

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ  
МАТЕРИАЛОВ ИМ. Н.С. ЕНИКОЛОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

*На правах рукописи*

**ПУЧКОВ АЛЕКСАНДР АНАТОЛЬЕВИЧ**

**ЗВЕЗДООБРАЗНЫЕ БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ НА ОСНОВЕ  
ЛАКТИДА ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ**

1.4.7 – Высокомолекулярные соединения (химические науки)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.ф.-м.н. Седуш Никита Геннадьевич

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>                                                                                                      | <b>4</b>  |
| <b>1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....</b>                                                                                         | <b>12</b> |
| 1.1 Современные подходы к синтезу и исследованию звездообразных сложных полиэфиров различного молекулярного строения..... | 17        |
| 1.1.1 Синтез звездообразных гомо- и сополимеров на основе лактида методом полимеризации с раскрытием цикла .....          | 22        |
| 1.1.2 Синтез $\mu$ -звезд на основе циклических сложных эфиров .....                                                      | 37        |
| 1.1.3 Методы исследования молекулярного строения и состава звездообразных сложных полиэфиров.....                         | 42        |
| 1.2 Влияние звездообразной структуры на физико-химические свойства полилактида ....                                       | 47        |
| 1.3 Основные области применения звездообразных полимеров на основе сложных полиэфиров.....                                | 55        |
| 1.3.1 Системы доставки лекарственных средств.....                                                                         | 55        |
| 1.3.2 Материалы для тканевой инженерии .....                                                                              | 65        |
| <b>2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>                                                                                    | <b>69</b> |
| 2.1 Реактивы и материалы .....                                                                                            | 69        |
| 2.2 Синтез звездообразных гомополимеров лактида.....                                                                      | 70        |
| 2.3 Карбоксилирование звездообразных поли-D,L-лактидов.....                                                               | 71        |
| 2.4 Синтез звездообразных амфифильных блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль.....                          | 72        |
| 2.5 Получение полимерных наночастиц и наносомальных форм противораковых препаратов.....                                   | 73        |
| 2.6 Определение антипролиферативной активности и внутриклеточного распределения наночастиц.....                           | 74        |
| 2.7 Исследование противоопухолевой эффективности наночастиц <i>in vivo</i> .....                                          | 76        |
| 2.8 Методы исследования.....                                                                                              | 76        |
| <b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>                                                                                  | <b>82</b> |
| 3.1 Синтез и исследование звездообразных гомополимеров лактида .....                                                      | 82        |
| 3.1.1 Полимеризация лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов ..                                          | 82        |

|                                             |                                                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.1.2                                       | Характеризация молекулярного строения и состава звездообразных полилактидов                                                             | 99         |
| 3.1.3                                       | Термические свойства и кристаллическая структура звездообразных полилактидов ..                                                         | 114        |
| 3.1.4                                       | Синтез и характеристика звездообразных поли-D,L-лактидов с концевыми карбоксильными группами .....                                      | 121        |
| 3.1.5                                       | Гидролитическая деградация звездообразных полилактидов .....                                                                            | 126        |
| 3.2                                         | Звездообразные блок-сополимеры лактида для систем доставки лекарственных средств .....                                                  | 141        |
| 3.2.1                                       | Синтез и характеристика амфифильных блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль .....                                         | 141        |
| 3.2.2                                       | Исследование влияния строения звездообразных блок-сополимеров на параметры наночастиц.....                                              | 145        |
| 3.2.3                                       | Получение и характеристика наночастиц, нагруженных противоопухолевыми соединениями .....                                                | 157        |
| 3.2.4                                       | Исследование цитотоксичности и внутриклеточного распределения наночастиц <i>in vitro</i> .....                                          | 165        |
| 3.2.5                                       | Сравнение эффективности действия и биораспределения оксалиплатина в свободной и наносомальной форме в эксперименте <i>in vivo</i> ..... | 168        |
| <b>ВЫВОДЫ.....</b>                          |                                                                                                                                         | <b>173</b> |
| <b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>                   |                                                                                                                                         | <b>175</b> |
| <b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....</b> |                                                                                                                                         | <b>176</b> |
| <b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>              |                                                                                                                                         | <b>178</b> |

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** В последнее время во многих областях человеческой жизни возрастает потребность в использовании полимерных изделий способных выполнять свою функцию в течение ограниченного времени. С точки зрения биомедицины биоразлагаемые сложные полиэфиры, в частности полилактид (PLA) и его сополимеры, являются одними из наиболее перспективных соединений, активно используемых в качестве шовных материалов, крепежных изделий, клеточных матриксов и систем доставки лекарств. Несмотря на широкое распространение, присущая PLA хрупкость, низкая ударная вязкость и прочность расплава может ограничивать его область применений. Для улучшения или модификации физико-химических свойств PLA в последнее десятилетие активно развивается направление синтеза его аналогов с разветвленным, в частности звездообразным, молекулярным строением. Добавление точки ветвления в структуру PLA приводит к изменению теплофизических, реологических и механических характеристик полимера, а также влияет на профиль его деградации. Большее количество концевых функциональных групп в звездообразных PLA по сравнению с линейными аналогами не только улучшает их растворимость, но и позволяет, например, проводить химическую модификацию сразу несколькими биологически активными соединениями, что является актуальным для решения задач тканевой инженерии и направленной доставки лекарственных средств (ЛС). Замена концевых групп на карбоксильные может ускорить процесс деградации сложных полиэфиров, а в случае с разветвленным PLA это открывает возможность создания иономеров, т.е. материалов, содержащих ионные кластеры и способных проявлять эффект «памяти формы». Таким образом, изучение влияния молекулярного строения, состава и типа концевых групп звездообразных PLA на их физико-химические характеристики является актуальной задачей, поскольку это позволит создавать материалы со свойствами необходимыми для конкретных биомедицинских задач.

Другим направлением, связанным с модификацией концевых групп

звездообразных PLA, является синтез их амфифильных блок-сополимеров полилактид-блок-полиэтиленгликоль (PLA-MPEG). Способность биосовместимых блок-сополимеров PLA-MPEG самоорганизовываться в водной среде в наночастицы может быть использована для солюбилизации и доставки ЛС в раковые клетки. Внедрение ЛС в полимерные наночастицы приводит к снижению их иммуногенности, повышению стабильности и времени циркуляции в организме человека. Кроме того, модификация макромолекул контрастирующими агентами позволяет визуализировать биораспределение наночастиц, а присоединение векторных лигандов может обеспечить их селективное связывание с рецепторами на поверхности раковых клеток. Это открывает возможность создания высокоселективных наносомальных форм ЛС на основе звездообразных блок-сополимеров PLA-MPEG.

**Степень разработанности темы.** Для достоверного определения взаимосвязи параметров макромолекул со свойствами полимеров, особенно в случае разветвленных систем, необходимо проводить их контролируемый синтез. Несмотря на многочисленные исследования одностадийной полимеризации лактида в присутствии 2-этилгексаноата олова (II) (октаноат олова,  $\text{SnOct}_2$ ), систематических данных по синтезу и характеристике 3-х, 4-х и 6-ти лучевых звездообразных PLA с молекулярной массой менее 50 кДа в литературе обнаружено не было. Кроме того, анализ литературных источников на предмет исследования гидролитической деградации звездообразных PLA показал, что существующие работы являются немногочисленными и ограничиваются изучением ранних сроков деградации, что послужило определяющим фактором при постановке задач данной работы.

Имеющиеся в современной литературе данные по самоорганизации блок-сополимеров PLA-MPEG в основном описывают получение дисперсионно устойчивых наночастиц в водной среде на основе линейных макромолекул. Развитие направления доставки ЛС в организме человека с применением звездообразных блок-сополимеров PLA-MPEG, как потенциально более

эффективных носителей, требует проведения комплексного исследования влияния их состава и строения на размер и морфологию наночастиц.

**Целью работы** является синтез звездообразных биоразлагаемых полилактидов с различной функциональностью концевых групп, в том числе модифицированных полиэтиленгликолем, изучение влияния строения и состава синтезированных полимеров на их физико-химические свойства, кинетику деградации и параметры получаемых на их основе наночастиц.

В работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Синтезировать и охарактеризовать серию 3-х, 4-х и 6-ти лучевых полилактидов с концевыми гидроксильными и карбоксильными группами, а также их звездообразных блок-сополимеров с метиловым эфиром полиэтиленгликоля.
2. Определить влияние числа лучей, их молекулярной массы и типа концевой группы на кинетику гидролитической деградации и физико-химические свойства синтезированных полилактидов.
3. Исследовать влияние параметров звездообразных блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль (PLLA-MPEG) на их самоорганизацию в водной среде.
4. Получить наночастицы на основе PLLA-MPEG, загруженные противораковыми препаратами и определить их эффективность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

**Научная новизна:**

1. Проведено систематическое исследование кинетики полимеризации L- и D,L-лактида в расплаве в присутствии мультифункциональных со-инициаторов триметилпропана (TMP), пентаэритрита (PTOL), дипентаэритрита (DPTOL).
2. Впервые методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) для звездообразных полилактидов были определены поправочные коэффициенты для пересчета молекулярной массы, определенной относительно полистирольных стандартов, в абсолютные значения.
3. Впервые определены профили гидролитической деградации при температуре

37 °С 3-х и 6-ти лучевых поли-L-лактидов (PLLA) с различной степенью кристалличности и поли-D,L-лактидов (PDLLA) с концевыми гидроксильными и карбоксильными группами.

4. Анализ самоорганизации звездообразных блок-сополимеров PLLA-MPEG показал, что метод нанопреципитации позволяет получать узкодисперсные наночастицы со средним размером 16 нм на основе полимеров со степенью полимеризации поли-L-лактидного блока 10.

5. Впервые была получена серия наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров PLLA-MPEG, содержащих противораковые комплексы Pt(IV) и Pt(II) (оксалиплатин), с высоким показателем эффективности загрузки. Продemonстрирована возможность одновременной солюбилизации наночастицами комбинации оксалиплатина и 5-фторурацила.

6. Разработана новая наносомальная форма оксалиплатина, обладающая более низким уровнем общей токсичности и повышенной терапевтической эффективностью в лечении карциномы толстой кишки.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В ходе работы были установлены кинетические закономерности полимеризации лактида в присутствии мультифункциональных спиртов, определены эффективные константы скорости этих реакций. Продemonстрирована возможность органокатализируемого синтеза 3-х лучевого PLA с высокой степенью конверсии мономера и функциональных групп со-инициатора. Исследовано влияние строения, молекулярной массы, степени кристалличности и природы концевых групп на скорость гидролитической деградации звездообразных PLA, что позволит на практике создавать материалы медицинского назначения с контролируемым сроком биоразложения.

Показано, что на основе звездообразных блок-сополимеров PLLA-MPEG могут быть получены биосовместимые наночастицы, способные солюбилизировать как гидрофильные, так и гидрофобные противораковые препараты. Эффективность действия разработанной наносомальной формы оксалиплатина была доказана в эксперименте *in vivo*, что делает ее перспективным

кандидатом для доставки ЛС в организме человека.

**Методология и методы исследования.** Методология работы заключалась в последовательном синтезе и характеристике звездообразных PLA и их блок-сополимеров PLLA-MPEG, установлении взаимосвязи строения и состава синтезированных полимеров с комплексом их физико-химических свойств, кинетикой деградации и самоорганизацией в водной среде. При выполнении данного исследования были использованы следующие основные инструментальные методы: ГПХ с тройным детектированием, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ), инфракрасная спектроскопия (ИК), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), термогравиметрический анализ (ТГА), рентгеновское рассеяние в больших и малых углах (МУРР), динамическое светорассеяние (ДСР), сканирующая (СЭМ) и просвечивающая (ПЭМ) электронная микроскопия.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Условия одностадийного синтеза 3-х, 4-х и 6-ти лучевых поли-L- и поли-D,L-лактидов в расплаве с узким молекулярно-массовым распределением (ММР) и минимальным содержанием побочных неразветвленных продуктов. Влияние структуры мультифункциональных со-инициаторов на кинетику полимеризации лактида.
2. Взаимосвязь строения и состава звездообразных PLA с их теплофизическими свойствами и скоростью гидролитической деградации.
3. Влияние параметров амфифильных звездообразных блок-сополимеров PLLA-MPEG на размер и морфологию наночастиц.
4. Антипролиферативная активность полимерных наночастиц, загруженных комплексами Pt(IV) и Pt(II), а также комбинацией последнего с 5-фторурацилом, по отношению к здоровым и раковым клеткам *in vitro*.
5. Противоопухолевая активность и биораспределение наносомальной лекарственной формы оксалиплатина *in vivo*.

**Личный вклад автора.** Автор принимал участие в постановке цели и задач исследования, непосредственно проводил эксперименты, связанные с синтезом и модификацией исследуемых полимеров, изучением их деградации и получением наночастиц загруженных ЛС. Автор занимался подготовкой и оформлением научных публикаций, докладывал результаты работы на конференциях. Проводил исследования образцов методами ГПХ с тройным детектированием, ДСР и МУРР, занимался обработкой и интерпретацией данных спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии, ТГА, ДСК, а также *in vitro* и *in vivo* исследований.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов работы подтверждается использованием в своей основе общепринятых подходов и методик исследования, использованием современного оборудования прошедшего своевременные поверки, а также воспроизводимостью полученных результатов в повторных экспериментах. Результаты работы прошли строгое рецензирование и были опубликованы в журналах индексируемых в базах данных «Web of Science» и «Scopus».

**Апробация работы.** Результаты работы были опубликованы в 9 тезисах и представлены в виде стендовых и устных докладов на следующих научных конференциях: 63-я и 64-я Всероссийская научная конференция МФТИ (г. Москва, 2020, 2021), VIII Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры в стратегии научно-технического развития РФ «Полимеры-2020» (г. Москва, 2020), VIII и IX Бакеевская международная конференция «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты» (г. Москва, 2020, 2023), III Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (г. Казань, 2021), IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (г. Москва, 2022), Молодежная конференция «Тканеинженерные конструкции и материалы для биомедицины» (г. Санкт-Петербург, 2022), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов - 2023» (г. Москва, 2023).

По материалам диссертационного исследования были опубликованы 6 статей в журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в базах данных «Web of Science» и «Scopus».

1. Synthesis and characterization of well-defined star-shaped poly(L-lactides) / **A. A. Puchkov**, N. G. Sedush, A. I. Buzin, T. N. Bozin, A. V. Bakirov, R. S. Borisov, S. N. Chvalun // Polymer. – 2023. – Vol. 264. – P. 125573(1-11).

2. Синтез биоразлагаемых полимеров на основе L-лактида в присутствии безметаллового органического катализатора / **А. А. Пучков**, Н. Г. Седуш, А. С. Чиркова, Т. Н. Бозин, С. Н. Чвалун // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. – 2023. – Т. 65. – № 4. – С. 265-274.

3. Физико-химические характеристики и антипролиферативная активность водорастворимой наносомальной формы комплекса  $Pt^{IV}$  с лигандом на основе лонидамина / **А. А. Пучков**, Н. Г. Седуш, А. А. Назаров, С. Н. Чвалун // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2024. – Т. 73. – № 1. – С. 213-220.

4. Линейные и разветвленные полимеры лактида для систем направленной доставки лекарственных средств / В. И. Гомзяк, Н. Г. Седуш, **А. А. Пучков**, Д. К. Поляков, С. Н. Чвалун // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. – 2021. – Т. 63. – № 3. – С. 190-206.

5. Наносомальные лекарственные формы на основе биоразлагаемых сополимеров лактида с различной молекулярной структурой и архитектурой / Н. Г. Седуш, Ю. А. Кадина, Е. В. Разуваева, **А. А. Пучков**, Е. М. Широкова, В. И. Гомзяк, К. Т. Калинин, А. И. Кулебякина, С. Н. Чвалун // Российские нанотехнологии. – 2021. – Т. 16. – № 4. – С. 462-481.

6. Synthesis and electrospinning of star-shaped poly(L-lactide) with different arm lengths / **A. A. Puchkov**, T. K. Tenchurin, V. G. Mamagulashvili, A. D. Shepelev, K. T. Kalinin, Yu. A. Kadina, R. A. Kamyshinsky, N. G. Sedush, S. N. Chvalun // Journal of Physics: Conference Series. – 2019. – Vol. 1347. – P. 012098(1-7).

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их

обсуждений, выводов и списка литературы. Работа изложена на 199 страницах печатного текста, содержит 84 рисунка, 14 таблиц и 197 ссылки на источники литературы.

## 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

По статистике 2017 года с 1950 по 2015 год было произведено около 8,3 млрд тонн пластика [1]. Только 9% из них были переработаны, а большая часть (почти 79%) превратилась в мусор и продолжает накапливаться в окружающей среде. По оценкам специалистов, если не будут приняты меры по рациональному использованию полимерных материалов, то к 2050 г. объем пластиковых отходов составит 12 млрд тонн. При этом ежегодно в реки, озера и океаны выбрасываются миллионы тонн пластиковых отходов, формирующих при этом огромное количество микро/нанопластика, наносящего серьезный ущерб глобальной экосистеме и представляющего потенциальную угрозу для здоровья человека [2]. Для решения этих проблем, связанных с пластиковыми отходами, и обеспечения здоровьесбережения современного общества существует необходимость в поиске альтернативных материалов, которые были бы экологически безвредными, нетоксичными и обладали бы приемлемыми механическими свойствами. Поэтому последнее время внимание многих научных групп по всему миру направленно на разработку и исследование отдельной группы полимеров – биопластиков. Основными преимуществами биопластиков по сравнению с полиолефинами является их биосовместимость, способность к биоразложению и преимущественное получение из возобновляемых природных ресурсов. На сегодняшний день наиболее производимыми биопластиками являются полилактид, полигидроксиалканат, полибутиленсукцинат и полимеры на основе крахмала и целлюлозы [3].

PLA является термопластичным сложным полиэфиром, способным разлагаться до олигомеров молочной кислоты, а в пределе до углекислого газа и воды. Благодаря физико-химическим свойствам PLA рассматривают как наиболее предпочтительную замену традиционным пластикам, при этом с 2011 по 2020 год мировое производство PLA увеличилось с менее чем 200 тыс. т/год до примерно 800 тыс. т/год [4]. PLA может быть синтезирован на основе двух типов мономеров, а именно молочной кислоты и ее циклического димера – лактида.

Молочная кислота (МК), известная также как 2-гидроксипропионовая кислота, является широко распространенной в природе альфа гидроксикислотой. Благодаря наличию хирального центра на втором атоме углерода молекула имеет две различные конфигурации - L (+) – и D (-) – форму (Рисунок 1.1). L-МК участвует в метаболизме всех животных и микроорганизмов и, таким образом, является абсолютно нетоксичным продуктом деградации полилактида. При смешивании равных количеств L-МК и D-МК образуется рацемическая смесь. Несмотря на сходство физико-химических свойств двух оптических изомеров, их биологические свойства сильно отличаются [5, 6]. По сравнению с L-МК высокие концентрации D-МК и их рацемической смеси вредны для организма человека.

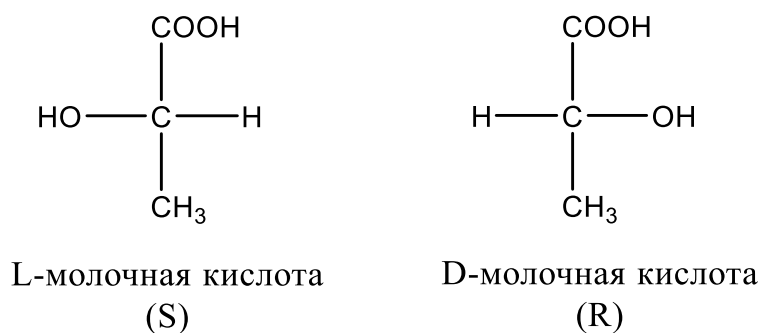


Рисунок 1.1 – Энантиомерные формы молочной кислоты

Получение МК подразделяется на синтетический и ферментативный способы. Химический синтез МК осуществляется по лактонитрильному пути. В прошлом веке этот способ широко применялся в Sterling Chemicals Tnc. в США и Musashino Chemical Co. в Японии [7]. В целом методику можно разделить на два основных этапа (Рисунок 1.2). На первой стадии жидкий ацетальдегид и цианистый водород при низкой температуре и атмосферном давлении закачивают в реактор в присутствии основного катализатора [8], впоследствии получая лактонитрил по реакции присоединения. На втором этапе в реактор добавляют разбавленную серную кислоту для получения МК с выделением сульфата аммония. Образовавшуюся молочную кислоту отгоняют вакуумной перегонкой и направляют в следующую секцию для дальнейшей очистки.

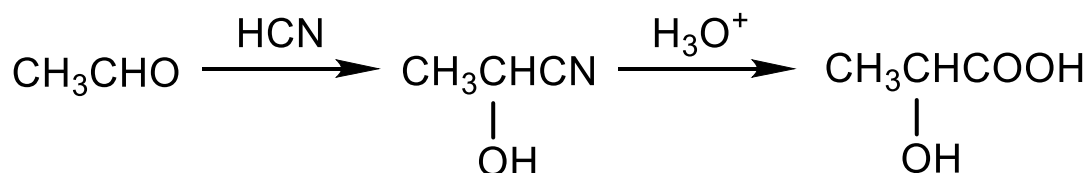


Рисунок 1.2 – Схема синтетического метода получения молочной кислоты из уксусного альдегида

Однако при данном подходе в качестве исходного реагента используется цианистый водород, который сам по себе является ядовитым веществом, представляющим опасность даже в минимальном количестве. В 2013 году Chaudhari с соавт. [9] исследовали возможность получения МК из глицерина с использованием ряда катализаторов на основе металлов (Pt, Pd, Rh, Ru, Cu, никель и кобальт Ренея) при относительно низкой температуре (115-160 °С). Было установлено, что катализатор Pt/C позволяет получать МК и некоторые линейные спирты с селективностью более 95%, что является преимуществом химического способа получения молочной кислоты. Однако в настоящее время менее 10% МК получают методом химического синтеза по двум основным причинам. С одной стороны, химический синтез относительно сложен, что приводит к увеличенному потреблению различных ресурсов в промышленном производстве. С другой стороны, химический синтез в настоящее время не позволяет контролировать получение хиральных стереоизомеров МК, что также считается недостатком этого метода [4].

На сегодняшний день более 90% молочной кислоты производится промышленным способом путем бактериальной ферментации с использованием не только различных субстратов, таких как кукуруза, картофель, свекла, тростниковый сахар, молочные продукты, но даже из отходов сельскохозяйственного производства. Обычно для этого процесса используются такие бактерии, как *Bacillus acidilacti*, *Lactobacillus delbueckii* или *Lactobacillus bulgaricus* [10]. По сравнению с химическим синтезом этот метод позволяет селективно получать L- и D-форму молочной кислоты, при этом выход целевого продукта может достигать 99.4% в зависимости от выбранного штамма бактерий

[11].

С точки зрения уменьшения стадий в процессе получения полилактида прямая поликонденсация молочной кислоты с использованием кислотных катализаторов является наиболее простым способом получения PLA. Однако в ходе реакции поликонденсации выделяется вода в виде побочного продукта, которую необходимо удалять из реакционной смеси во избежание быстрого достижения равновесия реакции полимеризации и деполимеризации. По мере протекания реакции с ростом цепей PLA вязкость системы постепенно увеличивается, затрудняя отгонку воды, что приводит к формированию макромолекул с молекулярной массой (ММ) не превышающей 50 кДа [6]. Для решения этой проблемы научными группами Ajoaka и Kimura были разработаны несколько новых подходов, а именно так называемая «melt/solid-state» и азеотропная поликонденсация молочной кислоты [12–14]. В результате молекулярная масса образующегося полилактида была увеличена до  $\approx 300$  кДа, однако эти методы обладают рядом факторов, ограничивающих их распространение: широкое молекулярно-массовое распределение, необходимость использования растворителей, сложного комплексного синтетического подхода и жесткие условия реакции, не позволяющие в целом синтезировать PLA с ММ более 500 кДа.

Как было сказано ранее, альтернативным мономером для синтеза PLA является лактид — циклический димер молочной кислоты. Посредством полимеризации с раскрытием цикла (ROP) лактида возможно получать высокомолекулярный продукт, проводя реакцию, как в растворе, так и в расплаве мономера. Лактид является шестичленным сложным эфиром, который получают путем олигомеризации молочной кислоты (не более 4 кДа) с последующим актом каталитической деполимеризации под вакуумом или в инертной атмосфере при температуре 180–220 °С. Условия этого процесса специально выбраны так, чтобы предотвратить преждевременную полимеризацию циклического мономера. В зависимости от изомерии используемой молочной кислоты, образующийся в ходе димеризации лактид может иметь три оптических изомера: два с одинаковой конфигурацией хиральных атомов в молекуле (L- и D-лактид), и один с разной —

мезо-лактид (Рисунок 1.3). При эквимольном смешении двух энантиомеров образуется их рацемическая смесь, так называемый D,L-лактид, обладающий повышенной температурой плавления порядка 126 °С [15]. Различные изомеры лактида мало отличаются друг от друга по физико-химическим свойствам, но существенно влияют на свойства продуктов полимеризации, например, на механические свойства, скорость кристаллизации и деградации и т.д.

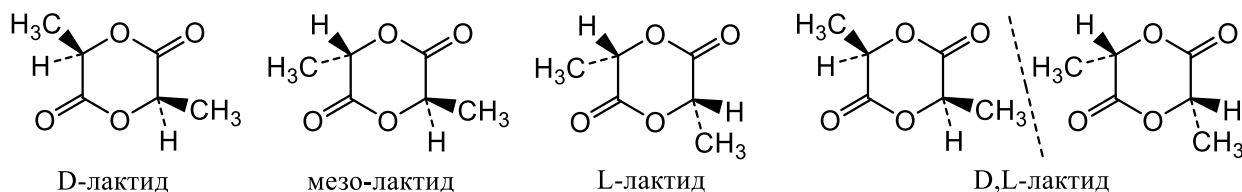


Рисунок 1.3 – Структурные формулы различных изомеров лактида

По сравнению с поликонденсацией в процессе ROP не происходит выделение воды, поэтому этот метод больше подходит для получения высокомолекулярного PLA. При полимеризации гомохиральных лактидов будут формироваться изотактические макромолекулы, способные к кристаллизации, а именно поли-L-лактид и поли-D-лактид (PDLA), соответственно. Материалы на основе этих полимеров обладают высокими механическими показателями. Раскрытие циклов в рацемической смеси приведет уже к образованию аморфного атактического поли-D,L-лактида, обладающего более высокой скоростью деградации и лучшей растворимостью по сравнению с кристаллическими аналогами. Общая схема получения PLA из молочной кислоты представлена на Рисунке 1.4. На сегодняшний день существует множество катализаторов, которые могут быть использованы для ROP, при этом в соответствии с механизмом можно выделить металлический, катионный, анионный, органический и ферментативный катализ [16]. Каждый из приведенных механизмов обладает своим рядом преимуществ и недостатков, которые, в конечном счете, отражаются и на свойствах продукта полимеризации. Кроме того, на физико-химические свойства PLA может оказывать влияние не только стереорегулярность и молекулярная масса полимерных цепей, но и их молекулярное строение. В последнее время все больший интерес среди

научных групп по всему миру вызывают разветвленные аналоги PLA, в частности звездообразные, способные проявлять уникальные реологические и механические свойства [17]. Регулируя на этапе синтеза молекулярное строение и состав макромолекул возможно контролируемо получать материалы на основе PLA и его сополимеров со свойствами, подходящими для широкого спектра биомедицинских применений. Для достижения этой цели необходимо детально рассмотреть подходы к синтезу звездообразных сложных полиэфиров, а также методы исследования их строения и состава.

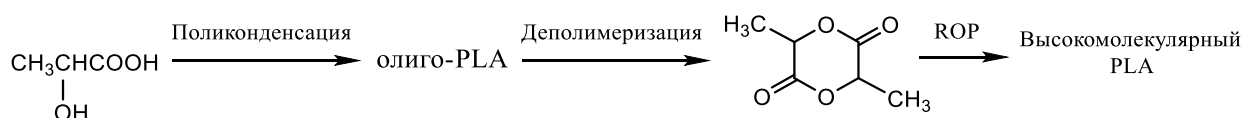
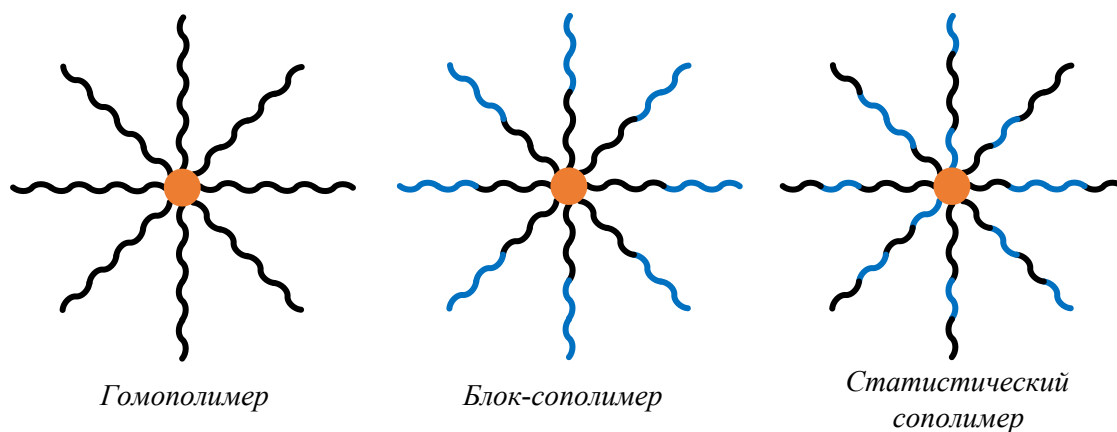


Рисунок 1.4 – Схема получения высокомолекулярного полилактида из молочной кислоты

### 1.1 Современные подходы к синтезу и исследованию звездообразных сложных полиэфиров различного молекулярного строения

Синтез макромолекул со сложным молекулярным строением и настраиваемой функциональностью является актуальным для решения современных задач биомедицины. Согласно номенклатуре IUPAC звездообразные полимеры являются подклассом разветвленных полимеров и характеризуются наличием одной точки ветвления, которая дает начало трем и более линейным цепям (лучам) [18]. Определяющим фактором числа полимерных лучей, формирующихся в процессе синтеза, является функциональность центральной точки ветвления, чаще всего именуемой «ядром» макромолекулы. По большей части звездообразные полимеры можно разделить на две категории: к первой можно отнести звезды, имеющие идентичный состав лучей (гомо-/со- и блок-сополимеры), вторая категория включает в себя так называемые «miktoarm» звезды (μ-звезды), характеризующиеся наличием разных по химическому составу или молекулярной массе лучей (Рисунок 1.5).

## (а) Звездообразные полимеры с аналогичным составом лучей



## (б) «miktoarm» звездообразные полимеры отличающиеся:

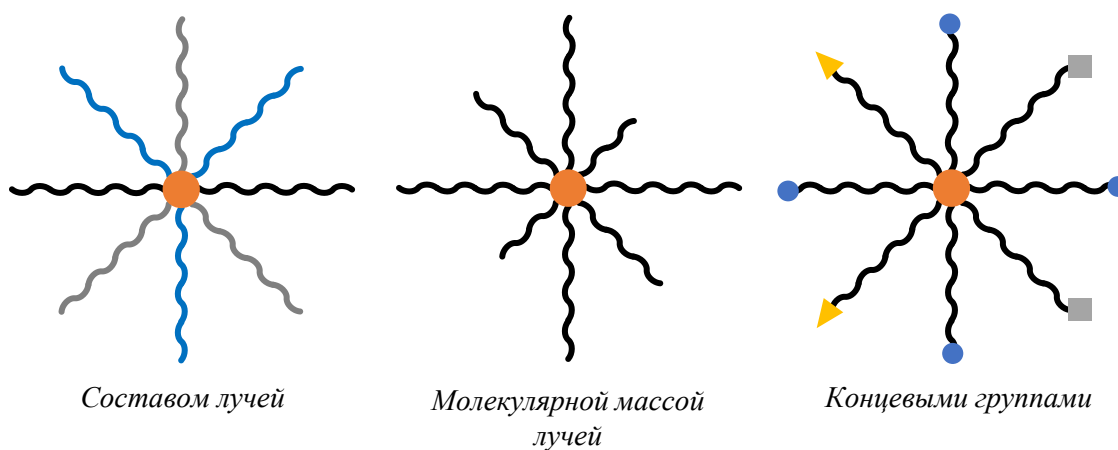


Рисунок 1.5 – Классификация звездообразных полимеров

Несмотря на значительное многообразие вариантов молекулярного строения звездообразных полимеров и соответствующих им синтетических подходов, они могут быть поделены на три основных метода: «core-first», «arm-first», и «grafting-onto». Выбор определенного метода зависит от необходимых свойств и целевого применения звездообразного полимера, поскольку каждый из синтетических подходов обладает своими преимуществами и недостатками. Достижения в области методов контролируемой/живой полимеризации значительно расширили возможности получения звездообразных полимеров с контролируемым молекулярным строением и концевыми группами, что позволяет с высокой степенью достоверности изучать взаимосвязь структуры макромолекул со свойствами материалов на их основе. В частности, контролируемая радикальная полимеризация произвела революцию в синтезе сложных полимерных архитектур,

включая звездообразные полимеры, благодаря контролю над активностью концевых групп и молекулярно-массовым распределением [19].

Ключевым аспектом метода «core-first» является дивергентная полимеризация мономера, т.е. параллельный рост полимерных лучей, на предварительно синтезированном мультифункциональном инициаторе – ядре (Рисунок 1.6). В данном методе важным условием получения образцов с заданным молекулярным строением и низкой дисперсностью лучей по длинам является одинаковая реакционная способность функциональных групп молекулы ядра. Кроме того, используемый механизм полимеризации должен обеспечивать значительное превышение скорости инициирования полимеризации над скоростью роста цепей. Благодаря тому, что методы контролируемой/живой полимеризации удовлетворяют этим требованиям, с использованием различных комбинаций мономеров и инициаторов были синтезированы звездообразные полимеры с высоким уровнем контроля над молекулярным строением и составом концевых групп [19]. Главным преимуществом метода «core-first» является его одностадийность и хороший выход целевого продукта, который обеспечивается легкостью выделения самого звездообразного полимера из реакционной смеси и очищения от остатков мономера, низкомолекулярных примесей и катализатора путем простого переосаждения. К числу недостатков данного метода можно отнести отсутствие простой возможности характеристики как длины полимерных лучей, так и их дисперсности. Для этого используются специальные методы, включающие анализ концевых групп, параметров разветвления, а также анализ полимерных цепей после их «отрыва» от молекулы ядра.

В отличие от предыдущего подхода, метод «arm-first» предполагает образование звездообразных структур путем связывания заранее синтезированных линейных молекул за счет реакций полимеризации или присоединения (Рисунок 1.7). В соответствии с механизмом связывания можно выделить три типа активных центров линейных макромолекул: концевые иницирующие фрагменты, способные к полимеризации функциональные группы или короткие сшивающиеся блочные сегменты.

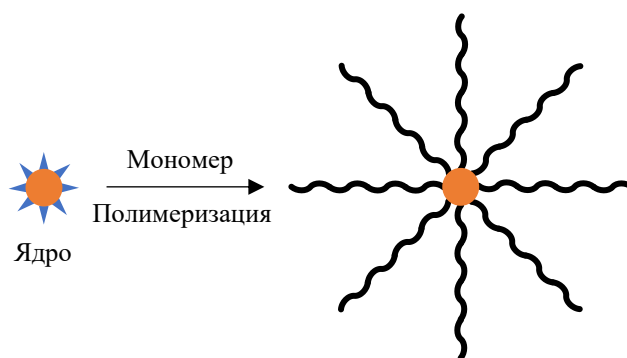


Рисунок 1.6 – Схема получения звездообразных полимеров по методу «core-first»

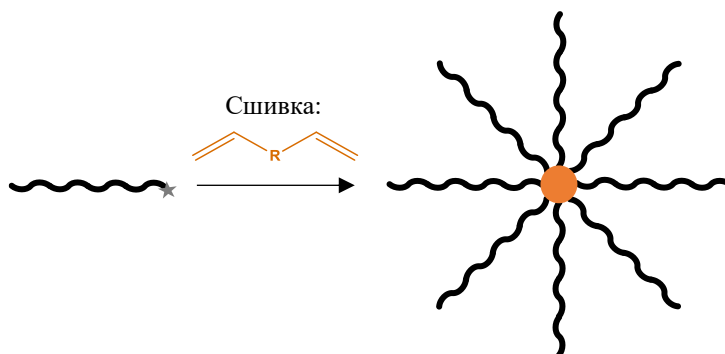


Рисунок 1.7 - Схема получения звездообразных полимеров по методу «arm-first»

Методы контролируемой/живой полимеризации, позволяющие получать линейные функциональные полимеры с заданной микроструктурой, оказались идеальными для синтеза лучей для звездообразных макромолекул. Низкая дисперсность лучей является неоспоримым преимуществом данного метода над методом «core-first». Однако образцы, полученные методом «arm-first», могут характеризоваться более широким распределением по числу лучей, в отличие от подходов «core-first» и «grafting-onto». Это связано с большим числом факторов, оказывающих влияние на процесс формирования сшитого ядра, включая степень полимеризации и химический состав линейных прекурсоров, природу самого сшивающего агента, мольное соотношение реагентов и т.д [20]. Кроме того, из-за специфики синтеза нередко имеет место неполная степень превращения линейных молекул в лучи, присоединенные к ядру, из-за чего приходится прибегать к таким методам очистки искомого продукта от побочных примесей, как хроматография или диализ. Несмотря на это, метод «arm-first» находит свое применение, поскольку позволяет синтезировать звездообразные полимеры с высокой молекулярной массой и количеством лучей, при этом масса сшитого ядра может

достигать 30 масс.% от всей макромолекулы. В данном случае объемное ядро может быть использовано для загрузки функциональных соединений посредством ковалентных связей [21] и/или межмолекулярных взаимодействий [22], что делает эти полимеры перспективными для использования в различных отраслях биомедицины, в частности для систем доставки ЛС.

Среди всех трех подходов к синтезу звездообразных полимеров, метод «grafting-onto» характеризуется наибольшим уровнем структурного контроля, так как синтез и характеристика ядра и лучей происходит независимо друг от друга до этапа их ковалентного связывания. В результате общая схема синтеза звездообразных макромолекул по методу «grafting-onto» включающего в себя взаимодействие мультифункционального ядра с линейными полимерами, содержащими комплементарные концы, представлена на Рисунке 1.8. Звездообразные полимеры, полученные этим методом, обычно имеют невысокое число лучей (обычно 4-8) и малый размер ядра. Увеличение же функциональности и молекулярной массы лучей может привести к возникновению стерических затруднений препятствующих полной конверсии функциональных групп и приводящих к уширению ММР полимера. Как и метод «arm-first», данный подход позволяет не только синтезировать звездообразные молекулы с низкой дисперсностью по длинам лучей, но и предлагает относительно простой способ получения  $\mu$ -звезд за счет использования в качестве прекурсорных лучей линейные макромолекулы различной природы, имеющих уникальный комплементарный конец цепи, способный присоединиться к мультифункциональному ядру.

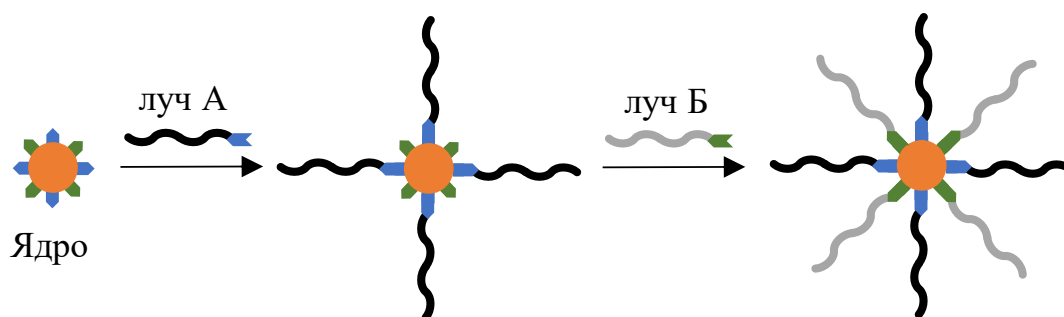


Рисунок 1.8 – Схема получения звездообразных полимеров по методу «grafting-onto»

### 1.1.1 Синтез звездообразных гомо- и сополимеров на основе лактида методом полимеризации с раскрытием цикла

Как уже было сказано ранее, для осуществления реакции раскрытия цикла лактидов и лактонов с последующей их полимеризацией используют различные инициаторы и каталитические системы. Что касается катионной полимеризации, то посредством скрининга различных кислотных соединений в 1986 году группой Kricheldorf было показано, что трифторметансульфоновая и метилтрифторметансульфоновая кислота могут эффективно инициировать полимеризацию L-лактида [23]. Спектроскопия ЯМР показала, что концевой группой полимера является метиловый сложный эфир, что свидетельствует о том, что полимеризация протекает через разрыв алкокси-связи мономера (O-CH). В результате, катионный механизм заключается в протонировании или алкилировании карбонильного O-атома с последующим электрофильным активированием связи O-CH. Образующийся трифторметансульфонат ( $\text{F}_3\text{CSO}_3\text{-R}$ ) работает как активный центр реакции роста цепи, раскрывая последующие молекулы L-лактида с формированием полимерной макромолекулы (Рисунок 1.9). Однако при температурах выше 50 °C интенсифицируется процесс рацемизации, что может привести к нежелательным изменениям в физико-химических свойствах материала.

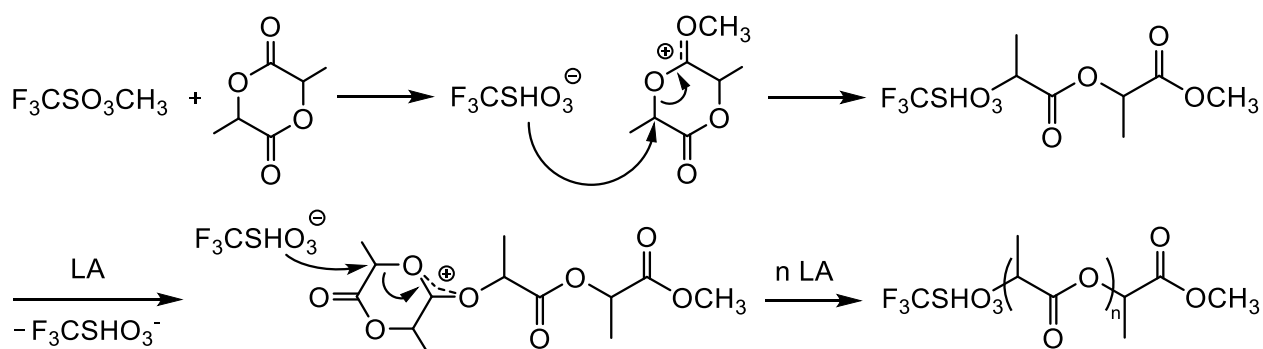


Рисунок 1.9 – Схема реакции полимеризации с раскрытием цикла по катионному механизму

Широко известными инициаторами анионной полимеризации с раскрытием цикла являются алкоксиды металлов, натрия, калия, лития и др. Механизм реакции

включает в себя на первом этапе нуклеофильную атаку иона инициатора на карбонильный атом углерода с последующим разрывом ацильной связи С-О. Рост цепи осуществляется по аналогии, но уже за счет воздействия на мономер образовавшегося алкокси-иона на концевом участке цепи (Рисунок 1.10). Наличие активного алкокси-иона может вызвать депротонирование мономера в альфа положении, что приведет к неизбежному процессу рацемизации. Рацемизация не является проблемой, например, если в качестве мономера используется D,L-лактид. Однако лактид-анион также способен инициировать полимеризацию новой цепи, и поэтому депротонирование мономера может сопровождаться процессом передачи цепи, что приведет к относительно невысоким значениям молекулярной массы полилактида [24].

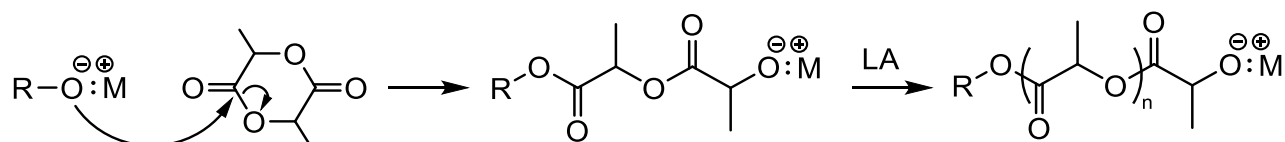
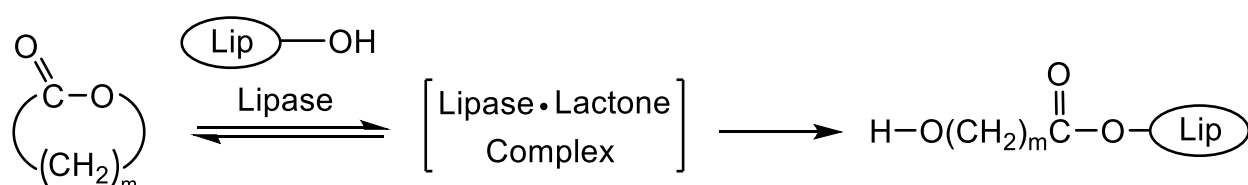


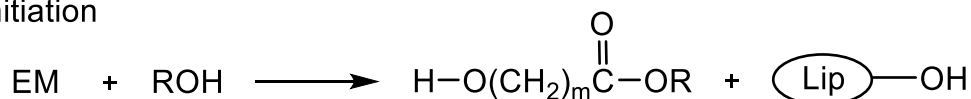
Рисунок 1.10 – Схема реакции полимеризации с раскрытием цикла по анионному механизму

Благодаря высокой селективности и низкой токсичности ферментативная ROP рассматривается как актуальный и экологически чистый метод синтеза сложных полиэфиров. Результаты современных исследований также показывают, что существует целый ряд ферментов (например, липаза *Candida rugosa*, липаза PS из *Burkholderia cepacia* и липаза из поджелудочной железы свиньи), которые могут быть использованы для получения сложных полиэфиров [25]. Uyama с коллегами [26] описали механизм ROP под действием липаз следующим образом (Рисунок 1.11). На первом этапе в результате связывания лактона с липазой происходит раскрытие кольца мономера и образуется активный ацил-ферментный промежуточный продукт (АФ). Стадия иницирования полимеризации протекает посредством нуклеофильной атаки молекул воды (или гидроксилсодержащего соединения) на ацильный атом углерода молекулы активированного мономера АФ. Ферментативную ROP можно проводить и в неводной среде, поскольку

каталитическое количество молекул воды необходимое для инициирования полимеризации всегда находится в связанном с ферментами состоянии. Последующий рост полимерной цепи осуществляется за счет взаимодействия концевой гидроксильной группы растущей цепи с вновь сформированной молекулой активированного лактона АФ. В результате лимитирующей стадией ROP, катализируемой липазой, является образование самого АФ промежуточного продукта.



Initiation



Propagation

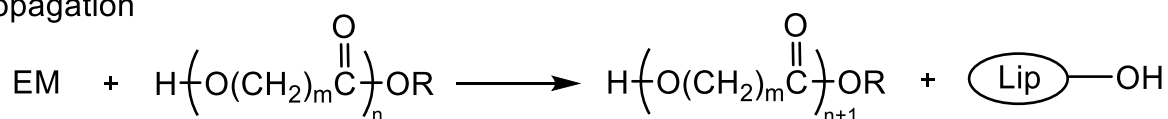


Рисунок 1.11 – Схема ферментативной полимеризации с раскрытием цикла лактонов

Широкому распространению ферментативной полимеризации с раскрытием цикла препятствуют некоторые недостатки. Несмотря на то, что используемые ферменты безопасны и безвредны для здоровья человека, в процессе получения могут быть использованы токсичные органические растворители, что повышает токсичность получаемых продуктов. Во-вторых, для обеспечения высокой каталитической активности ферментов необходимо строго контролировать pH и температуру среды, что наряду со сложностями масштабирования может привести к экономической и технологической нецелесообразности процесса. В-третьих, по сравнению с PLA, полученными другими методами, полилактид синтезированный методом ферментативной ROP, обычно имеет более низкую молекулярную массу, а его физико-химические свойства с трудом удовлетворяют требованиям, предъявляемым к нему при эксплуатации.

В результате анионная и катионная полимеризация, а также ROP лактида под действием ферментов обладают рядом ограничений и уступают по своей эффективности полимеризации под действием катализаторов на основе комплексов металлов Al, Mg, Zn, Ca, Sn, Zr и др. По сравнению с другими катализаторами, 2-этилгексаноат олова (II) проявляет лучшую активность, а также является растворимым в расплаве лактида и большинстве органических растворителей [27]. Это привело к тому, что практически все коммерческие предприятия по производству упаковочного полилактида путем полимеризации с раскрытием цикла используют в качестве катализатора октаноат олова. Эффективность катализатора обычно определяется в соответствии с обеспечиваемой скоростью полимеризации, степенью финальной конверсии мономера и максимально достижимой молекулярной массой продукта. В случае биоразлагаемых полимеров, и прежде всего в тех случаях, когда эти полимеры используются в медицинских и фармацевтических целях, важную роль играет еще один параметр катализатора – токсичность. Этот вопрос становится наиболее острым при использовании катализаторов на основе тяжелых металлов, остатки которых в конечном полилактиде могут привести к потенциальной угрозе организму человека. Поэтому теме безопасности наиболее популярного катализатора ROP необходимо уделить особое внимание. В связи с возрастанием потребности использования полилактида в качестве биоразлагаемого материала во многих областях применений токсичность ионов олова (II) довольно интенсивно изучалась в течение последних 40 лет и была признана достаточно низкой для человека [28]. Более точные данные о токсичности ионов олова (II) в продуктах питания были получены в результате длительных исследований потребления консервированных продуктов. За последние 120 лет человечество выпустило много миллиардов консервных банок из стали, внутренние стенки которых были покрыты оловом для защиты стальных стенок от коррозии. Выявленная в этих исследованиях низкая токсичность ионов олова (II) для человека в сочетании с его высокой токсичностью в отношении многих видов микробов и грибов побудила американское управление по контролю качества пищевых продуктов и

лекарственных средств (FDA) принять октаноат олова и другие соли олова (II), прежде всего хлорид олова, в качестве стабилизатора пищевых продуктов. Например, поскольку хлорид-ионы участвуют в метаболизме человека, хлорид олова используется в качестве распространенного стабилизатора для большинства томатных продуктов. Несмотря на то, что FDA установила пороговое значение содержания октаноата олова в изделиях, предназначенных для контакта с пищевыми продуктами, не более 1 масс.% [29], по меркам стандартов ASTM в медицинских изделиях содержание олова не должно превышать 200 ppm (ASTM F1925).

