

Хаптаханова Полина Анатольевна

**Полимерные композиции на основе биополимеров и наночастиц бора для
нейтронозахватной терапии**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва
2024 г.

Работа выполнена в Лаборатории твердофазных химических реакций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института синтетических полимерных материалов им. Н. С. Ениколопова Российской академии наук (ИСПМ РАН)

Научный руководитель:

Успенский Сергей Алексеевич

кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Лаборатории полимерных и композиционных материалов
биомедицинского назначения ФГБУН Института
синтетических полимерных материалов им. Н. С.
Ениколопова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

доктор химических наук, заведующий Лабораторией
функциональных полимеров и полимерных материалов
ФГБОУ ВО Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова (МГУ им. М. В. Ломоносова), г.
Москва

Легонькова Ольга Александровна

доктор технических наук, заведующая Отделом
перевязочных, шовных и полимерных материалов в
хирургии, руководитель Испытательного центра
Национального медицинского исследовательского центра
хирургии имени А. В. Вишневского (НМИЦ хирургии им. А.
В. Вишневского), г. Москва

Ведущая организация:

ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.
Н. Несмеянова Российской академии наук (ИНЭОС РАН), г.
Москва

Защита состоится «27» июня 2024 г. в ч.: на заседании диссертационного совета
24.1.116.01 (Д 002.085.01) при ФГБУН Институте синтетических полимерных материалов им.
Н. С. Ениколопова РАН по адресу: 117393, г. Москва, ул. Профсоюзная, 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Института синтетических
полимерных материалов им. Н. С. Ениколопова РАН и на сайте института: <http://www.ispm.ru/>.
Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.116.01 (Д 002.085.01)

доктор химических наук



Борщев О. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Современные достижения в области синтеза и модификации биосовместимых полимерных материалов оказали существенное влияние на развитие пролонгируемых систем доставки лекарств и практическое совершенствование терапевтических функций лекарственных средств, таких как: селективная локализация, контролируемый профиль высвобождения и снижение системной токсичности. Актуальной задачей является разработка полимерных систем доставки борсодержащих препаратов для одного из передовых направлений лучевой терапии онкологических заболеваний – бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ).

БНЗТ – бинарная лучевая терапия, которая демонстрирует положительную тенденцию к повышению эффективности лечения сложных форм раковых образований, включая злокачественные опухоли мозга. Метод БНЗТ заключается в использовании соединений на основе стабильного изотопа ^{10}B в качестве основы терапевтических препаратов и стабильного пучка тепловых (<0.1 эВ) нейтронов. Одним из ключевых факторов, ограничивающий развитие и применение методики БНЗТ в широкой практике, является клинические препараты, которые не накапливаются в достаточной дозировке в пораженной области (30 мкг ^{10}B (10 млрд. атомов) на 1 г опухоли) и тем самым не обеспечивают необходимый регресс опухоли после нейтронного облучения. Для успешной реализации БНЗТ предъявляются основные требования к разрабатываемым препаратам, такие как: отсутствие системной токсичности, биосовместимость, высокая концентрация ^{10}B , доступные и масштабируемые методы синтеза.

Создание системы доставки терапевтического препарата на основе наночастиц элементного бора и биосовместимых полимерных матриц является одним из перспективных подходов в получении нового мишенного агента для реализации БНЗТ. Актуальность применения наночастиц элементного бора в качестве терапевтического препарата БНЗТ заключается в высоком содержании атомов ^{10}B в одной частице: при диаметре в 50 нм число атомов составит ~ 500 тыс., что обеспечит терапевтическую концентрацию ^{10}B для БНЗТ в раковых клетках в случае селективной локализации. Однако, гидрофобный характер наночастиц элементного бора является лимитирующим фактором, который может ограничить их применение в медицине. Появление концепции инкапсуляции гидрофобных лекарственных средств в матрицы биосовместимых полимеров способствовало качественному и количественному росту разработок, в фармацевтической сфере. Биосовместимые полимерные материалы в системах доставки лекарств значительно улучшают фармакологические и терапевтические свойства лекарственных/терапевтических веществ, в результате контроля их фармакокинетики, фармакодинамики, биораспределения, токсичности.

Из множества биосовместимых полимеров, современные носители для доставки

лекарств зачастую производят из тоннажных полисахаридов, в частности, гиалуроновая кислота (ГК), целлюлоза и ее водорастворимые производные. Использование полисахаридов и их производных может повысить растворимость, снизить токсичность инкапсулированных лекарственных веществ, что приводит к появлению различных механизмов контроля профилей высвобождения препаратов, исключению взаимодействия с нецелевыми биообъектами в организме. Полисахариды образуют верхний гелевый слой на поверхности инкапсулированной дисперсии, где толщина слоя определена химической структурой, концентрацией и вязкостью раствора полимера.

Альтернативными матрицами для инкапсуляции наночастиц бора являются сложные полиэфиры и полиаминокислоты. Поли-L-молочная кислота (ПМК) – алифатический сложный полиэфир, который одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для изготовления регулируемых медицинских изделий класса III. Однако, ПМК является гидрофобным и инертным полимером, что ограничивает его применение в инвазивной медицине. Идея создания амфифильных макромолекул с ПМК способствует расширению свойств полимерных носителей на его основе. В настоящее время разработаны, промышленно производят и применяют системы доставки на основе ПМК в составе блок-сополимера с полиэтиленгликолем в виде нано- и микрочастиц, для контролируемой доставки лекарственных средств различных классов. Известны торговые марки: Risperdal Consta, Lupron Depot, Vivitrol и т.д., всего 19 наименований, одобренных FDA.

Модификация цепи полимолочной кислоты гидрофильными фрагментами близкими по своей природе к составу структурных элементов клеток организма будет способствовать созданию нового поколения «умных» полимерных носителей для систем доставки лекарств. Одним из таких соединений, является полиаминокислота – ϵ -полилизин (ϵ -ПЛ- NH_2). ϵ -ПЛ имеет реакционноспособные функциональные группы для связывания с целевыми лигандами и биомаркерами, которые могут обеспечить специфическое клеточное поглощение (активная доставка). ϵ -ПЛ также как и ПМК, имеет одобрение FDA. Материалы на основе как ϵ -ПЛ, так и ПМК характеризуются комплексом необходимых свойств для медицинского применения, таких как: биосовместимость, низкий иммунный ответ, регулируемые физико-химические и механические свойства, контролируемые сроки биodeградации в различных средах, возможность функционализации таргетными молекулами. В зависимости от задач, решаемых в медицине, перечисленные свойства полимеров можно изменить, варьируя молекулярно-массовые характеристики полимеров в процессе их синтеза, сополимеризации, модификации или функционализации. Однако, актуальным остается поиск доступных и технологичных методов синтеза таких сополимеров.

Новым и перспективным подходом в синтезе сополимеров ϵ -ПЛ-ПМК является применение метода импульсной механохимии. Метод реализуется в процессе механохимической активации в вибрационной мельнице, которая обеспечивает деформационное перемешивание, приложение давления со сдвигом, сопровождаемое непрерывным образованием в твердом теле дефектов, которые способствуют протеканию химических реакций при комнатной температуре без использования больших количеств органических растворителей и катализаторов. Твердофазные процессы, инициируемые механическим воздействием, стали предметом интенсивных исследований.

Реализация выбранных подходов в разработке предложенных биосовместимых полимерных композиций с наночастицами бора для БНЗТ обеспечит высокую эффективность метода, а также удобную для применения терапевтическую форму, при которой достигается необходимый терапевтический эффект.

Цель диссертационной работы: разработать научно-технологические подходы к получению перспективных композиций для БНЗТ на основе биосовместимых полимеров и наночастиц элементного бора, соответствующих требованиям: отсутствие токсичности; высокое содержание ^{10}B в одной единице препарата (мкг/мг полимера); биодоступность композиции; высокий ингибирующий эффект в условиях БНЗТ для исследуемых биологических систем; стабилизация наночастиц бора в полимерных матрицах. Получение композиций с наночастицами бора, диспергированных в полимерных матрицах, должно быть реализовано с применением доступных, масштабируемых, а также эффективных методов синтеза.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Разработать композиции на основе биосовместимых полимеров и наночастиц элементного бора, обеспечивающие стабильность частиц во времени, биодоступность. Предложить доступные способы получения таких полимерных композиций.
2. Разработать методику получения ультрадисперсных фракций наночастиц бора менее 100 нм. Провести количественный и качественный анализы нанодисперсий бора, исследовать морфологию и состав.
3. Исследовать коллоидную устойчивость наночастиц бора в водных растворах полисахаридов: гиалуроновая кислота, гидроксиэтилцеллюлоза. Провести комплекс биологических и радиобиологических экспериментов для определения эффективности разработанных композиций на основе полисахаридов с наночастицами бора в условиях БНЗТ.
4. Изучить процессы и особенности инкапсулирования наночастиц бора в матрицу ПМК.
5. Провести синтез сополимеров поли-L-молочной кислоты и ϵ -полилизина для использования в качестве инкапсулирующей матрицы наночастиц бора. Исследовать структуру полученных

сополимеров. Оценить эффективность инкапсуляции наночастиц бора в матрицу ϵ -ПЛ-ПМК.

6. Сравнить эффективность распределения полимерных композиций (ГК, гидроксипропилцеллюлоза, ϵ -ПЛ-ПМК) с наночастицами бора для модели *in vivo*.

Научная новизна полученных результатов.

1. Впервые предложены рецептуры полимерных композиций на основе полисахаридов, сополимеров сложных полиэфиров и полиаминокислот, в матрицу которых инкапсулированы наночастицы бора для применения в БНЗТ.

2. Впервые предложено использовать эффективный безрастворный механохимический подход для синтеза привитых сополимеров полимолочной кислоты- ϵ -полилизина, обеспечивающий более простую и экологически безопасную технологию, позволяющую получать продукт, не требующий дополнительной очистки.

3. Впервые показано, что полимерные матрицы полисахаридов, сополимера полимолочной кислоты-полилизина могут быть использованы в качестве эффективных стабилизирующих систем для нанодисперсных частиц бора, обеспечивающих сохранение размерных характеристик в течение длительного времени. Такие матрицы повышают биодоступность частиц бора, обеспечивают низкую токсичность и высокий терапевтический эффект после нейтронного облучения.

4. Впервые предложено получение узкодисперсных фракций наночастиц элементного бора менее 100 нм с применением ультразвукового диспергирования.

Практическая значимость работы. Разработанные в ходе выполнения исследовательской работы композиции на основе наночастиц бора и биосовместимых полимеров позволят увеличить эффективность БНЗТ за счет повышения дозы мишенного агента в пораженных областях. Изучение параметров и условий синтеза композиций на основе биосовместимых полимеров и наночастиц бора важны для предполагаемого медицинского применения. Разработаны составы композиций на основе наночастиц бора в составе полимерных матриц, ингибирующие рост злокачественного образования в экспериментах *in vitro/in vivo* после нейтронного облучения.

