состава сополимера, а именно, длины гидрофильного и гидрофобного блоков в случае блок-сополимеров и гидрофильно-гидрофобного баланса в случае статистических и тройных сополимеров, позволяет регулировать гидродинамический размер формируемых частиц.

3.2.2. Исследование деградации сополимеров и частиц на их основе

Изучение процесса биодеградации проводили двумя способами: (1) методом ДРС определяли изменение гидродинамического размера частиц в реакционной среде, содержащей модельный фермент папаин, и (2) методом ВЭЖХ анализировали накопление свободных аминокислот в течение процесса биодеградации.

Результаты мониторинга гидродинамических диаметров частиц на основе различных сополимеров методом ДРС в течение 35 дней представлены на Рисунке 12.

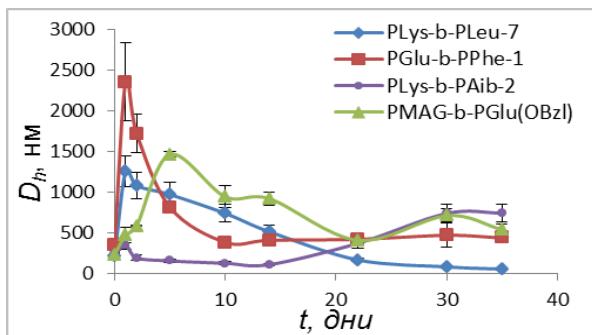


Рисунок 12 – Зависимость гидродинамического диаметра частиц на основе блок-сополимеров от времени инкубирования в среде, содержащей папаин ($C_{\text{папаина}} = 0.5 \text{ мг/мл}$).

Деградация частиц на основе блок-сополимеров природных α -аминокислот (PLys-*b*-PLeu-7, PGlu-*b*-PPhe-1) сопровождалась увеличением их гидродинамического размера уже спустя сутки после начала инкубирования частиц с ферментом ($C_{\text{папаина}}=0.5 \text{ мг/мл}$) и уменьшением D_h в течение последующего времени эксперимента. Такое резкое увеличение размера частиц может быть вызвано частичной деградацией гидрофильной полiamинокислотной (PLys/PGlu) оболочки, стабилизирующей гидрофобный внутренний слой в водной среде, что приводит к реорганизации частиц за счет гидрофобных взаимодействий и, как следствие, агрегации частиц. Затем наблюдается постепенная деградация остатков гидрофильных фрагментов и деполимеризация гидрофобного блока. Агрегация частиц на основе Aib-содержащих полипептидов (PLys-*b*-PAib-2) начиналась только спустя две недели после совместной инкубации с ферментом.

Сравнение деградации блок-сополимеров PLys-*b*-PLeu и PLys-*b*-PAib проводили, анализируя также скорость накопления в реакционной смеси свободных аминокислот методом ВЭЖХ. В случае образца PLys-*b*-PLeu-7, лейцин (Leu) в инкубационной смеси детектировали уже через один день, в то время как α -аминоизомасляную кислоту (Aib) только через 5 дней инкубирования с ферментом. Скорость деградации гидрофильного блока PLys в обоих случаях была сопоставима, однако, скорость деградации PAib была в 2.5 раза ниже, чем PLeu.

Гидродинамический диаметр частиц на основе статистических сополимеров, содержащих α -D-аминокислоту, несколько увеличивался при добавлении папаина и затем медленно уменьшался в процессе деградации (Рисунок 13а). Скорость деградации сополимеров P(Lys-*co*-DPhen) и P(Glu-*co*-DPhen) значительно падала по сравнению с блок-сополимерами на основе природных α -аминокислот. Так, например, для образца P(Lys-*co*-DPhen)-1 спустя месяц было установлено накопление 15% лизина и 5% D-фенилаланина, в то время как в случае PLys-*b*-PLeu-7 за этот период деградировало 97% PLys и 85% PLeu.