Полимеризация с раскрытием цикла таких циклических сложных эфиров, как лактиды и лактоны в присутствии 2-этилгексаноата олова протекает по механизму «координации-внедрения», который изначально был сформулирован в работах Teyssié для полимеризации  $\epsilon$ -капролактона под действием изопропоксида алюминия и биметаллических комплексов на основе Al и Zn [30]. В ходе исследований было показано, что реакция подчиняется первому порядку по катализатору, а также установлена линейная зависимость степени полимеризации от мольного соотношения катализатора к мономеру. «Псевдоживой» характер полимеризации позволил синтезировать и исследовать короткоцепочечные молекулы методами ЯМР и ИК-спектроскопии, в результате чего был сформулирован неионный механизм реакции, включающий внедрение цикла лактона в ковалентную связь катализатора Al-O (Рисунок 1.12).

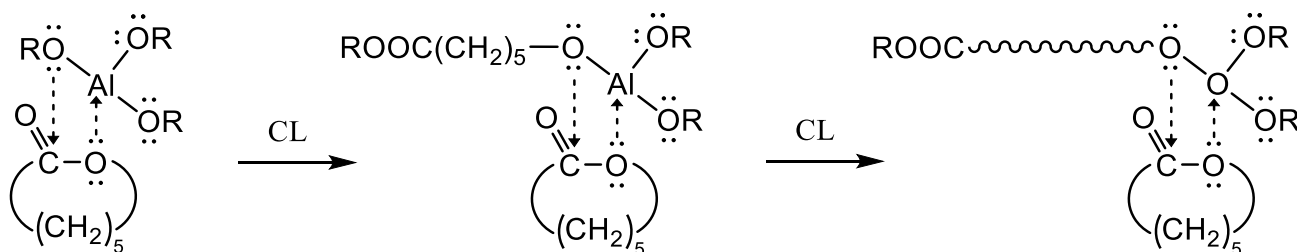


Рисунок 1.12 – Механизм полимеризации с раскрытием цикла  $\epsilon$ -капролактона под действием алкоксида алюминия

В 1991 году эти результаты были также продемонстрированы и для полимеризации L- и D,L-лактида под действием изопропоксида алюминия [31].

Незадолго до этого группа под руководством Kricheldorf изучала гомо- и сополимеризацию L-лактида используя уже различные алкоксиды олова такие как:  $\text{Bu}_3\text{SnOMe}$ ,  $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OMe})_2$ , и др. [32, 33]. Для всех комбинаций катализаторов и мономеров при температуре выше  $50\text{ }^\circ\text{C}$  наблюдалась линейная зависимость степени полимеризации от исходного соотношения компонентов, что позволило сделать вывод о протекании реакции по механизму «координации-внедрения». Характерной стадией для этого механизма в присутствии алкоксидов олова является взаимодействие карбонильного кислорода со свободной орбиталью атома Sn с последующим повышением электрофильности карбонильного атома углерода и нуклеофильности связи Sn-O. Второй этап заключается в перестройке ковалентных связей, в результате чего происходит встраивание циклического мономера в связь Sn-O.

В последующие годы алкоксиды олова редко использовались в качестве катализаторов/инициаторов ROP лактидов, поскольку интерес большинства исследовательских групп был сосредоточен на использовании чистого  $\text{SnOct}_2$  или в комбинации с гидроксилсодержащими соединениями в качестве со-инициаторов. Возможность использования различных спиртов в качестве со-инициаторов была, по-видимому, впервые исследована в публикации Schindler с соавторами, при этом в качестве мономера был использован не лактид, а  $\epsilon$ -капролактон [34]. Тот факт, что при использовании додеканола в качестве со-инициатора расчетные значения молекулярной массы полимера хорошо коррелировали с экспериментальными, указывает в пользу предположения, что каждая молекула спирта в присутствии  $\text{SnOct}_2$  инициирует рост полимерной цепи. Это позволило авторам контролируемо синтезировать линейный поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL) с молекулярными массами от 10 до 30 кДа. Кроме того, в качестве спиртов были использованы не только моно- и бифункциональные спирты, но и мультифункциональные соединения, а звездообразное строение синтезированных PCL было подтверждено более низкими значениями характеристических вязкостей по сравнению с линейными аналогами. Эта работа стимулировала многочисленные исследовательские группы к изучению прикладного потенциала данной каталитической системы ROP в виде сочетания

$\text{SnOct}_2$  и гидроксилсодержащих соединений с целью расширения возможностей медицинского и фармацевтического применения гомо- и сополимеров PLA.

Механизм реакции ROP под действием октаноата олова в присутствии спиртов интенсивно исследовали несколько научных групп в 1990-х годах. Первая формулировка концепции была опубликована в 1994 году группой McAuley [35]. Было показано, что добавление спирта в реакционную систему ускоряет процесс полимеризации, в то время как наличие карбоновых кислот наоборот замедляет ROP лактида. На основе ранее опубликованных работ, демонстрирующих слабое влияние концентрации октаноата олова на молекулярную массу образующегося PLA было постулировано, что в результате взаимодействий между спиртом и  $\text{SnOct}_2$  устанавливается равновесие с образованием алкоксидной связи  $\text{Sn-O}$  (Рисунок 1.13), которая рассматривается как истинный инициатор из-за ее более высокой нуклеофильности по сравнению с карбоксилатными группами олова в  $\text{SnOct}_2$ . В 1995 году группой Kricheldorf на базе экспериментов по изучению полимеризации L-лактида в присутствии бензилового спирта и октаноата олова был выдвинут альтернативный механизм, предполагающий взаимодействие спирта с мономером через комплекс с атомом Sn (II) посредством перекрывания  $\text{sp}^3\text{d}^2$  орбиталей без формирования алкоксидной связи [36]. Вскоре после этого в ряде работ групп Kricheldorf и Penczek в ходе детального исследования кинетики полимеризации лактидов и лактонов с помощью спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии было доказано образование ковалентной связи  $\text{Sn-O-CH}(\text{CH}_3)$  в качестве концевой фрагмента растущей цепи [37–40]. В результате было установлено, что ROP лактидов и лактонов в присутствии октаноата олова и гидроксилсодержащих соединений протекает по механизму «координации внедрения» (Рисунок 1.13) через образование промежуточного алкоксида, выступающего в качестве истинного инициатора. Сам по себе 2-этилгексонат олова (II) является малоактивным и не инициирует полимеризацию, а проведение в достаточной степени быстрого и контролируемого синтеза с узким MPP возможно только посредством добавления в систему спиртов. При добавлении в реакционную систему только  $\text{SnOct}_2$  и мономера полимеризация будет протекать

из-за наличия примесей воды и 2-этилгексановой кислоты, которая образуется даже после тщательной перегонки катализатора [35].

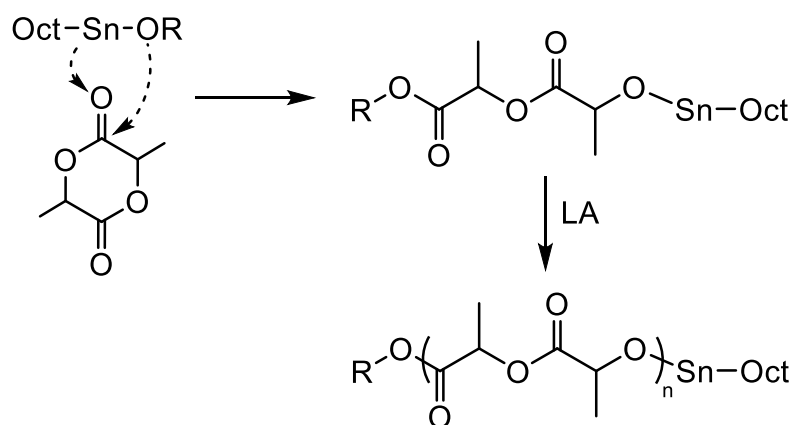
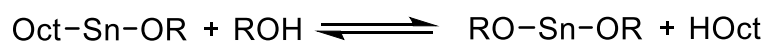
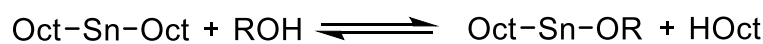
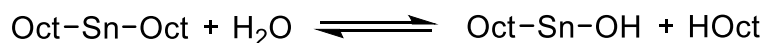


Рисунок 1.13 – Механизм полимеризации лактида в присутствии 2-этилгексаноата олова (II) и гидроксилсодержащих соединений

В соответствии с установленным механизмом основными побочными реакциями при температуре синтеза выше 120 °С являются реакции внутри- и межмолекулярной переэтерификации [41]. Вариантами межмолекулярных побочных реакций приводящих к уширению ММР, являются разрывы основной полимерной цепи полилактида под действием либо свободного октаноата олова либо под действием концевой алкоксидной группы другой макромолекулы (Рисунок 1.14). Следствием внутримолекулярной переэтерификации является образование полилактидных цепей циклической структуры (Рисунок 1.14). Интенсивность протекания побочных реакций напрямую связана с условиями проведения реакции, в частности с температурой и временем синтеза, концентрацией катализатора и природой молекулы со-инициатора.

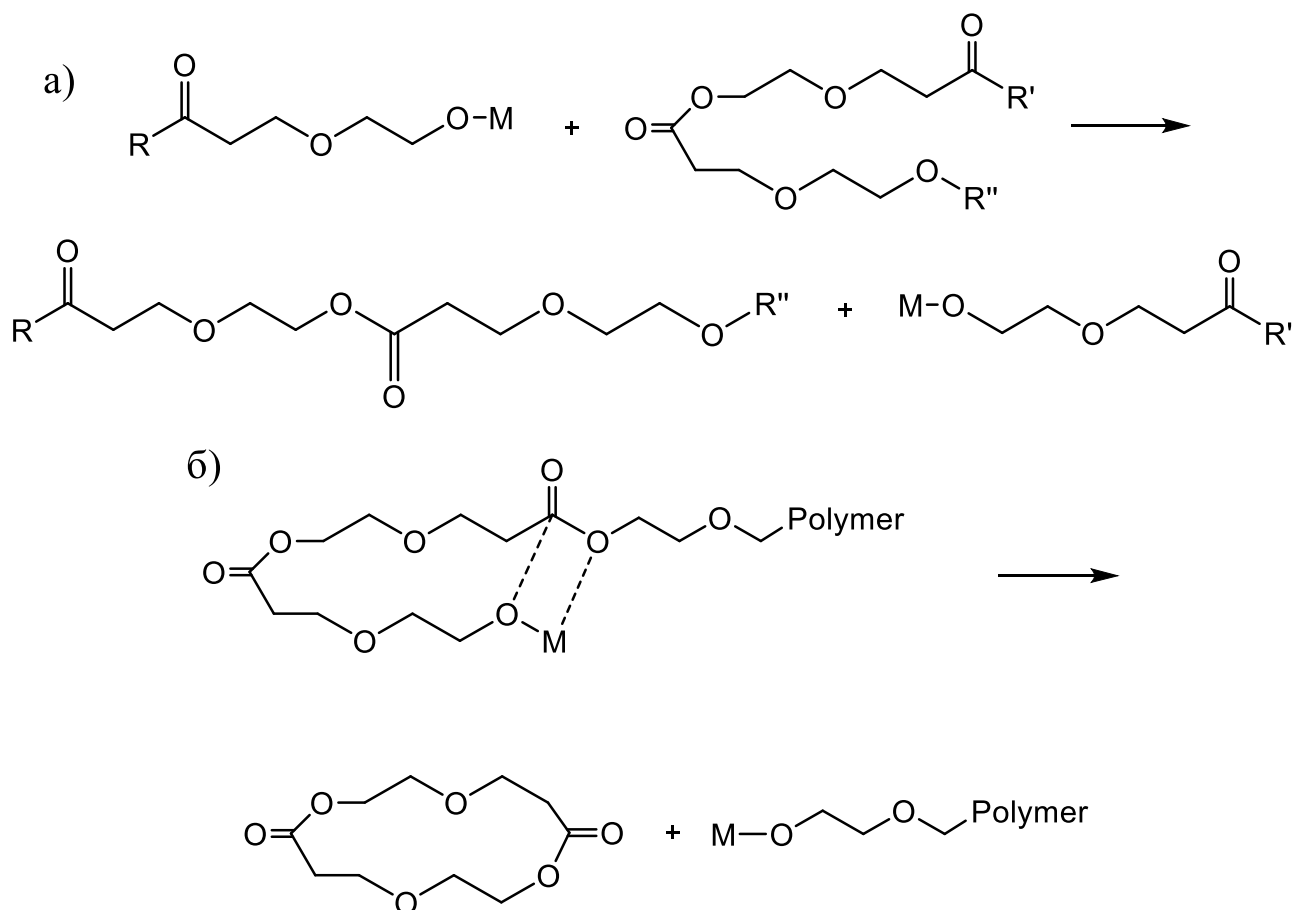


Рисунок 1.14 – Реакции межмолекулярной (а) и внутримолекулярной (б) переэтерификации

Благодаря тому, что молекула спирта остается ковалентно связанной с полимерной цепью полилактида через сложноэфирную связь, открывается возможность для контроля над природой одной из концевых групп. Кроме того, в качестве со-инициаторов можно использовать различные моно- и мультифункциональные гидроксилсодержащие соединения, что позволяет регулировать как состав, так и строение синтезируемых полилактидов. В основном звездообразные полилактиды и их сополимеры с другими циклическими сложными эфирами синтезируют методом ROP, реализуя подход «core-first» с использованием в качестве ядер молекулы низкомолекулярных мультифункциональных спиртов (Рисунок 1.15). В итоге в случае инициирования полимеризации мономера на каждой OH-группе со-инициатора образуются звездообразные полилактиды, содержащие чаще всего от 3-х до 8-ми лучей.

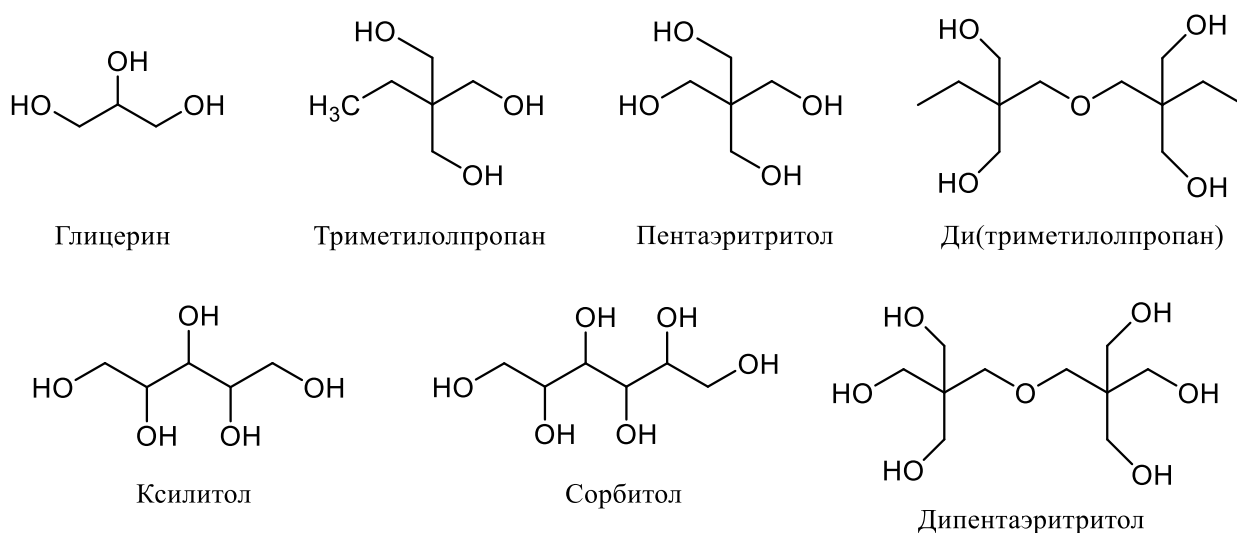


Рисунок 1.15 – Структурные формулы multifunctional со-инициаторов, используемых для синтеза звездообразных полилактидов методом ROP

Один из первых синтезов звездообразных PLLA в присутствии октаноата олова и 6-ти лучевого со-инициатора мио-инозитола был описан в работе Pennings в 1988 году [42]. Синтезированные 6-ти лучевые образцы были сшиты с помощью диизоцианата, полученного из этилового эфира L-лизина. Такого рода полимерные биоразлагаемые сетки предназначались для использования в качестве покрытий или скаффолдов для медицинских целей, поскольку конечные продукты деградации таких материалов могут участвовать в метаболизме человека. В дальнейшие годы многие научные группы по всему миру работали над синтезом и исследованием физико-химических свойств звездообразных PLLA [43–51], PDLA [52–56] и PDLLA [57–62] для использования в качестве материалов медицинского назначения. Как показывает практика наиболее распространенными со-инициаторами (ядрами) для синтеза звездообразного 3-х лучевого PLA является TMP и глицерин, для 4-х лучевого – PTOL, 5-ти лучевого – ксилитол, а для синтеза 6-ти лучевого – DPTOL и сорбитол. Сами реакции в присутствии  $\text{SnOct}_2$  по аналогии с линейными образцами проводят в инертной атмосфере в основном при температуре от 120 до 170 °C либо в растворе, либо в расплаве мономера. В зависимости от условий и соотношения компонентов реакции молекулярные массы образующихся полилактидов варьируются в пределах от  $10^3$  до  $10^5$  кДа, а индекс полидисперсности (PDI) обычно не превышает 1.3 [17].

Для выявления закономерностей влияния молекулярного строения на свойства материала с целью получения желаемых характеристик необходимо проведение контролируемого синтеза звездообразных PLA. Целый ряд работ связан с изучением кинетики и механизма синтеза линейных PLA под действием катализатора октаноата олова [39, 63–65]. Однако кинетика полимеризации лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов, содержащих от 3 до 10 гидроксильных групп изучена в меньшей степени. В 2001 году Korhonen с соавторами исследовал влияние числа гидроксильных групп в молекуле со-инициаторов (от 1 до 10) на скорость полимеризации L-лактида. Высокомолекулярные линейные и звездообразные PLLA были синтезированы в расплаве при 200 °C и 0.03 моль.% катализатора  $\text{SnOct}_2$ . Было показано, что при фиксированном мольном соотношении мономера к со-инициатору ( $[\text{M}]/[\text{CI}]$ ) с увеличением числа гидроксильных групп происходил рост скорости полимеризации. Данный вывод является закономерным с точки зрения увеличения концентрации активных центров полимеризации (ОН-групп) при фиксированной концентрации мономера. Однако скорость полимеризации немного уменьшилась при удваивании концентрации полиглицерина с 0.025 до 0.05 моль.%. В данной работе параллельно с изучением кинетики авторы также занимались исследованием структуры звездообразных полимеров с помощью спектроскопии ЯМР, а именно определяли среднее число вступивших в реакцию ОН-групп молекул со-инициаторов, тем самым констатируя образование макромолекул с разветвленным молекулярным строением. Karidi с коллегами [66] исследовали влияние типа со-инициатора при фиксированных соотношениях мономера к гидроксильной группе ( $[\text{M}/\text{OH}]$ ) на скорость полимеризации L-лактида при температуре 160 °C. В случае использования в качестве со-инициаторов 1,4-бутандиола и глицерина скорость полимеризации снижалась с увеличением степени полимеризации лучей. В то же время, в случае со-инициаторов с большим числом ОН-групп (ди(триметилпропан) и полиглицидол) наблюдался обратный эффект, т.е. скорость полимеризации снижалась с увеличением концентрации со-инициатора. Поскольку в данной работе независимо от типа со-инициатора было

зафиксировано количество мономера, приходящееся на активную точку роста цепи, авторы предположили, что наблюдаемые закономерности можно объяснить стерическими затруднениями, обусловленными звездообразной структурой полимерных молекул, и меньшей доступностью гидроксильных групп. В упомянутых работах, посвященных синтезу высокомолекулярных звездообразных PLA, зачастую в процессе реакции наблюдается формирование бимодального ММР. Это связано с тем, что даже незначительное количество примесей гидроксилсодержащих соединений (вода, молочная кислота) при исходной низкой концентрации мультифункциональных со-инициаторов может оказать существенное влияние на ММР продукта и кинетику полимеризации. Поэтому необходимо уделять отдельное внимание очистке используемых реагентов и растворителей. Нао с коллегами [29] исследовал полимеризацию L-лактида при 130 °C в растворе м-ксилола с фиксированным соотношением катализатора и мономера к гидроксильной группе:  $[I]/[OH] = 0,01$ ,  $[M]/[OH] = 10$ . Интересно отметить, что в реакции, инициированной глицерином, через 1.5 часа степень конверсии мономера приблизилась к 90 %, в то время как для сорбита она составила лишь около 60 %. Таким образом, в данном случае увеличение числа гидроксильных групп в молекуле ядра при прочих равных привело к замедлению реакции. Однако при сравнении скоростей полимеризации в присутствии различных со-инициаторов необходимо учитывать активность первичных и вторичных функциональных OH-групп, которая, безусловно, может влиять на кинетику ROP. Все это указывает на актуальность проведения дополнительных исследований в области изучения кинетики полимеризации лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов с целью определения оптимальных условий синтеза.

Для улучшения или придания нового комплекса свойств зачастую прибегают к синтезу звездообразных сополимеров лактида с другими циклическими сложными эфирами, такими как  $\epsilon$ -капролактон, гликолид и др. [67–71]. В зависимости от того будут ли мономеры смешаны в исходной реакционной смеси или добавлены последовательно возможно получение как статистического, так и блочного распределения звеньев внутри цепи, соответственно. Разнообразие

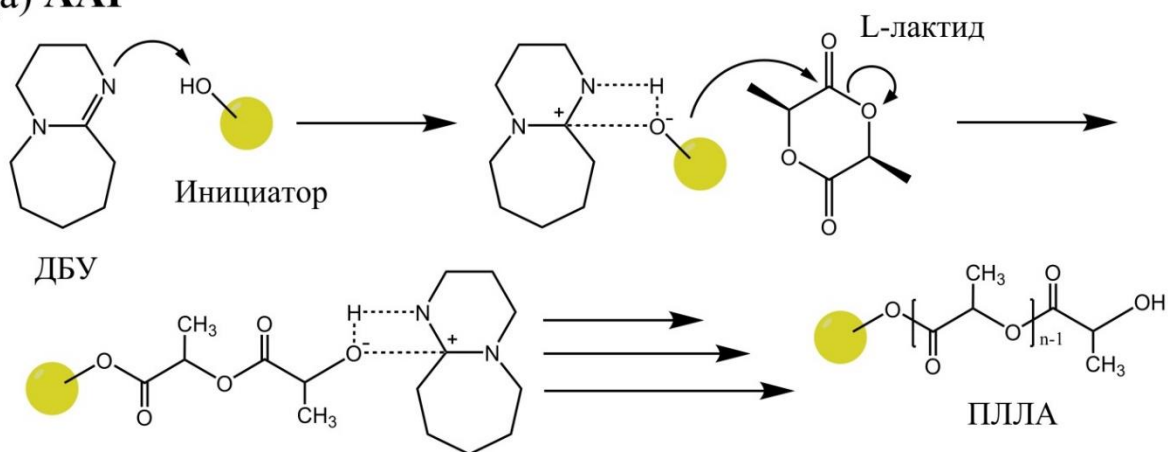
свойств материалов, получаемых на основе звездообразного PLA и его сополимеров позволяет открывать новые области применений таким соединениям.

В качестве катализаторов ROP для синтеза звездообразных PLA помимо наиболее распространенного  $\text{SnOct}_2$  успешно показали себя и другие производные олова. Так в работах [72, 73] для синтеза 4-х лучевых PLLA использовали спироциклический инициатор на основе этоксилированного пентаэритрита и оксида дибутилолова. Ацетилацетонат [74] и тетрафенил олова [75] были также использованы для синтеза звездообразных PLA. Свое применение нашли и соединения на основе других металлов, в частности Bi, Al, Zn, K и др. [17, 76–78]. Комплексы алюминия, иттрия с селеновыми и селаноновыми лигандами позволяют проводить контролируемый синтез 3-х и 6-ти лучевых стереорегулярных PLA [79, 80].

Несмотря на это в последние годы благодаря работам Hedrick, Waymouth и др. [81–84] органокатализируемая полимеризация с раскрытием цикла лактидов и лактонов (OROP) вызывает повышенный интерес в качестве альтернативы катализаторам на основе металлов [85]. Было показано, что за счет использования безметалловых катализаторов с высокой эффективностью возможно осуществлять синтез полилактидов как линейной, так и более сложной структуры в контролируемых «мягких» условиях. Отсутствие необходимости использования высоких температур и контроль над интенсивностью побочных реакций обуславливают актуальность таких катализаторов. В начале 2000-х было опубликовано несколько работ по синтезу линейных и звездообразных PLA в присутствии 4-диметиламинопиридина (DMAP) в качестве органического катализатора [81, 86]. Это подвигло научное сообщество к дальнейшему изучению различных оснований в качестве безметалловых катализаторов при получении алифатических сложных полиэфиров. Наиболее часто при OROP лактида встречаются алкил/ариламины, производные пиридина, амидины, гуанидины, а также N-гетероциклические карбены, фосфины и фосфазены [87]. Одними из наиболее каталитически активных соединений по отношению к лактиду оказались производные гуанидина и амидина – 1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ен (TBD), N-

метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ен (MTBD) и 1,8-диазабицикло[5.4.0]-ундец-7-ен (DBU). Однако именно DBU занимает золотую середину между очень активным TBD и малоактивным MTBD [87]. В 2016 году Scherck с соавторами [84] показали, что полимеризация лактида под действием DBU может протекать по нескольким механизмам. В первом случае, если в системе присутствуют гидроксилсодержащие соединения, то OROP будет протекать по спиртовым группам за счет их депротонирования и образования активного центра в виде алкоксид-аниона. Этот путь получил название «alcohol activation pathway» (AAP) (Рисунок 1.16а).

**(а) AAP**



**(б) NAP**

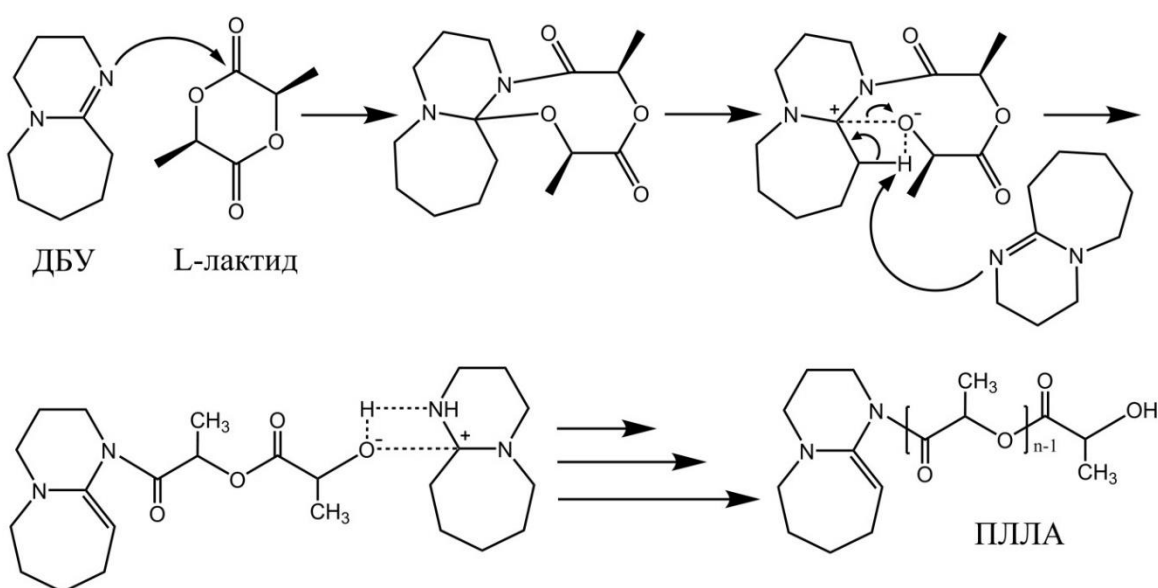


Рисунок 1.16 – Схема полимеризации L-лактида под действием DBU по механизмам AAP (а) и NAP (б)

Однако сам по себе DBU также способен инициировать полимеризацию лактида (Рисунок 1.16б) путем нуклеофильной атаки на ацильный атом углерода с последующим депротонированием молекулы катализатора и образованием линейных или циклических молекул полилактида («nucleophilic activation pathway» (NAP)). В рамках данного механизма возможными побочными реакциями являются реакции ацилирования между концевыми ОН-группами и фрагментами кетенаминаля, образующихся в ходе NAP. Результатом ацилирования двух макромолекул является сложение их молекулярной массы, в то время как внутримолекулярное ацилирование приведет к образованию циклов [84].

По сравнению с октаноатом олова способность DBU выступать как в качестве катализатора, так и в виде инициатора полимеризации лактида характеризует его универсальность в отношении ROP. На практике же при полимеризации по механизму AAR, т.е. в присутствии спиртов, возможно протекание побочных реакций по механизму NAP, что может затруднять получение желаемого продукта реакции. Если минимизировать NAP, то OROP лактида с целью получения звездообразных PLA может стать актуальным направлением. Как показали расчеты и эксперименты, преимущественное протекание полимеризации в присутствии спиртов по механизму AAR обуславливается соотношением констант равновесия реакций инициирования в рамках двух механизмов. Кроме того, в недавних работах было установлено, что избыток гидроксильных групп различных инициаторов по отношению к ДБУ может способствовать снижению доли побочных реакций [84, 88, 89]. В работе 2021 года группой Tirelli была тщательно исследована полимеризация L- и D,L-лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов (от 1 до 140 ОН-групп) под действием DBU [89]. На практике известна проблема ограниченной растворимости многих низкомолекулярных спиртов в основных органических растворителях и расплаве лактида, поэтому авторы использовали в качестве реакционной среды N-метилпирролидон. Он не только является менее токсичным, по сравнению с чаще всего используемыми хлорорганическими аналогами, но и способен растворять используемые для получения звездообразных полимеров спиртовые инициаторы, такие как PTOL,

DPTOL и др. Как показали эксперименты, поскольку ROP является термодинамически обусловленным процессом, наиболее высокие конверсии вплоть до 89% были достигнуты при температуре 5 °C. Интенсивность же побочных процессов по механизму NAP была снижена не только за счет увеличения соотношения  $[\text{OH}]/[\text{DBU}]$ , но и посредством дробного добавления мономера в реакционную систему, что позволило сохранить баланс между высокой скоростью полимеризации и количеством побочных реакций. В результате синтезированные звездообразные гомополимеры PLLA, PDLA и их блок-сополимеры, характеризовались молекулярными массами от 10 до 90 кДа, при этом PDI образцов не превышал 1.1. Сам по себе DBU является малоактивным катализатором по отношению к ROP  $\epsilon$ -капролактона, однако в паре с дифенил фосфатом путем последовательной полимеризации мономеров возможно получение звездообразных блок-сополимеров PLA-PCL с различным соотношением блоков [90]. Контроль над количеством побочных реакций наряду с обеспечением желаемого молекулярного строения делает OROP лактидов и лактонов перспективным направлением, способным конкурировать в будущем с металлоорганическими катализаторами.

### 1.1.2 Синтез $\mu$ -звезд на основе циклических сложных эфиров

В предыдущем разделе было отмечено, что наряду со звездообразными полимерами, обладающими идентичным составом лучей, существует вторая категория -  $\mu$ -звезды. Они обладают лучами, отличающимися друг от друга по составу, функциональности или молекулярной массе. Сам термин «miktoarm» произошел от греческого слова «μικτός», что в переводе означает смешанный. Так, в зависимости от химической природы лучей, обычно обозначаемых как A, B, C и D можно выделить основные структуры звезд по типу,  $A_2B$ , ABC,  $A_2B_2$ ,  $AB_3$  и ABCD (Рисунок 1.17). Одним или несколькими из этих лучей могут быть PLA различной стереорегулярности или другие сложные полиэфиры, в то время как остальные лучи могут быть синтезированы из других классов мономеров, что придает уникальность свойствам такого рода полимеров.

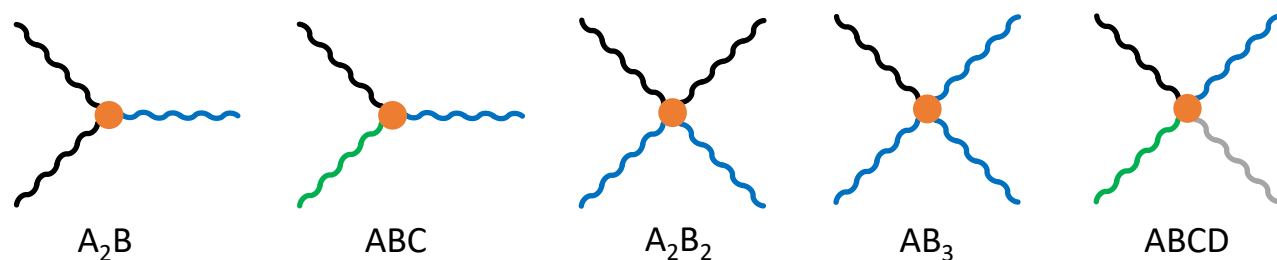


Рисунок 1.17 – Виды структур звездообразных «miktoarm» полимеров

Основными подходами к синтезу  $\mu$ -звезды являются, описанные ранее в разделе 1.1.1, методики «core-first» и «arm-first» или их комбинация. В зависимости от типа используемых мономеров для синтеза лучей применяются различные механизмы полимеризации. Так, для получения  $\mu$ -звезд в основном использовали анионную полимеризацию до появления других контролируемых методов, например, метатезисной ROP, методов «click» химии, а также радикальной полимеризации с обратимой дезактивацией (RDRP), к которой относятся полимеризация с обратимым процессом передачи цепи (RAFT) и переносом атома (ATRP). Лучи полилактида или других сложных полиэфиров в составе  $\mu$ -звезд синтезируются путем ранее рассмотренных механизмов ROP. Остальные лучи, входящие в состав звездообразной молекулы, могут быть синтезированы вышеперечисленными методами контролируемой полимеризации, которым следует уделить особое внимание.

С момента своего открытия в 1995 году [91, 92] метод ATRP зарекомендовал себя как надежный и универсальный подход к синтезу полимерных щеток, звездообразных и мультиметных макромолекул с контролируемым молекулярным строением и узким ММР. В качестве активатора в ATRP обычно используется комплекс переходного металла в низшей степени окисления, а в качестве инициатора - алкилгалогенид ( $P_n-X$ ). Согласно традиционному механизму каталитическая система переходный металл/лиганд ( $Mt^n/Ligand$ ) регулирует концентрацию активных радикалов ( $P_n^\bullet$ ), участвующих в полимеризации через контролируемый процесс обратимой активации и дезактивации (Рисунок 1.18) [93]. Необходимым условием является значительное преобладание константы скорости дезактивации, в результате чего равновесие в системе устанавливается при низкой

концентрации радикалов растущих цепей. Кроме того, высокая скорость инициирования наряду с минимизацией числа реакций обрыва цепи обеспечивает получение продукта с низкой полидисперсностью и контролируемыми молекулярными массами.

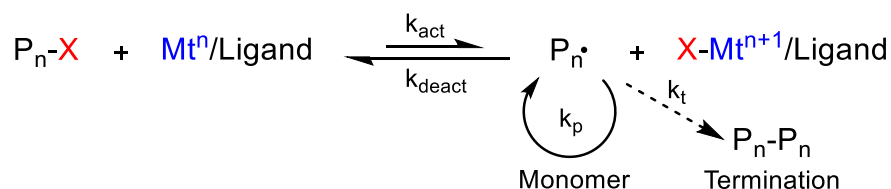


Рисунок 1.18 – Схема реакции полимеризации по механизму ATRP

В случае синтеза  $\mu$ -звезд по методу «core-first» иницирующий остаток, участвующий в ATRP, может быть внедрен путем этерификации имеющихся в молекуле ядра гидроксильных групп хлор или бромангидридами алкилгалогенидсодержащих кислот. Чаще всего для синтеза ядер, содержащих функциональные группы различной природы, требуется проведение дополнительных реакций защиты и активации групп, что, безусловно, усложняет процесс синтеза  $\mu$ -звезд. Например, в работе [94] были получены  $\mu$ -звезды по типу  $\text{AB}_2$  и  $\text{AB}_3$  на основе молекул ядер  $\alpha$ -D-рибофуранозы и  $\beta$ -D-глюкопиранозы путем комбинации ATRP и ROP. На первом этапе синтеза первичные OH-группы сахаров были защищены трифенилметил хлоридом, с последующей этерификацией вторичных OH-групп бромангидридом  $\alpha$ -бромизомасляной кислоты и активацией первичных групп трифторуксусной кислотой. В результате  $\mu$ -звезды были получены последовательной полимеризацией додецилакрилата методом ATRP и L-лактида методом ROP на оставшихся после снятия защиты OH-группах. Синтезированные  $\mu$ -звезды характеризовались узким MMP ( $\text{PDI} < 1.1$ ) и хорошим контролем над молекулярной массой лучей. Интересно отметить, что сами по себе звездообразные полилактиды могут быть перефункционализированы в макроинициаторы полимеризации ATRP через этерификацию концевых гидроксильных групп. Трехлучевые блок-сополимеры PLA с полиэтиленгликоль метакрилатом были синтезированы комбинацией ROP/ATRP с содержанием в

полимерной цепи метакрилата кампотецина (противоракового агента) от 8 до 17 масс.% [95].

Еще одним широко используемым видом контролируемой радикальной полимеризации является RAFT полимеризация, впервые описанная группой Rizzardo в 1998 году [96]. Ключевым аспектом данного метода является обратимая передача цепи с помощью RAFT-агентов, которыми зачастую выступают дитиоэфиры и дитиокарбаматы (Рисунок 1.19). Именно благодаря этому процессу, а также высокой скорости присоединения радикалов к двойной связи углерод-сера, осуществляется контроль над ростом полимерных цепей. Эффективность процесса присоединения и фрагментации наряду со стабилизацией растущих радикалов определяется типом используемой пары мономера и RAFT-агента, а точнее R и Z заместителей в нем. По своей природе R должен быть устойчивым радикалом и легко инициировать полимеризацию выбранного мономера. Структура Z является не менее важной, поскольку именно она будет определять стабильность интермедиата и, соответственно, эффективность полимеризации тех или иных классов мономеров. В результате значительное влияние RAFT-агента на процесс полимеризации обуславливает актуальность поиска и разработки новых соединений для более точного управления этим процессом.

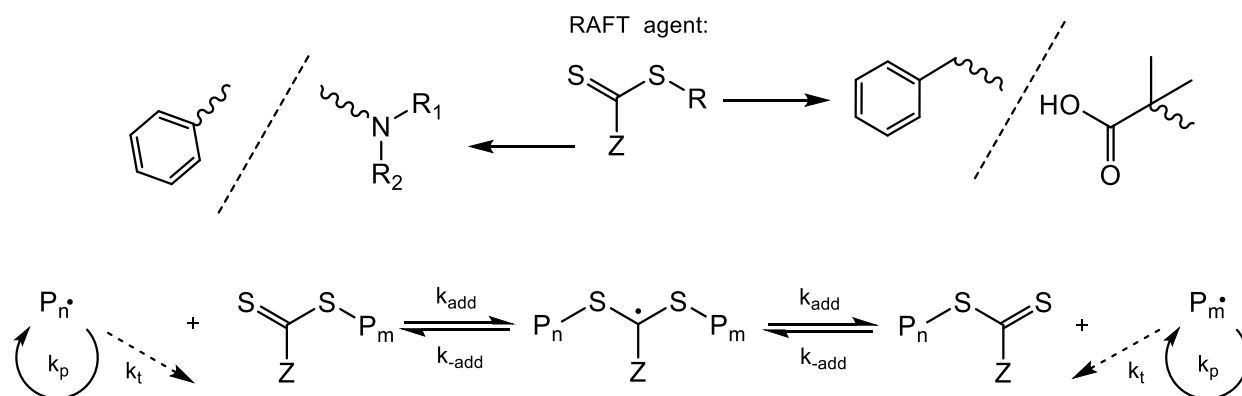


Рисунок 1.19 – Представление возможных заместителей R и Z в RAFT-агентах, а также схема реакции полимеризации по механизму RAFT

Благодаря комбинации RAFT, ROP и «click» химии в одной из работ были успешно синтезированы  $\mu$ -звезды типа  $\text{AB}_2$  [97]. Для полимеризации бутилакрилата, полиэтиленгликолякрилата и *N*-изопропилакриламида

использовался азид функционализированный RAFT-агент. На втором этапе в результате взаимодействия пропаргиламина и глицеринкарбоната была получена молекула ядра, содержащая на одном конце тройную связь, а на другом две гидроксильные группы, используемые для ROP лактида и  $\epsilon$ -капролактона. Финальное формирование  $\mu$ -звезд происходило за счет реакции «click» химии, т.е. азид-алкинового циклоприсоединения линейного продукта RAFT полимеризации к сложным полиэфирам. Как показывает практика,  $\mu$ -звезды могут быть синтезированы различными комбинациями методик контролируемой полимеризации, так в 2017 году Ху с соавторами [98] опубликовали работу посвященную синтезу  $\mu$ -звезд типа ABC комбинацией ATRP, RAFT и ROP. На Рисунке 1.20 представлена общая схема реакции. Многофункциональное иницилирующее ядро было получено путем последовательной этерификации триметилолпропана. Затем на каждой из трех групп была последовательно проведена полимеризация трех мономеров:  $\epsilon$ -капролактона, N-изопропилакриламида и 2-диметиламиноэтилметакрилата. Важно отметить, что PDI образцов  $\mu$ -звезд, синтезированных комбинацией методик ROP и контролируемой радикальной полимеризации, зачастую находится в пределах от 1.3 до 1.4, что явно выше значений характерных для индивидуальных методик. Причиной этого является возможное накладывание уже известных побочных реакций ROP с присущей для RDRP полимеризации побочной реакцией присоединения по типу звезда к звезде. Кроме того, как правило при комбинации RDRP и ROP используется подход «core-first», сопровождающийся дополнительными стадиями активации и защиты функциональных групп с последовательной полимеризацией мономеров. Эти факторы требуют многократных этапов очистки, с одной стороны приводящих к умеренным значениям полидисперсности для  $\mu$ -звезд, содержащих сложные полиэфиры, но с другой сокращающих выход целевого продукта. В тоже время именно за счет использования комбинации различных методов синтеза возможно получение уникальных по своей химической природе  $\mu$ -звезд. При этом важной задачей, которую необходимо выполнить перед исследованием свойств

материалов, является подтверждение молекулярного строения и состава синтезированных звездообразных соединений.

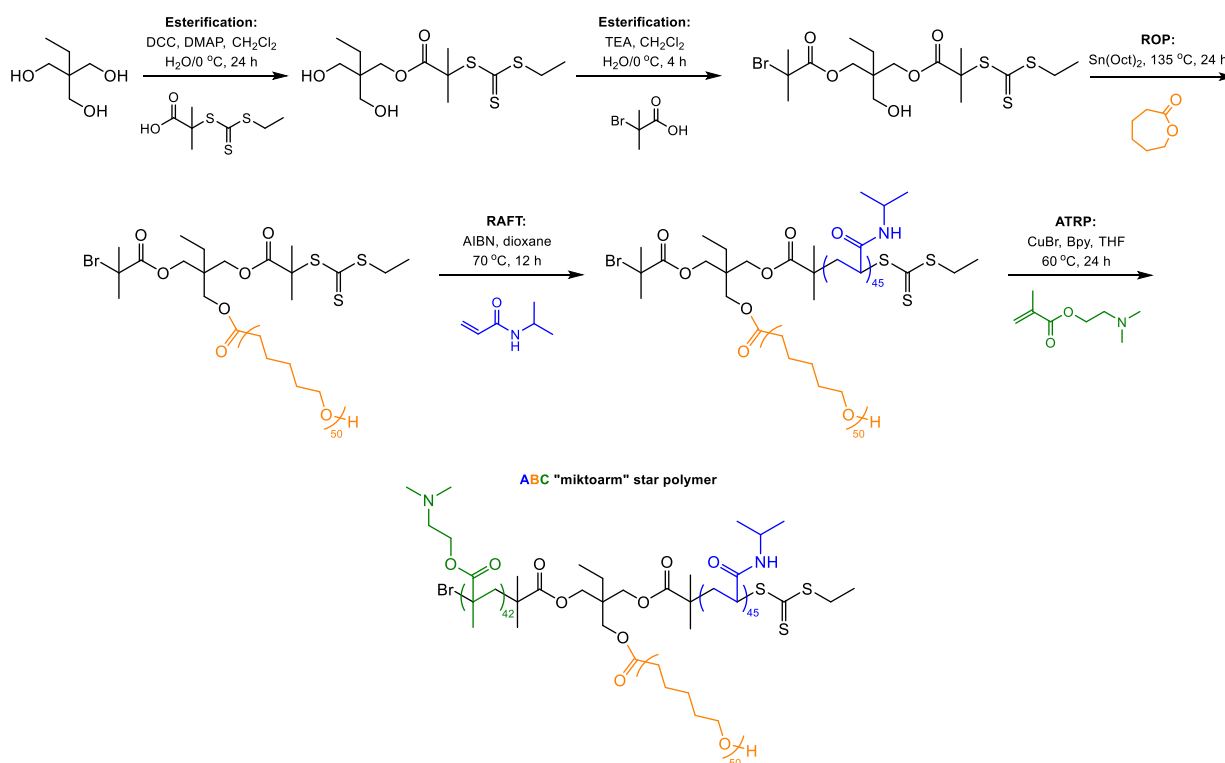


Рисунок 1.20 – Синтез ABC  $\mu$ -звезды по методу «core-first» с помощью комбинации ROP, RAFT и ATRP

### 1.1.3 Методы исследования молекулярного строения и состава звездообразных сложных полиэфиров

Множество факторов в процессе синтеза звезд (побочные реакции, неравномерный рост лучей и др.) могут привести к несоответствию полученного строения образцов с теоретически заданным. В данном случае выявить и проанализировать важнейшую взаимосвязь строения полимера со свойствами материала на его основе уже не будет представляться возможным. Поэтому контроль над молекулярным строением и составом синтезируемых сложных полиэфиров является необходимым, особенно в случае исследования разветвленных соединений.

Характеризация звездообразных сложных полиэфиров традиционно осуществляется с помощью методов качественного и количественного анализа, применяемых и для их линейных аналогов. К наиболее распространенным методам

исследования можно отнести ГПХ, спектроскопию ядерного магнитного резонанса, в частности протонную и углеродную ( $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР) и масс-спектрометрию МАЛДИ. Спектроскопия ЯМР позволяет с высокой точностью по виду сигналов и их положению на спектре определить химический состав макромолекул, а также наличие тех или иных функциональных групп в цепи. По соотношению интегральной интенсивности сигналов можно оценить степень конверсии мономера, количество вступивших в реакцию функциональных групп молекул ядер, а также среднюю степень полимеризации полимерных лучей [99]. Однако недостатком данного метода можно считать, что полученные данные являются усредненными по всем макромолекулам, которые находятся в системе, при этом изучение какого-либо распределения является затруднительным. МАЛДИ является методом, который позволяет за счет мягкой ионизации переводить целые макромолекулы в газовую фазу с последующим определением их молекулярной массы с точностью до дальтон [99]. Кроме того с помощью МАЛДИ возможно определение доли продуктов побочных реакций, например, циклических и линейных примесей [100]. Это является неоспоримым преимуществом данного метода, однако в зависимости от природы и молекулярной массы, макромолекулы могут обладать различной способностью к ионизации. С увеличением молекулярной массы эффективность ионизации снижается, и как следствие получение масс-спектров PLA с молекулярной массой более 10-15 кДа может быть сопряжено с рядом трудностей. В результате для полноценной характеристики звездообразных сложных полиэфиров необходимо использовать и другие методы исследования.

Гель-проникающую хроматографию можно отнести к основополагающим методам определения молекулярных масс и молекулярно-массового распределения полимеров. В то же время молекулярные массы PLA, определенные с помощью ГПХ с рефрактометрическим детектором не являются абсолютными, поскольку в большинстве исследований вычисления базируются на калибровке по линейным полистирольным стандартам. Если для линейных PLA эти значения могут быть пересчитаны в соответствии с определенным коэффициентом в приближенные к

абсолютным молекулярным массам, то в случае анализа разветвленных аналогов такого рода аппроксимация затруднительна. Причиной этого является меньший гидродинамический объем звездообразных макромолекул, по сравнению с линейными полимерами, который зависит не только от ММ, но и от числа лучей, что делает определение их молекулярной массы достаточно сложным. Наиболее современным и универсальным методом определения как молекулярных масс, так и степени разветвленности звездообразных полилактидов является ГПХ с тройным детектированием. Использование комбинации рефрактометрического детектора с вискозиметрией и детектором по светорассеянию предоставляет действительно ценную информацию о молекулярном строении разветвленных соединений. Широкоугловое светорассеяние является абсолютным методом для определения ММ полимеров. Фундаментальное уравнение рассеяния света можно представить следующим образом (Формула 1.1):

$$I(\theta) \propto M \times c \times \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \times P(\theta) \quad (1.1)$$

где интенсивность рассеянного света  $I$  под углом  $\theta$  прямо пропорциональна произведению молекулярной массы  $M$ , концентрации  $c$ , квадрата удельного показателя преломления  $dn/dc$  (константа для каждого образца) и функция, отражающая угловую зависимость интенсивности рассеяния –  $P(\theta)$ , которая равняется 1 при  $\theta = 0$ . Абсолютная интенсивность рассеянного света, экстраполированная на  $\theta = 0$ , используется для расчета молекулярной массы, а угол наклона этой экстраполяции – для расчета среднеквадратичного радиуса образца. В 1949 году Zimm и Stockmayer теоретически вывели коэффициент ветвления  $g$  как отношение радиуса инерции разветвленного образца ( $R_{\text{разветвленный}}$ ) к линейному ( $R_{\text{линейный}}$ ) при их аналогичной молекулярной массе  $M$  [101] (Формула 1.2).

$$g = \left(\frac{R_{\text{разветвленный}}}{R_{\text{линейный}}}\right)_M \quad (1.2)$$

Определенным ограничением метода статического светорассеяния является отсутствие возможности определения среднеквадратичного радиуса для сравнительно небольших полимеров с  $R < 10$  нм, что соответствует молярной массе порядка  $10^5$  Да и ниже. В случае таких полимеров вместо статического

светорассеяния для подтверждения звездообразного строения может быть использован метод вискозиметрии. С помощью вискозиметрического детектора в процессе гель-проникающей хроматографии возможно получение информации о гидродинамическом радиусе макромолекул, их характеристической вязкости и параметрах уравнения Марка-Куна-Хаувинка ( $a, K$ ). Именно на основе отношения характеристической вязкости ( $[\eta]$ ) разветвленного и линейного образца позже Zimm и Kilb вывели альтернативный коэффициент ветвления  $g'$  (Формула 1.3) [102].

$$g' = \left( \frac{[\eta]_{\text{разветвленный}}}{[\eta]_{\text{линейный}}} \right)_M \quad (1.3)$$

Взаимосвязь между  $g$  и  $g'$  описывают параметром  $e$  в соответствии с Формулой 1.4:

$$g' = g^e \quad (1.4)$$

Предполагается, что параметр  $e$  может изменяться в диапазоне 0.5-1.5, при этом значение  $e \approx 0.7$  чаще всего используется для пересчета  $g$  в  $g'$ .