Методология и методы исследования. Получение узкодисперсных фракций наночастиц элементного бора менее 100 нм проводили с помощью ультразвукового диспергирования в жидких средах. Морфологию и свойства полученных частиц оценивали методами: динамическое светорассеяние (ДСР), трансмиссионная спектроскопия (ТЭМ), рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РЭФС), инфракрасная спектроскопия (ИК), рентгенофазовый анализ. ПМК получали методом твердотельной дополиконденсации. Свойства полимера охарактеризовали гель-проникающей хроматографией (ГПХ), спектроскопией ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), дифференциально-сканирующей

калориметрией (ДСК), рентгенофазовым анализом. Сополимеры ПЛ-ПМК получали с помощью механохимической активации в вибрационной мельнице. Структуру сополимеров ПЛ-ПМК исследовали с помощью методов ИК, ЯМР. Размер ассоциатов в дисперсионной среде оценивали методами ДСР, малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), ТЭМ. Молекулярную массу охарактеризовали методом ГПХ. Содержание бора в полимерных матрицах оценивали методом эмиссионной спектроскопии с дугой постоянного тока (ЭС ДПТ). Биологические исследования полимерных композиций с наночастицами бора проводили с помощью МТТ-тестов (*in vitro*), клоногенного анализа (*in vitro*), моделей *in vivo*.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Впервые получены полимерные композиции с наночастицами элементного бора для БНЗТ. Показана эффективность стабилизации частиц бора в водных растворах полисахаридов: гиалуроновой кислоте, гидроксиэтилцеллюлозе;
2. Впервые показана возможность получения наночастиц элементного бора менее 100 нм с применением тонкого механохимического диспергирования в условиях акустической кавитации.
3. Представлена зависимость параметров диспергирования на морфологию, дисперсность частиц бора; определены этапы фракционирования частиц с узким гранулометрическим распределением. Охарактеризованы свойства наночастиц бора.
4. Впервые синтезированы композиции ПМК-наночастицы бора методом бескаталитической твердотельной дополиконденсации, охарактеризованы свойства продуктов с каждого этапа синтеза. Показано влияние наполнителя (наночастиц бора) на свойства ПМК.
5. Впервые методом импульсной механохимии получены сополимеры ϵ -полилизина и L-полимолочной кислоты. Охарактеризована структура полученных сополимеров. Оценена морфология ассоциатов ПЛ-ПМК в водном буферном растворе.
6. Проведен комплекс радиобиологических испытаний для композиций на основе наночастиц бора в составе полимерных матриц. Показана эффективность наночастиц бора в условиях БНЗТ.

Личный вклад соискателя. Автор работы внес существенный вклад в разработку концепции диссертации, активно принимал участие в постановке целей, задач, экспериментального комплекса исследований и анализа/ интерпретации полученных результатов исследований.

Автором проведен анализ литературы, разработаны методики синтеза наночастиц бора в условиях лабораторного синтеза и опытно-промышленного. Оценил свойства наночастиц бора аналитическими методами, включая ДСР, ТЭМ, СЭМ, РФЭС, рентгенофазовый анализ, ЭС ДПТ, ИК. Автор провел синтез композиций на основе наночастиц бора, включая готовые и синтетические полимерные матрицы, которые были охарактеризованы методами ДСК, ИК,

ЯМР, ЭС ДПТ, ГПХ, ТЭМ, МУРР. Автор принимал непосредственное участие в радиобиологических испытаниях разработанных композиций.

Автором проведено обобщение научных результатов, которые отражены в статьях, патентах, а также представлены на профильных научных конференциях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Результаты диссертации соответствуют паспорту специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 2, 4, 9 паспорта специальности.

Степень достоверности результатов работы. Достоверность результатов данной работы подтверждается комплексом статистических исследований, реализованных с применением современных методов и подходов, а также характеризуется непротиворечивостью согласно проведенным литературным исследованиям. Результаты исследований были представлены в виде научных статей и опубликованы в российских и зарубежных изданиях.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы представлены на 11 российских и международных конференциях: Международной конференции по борсодержащим соединениям EuroBoron 8 (Франция, Монпелье, 2019); Международном симпозиуме по самораспространяющемуся высокотемпературному синтезу (Россия, Москва, 2019); Международном симпозиуме ANAM-2019 (Армения, Ереван, 2019); Всероссийской конференции по бор-нейтронозахватной терапии (Россия, Новосибирск, 2019); Международной конференции «Деформация и разрушение материалов и наноматериалов» (Россия, Москва, 2019); Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2020» (Россия, Москва, 2020); Всероссийской конференции по бор-нейтронозахватной терапии (Россия, Новосибирск, 2022); Международной конференции по бор-нейтронозахватной терапии (Испания, Гранада, 2022); Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах» (Россия, Санкт-Петербург, 2022); Международной конференции по механохимии (Россия, Новосибирск, 2022); Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия» (Россия, Москва, 2024).

Публикации. Результаты научных исследований по теме диссертации опубликованы в 5-ти научных статьях в российских и зарубежных журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в базах данных «Scopus» и «Web of Science». 1 статья принята в печать. Получены 2 патента: РФ, Китай. Одобрена 1 заявка на изобретение, РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка

литературы, приложения. Работа изложена на 156 страницах печатного текста, включает 44 рисунка, 36 таблиц и список цитируемой литературы из 283 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** представлена актуальность проблемы исследования, сформулированы цели и задачи диссертационной работы, обоснован выбор объектов исследования, определена практическая значимость работы. Сформулированы научная новизна; положения, выносимые на защиту; описаны методология и методы исследования; степень достоверности и апробация результатов. В **Литературном обзоре** рассмотрены основные постулаты БНЗТ, описаны требования к новым разрабатываемым препаратам. Представлена концепция применения наночастиц бора в качестве мишенного агента для БНЗТ, рассмотрены основные методы синтеза. Подробно проанализированы и систематизированы свойства биосовместимых полимерных матриц для инкапсуляции гидрофобных лекарственных средств. Рассмотрен и обоснован выбор механохимического подхода как способ «зеленой химии» для синтеза новых биосовместимых полимерных композиций. В **Экспериментальной части** представлены основные характеристики исходных реагентов, описаны методики синтеза и физико-химические, биологические, радиобиологические методы исследования выбранных объектов. В **Обсуждении результатов** содержится 3 раздела, в которых представлены основные результаты работы. В первом разделе (3.1.) представлена разработка подхода к получению наночастиц бора с применением ультразвукового диспергирования, описаны основные этапы процесса, охарактеризована морфология частиц, оценено влияние этапа ультразвуковой обработки на состав поверхности, а также структурно-фазовые характеристики исследуемых наночастиц бора. Определены условия стабилизации наночастиц бора в готовые биосовместимые полимерные матрицы: гиалуроновая кислота, гидроксиэтилцеллюлоза. Второй раздел (3.2.) посвящен инкапсуляции наночастиц бора в синтетическую полимерную матрицу на основе сополимера поли-L-молочной кислоты и ϵ -полилизина. Рассмотрено влияние нанонаполнителя на свойства полимолочной кислоты, проведен механохимический синтез сополимера ϵ -полилизина-поли-L-молочной кислоты. В третьем разделе (3.3.) подробно рассмотрены биологические и радиобиологические исследования разработанных композиций на основе биосовместимых полимеров и наночастиц элементного бора.

Раздел 3.1. Наночастицы элементного бора

Для получения наночастиц элементного бора в работе выбран метод ультразвукового диспергирования микронных частиц бора в условиях акустической кавитации в водной дисперсионной среде. В результате разработанных оптимальных параметров диспергирования и каскадного фракционирования выделены три основные фракции частиц менее 100 нм, морфология которых охарактеризована с помощью ТЭМ и ДСР (рисунок 1).

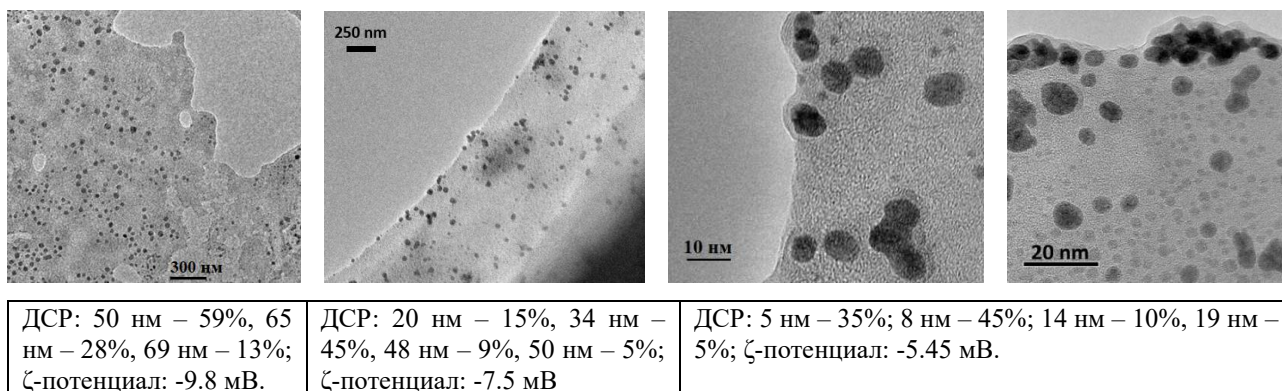


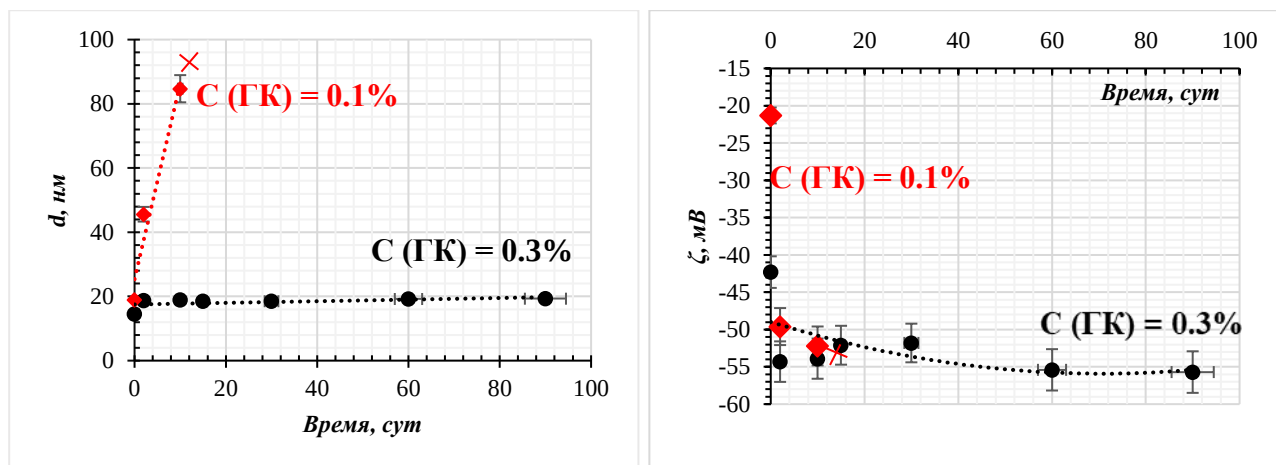
Рисунок 1 – Морфологические характеристики наночастиц бора.

Дисперсия наночастиц бора в водной дисперсионной среде характеризуется низкой агрегативной устойчивостью. Одним из методов стабилизации, является применение высокомолекулярных соединений. В результате такой стабилизации, получившей название стерической, наночастицы будут окружены защитным барьером, представляющим собой сплошной слой сольватированных полимерных цепей, в результате чего коллоидная система становится неограниченно устойчивой, до тех пор, пока защитный слой останется неповрежденным.

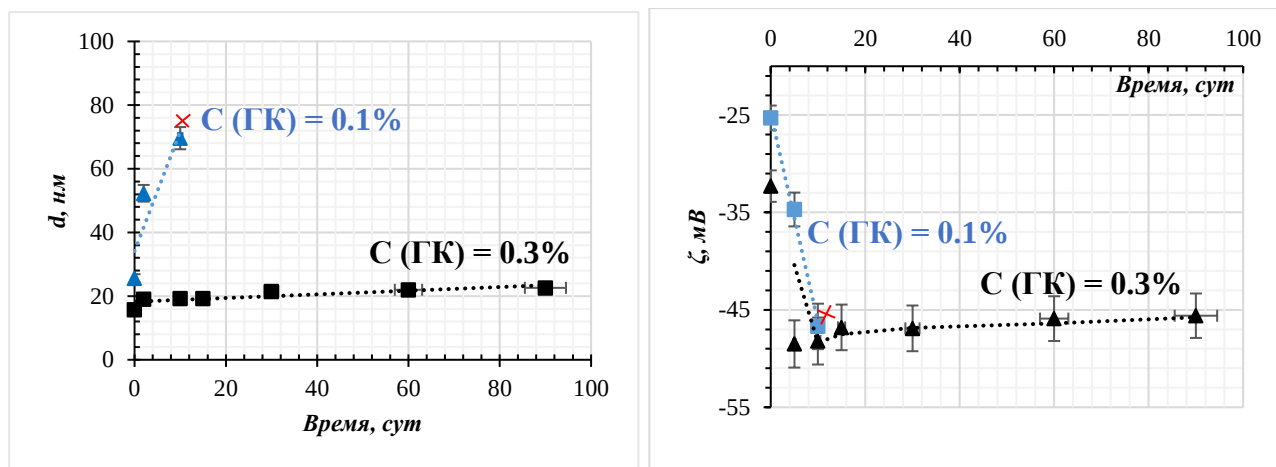
В качестве стабилизирующих систем выбрали следующие полимерные матрицы: гидроксипропилцеллюлозу и гиалуроновую кислоту, выбор которых обусловлен их высоким значением молекулярных масс, биосовместимостью, биологической активностью в среде организма, что определяет их как потенциальных матриц для инкапсуляции наночастиц бора. Сорбированные макромолекулы на поверхности наночастиц бора будут способствовать предотвращению связывания с белками плазмы крови и продлевать время циркуляции НЧ бора в кровотоке.

