

*На правах рукописи*

**ЗАШИХИНА**  
**Наталья Николаевна**

**БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ  
СОПОЛИМЕРОВ  $\alpha$ -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 10<sup>00</sup> 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](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 биodeградируемых 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 биodeградации, 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 биodeградируемые сополимеры являются наиболее перспективными для создания систем доставки лекарств. В качестве макромолекулярной основы для получения таких систем значительный интерес представляет использование биodeградируемых полимеров на основе  $\alpha$ -аминокислот и их сополимеров с поливинилсахаридами (гликополимерами). Аминокислоты, являясь продуктами биodeградации соответствующих полимеров, усваиваются организмом или выводятся из него естественными метаболическими путями. В свою очередь, комбинирование полиаминокислот и поливинилсахаридов позволяет повысить устойчивость полимерных систем к биodeградации, 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 мембраны. 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 биodeградируемых частиц на основе амфифильных 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 амфифильных сополимеров  $\alpha$ -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 биodeградируемых блок- и статистических сополимеров на основе  $\alpha$ -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  $\alpha$ -аминокислотами;
- оптимизация состава и структуры исходных полимеров с целью получения узкодисперсных частиц с необходимым набором характеристик и свойств (контролируемый размер, способность к биodeградации, 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-карбоксихидридов  $\alpha$ -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-метакриламидо-*D*-глюкозы) для полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксиянгидридов  $\alpha$ -аминокислот и синтезирован ряд новых амфифильных блок-сополимеров поли(2-деокси-2-метакриламидо-*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  $\alpha$ -аминокислот. Получены доказательства принципиальной возможности использования полученных полимерных частиц в качестве систем доставки биологически активных веществ различной природы (гидрофобных и амфифильных противоопухолевых веществ, пептидов).

**Практическая значимость работы:**

- полученные новые биodeградируемые частицы на основе амфифильных сополимеров  $\alpha$ -аминокислот, а также сополимеров полиаминокислот с поли(2-деокси-2-метакриламидо-*D*-глюкозой) перспективны для разработки систем доставки биологически активных веществ различной природы (амфифильное 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 паклитакселем 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-метакриламидо-*D*-глюкозы и полимеризации

с раскрытием цикла N-карбоксиянгидридов  $\alpha$ -аминокислот позволяет получать узкодисперсные сополимеры гликополимеров и полиаминокислот 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 (pH 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 биodeградации, 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 биodeградации полимерных частиц на основе полипептидов и их конъюгатов с поли(2-деокси-2-метакриламидо-*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); 11<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> 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); 9<sup>th</sup> 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, биodeградируемых 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 амфифильных блок- и статистических сополимеров на основе  $\alpha$ -аминокислот, а также их сополимеров с поли(2-деокси-2-метакриламидо-*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 амфифильных блок- и статистических сополимеров на основе  $\alpha$ -аминокислот, а также их сополимеров с поли(2-деокси-2-метакриламидо-*D*-глюкозой), не описанных в литературе, получены биodeградируемые частицы различной структуры и изучены характеристики и свойства данных систем. Проведена модификация поверхности полимерных частиц пептидами, а также флуоресцентными красителями.

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

#### 3.1. Синтез амфифильных сополимеров на основе $\alpha$ -аминокислот

Для синтеза полиаминокислот в данной работе был использован метод полимеризации с раскрытием цикла (Ring-opening polymerization, ROP) *N*-карбоксиангидридов (*N*-КА)  $\alpha$ -аминокислот. В качестве инициатора (*I*) для синтеза гомополимеров и статистических сополимеров  $\alpha$ -аминокислот использовали *n*-гексилламин. Выбор лизина и глутаминовой кислоты в качестве гидрофильных звеньев сополимеров был обусловлен наличием функциональных групп в боковой цепи данных аминокислот, которые обеспечивали рН-чувствительность амфифильного сополимера и возможность проведения ковалентной модификации поверхности частиц.

##### 3.1.1. Синтез блок-сополимеров на основе природных $\alpha$ -аминокислот

Получение амфифильных блок-сополимеров поли(*L*-лизин)-*b*-поли(*L*-лейцин) (PLys-*b*-PLeu) и поли(*L*-глутаминовая кислота)-*b*-поли(*L*-фенилаланин) (PGlu-*b*-PPhe) проводили в три этапа. На первом этапе синтезировали гомополимер защищенной аминокислоты – поли( $\epsilon$ -карбоксибензил-*L*-лизин) (P(Lys(Z)) или поли( $\gamma$ -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-КА гидрофобной аминокислоты (Рисунок 1, II). На указанном этапе полученный блок-сополимер характеризовался гидрофобной природой и приобретал амфифильные свойства после деблокирования защитных групп (Рисунок 1, III).