Как показала работа Yu and Rollings [103] рассчитать коэффициент  $g$  можно также на основе значений молекулярной массы (объеме элюирования) линейного и разветвленного полимера (Формула 1.5).

$$g = \left( \frac{M_{\text{линейный}}}{M_{\text{разветвленный}}} \right)^{\frac{1+a}{e}} \quad (1.5)$$

Чем меньше эти коэффициенты, тем более разветвленными являются макромолекулы. В литературе существует несколько моделей, представляющих параметры  $g$  и  $g'$  как функцию, зависящую от числа лучей  $f$  (Формула 1.6). При сравнении экспериментально полученных коэффициентов с теоретически рассчитанными, исходя из заданного числа лучей, можно количественно оценить степень ветвления исследуемых образцов.

$$g_{\text{теор}} = \frac{6f}{(f+1)(f+2)}; g'_{\text{теор}} = \left( \frac{(3f-2)}{f^2} \right)^{0,58} \times \frac{0,724-0,015(f-1)}{0,724} \quad (1.6)$$

Таким образом, гель-проникающая хроматография с тройным детектированием является одним из наиболее информативных методов

качественной и количественной оценки молекулярного строения разветвленных полимеров.

В дополнение к вышеперечисленному в литературе встречаются работы, посвященные использованию двумерной хроматографии для анализа полимерных материалов, у которых наблюдаются случайные распределения звеньев и структурная неоднородность цепей. Поскольку количество концевых функциональных групп в молекуле звездообразного полилактида определяется числом лучей, то в качестве первой ступени можно использовать колонку, предназначенную для хроматографии в критической точке адсорбции. В этих условия разделение полимера в колонке происходит исключительно за счет взаимодействия функциональных групп с материалом колонки, при этом молекулярная масса макромолекул не оказывает влияние на процесс разделения. В качестве второй ступени обычно используется колонка, предназначенная для проведения стандартной гель-проникающей хроматографии. Так в некоторых работах, данный метод был успешно применен для разделения и идентификации звездообразных полилактидов с аналогичной молекулярной массой, но отличающихся количеством лучей (Рисунок 1.21) [45, 104].

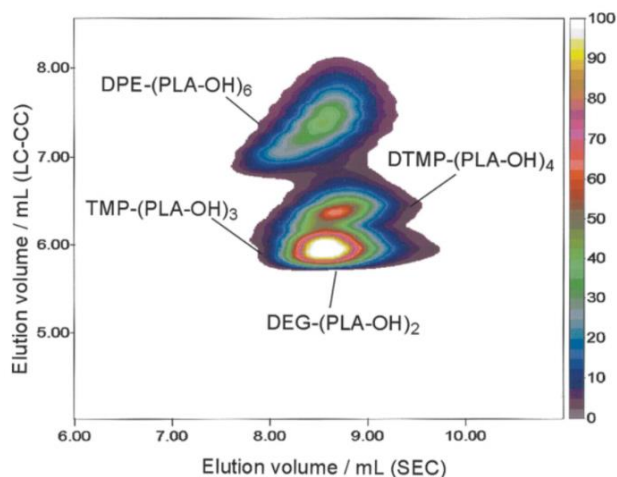


Рисунок 1.21 – Пример двумерной хроматографии в критической точке адсорбции смеси звездообразных полилактидов с различным количеством лучей [45]

Однако в случае если в системе присутствуют звездообразные полилактиды, содержащие разное количество не вступивших в реакцию гидроксильных групп молекул ядра, то их разделение будет протекать уже не столько эффективно, за счет

сильного преобладания взаимодействия первичных ОН групп ядра с материалом колонки.

В результате, было показано, что анализ молекулярного строения звездообразных полилактидов является нетривиальной задачей, требующей использования комплекса методов исследования.

## **1.2 Влияние звездообразной структуры на физико-химические свойства полилактида**

Полилактид и его сополимеры являются универсальными термопластичными биоразлагаемыми полиэфирами, чья область применения варьируется от изготовления имплантатов и тканевой инженерии [105–107] до создания лечебных покрытий, микро- и наносомальных систем для замедленного высвобождения и/или доставки лекарственных средств [108–112]. Однако у PLLA можно выделить некоторые особенности, такие как высокая степень кристалличности и сравнительно низкая скорость деградации, что может ограничивать его применения в ряде случаев. Кроме того, для полилактида характерна низкая прочность расплава, что в процессе формования может вызвать такие проблемы, как провисание, утоньшение и неравномерную вытяжку [113].

В настоящее время для улучшения или модификации физико-химических свойств полилактида активно изучаются его аналоги с разветвленной структурой, среди которых звездообразные олиго- и полилактиды занимают особое место. Наличие разветвленности в структуре полимера может обеспечить ряд преимуществ по сравнению с линейными аналогами.

Для детального исследования влияния разветвленного строения на кристаллизацию PLLA в работе [114] были синтезированы линейные (2-х лучевые) и звездообразные 4-х лучевые образцы в диапазоне молекулярных масс от 5 до 60 кДа. Как и ожидалось с увеличением молекулярной массы как линейных, так и звездообразных образцов температура стеклования ( $T_g$ ), плавления ( $T_m$ ) и холодной кристаллизации ( $T_c$ ) возрастала в интервалах 30-60, 90-120 и 130-180 °С, соответственно. При аналогичной молекулярной массе молекул такие параметры

как  $T_g$ ,  $T_m$  и удельная теплота плавления ( $\Delta H_m$ ) у звездообразных образцов оказались ниже, что может оказать существенное влияние на скорость деградации материалов на их основе и кинетику высвобождения лекарственных препаратов. Однако авторы работы отмечают, что при фиксации молекулярной массы луча значения  $T_m$  для линейных полимеров были близки к таковым у звездообразных, что указывает на преимущественное влияние на толщину кристаллитов молекулярной массы одного луча, а не молекулы в целом. Таким образом, при интерпретации свойств звездообразных образцов относительно линейных важно учитывать какие параметры фиксируются при сравнении. Что касается влияния ветвлений на сегментальную подвижность цепей, т.е. на  $T_g$ , то в исследуемом диапазоне молекулярных масс существенного влияния установлено не было. Расчет значений температуры стеклования и плавления при бесконечной молекулярной массе в соответствии с уравнениями Флори и Флори-Фокса [115, 116] показал минимальное расхождение для линейного и 4-х лучевого полимера ( $T_g$  58.5 и 60.6 °C,  $T_m$  179.4 и 178.0 °C). Это указывает на минимальное влияние точки ветвления на эти параметры при высоких молекулярных массах. Степень кристалличности звездообразных полимеров ( $X_c$ ) в ряде случаев оказалась ниже, чем у линейных, что свидетельствует о влиянии ветвлений на количество полимерных цепей, участвующих в формировании кристаллических областей. PLLA способен кристаллизоваться с образованием длинноцепочечных кристаллов в ленгмюровском монослое благодаря ускоренной кристаллизации на поверхности воды. В этой ситуации упаковка цепей может быть проанализирована путем простого измерения толщины ламелей. Так, в работе [117] были синтезированы звездообразные PLLA с числом лучей от 2 до 12 и изучена их кристаллизация в монослое с помощью атомно-силовой микроскопии. Размер ламелей в полимерах, содержащих 2-4 луча, варьировался в пределах  $15 \pm 4$  нм, при этом все лучи были выровнены в одном направлении относительно ядра. При увеличении количества лучей до 6 размер ламелей достигал  $33 \pm 10$  нм, что хорошо коррелирует с теоретическим расчетом  $36 \pm 4$  нм в предположении кристаллизации цепей PLLA в двух направлениях относительно центрального ядра.

В разбавленных растворах звездообразный полилактид обладает более низкими значениями  $[\eta]$ , чем линейный при идентичной молекулярной массе, благодаря меньшему гидродинамическому объему. Это объясняется различием в конформациях в зависимости от структуры макромолекул. Так, для молекулярной массы 2 кДа разница в  $[\eta]$  между линейным и 4-х лучевым PLLA составила 1.15 дл/г [118]. Вязкость растворов и расплавов является одним из ключевых параметров при переработке, формовании и использовании материалов на основе полилактида во многих отраслях биомедицины. Обычно линейный частично-кристаллический PLLA перерабатывают при температурах близких к 200 °С, при этом в процессе литья под давлением из-за высокой вязкости может проявляться сопротивление течению. Все это неизбежно приводит к побочным реакциям, деградации макромолекул и, как следствие, ухудшению конечных механических свойств материалов [119]. Одним из интересных промышленных методов модификации реологических свойств полимерных материалов является внедрение точек ветвления [120]. Эта стратегия широко использовалась в прошлом для реализации переработки полиолефинов и в настоящее время является перспективной и для сложных полиэфиров на основе лактида [121]. Было показано, что у полимеров наблюдается уменьшение вязкости при нулевом сдвиге по мере добавления короткоцепочечных ответвлений в основную цепь. Только когда длина ответвления превышает некоторое критическое значение, сами ответвления учувствуют в формировании сетки зацеплений, что приводит к увеличению вязкости расплава [122]. Закономерно было установлено, что у высокомолекулярных звездообразных полилактидов вязкость при нулевом сдвиге выше на порядок, чем у образцов с линейным молекулярным строением, однако при высоких скоростях сдвига наблюдается обратная картина. Такой тип реологического поведения может быть выгоден для определенных технологических операций [122, 123]. Благодаря наличию одной точки ветвления низкомолекулярные звездообразные PLA характеризуются компактной структурой, что делает их перспективными биосовместимыми пластификаторами. Добавление небольшого количества таких разветвленных молекул к обычному

линейному PLA может резко повысить пластичность и текучесть расплава, без изменения химической природы и основных свойств материала [124]. В частности, при добавлении 10 и 20 масс.% 3-х лучевого PLLA (19 кДа) к линейному с молекулярной массой 110 кДа скорость течения его расплава увеличилась с 4.4 до 5.6 и 6.4 г/10мин, соответственно, а механическая вязкость возросла в 2.5 раза [125]. Удлинение при разрыве по сравнению с 11% у чистого полилактида увеличилось после добавления звездообразного пластификатора до 17 и 25%, в тоже время модуль Юнга уменьшился незначительно с 1.9 до 1.8 и 1.7 ГПа, соответственно. Одним из способов решения проблемы низкой прочности расплава PLA является превращение его в иономер, т.е. материал содержащий до 15 моль.% ионных групп, способный формировать наноразмерные ионные кластеры за счет микрофазного разделения из диэлектрической среды полимера. Благодаря этому иономеры обладают улучшенными термическими и механическими характеристиками, причем взаимодействия между ионными группами действуют как обратимые сшивки, обеспечивая физические характеристики сшитого полимера наряду с возможностью переработки полимера в растворе или в расплаве при повышенных температурах [126]. Такого рода материалы к тому же способны проявлять свойства самозалечивания и памяти формы [127], что открывает целый ряд новых применений, в том числе и в биомедицине. Очевидно, что влияние одной или двух концевых ионных групп на свойства линейного PLA в случае высокой молекулярной массы полимера незначительно. Однако для молекул с низкими и средними значениями молекулярных масс, взаимодействия между концевыми сегментами может существенно влиять на свойства материалов. Увеличить содержание концевых групп в молекуле полилактида можно за счет внедрения в его структуру точек ветвления. В работе [113] было показано, что 6-ти лучевые PLLA, содержащие концевые ионные группы, проявляют в расплавленном состоянии вязкоупругие свойства в отличие от звездообразных гомополимеров с гидроксильными группами. Увеличение модуля упругости авторы напрямую связывают с формированием наноразмерных ионных кластеров, при этом с увеличением количества ионных групп на молекулу PLLA возрастают модули

накопления и потерь. Значения модуля линейного участка на реологических кривых указывают на то, что эффективная молекулярная масса кластеров больше молекулярной массы луча PLLA на несколько порядков. Это означает, что значительная доля звезд участвует в формировании ионной сетки посредством дипольных взаимодействий.

Определение факторов, влияющих на гидролитическую стабильность PLA, является важным с практической точки зрения. Дegradaция полилактида зависит от многих факторов, таких как молекулярная масса, степень кристалличности, наличие примесей, температура, pH, количество и тип функциональных концевых групп, а также наличие в системе активных добавок, например, ферментов. Время деградации PLA в зависимости от сочетания этих факторов в среднем может варьироваться от нескольких месяцев до 4-х лет. Высокомолекулярный PLA не подвергается деградации под действием микроорганизмов и может быть разложен ими только после расщепления макромолекул полимера на более короткие цепи путем гидролиза [128]. Так, например, в условиях компостирования сначала под действием тепла и влаги будет происходить гидролиз PLA с образованием макромолекул с молекулярной массой 15-40 кДа, и только после этого микроорганизмы будут разрушать цепочки. В первую очередь микроорганизмы выделяют внеклеточную деполимеразу для расщепления макромолекул до олигомеров, димеров и мономеров. Для стимуляции этого процесса зачастую требуется наличие желатина, некоторых аминокислот или пептидов [129]. Образующиеся низкомолекулярные продукты деградации уже способны проникать через клеточную мембрану и расщепляться до воды, углекислого газа или метана, в зависимости от того задействуется ли аэробный или анаэробный процесс. В ходе гидролиза сложноэфирных связей образуются цепочки, содержащие свободные концевые карбоксильные группы, которые понижают общий pH среды, что неизбежно ускоряет процесс деградации. Известно также, что гидролиз на начальном этапе преимущественно протекает в аморфных областях полимерной матрицы, нежели чем в кристаллических, что приводит к увеличению степени кристалличности образцов. Можно выделить следующие основные параметры,

контролирующие скорость гидролитической деградации PLA: скорость диффузии воды и ее количество, коэффициент распределения продуктов деградации внутри полимера, их растворимость и скорость диффузии из матрицы [129]. На практике, в зависимости от того преобладает ли скорость гидролиза сложноэфирных связей над скоростью диффузии воды в материале или наоборот, можно выделить поверхностный механизм деградации или объемный, соответственно. Первый подразумевает изменение формы образца вследствие деградации и вымывания поверхностных слоев, а второй – равномерное протекание процесса деградации по всему объему полимера. Интересно отметить, что с определенного момента увеличение количества поглощенной воды образцом может никак не способствовать ускорению процесса деградации. В работе [130] с помощью спектроскопии ЯМР было установлено, что вода в образце присутствует в связанном с полимерной цепью виде, посредством водородных связей со сложноэфирными группами, и в так называемом свободном состоянии. В процессе гидролиза будет участвовать в данном случае только связанная вода, концентрация которой выходит на плато по мере роста общего количества воды в системе.

Поскольку деградация PLLA на начальных этапах преимущественно происходит в аморфных областях, то в определенной степени увеличение количества лучей приходящихся на молекулу может повысить скорость ферментативного и щелочного гидролиза [131]. Важно отметить, что при анализе влияния молекулярного строения на скорость деградации между сравниваемыми образцами необходимо учитывать соотношения общей молекулярной массы молекулы и молекулярной массы, входящих в состав лучей. Так, в работе [132] было показано, что скорость ферментативного гидролиза монослоев звездообразных PLLA под действием протеиназы «К» может зависеть от ММ луча PLLA, а не от общей ММ полимера. Чтобы оценить влияние звездообразного молекулярного строения на скорость и механизм деградации PDLLA в воде при 37 °C, были получены тонкие пленки на основе полимеров линейного, 4-х и 6-ти лучевого строения [58]. В течение эксперимента образцы на основе линейных PDLLA демонстрировали более высокую скорость деградации, при этом

максимальное снижение массы образца и  $M_n$  полимера к концу 32 суток достигло порядка 55 и 30%, соответственно. В то же время динамика уменьшения этих показателей у звездообразных PDLA оказалась вдвое меньше практически на каждом временном интервале. К 15-му дню на макроскопическом уровне при аналогичной ММ деградация линейного образца сопровождалась потерей целостности пленки (Рисунок 1.22), в то время как звездообразный 4-х лучевой PDLA сохранял свою форму. При детальном рассмотрении видно, что уже на 5-ый день поверхность пленок на основе линейного полимера быстро покрылась «кратерами», а в дальнейшем и «пузырьками». Аналогичные изменения наблюдались и у образца на основе звездообразного полимера, однако в гораздо меньшем количестве. Основываясь на интерпретации данных по потере среднечисловой молекулярной массы и массы пленок, а также данных по микроскопии, авторами был сделан вывод о преимущественном протекании поверхностного гидролиза у звездообразных образцов, в отличие от объемного механизма у линейных аналогов.

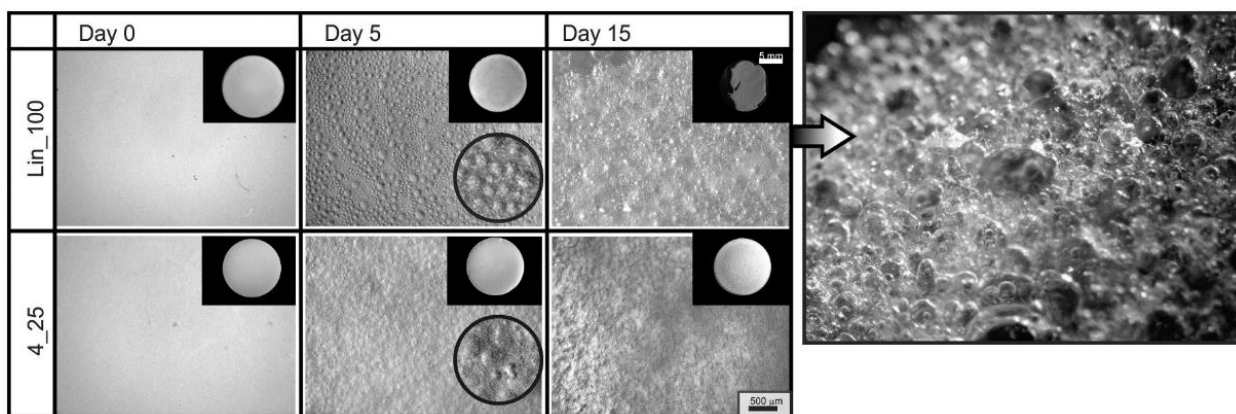


Рисунок 1.22 – Изображения поверхности пленок в процессе деградации (4\_25 – 4-х лучевой PDLA, Lin\_100 – линейный аналог) [58]

Еще одним инструментом влияния на кинетику деградации полилактида является изменение химического состава концевых функциональных групп. Было показано, что на сорбцию воды в материал существенно влияет природа концевых групп, особенно в случае низкомолекулярных образцов ( $MM < 10^4$  Да). Так, при 37 °C и pH = 7.4 PLA с концевыми карбоксильными группами за 22 дня сорбировал порядка 70% воды, в то время как у его аналога с гидроксильными группами это

значение не превышало нескольких процентов [133]. Что касается влияния молекулярного строения, то в данной работе [134] было показано, что масса линейного PLLA в процессе деградации при 80 °C в течение 96 часов практически не изменяется и слабо зависит от типа концевой группы (ОН, Cl, NH<sub>2</sub> и COOH), в то время как у 4-х лучевых PLLA наблюдались существенные отличия. Наибольшей устойчивостью к гидролизу в данных условиях обладали 4-х лучевые образцы с концевыми Cl и NH<sub>2</sub> группами, в то время как у образца с карбоксильными группами масса к концу эксперимента уменьшилась почти на 30% [134]. Данный факт открывает дополнительные возможности регулирования скорости гидролиза полилактидов посредством изменения их молекулярного строения и концевых групп.

Стоит отметить, что в литературе представлены некоторые работы, противоречащие друг другу в вопросе влияния звездообразной структуры на кинетику деградации. По большей части это может являться следствием расхождения условий проведения экспериментов и отличия в морфологии самих исследуемых образцов. Вдобавок сравнение результатов по деградации звездообразных PLA, синтезированных в лаборатории, с промышленными линейными аналогами является не совсем корректным, поскольку на скорость деградации промышленного PLA может повлиять наличие различных низкомолекулярных добавок или более широкое молекулярно-массовое распределение. В то же время в литературе практически не встречаются работы, в которых деградацию звездообразных PLA проводили бы вплоть до 80-90% потери молекулярной массы, что позволило бы провести качественное моделирование кинетики данного процесса. Все это указывает на потребность проведения дополнительных исследований деградации звездообразных PLA, в частности в виде материалов по своей форме и методике приготовления схожих с имплантируемыми изделиями, что позволило бы с большей точностью предсказывать их поведение в организме человека.

### **1.3 Основные области применения звездообразных полимеров на основе сложных полиэфиров**

#### **1.3.1 Системы доставки лекарственных средств**

Рак является общим термином для ряда заболеваний, характеризующихся неконтролируемым, случайным делением клеток с высоким риском инвазивности. Каждый год Американское онкологическое общество оценивает число новых случаев рака, и в 2023 году только в США выявлено порядка 2 млн новых случаев, при этом смертность, по некоторым прогнозам, может достигать 600 тыс. человек. Как результат, рак является одной из важнейших проблем здравоохранения во всем мире. К традиционным терапевтическим способам лечения относятся хирургия, химиотерапия, лучевая и гормональная терапия, а также иммунотерапия [135]. Несмотря на то, что лучевая или химиотерапия являются практически обязательными элементами лечения опухолей разного типа, их применение зачастую связано с острыми побочными эффектами и высоким риском рецидивов. К наиболее распространенным побочным эффектам относятся нейропатия, подавление функций костного мозга, желудочно-кишечные и кожные расстройства, выпадение волос и утомляемость. Относительно низкая селективность воздействия такого рода терапий приводит к тому, что цитостаз или воздействие цитостатиков, как группы препаратов, нарушающих процессы роста, развития и деления клеток, затрагивают и здоровые клетки организма. Эти факторы наряду с возможными специфическими для индивидуальных препаратов побочными эффектами, как кардиотоксичность, могут существенно ухудшать качество жизни пациентов. Поэтому одной из основных биомедицинских задач полимерной химии является решение вышеупомянутых проблем и поиск новых стратегии целевой терапии рака.

Последнее время различные полимерные материалы, такие как гидрогели, нано- и микрочастицы широко исследуются научными группами по всему миру для применения в качестве носителей лекарственных средств в противоопухолевой терапии. Для осознанного использования преимуществ наночастиц касательно

возможностей селективной доставки лекарств в ткани/органы мишени важно понимать влияние их физико-химических свойств (химической природы, размера, морфологии, поверхностного заряда, гидрофильно-гидрофобного баланса) на биораспределение в организме и вывод из него. Кроме того, размер наночастиц будет влиять на некоторые важные биологические явления, такие как период полувыведения из крови, характер клиренса, степень поглощения макрофагами и эффективность проникновения наночастиц в нарушенную сосудистую сеть раковых тканей [136]. В конце 1980-х [137] было обнаружено, что противоопухолевый антибиотик неокарциностатин, ковалентно связанный с сополимером стирола и малеиновой кислоты, накапливается в раковых клетках от 10 до 100 раз эффективнее, чем в несвязанном виде. Кроме того, было обнаружено, что концентрация конъюгата в плазме крови через 24 часа после внутривенного введения как у мышей, так и у пациентов была более чем в 20 раз выше, чем у несвязанного неокарциностатина [137]. Совокупность дальнейших исследований по визуализации накопления различных белков с молекулярной массой от 20 до 160 кДа показала, что такое преимущественное распределение макромолекул связано с возникновением увеличенных фенестраций (межклеточных пор), повреждений кровеносных сосудов и плохим лимфодренажем в раковых тканях [138, 139]. Это явление, позволяющее наночастицам с большей эффективностью накапливаться в опухоли по сравнению со здоровыми тканями, получило название «эффект повышенного проникновения и удержания» (EPR-эффект) (Рисунок 1.23). В условиях гипоксии быстро делящиеся раковые клетки стремятся задействовать больше кровеносных сосудов или поглотить уже существующие, что неизбежно приводит к формированию нарушений в эндотелии, так называемой фенестрации. Размер этих пор может варьироваться от 200 до 2000 нм в зависимости от типа рака [135]. Нарушение функции лимфатических сосудов, отвечающих за отток лимфы из тканей и органов, наряду с вышесказанным способствует накоплению наночастиц в раковых клетках. Такого рода явление как EPR-эффект не будет наблюдаться у низкомолекулярных молекул, проникающих во все клетки и обладающих коротким периодом циркуляции в крови. В результате для

существенного улучшения фармакокинетики и селективности действия противораковых препаратов широко используется подход по их инкапсуляции в полимерные наночастицы различного размера, морфологии и химической природы.

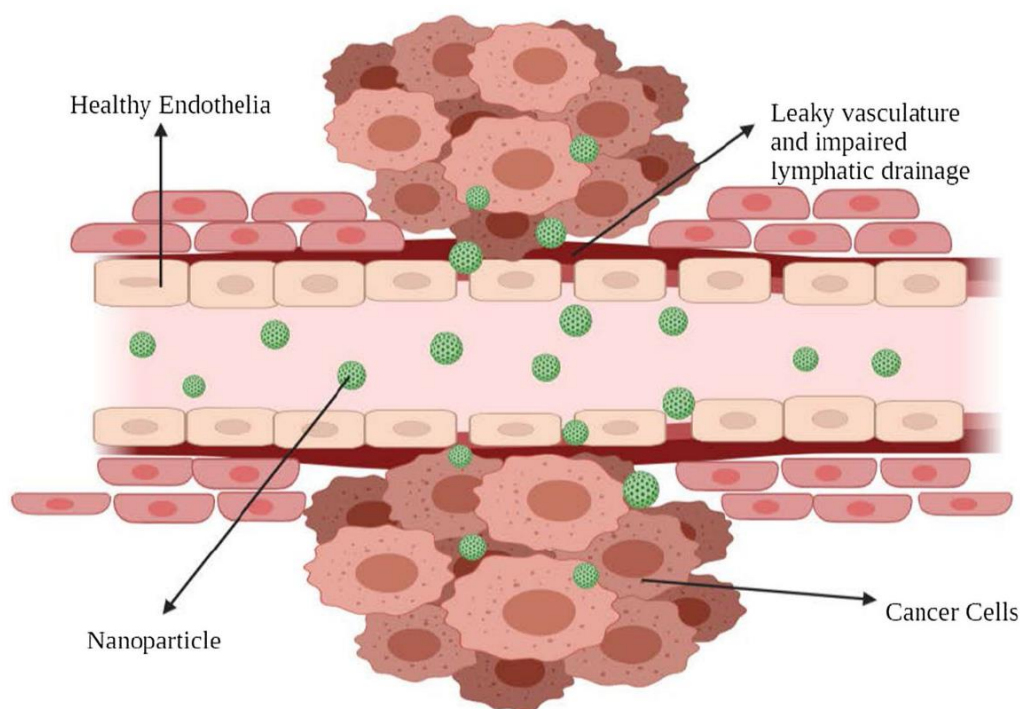


Рисунок 1.23 – Схематическое изображение EPR-эффекта [135]

Таким образом, основополагающим требованием при разработке наночастиц, направленных на лечение раковых опухолей, является придание им нужного размера для соблюдения требований пролонгированной циркуляции. В то же время относительно быстрый почечный или печеночный клиренс может снизить неспецифическое фоновое поглощение наночастиц в основных органах, что может улучшить визуализацию опухоли и снизить потенциальную токсичность [140]. Несмотря на понимание общих принципов взаимодействия организма человека с полимерными наночастицами, в литературе представлено ограниченное количество работ посвященных определению фундаментальных физико-химических свойств наночастиц, влияющих на их фармакокинетику, биораспределение, или селективность по отношению к опухолям. Это, в первую очередь, связано с трудоемкостью проведения такого рода исследований, а также

сосредоточенностью авторов на поиске новых материалов и реализации связанных с ними концепций.

Ранее считалось, что наночастицы с размером от 100 до 400 нм являются оптимальными для так называемого пассивного нацеливания на раковые клетки за счет EPR-эффекта, однако на данный момент этот вопрос в литературе не находит однозначного ответа. Так, в работе [141] было изучено накопление наночастиц на основе блок-сополимера PEG и полиглутаминовой кислоты, нагруженных противораковым комплексом платины (II) в раковые клетки линии мышинной аденокарциномы толстой кишки (C26) и человеческой аденокарциномы поджелудочной железы (ВхРС3). Как показали исследования, наночастицы с гидродинамическим диаметром 30, 50, 70 и 100 нм сопоставимо по эффективности проникали и накапливались в клетках линии C26, обладающих гиперпроницаемостью и высокой васкуляризацией. В это же время в случае опухоли ВхРС3, характеризующейся низкой сосудистой проницаемостью и плотным фиброзом, накопление наночастиц с размером 30 нм оказалось в два и четыре раза выше, чем у их аналогов с размерами 50 и 70 нм, соответственно. Различия в накоплении, безусловно, оказало влияние и на противоопухолевую эффективность наночастиц. Для детального исследования влияния размеров наночастиц на их биораспределение и фармакокинетику была получена серия конъюгатов PEG с ММ от 1 до 60 кДа и красителя, обладающего флуоресценцией в ближней инфракрасной области [140]. Эксперименты проводились на мышах линии CD-1 с опухолью HeLa. Как видно из Рисунка 1.24 спустя час после однократного внутривенного введения большая часть образцов с ММ менее 20 кДа и гидродинамическими диаметрами до 11 нм накапливается в мочевом пузыре, в то время как более высокомолекулярные PEG с размером 13 и 19 нм распределяются по всем основным органам и тканям. Такой характер биораспределения является довольно закономерным учитывая тот факт, что быстрый почечный клиренс будет наблюдаться для частиц с размерами порядка 6-8 нм за счет гломерулярной фильтрации [142]. Оценив концентрацию PEG в моче, было установлено, что периоды полувыведения наночастиц с диаметром 1 и 19 нм отличаются

практически в 10 раз и составляют 24 и 224 минуты, соответственно. Как обсуждалось ранее, более длительный период полувыведения является благоприятным условием накопления наночастиц в опухоли, так как увеличивается вероятность достижения терапевтического очага. Однако, оценив соотношения наночастиц, накопившихся за 24 часа в опухоли по сравнению с наночастицами в остальных здоровых тканях и органах оказалось, что наилучший результат был зарегистрирован у образца PEG 20кДа с размером 11 нм (Рисунок 1.24). Быстрый почечный клиренс наночастиц может оказаться более предпочтительным по сравнению с печеночным, поскольку в таком случае возможно снизить потенциальную токсичность наночастиц за счет незначительного участия в метаболизме и минимальной интернализации в здоровые клетки. Все это указывает на то, что очень важно принимать во внимание многие биологические факторы и фармакокинетику препаратов при определении оптимальных размеров наночастиц.

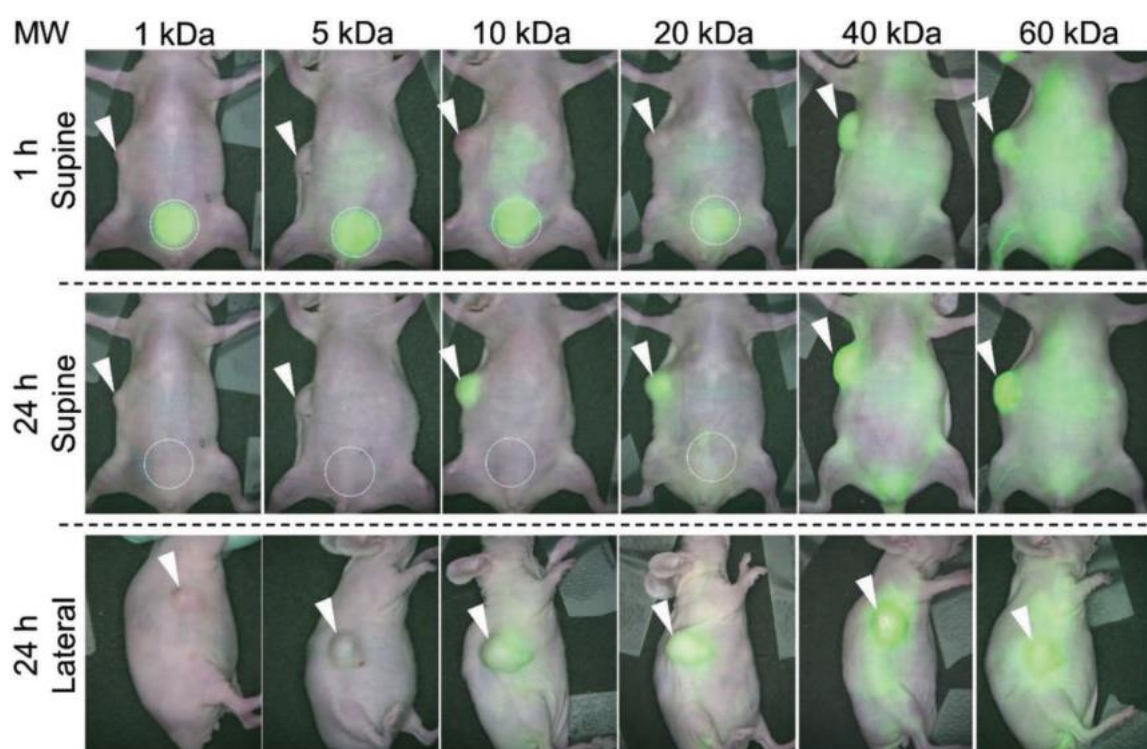


Рисунок 1.24 – Биораспределение флуоресцентно-меченого полиэтиленгликоля с различной молекулярной массой в организме мышей спустя 1 и 24 часа после инъекции (белые стрелки указывают на места расположения опухолей, а белые круги - на область скопления мочи в мочевом пузыре) [140]

В качестве еще одного подхода для селективной доставки наночастиц к раковым клеткам можно выделить активное нацеливание. Его принцип основан на взаимодействии лиганда, связанного с наночастицей, с молекулами или рецепторами, специфически экспрессированными или сверхэкспрессированными на клетках-мишенях. Такой типа нацеливания еще называют лиганд-опосредованным. Важнейшим принципом активного нацеливания является идентификация лиганда, находящегося на поверхности наночастицы, рецепторами клетки, в результате чего запускается процесс сворачивания мембраны и интернализации наночастиц через рецептор-опосредованный эндоцитоз (Рисунок 1.25).

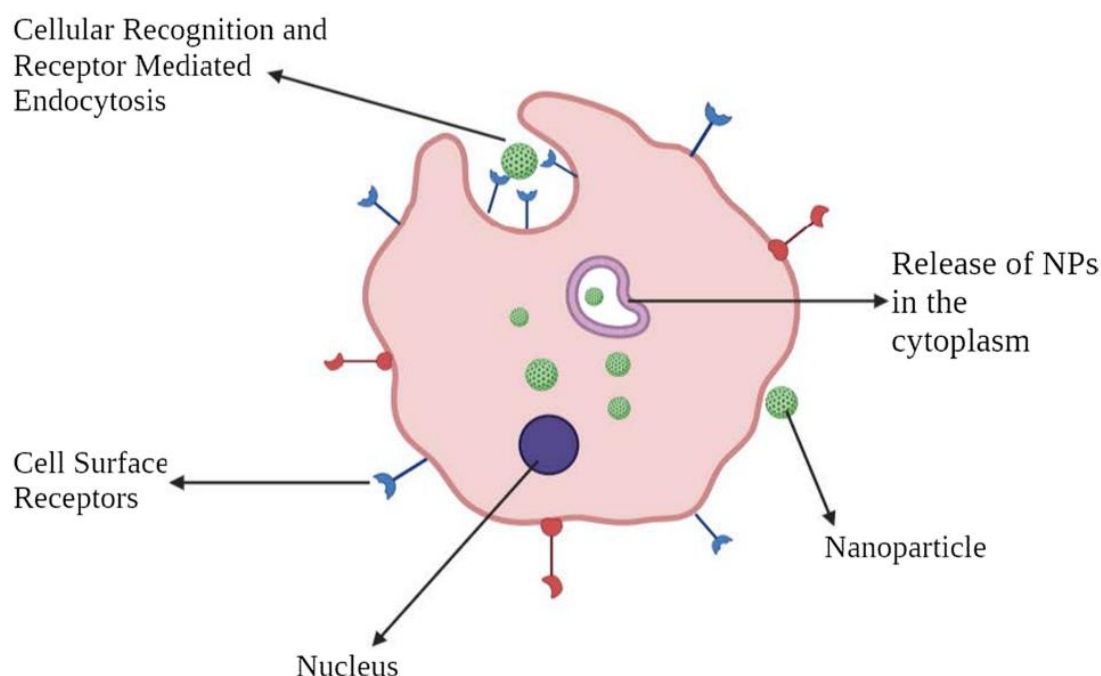


Рисунок 1.25 – Схематическое изображение рецептор-опосредованного механизма эндоцитоза полимерных наночастиц, содержащих на поверхности специфические лиганды [135]

Наиболее изученными в этом плане рецепторами являются рецепторы трансферрина, фолатов, глиопротеинов и эпидермального фактора роста. Например, клетки карциномы яичников A2780 сверхэкспрессируют трансферрин. Эту особенность используют трансферрин-модифицированные PEG-фосфатидил-этаноламиновые наночастицы, которые специфически нацеливаются на такие клетки [135]. Другим альтернативным методом является нацеливание на клетки,

соседствующие с раковыми, например, на ангиогенные эндотелиальные клетки. Эти клетки также имеют тесный контакт с кровеносными сосудами опухоли. Такая стратегия позволяет создать условия для гипоксии и некроза за счет уменьшения кровоснабжения раковых клеток. В совокупности можно сказать, что использования, полимерных наночастиц для направленной терапии раковых заболеваний является перспективным направлением в настоящее время.

В литературе можно найти достаточное количество работ, посвященных инкапсуляции лекарственных препаратов и модельных веществ в наночастицы на основе звездообразного PLA и его сополимеров [143–156]. Повышенный интерес к использованию именно разветвленных молекул в качестве материала для создания наночастиц вызван более низкими значениями гидродинамических диаметров, меньшей вязкостью растворов и возможностью в более широком диапазоне варьировать составы макромолекул и их молекулярное строение, тем самым создавая уникальные композиции с новыми свойствами. Большее количество функциональных групп, которые могут быть модифицированы различными биологически активными соединениями, также является преимуществом по сравнению с линейными аналогами. Наличие ветвлений может влиять и на скорость высвобождения препарата. Например, Burke с коллегами [58] показали, что высвобождение аторвастатина из пленок и наночастиц, приготовленных эмульсионным методом, происходит медленнее в случае звездообразного полилактида и имеет кинетику нулевого порядка, что, вероятно, связано с механизмом поверхностной деградации полимера. Гидродинамические диаметры наночастиц на основе 4-лучевого звездообразного и линейного PDLLA составили порядка 175 и 200 нм соответственно, а эффективность загрузки оказалась несколько выше (~ 81%) для звездообразного полимера. Многие работы по получению наночастиц связаны с использованием амфифильных блок-сополимеров на основе лактида, способных самоорганизовываться в надмолекулярные структуры в водной среде. В случае звездообразных макромолекул гидрофильно-гидрофобный баланс блок-сополимеров, влияющий на структуру и размер образующихся наночастиц, можно регулировать не только

посредством изменения молекулярной массы различных блоков, но также за счет варьирования их числа, приходящихся на молекулу. Так, в работе [157] было показано, что размер наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых амфифильных блок-сополимеров полилактид-со-гликолид-PEG с аналогичной молекулярной массой блоков возрастает от 80 до 200 нм с увеличением числа лучей. При исследовании кинетики высвобождения доксорубина из полученных наночастиц было установлено, что увеличение числа лучей приводит к уменьшению скорости высвобождения препарата, однако наибольшее клеточное поглощение и как следствие наибольшая токсичность наблюдалась в случае 4-х лучевых образцов, что авторы связывали с подходящим размером самих частиц. Изменение молекулярной массы гидрофильных блоков может повлиять не только на размер образующихся наночастиц, но и на кинетику высвобождения препарата. При увеличении ММ гидрофильного PEG с 2 до 6 кДа, в составе 4-х лучевых блок-сополимеров PLLA-PEG, скорость высвобождения ибупрофена заметно снизилась, в то время как гидродинамический диаметр наночастиц увеличился с 105 до 121 нм [154]. Все это указывает на вариативность многих основополагающих параметров наночастиц, полученных из полимеров, имеющих точки ветвления. Кроме того, сами по себе молекулы ядер, использующиеся как центры роста полилактидных лучей, могут являться соединениями, участвующими в метаболизме человека, или биологически активными веществами. В одной из работ в качестве со-инициатора для синтеза 3-х лучевого блок-сополимера использовалась молекула холиевой кислоты, являющаяся одной из двух основных желчных кислот, вырабатываемых печенью из холестерина [149]. Авторы данной работы [152] считают, что наночастицы, сочетающие в себе диагностическую визуализацию с терапевтической доставкой лекарств, являются нано-медикаментами нового поколения. Для создания такого рода наночастиц ими в качестве со-инициатора для синтеза 8-ми лучевого блок-сополимера PLA с полиэтилэтиленфосфатом была использована молекула флуоресцирующего диимида перилена. Наличие флуоресцирующего ядра в структуре полимера позволило авторам визуализировать не только клеточное поглощение наночастиц содержащих

каптотецин, но и установить биораспределение их в организме мышей, не прибегая к дополнительным способам связывания красителей с наночастицами.

Как правило, загрузка лекарственных средств в наночастицы происходит в процессе самоорганизации полимерных молекул в водной среде. Удержание препаратов в наночастицах может происходить за счет водородных связей, гидрофильно-гидрофобных взаимодействий, ионных сил и др. В это же время высвобождение низкомолекулярных активных компонентов осуществляется посредством диффузии или естественного распада наночастиц. Отсутствие «надежной» фиксации лекарств нередко приводит к одной распространенной проблеме, а именно резкому высвобождению большей части препарата за короткий промежуток времени после внедрения в организм, что неизбежно приводит к нежелательному токсическому эффекту. Помимо этого, к недостаткам таких систем можно отнести сложность инкапсуляции препаратов, плохо смешивающихся с полимерной матрицей, или возможную относительно низкую степени загрузки (порядка нескольких процентов). Ключом к решению данных проблем может стать создания конъюгатов полимерных носителей с лекарственными веществами. Это позволит улучшить степень загрузки и совместимость активного компонента, минимизировать «взрывной» характер высвобождения, ведь в таком случае этот процесс будет контролироваться разрывом ковалентной связи. Тем не менее, создание таких конъюгатов часто требует сложных путей синтеза, выходящих за рамки стадий синтеза самого полимера, обычно включающих этапы активации и защиты функциональных групп. Как известно, для инициирования полимеризации сложных эфиров, в частности лактида, необходимо наличие гидроксильной группы, которая в свою очередь присутствует во многих молекулах противораковых препаратов. Развитие низкотемпературных методов растворной ROP позволило исследователям уменьшить количество стадий, требуемых для создания конъюгатов и полимеризовать лактиды и лактоны напрямую на молекулах ЛС [158] (Рисунок 1.26).

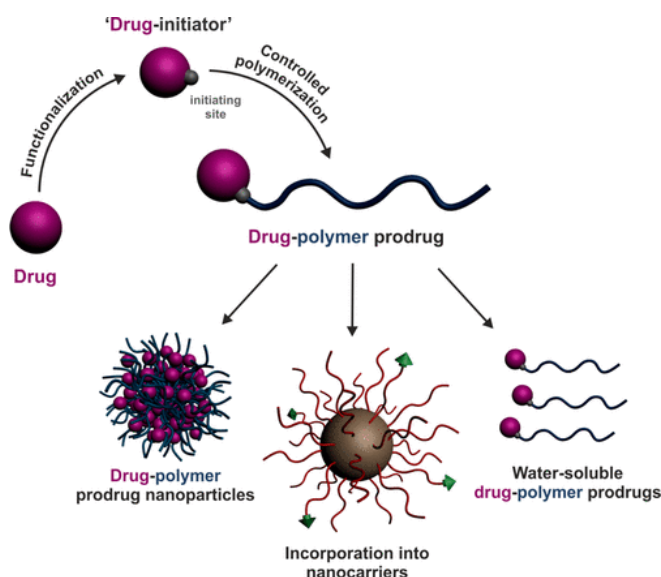


Рисунок 1.26 – Дизайн эксперимента по иницированию полимеризации на молекулах лекарственных веществ и использованию их в области доставки лекарств [158]

Этот подход был продемонстрирован на примере пяти широко известных противораковых препаратах, имеющих одну или две реакционно способные ОН-группы: паклитаксел, доцетаксел, камптоцетин, доксорубицин и гозерелин [158]. Известно, что дипиридамол способен существенно улучшить антипролиферативные свойства 5-фторурацила (5-Fu), препарата использующегося для лечения колоректального рака [159, 160]. Однако из-за различий в скорости метаболизма, а также высокого уровня кишечного всасывания дипиридамола эта комбинация не прошла клинические испытания. Для того чтобы преодолеть указанные проблемы авторы работы [161] разработали наносомальную систему доставки дипиридамола и 5-Fu. Наночастицы были получены на основе 4-х лучевого полилактида, причем в качестве со-инициатора полимеризации выступали молекулы самого дипиридамола. Внедрение этого препарата в качестве ядра звездообразных макромолекул может существенно увеличить его продолжительность существования в плазме крови и снизить скорость всасывания в желудочно-кишечном тракте. Кроме того, дипиридамол обладает флуоресценцией, что облегчает визуализацию наночастиц в клетках. На втором этапе по концевым группам полилактидных лучей были ковалентно присоединены

молекулы противоракового препарата 5-Fu, что позволило избежать резкого характера его высвобождения из наночастиц. Можно сказать, что создание мультифункциональных наносомальных систем на основе разветвленных PLA, способных не только устранять существующие проблемы в области терапии раковых заболеваний, но и обеспечивать создание новых стратегий, является одним из ключевых направлений в биомедицинской полимерной химии.

### **1.3.2 Материалы для тканевой инженерии**

Тканевая инженерия используется для создания искусственных заменителей дефектных тканей и органов, а также для регенерации тканей. Сама матрица может служить субстратом для прикрепления, роста и миграции клеток или может быть использована в качестве носителя лекарственного средства для активизации клеточных функций в данной области. Материалы на основе PLA и его сополимеров являются предпочтительными кандидатами для разработки тканеинженерных конструкций, таких как временные протезы или трехмерные пористые структуры, применяемые в качестве каркасов для тканевой инженерии и создания систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением. Именно за счет вариативности молекулярного строения и состава многие научные группы продемонстрировали [162] возможность использования полимеров на основе PLA для создания материалов с уникальными свойствами, от мягких гидрогелей до материалов с модулем упругости порядка 3 ГПа, применяемых для регенерации костных тканей.

Среди различных стратегий изготовления клеточных каркасов электроспиннинг выделяется за счет своей относительно простоты и универсальности, обеспечивая получение нетканых материалов с нано- и микроразмерными волокнами [163]. Основными недостатками материалов, полученных с помощью этого метода, является плохая инфильтрация и миграция клеток из-за высокой плотности волокон, что снижает преимущества объемного роста культуры тканей в этих материалах. Для решения этих проблем и создания каркасов подходящих для инженерии мягких тканей, авторами работы [164] были

получены нетканые материалы, содержащие макропоры различной структуры на основе 8-ми лучевого блок-сополимера PEG-PLA. В результате каркасы с сотоподобной микроструктурой обладали анизотропией механических свойств и способностью сохранять их даже после частичной деградации. Результирующая ориентация волокон объясняет анизотропное поведение при растяжении, причем материал на основе звездообразного блок-сополимера выдерживал большую деформацию при разрыве, чем его линейный аналог. Кроме того, было показано, что сотовая макроструктура улучшает клеточную пролиферацию по сравнению с немакропористыми волокнами, а также стимулирует трехмерную клеточную инвазию, что является критическими параметрами для регенерации ткани. Использование электропроводящих полимеров, например, полианилина в качестве компонента каркаса клеточного матрикса может оказать положительное влияние, поскольку некоторые ткани, такие как кости, нервы и мышцы, реагируют на электрические поля и стимулы. Кроме того, такие функции клеток как прикрепление, миграция, пролиферация и дифференциация могут регулироваться электропроводящими полимерами с помощью электрической стимуляции. Однако при использовании проводящих полимеров в качестве тканеинженерных каркасов можно столкнуться с проблемой плохой растворимости материалов в большинстве распространенных растворителей, плохим взаимодействием полимеров с клетками и отсутствием биоразложения. Massoumi с коллегами показал, что на основе синтезированного звездообразного блок-сополимера полианилина с PDLA возможно получить нетканый материал методом электроспиннинга с диаметром волокна от 70 до 200 нм [165]. Полученный материал обладал хорошей биосовместимостью, электропроводностью на уровне 0.05 См/см, что в совокупности улучшало адгезию и рост клеток линии фибробластов L929.

Наряду с неткаными материалами для тканевой инженерии активно изучаются различного рода гидрогели на основе блок-сополимеров PLA-PEG. Гидрогели представляют собой физически или химически сшитые полимерные сетки, которые могут поглощать значительное количество воды благодаря наличию гидрофильных цепей или функциональных групп. Физическая сшивка

полимеров на основе полилактида может происходить за счет гидрофобных взаимодействий сегментов, стереокомплексобразования цепей энантиомерной природы (PDLA PLLA), ионных взаимодействий, в то время как наиболее распространенным химическим вариантом сшивки является радикальный механизм с использованием фотоинициаторов [166]. Реологические измерения показали, что стереокомплексные гидрогели на основе 8-ми лучевого PEG-PLA обладают более высоким модулем накопления по сравнению с гидрогелями на основе линейных блок-сополимеров. Кроме того, образцы звездообразных гидрогелей при 37 °C имели модуль упругости 1.9 кПа по сравнению с 0.9 кПа у линейных, что авторы связывают с большим числом цепей на молекулу, участвующих в образовании стереокомплекса [167]. Существуют работы, в которых с целью быстрого формирования прочной сетки прибегают к комбинированному физико-химическому методу сшивки [168]. В целом использование химических сшивок позволяет получать более стабильные гидрогели с лучшими механическими свойствами, однако это может быть сопряжено с использованием токсичных сшивающих агентов.