Для стабилизации наночастиц бора оптимальным является способ введения готовой дисперсии бора в воде в готовый водный раствор стабилизатора. Для определения оптимальной концентрации полимера, которая бы обеспечила стабильность размера частиц (5-15 нм, 500 мкг/мл) во времени, дисперсию бора добавляли в растворы с 0.1 и 0.3 масс. % (рисунок 2).

При концентрации полимера 0.1% масс. средний гидродинамический диаметр наночастиц увеличивается в зависимости от времени. Размер дисперсии увеличивается с 5-15 нм до ~50 нм за первые 2 дня. Оптимальная концентрация полимеров для стабилизации наночастиц бора – 0.3% масс.



А.



В.

Рисунок 2 – Зависимость размера частиц и ζ -потенциала от времени экспозиции: А. ГК-НЧ; В. ГЭЦ-НЧ.

Выбор значения концентраций водных растворов полимеров (0.3% масс.) обусловлен следующими факторами:

- методическая сложность: при более высоких концентрациях значительно возрастает вязкость раствора, из-за чего диффузия наночастиц бора в матрицу полимера затруднена, и как следствие, наблюдалась агломерация частиц;
- значения динамической вязкости для 0.3% раствора полимера соответствует значению вязкости крови млекопитающих (4.2-4.8 мПа*с), при этом, сложность введения внутривенных инъекций исключена или определяется скоростью введения коллоидного раствора. Известно, что высоковязкие системы не предусмотрены для внутривенно, поскольку высок риск закупорки мелких кровеносных сосудов.

Раздел 3.2. Синтез сополимера ϵ -полилизина-поли-L-молочной кислоты

Инкапсуляцию наночастиц элементного бора в синтетическую матрицу из сополимера ϵ -полилизина-поли-L-молочной кислоты проводили на этапе синтеза ПМК, который осуществляли с применением бескаталитического метода твердотельной дополиконденсации.

Образование полимера с более высокими значениями молекулярных масс происходит в результате физических процессов: частицы олигомеров ПМК нагревают выше температуры стеклования, но ниже точки плавления. В таких условиях аморфная составляющая вытесняется на поверхность кристаллической фазы. Для ПМК твердотельная поликонденсация протекает в аморфной части, поэтому максимальная плотность полимерных клубков в конденсированной фазе способна обеспечить высокую вероятность реагирования свободных функциональных групп на концах различных полимерных цепей. Этот процесс приводит к увеличению M_w полимера. При варьировании основных параметров SSP, таких как, степень кристалличности олигомеров ПМК, размер частиц олигомеров, температура и время процесса, найдены оптимальные условия получения ПМК с M_w до 25 кДа, при отсутствии катализатор, инициаторов процесса, органических растворителей.

На основании оптимизированных параметров твердотельной дополиконденсации, синтезировали борсодержащую ПМК. В матрицу ПМК инкапсулировали наночастицы бора, в интервале размеров 5-15 нм. Оптимальным способом введения НЧ бора в полимерную матрицу является добавление частиц на этапе концентрирования исходного мономера. При добавлении дисперсии частиц в расплав олигомеров МК не целесообразно, так как из-за вязкости расплава добиться равномерного распределения частиц является сложной задачей. Вводили 0.03-10.0% масс. наночастиц бора. Изменение свойств ПМК при добавлении частиц бора на начальном этапе синтеза проводили методами: ДСК, рентгенофазового анализа, ГПХ. В таблице 1 показано влияние нанонаполнителя (5-15 нм, концентрация – вариативна) на свойства ПМК.

Таблица 1 – Свойства ПМК в зависимости концентрации наночастиц элементного бора.

Концентрация наночастиц бора, % масс. в 1 г ПМК	α ПМК, %	M_w ПМК, кДа	$\bar{D}$	Терапевтическая концентрация бора, мкг/мг ПМК
0	47	23	2.3	0
0.03	74	62	2.4	0.3
1.0	64	53	2.1	10
5.0	41	19	2.3	50
10.0	32	15	2.0	100

Для дальнейших работ по получению амфифильных сополимеров с полилизинном выбрали композит ПМК, с содержанием бора 5 %масс., и средним диаметром частиц 5-15 нм, так как такая концентрация, соответствует диапазону требуемой терапевтической концентрации мишенного агента для БНЗТ.

В данной работе предложен оригинальный механохимический подход для синтеза сополимеров ϵ -ПЛ-L-ПМК. В последнее время фармацевтическая промышленность уделяет особое внимание «синтезу в твердом теле», когда реакция проводится без растворителей или количество используемых растворителей значительно снижено. Такой подход позволяет: получать особо чистые вещества; нередко проводить реакции более селективно, с высоким

выходом продукта; решать экологические проблемы.

Для механической активации и последующего синтеза сополимеров на основе L-ПМК и ε-ПЛ в работе использовали вибрационную шаровую мельницу, предназначенную для измельчения материалов и получения как можно большей удельной поверхности при значительно меньших затратах энергии в условиях многоосного сжатия и сдвига. В основе метода: импульсный характер процесса во времени и локальный характер механического воздействия на вещество, обеспечивающие чередование процессов возникновения давления, сдвига, релаксации полимера. Проведение механической активации в мельницах является наиболее распространенной операцией в механохимии. Однако, следует отметить, что подобный метод синтеза не применялся для смесей ε-ПЛ-L-ПМК, и в данной работе это было апробировано впервые. Исходные гомополимеры (M_w ПМК = 10 кДа; M_w ПЛ = 6 кДа) были предварительно смешаны в виде растворов с последующим совместным испарением растворителей и измельчением в ступке для гомогенизации компонентов.

При выбранных условиях механохимического синтеза продукт будет содержать смеси компонентов, в том числе привитые сополимеры с разной степенью прививки и непрореагировавшие гомополимеры (рисунок 3).

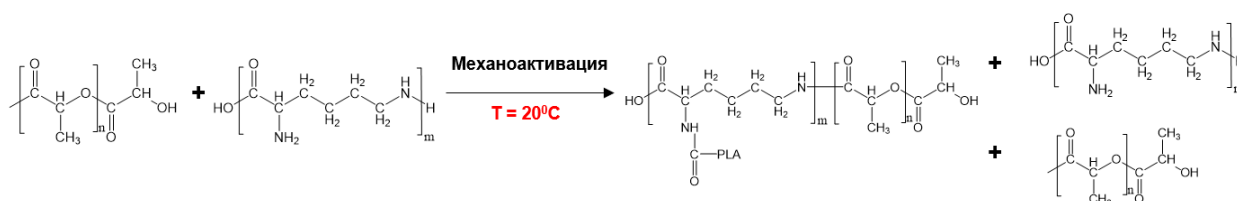


Рисунок 3 – Схема синтеза ПЛ-ПМК с применением импульсной механохимии.

Разработка алгоритмов разделения таких смесей является чрезвычайно сложной задачей из-за схожей растворимости амфифильных сополимеров и гомополимеров ПЛ и ПМК в селективных растворителях.

Всего было получено три соотношения ε-ПЛ:L-ПМК = 1:9, 1:1, 9:1 (по 10.0 г). Разделение реакционной массы проводили согласно схеме, указанной в п.2.2.3 диссертационной работы. Для качественной оценки структуры целевых продуктов использовали ИК (НПВО) и ^1H ЯМР. Выход сополимеров составил: 58% (ПЛ:ПМК = 1:9); 75% (ПЛ:ПМК = 1:1); 73% (ПЛ:ПМК = 9:1).

Исследование структуры методом ИК (НПВО) показало, что в продуктах реакций в твердом состоянии хорошо разрешены характерные полосы поглощения как для ε-ПЛ, так и для L-ПМК для всех соотношений гомополимеров ε-ПЛ:L-ПМК = 1:9, 1:1, 9:1. Для смеси компонентов, которые не подвергались механохимическому воздействию, интенсивней наблюдаются полосы поглощения того гомополимера, который преобладает в смеси, в зависимости от массового соотношения. Для смеси продуктов реакции, которая была получена

в результате механохимического воздействия аналогично выражены полосы поглощения, которые характеризуют гомополимер.

На рисунке 4 приведены спектры продуктов, полученных после первого смешения в ступке, смеси после импульсной механохимии и смеси после этапа очистки.

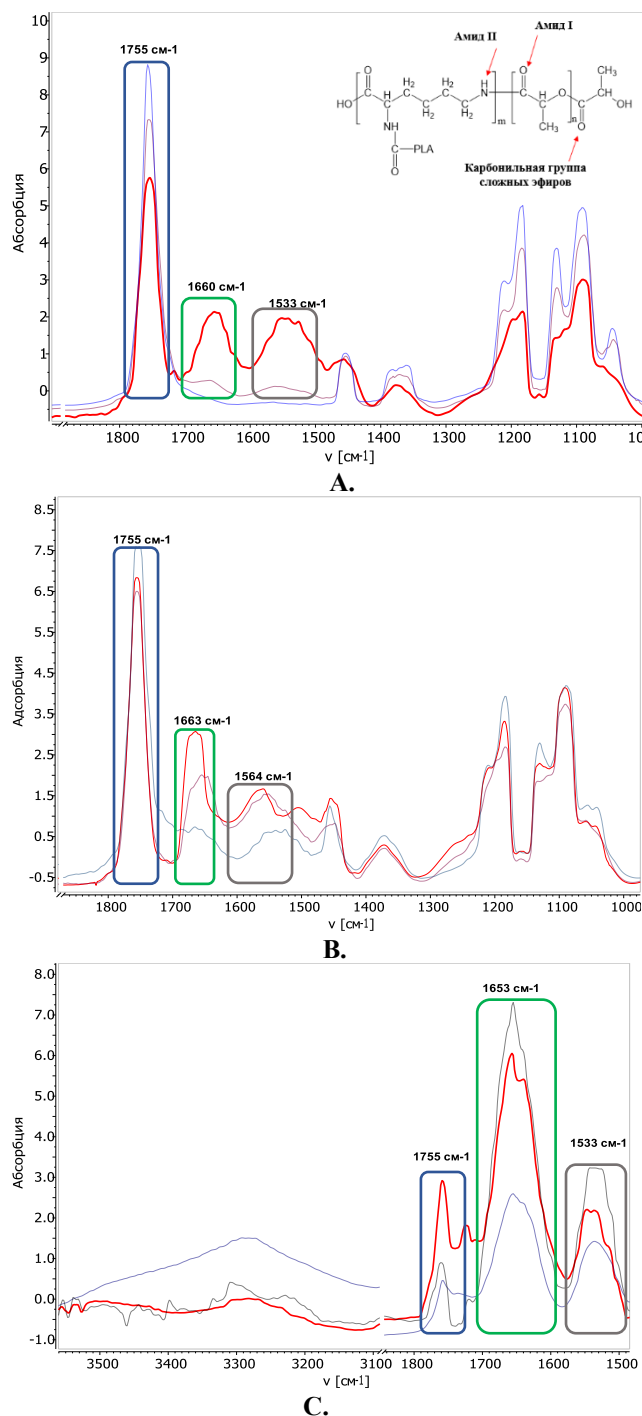


Рисунок 4 – ИК-спектры НПВО для продуктов, полученных после разных этапов синтеза: **А.** ϵ -ПЛ:L-ПМК = 1:9 (синий – смесь после смешения в ступке, бордовый – смесь после механоактивации, красный – смесь после очистки); **В.** ϵ -ПЛ:L-ПМК = 1:1 (синий – смесь после смешения в ступке, бордовый – смесь после механоактивации, красный – смесь после очистки); **С.** ϵ -ПЛ:L-ПМК = 9:1 (синий – смесь после смешения в ступке, зеленый – смесь после механоактивации, красный – смесь после очистки).