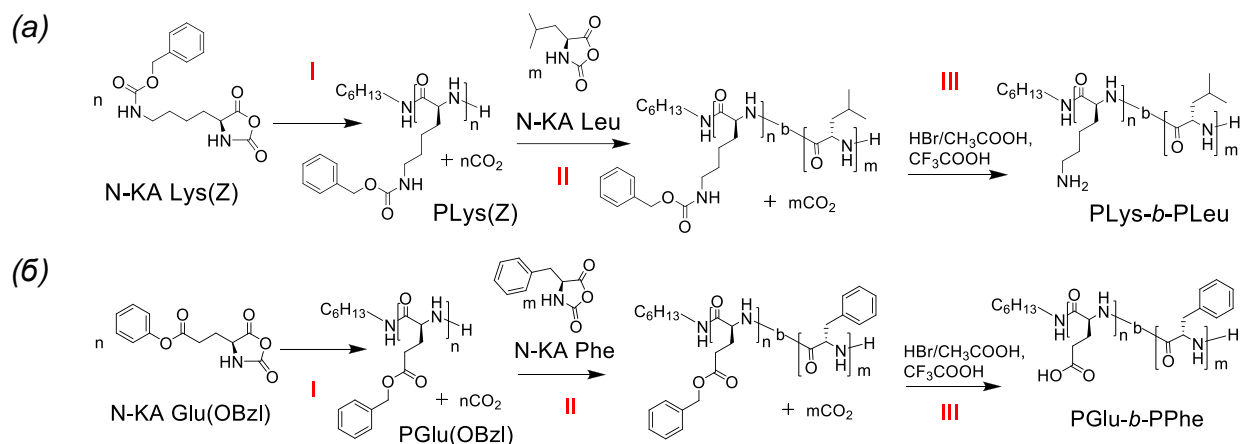


Рисунок 1 – Схема синтеза блок-сополимеров PLys-*b*-PLeu (а) и PGlu-*b*-PPhe (б).

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  $^1\text{H}$  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<sub>n</sub>-*b*-PLeu<sub>m</sub>.

Образец	macrol (PLys(Z))		[N-KA Leu]/ [macrol]	ВЭЖХ [Leu]/[Lys]	$n_{\text{Lys}}^*$	$m_{\text{Leu}}^{**}$
	$M_n$	$\mathcal{D}$				
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  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии;

\*\* рассчитаны на основании данных, полученных методами  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ.

Таблица 2 – Характеристики блок-сополимеров PGlu<sub>n</sub>-*b*-PPhe<sub>m</sub>.

Образец	macrol (PGlu(OBzl))		[N-KA Phe]/ [macrol]	ВЭЖХ [Phe]/[Glu]	$n_{\text{Glu}}^*$	$m_{\text{Phe}}^{**}$
	$M_n$	$\mathcal{D}$				
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  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии;

\*\* рассчитаны на основании данных, полученных методами  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ.



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

### 3.1.2. Соплимеры с повышенной устойчивостью к биодegradации

Введение *D*-аминокислот, неcodируемых аминокислот, а также частично деградирuемых или недеградирuемых 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 неcodируемую $\alpha$ -аминокислоту

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

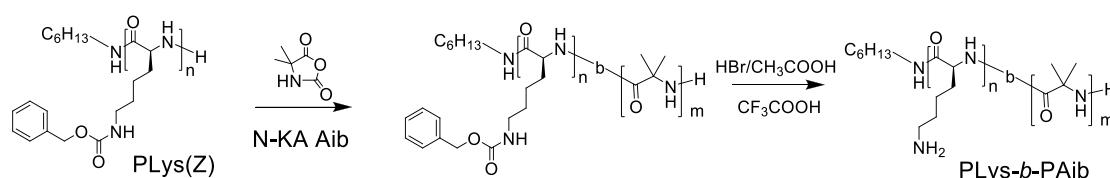


Рисунок 2 – Схема синтеза амфифильных блок-сополимеров PLys-*b*-PAib.

Таблица 3 – Характеристики блок-сополимеров PLys<sub>n</sub>-*b*-PAib<sub>m</sub>.

Образец	macroI (PLys(Z))		[N-KA Aib]/ [macroI]	ВЭЖХ [Aib]/[Lys]	n <sub>Lys</sub> <sup>*</sup>	m <sub>Aib</sub> <sup>**</sup>
	<i>M<sub>n</sub></i>	<i>Đ</i>				
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 <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии;

\*\* рассчитаны на основании данных, полученных методами <sup>1</sup>H 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  $\alpha$ -положении данной аминокислоты.

#### 3.1.2.2. Синтез статистических сополимеров, содержащих $\alpha$ -*D*-аминокислоту

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

Были синтезированы две серии сополимеров, а именно поли(*L*-лизин-со-*D*-фенилаланин) (P(Lys-co-DPhe)) и поли(*L*-глутаминовая кислота-со-*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*<sub>1</sub>] к N-KA DPhe [*M*<sub>2</sub>]) варьировали от 1 до 8 при заданном мольном соотношении [*M*<sub>1</sub>+*M*<sub>2</sub>]/[I], равном 50.