Клеи на основе гидрогелей для лечения поврежденных тканей являются интересными материалами, поскольку эти системы обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами заживления ран, такими как наложение швов. В настоящее время фибрин и цианакрилатные клеи являются наиболее популярными биоадгезивами. Однако обе эти системы имеют свои недостатки. Фибриновые клеи дороги, характеризуются ограниченной адгезионной прочностью и наличием проблем с биосовместимостью, поскольку в их основе лежит фибриноген, который чаще всего получают из плазмы крови человека. Другие клеевые композиции производятся из бычьего сырья, что может повышать риск возникновения аллергической реакции. Цианоакрилаты хорошо известны своей высокой адгезивностью, но их токсичность ограничивает их применение только для кожных покровов. В недавней работе для решения вышеуказанных проблем авторы поставили перед собой задачу, используя преимущества звездообразных амфифильных сополимеров PEG-PLA разработать новые

биоадгезивные и биоразлагаемые материалы [169]. Для этого были синтезированы 8-ми лучевые PEG-PDLLA с ММ блоков 20 кДа и 7.5 кДа, соответственно. Большое число функциональных групп увеличивает возможность взаимодействия макромолекул гидрогеля с тканями по сравнению с линейными блок-сополимерами. В одном случае для увеличения адгезии материалов к живым тканям концевые группы звездообразных PEG-PDLLA были модифицированы метакриловым остатком для реализации подхода первоначальной диффузии полимера в ткань с последующим сшиванием молекул по двойным связям. В качестве альтернативы была произведена модификация концевых групп катехоловыми фрагментами, способными образовывать водородные связи с различными поверхностными химическими группами живых тканей. Кроме того, катехоловые группы могут быть окислены до хинонов, в результате чего получается адгезив, способный создавать ковалентные связи по реакции Михаэля. В сравнении с широко используемыми для сшивки производными метакрилата, преимущество катехоловых биоадгезивов заключается в отсутствии необходимости инициирования реакций сшивки УФ-облучением, которое может привести к поражению клеток в зависимости от места применения. Гидрогели на основе образцов, модифицированных метакрилатом с концентрацией 10 масс.%, продемонстрировали прочность адгезии 293 кПа, аналогичную цианоакрилату (332 кПа) на желатиновом покрытии. В свою очередь, катехоловые системы показали более высокие значения (11 и 19 кПа) по сравнению с фибриновым клеем (7 кПа). Была также продемонстрирована [169] способность полученных гидрогелей к биоразложению и отсутствие проявлений острой цитотоксичности, что подтверждает возможность их использования в качестве новых биоадгезивных систем.

Таким образом, основываясь на представленных результатах звездообразные PLA можно отнести к классу полимеров, подходящих не только для создания мультифункциональных материалов нового поколения, способных обеспечить решение комплексных задач, но и для улучшения уже существующих концепций в биомедицине.

## 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Реактивы и материалы

**Мономеры:** В качестве мономеров для синтеза звездообразных полилактидов использовали L- и D,L-лактид (3,6-диметил-1,4-диоксан-2,5-дион) производства «Corbion» (99%). Перед проведением полимеризации мономеры были дважды перекристаллизованы из этилацетата для удаления возможных примесей гидроксилсодержащих соединений, а именно воды и молочной кислоты. Контроль над остаточным содержанием воды проводили с помощью кулонометрического титрования по Карлу Фишеру, а молочной кислоты – спектрофотометрически. Удовлетворительной остаточной концентрацией для МК считалось значение не более  $10^{-7}$  моль/г, а для воды – 50 массовых ppm. В случае необходимости, перекристаллизацию проводили повторно, после чего мономеры сушили при температуре 50 °С и давлении менее 10 мбар в течение 4 часов.

**Катализаторы и со-инициаторы ROP:** Для проведения полимеризации с раскрытием цикла в качестве катализатора использовали 2-этилгексаноат олова (94.5 %, «Aldrich») без очистки. Используемые для синтеза 3-х, 4-х и 6-ти лучевых полилактидов мультифункциональные со-инициаторы: триметилолпропан (2-этил-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол, TMP, 98%), пентаэритрит (2,2-бис(гидроксиметил)пропан-1,3-диол, PTOL, 98%) и дипентаэритрит (2,2'-(оксибис(метилен))бис(2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол), DPTOL, 87%) производства «Aldrich» были высушены при температуре 80 °С в вакуумном шкафу и хранились над  $P_2O_5$  для предотвращения сорбции воды. Для органокатализируемой полимеризации лактида использовали 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU, 98%, «Aldrich»).

**Дополнительные реагенты:** Янтарный ангидрид (дигидро-2,5-фурандион, 99%), 4-(диметиламино)пиридин (DMAP, 99%), N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC, 99%), бензойная кислота (99.5%) производства «Aldrich» использовали без дополнительной очистки. Метилловый эфир полиэтиленгликоля с молекулярной

массой 2 кДа (MPEG<sub>45</sub>, «Aldrich») перед использованием сушили при температуре 100 °С в вакуумном шкафу в течение 2 часов для удаления примесей воды.

**Растворители:** Тетрагидрофуран (ЧДА, «Компонент-Реактив»), этилацетат (эталонный, «Компонент-Реактив»), ацетон (ХЧ, «Компонент-Реактив»), толуол (эталонный, «Компонент-Реактив»), гексан (ЧДА, «Компонент-Реактив»), дихлорметан (метиленхлорид, ОСЧ, «Компонент-Реактив»), изопропиловый спирт (ОСЧ, «Компонент-Реактив»), диэтиловый эфир (ЧДА, «Медхимпром»), метанол (ХЧ, «Химмед»), диметилсульфооксид (Ч, «Компонент-Реактив»). Все растворители, использованные для подготовки реагентов или выступающие в качестве реакционной среды, были предварительно перегнаны и хранились над молекулярными ситами 4 Å во избежание сорбции воды. Для ГПХ использовали тетрагидрофуран классификации ВЭЖХ («Carlo erba Reagents»), для спектроскопии ЯМР дейтерированный хлороформ (Solvex-d, 99.8%).

**Лекарственные соединения и реактивы для исследований:** Оксалиплатин и комплекс Pt (IV) с лигандом на основе лонидамина были синтезированы и предоставлены группой Назарова А.А. (Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) [170]. 5-фторурацил (99%) производства «Acros Organics», *α*-циано-4-гидроксикоричная кислота (HCCA, 99%, «Aldrich»), флуоресцеин изотиоцианат (изомер I, 90%, «Aldrich»), 4',6-диамидин-2-фенилиндолом (DAPI, 98%, «Aldrich»), среда культуральная DMEM («Thermo Fisher Scientific»), фетальная бычья сыворотка (FBS, «HyClone»), гентамицин («HyClone»), MTT-реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид, «Thermo Fisher Scientific») использовали без дополнительной очистки.

## 2.2 Синтез звездообразных гомополимеров лактида

Полимеризацию с раскрытием цикла L- и D,L-лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов и катализатора 2-этилгексаноата олова (II) проводили в инертной атмосфере аргона в расплаве при постоянном перемешивании. В зависимости от используемого мономера и условий реакции температуру полимеризации варьировали от 140 до 170 °С. Для примера,

стандартную методику синтеза звездообразного 3-х лучевого PLLA со средней степенью полимеризации 25 лучей можно описать следующим образом: L-лактид (35 ммоль) и триметилпропан (0.93 ммоль) загружали в предварительно прокаленную колбу объемом 25 мл, после чего добавляли октаноат олова (6.25  $\mu$ моль) в виде раствора в осушенном толуоле. Для удаления толуола реакционную смесь вакуумировали при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего заполняли колбу аргоном, герметично закрывали пробкой и помещали в масляную баню на 8 часов. Полимеризацию проводили при 140 °C и скорости перемешивания магнитной мешалки 100 об/мин. По окончании синтеза продукт реакции растворяли в тетрагидрофуране и высаживали в смесь охлажденного гексана с диэтиловым эфиром (70:30) для очистки полилактида от остатков катализатора и непрореагировавшего мономера. Очищенный полимер сушили в вакуум-сушильном шкафу до постоянного веса при 80 °C в течение 24 часов.

Органокатализируемую полимеризацию L-лактида в присутствии TMR и DBU проводили в линии Шленка при температуре 25 °C в растворе и постоянном токе осушенного аргона. В заранее прокаленную круглодонную колбу, подключенную к линии Шленка, помещали L-лактид (10 ммоль) и триметилпропан (0.133 ммоль), затем после трех этапов последовательного вакуумирования и заполнения системы аргоном, реакционную смесь растворяли в 10 мл осушенного дихлорметана и добавляли катализатор DBU (0.160 ммоль). Через пять минут полимеризацию останавливали путем дезактивации катализатора добавлением двукратного мольного избытка бензойной кислоты по отношению к DBU. Продукт реакции очищали высаживанием в смесь охлажденного гексана с диэтиловым эфиром (70:30).

### **2.3 Карбоксилирование звездообразных поли-D,L-лактидов**

Карбоксилирование звездообразных поли-D,L-лактидов проводили посредством взаимодействия концевых гидроксильных групп с молекулами янтарного ангидрида. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что оптимальными условиями являются проведение реакции в растворе

дихлорметана и соблюдение мольного соотношения гидроксильных групп к янтарному ангидриду и DMAP как 1:2:0.5. В рамках используемой методики очищенный звездообразный PDLA, к примеру, 6-ти лучевой со средней степенью полимеризации лучей 25 (0.45 ммоль), помещали в двугорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, подключенную к линии Шленка. Заполнив колбу инертным газом, вносили 50 мл осушенного дихлорметана. После растворения полимера с помощью шприца через септу вносили смесь янтарного ангидрида (5.4 ммоль) с DMAP (1.35 ммоль), растворенных в 5 мл дихлорметана. Модификацию проводили в течение 24 часов при 25 °С. Полученный продукт очищали путем двукратного высаживания в охлажденную смесь гексана с диэтиловым эфиром (60:40) и сушили до постоянного веса вакуумном сушильном шкафу при температуре 60 °С.

#### **2.4 Синтез звездообразных амфифильных блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль**

На первом этапе для получения амфифильных звездообразных блок-сополимеров PLLA-MPEG была проведена модификация метилового эфира полиэтиленгликоля янтарным ангидридом с целью получения концевой карбоксильной группы. Для этого MPEG (2000 Да, 2.5 ммоль) и янтарный ангидрид (2.75 ммоль) загружали в коническую колбу объемом 25 мл с последующей продувкой осушенным аргоном. Реакцию проводили в течение 45 минут при температуре 135 °С, после чего продукт очищали путем переосаждения из тетрагидрофурана в охлажденный диэтиловый эфир.

На втором этапе реакцию этерификации по Штеглиху между концевыми гидроксильными группами звездообразных поли-L-лактидов и карбоксильными группами модифицированного MPEG осуществляли карбодиимидным методом. Для примера, 6-ти лучевой PLLA со средней степенью полимеризации лучей 10 (0.65 ммоль) и карбоксилированный MPEG (0.72 ммоль, 10% мольного избытка по отношению к ОН группам звездообразного полимера) растворяли в 45 мл осушенного дихлорметана в конической колбе объемом 100 мл. После растворения полимерных компонентов к реакционной смеси добавляли DCC (0.9 ммоль) и

DMAP (0.18 ммоль) в 5 мл дихлорметана. Реакцию проводили в инертной атмосфере в течение 24 часов при 25 °С. По окончании синтеза, раствор фильтровали через фильтр Шотта для очистки от нерастворенного побочного продукта – дициклогексилмочевины. Очистку от несвязанного со звездообразным полимером MPEG производили путем двукратного высаживания раствора в охлажденный метанол и сушки до постоянного веса под вакуумом в течение 24 ч.

## **2.5 Получение полимерных наночастиц и наносомальных форм противораковых препаратов**

Наночастицы на основе синтезированных звездообразных блок-сополимеров были получены методом замены растворителя (нанопреципитации) по следующей методике: органическую фазу, представляющую собой 50 мг блок-сополимера, растворенные в 10 мл ацетона, прикапывали к 10 мл дистиллированной воды в течение 2-х минут. Смешение органической и водной фазы проводили в цилиндрическом стакане объемом 50 мл при вращении магнитного якоря со скоростью 700 об/мин. Процесс выпаривания органического растворителя длился 3 часа при комнатной температуре. Для получения лиофилизатов наночастиц (порошкообразной формы) их водные суспензии замораживали в жидком азоте в отсутствие криопротекторов, после чего подвергали процессу сублимационной сушки.

Для инкапсулирования флуоресцентного красителя в наночастицы вышеописанную методику модифицировали добавлением в органическую фазу 5 масс.% (по отношению к массе блок-сополимера) флуоресцеин изотиоцианата. Эффективность загрузки оценивали спектрофотометрически.

Для получения наносомальной формы оксалиплатина или его комбинации с 5-фторурацилом, в водной фазе растворяли определенное количество противораковых препаратов, 5 или 20 масс.% по отношению к массе блок-сополимера. Очистку от несвязанных лекарственных средств осуществляли посредством диализа полученной водной суспензии наночастиц против воды, используя мешки MWCO 3.5 кДа «Thermo Fisher Scientific».

Получение наносомальной формы гидрофобного комплекса Pt (IV) проводили по следующей методике: 25 мг блок-сополимера и 1.25 мг (5 масс.%) комплекса Pt (IV) растворяли в 5 мл смешивающегося с водой органического растворителя тетрагидрофурана. К 10 мл воды при интенсивном перемешивании (700 об/мин) прикапывали 5 мл органической фазы в течение 2-3 минут. Процесс выпаривания органического растворителя длился 3 часа, после чего полученную водную суспензию блок-сополимерных наночастиц центрифугировали при  $10^4$  об/мин в течение 10 минут для удаления несвязанного лекарственного вещества.

Изучение кинетики высвобождения ЛС из наночастиц осуществляли посредством диализа их водных суспензий против дистиллированной воды, используя мешки MWCO 3.5 кДа «Thermo Fisher Scientific». Эксперимент проводили при температуре 37 °С. По истечении определенного времени, из мешков отбирали от 1 до 2 мл суспензии и замораживали ее в жидком азоте с целью последующей лиофилизации. В случае с наночастицами, содержащими оксалиплатин, принималось, что по мере высвобождения ЛС удаляется из диализного мешка через его поры, а в случае с комплексом Pt(IV) перед заморозкой отобранные аликвоты центрифугировали, в соответствии с вышеописанной методикой, для удаления несвязанного препарата.

Для стерилизации суспензий наночастиц в экспериментах *in vivo* их пропускали через шприцевые гидрофильные фильтры с размером пор 0.22  $\mu$ m («Techno Plastic Products») с последующим хранением и лиофилизацией в стерильных контейнерах.

## **2.6 Определение антипролиферативной активности и внутриклеточного распределения наночастиц**

Клетки линии аденокарциномы толстой кишки человека HTC116 и фибробластов легкого эмбриона человека WI38 культивировали в пластиковых культуральных флаконах в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в увлажнённой

атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки рассеивали 2 раза в неделю с помощью раствора трипсин-EDTA. Клеточные линии поддерживали в культуре не более двух месяцев, после чего культуру обновляли из коллекции замороженных клеток.

Определение уровня цитотоксичности полученных наносомальных форм противораковых препаратов проводили с помощью МТТ-теста. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (Eppendorf) за сутки до эксперимента для прикрепления и адаптации. Наночастицы, а также ЛС в свободной и наносомальной форме добавляли к клеткам в широком диапазоне концентраций (от 0.04 до 100 мМ ЛС), в трех параллельных экспериментах, и инкубировали в течение 72 ч. За 4 ч до окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора МТТ-реагента с концентрацией 1 мг/мл в среде для культивирования клеток. После появления окраски среду удаляли, выпавшие кристаллы формазана растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида и измеряли его концентрацию по интенсивности поглощения при 570 нм с помощью планшетного спектрофотометра iMark (Bio-Rad, США). Выживаемость клеток оценивали в процентах относительно контроля. По экспериментальным данным строили кривые выживаемости и определяли значение IC<sub>50</sub>, т.е. концентрацию препарата, ингибирующую пролиферацию клеток на 50%.

Для анализа внутриклеточного распределения наночастиц клетки аденокарциномы молочной железы человека (MCF7) высевали на покровные стекла в 24-луночные планшеты в стандартной среде для культивирования за сутки до начала эксперимента. После 1 и 4 ч инкубации клеток с флуоресцентно-мечеными наночастицами, клетки промывали фосфатно-солевым буфером и фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 20 мин. Далее препараты отмывали от фиксатора и окрашивали ядра клеток DAPI. Флуоресценцию анализировали с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM900 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения ZEN 3.2 blue edition (Carl Zeiss, Германия).

## 2.7 Исследование противоопухолевой эффективности наночастиц *in vivo*

Эксперимент проводили в виварии НИЦ «Курчатовский институт» на мышам-самцах линии Balb/c весом 16-18 г, полученных из питомника СМК «Стезар». Эксперимент был одобрен локальным этическим комитетом НИЦ «Курчатовский институт». Содержание оксалиплатина в наночастицах составило 4.2 масс.%. На первом этапе мышам были привиты клетки карциномы кишечника мыши СТ26, как наиболее релевантные по отношению к противоопухолевой активности оксалиплатина. Далее мыши в равном соотношении, по 20 особей, были поделены на три группы в соответствии с планом эксперимента: группа контроля, не претерпевающая лечение на всем протяжении эксперимента, и две группы с поэтапным введением либо свободной формы оксалиплатина (препарат сравнения), либо оксалиплатина, входящего в состав наночастиц. Первую инъекцию препаратов в объеме 100 мкл производили в хвостовую вену через 7 дней после инокуляции опухоли, после чего еще две с разницей в три дня. Однократная доза препарата в пересчете на оксалиплатин составляла 7 мг/кг.

## 2.8 Методы исследования

### *Гель-проникающая хроматография*

Молекулярно-массовые характеристики, а именно среднечисловую ( $M_n$ ), средневесовую ( $M_w$ ) молекулярные массы, а также PDI синтезированных полимеров определяли методом ГПХ на хроматографической системе «Knauer» с рефрактометрическим детектором «Knauer Smartline 2300». В качестве элюента использовали тетрагидрофуран, при этом скорость потока составляла 1 мл/мин. Для исследования готовили растворы полимеров с концентрацией 3-7 мг/мл. Перед измерением растворы фильтровали через шприцевые фильтры («Millex») с размером пор 0.45 мкм. Анализ проводили при 40 °С с использованием колонок Agilent PLgel (размер пор  $10^3$  Å,  $10^4$  Å и «mixed-C»). Калибровку системы проводили относительно полистирольных стандартов. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения «ClarityChrom».

Для оценки абсолютных значений молекулярных масс и вязкостных характеристик синтезированные полимеры были исследованы на мульти-детекторной хроматографической системе «Wyatt-Waters», оснащенной рефрактометрическим детектором Waters RI (2414), детектором широкоугольного статического рассеяния света Wyatt (miniDAWN M3020) и вискозиметрическим детектором Wyatt (ViscoStar). Исследование проводили в аналогичных условиях с использованием колонки Agilent PL gel 5μm MIXED-C. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения «Astra 8».

### *Спектроскопия ядерного магнитного резонанса*

Методы  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопии были использованы для подтверждения успешного протекания реакций модификации, определения химического состава синтезированных соединений, расчета средней степени полимеризации полилактидных лучей, степени конверсии мономеров и ОН-групп со-инициаторов. Регистрацию спектров проводили на спектрометрах Bruker DPX-300 и Varian VNRMS-700 при температуре 30 °C и рабочей частоте 300 и 700 МГц, соответственно. Для исследования готовили растворы образцов в осушенном дейтерированном хлороформе с концентрацией от 50 до 160 мг/мл. Химические сдвиги сигналов протонов и углеродов выражены в ppm относительно сигнала от остаточного недейтерированного растворителя, чей химический сдвиг был принят 7.26 и 77.16 ppm в случае  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопии, соответственно. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения «MestreNova».

### *Масс-спектрометрия*

Масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией проводили с использованием спектрометра «Bruker Daltonics» autoflex speed TOF (Германия), оснащенного твердотельным УФ лазером ( $\lambda = 355$  нм), в линейном режиме с регистрацией положительно заряженных ионов. Перед измерением раствор НССА в тетрагидрофуране (30 мг/мл) предварительно смешивали с растворами образцов (10 мг/мл) в соотношении 5:1, наносили на

стальные мишени (МТП 384, «Bruker Daltonics Inc.») и высушивали на воздухе при комнатных условиях. Итоговые масс-спектры были сформированы после регистрации и усреднения 200 одиночных спектров в различных точках образца на мишени при мощности лазера от 70 до 90 %. Калибровку проводили по PEG с молекулярной массой до 8 кДа. Данные были обработаны с помощью программы FlexAnalysis 3.4 («Bruker Daltonics Inc.»).

Содержание платины в наночастицах определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе XSeries II («Thermo Fisher Scientific», США). Разложение образцов массой от 5 до 15 мг проводили в смеси концентрированной азотной и соляной кислот в системе автоклавного вскрытия САА-1 (ИПТМ РАН, Россия). После разложения при 180 °С в течение часа объем полученных растворов доводили до 8 мл и добавляли внутренний стандарт – индий (10 мкг/л). Измерения проводили при следующих параметрах эксперимента: выходная мощность генератора – 1400 Вт; распылитель – концентрический PolyCon; распылительная камера – кварцевая охлаждаемая (3 °С); разрешение – 0.8М.

### *Инфракрасная спектроскопия*

Метод ИК-спектроскопии применяли для подтверждения протекания реакции карбоксилирования звездообразных поли-D,L-лактидов. Измерения проводили на ИК-Фурье спектрометре Nicolet iS5 («Thermo Fisher Scientific», США) с использованием приставки НПВО iD5 ATR. Регистрацию спектров осуществляли в диапазоне от 550 до 4000 см<sup>-1</sup>.

### *Термогравиметрический анализ*

Термогравиметрический анализ проводили на приборе Perkin-Elmer Pyris 1 TGA (США) в динамическом режиме в среде осушенного азота. Навеску полимера (до 5 мг) помещали в платиновую открытую чашку и фиксировали потерю массы образца в диапазоне от 30 до 700 °С с точностью до 0.01 мг.

### *Дифференциальная сканирующая калориметрия*

Теплофизические свойства синтезированных полимеров были исследованы в токе азота на дифференциально сканирующем калориметре Perkin Elmer DSC8500 (США). Для звездообразных поли-L- и поли-D,L-лактидов диапазон исследуемых температур был зафиксирован от 0 до 180 и от -20 до 100 °С, соответственно. Скорость нагрева составляла 20 °С/мин. Масса навесок, запаянных в стандартных алюминиевых чашках, варьировалась от 10 до 15 мг. Все звездообразные поли-L-лактиды перед измерением отжигали в течение 6 часов при температуре от 90 до 125 °С в зависимости от молекулярной массы лучей.

### *Рентгеновское рассеяние*

Кристаллическая структура звездообразных поли-L-лактидов, а также наночастиц на основе их блок-сополимеров была исследована методом рентгеновской дифракции в больших углах на станции БиоМУР Курчатовского комплекса синхротронно-нейтронных исследований. Источником излучения являлся поворотный магнит (1.7 Тл) с энергией пучка после монохроматора 8 кэВ (1.433 Å) и потоком фотонов  $10^9$  фот/с\*мм<sup>2</sup>. Размер пучка на образце составлял  $0.5 \times 0.3$  мм<sup>2</sup>. Дифрактограммы регистрировали с помощью детектора Pilatus 1M («Dectris», Швейцария) в диапазоне  $q$  от 0.8 до 30 нм<sup>-1</sup>. Экспозиция составляла 300 с. Для обработки данных использовали программы Fit2D и ImageJ.

Водные суспензии наночастиц были исследованы методом малоуглового рентгеновского рассеяния на синхротроне Petra III (DESY, Гамбург) на линии P12, оснащенной автоматической системой подачей образцов и детектором Pilatus 2M («Dectris», Швейцария). Интенсивность рассеяния  $I(s)$  была измерена в области значений волновых векторов  $0.02 < s < 4.5$  нм<sup>-1</sup>, где  $s = 4\pi \sin\theta/\lambda$  ( $2\theta$  – угол рассеяния, а  $\lambda$  – длина волны 0.124 нм). Для каждого образца с целью улучшения качества данных были зарегистрированы 20 кривых рассеяния при температуре 23 °С. Первичная обработка экспериментальных данных, включая вычитание рассеяния от среды, проводилась в программе PRIMUS. Последующий анализ данных был осуществлен с помощью программного комплекса ATSAS. Для

построения функции распределения по расстояниям  $P(R)$  была использована программа GNOM.

### *Динамическое рассеяние света*

Гидродинамический диаметр наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров был определен методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd», США). Водные суспензии наночастиц разбавляли до концентрации порядка 0.5 мг/мл для исключения многократного рассеяния, после чего помещали в кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм. Измерения проводили при 25 °С после термостатирования кюветы в течение 2 минут. Угол расположения фотодетектора в приборе составлял 173°, а в качестве источника излучения использовался гелий-неоновый лазер с длиной волны 633 нм. Распределения интенсивности рассеянного света по гидродинамическим диаметрам наночастиц были рассчитаны из автокорреляционных функций интенсивности рассеянного света с использованием фирменного программного обеспечения «Zetasizer software».

Электрокинетический потенциал ( $\zeta$ -потенциал) наночастиц был определен методом электрофоретического рассеяния света на анализаторе Zetasizer Nano ZS. Измерения проводили в аналогичных условиях с использованием U-образной кюветы.

### *Электронная микроскопия*

Морфология поверхности образцов звездообразных поли-L-лактидов была изучена методом сканирующей электронной микроскопии. Микрофотографии получали с помощью растрового электронного микроскопа Phenom XL («Thermo Fisher Scientific», США) с детектором обратно рассеянных электронов в режиме низкого вакуума (60 Па) при ускоряющем напряжении 5 кВ без нанесения токопроводящего покрытия.

Морфология наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров была изучена с помощью электронного микроскопа «Titan 80–300 TEM/STEM» («FEI», США) с ускоряющим напряжением 300 кВ и камерой «BM-Ultrascan» («Gatan»,

США). Изображения были получены в режиме светлого поля. Для усиления контраста применяли процедуру негативного контрастирования. В качестве подложек для образцов использовали медные сетки, покрытые углеродной пленкой, которые предварительно очищали, обрабатывая плазмой в течение 10 секунд на установке «Pelco easiGlow» («Ted Pella», США). На обработанную решетку наносили 3 мкл водной суспензии наночастиц с концентрацией 0.5 мг/мл. После промывки наносили 10 мкл раствора ацетата уранила (0.5 масс.%) и выдерживали 30 сек. Время высушивания образца перед измерением составляло 30 мин.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Синтез и исследование звездообразных гомополимеров лактида

##### 3.1.1 Полимеризация лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов

Как известно, при ROP лактидов и лактонов в определенных условиях могут протекать побочные реакции внутри- и межмолекулярной переэтерификации, приводящие к существенному увеличению молекулярно-массового распределения и несоответствию теоретической структуры макромолекул с полученной на практике. Этот вопрос в случае синтеза разветвленных макромолекул является еще более значимым, поскольку наряду со снижением вероятности протекания побочных реакций необходимо предотвратить образование «кометоподобных» структур, т.е. обеспечить равномерное распределение мономерных звеньев по лучам макромолекул. Кроме того, кинетика полимеризации циклических сложных эфиров в присутствии со-инициаторов с числом ОН-групп от 3 до 10 и целевыми значениями ММ до 50 кДа в литературе изучена мало и может существенно отличаться от таковой в случае синтеза линейных сложных полиэфиров. Поэтому для получения 3-х, 4-х и 6-ти лучевых полилактидов с контролируемым строением и длиной лучей от 10 до 100 мономерных звеньев необходимо было провести серию экспериментов, основная цель которых заключалась в установлении влияния условий реакции, а также типа со-инициатора на скорость полимеризации мономера и ММР образующихся в ходе реакции звездообразных макромолекул [99].

Полимеризацию с раскрытием цикла L- и D,L-лактида проводили по механизму реакции «координации-внедрения» в присутствии мультифункциональных гидроксилсодержащих со-инициаторов триметилпропана, пентаэритрита и дипентаэритрита для синтеза 3-х, 4-х и 6-ти лучевых поли-L- и поли-D,L-лактидов, соответственно. Синтез проводили в среде инертного газа в расплаве при постоянном перемешивании, а катализатором реакции выступал 2-этилгексаноат олова. Общая схема синтеза звездообразных

поли-L- и поли-D,L-лактидов отражена на Рисунке 3.1. Кратко запись формул звездообразных полимеров в соответствии с их молекулярным строением и составом можно представить следующим образом: **3s-, 4s-, 6s-PLLA<sub>n</sub>/PDLLA<sub>n</sub>**, где «n» это средняя степень полимеризации (DP) полилактидных лучей.

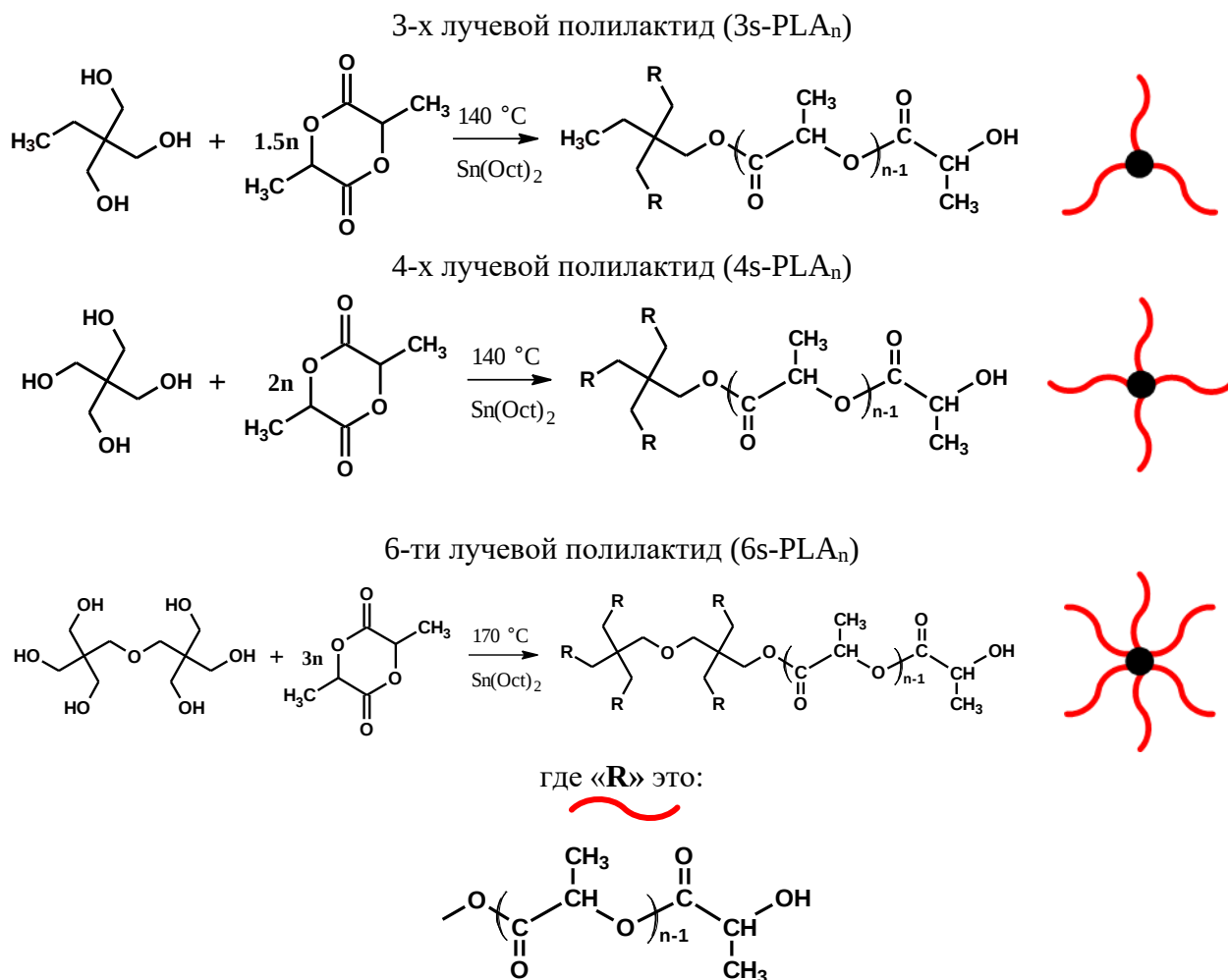


Рисунок 3.1 – Схема синтеза 3-х, 4-х и 6-ти лучевых звездообразных полилактидов

В процессе реакции  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  взаимодействует с гидроксильными группами молекул со-инициаторов с образованием алкоксида олова, который и является истинным инициатором полимеризации циклических сложных эфиров. Таким образом, при полной конверсии функциональных групп, количество лучей будет определяться числом гидроксильных групп в молекуле со-инициатора, а их длина мольным соотношением мономера к OH-группам (М/ОН). В ходе экспериментов по изучению кинетики полимеризации L-лактида мольное соотношение М/ОН варьировали в пределах от 5 до 50 в зависимости от желаемой длины лучей. Для

предотвращения попадания в реакционную систему гидроксилсодержащих примесей мономеры предварительно были перекристаллизованы и высушены при повышенной температуре под вакуумом, наряду с мультифункциональными со-инициаторами. Во избежание перехода в область концентраций олова недопустимых по меркам ASTM для изделий медицинского назначения, концентрация катализатора во всех экспериментах равнялась 500 массовым ppm по отношению к лактиду ( $M/SnOct_2 = 5600$ ), поскольку в большинстве случаев масса конечного продукта реакции в основном зависит от массы мономера в реакционной системе. Здесь стоит отметить важный факт, который необходимо учитывать при интерпретации данных зависимости скорости реакции от изначальных условий. При фиксированных мольных отношениях  $M/OH$  и  $M/SnOct_2$  по мере увеличения длины лучей, т.е. уменьшении концентрации со-инициатора в реакционной системе, соотношение катализатора, приходящегося на OH-группы со-инициатора ( $SnOct_2/OH$ ) закономерно увеличивается (Таблица 3.1). Основываясь на литературных данных, выбранной концентрации катализатора и пробных экспериментах, температура синтеза была установлена 140 °C. При этой температуре и концентрации  $SnOct_2$  может сохраняться баланс между высокой скоростью полимеризации и низкой интенсивностью протекания возможных побочных реакций. Однако при переходе к синтезу 6-ти лучевых образцов температура полимеризации была увеличена до 170 °C по причине низких скоростей реакции и инициирования функциональных групп со-инициатора при низком мольном соотношении  $M/OH$ . Основные условия проведения полимеризации L-лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов представлены в Таблице 3.1.

В первую очередь для проведения контролируемого синтеза 3-х, 4-х и 6-ти лучевых поли-L-лактидов необходимо было определить время достижения максимальных конверсий, соответствующее заданным степеням полимеризации и минимальной доли протекания побочных реакций. Зависимость конверсии L-лактида от времени реакции при температуре 140 °C для образцов  $3s-PLLA_n$  со степенью полимеризации лучей 10, 25, 50 и 100 представлена на Рисунке 3.2(а).

Таблица 3.1 – Условия проведения реакции полимеризации L-лактида и соответствующие им значения эффективных констант скоростей

| Число лучей | DP  | M/OH | SnOct <sub>2</sub> /OH × 10 <sup>3</sup> | M/SnOct <sub>2</sub> | T, °C | k <sub>эфф</sub> × 10 <sup>3</sup> , мин <sup>-1</sup> |
|-------------|-----|------|------------------------------------------|----------------------|-------|--------------------------------------------------------|
| 3           | 10  | 5    | 0.9                                      | 5600                 | 140   | 59 ± 2                                                 |
|             | 25  | 12.5 | 2.2                                      |                      |       | 44 ± 2                                                 |
|             | 50  | 25   | 4.4                                      |                      |       | 38 ± 2                                                 |
|             | 100 | 50   | 8.8                                      |                      |       | 12 ± 1                                                 |
| 4           | 10  | 5    | 0.9                                      | 5600                 | 140   | 35 ± 1                                                 |
|             | 25  | 12.5 | 2.2                                      |                      |       | 43 ± 2                                                 |
|             | 50  | 25   | 4.4                                      |                      |       | 33 ± 2                                                 |
|             | 100 | 50   | 8.8                                      |                      |       | 23 ± 1                                                 |
| 6           | 10  | 5    | 0.9                                      | 5600                 | 170   | 2.0 ± 0.2                                              |
|             | 25  | 12.5 | 2.2                                      |                      |       | 13 ± 2                                                 |
|             | 50  | 25   | 4.4                                      |                      |       | 60 ± 9                                                 |
|             | 100 | 50   | 8.8                                      |                      |       | 120 ± 29                                               |

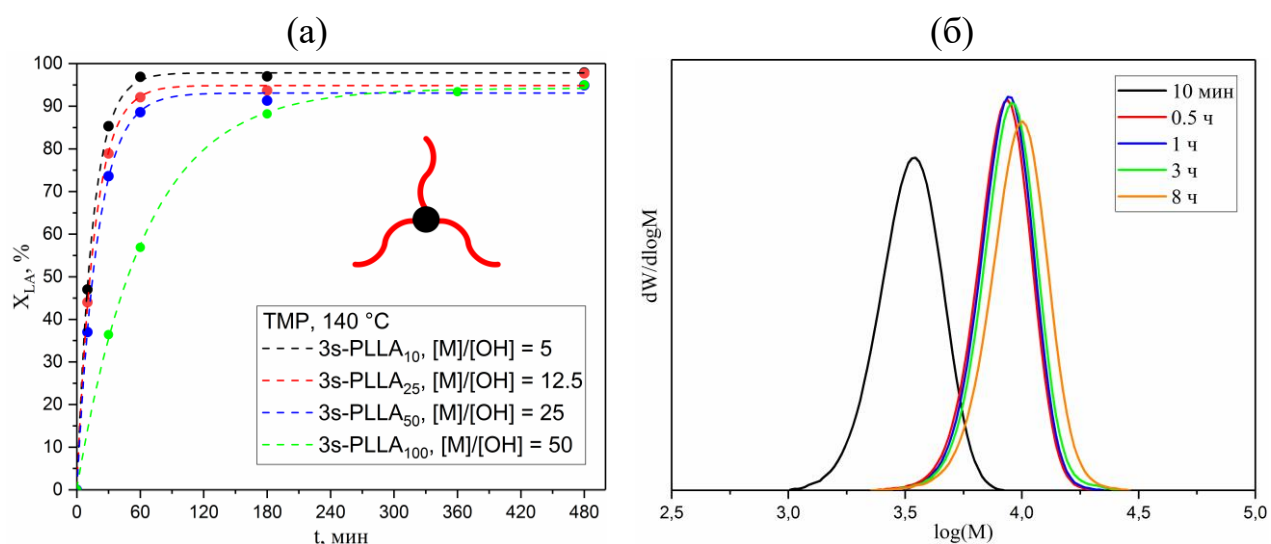


Рисунок 3.2 – Графики зависимостей конверсии L-лактида от времени реакции для 3-х лучевых образцов (а) и молекулярно-массовые распределения образца 3s-PLLA<sub>25</sub> в процессе полимеризации при 140 °C (б)

Из приведенных данных видно, что конверсия мономера близкая к равновесной (более 95%) для всех мольных соотношений M/OH достигается в заданных условиях в пределах 8 часов. Стоит отметить, что за идентичные временные интервалы конверсия мономера оказалась тем выше, чем больше концентрация соинициатора в реакционной системе, т.е. меньше соотношение L-лактида приходящееся на одну OH-группу. Так, например, для образца 3s-PLLA<sub>10</sub> и 3s-PLLA<sub>100</sub> за 30 минут конверсия L-лактида составила порядка 85 и 36%,

соответственно, несмотря на то, что в эксперименте по синтезу 3s-PLLA<sub>100</sub> соотношение SnOct<sub>2</sub>/ОН больше в 10 раз. Этот факт указывает на то, что в присутствии триметилолпропана ROP L-лактида протекает тем быстрее, чем выше концентрация активных растущих центров в реакционной системе. А повышенная концентрация октаноата олова у образцов с более высокой степенью полимеризации позволяет «выровнять» время протекания всех реакций, что может быть важно с точки зрения уменьшения технологических затрат.

На всем протяжении полимеризации 3-х лучевые образцы характеризуются мономодальным молекулярно-массовым распределением с низкими индексами полидисперсности. На Рисунке 3.2 (б) приведено молекулярно-массовое распределение образца 3s-PLLA<sub>25</sub> при разных временах полимеризации. Отсутствие бимодальности или выраженной асимметрии говорит о минимальной степени протекания полимеризации мономера на гидроксилсодержащих примесях. По мере того, как время реакции увеличивается, пик закономерно смещается в сторону больших молекулярных масс, при этом на высоких степенях конверсии мономера не происходит уширение ММР или формирование низкомолекулярного «хвоста» из-за реакций циклизации, что может указывать на невысокую долю побочных реакций. На каждом этапе полимеризации реакционную систему исследовали не только методом ГПХ, но и ЯМР-спектроскопией для подтверждения химического состава, определения конверсии мономера и конверсии функциональных групп со-инициатора. На Рисунке 3.3 приведены <sup>1</sup>H-ЯМР спектры для образца 3s-PLLA<sub>10</sub> на разных временных промежутках полимеризации. С увеличением времени синтеза на спектрах можно наблюдать уменьшение интегральной интенсивности сигналов от метиновых (х) и метильных протонов (с) L-лактида и пропорциональное увеличение интенсивности сигналов от протонов в соответствующих полимерных группах (1 и 5). Степень конверсии L-лактида (X<sub>LA</sub>) на протяжении реакции рассчитывали исходя из соотношения интегральных интенсивностей метиновых групп -CH- мономера (с) и поли-L-лактида (1+2) по Формуле 3.1. Исчезновение сигналов от метиленовых протонов молекулы со-инициатора -CH<sub>2</sub>-ОН (4), граничащих с гидроксильной группой, и

появление сигналов от протонов  $-\text{CH}_2\text{-O-R}$  (3) свидетельствует об успешном протекании реакции полимеризации L-лактида по гидроксильным группам молекулы TMP. Наличие же концевой гидроксильной группы на концах, образующихся поли-L-лактидных лучей, подтверждается присутствием на спектрах сигнала от концевых метиновых протонов (2) в положении 4.35 ppm.

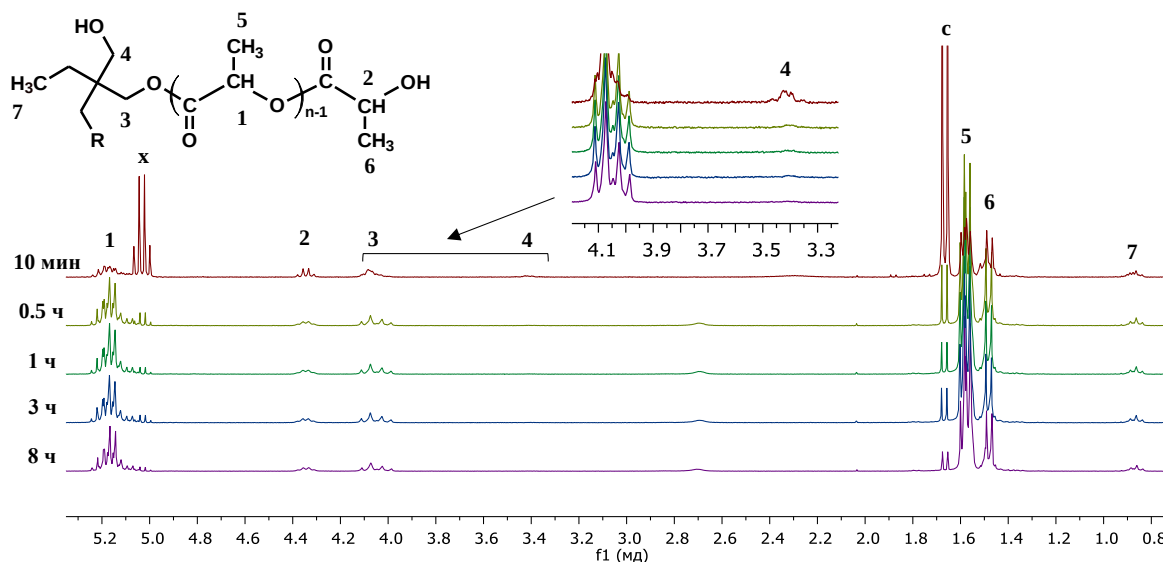


Рисунок 3.3 –  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры образца 3s-PLLA<sub>10</sub> при различном времени реакции

$$X_{LA} = \frac{I_{CH(1)}^{LA} + I_{CH(2)}^{LA}}{I^x + I_{CH(1)}^{LA} + I_{CH(2)}^{LA}} \times 100\% \quad (3.1)$$

По аналогии с TMP при полимеризации L-лактида в присутствии PTOI при температуре 140 °C с увеличением концентрации активных центров в реакционной системе скорость полимеризации увеличивалась (Рисунок 3.4 (а)), а время, необходимое для достижения конверсий мономера близких к равновесным значениям (более 95%), также не превышало 8 часов. Интересно отметить, что при мольном соотношении  $M/OH = 5, 12.5$  и  $25$  значения конверсии мономера при идентичной температуре и времени синтеза оказались немного больше или как минимум равны у 3-х лучевых полимеров по сравнению со значениями у 4-х лучевых. При увеличении степени полимеризации лучей до 100 ( $M/OH = 50$ ) значения конверсии мономера за первые 30 и 60 мин реакции наоборот оказались больше у 4-х лучевого полимера на 10 и 20%, соответственно, по сравнению с 3s-PLLA<sub>100</sub>. Однако в целом значения конверсии L-лактида на последующих

временных интервалах оказались близки, из чего можно сделать вывод о сравнительно невысоком влиянии на кинетику полимеризации L-лактида перехода от 3-х функционального со-инициатора к 4-х.

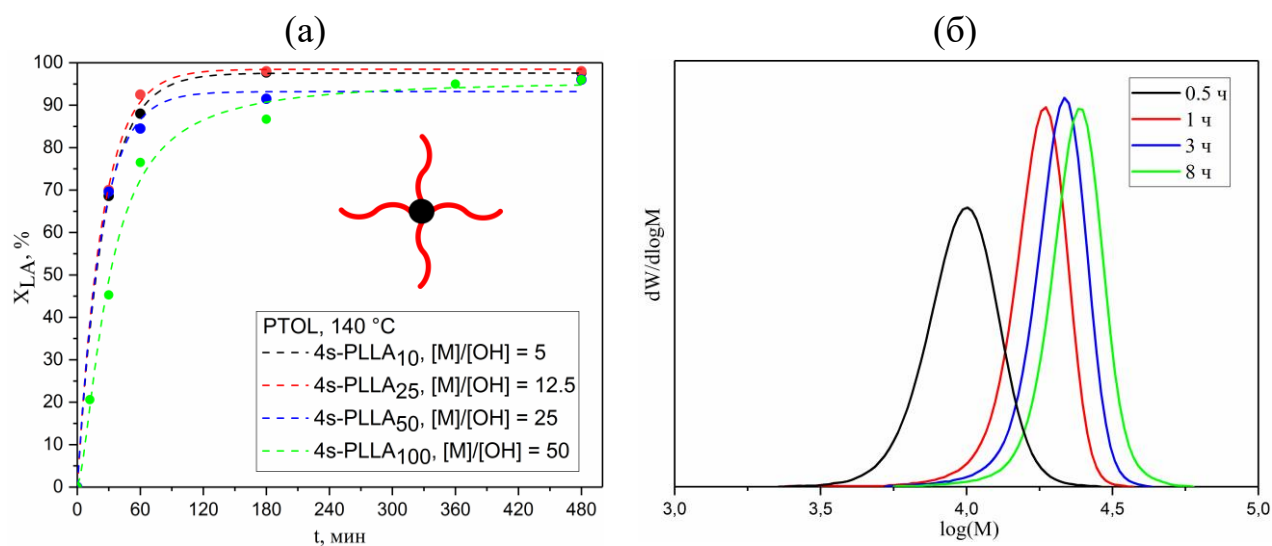


Рисунок 3.4 – Графики зависимости конверсии L-лактида от времени реакции для 4-х лучевых образцов (а) и молекулярно-массовые распределения образца 4s-PLLA<sub>50</sub> в процессе полимеризации при 140 °C (б)

На всех временных этапах полимеризации 4-х лучевые PLLA характеризуются мономодальным молекулярно-массовым распределением и низкими индексами полидисперсности. На Рисунке 3.4 (б) для примера приведены MMP образца 4s-PLLA<sub>50</sub> при разном времени полимеризации. Как и в случае со звездообразными 3s-PLLA<sub>n</sub> при достижении конверсий мономера близких к равновесным не наблюдается уширение пика на графиках MMP. На Рисунке 3.5 приведены <sup>1</sup>H-ЯМР спектры образца 4s-PLLA<sub>10</sub> на разных временных этапах полимеризации. Расчеты степени конверсии мономера проводили по Формуле 3.1.

Отслеживание конверсии лактида на протяжении синтеза и соответствующее MMP образцов является первоочередной задачей при проведении контролируемого синтеза полилактидов. В то же время необходимо ответить на еще один вопрос, а именно какое количество функциональных групп молекулы со-инициатора вступило в реакцию и при какой степени конверсии мономера, поскольку именно эти факторы окажут влияние на соответствие теоретически заданного молекулярного строения с полученным на практике. Конверсию функциональных

групп со-инициатора определяли с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР спектров по интегральной интенсивности сигнала от метиленовых протонов  $\text{CH}_2\text{-OH}$  (4), граничащих с гидроксильной группой (Рисунок 3.3, 3.5), уменьшение которой подтверждает успешное протекание реакции. В результате у 3-х лучевого  $3\text{s-PLLA}_{10}$  ( $\text{M/OH} = 5$ ) после 10 минут реакции прореагировавшими оказались 86%  $\text{OH}$ -групп со-инициатора ТМР, в то время как к 30 минуте это значение равняется 97% (Рисунок 3.3). При увеличении мольного соотношения  $\text{M/OH}$  до 12.5 после 10 минут реакции сигналов от незакрытых групп со-инициатора не было обнаружено на ЯМР спектрах (Рисунок 3.6).