После стадии очистки в продуктах идентифицируются валентные колебания карбоксильной группы сложных полиэфиров в области 1756 cm^{-1} ; полосы поглощения, в совокупности характеризующие амидную группировку: деформационные колебания $-\text{C}=\text{O}$ в полиаминокислотах в твердом состоянии (Амид I) в области 1660 cm^{-1} , частота такой полосы сильно подвержена влиянию водородной связи, вследствие чего возможны значительные смещения при переходе от твердого состояния к раствору; деформационные колебания $-\text{NH}-$ в амидах (Амид II) в области 1521 cm^{-1} . Также наблюдаются полосы поглощения, характеризующие деформационные ассиметричные колебания $-\text{CH}_3$ сложных полиэфирах в области 1481 cm^{-1} .

Согласно полученным данным, для всех трех соотношений гомополимеров, после механоактивации и стадии очистки, на спектрах наблюдаются полосы поглощения для сополимера, характеризующие группы ϵ -ПЛ и L-ПМК. Для продукта реакции при соотношении ϵ -ПЛ к L-ПМК = 1:1, наблюдается исчезновение полосы поглощения валентных

колебаний первичной аминогруппы по длине макроцепи у ϵ -ПЛ в области 3400-3500 см^{-1} . Одновременно при таком соотношении компонентов интенсивность полос Амида-I и Амида-II заметно возрастает, что свидетельствует об интенсивном процессе прививки ϵ -полилизина и поли-L-молочной кислоты в результате реакции аминотрибутирования.

Анализ структуры привитых сополимеров ϵ -ПЛ-L-ПМК, полученных после механоактивации и очистки, исследовали методом ^1H ЯМР-спектроскопии, в растворителе CDCl_3 . На рисунке 5 приведен общий вид протонного спектра продуктов реакции.

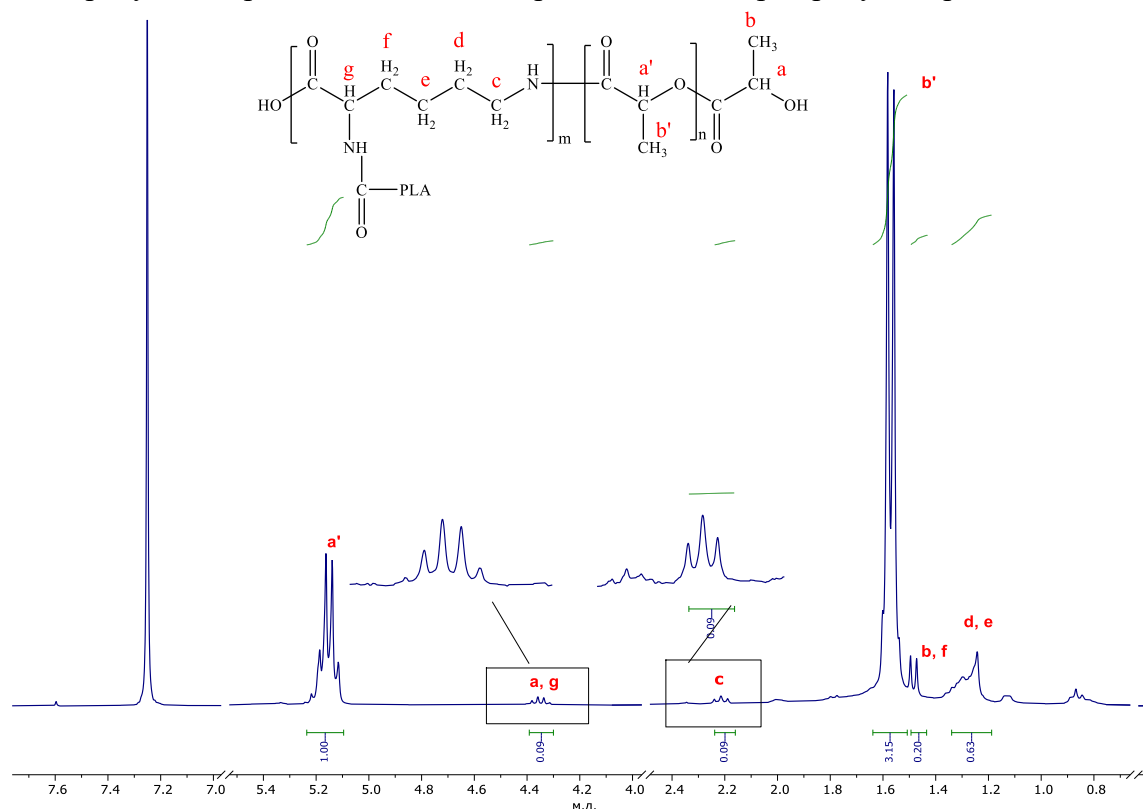


Рисунок 5 – Общий вид ^1H спектра для продуктов после механоактивации и очистки. Растворитель CDCl_3 .

На ^1H -спектре наблюдаются пики, характеризующие L-ПМК: $\delta = 5.12-5.23$ м.д. – протоны CH группы в макроцепи ПМК (a'), $\delta = 1.51-1.16$ м.д. – протоны $-\text{CH}_3$ группы в макроцепи ПМК (b'), $\delta = 4.3-4.4$ м.д. – протоны в $-\text{CH}$ группе на концах макроцепи ПМК (a), протоны в $-\text{CH}$ группе ПЛ (g), $\delta = 1.45-1.5$ м.д. – протоны в $-\text{CH}_3$ группе на концах макроцепи ПМК (b); а также ϵ -ПЛ: $\delta = 2.19$ м.д. – протоны в $-\text{CH}_2$ группе ϵ -ПЛ (c), $\delta = 1.46$ м.д. – протоны в $-\text{CH}_2$ группе ϵ -ПЛ (f), $\delta = 1.25$ м.д. – протоны в $-\text{CH}_2$ группе ϵ -ПЛ (d). В таблице 2 приведены значения интегральных интенсивностей для сигналов протонов групп ϵ -ПЛ и ПМК, при варьировании соотношения исходных гомополимеров.

Таблица 2 – Интегральные интенсивности сигналов для протонов в группах, характерных для ϵ -ПЛ и L-ПМК (растворитель CDCl_3), в продуктах.

Соотношение ϵ -ПЛ:L-ПМК	δ м.д. (группа), I	$(I_{\text{CH(ПЛ)}}/I_{\text{CH(ПМК)}})*100\%$
1:9	3.1 м.д. (d , $-\text{CH}_2$ - в ПЛ), 0.63 ; 4.3-4.4 м.д. (g , $-\text{CH}$ в ПЛ), 0.09 ; 5.12-5.23 м.д.	$(0.09)/1 = 9.0\%$

Соотношение ϵ -ПЛ:L-ПМК	δ м.д. (группа), I	$(I_{\text{CH(ПЛ)}}/I_{\text{CH(ПМК)}}) * 100\%$
	(a', -CH- в ПМК), 1.0	
1:1	3.1 м.д. (d, -CH ₂ - в ПЛ), 0.85 ; 4.3-4.4 м.д. (g, -CH в ПЛ), 0.2 ; 5.12-5.23 м.д. (a', -CH- в ПМК), 1.0	$(0.2)/1 = 20\%$
9:1	3.1 м.д. (d, -CH ₂ - в ПЛ), 0.4 ; 4.3-4.4 м.д. (g, -CH в ПЛ), 0.18 ; 5.12-5.23 м.д. (a', -CH- в ПМК), 1.0	$(0.19)/1 = 18.0 \%$

Образование сополимера в условиях импульсного механохимического воздействия обусловлено наличием групп ϵ -полилизина в нехарактерной для него органической среде (хлороформ). Для массового соотношения гомополимеров ϵ -ПЛ:L-ПМК = 1:1 наблюдали наибольшее значение интенсивности сигналов протонов групп (таблица 3), характерных ϵ -полилизину. Мольная доля ϵ -ПЛ, рассчитанная по соотношению интегральных интенсивностей -CH в ПЛ и -CH в ПМК, составила $\sim 20\%$.

Продукты реакции, полученные после механоактивации и очистки, исследовали методом ^1H ЯМР в растворителе DMSO- d_6 (рисунок 6).

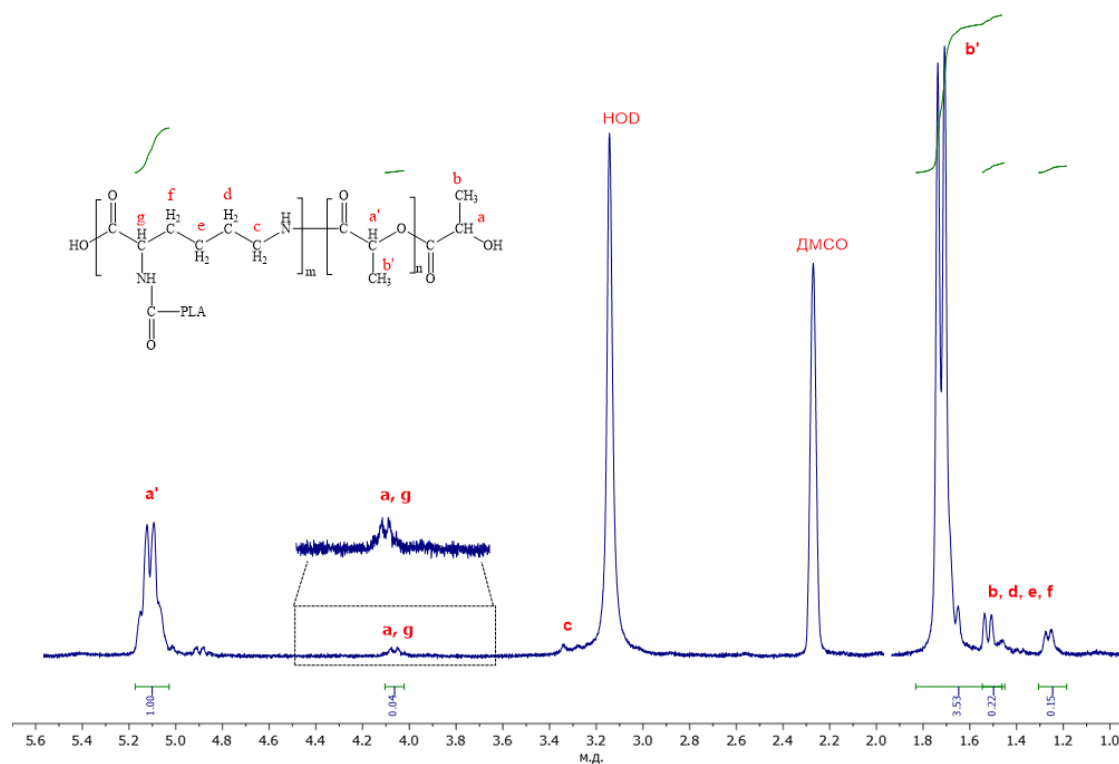


Рисунок 6 – Общий вид ^1H спектра для продуктов после механоактивации и очистки.
Растворитель DMSO- d_6 .