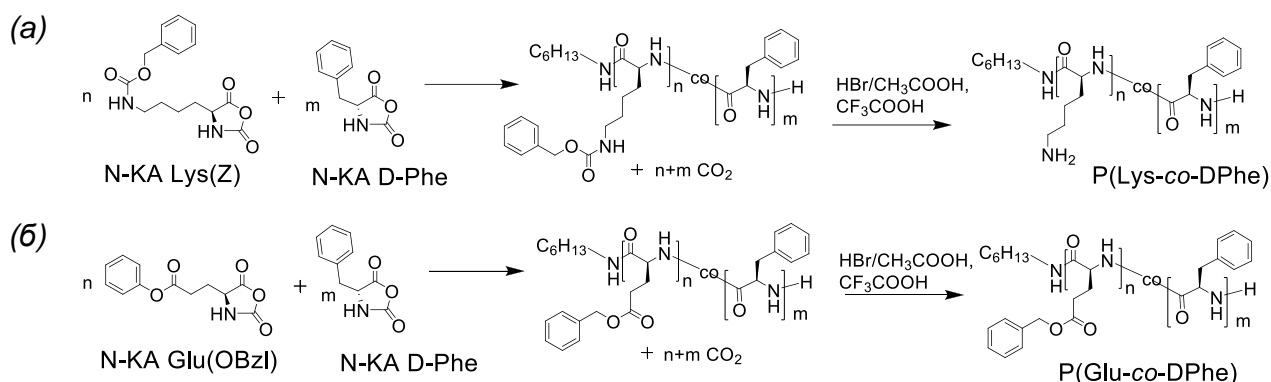


Рисунок 3 – Схема синтеза амфифильных статистических сополимеров P(Lys-co-DPhe) (a) и P(Glu-co-DPhe) (б).

Молекулярно-массовые характеристики и состав сополимеров определяли методами ГПХ, ВЭЖХ и  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии (Таблицы 4–5).

Таблица 4 – Характеристики статистических сополимеров P(Glu<sub>n</sub>-co-DPhe<sub>m</sub>).

Образец	[N-KA Glu(OBzl)]/ [N-KA DPhe]	ГПХ*		$^1\text{H}$ ЯМР*		ВЭЖХ [Glu]/[DPhe]
		$M_n$	$\bar{D}$	$n_{\text{Glu}}$	$m_{\text{DPhe}}$	
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(OBzl)-co-DPhe).

Таблица 5 – Характеристики статистических сополимеров P(Lys<sub>n</sub>-co-DPhe<sub>m</sub>).

Образец	[N-KA Lys(Z)]/ [N-KA DPhe]	ГПХ*		ВЭЖХ [Lys]/[DPhe]
		$M_n$	$\bar{D}$	
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  $\alpha$ -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 биodeградации полипептидных материалов. В данной работе были получены гибридные блок-сополимеры, в которых полиаминокислотные гидрофобные блоки сочетались с гидрофильным синтетическим гликополимером поли(2-деокси-2-метакриламидо-*D*-глюкозой) (PMAG). После биodeградации полиаминокислотного блока такой водорастворимый поливинилсахарид может полностью выводиться из организма.

Стратегия получения подобных амфифильных 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-КА  $\alpha$ -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).

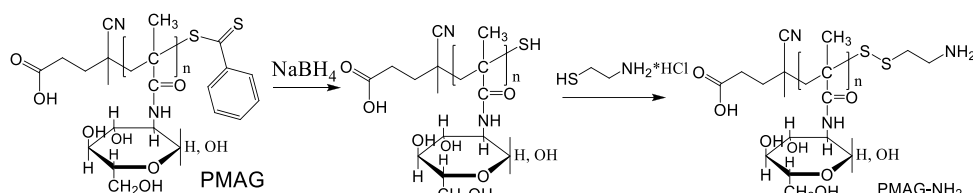


Рисунок 4 – Схема получения макроинициатора PMAG-NH<sub>2</sub>.

После проведения реакции модификации PMAG в спектре <sup>1</sup>H 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 цистеина. Сравнение хроматограмм, полученных методом ГПХ, исходных PMAG и PMAG-NH<sub>2</sub>, полученных после модификации полимера, подтвердило отсутствие димеризации в ходе реакции модификации PMAG.

Полученный гомополимер PMAG-NH<sub>2</sub> впервые был использован в качестве макроинициатора для полимеризации N-КА  $\alpha$ -(*L*-аминокислот) и синтезированы на его основе не описанные в литературе блок-сополимеры с полифенилаланином (PMAG-*b*-PPhe) и поли( $\gamma$ -бензил-*L*-глутаматом) (PMAG-*b*-PGlu(OBzl)) (Рисунок 5). Состав и молекулярно-массовые характеристики сополимеров представлены в Таблице 6.

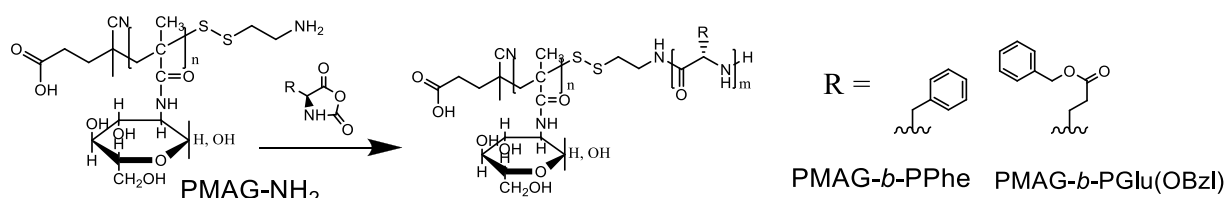


Рисунок 5 – Схема синтеза блок-сополимеров PMAG-*b*-PPhe и PMAG-*b*-PGlu(OBzl).

Таблица 6 – Характеристики блок-сополимеров PMAG<sub>n</sub>-*b*-PPhe<sub>m</sub> и PMAG<sub>n</sub>-*b*-PGlu(OBzl)<sub>m</sub>.