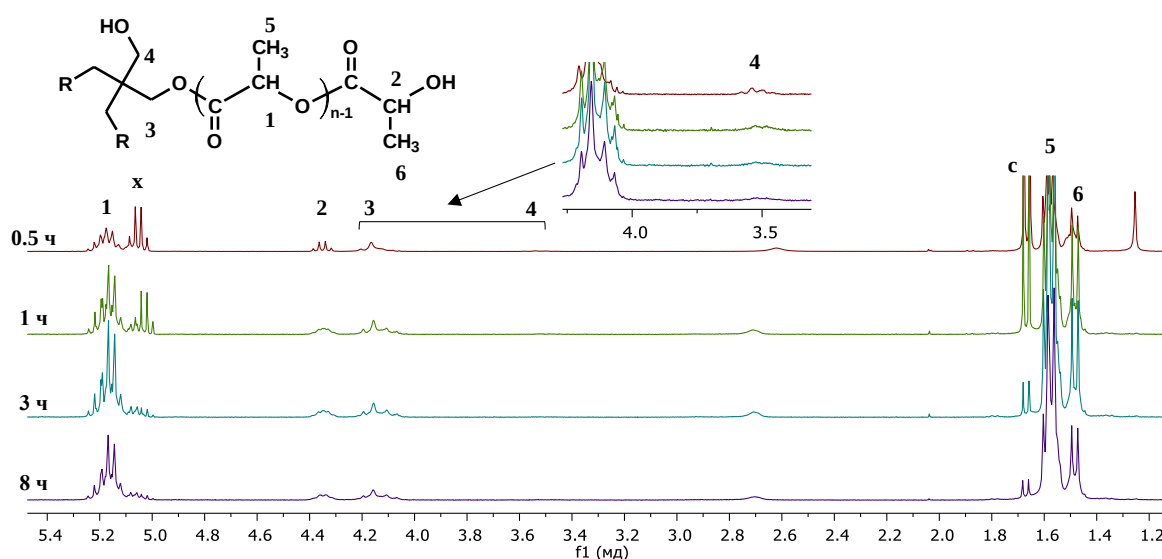


Рисунок 3.5 –  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры образца  $4\text{s-PLLA}_{10}$  при различном времени синтеза

Аналогичные закономерности были также обнаружены при использовании в качестве ядра молекулу РТОЛ, что указывает на то, что увеличение концентрации мономера наряду с возрастанием мольного соотношения  $\text{SnOct}_2/\text{OH}$  по мере перехода к большим степеням полимеризации лучей (Таблица 3.1) ускоряет инициирование функциональных групп. Относительно невысокая скорость инициирования при  $\text{M/OH} = 5$  может сказаться на равномерности распределения мономерных звеньев внутри звездообразных макромолекул.

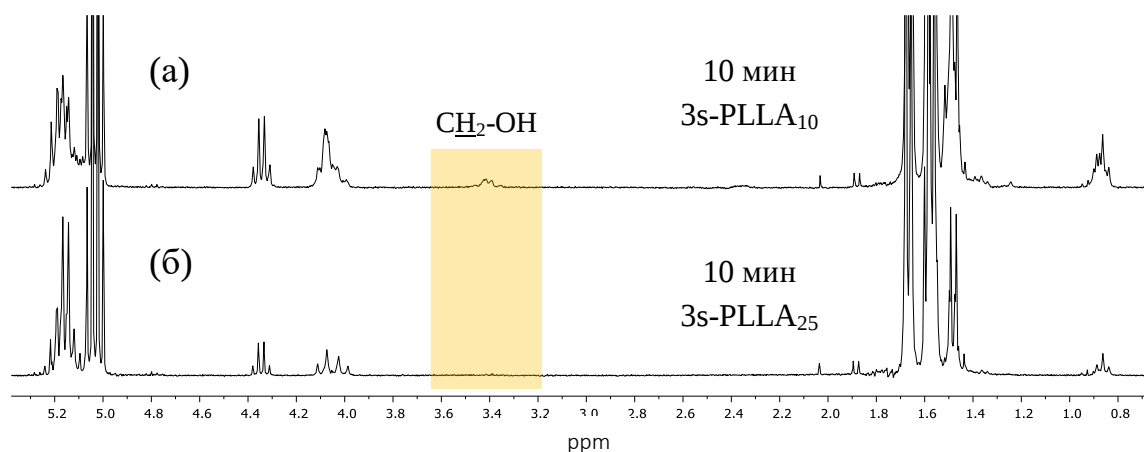


Рисунок 3.6 –  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры образцов 3s-PLLA<sub>10</sub> (а) и 3s-PLLA<sub>25</sub> (б) при времени полимеризации 10 минут

При исследовании влияния структуры со-инициатора и числа функциональных групп на скорость их инициирования было установлено, что в идентичных условиях полная конверсия ОН-групп у РТОЛ при М/ОН = 5 наступает немного позднее, чем у ТМР: 85% и 97% за 30 минут, соответственно. При полимеризации L-лактида в присутствии DPTOL было обнаружено, что для 6s-PLLA<sub>10</sub> при 140 °С скорость инициирования ОН-групп и скорость реакции полимеризации оказались существенно ниже, чем у 3-х и 4-х лучевых аналогов. Для примера при соотношении М/ОН = 5 только 93% ОН-групп DPTOL вступили в реакцию после 8 часов синтеза, при этом конверсия мономера к этому времени не превышала 55%. Как было установлено ранее, повысить скорость инициирования можно путем увеличения соотношения катализатора, приходящегося на гидроксильную группу. Однако в данном случае увеличение доли катализатора сопровождалось бы переходом в область концентрации олова недопустимую для изделий медицинского назначения. Поэтому для того, чтобы увеличить скорость реакции и свести к минимуму влияние эффекта медленного инициирования на конечное ММР образцов необходимо было увеличить температуру синтеза 6-ти лучевых поли-L-лактидов до 170 °С. В результате конверсия функциональных групп DPTOL за 3 часа для образца 6s-PLLA<sub>10</sub> была более 95% (Рисунок 3.7), а при соотношении М/ОН = 12.5 это значение было достигнуто уже за первые полчаса. Можно предположить, что уменьшение скорости инициирования по мере перехода

от 3-х лучевых образов к 6-ти обусловлено возникновением стерических затруднений, вызванных молекулярным строением со-инициаторов. Этот факт необходимо учитывать при проведении контролируемого синтеза звездообразных полилактидов.

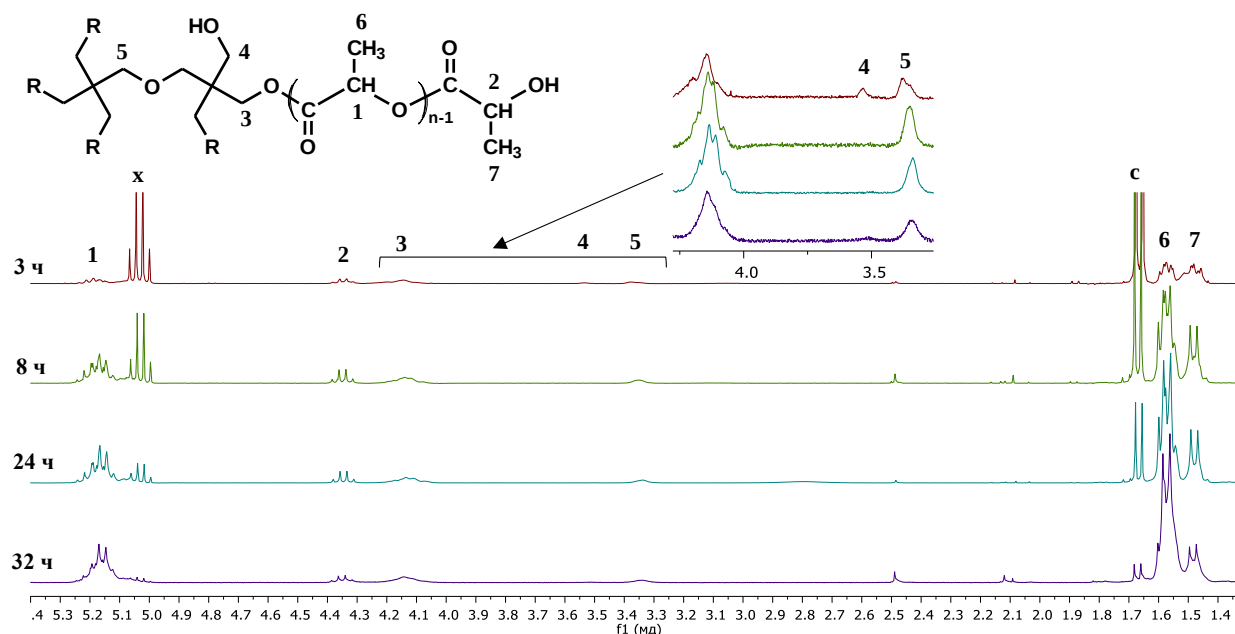


Рисунок 3.7 –  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры образца 6s-PLLA<sub>10</sub> в различные временные интервалы синтеза

В процессе изучения кинетики полимеризации L-лактида в присутствии DPTOL при температуре 170 °C было установлено, что с увеличением степени полимеризации поли-L-лактидных лучей, т.е. уменьшением концентрации со-инициатора в исходной системе, скорость полимеризации возрастает (Рисунке 3.8 (а)). Так, время необходимое для достижения конверсий мономера близких к равновесным в случае 6s-PLLA<sub>10</sub> и 6s-PLLA<sub>100</sub> составило 32 и 0.5 часа, соответственно. Такого рода зависимость является прямой противоположностью тому, что наблюдается в случае со-инициаторов TMP и PTOL. Структура молекул ядер, а также стерические затруднения, по-видимому, способны оказывать влияние не только на скорость инициирования ОН-групп, но и на кинетику полимеризации лактида.

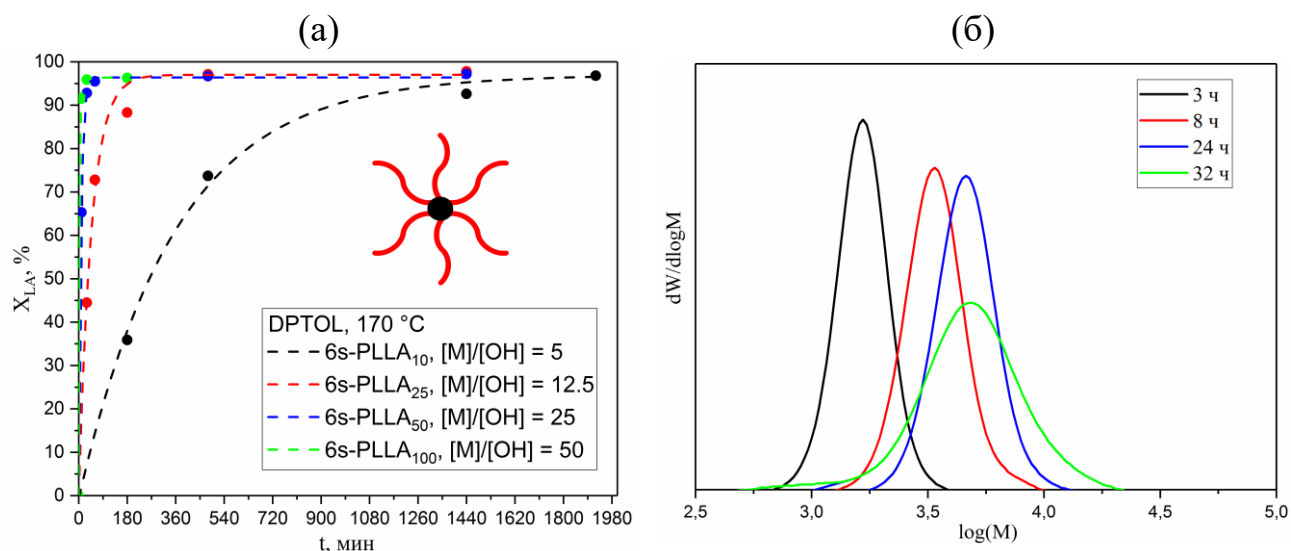


Рисунок 3.8 – Графики зависимости конверсии L-лактида от времени реакции для 6-ти лучевых образцов (а) и молекулярно-массовые распределения образца 6s-PLLA<sub>10</sub> в процессе полимеризации при 170 °C (б)

Похожее влияние структуры со-инициатора наблюдали в работе [66] в ходе синтеза высокомолекулярных разветвленных PLLA при переходе от глицерина – трехфункционального ядра к 4-х функциональному – ди(триметилпропану), по своей структуре напоминающему DPTOL. Таким образом, можно сделать вывод, что решающую роль в возникновении наблюдаемого эффекта играет плотность и взаиморасположение гидроксильных групп, а не их количество. Поэтому для успешного синтеза звездообразных полилактидов с заданным строением и составом важно первоначально установить, как структура со-инициатора влияет на кинетику полимеризации. Дополнительно, важно было подтвердить, что при использовании DPTOL увеличение скорости реакции при более высоком мольном соотношении М/ОН связано с молекулярной структурой ядра, а не увеличением количества катализатора, приходящегося на ОН-группу (Таблица 3.1). Для этого был проведен эксперимент, который показал, что при фиксированном мольном соотношении SnOct<sub>2</sub>/ОН = 0.9 в случае 6s-PLLA<sub>25</sub> с М/ОН = 12.5 по-прежнему были достигнуты существенно более высокие значения конверсии мономера через 3 часа ( $X_{LA}$  = 65.4%), чем для 6s-PLLA<sub>10</sub> с М/ОН = 5 ( $X_{LA}$  = 35.9%). Этот факт подтверждает предположение о преобладающем влиянии стерических затруднений при синтезе 6-ти лучевых поли-L-лактидов в присутствии DPTOL.

При невысокой скорости полимеризации, особенно при повышенной температуре, достижение высоких конверсий мономера может быть сопряжено с интенсификацией протекания побочных реакций. Так, из представленного на Рисунке 3.8 (б) ММР образца 6s-PLLA<sub>10</sub> видно, что вплоть до 24 ч и конверсии лактида порядка 90% сохраняется равномерное смещение пика по мере увеличения времени реакции. Дальнейшее пребывание реакционной смеси в условиях полимеризации хоть и приводит к увеличению конверсии мономера на 5%, но при этом существенно увеличивается ММР за счет реакций переэтерификации. Соблюдение баланса между конверсией мономера и узким молекулярно-массовым распределением является одним из ключевых факторов синтеза звездообразных полилактидов.

Полимеризация с раскрытием цикла лактида в присутствии SnOct<sub>2</sub> обычно подчиняется уравнению реакции первого порядка по мономеру, и может быть описана Формулой 3.2, в которой эффективная константа скорости ( $k_{эфф}$ ) для заданных начальных условий реакции остается постоянной:

$$-\frac{d[M]}{dt} = k_{эфф}[M]^a; k_{эфф} = k[CI]^b[SnOct_2]^c \quad (3.2)$$

где  $k$  – константа скорости полимеризации;  $[M]$ ,  $[CI]$  и  $[SnOct_2]$  – концентрация мономера, со-инициатора и 2-этилгексаноата олова (II), соответственно;  $a$ ,  $b$  и  $c$  – частные порядки реакции. После интегрирования, с учетом выражения для степени конверсии мономера  $X$  в момент времени  $t$ , Формула 3.2 принимает следующий вид (Формула 3.3):

$$\ln\left(\frac{1}{1-X}\right) = k_{эфф}t; X = \frac{[M_0] - [M]}{[M_0]} \quad (3.3)$$

где  $[M_0]$  – начальная концентрация мономера.

Как видно из Рисунка 3.9, кинетические данные довольно хорошо аппроксимируются прямыми в координатах первого порядка, что указывает на правильное предположение о порядке реакции по мономеру, а также на отсутствие реакций обрыва цепи по мере протекания полимеризации. По тангенсу угла наклона прямых были рассчитаны значения  $k_{эфф}$  (Таблица 3.1). Несмотря на более

высокую температуру синтеза 170 °С эффективная константа скорости реакции для образца 6s-PLLA<sub>10</sub> оказалась в 30 раз меньше по сравнению с 3-х лучевым аналогом. Приведенные значения подтверждают возможное влияние структуры со-инициаторов на кинетику полимеризации лактида.

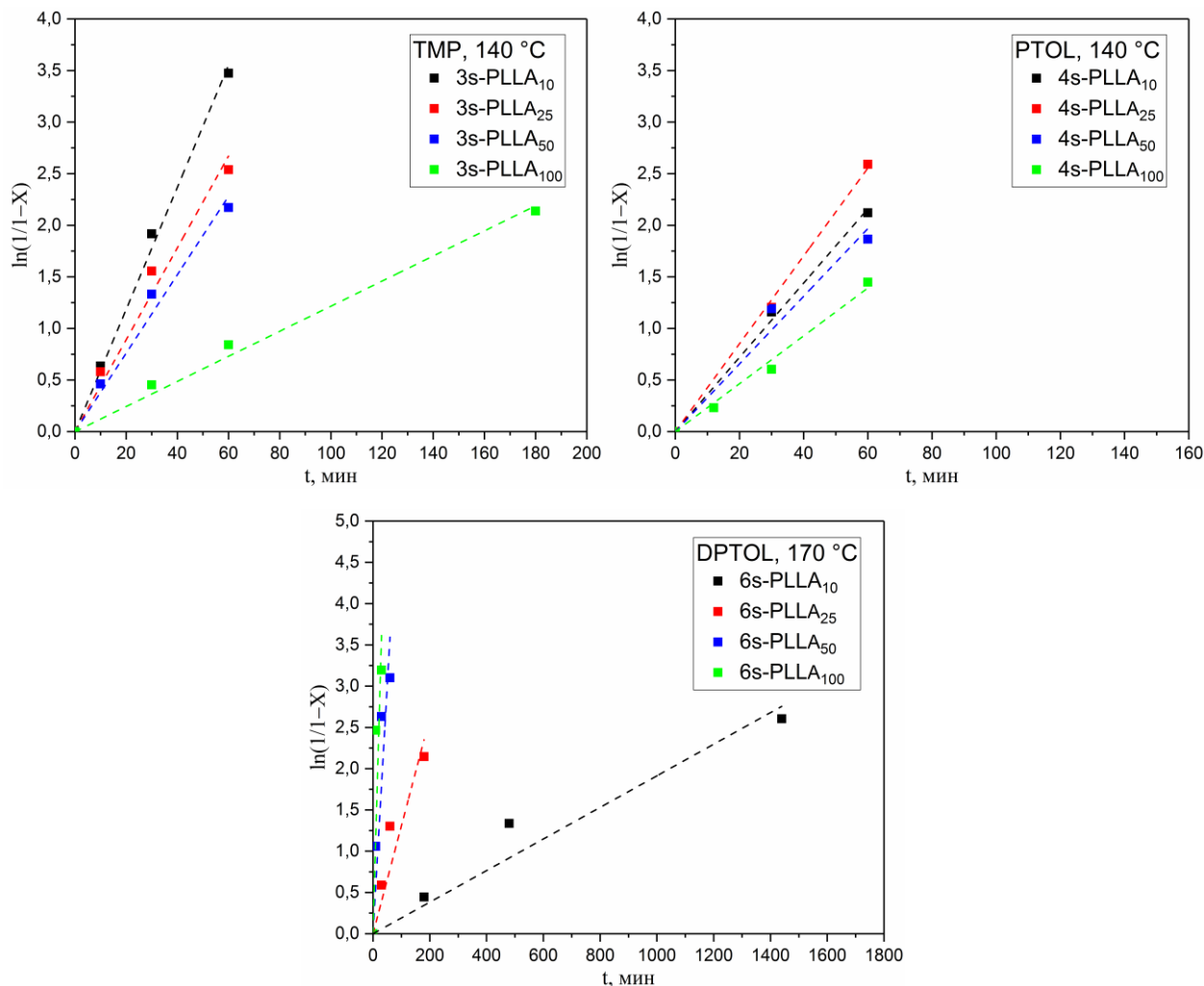


Рисунок 3.9 – Линейные анаморфозы кинетических кривых полимеризации L-лактида в присутствии TMP, PTOL и DPTOL

На «псевдоживой» характер полимеризации L-лактида в присутствии multifunctional со-инициаторов указывает линейная зависимость степени полимеризации и среднечисловой молекулярной массы 3-х, 4-х и 6-ти лучевых образцов от конверсии мономера на всем протяжении реакции (Рисунок 3.10). Перечисленные факты подтверждают протекание реакции по механизму «координации-внедрения» и отсутствие изменения числа реакционных центров в процессе синтеза.

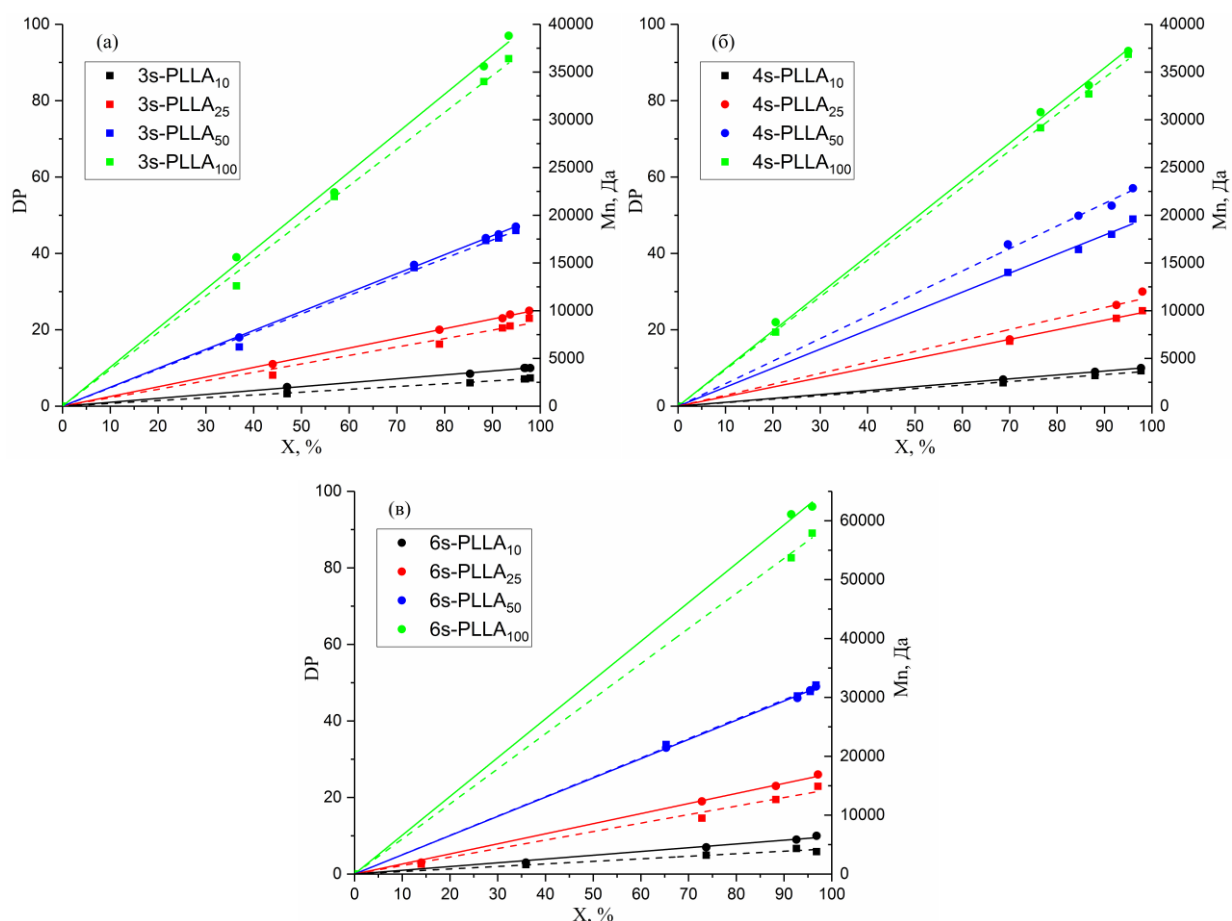


Рисунок 3.10 – Графики зависимости средней степени полимеризации (сплошные линии) и среднечисловой молекулярной массы (пунктирные линии) для 3-х (а), 4-х (б) и 6-ти лучевых (в) поли-L-лактидов

### *Полимеризация D,L-лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов*

На следующем этапе была изучена реакция полимеризации D,L-лактида в присутствии TMP, PTOL и DPTOL с целью определения оптимальных условий синтеза звездообразных поли-D,L-лактидов. Кинетические кривые синтеза звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PDLLA<sub>n</sub> приведены на Рисунке 3.11. Степени полимеризации лучей были зафиксированы 25 и 100 мономерных звеньев на луч ( $M/OH = 12.5$  и  $50$ ).

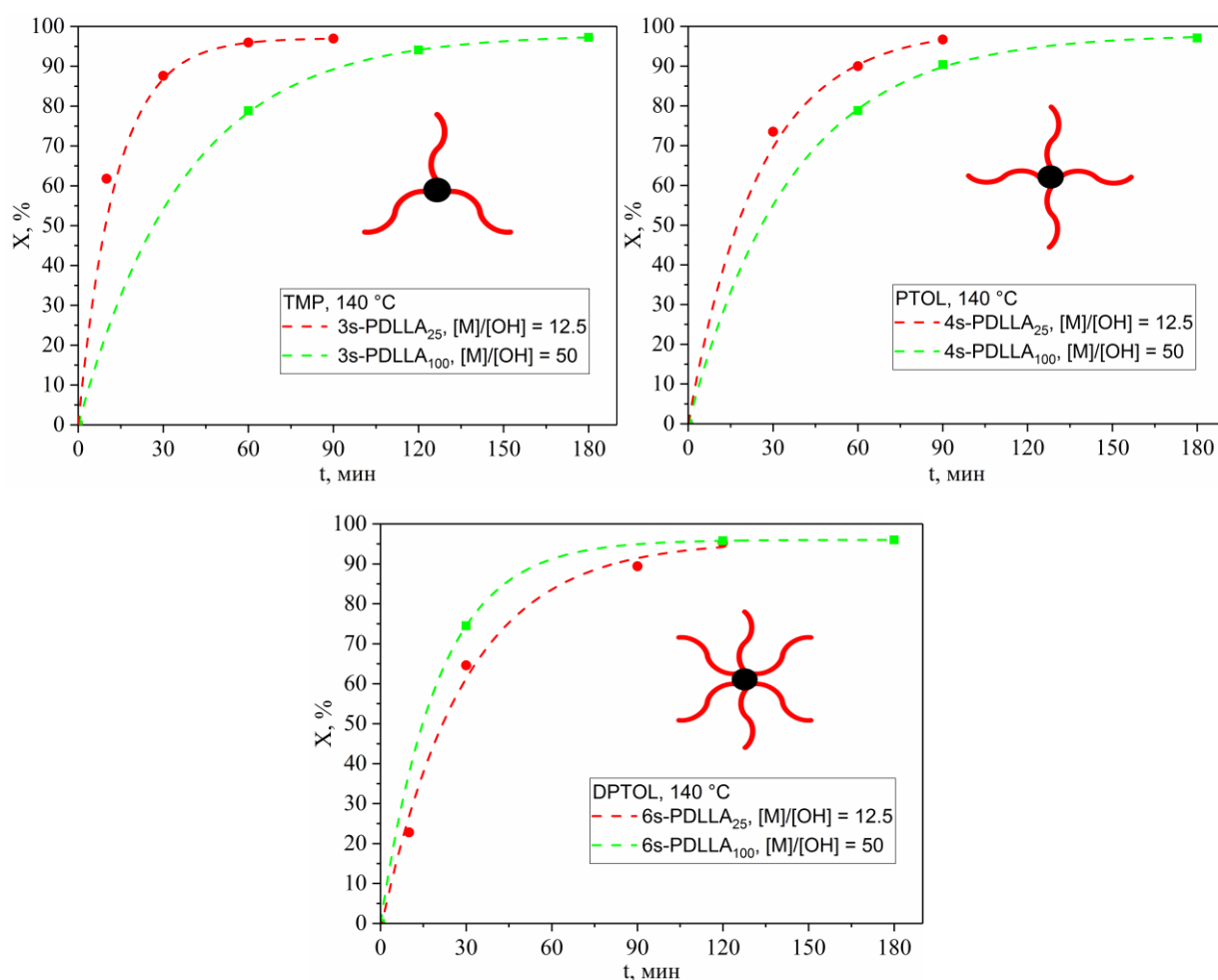


Рисунок 3.11 – Графики зависимости конверсии D,L-лактида от времени реакции в присутствии со-инициаторов TMP, PTOL и DPTOL при  $140^\circ\text{C}$

Во всех экспериментах конверсия мономера от 95 до 97%, т.е. близкая к равновесной, была достигнута в пределах 3 часов. Для серии 3-х и 4-х лучевых образцов по мере уменьшения концентрации со-инициатора в системе скорость реакции закономерно уменьшается. В то же время для 6-ти лучевых PDLLA<sub>n</sub>, аналогично серии PLLA<sub>n</sub>, наблюдается обратная зависимость, что, вероятно, связано со стерическими затруднениями. Также можно отметить, что снижение скорости реакции происходит и по мере увеличения степени ветвления образцов. Существенного влияния, а именно заметного замедления скорости реакции при мольном соотношении  $M/OH = 5$ , в данном случае не наблюдалось. При сравнении реакции полимеризации L- и D,L-лактида в присутствии мультифункциональных гидроксилсодержащих со-инициаторов было установлено, что основные обнаруженные закономерности воспроизводятся, за исключением времени

достижения равновесных конверсий в силу разной активности мономеров. Помимо этого, при выбранных условиях синтеза воспроизвелись и такие ранее выявленные закономерности как линейная зависимость молекулярной массы от конверсии мономера и мономодальный характер молекулярно-массового распределения, что подтверждает протекание реакции в соответствии с механизмом «координации-внедрения».

Таким образом, благодаря контролированию молекулярного состава продуктов реакции на протяжении всего синтеза методами ГПХ и ЯМР, были определены оптимальные условия синтеза звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых поли-L-лактидов со степенью полимеризации 10, 25, 50 и 100 и поли-D,L-лактидов со степенью полимеризации лучей 25 и 100. В заданных условиях были достигнуты высокие показатели конверсии мономеров и функциональных групп со-инициаторов (более 95%), что наряду с узким молекулярно-массовым распределением обеспечивает синтез звездообразных полимеров заданного строения и состава. Стоит отметить, что, несмотря на первичный характер ОН-групп, структура используемых со-инициаторов может оказывать существенное влияние на скорость инициирования, а также на кинетику полимеризации лактида. Этот факт необходимо учитывать при определении оптимальных условий синтеза звездообразных поли-L- и поли-D,L-лактидов.

*Полимеризация L-лактида под действием безметаллового катализатора  
DBU*

В связи с возрастанием потребности использования полимерных материалов в медицине, последние годы активно ведется поиск более эффективных и биосовместимых катализаторов для полимеризации с раскрытием цикла лактидов и лактонов, чем октаноат олова [171–177]. Фокус работ некоторых научных групп в этом направлении сместился на изучение применения безметалловых органических катализаторов. По сравнению с триалкиламинами или ариламинами, амидины и гуанидины являются более сильными органическими основаниями из-за стабильности их соответствующей сопряженной кислоты. В частности было показано, что 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен является одним из наиболее

эффективных основных катализаторов Бренстеда при полимеризации лактида [87]. В литературном обзоре (раздел 1.1.1) был описан механизм OROP лактида в присутствии DBU, демонстрирующий его способность выступать как катализатором, так и инициатором реакции. В то же время открытыми остаются вопросы, касающиеся влияния концентрации DBU на кинетику полимеризации лактида и молекулярно-массовые характеристики образующихся полимеров. В нашей публикации [178] было показано, что с увеличением мольного соотношения LA/DBU от 100 до 400 молекулярная масса образующегося поли-L-лактида планомерно возрастает от 30 до 125 кДа, а индекс полидисперсности полимеров не превышает 1.25. Была определена истинная константа скорости полимеризации, которая составила  $120 \text{ мин}^{-1} \times \text{М}^{-1.6}$ . Кроме того, был определен порядок реакции по катализатору равный 1.6, что указывает на более высокую чувствительность скорости реакции к изменению концентрации катализатора, чем к концентрации L-лактида в реакционной системе. Благодаря этому возможно осуществлять контролируемый синтез гомополимеров лактида в широком диапазоне молекулярных масс. Что касается получения образцов с регулируемым молекулярным строением по механизму AAR, то при добавлении в реакционную смесь гидроксилсодержащих со-инициаторов описываются случаи преждевременной остановки полимеризации на невысоких степенях конверсии [84]. Это явление, скорее всего, вызвано дезактивацией катализатора возможными кислотными примесями. Проведя процедуры по дополнительной очистке со-инициатора – TMP, растворителя – метиленхлорида и L-лактида был успешно синтезирован 3-х лучевой полимер 3s-PLLA<sub>49</sub> с молекулярной массой 11 кДа, индексом полидисперсности 1.08 и конверсией мономера порядка 99%. Успешное протекание полимеризации L-лактида по всем гидроксильным группам TMP подтверждает <sup>1</sup>H-ЯМР спектр (Рисунок 3.12). Использование соотношения OH/DBU = 2.5 позволило достигнуть не только высокого показателя конверсии уже за первые 5 минут реакции (99%), но и способствовало минимальной степени протекания побочных реакций ацилирования. Все это указывает на возможные перспективы использования органических катализаторов для контролируемой

полимеризации лактида, однако можно выделить и ряд ограничений. Первое связано с необходимостью использовать высокую концентрацию катализатора, переходящую в токсичную область и требующую дополнительных этапов очистки продуктов. В противном случае использование более низких концентраций сопряжено с риском преждевременной остановки полимеризации за счет запуска каскадной дезактивации DBU из-за присутствия остатков кислотных примесей. Вторая проблема связана с плохой растворимостью различных со-инициаторов в растворителях используемых для OROP, что ограничивает спектр возможных разветвленных структур. В результате органокатализируемая полимеризация лактида по своей эффективности и степени контроля над протеканием побочных реакций может превзойти устоявшуюся методику полимеризации в присутствии октаноата олова, однако для этого требуется проведение дополнительных исследований.

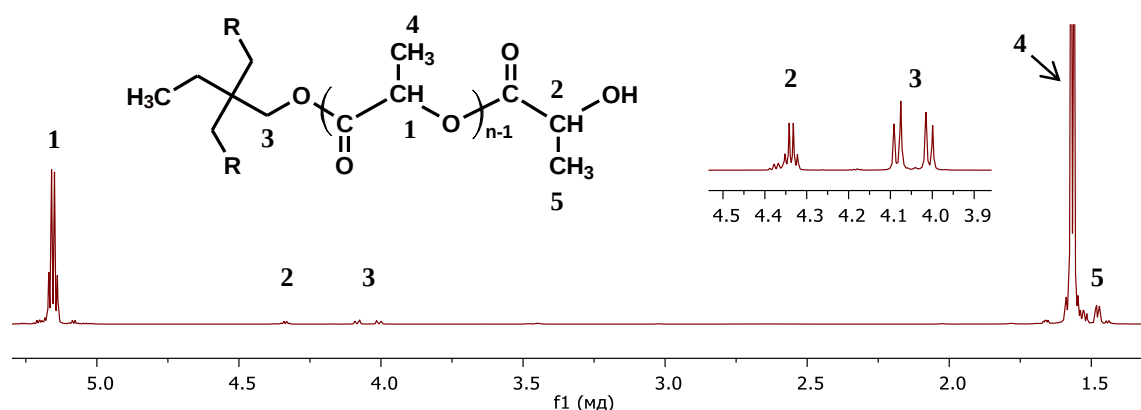


Рисунок 3.12 –  $^1\text{H}$ -ЯМР спектр образца 3s-PLLA<sub>49</sub> синтезированного в присутствии органического катализатора DBU

### 3.1.2 Характеризация молекулярного строения и состава звездообразных полилактидов

Принимая во внимание установленные ранее кинетические закономерности, в оптимальных условиях была синтезирована серия звездообразных поли-L- и поли-D,L-лактидов со степенью полимеризации лучей в интервале от 10 до 100 (Таблица 3.2). Катализатором реакции выступал 2-этилгексаноат олова. Прежде чем приступить к модификации концевых функциональных групп и исследованию

влияния структуры на комплекс физико-химических свойств, а также кинетику деградации, первоочередной задачей является подтверждение строения и состава синтезированных звездообразных гомополимеров. Этот вопрос не является тривиальным в случае анализа разветвленных соединений, синтезируемых методом ROP. Дело в том, что помимо возможных побочных реакций внутри- и межмолекулярной перэтерификации, приводящих к формированию линейных или циклических структур, в процессе синтеза звезд возможно образование «кометоподобных» структур, как крайнего случая неравномерного распределения мономерных звеньев по лучам (Рисунок 3.13).

Качественный и количественный анализ синтезированных полимеров проводили с использованием спектроскопии ЯМР, гельпроникающей хроматографии с тройным детектированием и спектрометрии МАЛДИ.

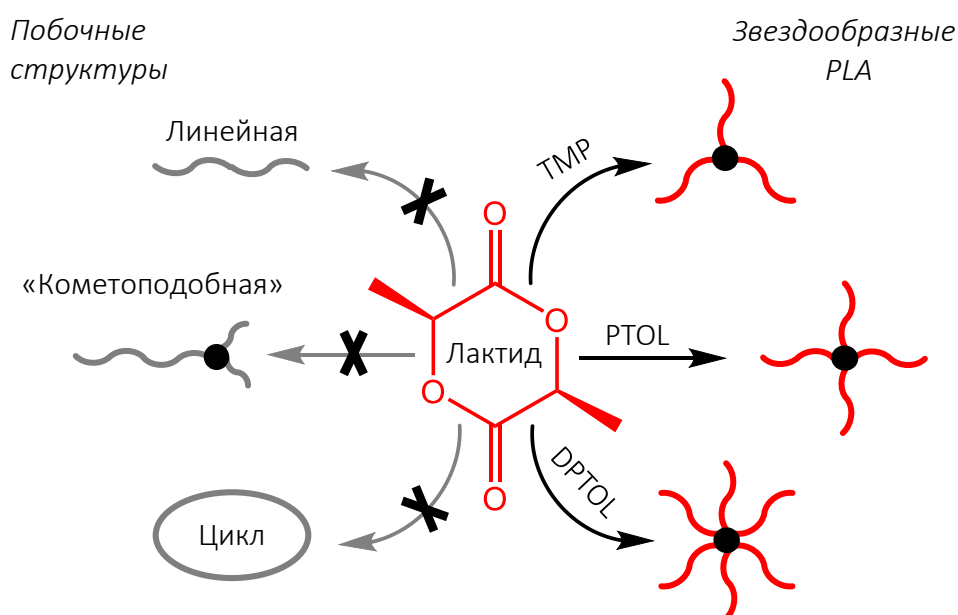


Рисунок 3.13 – Схематическая иллюстрация формирования целевых и возможных побочных полимерных структур в процессе ROP лактида

### *Протонный магнитный резонанс*

Метод  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии использовали для подтверждения химического состава соединений, расчета средней степени полимеризации лучей, а также степени конверсии мономеров и ОН-групп со-инициаторов.

Репрезентативные  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры 3-х, 4-х и 6-ти лучевых поли-L- и поли-D,L-лактидов со степенью полимеризации 25 представлены на Рисунке 3.14.

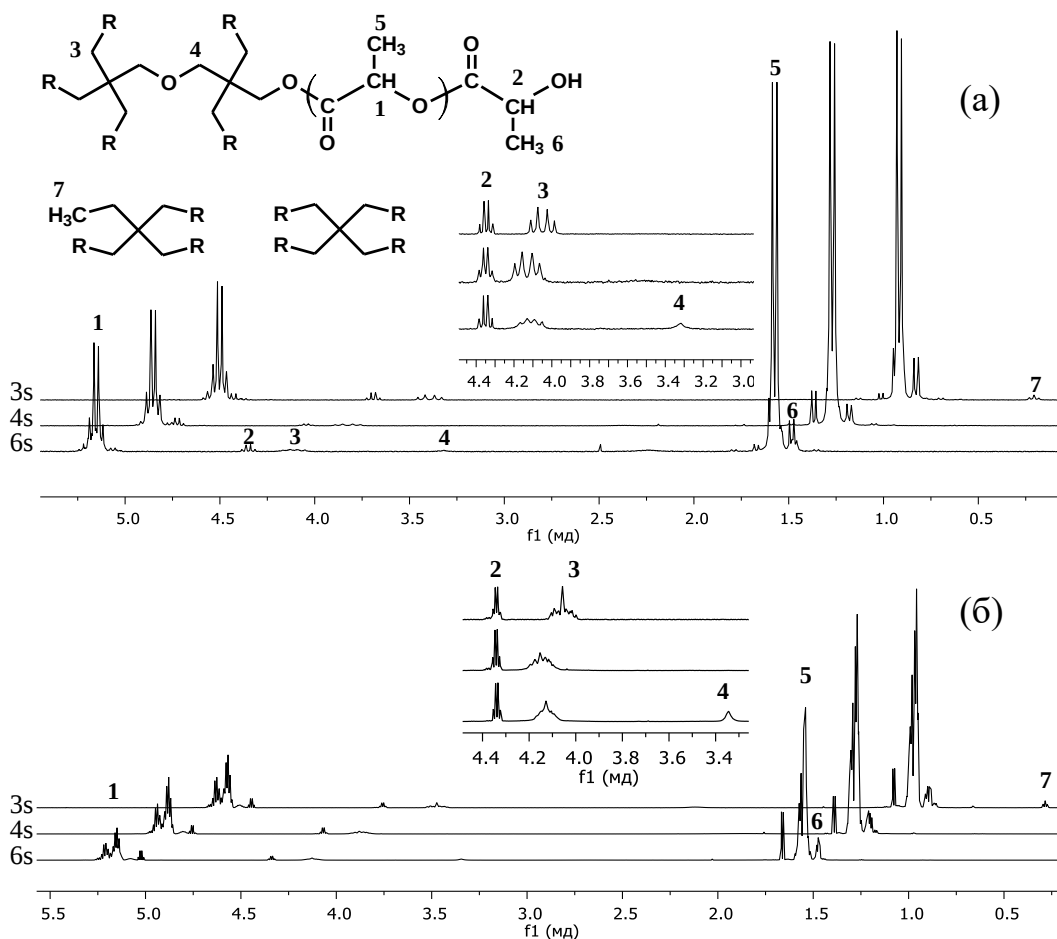


Рисунок 3.14 –  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>25</sub> (a) и PDLLA<sub>25</sub> (б)

Наличие на спектрах сигналов от метиновых протонов в основной цепи  $-\text{CH}-$  (1) в виде квартета у образцов PLLA и двух мультиплетов у PDLLA указывает не только на формирование полимерных цепей, но и на соответствие их изомерии заданной. В равной степени об этом свидетельствует вид и положение сигналов от метильных групп  $-\text{CH}_3-$  под номером 5. Присутствие на спектрах квартета от концевых метиновых протонов (2) в положении 4.35 ppm подтверждает образование концевых гидроксильных групп для всех образцов звездообразных полилактидов. Основываясь на соотношении интегральных интенсивностей сигналов от метиновых протонов (1) основной цепи полилактида и интенсивности сигналов от соответствующих концевых групп (2) была рассчитана средняя степень полимеризации лучей (Формула 3.4). Соответствующая этим значениям

среднечисловая молекулярная масса образцов хорошо коррелирует с теоретически заданной (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Молекулярно-массовые характеристики синтезированных звездообразных поли-L- и поли-D,L-лактидов

| Образец                   | M <sub>расчет.</sub><br>кДа | ГПХ                  |                      |      |                      |                      | M <sub>n</sub> (MALS)/<br>M <sub>n</sub> (RI) | <sup>1</sup> H-ЯМР   |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|------|----------------------|----------------------|-----------------------------------------------|----------------------|
|                           |                             | RI                   |                      |      | MALS                 |                      |                                               | M <sub>n</sub> , кДа |
|                           |                             | M <sub>n</sub> , кДа | M <sub>w</sub> , кДа | PDI  | M <sub>n</sub> , кДа | M <sub>w</sub> , кДа |                                               |                      |
| поли- <b>L</b> -лактиды   |                             |                      |                      |      |                      |                      |                                               |                      |
| 3s-PLLA <sub>10</sub>     | 2.3                         | 2.9                  | 3.4                  | 1.14 | 2.4                  | 2.5                  | 0.83                                          | 2.3                  |
| 3s-PLLA <sub>25</sub>     | 5.5                         | 8.7                  | 9.5                  | 1.10 | 5.3                  | 5.5                  | 0.61                                          | 5.5                  |
| 3s-PLLA <sub>48</sub>     | 10.9                        | 20.3                 | 21.6                 | 1.06 | 10.1                 | 10.3                 | 0.50                                          | 10.5                 |
| 3s-PLLA <sub>96</sub>     | 21.7                        | 36.6                 | 39.8                 | 1.08 | 20.1                 | 21.1                 | 0.55                                          | 20.9                 |
| 4s-PLLA <sub>10</sub>     | 3.0                         | 3.5                  | 4.2                  | 1.19 | 2.8                  | 3.0                  | 0.80                                          | 3.0                  |
| 4s-PLLA <sub>25</sub>     | 7.3                         | 11.7                 | 13.0                 | 1.12 | 7.3                  | 7.5                  | 0.62                                          | 7.3                  |
| 4s-PLLA <sub>50</sub>     | 14.5                        | 21.2                 | 23.1                 | 1.09 | 10.5                 | 11.2                 | 0.50                                          | 14.5                 |
| 4s-PLLA <sub>100</sub>    | 28.9                        | 46.6                 | 55.9                 | 1.19 | 29.8                 | 31.5                 | 0.64                                          | 28.9                 |
| 6s-PLLA <sub>10</sub>     | 4.6                         | 6.3                  | 7.2                  | 1.14 | 5.2                  | 5.5                  | 0.83                                          | 4.6                  |
| 6s-PLLA <sub>25</sub>     | 11.1                        | 16.8                 | 18.6                 | 1.11 | 10.7                 | 11.3                 | 0.64                                          | 11.1                 |
| 6s-PLLA <sub>49</sub>     | 21.8                        | 31.5                 | 34.9                 | 1.11 | 21.3                 | 22.8                 | 0.68                                          | 21.4                 |
| 6s-PLLA <sub>100</sub>    | 43.5                        | 64.7                 | 73.2                 | 1.13 | 40.0                 | 42.1                 | 0.62                                          | 43.5                 |
| поли- <b>D,L</b> -лактиды |                             |                      |                      |      |                      |                      |                                               |                      |
| 3s-PDLLA <sub>25</sub>    | 5.5                         | 7.3                  | 8.0                  | 1.09 | 5.4                  | 5.6                  | 0.74                                          | 5.5                  |
| 3s-PDLLA <sub>100</sub>   | 21.7                        | 29.2                 | 33.4                 | 1.14 | 21.1                 | 22.2                 | 0.72                                          | 21.7                 |
| 4s-PDLLA <sub>25</sub>    | 7.3                         | 9.9                  | 11.4                 | 1.14 | 7.6                  | 8.2                  | 0.77                                          | 7.3                  |
| 4s-PDLLA <sub>100</sub>   | 28.9                        | 39.8                 | 46.5                 | 1.16 | 29.9                 | 31.1                 | 0.75                                          | 28.9                 |
| 6s-PDLLA <sub>25</sub>    | 11.1                        | 13.8                 | 14.7                 | 1.07 | 10.7                 | 11.3                 | 0.78                                          | 11.1                 |
| 6s-PDLLA <sub>100</sub>   | 43.5                        | 52.3                 | 56.9                 | 1.09 | 43.7                 | 44.3                 | 0.84                                          | 43.5                 |

$$DP = \frac{I_{CH}^{(1)} + I_{CH}^{(2)}}{I_{CH}^{(2)}} \quad (3.4)$$

В результате полученные соединения характеризуются молекулярной массой от 2 до 43 кДа в зависимости от количества лучей и степени полимеризации. Остаточное содержание мономера в полимерах после переосаждения не превышает 1.5 моль.%. Кроме сигналов от протонов полилактида на спектрах 3-х лучевых полимеров также присутствуют сигналы от метильных протонов TMP (7), а у 6-ти лучевых от центральных метиленовых протонов DPTOL (4). Из представленных ранее данных (Рисунок 3.6) по изучению кинетики полимеризации лактида можно сделать вывод, что полное превращение функциональных групп молекул со-инициаторов наступает в большинстве случаев при относительно невысоких степенях конверсии мономера на начальных этапах реакции, что должно способствовать равномерному росту полилактидных лучей. На всех спектрах PLLA<sub>n</sub> PDLLA<sub>n</sub> не были обнаружены сигналы от метиленовых протонов молекул со-инициаторов, граничащих с гидроксильными группами. Принимая во внимание этот факт, в совокупности с появлением сигналов от протонов со-инициаторов - CH<sub>2</sub>-O-R- (3), связанных с цепью полилактида, подтверждается формирование полимерных цепей на каждой функциональной группе ядер, что соответствует звездообразному строению синтезированных соединений. Важно отметить, что соотношение интегральных интенсивностей сигналов от метиленовых протонов - CH<sub>2</sub>-O-R (3) и сигналов от концевых групп (2) на всех спектрах равняется двум. Этот факт указывает на преимущественное раскрытие цикла мономера и последующий рост цепей именно на мультифункциональных спиртах, а не на гидроксилсодержащих примесях, таких как вода или молочная кислота, поскольку в этом случае количество концевых групп в системе увеличивалось бы, и соотношение между вышеупомянутыми сигналами оказалось бы меньше двух.

Таким образом, с помощью спектроскопии ЯМР был качественно подтвержден химический состав полимеров, определена средняя степень полимеризации лучей и подтверждено формирование звездообразных структур.

Однако метод  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии позволяет получить лишь усредненное представление о строении макромолекул и не дает ответа на вопрос о равномерности распределения звеньев и возможном присутствии «кометоподобных» структур.

### *Гель-проникающая хроматография с тройным детектированием*

Гель-проникающая хроматография является одним из основополагающих и универсальных методов, используемых при характеристике различных полимеров. Наиболее распространенным детектором, позволяющим оценить характер молекулярно-массового распределения, а также рассчитать значения  $M_n$ ,  $M_w$  и PDI используя калибровочные данные, является рефрактометр (RI). Графики ММР образцов 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub> и PDLA<sub>n</sub> приведены на Рисунках 3.15 и 3.16, соответственно. Все образцы характеризуются мономодальным молекулярно-массовым распределением, при этом PDI варьируется от 1.06 до 1.19, что является достаточно низким значением для разветвленных полилактидов, синтезированных методом ROP в присутствии SnOct<sub>2</sub>. Использование калибровочных стандартов не позволяет определить абсолютные значения молекулярных масс, когда строение и химический состав стандартов и анализируемых образцов отличаются. В данном случае использование полистирольных калибровочных стандартов позволило оценить ММР образцов и относительные значения молекулярных масс (Таблица 3.2). Как видно из представленных данных, по мере увеличения количества лучей и их степени полимеризации можно отметить закономерное увеличение ММ синтезированных звезд. Кроме того, отсутствие выраженной бимодальности и правильная форма пиков указывают на преимущественную полимеризацию мономера на мультифункциональных центрах, а не на возможных гидроксилсодержащих примесях.