На ^1H -спектре наблюдаются пики, характеризующие L-ПМК: $\delta = 4.18-4.25$ м.д. – протоны в -CH группе на концах макроцепи ПМК (a), $\delta = 1.47-1.5$ м.д. – протоны в -CH₃ группе на концах макроцепи ПМК (b), $\delta = 5.10-5.24$ м.д. – протоны CH группы в макроцепи ПМК (a'), $\delta = 1.55-1.21$ м.д. – протоны -CH₃ группы в макроцепи ПМК (b'), а также ϵ -ПЛ: $\delta = 4.18-4.25$ м.д. – протоны в -CH (g), $\delta = 3.58$ м.д. – протоны в -CH₂ группе ϵ -ПЛ (c), $\delta = 1.47$ м.д., 1.18-1.25 м.д. – протоны в -CH₂ группе ϵ -ПЛ (d, e, f). В таблице 3 приведены численные значения

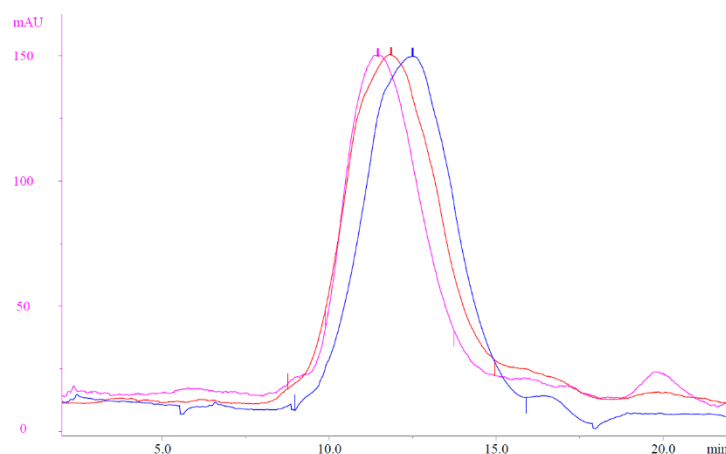
интенсивности сигналов для протонов групп ПМК и ϵ -ПЛ, при варьировании соотношения исходных гомополимеров.

Таблица 3 – Сравнение интенсивности сигналов для протонов в группах, характерных для ПМК и ϵ -ПЛ (растворитель DMSO-d₆).

Соотношение ϵ -ПЛ:L-ПМК	δ м.д. (группа), I	$(I_{CH(ПЛ)}/I_{CH(ПМК)}) * 100\%$
1:9	1.46 м.д. (d, -CH ₂ - в ПЛ), <u>0.22</u> ; 4.18-4.25 м.д. (g, CH в ПЛ), 0.04; 5.10-5.24 м.д. (a', -CH- в ПМК), <u>1.0</u>	$(0.04*0.5)/1 = 2.0\%$
1:1	1.46 м.д. (d, -CH ₂ - в ПЛ), <u>0.32</u> ; 4.18-4.25 м.д. (g, CH в ПЛ), 0.2; 5.10-5.24 м.д. (a', -CH- в ПМК), <u>1.0</u>	$(0.2*0.5)/1 = 10.0\%$
9:1	1.46 м.д. (d, -CH ₂ - в ПЛ), <u>0.49</u> ; 4.18-4.25 м.д. (g, CH в ПЛ), 0.24; 5.10-5.24 м.д. (a', -CH- в ПМК), <u>1.0</u>	$(0.24*0.5)/1 = 12.0 \%$

По данным ИК и ЯМР показано, что в результате импульсного механохимического воздействия образуются целевые продукты – сополимеры ϵ -ПЛ-L-ПМК. Следует отметить, что выход соответствует выбранным параметрам и условиям синтеза. Изменение амплитуды колебаний вибромельницы, а также время воздействия на материал будут способствовать увеличению количественного выхода целевых продуктов. Оптимизация параметров и условий синтеза является предметом дальнейших исследований.

Кажущуюся молекулярную массу сополимера определяли методом ГПХ. Изучались продукты реакции после очистки, полученные при массовом соотношении ϵ -ПЛ:L-ПМК = 1:1, 9:1. В качестве элюента использовали ацетатный буфер. На рисунке 7 представлены хроматограммы образцов в зависимости от массового соотношения гомополимеров.



Образец	Удержание, мин	M _w , кДа	M _n , кДа	Đ
ПЛ (розовый)	11.35	5.4	5.3	1.02
ПЛ:ПМК= 9:1 (красный)	11.8	8.8	7.4	1.2
ПЛ:ПМК= 1:1 (синий)	12.5	12.72	10.6	1.2

Рисунок 7 – Хроматограммы и расчетные молекулярные массы продуктов, полученных в результате механохимического воздействия.

Для сравнения был взят ПЛ с известной молекулярной массой. Показано, что наибольшая молекулярная масса характерна для образца, полученного в результате синтеза в

вибрационной мельнице, с массовым соотношением ϵ -ПЛ:Л-ПМК = 1:1.

Для амфифильного сополимера ассоциаты в водном растворе состоят из гидрофобного ядра, представленного схлопнувшейся гидрофобной ПМК, и гидрофильной оболочки, представленной ϵ -ПЛ. Изучена потенциальная возможность образования макромолекулярных ассоциатов ϵ -ПЛ-Л-ПМК в водной дисперсионной среде. Экспериментально методом МУРР показано, что у сополимеров наблюдаются самоорганизующиеся структуры в водной среде. Исследованы образцы с массовым соотношением ПЛ:ПМК = 1:1 и 9:1.

Использованы две модели для аппроксимации данных МУРР для ассоциатов (рисунок 8): эллипсоид и катушку Гаусса. Эллипсоидальная модель лучше соответствует экспериментальным данным (значения χ^2 1.080, 1.078 и 0.902 вместо 1.217, 1.235 и 0.977), что указывает на более вероятную глобулярную структуру для ϵ -ПЛ и ϵ -ПЛ-Л-ПМК по сравнению со спиралью. Из-за схожих значений плотности длины рассеяния ϵ -ПЛ:Л-ПМК использовали модель однородного эллипсоида вместо модели эллипсоида ядро-оболочка.

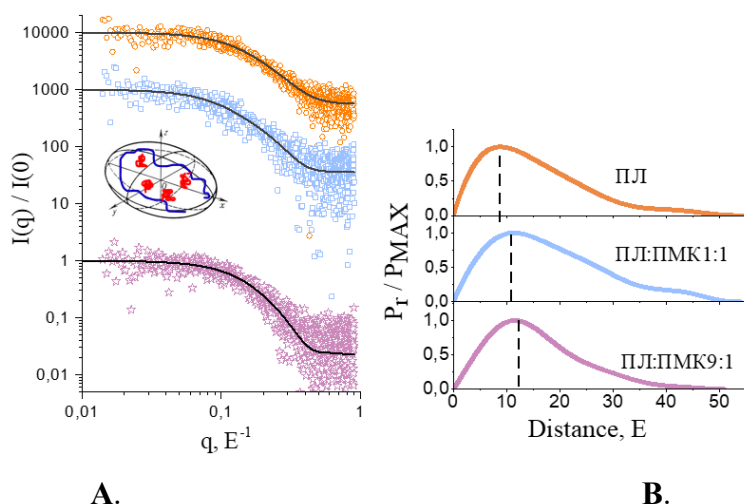


Рисунок 8 – Данные МУРР сополимеров. А. Экспериментальные профили $I(q)$ для ϵ -ПЛ (оранжевый) и сополимеров ϵ -ПЛ:Л-ПМК с соотношением 9:1 (фиолетовый) и 1:1 (синий). В. Нормализованная функция распределения парных расстояний $P(r)/P_{\max}$ для ϵ -ПЛ и сополимеров ϵ -ПЛ-ПМК. Вертикальные пунктирные линии соответствуют максимумам функций $P(r)$ и показывают, что характерные размеры сополимера увеличиваются с увеличением доли ПМК.

$R_{P_{\max}}/D_{\max} \sim 1/5$ также указывает на удлиненную/сплюснутую форму ассоциата.

Функция парной корреляции, описывает форму ассоциатов в виде трехосевого эллипсоида, размеры которого меняются в зависимости от соотношения гидрофильной и гидрофобной частей. Показано, что размеры трехосного эллипсоида варьируются в зависимости от соотношения гидрофильной и гидрофобной частей и увеличиваются с

Форма ассоциатов преимущественно вытянутая и уплощенная, с соотношением осей примерно 1:2:5, что хорошо согласуется с тем, что ПЛ имеет положительный заряд (все кислотно-основные центры протонированы) в растворе с $pH < 7$ (ацетатный буфер) и имеет тенденцию принимать вытянутую конформацию, при этом может находиться в электростатически расширенной конформации из-за отталкивания протонированных аминогрупп. Отношение положения максимума к максимальному размеру

увеличением доли ПМК (таблица 4). Радиус инерции R_g , а также положение максимума R_{pmax} функции распределения парных расстояний также увеличиваются с увеличением доли ПМК (рисунок 8 В, таблица 4), показывают, что характерные размеры ассоциата сополимера увеличиваются.

Таблица 4 – Параметры ϵ -ПЛ и ϵ -ПЛ-L-ПМК, полученные методом МУРР.

ПЛ:ПМК	$P(r)$ параметры			Эллипсоидные полуоси			Объем, $10^3 \text{ \AA}^3$	$\bar{v}$, $\text{\AA}^3/\text{Да}$	M_w , кДа
	D_{max} , $\text{\AA}$	R_g , $\text{\AA}$	R_{pmax} , $\text{\AA}$	a , $\text{\AA}$	b , $\text{\AA}$	c , $\text{\AA}$			
ПЛ	55	12 ± 0.2	9.1	-	-	-	4.5 ± 0.4	-	3.8 ± 0.4
9:1	51	12.8 ± 0.8	11.6	7.1 ± 1.3	9.8 ± 1.6	22.9 ± 1.3	6.7 ± 0.4	1.0688	6.2 ± 0.4
1:1	54	14.9 ± 1.3	11.4	6.4 ± 1.0	10.2 ± 1.3	32.3 ± 2.1	8.9 ± 0.8	1.0425	8.3 ± 0.7

Размеры ассоциатов, полученные методом МУРР, сравнили с гидродинамическим радиусом R_{hyd} , полученным в экспериментах по ДСР. В таблице 5 показано распределение по размерам ассоциатов ϵ -ПЛ-L-ПМК, полученных методом ДСР.

Таблица 5 – Распределение ассоциатов по размерам.

№	Соотношение ПЛ:ПМК, масс.	Средний R_{hyd} , нм	ζ -потенциал, мВ
1	9:1	10 ± 2	29.5
2	1:1	12 ± 3	28.5

Для исследуемых сополимеров в водной дисперсионной среде размер макромолекулярных ассоциатов увеличивается с увеличением содержания ПМК в продукте. Гидродинамические радиусы хорошо согласуются с эквивалентным сферическим радиусом из МУРР, хотя они немного больше, что ожидаемо для полимерных мицеллярных структур из-за гидродинамического сопротивления боковых цепей ассоциата.

Для оценки морфологии ассоциатов ϵ -ПЛ-L-ПМК, при массовом соотношении 1:1, применили метод ТЭМ (рисунок 9).

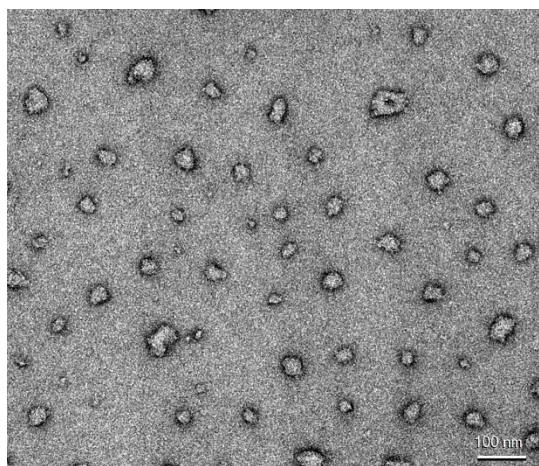


Рисунок 9 – Микрофотография ассоциатов ПЛ:ПМК = 1:1.