Образец	[N-КА 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 <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии;

\*\* рассчитаны на основании данных, полученных методами <sup>1</sup>H 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-*co*-*L*-фенилаланин) (PMAG-*b*-P(Lys-*co*-Phe)) представлена на Рисунке 6.

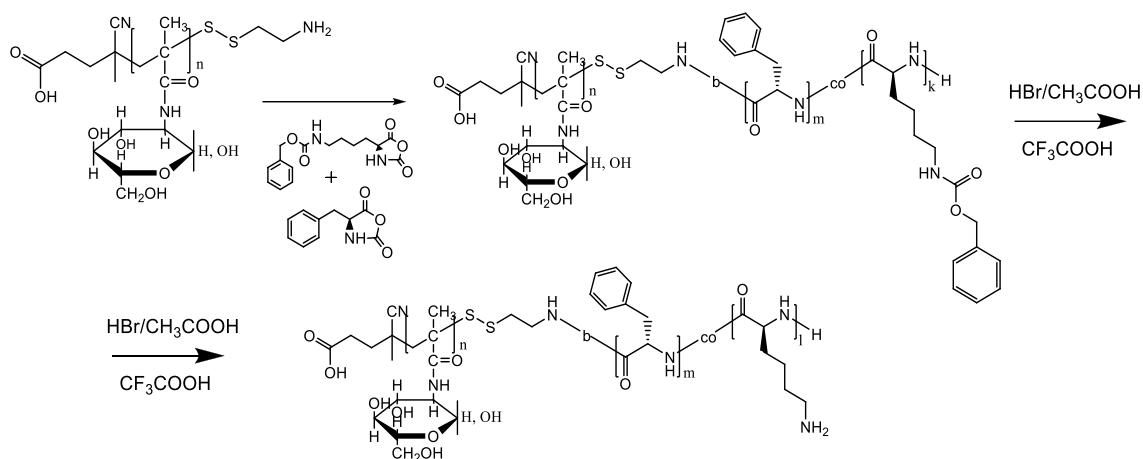


Рисунок 6 – Схема синтеза тройных сополимеров PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe).

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

Таблица 7 – Характеристики тройных сополимеров PMAG<sub>n</sub>-*b*-P(Lys<sub>m</sub>-co-Phe<sub>k</sub>).

Образец		$[M_1+M_2]/[PMAG]$	$[M_1]/[M_2]$	ВЭЖХ	$^1\text{H}$ ЯМР	
				$[Lys]/[Phe]$	$[MAG]/[Lys(Z)]/[Phe]$	$n_{MAG}:m_{Lys}:k_{Phe}$
PMAG- <i>b</i> -P(Lys-co-Phe)	1	75	2/1	1:0.4	0.4:1:0.5	22:55:27
	2	75	1/1	1:0.9	0.8:1:0.8	22:31:25
	3	75	1/2	1:1.6	1.1:1:1.5	22:20:30
	4	150	1/1	1:0.9	0.4:1:0.9	22:55:50
	5	75	1/1	1:0.9	2.8:1:0.8	80:29:23

$M_1 = \text{N-KA Lys(Z)}$ ,  $M_2 = \text{N-KA Phe}$ .

Таким образом, был разработан системный подход к получению новых гибридных блок-сополимеров на основе винилсахаридов и  $\alpha$ -аминокислот, заключающийся в последовательном использовании методов RAFT-полимеризации и полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксиангидридов  $\alpha$ -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 (pH раствора), так и с характеристиками используемого сополимера (состав, молекулярная масса, гидрофильно-гидрофобный баланс) на свойства образующихся частиц (гидродинамический размер,  $\zeta$ -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*-PPhe, PLys-*b*-PLeu и PLys-*b*-PAib наблюдалось формирование полимеросом – частиц, состоящих из гидрофобной мембраны 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  $\alpha$ -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 7в–е).