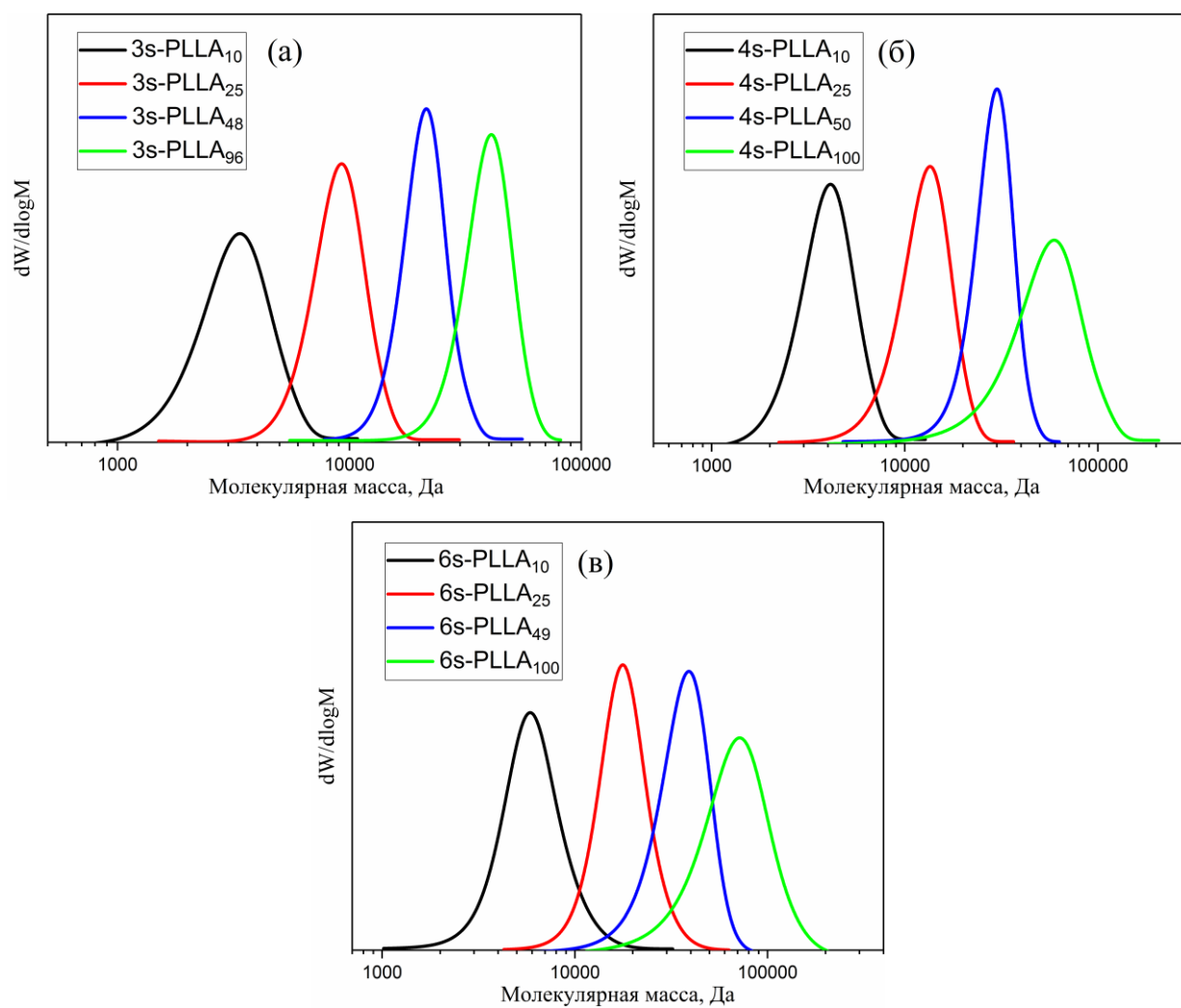


Рисунок 3.15 – Молекулярно-массовые распределения синтезированных звездообразных 3-х (а), 4-х (б) и 6-ти (в) лучевых поли-L-лактидов

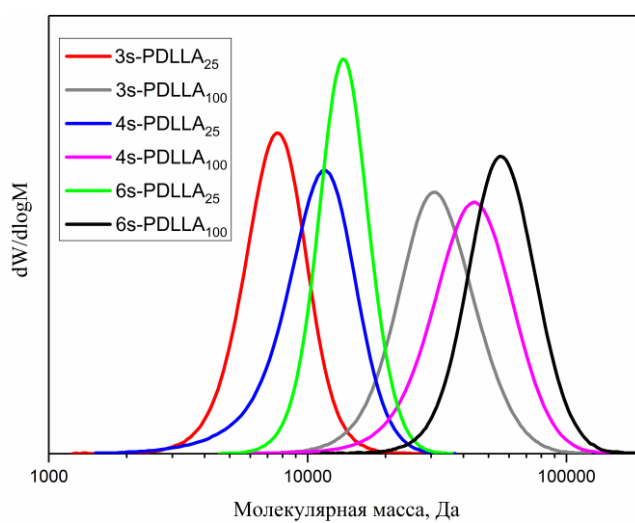


Рисунок 3.16 – Молекулярно-массовые распределения синтезированных звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых поли-D,L-лактидов

В гель-проникающей хроматографии с тройным детектированием рефрактометр в основном используется в качестве концентрационного детектора. Он позволяет не только определить концентрацию раствора полимера, но и параметр  $dn/dc$  – инкремент показателя преломления, использующийся при расчетах абсолютной молекулярной массы в теории статического светорассеяния (Формула 3.5). Уравнение Дебая (Формула 3.6) связывает соотношения Рэлея ( $R_\theta$ ), т.е. интенсивность рассеянного света, отнесенную к интенсивности падающего света с учетом рассеивающего объема и расстояния от него до детектора, с молекулярной массой полимера ( $M$ ). Для частиц меньше  $1/20$  длины волны функция рассеяния  $P(\theta)$  равняется единице и в этом случае можно сказать, что интенсивность рассеянного света пропорциональна концентрации полимера, его молекулярной массе и квадрату  $dn/dc$  (Формула 3.7). Инкремент показателя преломления раствора полилактида в данной работе был принят равным 0.045 мл/г.

$$K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (3.5)$$

$$\frac{K^* c}{R_\theta} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2 c \quad (3.6)$$

$$I(\theta) \sim c \times M \times \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (3.7)$$

В результате за счет дополнительного детектора широкоугольного светорассеяния (MALS) для звездообразных поли-L- и поли-D,L-лактидов были определены абсолютные молекулярные массы, значения которых хорошо коррелируют с расчетными и варьируются в пределах от 2.4 до 44.3 кДа. (Таблица 3.2.). Стоит отметить, что молекулярная масса по MALS для звездообразных полилактидов оказалась ниже значений, определенных по RI. Для образцов PLLA коэффициент пересчета среднечисловой молекулярной массы по полистирольным стандартам в абсолютные значения составил  $0.59 \pm 0.06$ , что хорошо коррелирует с литературными данными для линейных поли-L-лактидов [179]. Исключением в данной серии являются низкомолекулярные образцы 3s/4s/6s-PLLA<sub>10</sub> с поправочным коэффициентом  $0.82 \pm 0.02$ . Для синтезированных 3-х 4-х и 6-ти

лучевых PDLA<sub>25</sub> и PDLA<sub>100</sub> это значение составило уже  $0.77 \pm 0.04$ , что существенно отличается от их частично-кристаллических аналогов. Учитывая установленные поправочные коэффициенты для пересчета молекулярной массы, определенной относительно полистирольных стандартов, в абсолютные значения, можно осуществлять первичную оценку ММ разветвленных полилактидов по данным хроматографии с рефрактометрическим детектором.

Одним из ключевых вопросов, касающихся структуры синтезированных полилактидов, является оценка их степени разветвленности посредством определения коэффициента ветвления  $g$  (Формула 1.2). В данном случае расчет параметра  $g$  через отношение радиуса инерции разветвленного образца к линейному аналогу не представляется возможным. Это связано с ограничениями метода MALS, из-за которых определение  $R_g$  для большинства синтезированных звездообразных полимеров с массой менее 50 кДа не имеет физического смысла. Альтернативным вариантом является оперирование не радиусом инерции, а характеристической вязкостью полимеров и, соответственно, коэффициентом ветвления  $g'$  (Формула 1.3). С высокой точностью оценить вязкость растворов полимеров позволяет вискозиметрия, выступающая в качестве третьего детектора в системе гель-проникающей хроматографии. В процессе измерений напрямую определяются значения удельной вязкости  $([\eta_{уд}])$ . Концентрационная зависимость  $[\eta_{уд}]$  может быть разложена в ряд, известный как уравнение Хаггинса (Формула 3.8). Коэффициент  $k'$  – это постоянная Хаггинса, численно варьирующаяся в пределах от 0 до 0.3 для полимеров с конформацией клубка в термодинамически хороших растворителях. В гель-проникающей хроматографии концентрация ( $c$ ) пробы обычно настолько низка, что ее квадратичными слагаемыми можно пренебречь и использовать для расчета характеристической вязкости приближенную Формулу 3.9.

$$\eta_{уд} = [\eta]c + k'[\eta]^2c^2 \quad (3.8)$$

$$[\eta] \cong \eta_{уд}/c \quad (3.9)$$

Полученные графики в координатах Марка-Куна-Хаувинка для звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>/PDLLA<sub>n</sub> представлены на Рисунке 3.17. Соответствующие значения характеристической вязкости средневесовой фракции образцов  $[\eta]_w$  приведены в Таблице 3.3.

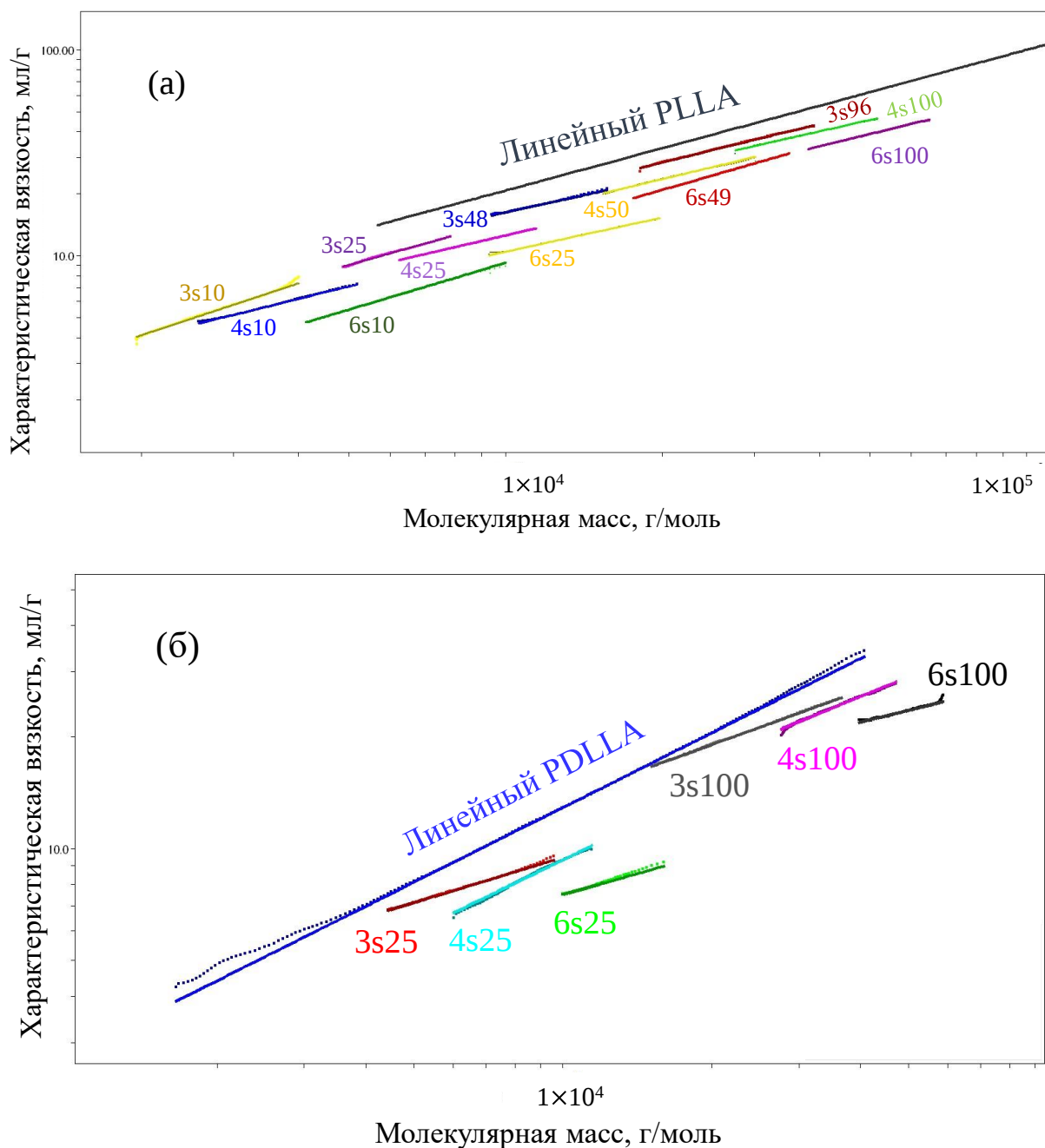


Рисунок 3.17 – Графики зависимости характеристической вязкости от молекулярной массы для звездообразных поли-L- (а) и поли-D,L-лактидов (б)

Независимо от своего строения и состава значения  $[\eta]_w$  всех звездообразных полимеров находятся ниже аналогичных значений для линейных полимеров той же

изомерии при идентичных молекулярных массах. Этот факт свидетельствует в пользу звездообразного строения синтезированных поли-L- и поли-D,L-лактидов. Кроме того, у образцов с аналогичной молекулярной массой по мере увеличения числа лучей можно также отметить существенное уменьшение их вязкости. Так, например, у 3s-PLLA<sub>48</sub> с ММ порядка 11 кДа  $[\eta]_w$  составила 18.4 мл/г, а у 6s-PLLA<sub>25</sub> при близких значениях молекулярной массы уже 13.3 мл/г. Это указывает на закономерное увеличение степени ветвления по мере возрастания функциональности со-инициаторов при переходе от TMP к DPTOL. Для того чтобы количественно оценить разветвленность макромолекул необходимо рассчитать параметр  $g'$  (Формула 1.3). Характеристическая вязкость линейных полилактидов с молекулярной массой ( $M_w$ ) равной звездообразным аналогам, была определена по уравнению Марка-Куна-Хаувинка (Формула 3.10, Таблица 3.3). Необходимые константы уравнения  $a$  и  $K$  были определены экспериментально исходя из анализа кривых линейных образцов PLLA и PDLLA фирмы Corbion (Рисунок 3.17). По результатам трех измерений для линейного поли-L-лактида константа  $a$  была принята равной 0.712, а константа  $K = 0.031$ , для линейного поли-D,L-лактида  $a = 0.687$ ,  $K = 0.026$ , соответственно.

Было установлено, что коэффициент ветвления  $g'$  для всех звездообразных полимеров оказался меньше единицы и закономерно уменьшался по мере увеличения числа лучей. При этом наименее компактной структурой обладает образец 3s-PDLLA<sub>100</sub> с коэффициентом 0.89, а наиболее компактным оказался 6-ти лучевой 6s-PLLA<sub>10</sub> с  $g'$  равным 0.46. Наблюдаемая тенденция указывает на звездообразное молекулярное строение у синтезированных серий полилактидов. Для того, чтобы количественно оценить распределение мономерных звеньев по лучам можно сравнить  $g'$  с теоретически рассчитанным ( $g'_{\text{теор}}$ ) по Формуле 1.6. Данная полуэмпирическая формула была выведена Douglas и Freed на основе результатов изучения растворов звездообразных полистиролов в  $\theta$ -условиях с учетом вклада от исключенного объема. Единственной переменной, определяющей коэффициент ветвления, в данной формуле является число лучей  $f$ . В Таблице 3.3

приведены данные  $g'$  для синтезированных звездообразных PLA и соответствующие этим коэффициентам значения расчетного числа лучей  $f_{\text{расчет}}$ .

$$[\eta]_{w,\text{линейный}} = K \times M_w^a \quad (3.10)$$

Таблица 3.3 – Характеристическая вязкость и коэффициент ветвления синтезированных звездообразных поли-L- и поли-D,L-лактидов

| Образец                 | $h$ | $[\eta]_w$ , мл/г | $[\eta]_w$ ,<br>линейный мл/г | $g'$ | $f_{\text{расчет}}$ | $f_{\text{расчет}}/h$ |
|-------------------------|-----|-------------------|-------------------------------|------|---------------------|-----------------------|
| 3s-PLLA <sub>10</sub>   | 3   | 5.5               | 8.3                           | 0.67 | 4.4                 | 1.47                  |
| 3s-PLLA <sub>25</sub>   |     | 10.8              | 14.5                          | 0.75 | 3.6                 | 1.20                  |
| 3s-PLLA <sub>48</sub>   |     | 18.4              | 22.6                          | 0.81 | 3.1                 | 1.03                  |
| 3s-PLLA <sub>96</sub>   |     | 32.6              | 37.7                          | 0.86 | 2.8                 | 0.93                  |
| 4s-PLLA <sub>10</sub>   | 4   | 5.7               | 9.4                           | 0.61 | 5.2                 | 1.30                  |
| 4s-PLLA <sub>25</sub>   |     | 11.8              | 18.0                          | 0.65 | 4.7                 | 1.18                  |
| 4s-PLLA <sub>50</sub>   |     | 17.2              | 24.0                          | 0.72 | 4.0                 | 1                     |
| 4s-PLLA <sub>100</sub>  |     | 38.9              | 50.2                          | 0.78 | 3.4                 | 0.85                  |
| 6s-PLLA <sub>10</sub>   | 6   | 6.6               | 14.5                          | 0.46 | 8.0                 | 1.33                  |
| 6s-PLLA <sub>25</sub>   |     | 13.3              | 24.2                          | 0.55 | 6.1                 | 1.02                  |
| 6s-PLLA <sub>49</sub>   |     | 25.8              | 39.8                          | 0.65 | 4.7                 | 0.78                  |
| 6s-PLLA <sub>100</sub>  |     | 39.1              | 61.7                          | 0.63 | 5.0                 | 0.83                  |
| 3s-PDLLA <sub>25</sub>  | 3   | 8.2               | 9.7                           | 0.85 | 2.8                 | 0.93                  |
| 3s-PDLLA <sub>100</sub> |     | 22.1              | 24.9                          | 0.89 | 2.6                 | 0.87                  |
| 4s-PDLLA <sub>25</sub>  | 4   | 9.3               | 12.6                          | 0.74 | 3.8                 | 0.95                  |
| 4s-PDLLA <sub>100</sub> |     | 24.6              | 31.4                          | 0.78 | 3.4                 | 0.85                  |
| 6s-PDLLA <sub>25</sub>  | 6   | 9.2               | 15.6                          | 0.59 | 5.6                 | 0.93                  |
| 6s-PDLLA <sub>100</sub> |     | 24.7              | 40.0                          | 0.62 | 5.1                 | 0.85                  |

Из представленных данных видно, что значения  $f_{\text{расчет}}$  в целом хорошо коррелируют со значениями функциональности используемых со-инициаторов  $h$ , определяющих максимально возможное число лучей. В случае некоторых низкомолекулярных PLLA можно отметить превышение расчетного числа лучей над возможным, что вероятно является следствием теоретического расчета значений  $[\eta]_w$  для линейных аналогов PLA, участвующих в формуле определения коэффициента ветвления, и возможной погрешности установленных параметров  $a$  и  $K$  в низкомолекулярной области. Для остальных более высокомолекулярных звездообразных образцов, как среди PLLA, так и PDLLA можно отметить близость расчетного числа лучей к показателю функциональности со-инициатора ( $f_{\text{расчет}}/h \sim$

1) или незначительное отклонение числа лучей в сторону меньшей разветвленности по сравнению с  $h$ . В данном случае, поскольку с помощью спектроскопии ЯМР была подтверждена полная конверсия функциональных групп молекул со-инициаторов, это указывает не на отсутствие заданного числа лучей, а на их неравномерную длину. Однако даже у высокомолекулярных звездообразных PLA эти отклонения находятся в пределах от 7 до 17%, что подтверждает отсутствие так называемых «кометоподобных» макромолекул, по строению напоминающих линейные системы.

Таким образом, в результате анализа методом гельпроникающей хроматографии с тройным детектированием для звездообразных полилактидов были определены коэффициенты пересчета молекулярной массы по полистирольным стандартам в абсолютные значения, установлено что синтезированные 3-х, 4-х и 6-ти лучевые поли-L- и поли-D,L-лактиды со средней степенью полимеризации лучей в интервале от 10 до 100 обладают молекулярным разветвленным строением близким к теоретически заданному и характеризуются мономодальным ММР с молекулярными массами от 2.5 до 44.3 кДа.

#### *Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией*

Как было упомянуто ранее, для более детального анализа строения звездообразных полилактидов необходимо использовать комплекс инструментальных методов. Поэтому чтобы установить возможное содержание в синтезированных полимерах высокой доли линейных или циклических примесей ряд синтезированных соединений был исследован с помощью масс-спектрометрии МАЛДИ. В силу ограниченной способности высокомолекулярных соединений к ионизации, анализ методом МАЛДИ был проведен только для 3-х и 4-х лучевых PLLA<sub>10</sub>. Эффективность ионизации этих олигомеров была достаточна для регистрации масс-спектров с относительно интенсивными пиками соответствующих ионов. В то же время масс-спектр образца 6s-PLLA<sub>10</sub> с ММ порядка 5 кДа оказался уже неинформативным и состоял только из

низкоинтенсивных сигналов. Регистрация спектров для образцов с большей степенью полимеризации лучей не представлялась возможной. Анализ полученных данных ясно показывает, что исследуемые звездообразные поли-L-лактиды характеризуются мономодальным колоколообразным распределением с низкой полидисперсностью (Рисунок 3.18).

В отсутствие побочных реакций переэтерификации полилактид должен состоять из фракций четных полимерных цепей, отличающихся друг от друга на 144 Да, т.е. на молекулярную массу молекулы лактида. Из представленных масс-спектров, в частности на Рисунке 3.18 (б) можно наблюдать присутствие менее интенсивной нечетной фракции молекул с периодичностью в 72 Да, свидетельствующей о протекании побочной реакции межмолекулярной переэтерификации сегментального обмена, которая всегда сопровождает полимеризацию лактида с раскрытием цикла в присутствии октаноата олова. Важно отметить, что на полученных спектрах фракций макромолекул, по молекулярным массам соответствующих линейным или циклическим структурам, на масс-спектрах 3s-PLLA<sub>10</sub> и 4s-PLLA<sub>10</sub> обнаружено не было. В недавней работе [65] было показано, что даже при высокой интенсивности реакции межмолекулярной переэтерификации, т.е. в случае равной доли цепей с четным и нечетным числом мономерных звеньев, образование циклов может не происходить из-за более высокой энергии активации. Полученные результаты указывают на минимальное протекание реакций внутримолекулярной переэтерификации и ROP лактида на возможных гидроксилсодержащих примесях. Полученные значения молекулярных масс всех трех образцов (Рисунок 3.18) хорошо коррелируют с теоретически заданными и измеренными абсолютными значениями, а наличие нечетных цепей не привело к значимому возрастанию индексов полидисперсности (Таблица 3.2).

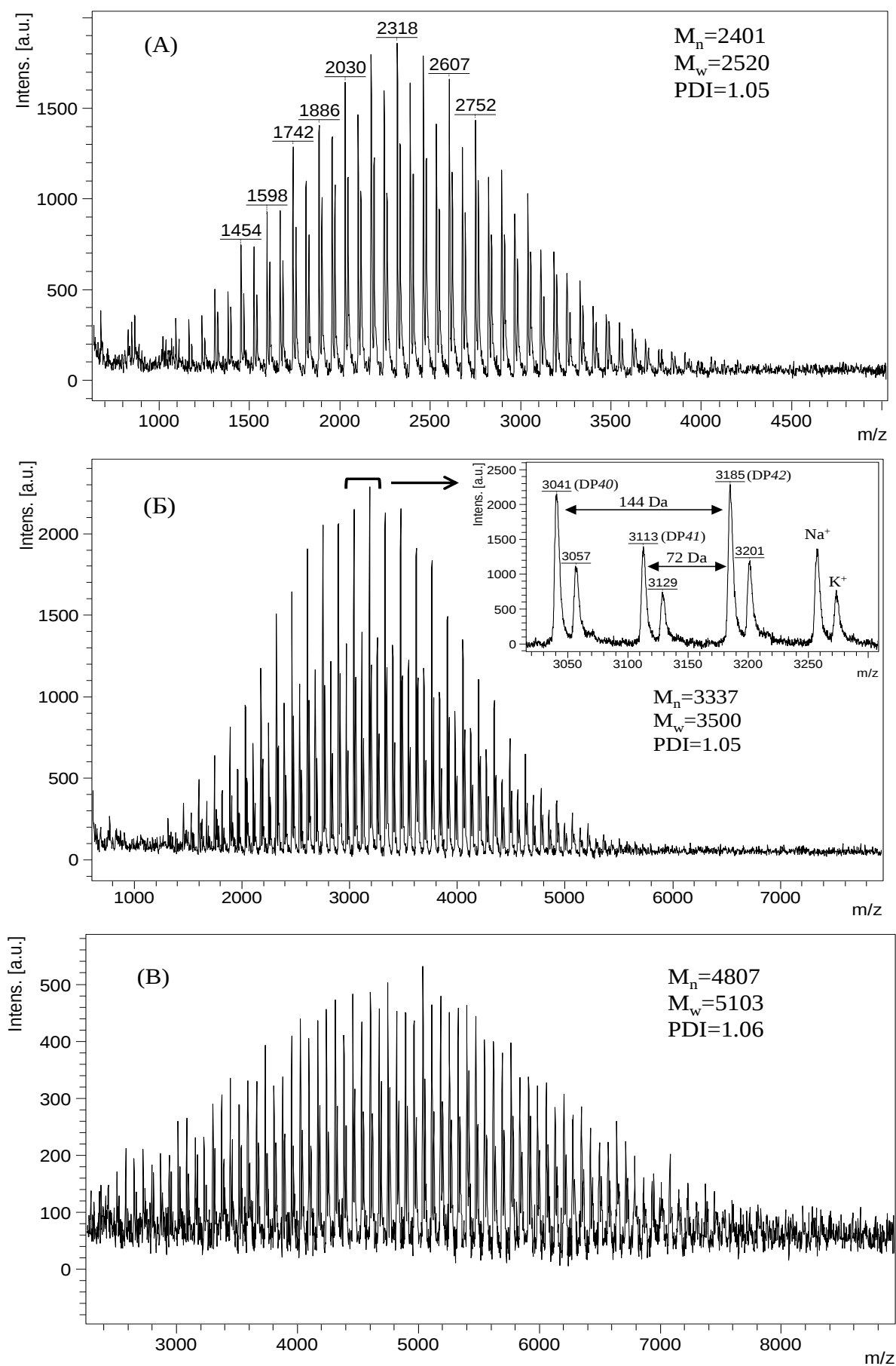


Рисунок 3.18 – Масс-спектры МАЛДИ звездообразных олигомеров 3s-PLLA<sub>10</sub> (а), 4s-PLLA<sub>10</sub> (б) и 6s-PLLA<sub>10</sub> (в).

Кроме того, при сравнении экспериментальных значений соотношения массы к заряду ( $m/z$ ) любой из фракций на спектре с теоретическим расчетом, было обнаружено, что совпадение с точностью до одного г/моль произойдет лишь при учете молекулярной массы используемого со-инициатора. Для примера, в образце 4s-PLLA<sub>10</sub> фракцию с соотношением  $m/z = 3185$  Да можно представить как сумму молекулярных масс пентаэритрита и поли-L-лактидных цепей с общей степенью полимеризации 42:

$$m/z (3185 \text{ Да}) = \text{MM}(\text{PTOL}) + \text{MM}(\text{Na}^+) + (\text{MM}(\text{мономерного звена}) \times \text{DP}) = 136.15 + 23 + (72.06 \times 42)$$

Аналогичные расчеты можно провести для всех образцов низкомолекулярных поли-L-лактидов, что напрямую подтверждает присутствие центра ветвления в каждой из представленных фракций макромолекул.

В результате строение и состав синтезированных звездообразных полилактидов были качественно и количественно охарактеризованы с помощью методов ГПХ с тройным детектированием, спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии. Установлено минимальное содержание неразветвленных побочных продуктов и достаточно точное соответствие между расчетной и экспериментальной молекулярной структурой синтезированных полимеров. Это обеспечивает возможность проведения дальнейшего достоверного анализа взаимосвязи структуры звездообразных молекул с комплексом их физико-химических свойств.

### **3.1.3 Термические свойства и кристаллическая структура звездообразных полилактидов**

Термический анализ может дать много полезной информации о свойствах звездообразных полилактидов, в т.ч. важных в аспекте их биомедицинского применения. Так, варьируя степень кристалличности, температуру стеклования и кристаллизации полимеров возможно регулировать кинетику биоразложения, а также скорость высвобождения лекарственных веществ. Кроме того, определение температуры плавления и деструкции высокомолекулярных соединений дает

понимание о возможном температурном окне переработки материалов. По результатам ТГА температура деструкции звездообразных PLLA<sub>n</sub> и PDLLA<sub>n</sub> возрастает с увеличением молекулярной массы лучей. Например, для образца 3s-PLLA<sub>10</sub> температура 5%-ой потери массы составила 205 °С, в то время как для длины 100 это значение увеличилось до 260 °С (Рисунок 3.19 (а)). Число лучей, приходящихся на одну молекулу, оказало слабое влияние на температуру деструкции, как для частично-кристаллических, так и для аморфных полилактидов (Рисунок 3.19 (б)).

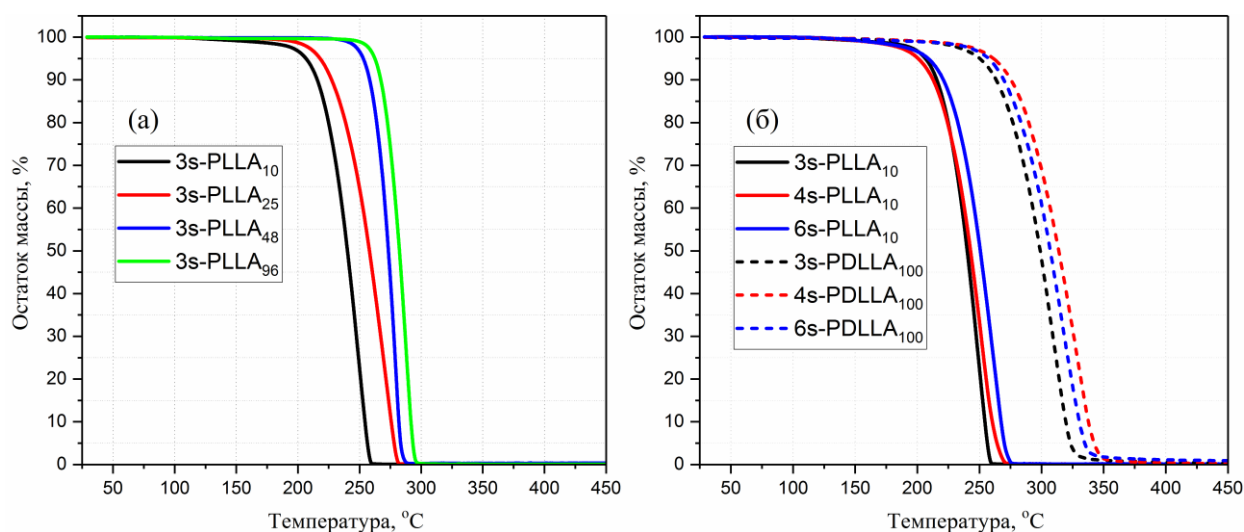


Рисунок 3.19 – ТГА кривые для образцов 3-х лучевых поли-L-лактидов ( $n = 10, 25, 48, 96$ ) (а) и 3-х, 4-х и 6-ти лучевых поли-L- и поли-D,L-лактидов ( $n = 10$  и 100)

С помощью дифференциально сканирующей калориметрии были определены значения температуры стеклования ( $T_g$ ), температуры плавления ( $T_m$ ), и степени кристалличности ( $X_c$ ) синтезированных звездообразных полилактидов (Таблица 3.4). ДСК кривые для аморфных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PDLLA<sub>n</sub> приведены на Рисунке 3.20. На Рисунке 3.21 представлены ДСК кривые для серии частично-кристаллических образцов PLLA<sub>n</sub> после отжига и после аморфизации соответственно. После первого нагрева проводили аморфизацию с целью минимизации доли кристаллической фазы и более точного определения  $T_g$  образцов. Температуру плавления наряду со степенью кристалличности (Формула 3.11) определяли по первому нагреву отожженных образцов.

$$X_{\text{кр}} = \frac{\Delta H_m + \Delta H_c}{106} \times 100\% \quad (3.11)$$

$\Delta H_m$  – энтальпия плавления,  $\Delta H_c$  – энтальпия холодной кристаллизации, а 106 Дж/г является теоретическим значением энтальпии плавления PLLA со степенью кристалличности 100% [180].

Таблица 3.4 – Температура стеклования, плавления и степень кристалличности звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых полилактидов

| Степень<br>полимеризации | T <sub>g</sub> , °C |    |    | T <sub>m</sub> , °C |          |          | X <sub>c</sub> , % |    |    |
|--------------------------|---------------------|----|----|---------------------|----------|----------|--------------------|----|----|
|                          | Кол-во лучей        |    |    |                     |          |          |                    |    |    |
|                          | 3                   | 4  | 6  | 3                   | 4        | 6        | 3                  | 4  | 6  |
| PLLA <sub>10</sub>       | 32                  | 37 | 43 | -                   | -        | 102      | -                  | -  | 2  |
| PLLA <sub>25</sub>       | 51                  | 54 | 55 | 118, 132            | 127, 134 | 129      | 42                 | 42 | 38 |
| PLLA <sub>50</sub>       | 57                  | 58 | 59 | 150                 | 148      | 155      | 53                 | 49 | 45 |
| PLLA <sub>100</sub>      | 60                  | 61 | 61 | 160, 162            | 164      | 157, 162 | 59                 | 54 | 38 |
| PDLLA <sub>25</sub>      | 34                  | 39 | 42 | -                   | -        | -        | -                  | -  | -  |
| PDLLA <sub>100</sub>     | 51                  | 51 | 51 | -                   | -        | -        | -                  | -  | -  |

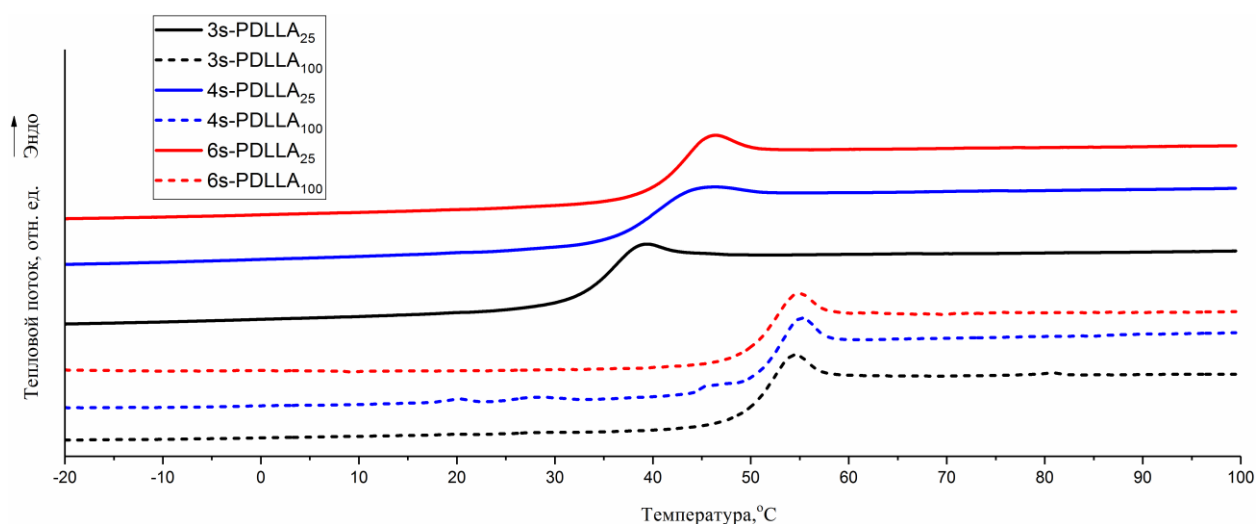


Рисунок 3.20 – ДСК кривые звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти поли-D,L-лактидов со степенью полимеризации 25(сплошные линии) и 100 (пунктирные линии)

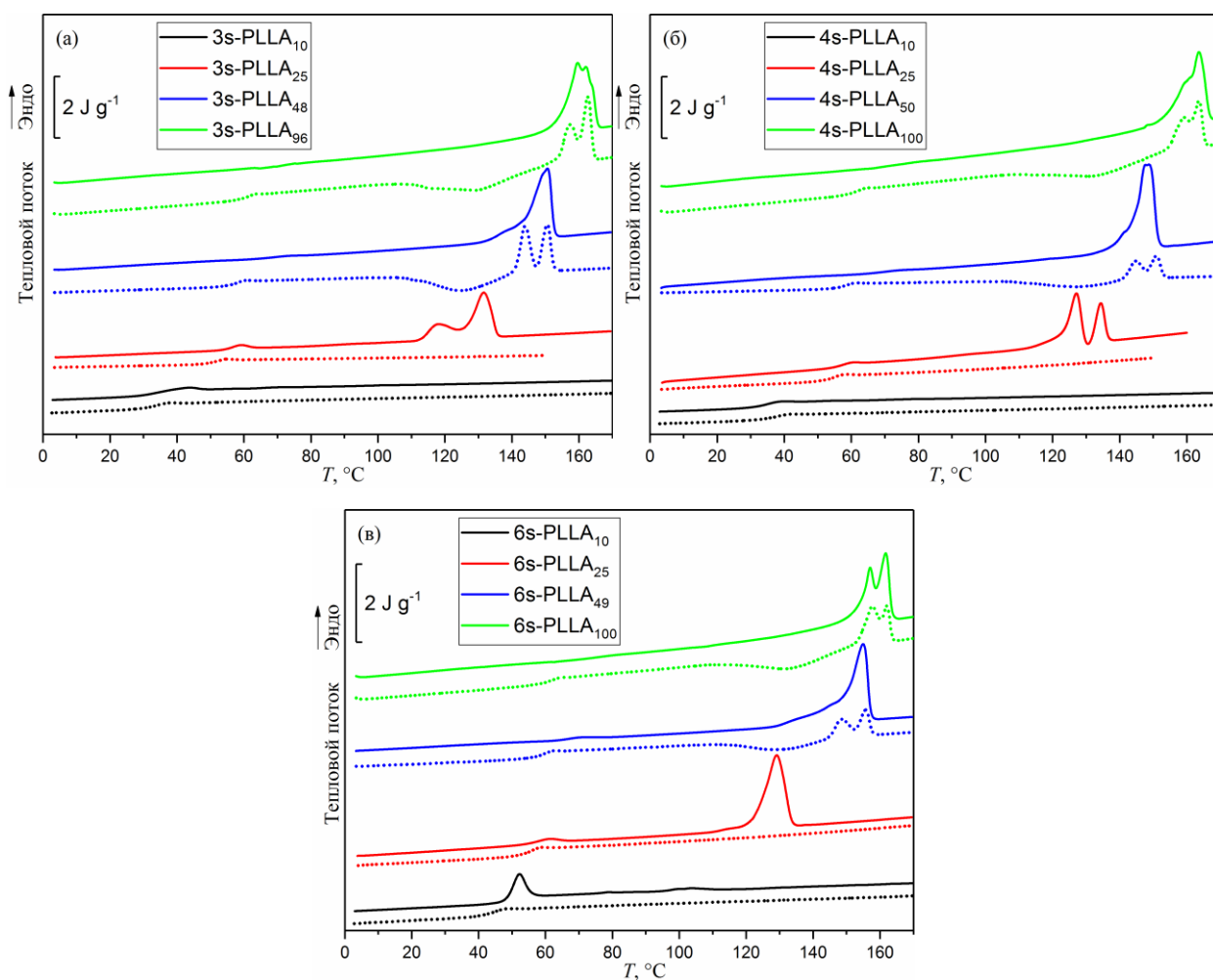


Рисунок 3.21 – ДСК кривые звездообразных 3-х (а), 4-х (б) и 6-ти (в) поли-L-лактидов после отжига (сплошные линии) и аморфизации (пунктирные линии)

Температура стеклования для обеих серий звездообразных полилактидов находится в пределах от 32 до 61 °С, увеличивается по мере возрастания средней степени полимеризации лучей и слабо зависит от их общего числа для большинства образцов (Таблица 3.4). Возрастание  $T_g$  по мере увеличения молекулярной массы является характерным поведением для олигомеров и связано с уменьшением влияния доли концевых групп на свободный объем. Влияние разветвленности на  $T_g$  и, соответственно, на сегментальную подвижность хорошо прослеживается на полимерах с невысокой степенью полимеризации лучей. Для звездообразных PLLA<sub>10</sub> и PDLA<sub>25</sub> температура стеклования увеличивается практически на 10 °С по мере перехода от 3-х к 6-ти лучам при аналогичной молекулярной массе лучей. При более высоких степенях полимеризации влияние различной функциональности со-инициаторов на  $T_g$  происходит в меньшей степени. Данный

факт согласуется с вычислениями, произведенными в работе [114], которые демонстрируют, что в соответствии с уравнением Флори-Фокса при бесконечно большой молекулярной массе влияние разветвленного строения полилактида на температуру стеклования является минимальным.

По аналогии с  $T_g$ , температура плавления, а также степень кристалличности поли-L-лактидов после отжига увеличивается с ростом длины лучей PLLA за счет образования более совершенных кристаллитов, обеспечиваемых уменьшающимся воздействием концевых участков цепей (Таблица 3.4). Наличие на кривых ДСК бимодальных пиков плавления, для полилактидов отожденных при температуре от 110 до 130 °C, в литературе связывают с изменением надмолекулярной структуры полимерных цепей и/или морфологии кристаллитов в процессе плавления полимера, а не с процессом плавления/рекристаллизации менее стабильных  $\alpha'$ -кристаллов в стабильную  $\alpha$ -форму [181]. Соотношение высоко- и низкотемпературной фазы определяется условиями кристаллизации, что отчетливо видно на примере 3s-PLLA<sub>48</sub>, у которого при первом нагреве после отжига на кривой ДСК присутствует мономодальный пик плавления, а после аморфизации и кристаллизации цепей в процессе нагревания со скоростью 20 °C/мин – бимодальный (Рисунок 3.21 (а)).

На кривых ДСК аморфизованных звездообразных PLLA со степенью полимеризации 10 и 25 пики, соответствующие холодной кристаллизации или плавлению обнаружены не были (Рисунок 3.21). В то же время все образцы PLLA<sub>25</sub> наряду с 6s-PLLA<sub>10</sub> после отжига демонстрируют пик плавления, что указывает на их способность к кристаллизации. При наличии после отжига бимодального пика плавления в Таблице 3.4 через запятую отражены значения  $T_m$  для обоих пиков. Изменение  $T_m$  в пределах от 102 до 164 °C в основном обусловлено влиянием длины лучей, а не их количеством, в то время как  $X_c$  в явной степени уменьшается в ряду 3s/4s/6s при аналогичной степени полимеризации лучей. Похожее влияние звездообразного строения на  $X_c$  полимеров было отражено авторами в публикациях [114, 182], при исследовании процесса кристаллизации линейного и 4-х лучевого поли-L-лактида в изотермических и динамических условиях.

Более детально влияние строения звездообразных поли-L-лактидов на кристаллическую структуру было изучено методом рентгеновской дифракции в больших углах. Дифрактограммы 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub> после отжига при температуре кристаллизации в течение 6 часов представлены на Рисунке 3.22.

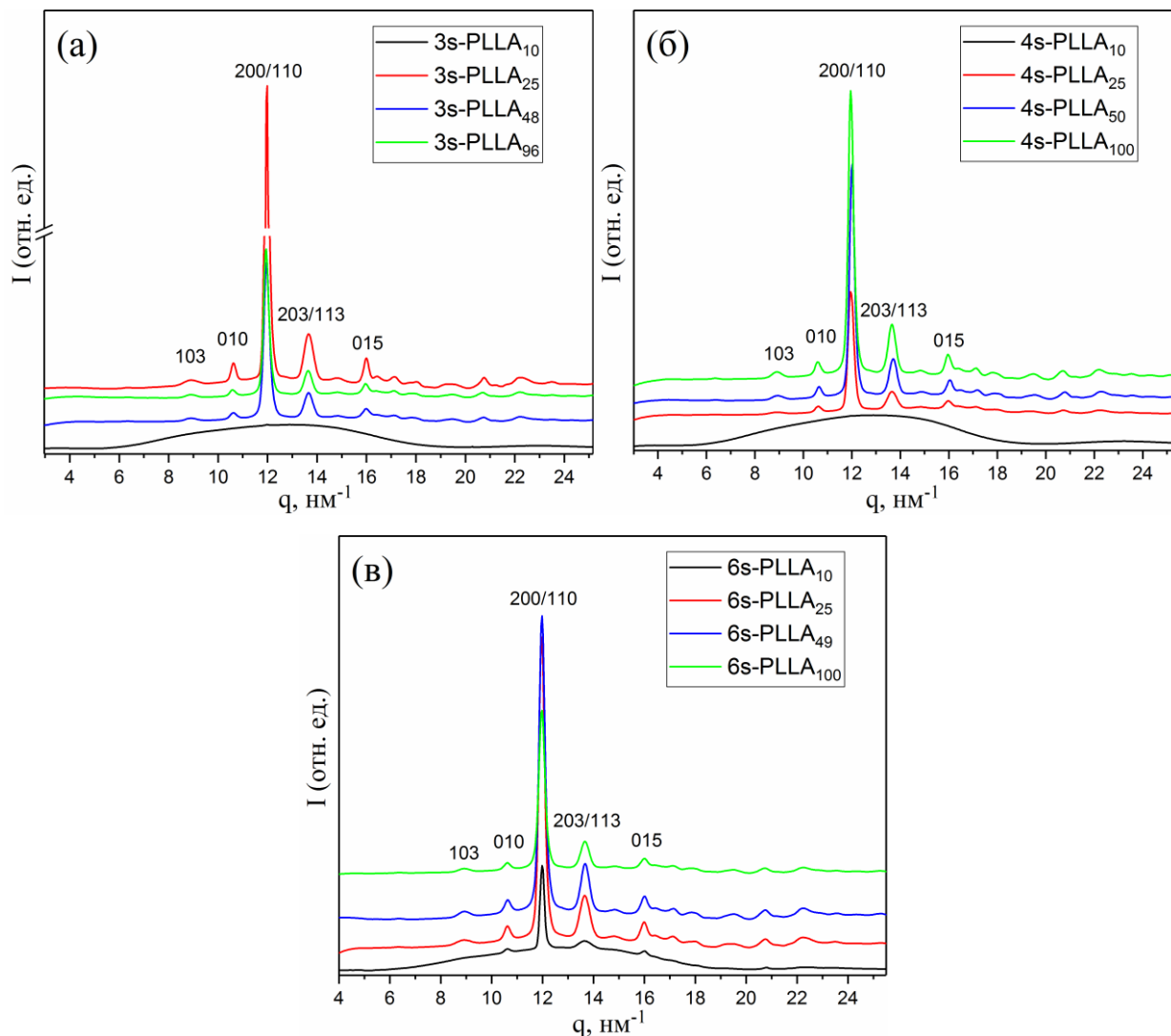


Рисунок 3.22 – Дифрактограммы 3-х (а), 4-х (б) и 6-ти (в) лучевых поли-L-лактидов

Для звездообразных поли-L-лактидов со степенью полимеризации 25 и выше наблюдается два основных кристаллических рефлекса при значениях вектора рассеяния  $q$  11.9 и 13.6  $\text{nm}^{-1}$ . Эти два пика имеют индексы (200)/(110) и (203)/(113)  $\alpha$ -формы кристаллического поли-L-лактида. Другие рефлексы, четко наблюдаемые на дифрактограммах, а именно (004)/(103), (110), (115), также подтверждают образование  $\alpha$ -кристаллической фазы [183, 184].

Было установлено, что 3-х и 4-х лучевые PLLA<sub>10</sub> являются полностью аморфными, так как кристаллические рефлексы на их дифрактограммах отсутствуют. В то же время интересно отметить, что на дифрактограмме 6-ти лучевого PLLA<sub>10</sub> в тех же условиях наблюдаются ряд рефлексов невысокой интенсивности ( $X_c = 13\%$ ), что указывает на то, что увеличение степени разветвленности при низких молекулярных массах может способствовать кристаллизации поли-L-лактида. Этот вывод также подтверждается данными ДСК, поскольку небольшой пик плавления после отжига присутствовал на кривой образца 6s-PLLA<sub>10</sub>. Этот эффект может быть объяснен меньшим критическим размером зародыша из-за затрудненной подвижности цепей, связанных с точкой ветвления в виде молекулы DPTOL. Это является довольно неожиданным результатом, поскольку в работе [185] было показано, что для кристаллизации полилактидных цепей требуется не менее 11 мономерных звеньев. Альтернативным объяснением наблюдаемого поведения может быть некоторая неоднородность по длинам лучей в случае 6-ти лучевого PLLA<sub>10</sub>, который, вероятно, содержит более высокую долю цепей с  $DP \geq 11$ . Степень кристалличности, а также величина размера области когерентного рассеяния  $h_{окр}$  звездообразных поли-L-лактидов представлены в Таблице 3.5. Размер области когерентного рассеяния был рассчитан по уравнению Селякова-Шеррера (Формула 3.12) из наиболее интенсивного рефлекса 200/110.

$$h_{окр} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (3.12)$$

где  $K$  – безразмерный коэффициент,  $\lambda$  – длина волны рентгеновского излучения,  $\beta$  – ширина рефлекса на полувысоте и  $\theta$  – угол рассеяния.