Согласно микрофотографии, ассоциаты ПЛ-ПМК имеют неправильную форму, размером 10-20 нм, но также наблюдаются отдельные частицы ~80 нм (не более 3%). Полученные амфифильные ассоциаты сополимеров ПЛ-ПМК были рассмотрены как синтетическая полимерная матрица для инкапсуляции гидрофобных наночастиц элементного бора. Предварительно частицы бора (5-15 нм, 5% масс.) были инкапсулированы в ПМК.

Используя такую концентрацию борных частиц в терапевтической композиции, возможно добиться значительного увеличения необходимой концентрации мишенного агента для бор-нейтронозахватной терапии 500 мкг в 0.01 г композиции ПМК-НЧ. Полученные

композиты на основе ПМК и НЧ бора ($C_{\text{бора}} = 5\%$ масс.) предварительно микронизировали для оценки содержания наночастиц бора в матрице полимера методом ЭС ДПТ, при этом оценивали содержание для 5 проб одного образца (таблица 6).

Таблица 6 – Оценка содержания наночастиц бора в 1.0 г ПМК: введенное количество бора: 5.0% масс.

№	Экспериментальное значение, мг
1	49.2
2	49.8
3	49.7
4	49.8
5	49.3

Измерения показали, что расхождение концентрации бора в ПМК между рассчитанной концентрацией бора на основании загруженной массы частиц, не превышает 2%. Наночастицы бора равномерно распределены в матрице ПМК, потерь частиц не наблюдается.

Синтез и изучение комплекса свойств ε -ПЛ-L-ПМК (1:1) в присутствии наночастиц бора проводили аналогично исследованиям, описанных в п.2.2.3. При изучении структуры полученных сополимеров с наночастицами бора не было выявлено никаких отличий с продуктами, которые получали без добавления частиц бора. Предполагается, что частицы будут распределены в гидрофобном ядре, в то время как внешняя оболочка будет поддерживать гидратационный барьер, который защищает целостность каждого ассоциата.

Для оценки эффективности инкапсуляции фракции бора 5-10 нм в матрицу ПЛ-ПМК оценили распределение наночастиц. Добавляли 5% масс. частиц бора в матрицу ПМК. Исследования проводили для порошковых систем, полученных после стадии очистки (см. п. 2.2.3.). Концентрация сополимеров ПЛ-ПМК (1:1): 1.0, 5.0, 10.0 мг, при этом теоретические концентрации бора составили: 24.5 мкг, 122.5 мкг, 245 мкг, соответственно. На рисунке 10 указаны загруженные концентрации наночастиц бора 5-15 нм в матрице, а также концентрации бора, определенные практическим путем, методом ЭС ДПТ.

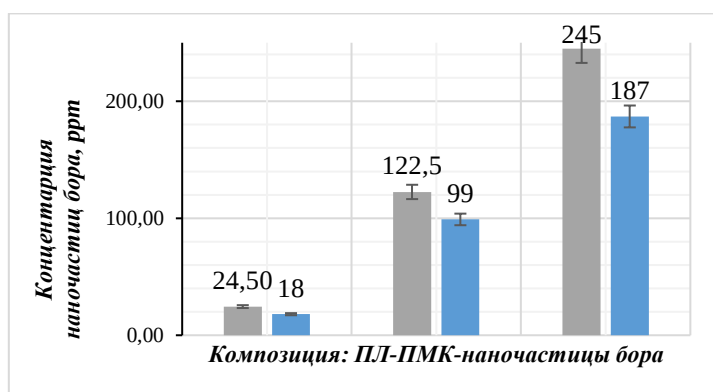


Рисунок 10 – Теоретическая и определенная концентрации наночастиц бора в композиции ПЛ-ПМК: серый – теоретическая, голубой – определена экспериментально.

Показано, что наночастицы бора эффективно инкапсулируются в матрицу сополимера ПЛ-ПМК, средний процент инкапсуляции составил: 63%.

Раздел 3.3. Радиобиологические испытания полимерных композиций на основе наночастиц бора в условиях БНЗТ

Препараты, которые разрабатываются для БНЗТ, должны избирательно доставлять бор в опухоли, не вызывая токсичности для нормальных клеток. Для оценки предварительной эффективности борсодержащего препарата для БНЗТ проводят тесты на цитотоксичность и тесты клеточного поглощения опухолевыми клетками. Чтобы подтвердить точность этих экспериментов, необходимо проводить сравнение с клиническим ВРА, терапевтическое поведение которого описано в многочисленных исследованиях. При самостоятельном исследовании ВРА важно оценивать сходимость полученных данных (в рамках одного эксперимента) с данными из предыдущих исследований.

Для определения токсичности нативных наночастиц бора и в составе полимерных композиций с помощью МТТ-теста, были выбраны линии клеток: U251 MG – клетки глиомы человека, U87 – клетки глиомы человека, G361 – клетки меланомы человека, T98G – клетки глиобластомы человека, BJ-5ta – фибробласты человека, которые активно используют в исследованиях по оценке токсичности борсодержащих препаратов и их ингибирующего эффекта в условиях БНЗТ.

В таблице 7 представлены обобщенные биологические свойства нативных наночастиц бора, а также в составе биосовместимых полимерных композиций.

Таблица 7 – Свойства наночастиц бора, а также наночастиц в составе полимерных композиций (сравнение с ВРА).

Система	Оценка цитотоксичности, МТТ тест	Накопление в клеточном материале
НЧ: • размер 5-15 нм, 20-50 нм, 50-70 нм; • концентрация: 50, 100, 250, 500, 1000 ppm.	не оказывают токсического действия, для отдельных линий пролиферация возросла на 5-10%.	Средний процент накопления наночастиц бора в клетках составил 92% (~20 нм).
ГК-НЧ: • размер 5-15 нм; • концентрация НЧ: 50, 100, 250, 500, 1000 ppm; • концентрация ГК: 0.3% масс.	не влияют на эффективность образования колоний и, соответственно, не приводят к снижению жизнеспособности клеток глиом, меланомы и глиобластомы человека	Средний процент накопления: 85-92%.
ГЭЦ-НЧ: • размер 5-15 нм; • концентрация НЧ: 50, 100, 250, 500, 1000 ppm; • концентрация ГЭЦ: 0.3% масс.		Средний процент накопления: 85-90%.
ВРА: • концентрация: 50, 100, 250, 500, 1000 ppm.	Жизнеспособность клеточных линий снижена до 40%.	Средний процент накопления: 30-40%.

На основании полученных результатов, было составлено заключение о том, что композиции на основе наночастиц бора и гиалуроновой кислоты, наночастиц бора и гидроксиэтилцеллюлозы, не оказывают токсического действия на раковые клеточные линии T98G, G361, U87, U251 MG, а также фибробласты BJ-5ta, в диапазоне концентраций от 50 до

1000 ppm, накапливаются в клетках в достаточных количествах за 24 ч инкубации (85-92%). Для фибробластов BJ-5ta и клеток меланомы кожи G361 выражено высокое накопление частиц бора в составе композиции с ГК. Вероятно, такой эффект основан на том, что ГК является составным компонентом внеклеточного матрикса кожи. Поэтому такие композиции могут быть эффективны для доставки частиц бора в опухоли с подкожной локализацией, меланомы различного типа.

3.3.2. Радиобиологические исследования полимерных композиций на основе наночастиц бора

Нейтронное облучение клеточных линий, инкубированных в среде, содержащей композиции с НЧ бора (5-15 нм, ^{10}B – 80%) при варьировании концентрации, а также контрольных клеток, проводили на ускорительном источнике эпитепловых нейтронов (г. Новосибирск). Параметры облучения: ток протонного пучка – 1.8 мА, энергия – 2.0 МэВ, время облучения – 60 минут, флюенс нейтронов – $6.5 \times 10^{11} \text{ см}^{-2}$. После облучения через 14 дней оценивали колониобразующую способность раковых клеточных линий с помощью клоногенного анализа (рисунок 11). В качестве сравнения использовали комплекс ВРА с фруктозой (^{10}B – 99%). В качестве контроля облучали интактные раковые клеточные линии.

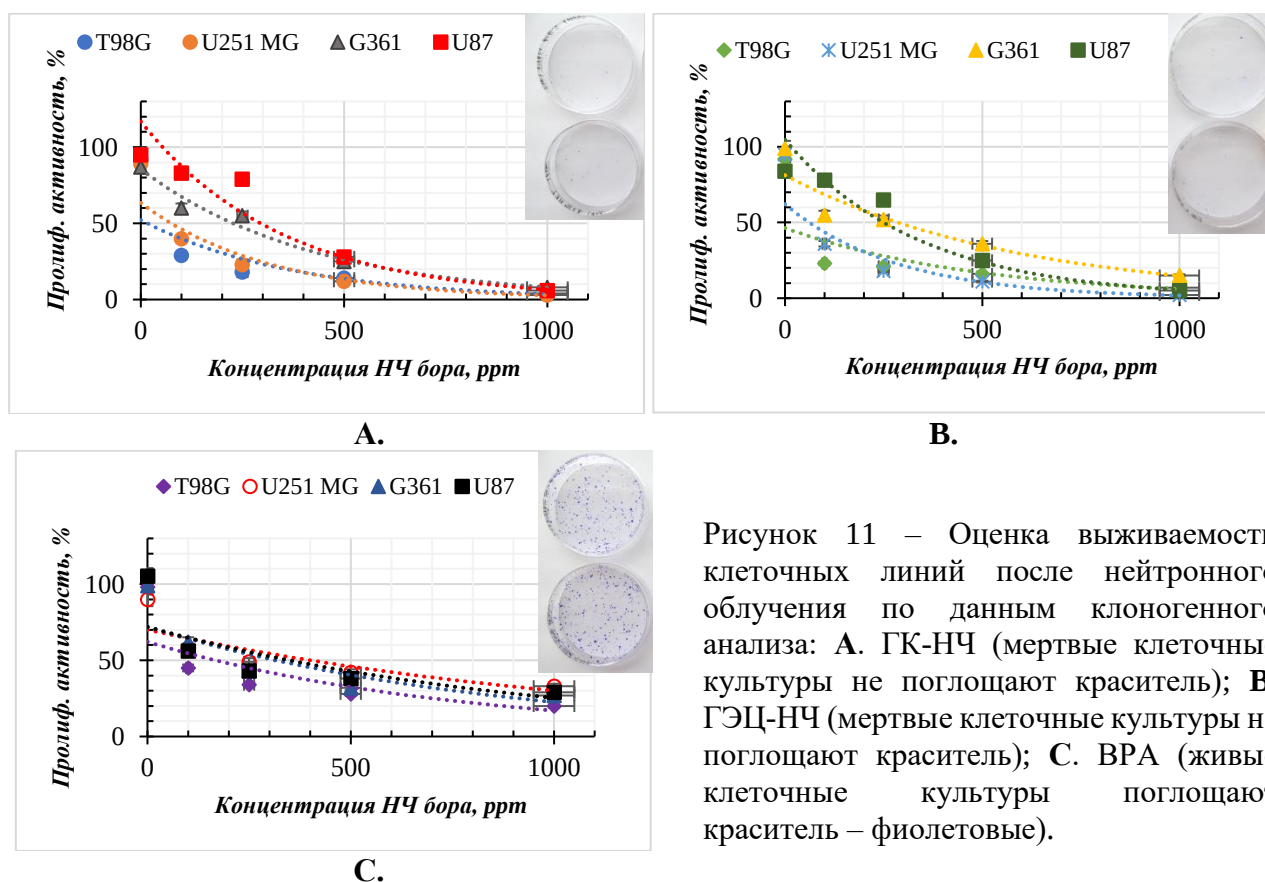


Рисунок 11 – Оценка выживаемости клеточных линий после нейтронного облучения по данным клоногенного анализа: А. ГК-НЧ (мертвые клеточные культуры не поглощают краситель); В. ГЭЦ-НЧ (мертвые клеточные культуры не поглощают краситель); С. ВРА (живые клеточные культуры поглощают краситель – фиолетовые).