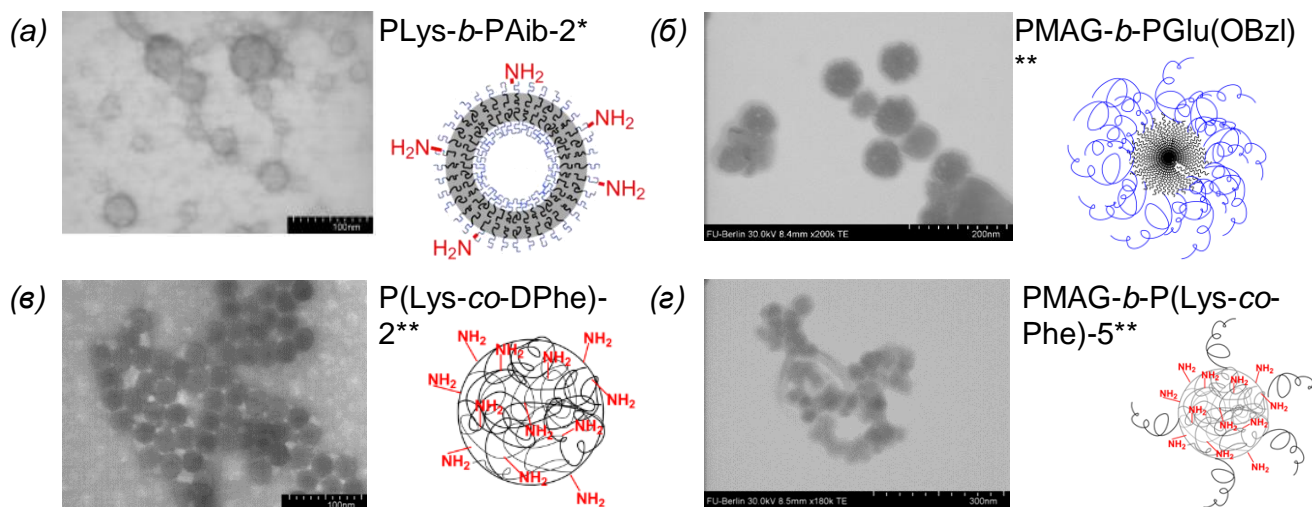


Рисунок 7 – Микрофотографии и схематичное изображение структуры полученных частиц. Условия получения частиц: \* 0.1 М цитратный буферный раствор, pH 3.0; \*\* 0.01 М фосфатный буферный раствор, pH 7.4.

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 8а), 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 8б), что связано с увеличением степени ионизации карбоксильных групп.

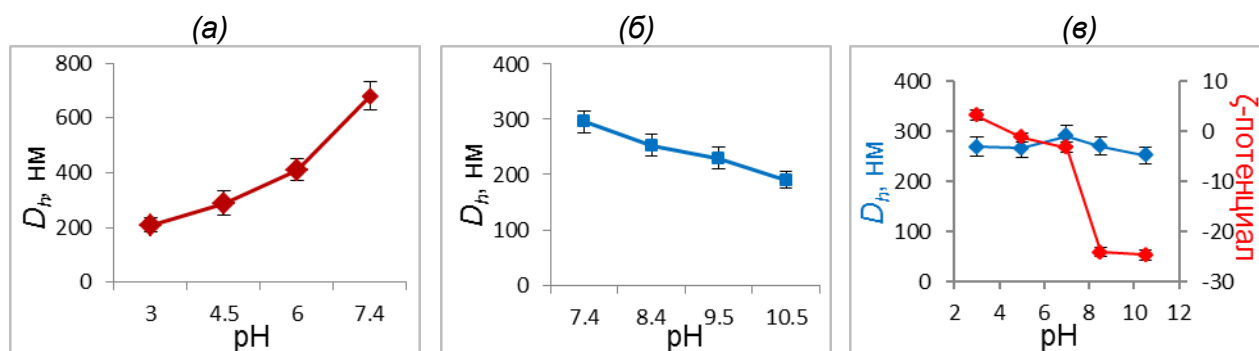


Рисунок 8 – Зависимость гидродинамического диаметра частиц на основе блок-сополимеров PLys-*b*-PLeu-7, (а) PGlu-*b*-PPhe-1 (б) и PMAG-*b*-PPhe-2 (в) от pH раствора, используемого при формировании частиц.

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  $\zeta$ -потенциала (Рисунок 8в).

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.

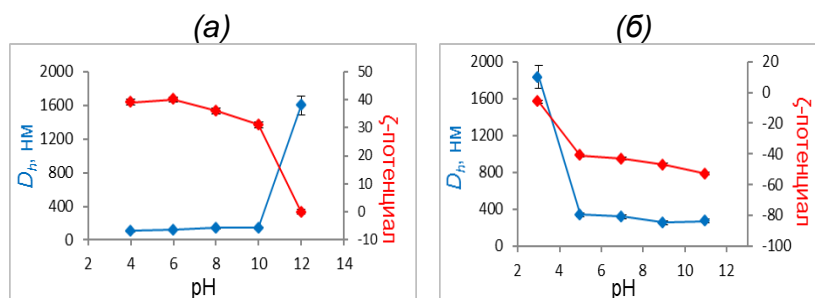


Рисунок 9 – Зависимость гидродинамического диаметра и  $\zeta$ -потенциала частиц на основе статистических сополимеров P(Lys-co-DPhe) (а) и P(Glu-co-DPhe) (б) от pH раствора, используемого при формировании частиц.

Изучение влияния длины гидрофильного и гидрофобного блоков на гидродинамический размер частиц позволило установить, что  $D_h$  частиц на основе блок-сополимеров  $\alpha$ -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.