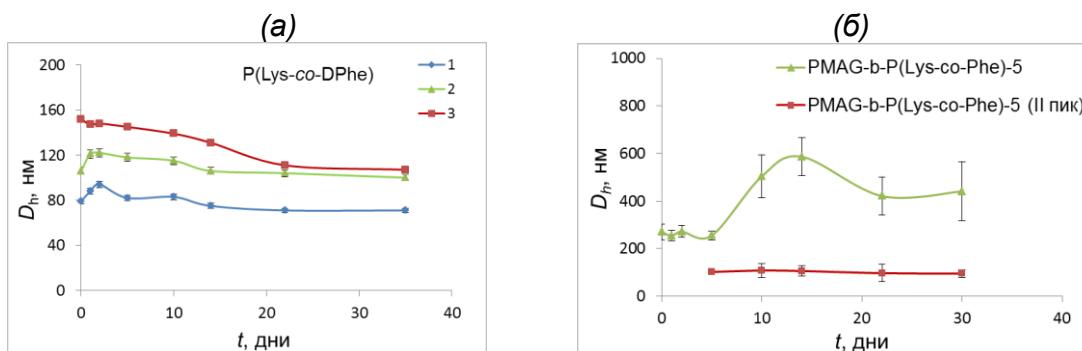


Рисунок 13 – Зависимость гидродинамического диаметра частиц на основе статистических сополимеров P(Lys-*co*-DPhen) (а) и гибридных сополимеров PMAG-*b*-P(Lys-*co*-Phe) (б) от времени инкубирования в среде, содержащей папаин ($C_{\text{папаина}} = 0.5 \text{ мг/мл}$).

Как было представлено выше, деградация полимерных частиц на основе блок-сополимеров природных α -аминокислот сопровождалась увеличением их гидродинамического размера уже спустя сутки после начала инкубирования частиц с папаином. В то же время, деградация частиц основе PMAG-*b*-PGlu(OBzl) и PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-5, содержащих недеградируемый блок PMAG, происходила медленнее, и существенное увеличение D_h частиц наблюдалось после пяти дней, а затем D_h частиц постепенно уменьшался (Рисунок 12, 13б). В этот период для образцов PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe) было отмечено появление пиков других частиц, вероятно, образовавшихся вследствие расщепления деградируемого блока и представляющих собой частицы на основе статистического сополимера P(Lys-co-Phe).

Таким образом, было показано, что введение в состав сополимеров недеградируемых фрагментов (PMAG, некодируемая α -аминоизомасляная аминокислота, *D*-изомеры α -аминокислот) увеличивает стабильность частиц к ферментативной деградации по сравнению со стабильностью частиц, образованных полимерами, построенными из звеньев природных α -аминокислот, что, в свою очередь, будет способствовать пролонгированному высвобождению лекарственных веществ, заключенных внутрь частиц.

3.2.3. Исследование цитотоксичности полимерных частиц

Биосовместимость является ключевым параметром для использования частиц *in vivo*, поэтому, в первую очередь, полимерные частицы не должны проявлять цитотоксического эффекта. В работе было проведено исследование цитотоксичности полимерных частиц на клетках почек эмбриона человека (HEK 293) и эпителиальных клетках легких человека (BEAS-2B) в широком диапазоне концентраций.

Для стабильных в культуральной среде частиц на основе блок-сополимеров PLys-*b*-PLeu, PGlu-*b*-PPhe и PMAG-*b*-PGlu(OBzl), а также статистических сополимеров P(Glu-co-DPhe) в диапазоне концентраций от 4 до 1000 мкг/мл выживаемость клеток после их инкубирования с частицами в течение 72 ч составила более 80%, что доказывает отсутствие цитотоксического эффекта частиц.

В свою очередь, частицы на основе P(Lys-co-DPhe) вызывали значительную гибель клеток, что, вероятно, вызвано их агрегацией в присутствии белков культуральной среды. Значения концентраций частиц, при которых выживает половина клеток (EC_{50}) составляли 5.8–50.4 мкг/мл. Для снижения цитотоксичности катионных частиц на основе P(Lys-co-DPhe), они были дополнительно покрыты гепарином, отрицательно заряженным полисахаридом, при этом знак ζ -потенциала изменялся с положительного на отрицательный, а цитотоксичность образцов значительно снижалась ($EC_{50} > 280$ мкг/мл). Введение нейтрального блока PMAG в структуру частиц уменьшает их взаимодействие с белками среды за счет частичного экранирования положительного заряда лизина, и, как следствие, снижает токсичность полимерных частиц. Увеличение длины PMAG (с 22 до 80 звеньев) приводило к резкому снижению цитотоксического эффекта: EC_{50} (PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-1) = 37–137 мкг/мл, EC_{50} (PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-5) > 1000 мкг/мл.