По данным клоногенного теста установлено, что облучение нейтронами опухолевых клеточных линий, которые предварительно были инкубированы в среде с композициями, в составе которых наночастицы бора (5-15 нм), приводит к значительному подавлению их

жизнеспособности (выживаемость клеток снижена до 8%), по сравнению с контрольными клетками, которые не содержали борсодержащий препарат (выживаемость клеток составляет ~100%). Выживаемость клеток, которые облучали с ВРА составила более 20% после эксперимента при максимальных дозировках.

Оптимальные составы для экспериментов *in vivo*:

- ГК-НЧ бора: концентрация ГК: 0.3% масс., концентрация частиц бора: 1000 ppm (^{10}B – 800 ppm);
- ГЭЦ-НЧ бора: концентрация ГЭЦ: 0.3% масс., концентрация частиц бора: 1000 ppm (^{10}B – 800 ppm).

3.3.3. *In vivo* исследования полимерных композиций на основе бора

Для определения токсичности композиций на основе наночастиц бора и полимерных матриц *in vivo* (мыши CD-1) использовали следующие составы: ГК-НЧ (1000 ppm), ГЭЦ-НЧ (1000 ppm), ПЛ-ПМК-НЧ – 187 мкг бора в навеске 10.0 мг сополимера.

Изменение массы тела животных проводили согласно методике, описанной в п. 3.3.3 (рисунок 12).

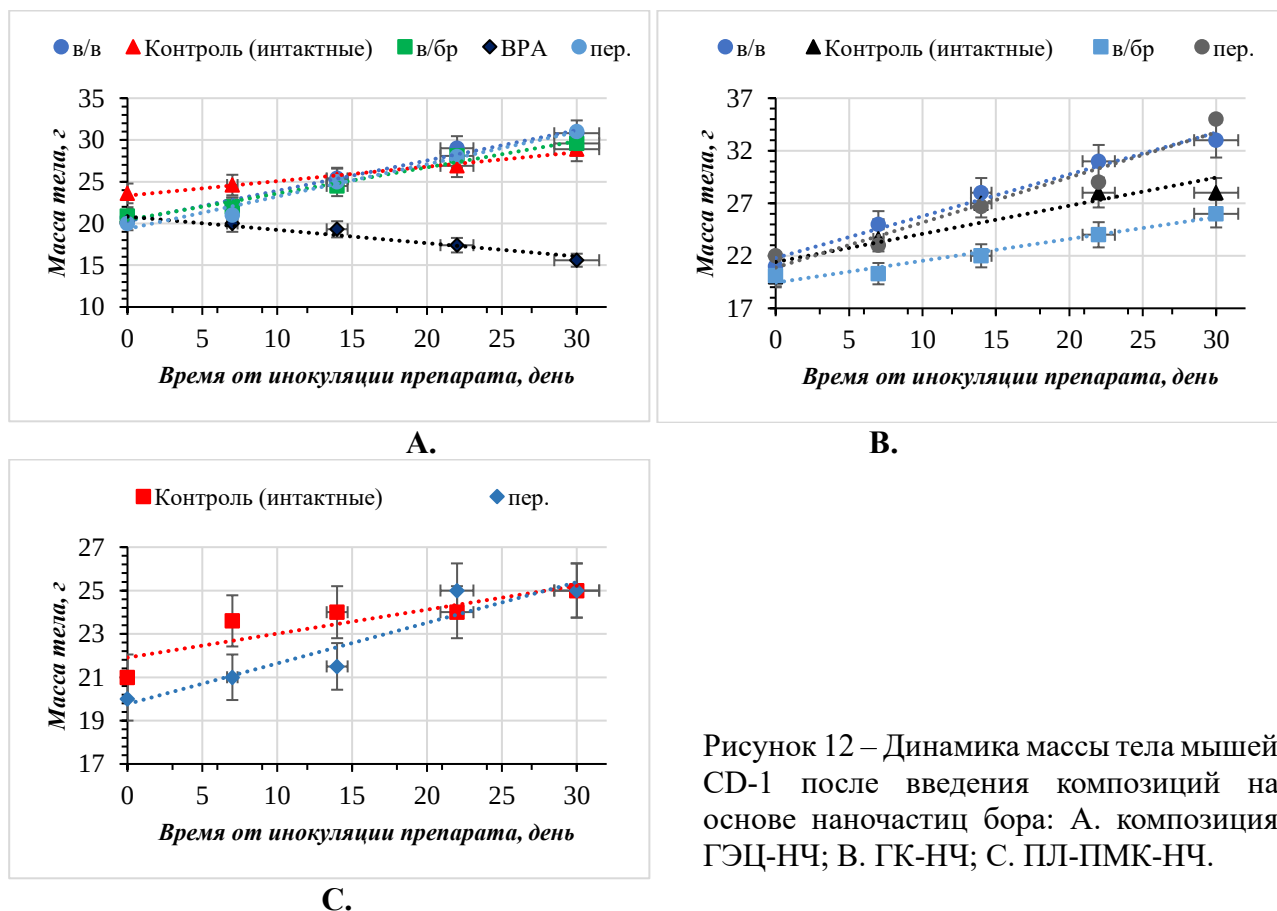
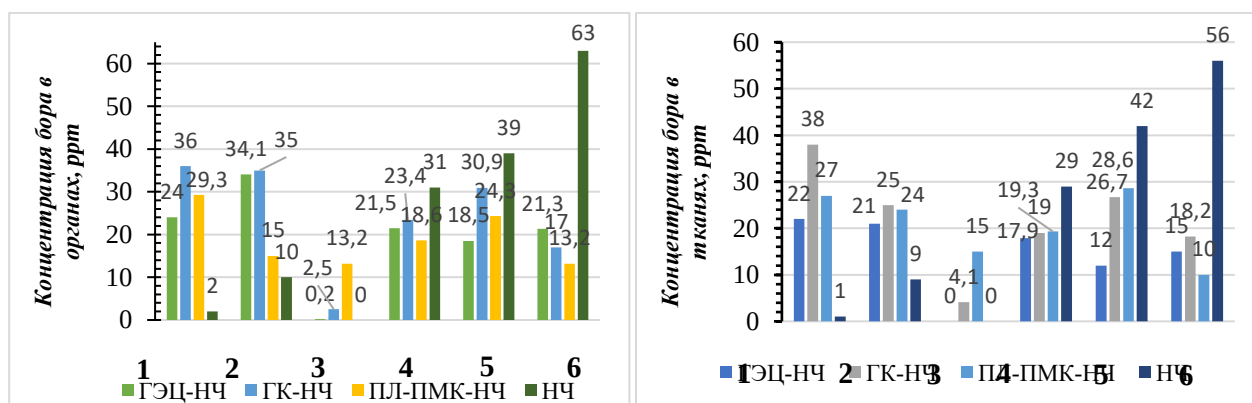


Рисунок 12 – Динамика массы тела мышей CD-1 после введения композиций на основе наночастиц бора: А. композиция ГЭЦ-НЧ; В. ГК-НЧ; С. ПЛ-ПМК-НЧ.

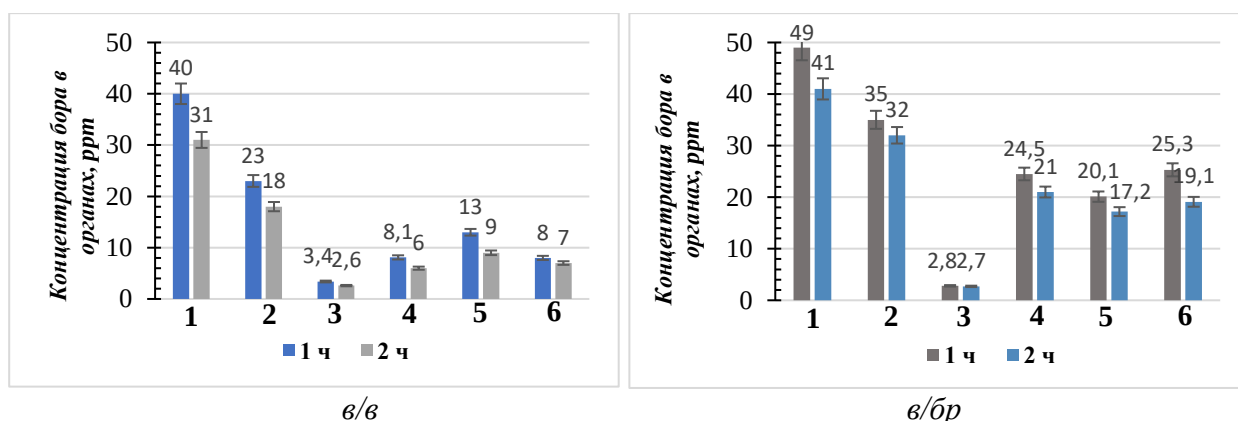
В ходе эксперимента не было отмечено каких-либо признаков токсического действия исследуемых НЧ ни в день инъекции, ни в дальнейших наблюдениях. Масса тела животных не снижалась и не отличалась от контрольной группы. При вскрытии (некропии) не наблюдалось

морфологических изменений внутренних органов. При внутривенном, внутрибрюшинном и пероральном введении ЛД₅₀, 100 не установлены. Все животные остались живы в течение всего срока наблюдения. Наночастицы бора в составе стабилизирующих систем не приводят к гибели животных, что может указывать на их низкую токсичность в исследуемом диапазоне концентраций.

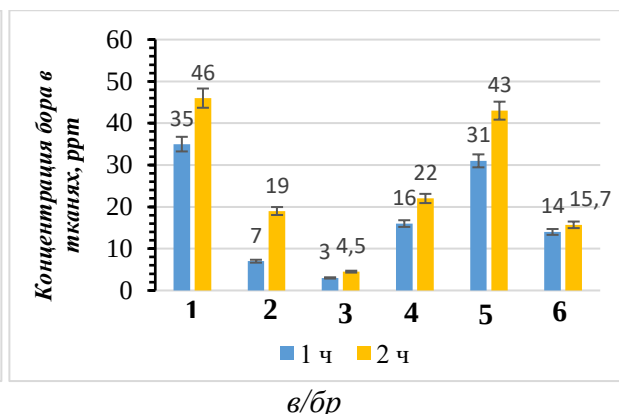
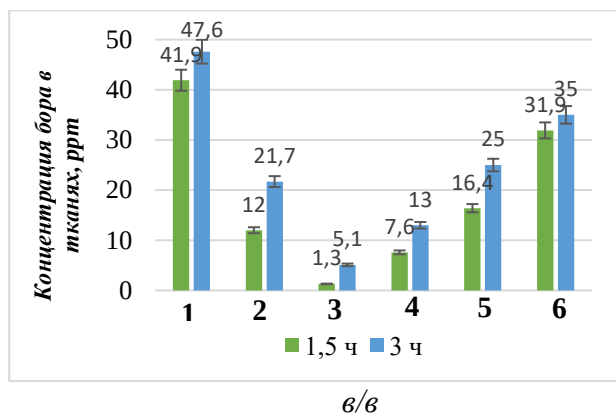
Для экспериментов *in vivo* (оценка биораспределения частиц) были установлены следующие параметры: тип введения – в/в, в/бр, перорально; композиции: НЧ бора в воде – 1000 ppm; ГК-НЧ (1000 ppm); ГЭЦ-НЧ (1000 ppm); ПЛ-ПМК-НЧ – 187 мкг в 10.0 мг сополимера; лабораторные животные: мыши CD-1, возраст 12 недель, с моделью ксенотрансплантата U87, для каждой системы (варьировали способ введения, полимер, концентрацию частиц) использовали 3 особи (n=3). Содержание бора в тканях анализировали методом ЭС ДПТ (рисунок 13).