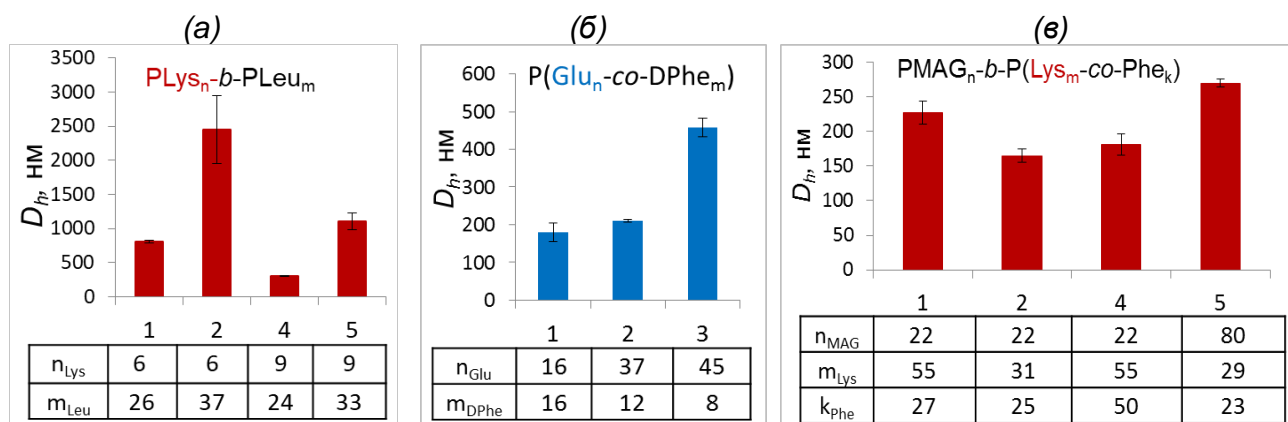


Рисунок 10 – Гидродинамический диаметр частиц на основе P(Lys-*b*-PLeu (0.1 М цитратный буферный раствор, pH 3.0) (а), P(Lys-co-DPhe) (б) и PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe) (в) (0.01 М фосфатный буферный раствор, pH 7.4).

Гидродинамический размер частиц на основе статистических сополимеров  $\alpha$ -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 структуры 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  $\alpha$ -аминокислот. Структура подобных частиц приведена на Рисунке 7з: они состоят из

гидрофобного ядра, образуемого PPhе, и гидрофильной мембраны, 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  $\alpha$ -аминокислоты (Рисунок 10в). 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  $\zeta$ -потенциалом они обладали: P(Lys-co-DPhe)-1 ( $36 \pm 6$  мВ) > PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-1 ( $8 \pm 1$  мВ) > PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe)-3 ( $2 \pm 1$  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.

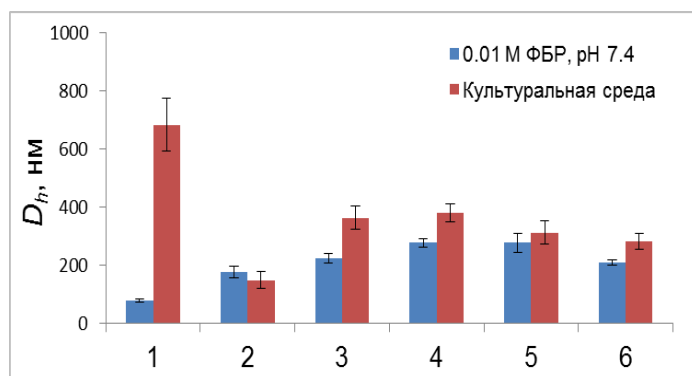


Рисунок 11 – Изменение гидродинамического диаметра частиц в культуральной среде, содержащей эмбриональную бычью сыворотку.

- 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 биodeградации 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 биodeградации.



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

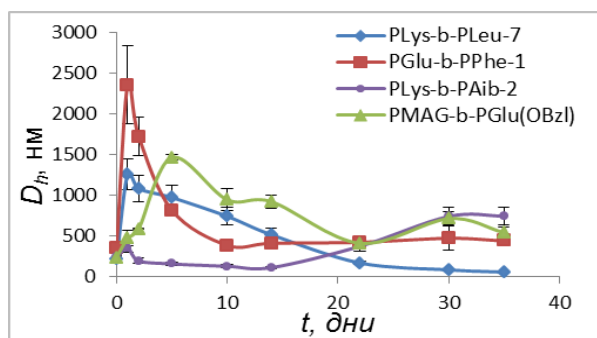


Рисунок 12 – Зависимость гидродинамического диаметра частиц на основе блок-сополимеров от времени инкубирования в среде, содержащей папаин ( $c_{\text{папаина}} = 0.5$  мг/мл).

Деградация частиц на основе блок-сополимеров природных  $\alpha$ -аминокислот (PLys-*b*-PLeu-7, PGlu-*b*-PPhe-1) сопровождалась увеличением их гидродинамического размера уже спустя сутки после начала инкубирования частиц с ферментом ( $c_{\text{папаина}} = 0.5$  мг/мл) и уменьшением  $D_h$  в течение последующего времени эксперимента. Такое резкое увеличение размера частиц может быть вызвано частичной деградацией гидрофильной полиаминокислотной (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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -D-аминокислоту, несколько увеличивался при добавлении папаина и затем медленно уменьшался в процессе деградации (Рисунок 13а). Скорость деградации сополимеров P(Lys-co-DPhe) и P(Glu-co-DPhe) значительно падала по сравнению с блок-сополимерами на основе природных  $\alpha$ -аминокислот. Так, например, для образца P(Lys-co-DPhe)-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.