Таким образом, модификация поверхности частиц на основе статистических сополимеров лизина с фенилаланином ковалентно связанными синтетическими гликополимерами или адсорбированными на поверхности природными полисахаридами позволила повысить стабильность к агрегации таких частиц в культуральных средах и, как следствие, снизить их цитотоксичность.

3.3. Модификация поверхности полимерных частиц и изучение их проникновения в клетки

Для возможности визуализации в клетках полимерные частицы модифицировали флуоресцентными красителями: боковые NH₂-группы частиц, содержащих в своей структуре лизин, модифицировали флуоресцентным красителем цианинового ряда Су3,

боковые COOH-группы частиц на основе глутаминовой кислоты – дансиликадаверином. Инкубирование меченых флуоресцентным красителем частиц с различными клеточными культурами приводило к проникновению частиц внутрь клеток, что выражалось в появлении сильной флуоресценции внутри цитоплазмы клеток (Рисунок 14). На примере частиц различного состава, заряда поверхности и размера было показано, что они способны проникать внутрь клеток.

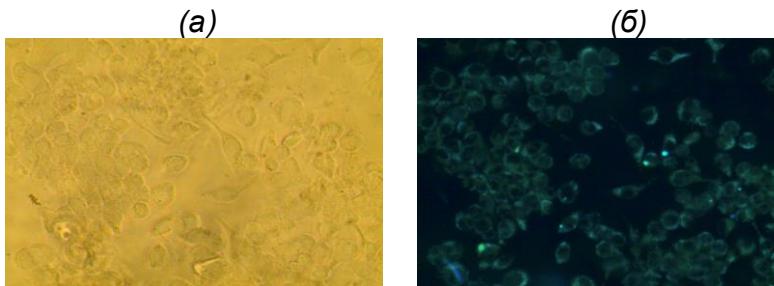


Рисунок 14 – Световая (а) и флуоресцентная (б) микрофотографии клеток рака легких А549, инкубированных с частицами на основе PGlu-*b*-PPhe, меченными дансиликадаверином.

Кинетику накопления полимерных частиц в клетках изучали с помощью метода проточной цитометрии. Наибольшую скорость проникновения в клетки рака легких (A549) имели катионные частицы на основе P(Lys-co-DPhe). Модификация частиц гепарином, при которой происходит изменение знака заряда поверхности частиц с положительного на отрицательный, влияла не только на цитотоксичность полимерных частиц, но и на профиль их накопления в клетках. Так, анионные частицы на основе P(Lys-co-DPhe), покрытые гепарином (P(Lys-co-DPhe)-HEP), имели скорость проникновения в клетки рака легких А549 в 5–10 раз меньшую, чем их немодифицированный катионный аналог. Частицы с нейтральным зарядом поверхности на основе PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-5 имели несколько большую скорость накопления в клетках А549 по сравнению с анионными аналогами P(Lys-co-DPhe)-HEP, однако, гораздо медленнее проникали в клетки по сравнению с катионными частицами P(Lys-co-DPhe).

Несмотря на то, что частицы с отрицательным и положительным зарядом поверхности имели разную скорость накопления в раковых клетках, они одинаково быстро захватывались макрофагами (J774A.1), клетками иммунной системы, что, в свою очередь, будет способствовать их быстрому выведению из кровотока и, как следствие, снижению эффективности системы доставки. Введение нейтрального блока PMAG в структуру частицы, значительно снижало поглощение частиц макрофагами (Рисунок 15).

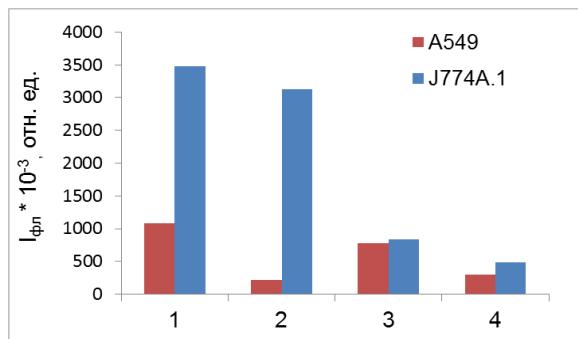


Рисунок 15 – Интенсивность флуоресценции клеток рака легких (А549) и макрофагов (J774A.1) после их инкубирования с флуоресцентно меченными частицами ($t = 24$ ч).
1 – P(Lys-co-DPhe)-1;
2 – (P(Lys-co-DPhe)-1)-HEP;
3 – PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-3;
4 – PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-5.