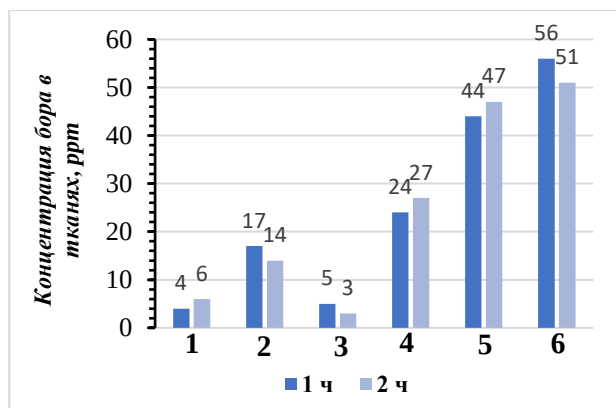
А.



В.



С.



в/в. D.

Рисунок 13 – Содержание бора в органах мышей через 1 и 2 ч после введения: А. Пер. введение композиций, сравнение. В. композиция ГЭЦ-НЧ бора; С. композиция ГК-НЧ; С. композиция ПЛ-ПМК-НЧ; D. наночастицы бора (1 – опухоль (средний вес 0.8 г), 2 – кровь, 3 – головной мозг, 4 – селезенка, 5 – печень, 6 – почки).

При исследовании биораспределения наночастиц бора без полимерной оболочки показано, что наибольшее накопление выражено в печени и почках. По литературным данным, частицы неорганической природы, сферической формы и менее 20 нм, активно накапливаются в печени, почках, селезенке. При использовании стабилизирующих полимерных матриц распределение бора меняется. На основании данных о накоплении частиц бора (5-15 нм) в модели *in vivo*, показано, что частицы достоверно накапливаются в пораженной области. При в/в, в/бр введении композиций ГЭЦ-НЧ в анализируемых дозах содержание бора во всех исследуемых органах было достоверно выше через 1 ч по сравнению с 2 ч, причем самые высокие значения наблюдались в тканях опухоли и крови. Для композиции ГК-НЧ содержание бора в органах возрастало к 2 часам циркуляции, высокое накопление наблюдалось в опухоли, печени. При сравнении перорального способа введения для трех композиций показано, что для всех трех композиций НЧ бора накапливаются в опухоли, однако, для ГК-НЧ и ПЛ-ПМК-НЧ накопление выше, чем для ГЭЦ-НЧ. Если оценивать в/в введение, то относительные соотношения опухоль/кровь в эксперименте с инкапсулированными частицами в ГК и ГЭЦ для временной точки 2 ч составляли довольно приемлемые значения, которые пригодны для методики БНЗТ: ГК-НЧ – $47.6/21.7 = 2.19$; ГЭЦ-НЧ – $31/18 = 1.72$. Стоит отметить, что при варьировании полимерной матрицы для инкапсуляции наночастиц бора, меняется и профиль накопления бора, что может быть связано с природой полимера. К примеру, композицию ГК-НЧ можно рассматривать как эффективный препарат для опухолей кожи или подкожной

локализации; композицию ГЭЦ-НЧ, ПЛ-ПМК-НЧ – для опухолей, локализованных в органах пищеварительной системы. Более точные представления о механизмах накопления бора в зависимости от типа стабилизирующей полимерной матрицы будут изучены в дальнейших исследованиях, что может послужить расширению спектра злокачественных образований, к котором возможно будет применить БНЗТ. При этом, необходимо варьировать типы опухолей, типы лабораторных животных.

3.3.4. Ветеринарная практика применения полимерных композиций, содержащих наночастицы бора в нейтронной захватной терапии

Проведены клинические исследования БНЗТ с композицией ГК-НЧ (500 ppm) на ветеринарном животном (кошка, 10 лет, 4 кг) с злокачественным образованием в полости носа, с тяжелым соматическим статусом: на фоне новообразования было затруднено дыхание. Ранее животное не подвергалось химиотерапии.

Дозировка композиции: 2 мл/кг массы тела, что в пропорционально количеству бора: 1000 ppm/кг. Параметры облучения и условия дозирования указаны в п.

Контроль регресса опухоли проводили с помощью МРТ исследований. На рисунке 14 показаны снимки, снятые с периодичность в 3 месяца.

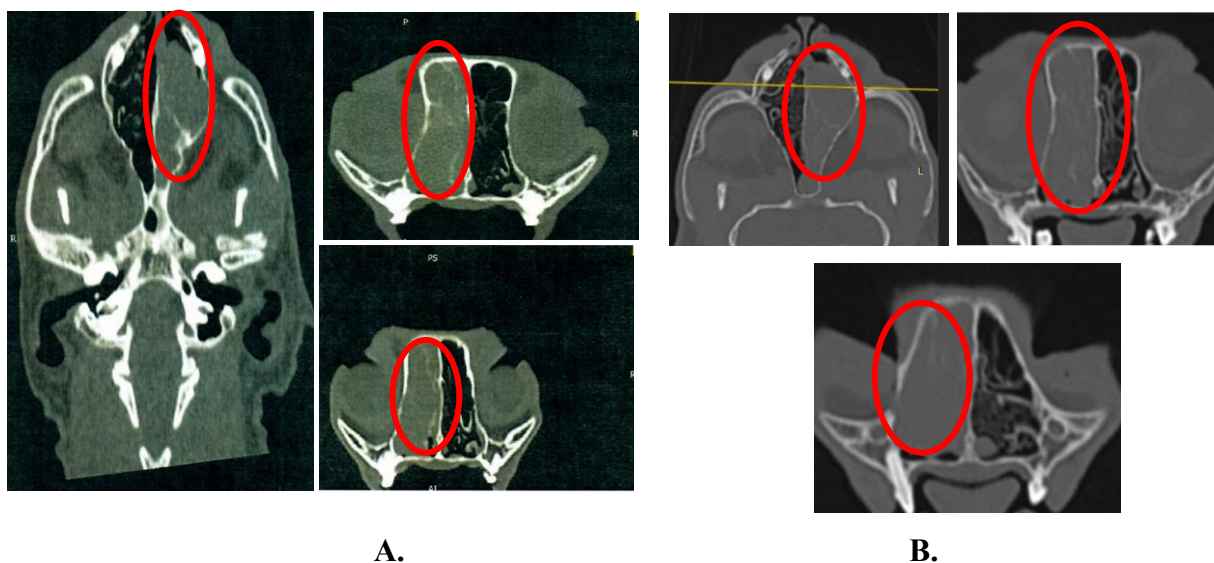


Рисунок 14 – Данные МРТ исследований носовой полости кошки: **А.** май 2023 г. (до облучения); **В.** август 2023 г. (после облучения).

По данным МРТ исследований, параметры опухоли в мае 2023 г. составили: 4.0x1.3x3.8 см; в августе: 3.0x1.4x3.6. Выражена значимая отрицательная динамика в росте опухоли, подтверждая ответ на лечение, проведенного в условиях БНЗТ. Было отмечено улучшения общей клинической картины животного, что прогнозируемо повлияет на качество и срок жизни. Не исключены и побочные реакции, которые выражены дерматитом, выпадение шерстяного покрова в местах облучения.

Предварительно полученная положительная динамика уменьшения роста опухоли

является предпосылкой к дальнейшим исследованиям на животных с вариативными типами злокачественных образований.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые составы полимерных композиций на основе полисахаридов (гиалуроновая кислота, гидроксиэтилцеллюлоза) и наночастиц элементного бора. Показана возможность получения ультрадисперсных фракций частиц бора менее 100 нм в условиях акустической кавитации в водной дисперсионной среде. С применением такого метода получения наночастиц бора количество примесей и посторонних включений минимизировано.
2. Предложенный состав композиций обеспечивает ключевые характеристики, такие как: коллоидную стабильность дисперсии частиц бора, отсутствие токсичности, биосовместимость, биодоступность, высокую эффективность в условиях радиобиологических испытаний.
3. Продемонстрирована возможность инкапсуляции наночастиц бора в синтетическую полимерную матрицу на основе ПМК, которая была синтезирована бескаталитической твердотельной дополиконденсацией. Показано изменение свойств ПМК при добавлении наночастиц бора на начальных этапах синтеза.
4. Впервые показана возможность получения привитых сополимеров поли-L-молочной кислоты и ϵ -полилизина с применением безрастворного импульсного механохимического подхода.
5. Проведено сравнение полимерных матриц относительно биораспределения, в которые были инкапсулированы наночастицы элементного бора. Показана высокая усваиваемость разработанных полимерных композиций на моделях *in vitro/in vivo*, что потенциально исключает использование больших терапевтических доз ^{10}B , при этом повышается возможность снизить токсическую нагрузку на организм, в сравнении с существующими клиническим препаратом – ВРА. Применение разработанных композиций в условиях нейтронного облучения обеспечило снижение жизнеспособности тестируемых биологических систем на ~90%.
6. Разработанные композиции имеют потенциал дальнейшего развития – возможность произвести модифицирование специфическими таргетными молекулами и повысить селективность к определенным типам опухолей. В свою очередь, предложенные в работе научно-технологические подходы будут способствовать расширению областей их применения.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Получение наночастиц элементного бора методом ультразвуковой обработки в водной среде и их применение в бор-нейтронозахватной терапии / С. А. Успенский, П. А. Хаптаханова, А. А. Заборонок и др. // ДАН – 2020. – Т.491. – С.20-24. (WoS, IF = 0.8).

2. Получение полимолочной кислоты методом твердотельной поликонденсации олигомеров. Влияние борного нанонаполнителя на конечные свойства полимера / П. А. Хаптаханова, Н. Б. Свищёва, Т. С. Куркин, С. А. Успенский // Известия АН. Серия химическая – 2021. – №9. – С. 1729-1735. (WoS, IF = 1.7).
 3. Наночастицы элементного бора, их получение и применение в бор-нейтронозахватной терапии рака / Успенский С.А., Хаптаханова П.А., Таскаев С.Ю., Заборонок А.А. // Медицинская физика – 2021. – №1. – 89. С. 56-57. (Перечень ВАК).
 4. Polymer-Stabilized Elemental Boron Nanoparticles for Boron Neutron Capture Therapy: Initial Irradiation Experiments / Alexander Zaboronok, Polina Khaptakhanova, Sergey Uspenskii [et al.] // Pharmaceutics – 2022. – №14. – 761.- P.1-18. (WoS, IF = 6.525).
 5. Наночастицы бора в химио- и радиотерапии: синтез, современное состояние и перспективы / С. А. Успенский, П. А. Хаптаханова // Известия АН. Серия химическая – 2022. – №12. – С. 2533-2560. (WoS, IF = 1.7).
 6. Chemical transformations during mechanoactivation of ϵ -Polylysine-Poly-L-lactic acid mixture / P. Khaptakhanova, S. Uspenskii, A. Aleksandrov, Yu. Ryzhykau, I. Okhrimenko // Journal of Applied Polymer Science – 2024. Принята к публикации. (WoS, IF = 3.0).
- Патенты:
7. Способ получения композиции для бор-нейтронозахватной терапии злокачественных опухолей (варианты) / Успенский С.А., Хаптаханова П.А., Заборонок А.А., Куркин Т.С., Зеленецкий А.Н., Селянин М.А., Таскаев С.Ю. // Патент РФ № 2720458. Опубликовано 10.12. 2020 г.
 8. Method of producing a composition for boron neutron capture therapy of malignant tumors (embodiments) / Uspenskij S.A., Haptahanova P.A., Zaboronok A.A., Kurkin T.S., Zeleneckij A.N., Selyanin M.A., Taskaev S.Yu. // China application patent no. CN114072656A filed on 2022 February 18.
 9. Способ получения нанопорошка элементного бора / Успенский С.А., Хаптаханова П.А. // Заявка на изобретение РФ №2023127730. Решение о выдачи патента от 20.03.2024 г.