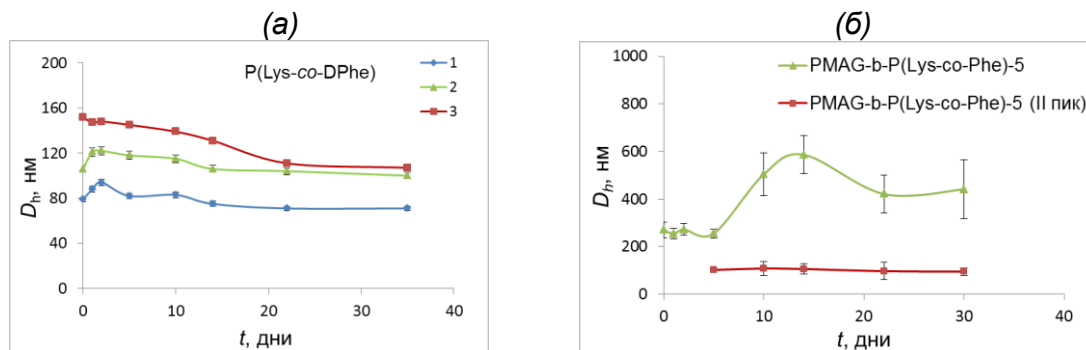


Рисунок 13 – Зависимость гидродинамического диаметра частиц на основе статистических сополимеров P(Lys-co-DPhe) (а) и гибридных сополимеров PMAG-*b*-P(Lys-co-Phe) (б) от времени инкубирования в среде, содержащей папаин ( $c_{\text{папаина}} = 0.5$  мг/мл).



Как было представлено выше, деградация полимерных частиц на основе блок-сополимеров природных  $\alpha$ -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  $\alpha$ -аминоизомасляная аминокислота, *D*-изомеры  $\alpha$ -аминокислот) увеличивает стабильность частиц к ферментативной деградации по сравнению со стабильностью частиц, образованных полимерами, построенными из звеньев природных  $\alpha$ -аминокислот, что, в свою очередь, будет способствовать пролонгированному высвобождению лекарственных веществ, заключенных внутри 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  $\zeta$ -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  $NH_2$ -группы частиц, содержащих в своей структуре лизин, модифицировали флуоресцентным красителем цианинового ряда Cy3,

боковые  $\text{COOH}$ -группы частиц на основе глутаминовой кислоты – дансилкадаверином. Инкубирование меченных 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.

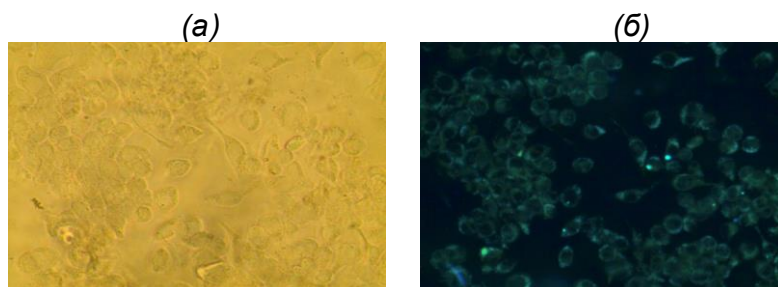


Рисунок 14 – Световая (а) и флуоресцентная (б) микрофотографии клеток рака легких A549, инкубированных с частицами на основе P(Glu-*b*-PPhe), меченными дансилкадаверином.

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 A549 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 A549 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).

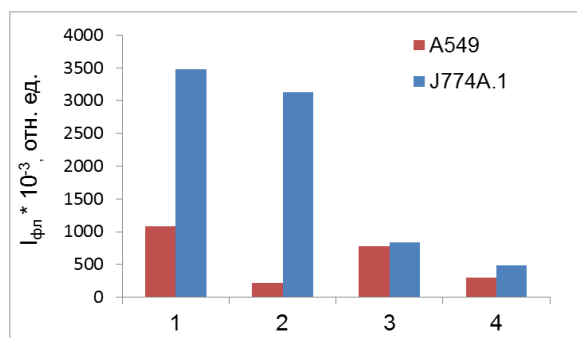


Рисунок 15 – Интенсивность флуоресценции клеток рака легких (A549) и макрофагов (J774A.1) после их инкубирования с флуоресцентно мечеными частицами ( $t = 24$  ч).

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 GNYTCEVTELTREGETIIELEK, 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 amino/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 биodeградируемых 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 – амфифильного 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  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. 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  $\alpha$ -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  $48 \pm 5$  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).

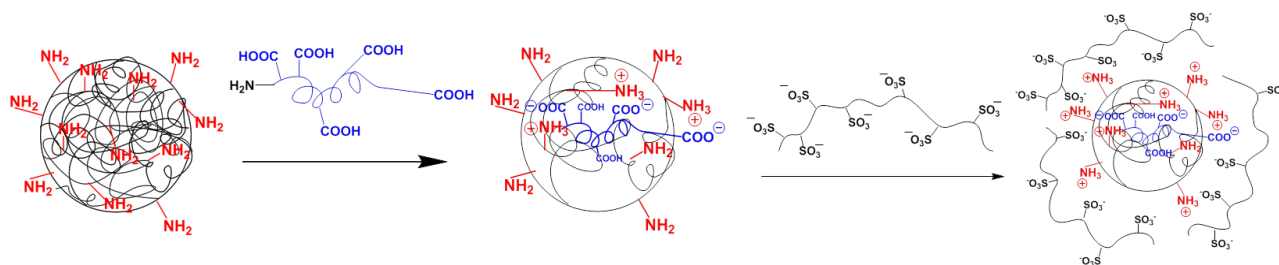


Рисунок 16 – Схематичное представление инкапсулирования С-пептида в частицы на основе P(Lys-co-DPhe) и последующей их модификации гепарином.