С целью уменьшения захвата анионных частиц макрофагами проводили ковалентную иммобилизацию пептида GNYTCEVTELTRGETIELK, подавляющего процесс распознавания частиц как инородного тела, на поверхности частиц на основе P(Glu-co-DPhe). Модификация частиц пептидом позволила в 2 раза снизить их захват макрофагами, что, безусловно, необходимо для достижения долговременной циркуляции подобных материалов в кровотоке при использовании *in vivo*.

В целом, на данном этапе работы было показано, что локализованные в поверхностном слое частиц амино/карбоксильные группы обеспечивают возможность проведения ковалентного присоединения флуоресцентных красителей и биологически

активных молекул. Такая модификация позволила провести биовизуализацию частиц в клетках, а также создать системы доставки, способные к молекулярному распознаванию.

3.4. Разработка прототипов систем доставки лекарственных веществ

Данная часть работы была направлена на исследование возможности применения разработанных биодеградируемых полимерных частиц в качестве потенциальных систем доставки лекарственных веществ различной природы: паклитаксела – гидрофобного противоопухолевого вещества, гидрофильного С-пептида, перспективного для лечения осложнений сахарного диабета, и иринотекана – амфи菲尔ного основания, используемого для лечения колоректального рака.

3.4.1. Разработка прототипов систем доставки гидрофильного С-пептида

По своей химической структуре С-пептид представляет собой последовательность из 31 аминокислоты и содержит 6 карбоксильных и одну аминогруппу, N-концевую α -NH₂. Для получения систем доставки С-пептида использовали два подхода: 1) модификацию поверхности частиц на основе P(Glu-co-DPhe) С-пептидом и 2) инкапсулирование С-пептида в частицы на основе P(Lys-co-DPhe).

Первый подход включал активацию карбоксильных групп поверхности частиц на основе P(Glu-co-DPhe) и последующую реакцию активированных сложных эфиров с α -аминогруппами С-пептида. Эффективность иммобилизации пептида зависела от содержания звеньев глутаминовой кислоты, а также от D_h частиц. При мольном соотношении Glu/DPhe в полимерной частице, примерно равном 3, достигалась максимальная степень модификации, равная 48 ± 5 мкг/мг частиц.

Инкапсулирование С-пептида в частицы на основе P(Lys-co-DPhe), в свою очередь, обусловлено ионными взаимодействиями между боковыми карбоксильными группами С-пептида и аминогруппами катионных частиц на основе P(Lys-co-DPhe) (Рисунок 16).

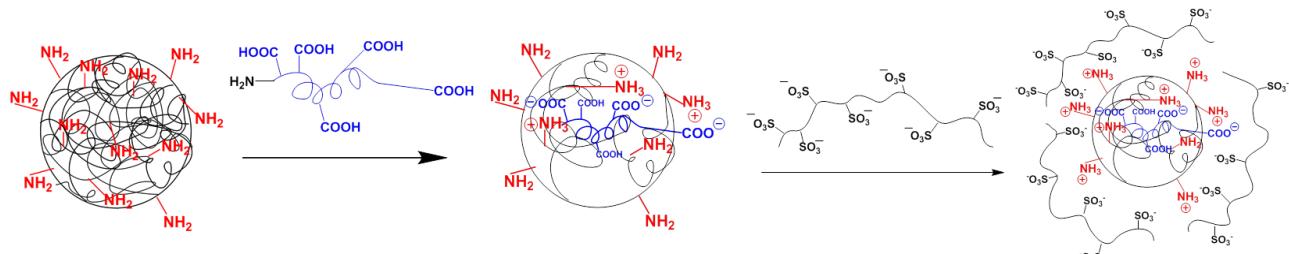


Рисунок 16 – Схематичное представление инкапсулирования С-пептида в частицы на основе P(Lys-co-DPhe) и последующей их модификации гепарином.

Максимально достигнутая загрузка С-пептида в частицы с наибольшим (P(Lys-co-DPhe)-3) и наименьшим (P(Lys-co-DPhe)-1) содержанием лизинового фрагмента равнялась 860 ± 10 и 810 ± 10 мкг/мг частиц, соответственно.