Значения  $X_c$ , рассчитанные из дифрактограмм, оказались выше примерно на 25%, чем аналогичные значения, определенные с помощью ДСК. Это может быть вызвано тем, что значение энтальпии плавления 100% закристаллизованного PLLA, используемое в Формуле 3.11, может отличаться от 106 Дж/г для звездообразных полилактидов, что приводит к некорректным расчетам. В то же время тенденция уменьшения степени кристалличности с увеличением числа лучей

также прослеживается в ряду образцов 3s/4s/6s-PLLA<sub>100</sub>, что в совокупности с вышесказанным указывает на то, что при определенных молекулярных массах звездообразное строение молекул может затруднять кристаллизацию цепей.

Таблица 3.5 – Степень кристалличности и размер области когерентного рассеяния 3-х, 4-х и 6-ти лучевых поли-L-лактидов

| Степень<br>полимеризации | $h_{\text{ОКР}}$ , нм |    |    | $X_c$ , % |    |    |
|--------------------------|-----------------------|----|----|-----------|----|----|
|                          | Количество лучей      |    |    |           |    |    |
|                          | 3                     | 4  | 6  | 3         | 4  | 6  |
| 10                       | -                     | -  | 26 | -         | -  | 13 |
| 25                       | 25                    | 19 | 19 | 68        | 70 | 68 |
| 50                       | 18                    | 20 | 17 | 73        | 76 | 75 |
| 100                      | 19                    | 18 | 17 | 79        | 77 | 70 |

В результате было установлено, что температура стеклования и плавления слабо зависят от числа лучей в молекуле звездообразного полилактида, за исключением образцов со степенью полимеризации 10 и 25, у которых затруднение сегментальной подвижности, и как следствие увеличения температуры стеклования, наблюдается по мере перехода от 3-х к 6-ти лучевым PLA. Наличие точки ветвления может оказывать влияние и на способность к кристаллизации образцов. Для звездообразных PLLA с большим разветвлением характерны более низкие значения степени кристалличности при аналогичных длинах лучей.

### 3.1.4 Синтез и характеристика звездообразных поли-D,L-лактидов с концевыми карбоксильными группами

Несмотря на широкое исследование и применение полилактида в качестве биосовместимого и биоразлагаемого материала для создания клеточных матриц, хирургических имплантатов, а также в системах по доставке лекарственных средств, в последнее время активно ведутся работы, направленные на модифицирование и улучшение его физико-химических свойств с целью создания новых материалов биомедицинского назначения. Одним из способов

достижения этого является перефункционализация концевых групп. Наиболее распространенным типом концевых функциональных групп в молекулах звездообразных полилактидов являются ОН-группы, присутствие которых обеспечивается на стадии полимеризации по механизму «координации-внедрения» за счет использования в качестве со-инициаторов гидроксилсодержащих соединений. В условиях реакции молекулы спиртов взаимодействуют с катализатором октаноатом олова с образованием алкоксидных связей (Рисунок 1.13). Гидролиз инициирующей полимеризацию мономера концевых алкоксидных групп приводит к формированию концевых ОН-групп в молекулах полилактидов. В свою очередь замена концевых ОН-групп на карбоксильные (COOH) обеспечивает ряд преимуществ, а именно открывает возможность для ковалентного связывания биологически активных лигандов в мягких условиях, регулирования сроков биodeградации, а также получения материалов, молекулы которых связаны друг с другом ионными взаимодействиями [186]. Известно, что несмотря на высокие показатели механических свойств медицинских изделий из полилактида, одним из его недостатков может являться относительно долгий срок биodeградации материала. Чаще всего регулирование сроков биodeградации происходит посредством синтеза сополимеров лактида с другими циклическими сложными эфирами. Однако как было показано в литературном обзоре, карбоксилирование звездообразных полилактидов может приводить к увеличению скорости деградации и повышению термической стабильности макромолекул. Помимо этого, на основе полилактидов с концевыми COOH-группами возможно создание иономеров - материалов, обладающих свойствами памяти формы и самозалечивания.

Для проведения экспериментов по изучению влияния не только строения, состава, степени кристалличности, но и типа концевых групп звездообразных полилактидов на кинетику их гидролитической деградации, дополнительно к полимерам с концевыми гидроксильными группами, была синтезирована серия аморфных поли-D,L-лактидов с концевыми карбоксильными группами: **3s-/6s-PDLLA<sub>n</sub>-COOH**, где n – это средняя степень полимеризации луча.

Анализ литературы показал, что при работе с полимерами медицинского назначения в качестве карбоксилирующего агента чаще всего используется янтарный ангидрид [187]. Существует несколько способов модификации ОН-групп янтарным ангидридом: первый направлен на проведение реакции в растворе или расплаве при высокой температуре, второй подразумевает использование катализаторов, например распространенной пары, DMAP и триэтиламина (TEA) в растворе при комнатной температуре. В отличие от карбоксилирования первичных ОН-групп, например, у полиэтиленгликоля, при повышенных температурах в растворе или расплаве, модификация вторичных ОН-групп полилактида протекает с существенно меньшей эффективностью. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что оптимальными условиями проведения модификации звездообразных поли-D,L-лактидов янтарным ангидридом является реакция в растворе метиленхлорида в присутствии катализатора DMAP. Дальнейшая очистка продукта реакции от несвязанного модифицирующего агента и катализатора происходила путем высаживания полимера в систему гексан/изопропиловый спирт. Схема реакции карбоксилирования на примере модификации 3-х лучевого PDLLA<sub>n</sub> представлена на Рисунке 3.23.

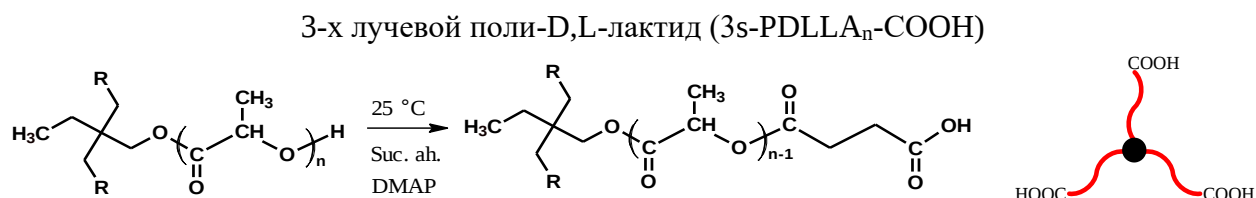


Рисунок 3.23 – Схема синтеза 3-х лучевого поли-D,L-лактида с концевыми карбоксильными группами

В результате серия 3-х и 6-ти лучевых звездообразных поли-D,L-лактидов с концевыми гидроксильными группами и средней степенью полимеризации лучей 25 и 100 была модифицирована янтарным ангидридом в оптимальных условиях. Молекулярно-массовые характеристики карбоксилированных образцов были определены с помощью ГПХ и приведены в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Молекулярно-массовые характеристики синтезированных звездообразных поли-D,L-лактидов с концевыми карбоксильными группами

| Образец                       | ГПХ               |      | ЯМР            |                                                       |
|-------------------------------|-------------------|------|----------------|-------------------------------------------------------|
|                               | $M_w$ ,<br>г/моль | PDI  | $M_n$ , г/моль | Средняя степень модификации<br>янтарным ангидридом, % |
| 3s-PDLLA <sub>25</sub> -COOH  | 6 400             | 1.44 | 5 900          | 99                                                    |
| 3s-PDLLA <sub>100</sub> -COOH | 32 000            | 1.18 | 22 100         | 85                                                    |
| 6s-PDLLA <sub>25</sub> -COOH  | 9 200             | 1.52 | 12 000         | 99                                                    |
| 6s-PDLLA <sub>100</sub> -COOH | 51 500            | 1.26 | 44 100         | 85                                                    |

Все полимеры обладают мономодальным ММР, при этом более высокие значения индекса PDI у полимеров с карбоксильными группами по сравнению с аналогами до перефункционализации связаны с описанным в литературе специфическим взаимодействием COOH-групп с материалом неподвижной фазы хроматографической колонки, а не с деструкцией макромолекул [186]. С помощью <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии (Рисунок 3.24) была подтверждена структура синтезированных соединений, а также успешное протекание реакции посредством возникновения нового сигнала от метиленовых протонов раскрывшегося янтарного ангидрида в области 2.65 ppm. Уменьшение интегральной интенсивности сигнала от концевых метиновых протонов полилактида, связанных с OH-группами (4.35 ppm), также указывает на успешное протекание перефункционализации, причем интегральная интенсивность этого сигнала пропорциональна средней степени карбоксилирования OH-групп. Качественно протекание реакции карбоксилирования было подтверждено методом <sup>13</sup>C-ЯМР спектроскопии. На это указывает отсутствие сигналов от атомов углерода связанных с концевыми OH-группами на спектрах модифицированных полимеров (Рисунок 3.25).

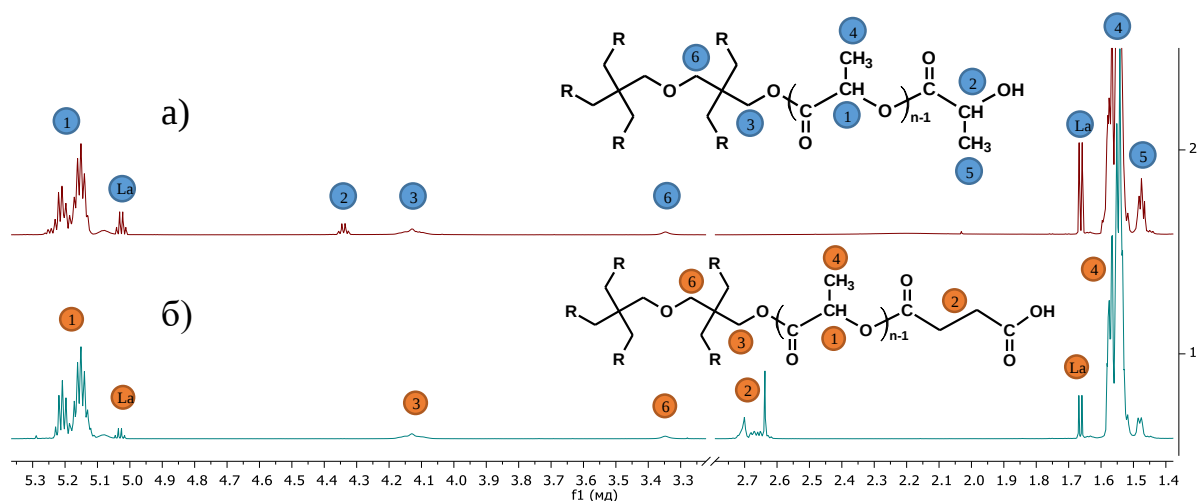


Рисунок 3.24 –  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры 6s-PDLLA<sub>25</sub> с концевыми гидроксильными (а) и карбоксильными (б) группами

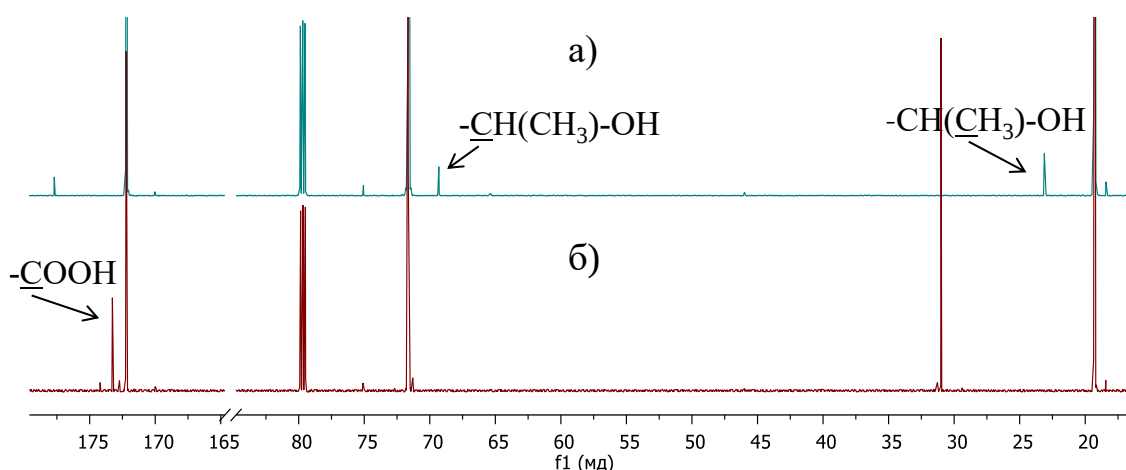


Рисунок 3.25 –  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектры 6s-PDLLA<sub>25</sub> с концевыми гидроксильными (а) и карбоксильными (б) группами

Дополнительно после модификации янтарным ангидридом образцы были исследованы с помощью инфракрасной спектроскопии. На ИК-спектрах карбоксилированных поли-D,L-лактидов отсутствует полоса поглощения в области  $3500\text{ см}^{-1}$ , соответствующая исходным концевым гидроксильным группам, и появляется новая полоса поглощения в области  $1710\text{ см}^{-1}$ , которая относится к колебаниям  $\text{C}=\text{O}$  связи в карбоксильной группе (Рисунок 3.26). Таким образом успешное протекание реакции карбоксилирования было подтверждено совокупностью методов, а звездообразные поли-D,L-лактиды после перефункционализации характеризуются молекулярной массой от 6 до 44 кДа и средней степенью модификации янтарным ангидридом не менее 85%.

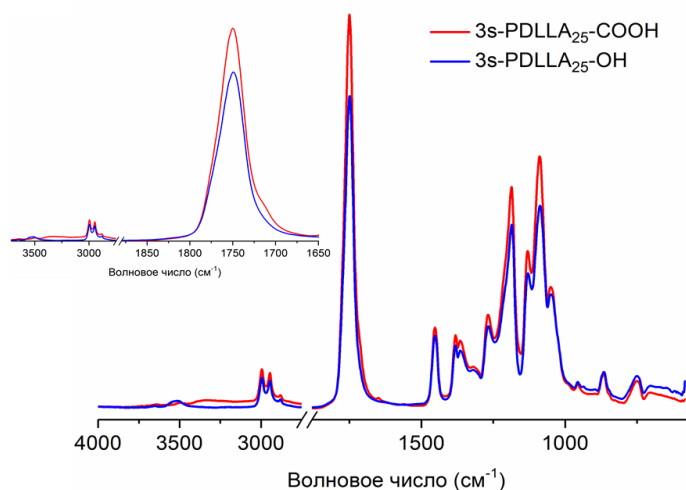


Рисунок 3.26 – ИК спектры 3-х лучевого PDLLA<sub>25</sub> до и после реакции карбоксилирования

### 3.1.5 Гидролитическая деградация звездообразных полилактидов

Исследование влияния строения, молекулярной массы, степени кристалличности и типа концевой группы на кинетику деградации в водной среде проводили на 3-х и 6-ти лучевых звездообразных PLLA<sub>n</sub>/PDLLA<sub>n</sub> со средней степенью полимеризации лучей 25 и 100. На скорость деградации может оказывать влияние морфология и форма исследуемых образцов, поэтому в данном случае на основе выбранных полимеров были получены цилиндры в виде «дисков» массой около 100 мг, диаметром и толщиной 9 и 2 мм, соответственно. Формование происходило из расплава в специально изготовленном из политетрафторэтилена планшете. Дополнительно для обеспечения однородной структуры дисков процесс нагревания сопровождался снижением давления до глубокого вакуума с целью дегазации расплавов полимеров. После этого в случае поли-L-лактидов одна часть образцов аморфизовалась посредством резкого охлаждения с целью минимизации доли кристаллической фазы, а вторая часть остывала с медленной скоростью до комнатной температуры. В результате на основе 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>-OH с концевыми гидроксильными группами были получены полностью аморфные и частично-кристаллические образцы, что позволит оценить вклад кристаллизации в процесс деградации макромолекул (Рисунок 3.27).

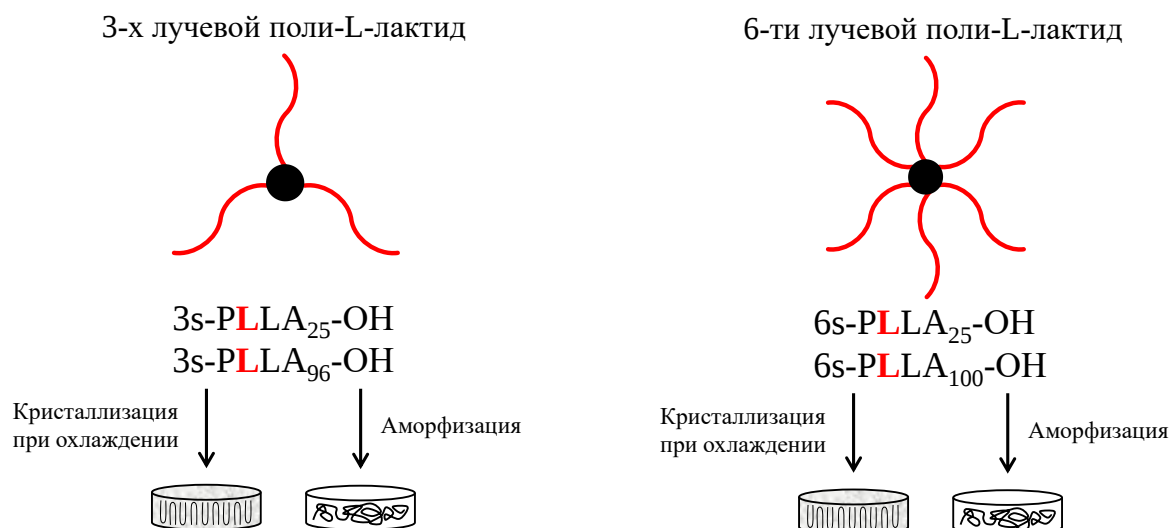


Рисунок 3.27 – Схема получения образцов для исследования гидролитической деградации 3-х и 6-ти лучевых поли-L-лактидов

По аналогии дискообразные образцы были получены и на основе ранее синтезированных аморфных 3-х и 6-ти лучевых поли-D,L-лактидов с концевыми гидроксильными и карбоксильными группами (Рисунок 3.28).

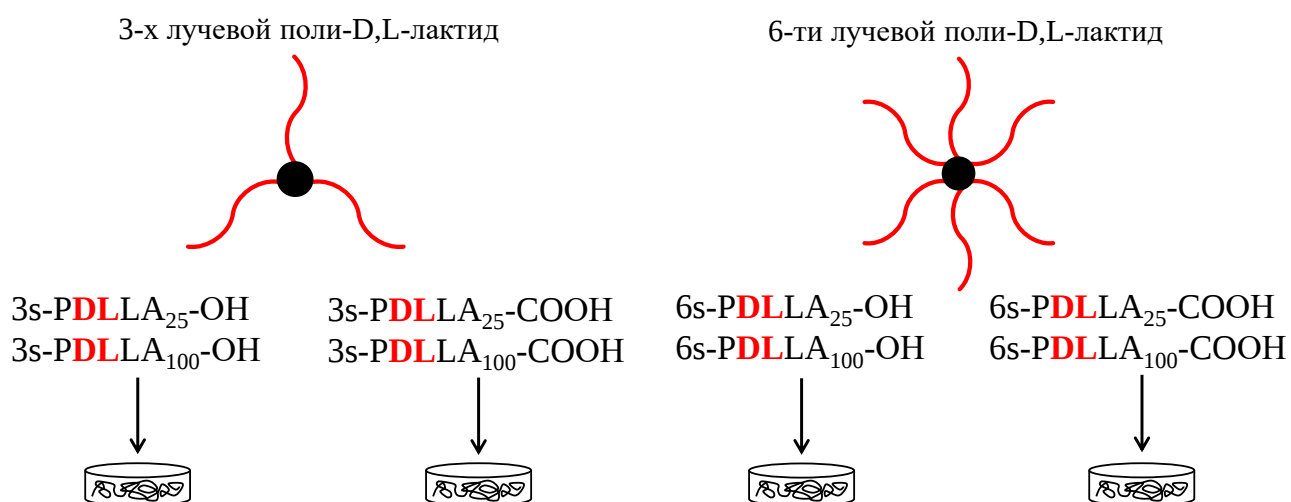


Рисунок 3.28 – Схема получения образцов для исследования гидролитической деградации 3-х и 6-ти лучевых поли-D,L-лактидов с различными концевыми группами

Важно отметить, что молекулярно-массовые характеристики полимеров в процессе формования дисков не изменялись. Эксперимент по изучению гидролитической деградации проводили в среде фосфатного буфера с pH 7.4 при 37 °C. В первую очередь по истечении определенного времени пребывания

образцов буферной среде фиксировали изменение их массы. Первое измерение проводили после сушки в течение 30 минут в комнатных условиях, избавляясь при этом от влаги на поверхности образцов. После чего их помещали в вакуумный шкаф и сушили до постоянного веса при комнатной температуре для оценки массы сухих образцов. Для оценки изменения молекулярной массы полимеров в процессе деградации использовали ГПХ.

### *Гидролитическая деградация аморфных звездообразных поли-L-лактидов*

Графики зависимости массы от времени деградации для аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>-ОН приведены на Рисунке 3.29.

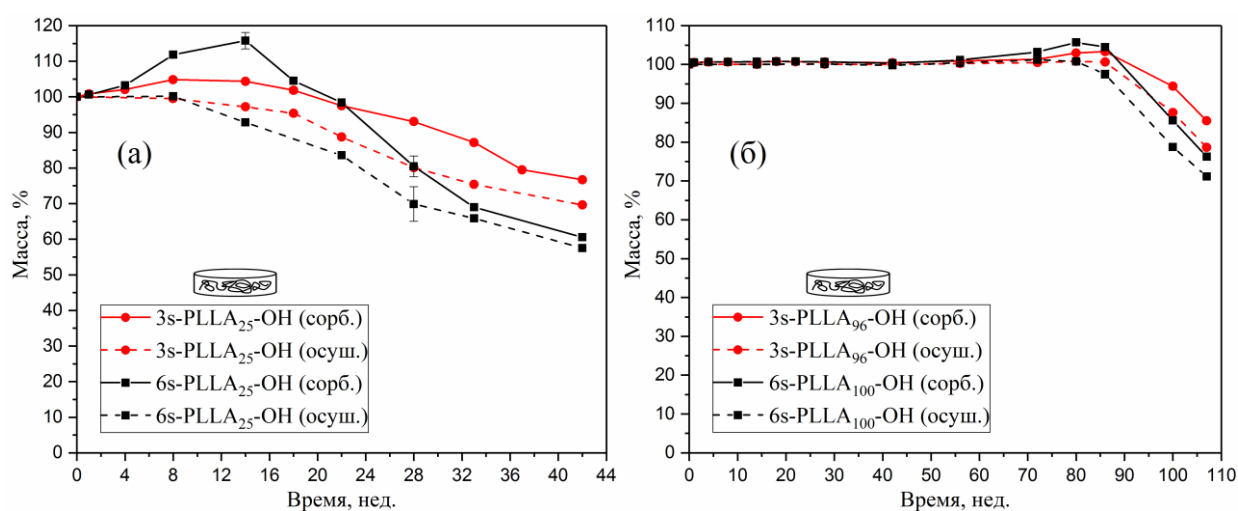


Рисунок 3.29 – Графики зависимости массы от времени гидролиза для аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>25</sub>-ОН (а) и PLLA<sub>100</sub>-ОН (б) до и после сушки (условия деградации – pH 7.4, 37 °C)

В случае более низкомолекулярных образцов (Рисунок 3.29 (а)) максимальное количество сорбированной воды к 14-й неделе достигает порядка 15 масс.% для 6-ти лучевого PLLA<sub>25</sub>-ОН по сравнению с 5 масс.% у 3-х лучевого аналога. Примерно в это же время отмечается начало снижения массы образцов, которое протекает более интенсивно у 6s-PLLA<sub>25</sub>-ОН вплоть до 57 масс.% к 42-й неделе эксперимента по сравнению с 69 масс.% у 3-х лучевого образца. После этого времени изготовленные из низкомолекулярных полимеров образцы разрушаются без возможности дальнейшего определения их массы. Более активное поглощение

воды у 6-ти лучевого PLLA<sub>25</sub> может быть связано с наличием большего числа концевых гидроксильных групп, которые в силу относительно невысокой молекулярной массы полимера могут вносить значительный вклад в гидрофильно-гидрофобный баланс материала.

При увеличении средней степени полимеризации лучей в 4 раза ожидаемо возросла стабильность полимеров по отношению к гидролитической деградации и уменьшилась степень их водопоглощения (Рисунок 3.29(б)). В начале эксперимента высокомолекулярные 3-х и 6-ти лучевые PLLA сорбируют порядка 0.5 масс.% воды и сохраняют это состояние длительное время вплоть до 80-й недели. Максимальное водопоглощение не превышающее 5 масс.% можно отметить в период с 80-й до 86-й недели, после чего происходит уменьшение массы образцов до 78 и 71 масс.% в случае 3-х и 6-ти лучевых полимеров, соответственно. По достижении 107-й недели образцы начинают фрагментироваться и разрушаться от минимальной механической нагрузки, что делает дальнейшее измерение массы невозможной. Для образцов из высокомолекулярных полимеров также прослеживается тенденция увеличения скорости потери массы и сорбции воды по мере возрастания числа лучей, однако данный эффект проявляется в меньшей степени по сравнению с образцами со степенью полимеризации лучей 25.

На Рисунке 3.30 представлены графики ММР аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>-ОН в различные временные интервалы деградации. Независимо от количества лучей и их длины в определенный момент времени кривые начинают характеризоваться бимодальным распределением. Для корректной интерпретации данных, в связи с появлением второй (более низкомолекулярной) фракции, на оси ординат графиков откладывали изменение молекулярной массы основной фракции полимера в точке экстремума ( $M_{p1}$ ) пика (с большей ММ) в процентах относительно исходного значения. Дополнительно на графиках зависимости ММ от времени представлено изменение массовой доли низкомолекулярной фракции ( $\omega_2$ ) (Рисунок 3.31).

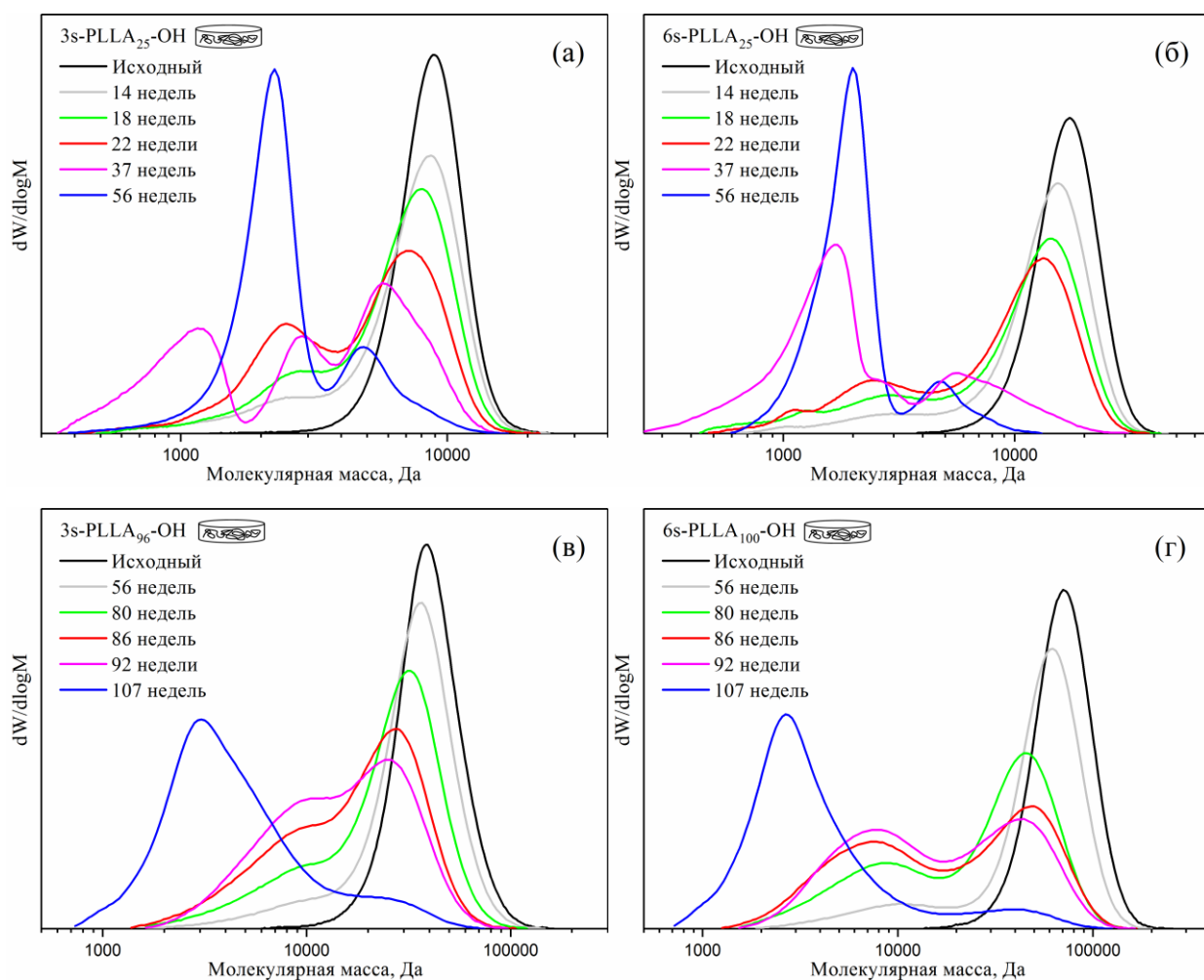


Рисунок 3.30 – Молекулярно-массовое распределение аморфных образцов 3s-PLLA<sub>25</sub>-OH (а), 6s-PLLA<sub>25</sub>-OH (б), 3s-PLLA<sub>96</sub>-OH (в) и 6s-PLLA<sub>100</sub>-OH (г) в различные временные интервалы гидролитической деградации (pH 7.4, 37 °C)

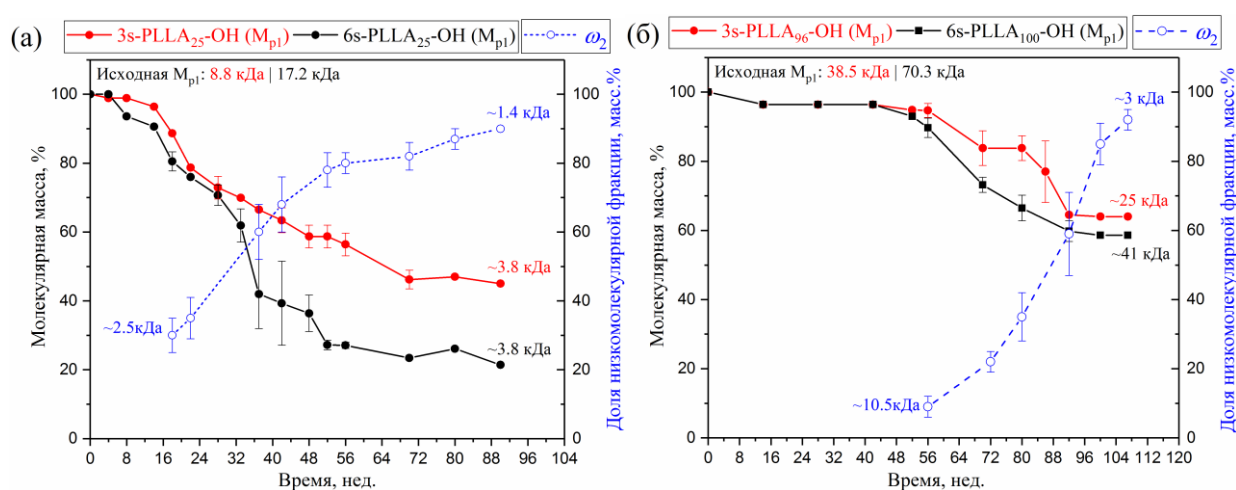


Рисунок 3.31 – Графики зависимости нормированной молекулярной массы и доли низкомолекулярной фракции от времени гидролиза для аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>25</sub>-OH (а) и PLLA<sub>100</sub>-OH (б) (pH 7.4, 37 °C)

Со временем на графиках ММР аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>25</sub>-ОН происходит смещение основного пика в сторону меньших молекулярных масс и образование низкомолекулярного «хвоста», который в период с 14-й по 18-ю неделю уже отчетливо формирует новую фракцию с молекулярной массой пика порядка 2.5 кДа (Рисунок 3.30 (а,б)). Аналогичное поведение проявляется и у образцов из высокомолекулярных полимеров, начиная с 56-й недели, при этом для них ММ второй фракции составляет порядка 10.5 кДа (Рисунок 3.30 (в,г)). Поскольку значения 2.5 и 10.5 кДа, с учетом поправочных коэффициентов для пересчета молекулярной массы, определенной относительно полистирольных стандартов (Таблица 3.2), сопоставимы с ММ одного луча со степенью полимеризации 25 и 100, то можно предположить, что формирование новой фракции связано именно с отрывом лучей от молекулы «ядра». Стоит отметить, что формирование на начальных этапах бимодального ММР и сохранение его до финальных стадий деградации является нетипичным для гидролитической деструкции линейных полилактидов, характеризующейся равномерным уменьшением ММ с сохранением мономодального распределения. Скорость гидролитической деградации у высокомолекулярных аморфных полимеров оказалась существенно ниже по сравнению с их аналогами PLLA<sub>25</sub>. Так доля  $\omega_2$  для PLLA<sub>100</sub> достигает порядка 60 масс.% только лишь к 92-й неделе по сравнению с 37-й неделей для PLLA<sub>25</sub>. Независимо от степени полимеризации начальные участки кривых зависимостей молекулярной массы от времени для 3-х и 6-ти лучевых полимеров практически накладываются друг на друга. Однако с определенного временного этапа 6-ти лучевые полимеры в обоих случаях демонстрируют более резкое уменьшение ММ основного пика в процентном соотношении по сравнению с 3-х лучевыми аналогами и в большей степени это проявляется у низкомолекулярных поли-L-лактидов, что указывает на возможное влияние степени ветвления на кинетику деградации звездообразных аморфных PLLA. Для примера к 42-й неделе разница между  $M_{p1}$  у 3s-PLLA<sub>25</sub>-ОН и 6s-PLLA<sub>25</sub>-ОН достигает 25% (Рисунок 3.31 (а)).

Визуально образцы на основе PLLA<sub>25</sub> в течение первых восьми недель из полностью прозрачных превращались в мутно-белые, причем более активная сорбция воды у 6s-PLLA<sub>25</sub>-ОН в дальнейшем привела к существенной деформации дисков, в то время как у 3-х лучевых наблюдалась сохранение формы с образованием развитой поверхности. Было также отмечено, что высокомолекулярные аморфные образцы демонстрировали плавный переход от момента начала появления мутных участков до стадии молочно-белого цвета период с 56-й по 92-ю неделю. Анализ образцов методом ДСК на разных этапах деградации показал, что наблюдаемые визуальные явления, происходящие с исследуемыми объектами, а также обнаруженные ранее закономерности могут быть объяснены изменением степени кристалличности образцов. Из представленных на Рисунке 3.32 данных видно (пунктирные линии), что к 14-й неделе доля кристаллической фазы у 3s-PLLA<sub>25</sub>-ОН увеличивается с исходных 5 до 36%, в то время как степень кристалличности 6-ти лучевого аналога к этому времени остается практически неизменной. Данный факт подтверждает ранее высказанные наблюдения, что повышение степени ветвления может затруднять кристаллизацию звездообразных поли-L-лактидов. В итоге это приводит к существенной разнице в степени водопоглощения образцов и сохранении формы диска в одном случае и деформации в другом. К 28-й неделе у 6s-PLLA<sub>25</sub>-ОН степень кристалличности достигает примерно 20%, однако разница с 3-х лучевым полимером все равно составляет порядка 25%, что, вероятно, сказалось на разнице в кинетике деградации данных полимеров. Что касается высокомолекулярных аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA, то существенной разницы в изменении их степени кристалличности во времени не отмечается (Рисунок 3.32, сплошные линии). Оба полимера характеризуются повышением  $X_c$  на 10% за первые 50 недель, т.е. до начала активной фазы гидролитической деструкции цепей, после чего к 72-й неделе это значение выходит на плато в пределах 35-40%. Поскольку у серии PLLA<sub>25</sub> с 14-й недели фиксируется потеря массы, то увеличение  $X_c$  может быть вызвано двумя параллельными процессами, как деградацией и вымыванием аморфной фазы, так и процессом кристаллизации. У высокомолекулярных же

образцов потеря массы происходит лишь начиная с 86-й недели, поэтому повышение степени кристалличности до этого момента в основном можно связать только с процессом кристаллизации.

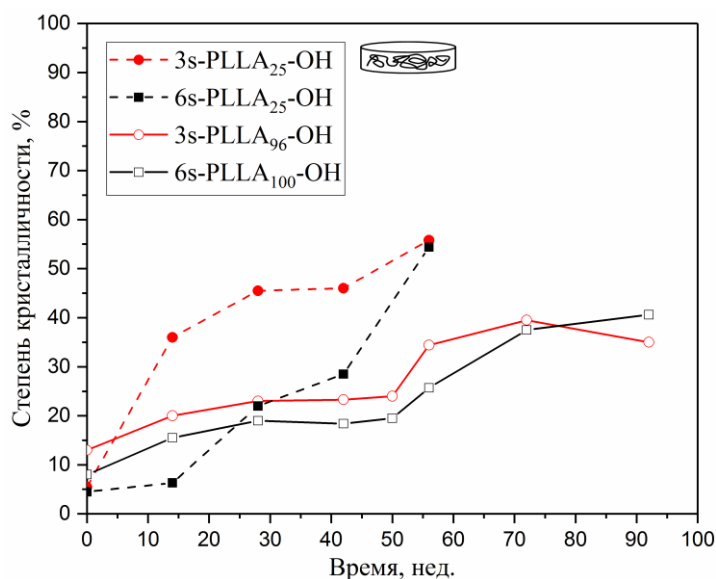


Рисунок 3.32 – Зависимость степени кристалличности аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>-OH от времени гидролитической деградации (pH 7.4, 37 °C)

#### *Гидролитическая деградация частично-кристаллических звездообразных поли-L-лактидов*

По аналогии с аморфными образцами была исследована гидролитическая деградация их частично-кристаллических аналогов, полученных посредством кристаллизации в процессе медленного охлаждения из расплава (Рисунок 3.27). На Рисунке 3.33 представлены графики зависимости массы от времени деградации частично-кристаллических 3-х и 6-ти лучевых поли-L-лактидов до и после сушки в вакууме. Масса сорбированной воды у частично-кристаллических 3s- и 6s-PLLA<sub>25</sub>-OH в максимальной точке составила 1.5 и 3.7 масс.% (Рисунок 3.33 (а)), что в несколько раз меньше по сравнению с их аморфными аналогами. Более высокие значения у 6-ти лучевого PLLA могут являться следствием разницы изначальной степени кристалличности полученных образцов (Рисунок 3.34). Несмотря на это, как для низко-, так и для высокомолекулярной серии частично-кристаллических поли-L-лактидов выраженного влияния числа лучей при их аналогичной степени полимеризации на скорость потери массы не прослеживается. Аналогичный вывод

можно сделать и об изменении молекулярной массы данных образцов от времени деградации (Рисунок 3.35). Данный факт указывает в пользу предположения о преимущественном влиянии на кинетику деградации различной способности к кристаллизации у 3-х и 6-ти лучевых аморфных PLLA<sub>25</sub>, речь о которых шла в предыдущем разделе.

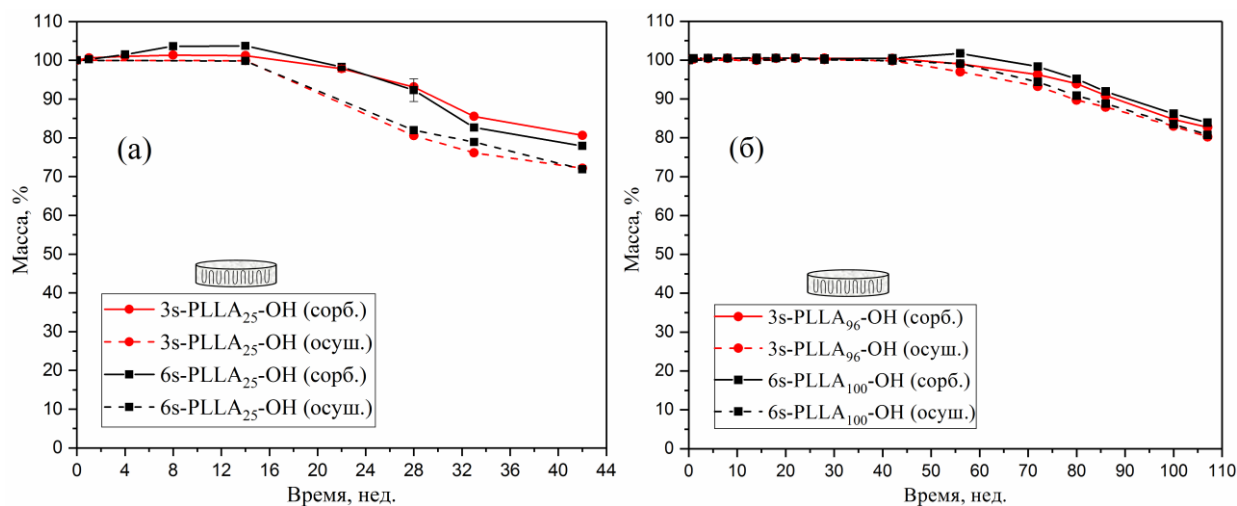


Рисунок 3.33 – Графики зависимости массы от времени гидролиза для частично-кристаллических 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>25</sub>-OH (а) и PLLA<sub>100</sub>-OH (б) до и после сушки в вакууме (рН 7.4, 37 °С)

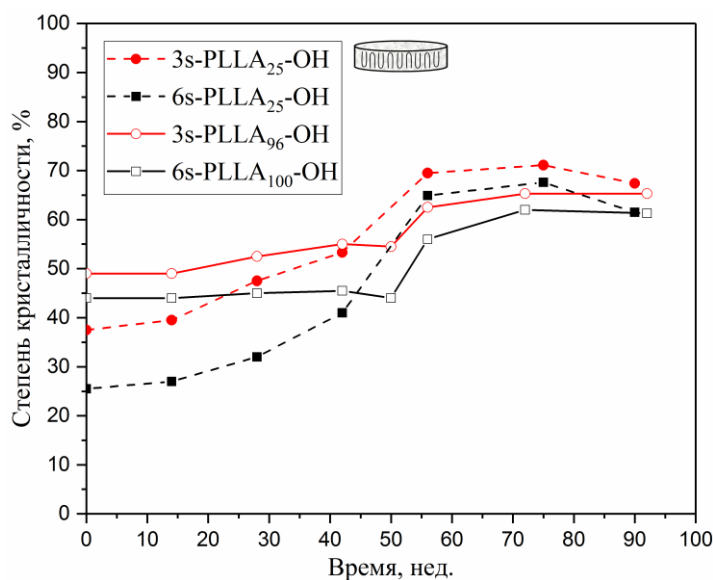


Рисунок 3.34 – Зависимость степени кристалличности частично-кристаллических 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>-OH от времени гидролитической деградации (рН 7.4, 37 °С)

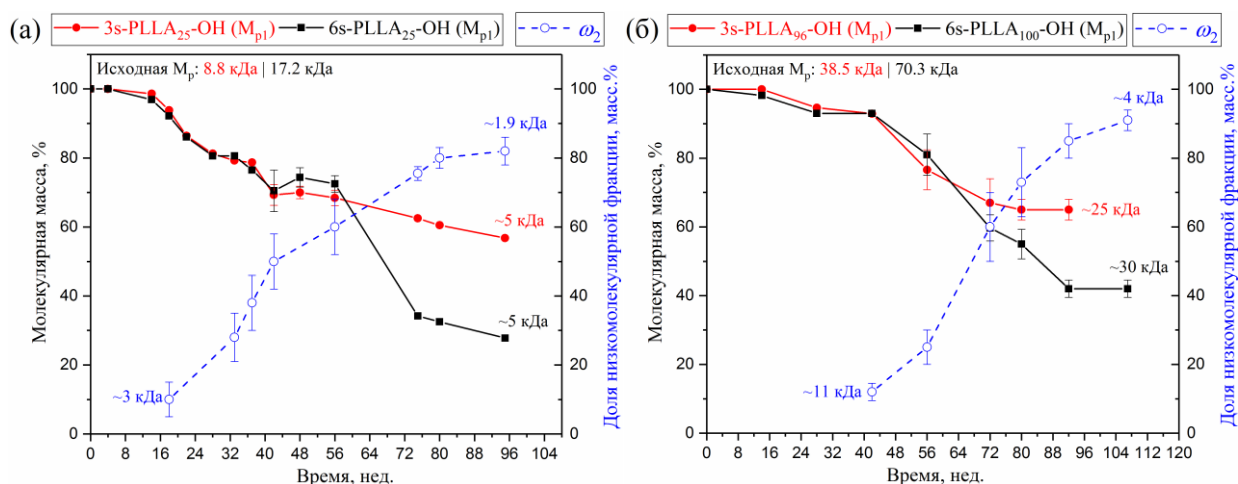


Рисунок 3.35 – Графики зависимости относительной молекулярной массы и доли низкомолекулярной фракции от времени гидролиза для частично-кристаллических 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>25</sub>-ОН (а) и PLLA<sub>100</sub>-ОН (б) (рН 7.4, 37 °С)

Поскольку временной интервал, в котором наблюдается начало роста степени кристалличности изначально кристаллических 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>-ОН (Рисунок 3.34), совпадает с периодом снижения массы образцов (Рисунок 3.33), то рост  $X_c$  можно связать с деградацией аморфной фазы и вымыванием водорастворимой низкомолекулярной фракции. Эти результаты также подкрепляются и графиками зависимости ММ от времени деградации.

Если сравнить между собой графики, представленные на Рисунках 3.31 (а) и 3.35 (а), то можно сделать вывод, что интенсивность образования низкомолекулярной фракции, наряду со скоростью уменьшения ММ ниже у частично-кристаллических 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>25</sub>-ОН по сравнению с их аморфными вариантами. Наибольшая разница между значениями ММ наблюдается у 6-ти лучевых PLLA<sub>25</sub>-ОН, которая в зависимости от этапа деградации варьируется в пределах от 5 до 45%. Такое поведение материалов связано с тем, что присутствие кристаллической фазы уменьшает молекулярную подвижность и долю свободного объема, повышает плотность упаковки макромолекул, что затрудняет доступ воды к участкам поли-L-лактидных цепей, и в конечном счете, приводит к низкой сорбции воды и меньшей скорости гидролитической деградации. Стоит отметить, что несмотря на отличия в скорости деструкции вид кривых

молекулярно-массового распределения в процессе эксперимента у 3-х и 6-ти лучевых частично-кристаллических PLLA<sub>25</sub>-ОН являлся аналогичным аморфным.

Изучение зависимости массы от времени для частично-кристаллических высокомолекулярных поли-L-лактидов показало, что снижение массы образцов наряду с максимальной сорбцией воды наблюдается на 56-й неделе независимо от числа лучей (Рисунок 3.33 (б)), что на 24 недели раньше, чем у их аморфных аналогов. Кроме того, начиная с 28-й недели и до окончания эксперимента, значения молекулярной массы основного пика у частично-кристаллических высокомолекулярных образцов оказались ниже до 25% по сравнению с аморфными (Рисунок 3.35 (б)). Вид кривых молекулярно-массового распределения полимеров по мере протекания деградации также имел существенные отличия. Параллельно с характерным для высокомолекулярных полимеров появлением фракции макромолекул с ММ порядка 10.5 кДа на графиках ММР в явном виде начиная с 42-й недели начинает формироваться дополнительная фракция с ММ 6 кДа (Рисунок 3.36). У аморфных же образцов данная фракция присутствовала в виде низкомолекулярного «плеча» вплоть до финальных этапов деградации, что указывает на невысокую массовую долю молекул с ММ меньше 6 кДа (Рисунок 3.30 (в,г)) .

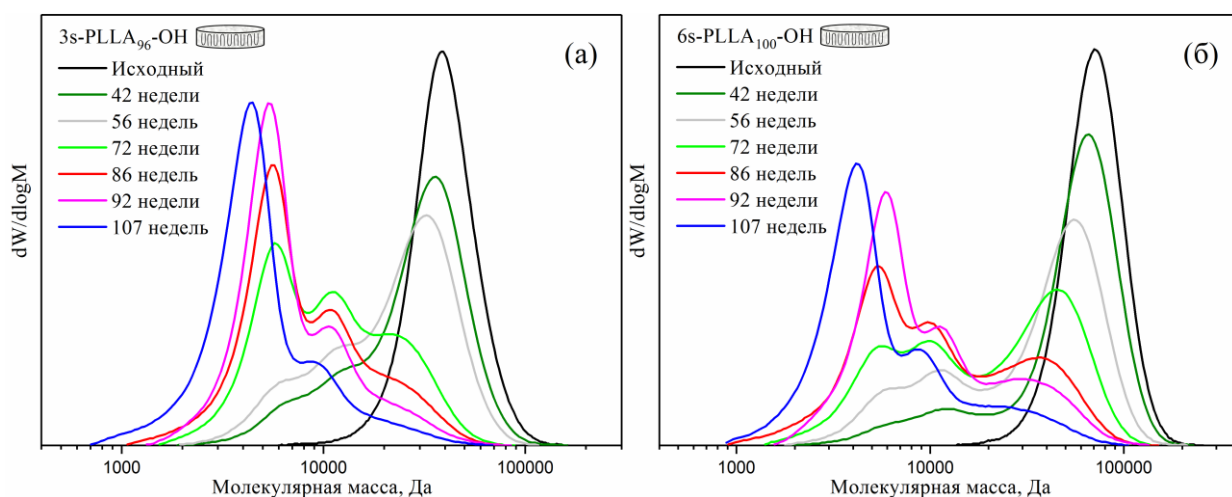


Рисунок 3.36 – Молекулярно-массовое распределение частично-кристаллических полимеров 3s-PLLA<sub>96</sub>-ОН (а) и 6s-PLLA<sub>100</sub>-ОН (б) в различные временные интервалы гидролитической деградации

Дополнительно с целью установить причину более высокой скорости деградации у частично-кристаллических высокомолекулярных PLLA по сравнению с их аморфными аналогами были получены изображения поверхности сколов исходных дисков с помощью сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 3.37).