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  $860 \pm 10$  и  $810 \pm 10$  мкг/мг частиц, соответственно.

Применение иммобилизованной и инкапсулированной форм С-пептида позволило повысить активность фермента Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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 амфифильного основания иринотекана

Противоопухолевое амфифильное 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).

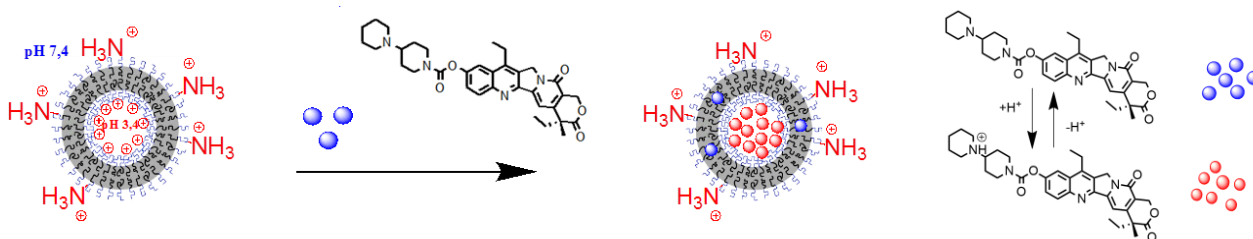


Рисунок 17 – Схематичное изображение инкапсулирования амфифильного основания иринотекана внутрь частиц на основе PLys-*b*-PLeu методом pH-градиента.

Максимальная загрузка иринотекана составила  $320 \pm 50$  мкг/мг частиц.

Для изучения высвобождения лекарственного вещества использовали модельные системы, содержащие ферменты папаин (pH 7.4) или пепсин (pH 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 биodeградации 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.

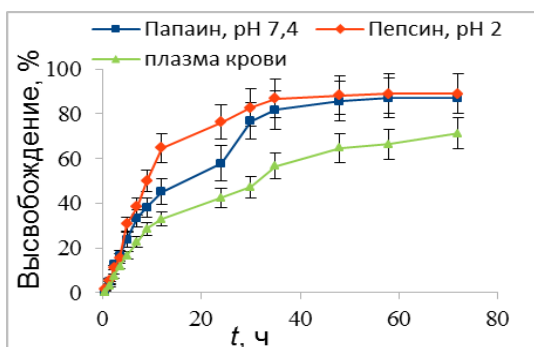


Рисунок 18 – Профили высвобождения иринотекана из полимерных частиц на основе PLys-*b*-PLeu-7, инкубированных в модельных физиологических условиях ( $T = 37^\circ\text{C}$ ).

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 инкапсулирования (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 ( $EC_{50} = 1.0\text{--}22.3$  нг/мл,  $t = 72$

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

Таким образом, на данном этапе работы была решена основная задача – разработка биodeградируемых и биосовместимых полимерных систем доставки на основе амфифильных сополимеров  $\alpha$ -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 амфифильных сополимеров  $\alpha$ -аминокислот и получения на их основе частиц, обладающих комплексом свойств (контролируемый размер, способность к биodeградации 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 амфифильный блок-сополимер, содержащий некодируемую  $\alpha$ -аминоизомасляную кислоту, и получен ряд статистических сополимеров  $\alpha$ -аминокислот с частичной заменой *L*-аминокислот на *D*-изомеры.
3. Впервые синтезированы амфифильные диблок-сополимеры, состоящие из небиodeградируемого блока гликополимера и биodeградируемого полипептидного блока, с использованием поли(2-деокси-2-метакриламидо-*D*-глюкозы), содержащей концевую первичную аминогруппу, в качестве макроинициатора для полимеризации *N*-карбоксиянгидридов  $\alpha$ -аминокислот.
4. На основе синтезированных амфифильных сополимеров получены узкодисперсные частицы различной структуры и исследовано влияние состава, гидрофильно-гидрофобного баланса исходных полимеров, а также условий получения частиц (pH) на их физико-химические свойства (гидродинамический размер,  $\zeta$ -потенциал).
5. Показано, что введение в структуру сополимеров небиodeградируемого поливинилсахарида поли(2-деокси-2-метакриламидо-*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. Vlach, E. Preparation, characterization, and biological evaluation of poly(glutamic acid)-b-polyphenylalanine polymersomes / E. Vlach, 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-Vlach, I.I. Tarasenko, A. Lavrentieva, T. Scheper, E. Rühl, R.V. Orlova, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlach // *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. Тарасенко, 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. Амфифильные 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, 28–31 мая 2017. – Севастополь, Крым, 2017. – Тезисы докладов. – С. 29.

10. Левит, М.Л. Амфифильные полипептид-содержащие блок-сополимеры для получения устойчивых к биodeградации наночастиц / М.Л. Левит, Н.Н. Зашихина, И.И. Тарасенко, Е.Г. Коржихова-Влах, Т.Б. Тенникова // III Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма2017, 28–31 мая 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. Коржихова-Влах // III Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической химии и Фармацевтике МОБИ-ХимФарма2017, 28–31 мая 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. Glycopolymer-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. Коржихова-Влах, Е.Г. Самоорганизующиеся полимерные системы для доставки лекарств различной природы / Е.Г. Коржихова-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 amphiphilic 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.