Применение иммобилизованной и инкапсулированной форм С-пептида позволило повысить активность фермента Na⁺/K⁺-аденозинтрифосфатазы (которая снижается в условиях диабетической патологии) в 2 раза по сравнению с нативной формой пептида, что доказывает перспективность исследования и разработки новых форм С-пептида для лечения осложнений сахарного диабета.

3.4.2. Разработка прототипов систем доставки амфи菲尔ного основания иринотекана

Противоопухолевое амфи菲尔ное основание иринотекан было инкапсулировано в полимеросомы на основе PLys-*b*-PLeu-7 методом pH-градиента, основанного на разнице pH внутреннего и внешнего растворов (Рисунок 17).

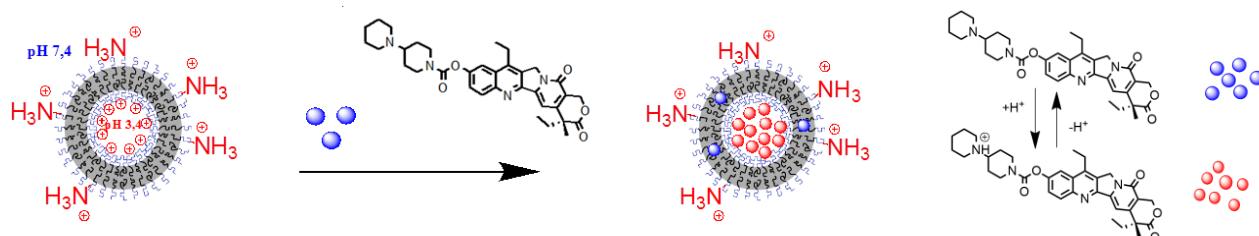


Рисунок 17 – Схематичное изображение инкапсулирования амфифильного основания иринотекана внутрь частиц на основе PLys-*b*-PLeu методом pH-градиента.

Максимальная загрузка иринотекана составила 320 ± 50 мкг/мг частиц.

Для изучения высвобождения лекарственного вещества использовали модельные системы, содержащие ферменты папаин (рН 7.4) или пепсин (рН 2), а также плазму крови человека. Профили высвобождения иринотекана из частиц представлены на Рисунке 18. Во всех случаях начальное быстрое высвобождение наблюдалось в течение 12 ч после инкубации. Можно отметить, что наибольшая скорость высвобождения иринотекана из частиц наблюдалась в среде с пепсином, а наименьшая – в плазме крови человека. Тем не менее, скорость высвобождения лекарственного вещества была значительно выше, чем скорость процесса биодеградации полимера PLys-*b*-PLeu-7 в тех же условиях. Например, полное высвобождение иринотекана в модельных ферментативных системах завершается за 4 дня, тогда как степень деградации полимерного материала за это время составляет менее 10%. Это может быть связано с образованием дефектов и полостей в мембране частиц, что способствует высвобождению иринотекана.

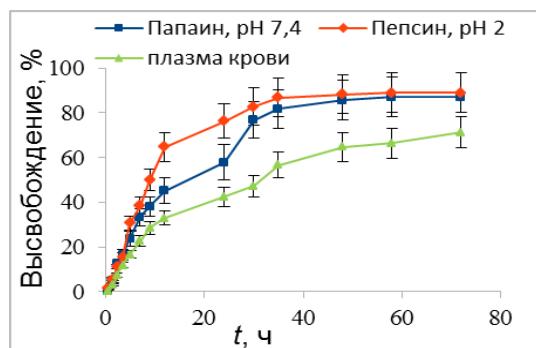


Рисунок 18 – Профили высвобождения иринотекана из полимерных частиц на основе PLys-*b*-PLeu-7, инкубированных в модельных физиологических условиях ($T=37^\circ\text{C}$).

Значение EC_{50} для инкапсулированного иринотекана на клетках рака толстой кишки (Caco-2, 96 ч) составило 15.9 мкг/мл, тогда как для свободного лекарственного вещества оказалось равным 7.6 мкг/мл. Различие в поведении свободного и инкапсулированного иринотекана может быть объяснено различной концентрацией лекарственного вещества в среде во время инкубирования. В случае свободного иринотекана количество вещества в среде является постоянным в течение эксперимента, тогда как для инкапсулированной формы количество иринотекана увеличивается постепенно.

3.4.3. Разработка прототипов систем доставки гидрофобного паклитаксела

Для увеличения растворимости и биодоступности гидрофобного противоопухолевого вещества паклитаксела в данном исследовании применялись частицы на основе полиаминокислот. Для всех полученных в работе полимерных частиц эффективность инкапсуляции (ЕЕ) превышала 80%. Значения ЕЕ увеличивались при повышении доли гидрофобного фрагмента в сополимерах и несколько уменьшались при увеличении начальной концентрации паклитаксела в растворе.

Применение инкапсулированных форм паклитаксела позволило добиться сопоставимой эффективности, а в некоторых случаях увеличить биологическую активность вещества на клетках рака легких человека A549 ($\text{EC}_{50} = 1.0–22.3$ нг/мл, $t = 72$

ч) и клетках рака молочной железы человека MCF-7 ($EC_{50} = 0.5\text{--}24.0 \text{ нг}/\text{мл}, t = 72 \text{ ч}$) по сравнению с коммерчески доступным препаратом «паклитаксел-ЛЭНС» ($EC_{50} (\text{A549}) = 2.0 \text{ нг}/\text{мл}, EC_{50} (\text{MCF-7}) = 3.3 \text{ нг}/\text{мл}, t = 72 \text{ ч}$).

Таким образом, на данном этапе работы была решена основная задача – разработка биодеградируемых и биосовместимых полимерных систем доставки на основе амифильных сополимеров α -аминокислот, пригодных для доставки лекарственных веществ различной природы. Установленные основные закономерности создания прототипов систем доставки на основе выбранных полимеров могут быть перенесены в дальнейшем на другие объекты и применены для решения практических задач для создания инкапсулированных форм различных веществ.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы синтеза амифильных сополимеров α -аминокислот и получения на их основе частиц, обладающих комплексом свойств (контролируемый размер, способность к биодеградации и связыванию биологически активных веществ, стабильность в физиологических средах, отсутствие цитотоксичности), необходимых для их использования в качестве систем доставки лекарственных веществ различной природы.
2. Методом полимеризации с раскрытием цикла впервые синтезирован амифильный блок-сополимер, содержащий некодируемую α -аминоизомасляную кислоту, и получен ряд статистических сополимеров α -аминокислот с частичной заменой *L*-аминокислот на *D*-изомеры.
3. Впервые синтезированы амифильные дублок-сополимеры, состоящие из небиодеградируемого блока гликополимера и биодеградируемого полипептидного блока, с использованием поли(2-деокси-2-метакриламино-*D*-глюкозы), содержащей концевую первичную аминогруппу, в качестве макроинициатора для полимеризации N-карбоксиангидридов α -аминокислот.
4. На основе синтезированных амифильных сополимеров получены узкодисперсные частицы различной структуры и исследовано влияние состава, гидрофильно-гидрофобного баланса исходных полимеров, а также условий получения частиц (рН) на их физико-химические свойства (гидродинамический размер, ζ -потенциал).
5. Показано, что введение в структуру сополимеров недеградируемого поливинилсахарида поли(2-деокси-2-метакриламино-*D*-глюкозы) увеличивает стабильность частиц на их основе к ферментативной деградации, уменьшает цитотоксичность и скорость поглощения макрофагами.
6. На основании исследования скорости деградации полимерных материалов и частиц на их основе в модельных ферментативных средах, цитотоксичности полимерных частиц и изучения биологической активности полученных систем с инкапсулированным или ковалентно присоединенным лекарственным веществом, показана принципиальная возможность применения разработанных полимерных частиц в качестве систем доставки лекарственных веществ различной природы.

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях:

Статьи:

1. Vlakh, E. Preparation, characterization, and biological evaluation of poly(glutamic acid)-b-polyphenylalanine polymersomes / E. Vlakh, A. Ananyan, N. Zashikhina, A. Hubina, A. Pogodaev, M. Volokitina, V. Sharoyko, T. Tennikova // Polymers. – 2016. – V. 8. – № 6. – P. 212.
2. Zashikhina, N.N. Self-assembled polypeptide nanoparticles for intracellular irinotecan delivery / N.N. Zashikhina, M.V. Volokitina, V.A. Korzhikov-Vlakh, I.I. Tarasenko, A. Lavrentieva, T. Scheper, E. Rühl, R.V. Orlova, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlakh // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2017. – V. 109. – P. 1–12.

3. Levit, M. Synthesis and characterization of well-defined poly(2-deoxy-2-methacrylamido-D-glucose) and its biopotential block copolymers via RAFT and ROP polymerization / M. Levit, N. Zashikhina, A. Dobrodumov, A. Kashina, I. Tarasenko, E. Panarin, S. Fiorucci, E. Korzhikova-Vlakh, T. Tennikova // European Polymer Journal. – 2018. – V. 105. – P. 26–37.
4. Tarasenko, I. Amphiphilic polypeptides with prolonged enzymatic stability for the preparation of self-assembled nanobiomaterials / I. Tarasenko, N. Zashikhina, I. Guryanov, M. Volokitina, B. Biondi, S. Fiorucci, F. Formaggio, T. Tennikova, E. Korzhikova-Vlakh // RSC Advances. – 2018. – V. 8. – № 60. – P. 34603–34613.
5. Zashikhina, N. Novel formulations of C-peptide with long-acting therapeutic potential for treatment of diabetic complications / N. Zashikhina, V. Sharoyko, M. Antipchik, I. Tarasenko, Y. Anufrikov, A. Lavrentieva, T. Tennikova, E. Korzhikova-Vlakh // Pharmaceutics. – 2019. – V. 11. – № 1. – P. 27.

Тезисы докладов:

1. Vlakh, E. Poly(amino acid) polymersomes as potential nanocontainers for drug delivery / E. Vlakh, N. Zashikhina, A. Hubina, T. Tennikova // Russian Conference on Medicinal Chemistry (MedChem 2015), 5–10 July 2015. – Novosibirsk, Russia, 2015. – Book of Abstracts. – P. 126.
2. Zashikhina, N. Poly(amino acid) self-assembled nanoparticles for drug delivery / N. Zashikhina, A. Hubina, E. Vlakh, T. Tennikova // International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials, 26–29 August 2015. – Lviv, Ukraine, 2015. – Book of Abstracts. – P. 228.
3. Влах, Е.Г. Полимеросомы на основе полиаминокислот как перспективные системы доставки лекарств / Е. Г. Влах, А. Ю. Ананян, Н. Н. Зашихина, А. В. Губина, В. В. Шаройко, Р. В. Орлова, Т.Б. Тенникова // Второй междисциплинарный симпозиум и молодежный форум по медицинской, органической и биологической химии, 27–30 сентября 2015. – Новый Свет, Крым, 2015. – Тезисы докладов. – С. 67.
4. Зашихина, Н.Н. Полимеросомы на основе блок-сополимеров полиаминокислот для создания систем адресной доставки лекарственных препаратов / Н.Н. Зашихина, А.Ю. Ананян // VI Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего», 25–26 апреля 2016. – Санкт-Петербург, Россия, 2016. – Тезисы докладов. – С. 221–223.
5. Zashikhina, N.N. Poly(L-lysine)-co-poly(L-leucine) nanoparticles for delivery of antitumor drug irinotecan / N.N. Zashikhina, M.V. Volokitina, E.G. Vlakh, T.B. Tennikova // 12th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientists «Modern Problems of Polymer Science», 14–17 November 2016. – Saint-Petersburg, Russia, 2016. – Book of Abstracts. – P. 83.
6. Levit, M.L. Amphiphilic MAG-b-(L-Phe) block-copolymers obtained via sequential RAFT and ROP polymerization for preparation of nanoparticles stable to biodegradation / M.L Levit, N.N. Zashikhina, I.I. Tarasenko, E.G. Vlakh, T.B. Tennikova // 12th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientists «Modern Problems of Polymer Science», 14–17 November 2016. – Saint-Petersburg, Russia, 2016. – Book of Abstracts. – P. 74.
7. Zashikhina, N.N. Novel formulations of a long-acting c-peptide with the therapeutic potential for diabetic complications / N.N. Zashikhina, I.I. Tarasenko, V.V. Sharoyko, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlakh // X Международная конференция молодых ученых по химии «Менделеев- 2017», 4–7 апреля 2017. – Санкт-Петербург, Россия, 2017. – Тезисы докладов. – С. 287.
8. Зашихина, Н.Н. Частицы на основе полиаминокислот для доставки водорастворимого противоопухолевого препарата иринотекана / Н.Н. Зашихина, И.И. Тарабенко, М.В. Волокитина, Р.В. Орлова, Т.Б. Тенникова, Е.Г. Коржикова-Влах // III Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма2017, 28–31 мая 2017. – Севастополь, Крым, 2017. – Тезисы докладов. – С. 20.
9. Коржикова-Влах, Е.Г. Амфи菲尔ные полипептиды для создания систем доставки лекарств и диагностики / Е.Г. Коржикова-Влах, Н.Н. Зашихина, М.Л. Левит, М.В. Волокитина, Т.Б. Тенникова // III Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской,

- Органической и Биологической химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма2017, 28–31мая 2017. – Севастополь, Крым, 2017. – Тезисы докладов. – С. 29.
10. Левит, М.Л. Амфи菲尔ные полипептид-содержащие блок-сополимеры для получения устойчивых к биодеградации наночастиц / М.Л. Левит, Н.Н. Зашихина, И.И. Тарасенко, Е.Г. Коржикова-Влах, Т.Б. Тенникова // III Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма2017, 28–31мая 2017. – Севастополь, Крым, 2017. – Тезисы докладов. – С. 40.
11. Зашихина, Н.Н., Создание прототипов лекарственных форм С-пептида для терапии осложнений сахарного диабета / Н.Н. Зашихина, И.И. Тарасенко, В.В. Шаройко, Т.Б. Тенникова, Ю.А. Скорик, Е.Г. Коржикова-Влах // III Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма2017, 28–31мая 2017. – Севастополь, Крым, 2017. – Тезисы докладов. – С. 90.
12. Zashikhina, N.N. PMAG-b-PPhe nanoparticles as potential drug delivery systems / N.N. Zashikhina, M.L. Levit, I.I. Tarasenko, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlakh // 9th International Symposium "Molecular Order and Mobility in Polymer Systems", 19–23 June 2017. – St. Petersburg, Russia, 2017. – Book of abstracts. – P. 308.
13. Zashikhina, N.N. Poly(amino acid)-based particles for creation of the new formulations of C-peptide / N.N. Zashikhina, I.I. Tarasenko, M.V. Volokitina, V.V. Sharoyko, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlakh // Baltic Polymer Symposium 2017, 22–25 September 2017. – Tallinn, Estonia, 2017. – Book of abstracts. – P. 40.
14. Zashikhina, N. Development of paclitaxel delivery system based on polypeptide-based polymersomes / N. Zashikhina, M. Volokitina, T. Tennikova, E. Korzhikova-Vlakh // Baltic Polymer Symposium 2017, 22–25 September 2017. – Tallinn, Estonia, 2017. – Book of abstracts. – P. 134.
15. Zashikhina, N.N. Poly(amino acid)-based particles for encapsulation of drugs of different nature / N.N. Zashikhina, I.I. Tarasenko, M.V. Volokitina, V.A. Korzhikov-Vlakh, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlakh // 13th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientists «Modern Problems of Polymer Science», 13–16 November 2017. – Saint-Petersburg, Russia, 2017. – Book of Abstracts. – P. 116.
16. Levit, M.L. Glycopolymers-poly(amino acid)-based nanocarriers for creation of drug delivery systems / M.L. Levit, N.N. Zashikhina, E.G. Korzhikova-Vlakh // 13th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientists «Modern Problems of Polymer Science», 13–16 November 2017. – Saint-Petersburg, Russia, 2017. – Book of Abstracts. – P. 130.
17. Коржикова-Влах, Е.Г. Самоорганизующиеся полимерные системы для доставки лекарств различной природы / Е.Г. Коржикова-Влах, Н.Н. Зашихина, М.Л. Левит, М.В. Волокитина, Т.Б. Тенникова // IV Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма2018, 23–26 сентября 2018. – Новый Свет, Крым, 2018. – Тезисы докладов. – С. 37.
18. Stulova, E.G. Random amphilic polypeptides as a macromolecular basis for the creation of drug delivery system / E.G. Stulova, N.N. Zashikhina, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlakh // 14th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientists «Modern Problems of Polymer Science», 12–14 November 2018. – Saint-Petersburg, Russia, 2018. – Book of Abstracts. – P. 126.
19. Zashikhina, N.N. Novel cationic and anionic random amphiphilic polypeptides with prolonged stability / N.N. Zashikhina, M.V. Volokitina, I.I. Tarasenko, V.V. Sharoyko, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlakh // 14th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientists «Modern Problems of Polymer Science», 12–14 November 2018. – Saint-Petersburg, Russia, 2018. – Book of Abstracts. – P. 129.

Бесплатно

Автореферат отпечатан в ИВС РАН. Ризография.
Тираж 100 экз.