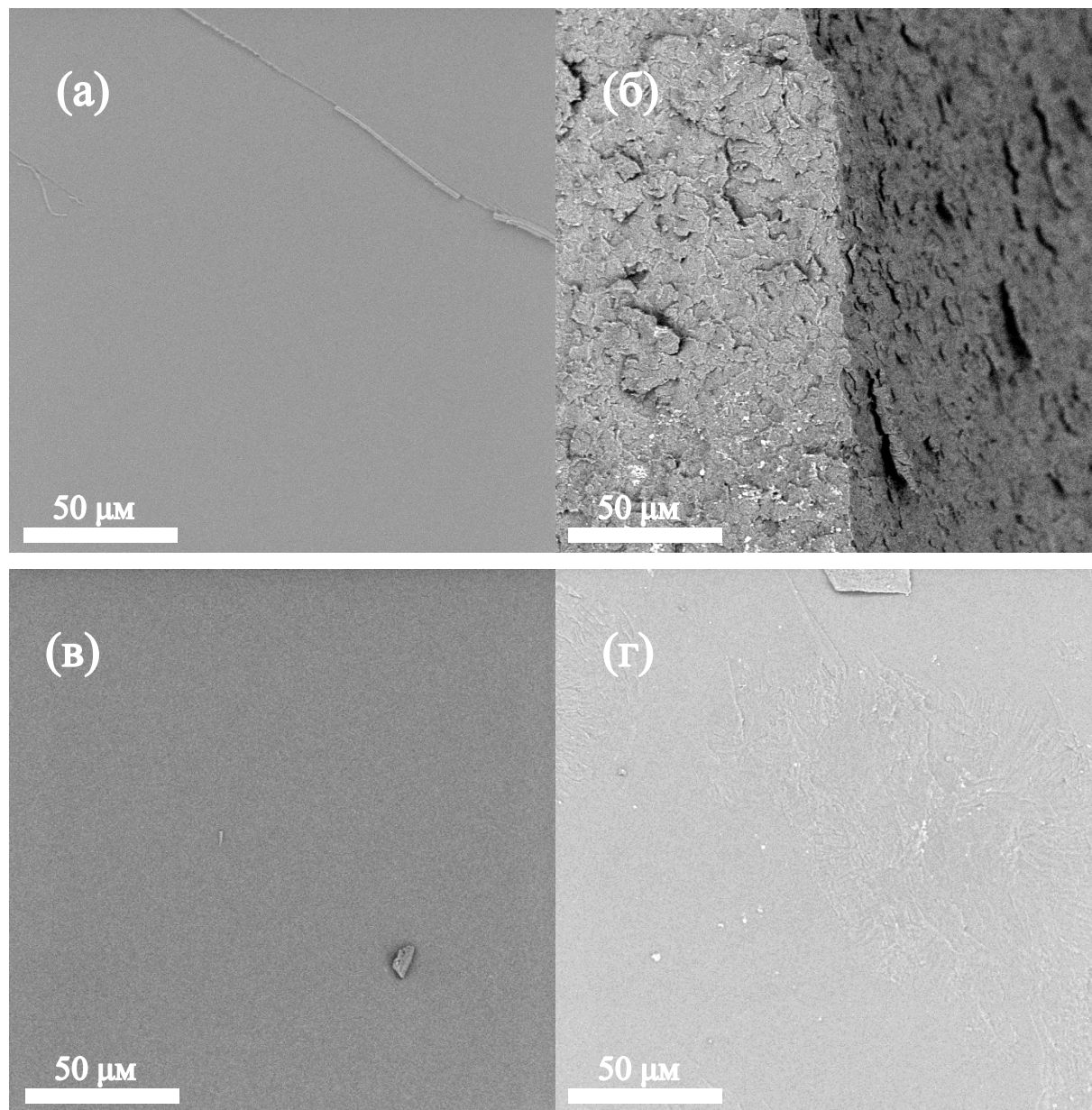


Рисунок 3.37 – СЭМ-изображения сечения исходных образцов на основе аморфных 3s-PLLA<sub>96</sub>-OH (а) и 6s-PLLA<sub>25</sub>-OH (в), и частично-кристаллических 3s-PLLA<sub>96</sub>-OH (б) и 3s-PLLA<sub>25</sub>-OH (г)

Как видно из представленных данных, как низко-, так и высокомолекулярные аморфные образцы на основе 3s-PLLA<sub>96</sub>-OH и 6s-PLLA<sub>25</sub>-OH (Рисунок 3.37 (а) и

(в)) обладают в разрезе гладкой морфологией поверхности без каких-либо выраженных неоднородностей. В тоже время морфологию частично-кристаллического диска на основе 3s-PLLA<sub>96</sub>-ОН можно охарактеризовать как высокоразвитую рельефную поверхность (Рисунок 3.37 (б)). Образующаяся гетерогенность внутренней структуры образцов, по всей видимости, является причиной ускоренной деградации частично-кристаллических высокомолекулярных звездообразных поли-L-лактидов, поскольку ее изначальное присутствие по всему объему дисков облегчает доступ воды в толщу материала. На изображениях СЭМ сколов частично-кристаллических образцов со степенью полимеризации лучей 25 такого рода гетерогенности обнаружено не было (Рисунок 3.37 (г)), их морфология близка к аморфным аналогам за исключением присутствия в некоторых областях микротрещин. Близкая морфология материалов, по-видимому, является причиной того, что увеличение степени кристалличности у низкомолекулярных PLLA привело к закономерному уменьшению скорости гидролитической деградации, в отличие от высокомолекулярных полимеров.

Исходя из сопоставления графиков зависимостей массы образцов и ММ от времени деградации, можно сделать вывод, что для звездообразных поли-L-лактидов более характерен объемный механизм деградации, нежели чем поверхностный, поскольку периода уменьшения массы без изменения ММ основной фракции не наблюдается во всех случаях. В результате изучения гидролитической деградации 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub> с концевыми гидроксильными группами установлено, что в большей степени на кинетику процесса оказывает влияние молекулярная масса лучей, а также исходная степень кристалличности. В целом, в зависимости от сочетания этих параметров, время гидролитической деградации звездообразных PLLA при 37 °С в среде фосфатного буфера варьировалось от 56 до 100 недель. Показано, что количество лучей при их средней степени полимеризации 25 может оказывать влияние на скорость деградации за счет различной способности к кристаллизации у 3-х и 6-ти лучевых макромолекул.

*Гидролитическая деградация звездообразных поли-D,L-лактидов с концевыми гидроксильными и карбоксильными группами*

Как было сказано ранее для исследования влияния типа концевой группы на процесс гидролитической деградации в отсутствие вклада от кристаллизации были выбраны ранее синтезированные аморфные 3-х и 6-ти лучевые поли-D,L-лактиды с концевыми гидроксильными и карбоксильными группами. Деградация аморфных звездообразных 3s- и 6s-PDLLA<sub>25</sub>/PDLLA<sub>100</sub>-ОН протекала быстрее по сравнению с PLLA<sub>n</sub>. В первую очередь это может быть связано с более низкими значениями температуры стеклования у соответствующих полимеров и отсутствием кристаллических областей (Таблица 3.4). После первых нескольких недель эксперимента образцы на основе звездообразных PDLLA со степенью полимеризации 25 деформировались и становились хрупкими после сушки, поэтому оценка изменения их массы от времени не представлялась возможной. В связи с этим на Рисунке 3.38 представлены только графики, изменения массы высокомолекулярных 3-х и 6-ти лучевым PDLLA<sub>100</sub> с различными концевыми группами.

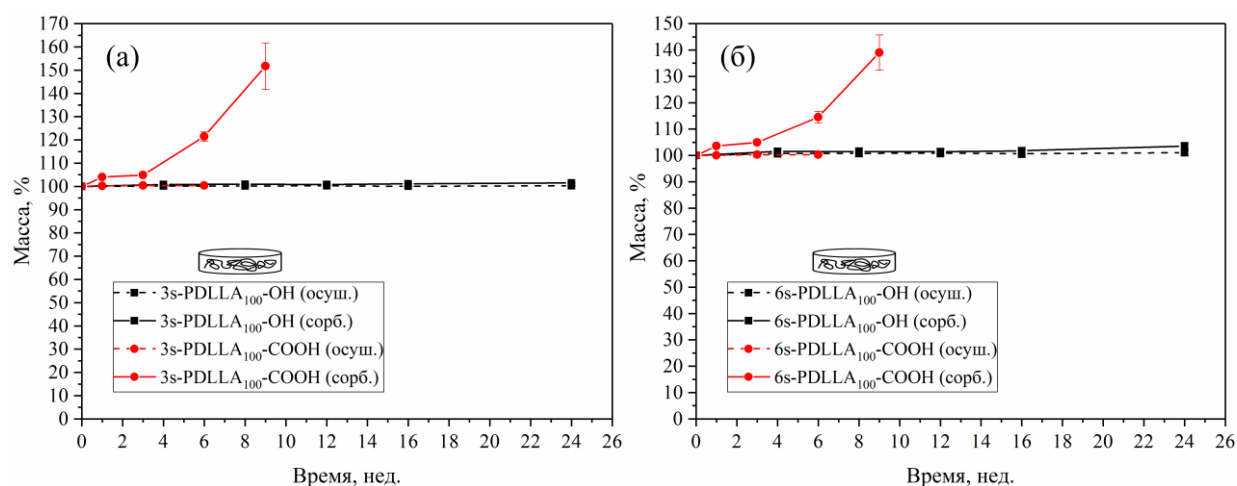


Рисунок 3.38 – Графики зависимости массы от времени гидролиза для аморфных 3-х (а) и 6-ти лучевых (б) PLLA<sub>25</sub>/PLLA<sub>100</sub> с концевыми гидроксильными и карбоксильными группами до и после сушки в вакууме (рН 7.4, 37 °С)

Установлено, что введение концевых карбоксильных групп приводит к существенному увеличению сорбции воды вплоть до 50 масс.% за 9 недель, при

этом в аналогичный период это значение для полимеров с ОН-группами не превышает нескольких процентов, подобно ранее исследованным высокомолекулярным аморфным PLLA.

В процессе деградации кривые молекулярно-массового распределения, также как и в случае PLLA, с определенного момента характеризуются появлением бимодальности, в связи с чем на Рисунке 3.39 отложено изменение молекулярной массы основной фракции ( $M_{p1}$ ).

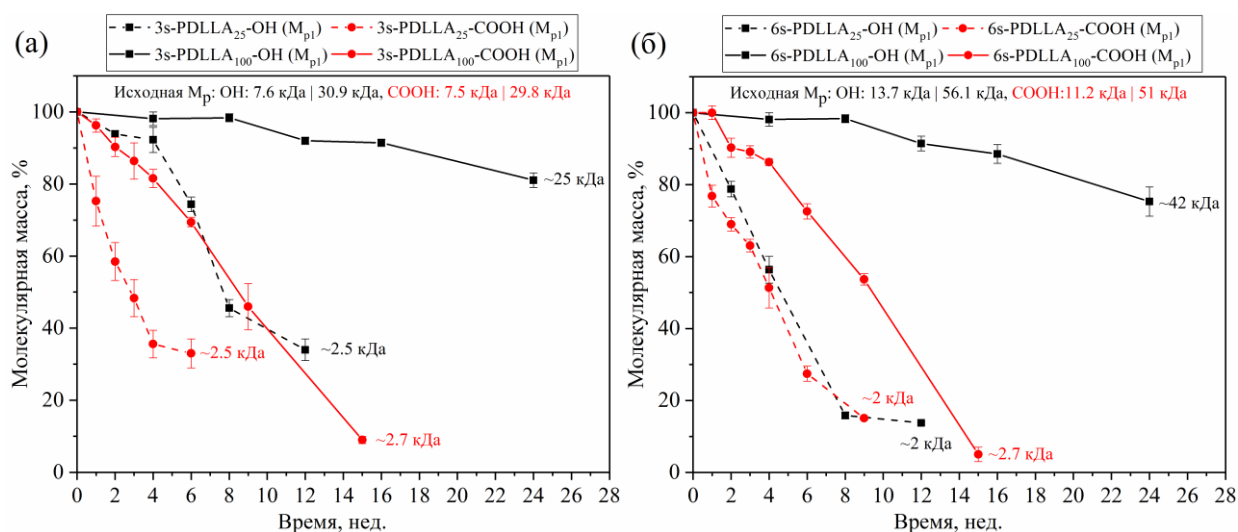


Рисунок 3.39 – Графики зависимости относительной молекулярной массы от времени для аморфных 3-х (а) и 6-ти лучевых (б) PLLA<sub>25</sub>/PLLA<sub>100</sub> с концевыми гидроксильными и карбоксильными группами (pH 7.4, 37 °C)

Одной из причин высокой скорости гидролитической деградации у 3-х и 6-ти лучевых PDLLA<sub>25</sub>-ОН, особенно в сравнении с аморфными PLLA<sub>25</sub>-ОН, является их низкая температура стеклования, сопоставимая по значениям с температурой проведения эксперимента (Таблица 3.4). Это приводит к тому, что к 6-8 неделе в обоих случаях 3-х и 6-ти лучевые PDLLA<sub>25</sub>-ОН полностью деградируют до молекулярной массы порядка 2.5 кДа. С увеличением степени полимеризации до 100 у звездообразных PDLLA с гидроксильными группам увеличивается стабильность по отношению к гидролизу, при этом количество лучей оказывает слабое влияние на этот процесс. Замена концевых ОН-групп на карбоксильные привела к значительному повышению скорости гидролитической деградации, причем в большей степени это можно наблюдать для серии звездообразных

полимеров PDLLA<sub>100</sub> (Рисунок 3.39). Так, к 15-й неделе 3s- и 6s-PDLLA<sub>100</sub>-COOH полностью деградируют с 90-95% потерей ММ от исходной, в то время как их аналоги с ОН-группами к этому времени теряют лишь порядка 10%. В результате можно предположить, что концевые карбоксильные группы могут провоцировать своего рода «автокаталитический» эффект, результатом которого является повышение общей скорости процесса деградации поли-D,L-лактидов.

Таким образом, в ходе детального исследования гидролитической деградации звездообразных поли-L- и поли-D,L-лактидов было установлено влияние не только молекулярной массы и числа лучей, но также степени кристалличности и типа концевых функциональных групп на скорость данного процесса, а условия эксперимента приближенные по pH и температуре к условиям в организме человека, позволят в будущем создавать на основе этих полимеров персонализированные медицинские материалы с регулируемыми сроками биоразложения.

## **3.2 Звездообразные блок-сополимеры лактида для систем доставки лекарственных средств**

### **3.2.1 Синтез и характеристика амфифильных блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль**

Одним из распространенных способов придания амфифильности макромолекулам полилактида с целью получения на их основе наночастиц, является присоединение по концам цепей гидрофильных макромолекул метилового эфира полиэтиленгликоля. В настоящей работе молекулярная масса используемого монофункционального MPEG<sub>45</sub> составляет 2000 Да, который по своей сути является «золотым» стандартом наномедицины. Так, липидные наночастицы, модифицированные PEG<sub>45</sub>, были использованы не только для солубилизации доксорубина в зарегистрированном противораковом препарате Doxil, но и для создания вакцины от COVID-19 в качестве носителей иРНК [188]. Для проведения реакции присоединения в «мягких» условиях, при которых не

происходит деструкции используемых в реакции соединений, необходимо предварительно провести карбоксилирование концевых гидроксильных групп поли-L-лактида или MPEG<sub>45</sub>. Поскольку именно в структуре метилового эфира полиэтиленгликоля содержится наиболее реакционноспособная первичная гидроксильная группа, более эффективным является провести ее карбоксилирование посредством взаимодействия с молекулами янтарного ангидрида. Реакцию проводили в инертной атмосфере при температуре 135 °С без использования токсичных катализаторов. На <sup>1</sup>H-ЯМР спектрах (Рисунок 3.40) MPEG<sub>45</sub> после модификации возникает триплет от стыковых метиленовых групп метилового эфира полиэтиленгликоля (2'), наряду с мультиплетом от двух метиленовых групп раскрывшегося янтарного ангидрида (3), что подтверждает образование концевой карбоксильной группы.

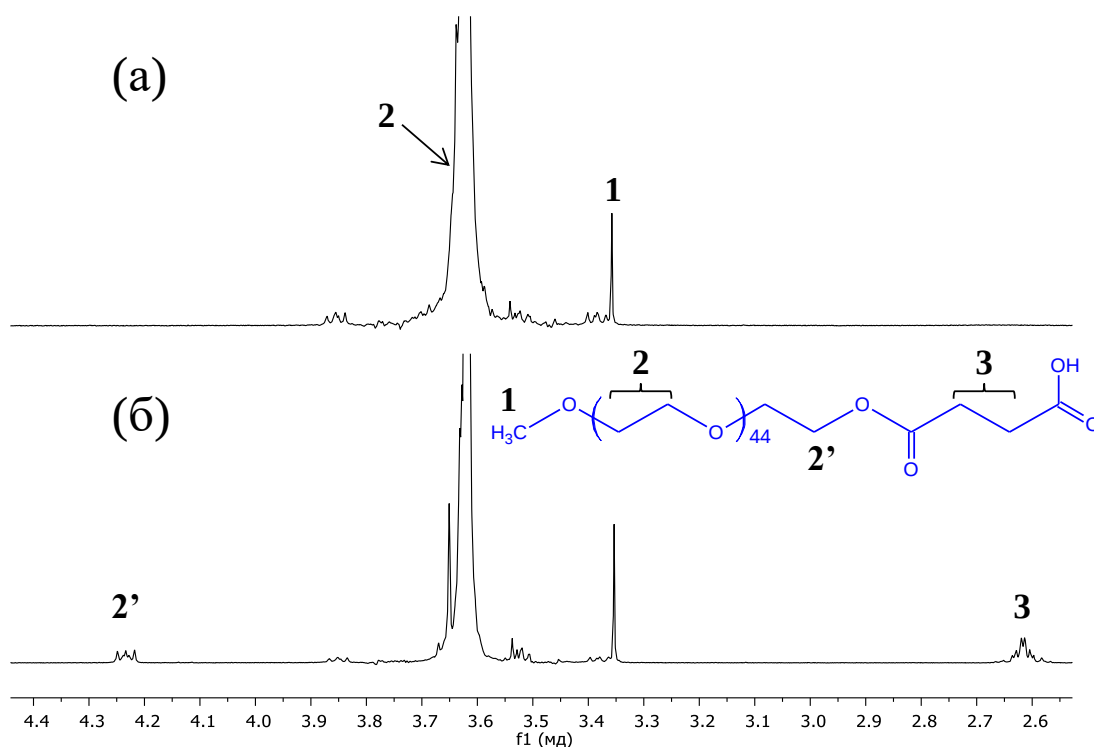


Рисунок 3.40 – <sup>1</sup>H-ЯМР спектры исходного (а) и карбоксилированного (б) MPEG<sub>45</sub>

Одним из наиболее распространенных способов проведения реакции этерификации между концевыми гидроксильными группами звездообразных полилактидов и карбоксильной группой MPEG<sub>45</sub> с целью получения блок-сополимеров является карбодиимидный метод. Он основан на использовании в качестве активатора карбоксильной группы DCC и катализатора реакции DMAP,

предотвращающего протекание побочной реакции. Признаком активации карбоксильной группы является выделение нерастворимого в хлорорганических растворителях побочного продукта – дициклогексилмочевины, поэтому для его эффективного удаления реакцию проводили в среде метиленхлорида при 25 °С в течение 24 часов. Схема синтеза амфифильных блок-сополимеров на примере 3-х лучевого PLLA<sub>10</sub> представлена на Рисунке 3.41.

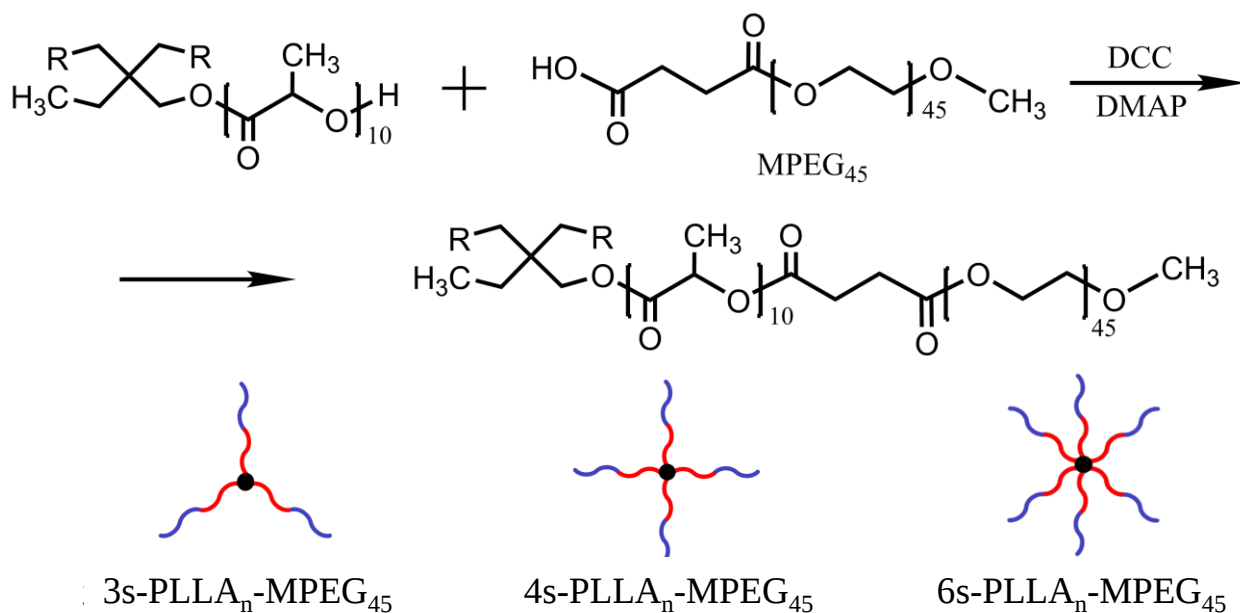


Рисунок 3.41 – Схема синтеза звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль

Кратко формулы образующихся в ходе реакции 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров можно представить следующим образом: **3s-PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>**, **4s-PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>** и **6s-PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>**, где  $n$  – это средняя степень полимеризации поли-L-лактидных блоков. С помощью <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии было подтверждено строение, определена степень модификации и среднечисловая молекулярная масса синтезированных амфифильных звездообразных блок-сополимеров. На Рисунке 3.42 представлены <sup>1</sup>H-ЯМР спектры звездообразного поли-L-лактида 3s-PLLA<sub>10</sub> и его блок-сополимера с MPEG<sub>45</sub>. Уменьшение интенсивности сигнала от концевых метиновых протонов CH-OH (4.35 ppm), связанных с гидроксильной группой полилактидных лучей, на спектре блок-сополимера подтверждает успешное протекание реакции этерификации и образование блочной структуры с метиловым

эфиром полиэтиленгликоля. По интегральной интенсивности данного сигнала была определена средняя степень модификации звездообразных PLLA гидрофильными блоками MPEG<sub>45</sub> (Таблица 3.7).

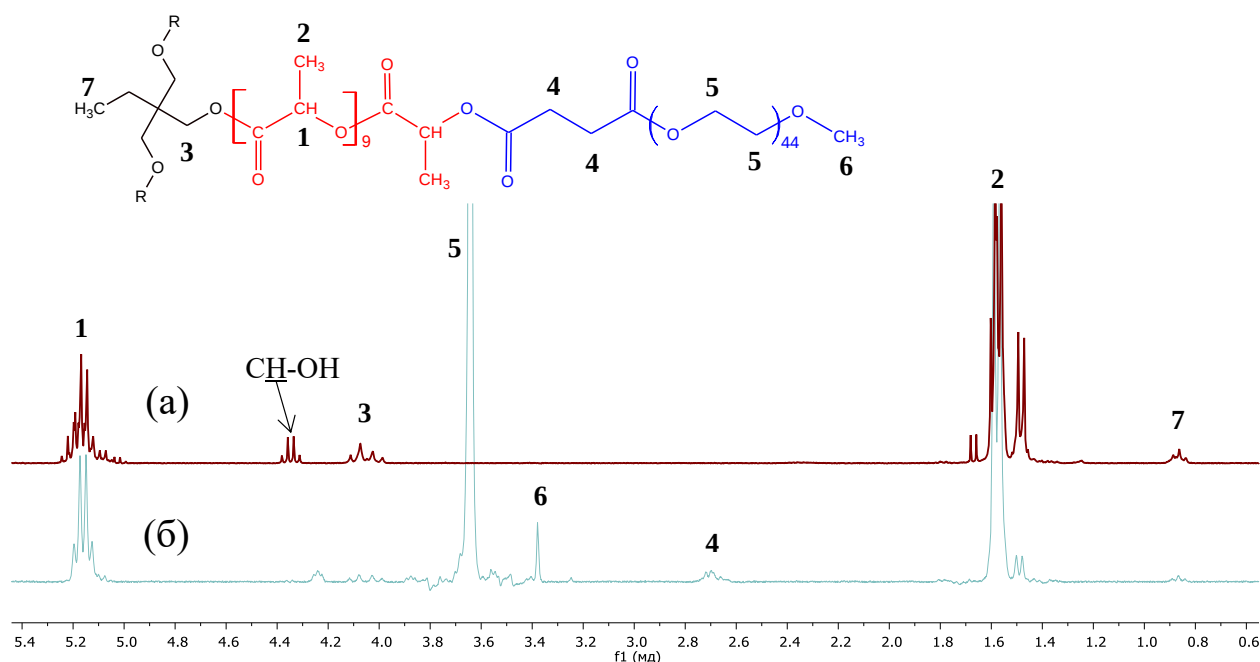


Рисунок 3.42 – <sup>1</sup>H-ЯМР спектры гомополимера 3s-PLLA<sub>10</sub> (а) и его амфифильного 3-х лучевого блок-сополимера 3s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> (б)

Таблица 3.7 – Молекулярно-массовые характеристики синтезированных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль

| Образец                                   | ГПХ                 |                     |      | ЯМР                 |                                                         |
|-------------------------------------------|---------------------|---------------------|------|---------------------|---------------------------------------------------------|
|                                           | M <sub>n</sub> , Да | M <sub>w</sub> , Да | PDI  | M <sub>n</sub> , Да | Степень модификации гидрофильным MPEG <sub>45</sub> , % |
| 3s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 9 900               | 10 700              | 1.10 | 8 600               | 95                                                      |
| 3s-PLLA <sub>25</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 13 700              | 15 400              | 1.12 | 10 900              | 85                                                      |
| 3s-PLLA <sub>48</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 23 400              | 25 700              | 1.10 | 15 250              | 79                                                      |
| 4s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 13 600              | 14 600              | 1.08 | 11 400              | 96                                                      |
| 4s-PLLA <sub>25</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 17 900              | 19 600              | 1.09 | 13 200              | 70                                                      |
| 4s-PLLA <sub>50</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 27 800              | 30 900              | 1.11 | 20 200              | 70                                                      |
| 6s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 17 400              | 19 100              | 1.09 | 15 600              | 92                                                      |
| 6s-PLLA <sub>25</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 23 400              | 25 400              | 1.09 | 20 100              | 75                                                      |
| 6s-PLLA <sub>49</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 32 200              | 37 000              | 1.15 | 30 400              | 75                                                      |

Молекулярно-массовые характеристики синтезированных звездообразных блок-сополимеров были определены с помощью ГПХ (Таблица 3.7). Увеличение

ММ блок-сополимеров по сравнению с исходными звездообразными поли-L-лактидами также подтверждает успешное протекание реакции присоединения и формирование блочных сополимеров.

В результате была синтезирована серия звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров с молекулярными массами от 8 до 30 кДа с узким ММР, отличающихся степенью полимеризации гидрофобного поли-L-лактидного блока от 10 до 50 мономерных звеньев на луч.

### **3.2.2 Исследование влияния строения звездообразных блок-сополимеров на параметры наночастиц**

Благодаря своей амфифильной природе синтезированные 3-х, 4-х и 6-ти звездообразные блок-сополимеры способны образовывать устойчивые надмолекулярные агрегаты в водной среде. Размер и морфология образующихся в результате самоорганизации наночастиц зависят от многих факторов, в том числе от природы, структуры и гидрофильно-гидрофобного баланса исходных макромолекул. Однако в независимости от морфологии за счет наличия в своей структуре как гидрофильной, так и гидрофобной части, наночастицы такого строения могут быть использованы для солюбилизации различных по своей природе противораковых агентов. Внешняя гидрофильная оболочка наночастиц, состоящая из макромолекул MPEG, выполняет не только стабилизирующую функцию, препятствуя их агрегации, но и снижает уровень опсонизации, тем самым замедляя выведение наночастиц системой мононуклеарных фагоцитов [189]. Так называемый «stealth» эффект приводит к существенному повышению стабильности препаратов в организме человека, пролонгированному и селективному действию лекарственного соединения и обеспечивает возможность достижения одинаковой терапевтической эффективности при меньших концентрациях действующего вещества. Несмотря на очевидные преимущества использования наносомальных форм доставки лекарственных средств на основе амфифильных блок-сополимеров PLLA-MPEG, до сих пор одной из важных и актуальных задач остается исследование влияния их строения и состава на размер

и морфологию, образующихся на их основе наночастиц, поскольку именно от этих параметров во многом будет зависеть фармакокинетика наносомальной формы препарата.

Методом замены растворителя (нанопреципитации) была получена серия наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>. Этот метод основан на контролируемом смешении органической фазы (раствора полимера в легколетучем растворителе – ацетоне) с водной фазой при интенсивном перемешивании. При этом лекарственное средство или контрастирующий агент могут быть заранее растворены как в водной, так и в органической среде. Нанопреципитацию проводили до полного удаления органического растворителя из водных суспензий, а концентрация наночастиц составляла 5 мг/мл. Значения гидродинамических диаметров ( $D_h$ ), определенных с помощью метода ДСР, и дзета-потенциалов ( $\zeta$ ), полученных наночастиц представлены в Таблице 3.8. На Рисунке 3.43 приведены кривые распределения интенсивности рассеянного света и количества наночастиц по их гидродинамическим диаметрам. Согласно данным ДСР, водные суспензии наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров, независимо от числа или состава лучей, характеризуются бимодальным распределением интенсивности рассеянного света по гидродинамическим диаметрам. По-видимому, после получения в водных суспензиях сосуществуют две фракции объектов: первая с меньшим гидродинамическим диаметром относится к индивидуальным наночастицам, а вторая к их вторичным агрегатам с более крупным размером. Стоит отметить, что аналогичные наблюдения были описаны в диссертационной работе Разуваевой Е.В. при исследовании самоорганизации линейных двойных и тройных амфифильных блок-сополимеров лактида с этиленоксидом [190]. Было установлено, что структура формирующихся в процессе диализа вторичных агрегатов может варьироваться для наночастиц с аморфным и кристаллическим ядром.

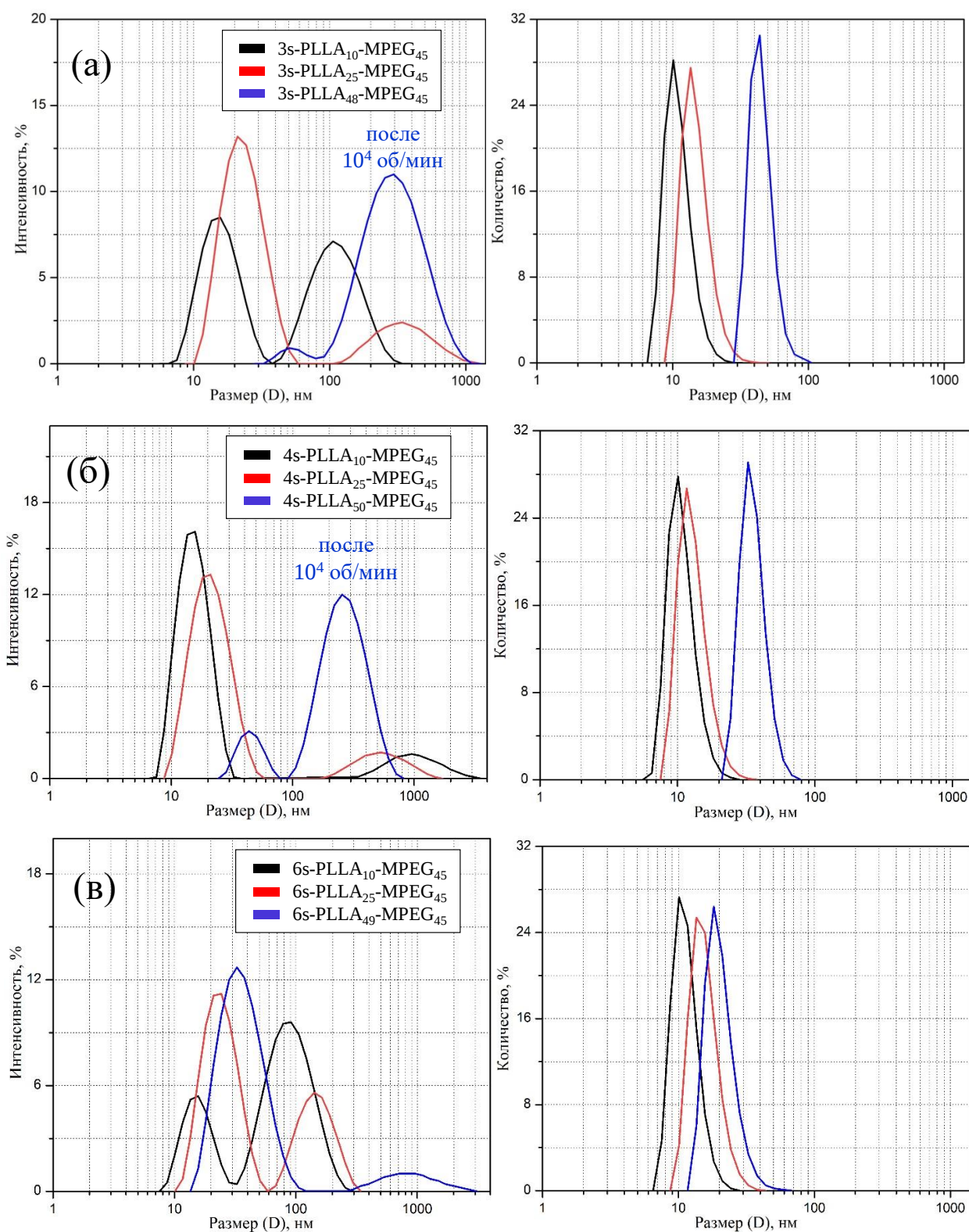


Рисунок 3.43 – Распределения интенсивности рассеянного света (справа) и количества наночастиц (слева) по их гидродинамическим диаметрам для 3-х (а) 4-х (б) и 6-ти (в) лучевых амфифильных блок-сополимеров. Распределения для наночастиц на основе 3s-PLLA<sub>48</sub>-MPEG<sub>45</sub> и 4s-PLLA<sub>50</sub>-MPEG<sub>45</sub> представлены после центрифугирования исходных суспензий при 10<sup>4</sup> об/мин

Таблица 3.8 – Гидродинамический диаметр и дзета-потенциал наночастиц на основе звездообразных амфифильных блок-сополимеров PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>

| Образец                                   | ДСР                              |       |
|-------------------------------------------|----------------------------------|-------|
|                                           | <sup>1</sup> D <sub>h</sub> , нм | ζ, мВ |
| 3s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 16±5                             | -4    |
| 3s-PLLA <sub>25</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 24±8                             | -2    |
| 3s-PLLA <sub>48</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 54±11                            | -3    |
| 4s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 16±5                             | 0     |
| 4s-PLLA <sub>25</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 22±7                             | -3    |
| 4s-PLLA <sub>50</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 45±9                             | -4    |
| 6s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 16±5                             | 0     |
| 6s-PLLA <sub>25</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 25±8                             | -1    |
| 6s-PLLA <sub>49</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 34±13                            | 0     |

<sup>1</sup>Гидродинамический диаметр фракции индивидуальных наночастиц

Основным фактором дисперсионной устойчивости наночастиц, образующихся в ходе самоорганизации звездообразных блок-сополимеров PLLA-MEPG, является стерическая стабилизация, обеспечиваемая наличием гидрофильной оболочки. Однако с увеличением степени полимеризации гидрофобного блока PLA плотность гидрофильной оболочки может уменьшаться, что, по-видимому, может приводить к агрегации наночастиц [190]. Кроме того, причиной вторичной агрегации в случае звездообразных полимеров может являться формирование проходных цепей, при ассоциации соседних наночастиц и отсутствие электростатического барьера, т.е. низкие по модулю значения дзета-потенциала (Таблица 3.8). Из-за присутствия вторичных агрегатов в исследуемых системах за размер индивидуальных наночастиц был принят гидродинамический диаметр первого пика на распределениях интенсивности рассеянного света (Таблица 3.8).

По представленным на Рисунке 3.43 распределениям интенсивности рассеянного света и количества наночастиц по их гидродинамическим диаметрам можно предположить, что преобладающей фракцией наночастиц на основе полимеров со степенью полимеризации гидрофобного блока 10 и 25 являются

индивидуальные наночастицы. В противном случае, если бы концентрация вторичных агрегатов превышала несколько процентов, детектирование рассеяния от более мелких наночастиц методом ДСР не представлялось бы возможным [191]. По мере увеличения степени полимеризации гидрофобного PLLA блока доля агрегатов в системе возрастает. После центрифугирования исходных водных суспензий и анализе концентрации наночастиц в супернатанте методом гравиметрии, было установлено, что доля вторичных агрегатов микронного размера для частиц на основе PLLA с самым длинным блоком, в случае 3-х и 4-х лучевых макромолекул, может достигать до 90 масс.%. Рассеяние от таких объектов не позволяет детектировать ДСР-распределение индивидуальных наночастиц с меньшим размером, поэтому на Рисунке 3.43 кривые для этих образцов приведены после центрифугирования исходных суспензий при  $10^4$  об/мин. Важно отметить, что в отличие от менее разветвленных аналогов, водная суспензия на основе 6s-PLLA<sub>49</sub>-MPEG<sub>45</sub> не характеризуется высокой долей вторичных агрегатов микронного размера, а рассеяние от индивидуальных наночастиц присутствует в виде интенсивного пика на Рисунке 3.43 (в).

В результате, по данным ДСР гидродинамический диаметр индивидуальных наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров увеличивается по мере возрастания степени полимеризации гидрофобного блока PLLA и слабо зависит от общего числа лучей в исходных макромолекулах [192]. Так, например, для серии наночастиц на основе 6-ти лучевых блок-сополимеров можно отметить характерное увеличение среднего  $D_h$  с 16 до 34 нм (Таблица 3.8). Схожая зависимость размера наночастиц от молекулярной массы гидрофобного блока была продемонстрирована в диссертационной работе [190] для наночастиц на основе линейных блок-сополимеров PLA-PEG с аморфным ядром.

При исследовании водных суспензий наночастиц методом рентгеновской дифракции в больших углах было обнаружено, что рефлекс  $200/110$ , относящийся к  $\alpha$ -форме кристаллического поли-L-лактида, наблюдается на дифрактограммах исходных водных суспензий наночастиц 3s-PLLA<sub>48</sub>-MPEG<sub>45</sub> и 4s-PLLA<sub>50</sub>-MPEG<sub>45</sub> (Рисунок 3.44).

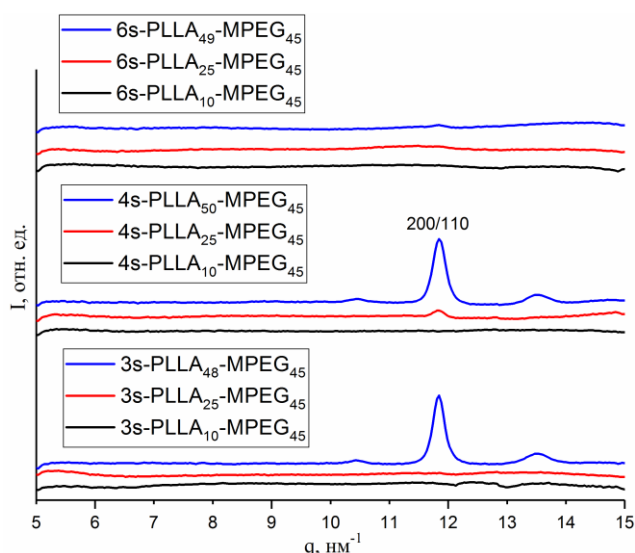


Рисунок 3.44 – Дифрактограммы водных суспензий наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль

Величина размера области когерентного рассеяния в обоих случаях составила 21 нм, что коррелирует с ранее представленными значениями для звездообразных гомополимеров PLLA (Таблица 3.5). В то же время на дифрактограммах наночастиц на основе 6-ти лучевых образцов отсутствуют кристаллические рефлексы. Это свидетельствует о том, что разветвленное строение 6-ти лучевых блок-сополимеров может приводить к кинетическим затруднениям в процессе кристаллизации гидрофобного блока в ядре наночастиц. Таким образом, можно сказать, что для 3s-PLLA<sub>48</sub>-MPEG<sub>45</sub> и 4s-PLLA<sub>50</sub>-MPEG<sub>45</sub> одной из движущих сил активной вторичной агрегации наночастиц является процесс кристаллизации поли-L-лактидных участков полимерных цепей. В то же время общая тенденция по повышению доли агрегатов в системе по мере возрастания длины гидрофобного блока может быть обоснована уменьшением плотности гидрофильной оболочки по мере увеличения размеров наночастиц.

Данные, полученные с помощью ПЭМ, хорошо коррелируют с данными ДСР. На рисунке 3.45 представлены изображения ПЭМ наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>.

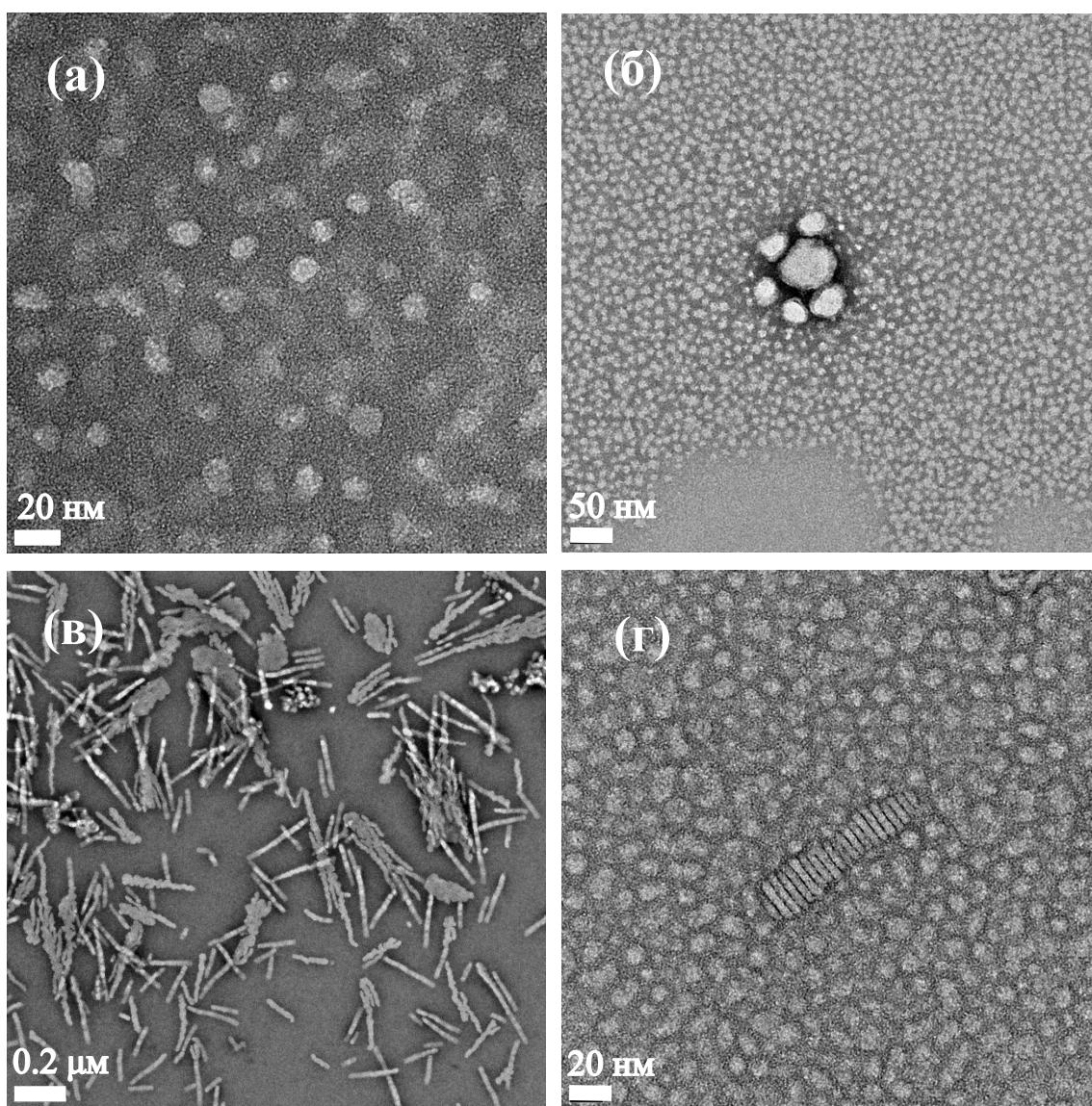


Рисунок 3.45 – ПЭМ изображения наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров 3s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> (а), 6s-PLLA<sub>25</sub>-MPEG<sub>45</sub> (б), 3s-PLLA<sub>48</sub>-MPEG<sub>45</sub> (в) и 6s-PLLA<sub>49</sub>-MPEG<sub>45</sub> (г)

Преобладающей фракцией в образцах со средней степенью полимеризации поли-L-лактидного блока 10 и 25 независимо от числа лучей являются индивидуальные наночастицы, средний размер которых варьируется от 10 до 25 нм (Рисунок 3.45 (а,б)), однако встречается и незначительная доля агрегатов с более крупным размером. С увеличением степени полимеризации гидрофобного блока до 50 в случае 3-х и 4-х лучевых блок-сополимеров наблюдается формирование протяженных лентовидных структур с длиной от 0.1 до 1 мкм (Рисунок 3.45 (в)). Поперечный размер их при этом составляет 20-25 нм, что коррелирует с размером

индивидуальных наночастиц. В работе [193] наблюдалось аналогичное поведение наночастиц на основе линейных блок-сополимеров PLLA-PEG при высаживании их на подложку, что авторы связывали со слиянием кристаллических мицелл. Интересно отметить, что на ПЭМ изображениях образца на основе 6s-PLLA<sub>49</sub>-MPEG<sub>45</sub> (Рисунок 3.45 (г)) помимо преобладающих по количеству индивидуальных наночастиц с размером от 10 до 20 нм встречается небольшая доля стержневидных агрегатов, упакованных в «стопки». Длина этих агрегатов не превышала 100 нм, а поперечный размер находился в пределах от 4 до 5 нм. Формирование такого рода структур может быть следствием кристаллизации блок-сополимеров, вызванной концентрированием и высаживанием наночастиц на подложке, однако объяснение механизма этого процесса и влияния на него звездообразной структуры блок-сополимеров выходит за рамки данной диссертационной работы и станет предметом дальнейших исследований.

Дополнительно с целью определения параметров индивидуальных наночастиц в водной среде их водные суспензии были исследованы методом МУРР с использованием источника синхротронного излучения. На Рисунке 3.46 приведены кривые рассеяния в координатах  $\text{Log } I - s$  для исходных суспензий наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>.

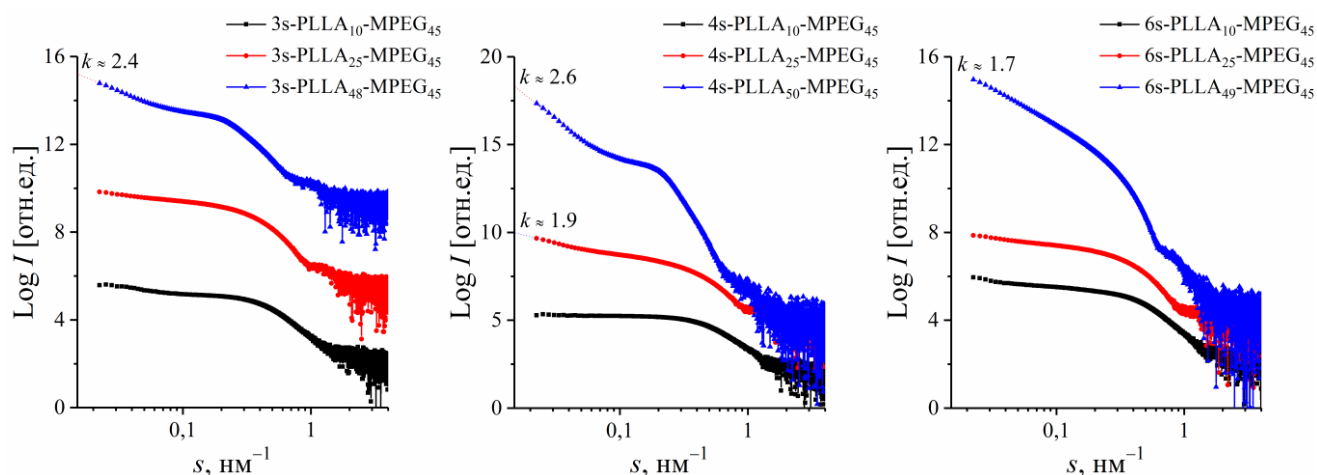


Рисунок 3.46 – Кривые МУРР в координатах  $\text{Log } I - s$  для исходных суспензий наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub> (с = 5 мг/мл)

По мере увеличения средней степени полимеризации гидрофобного блока PLLA на кривых МУРР можно отметить возрастание интенсивности рассеяния в области самых малых волновых векторов  $s < 0.1 \text{ нм}^{-1}$ , что свидетельствует о повышении концентрации крупных рассеивающих объектов в суспензиях наночастиц. Величина коэффициента наклона начальных участков  $k$  для кривых 3s-PLLA<sub>48</sub>-MPEG<sub>45</sub> и 4s-PLLA<sub>50</sub>-MPEG<sub>45</sub> составила порядка 2.5, что может указывать на агрегацию наночастиц с последующим их слипанием и формированием плотных структур. В случае же образца 6s-PLLA<sub>49</sub>-MPEG<sub>45</sub>  $k \approx 1.7$ , что в большей степени свидетельствует о протекании диффузионно-лимитированной агрегации индивидуальных наночастиц и формировании «рыхлых» разветвленных структур [190]. Важно отметить, что наночастицы на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров с коротким гидрофобным блоком PLLA<sub>10</sub> близки к монодисперсным системам, что коррелирует с данными ДСР и ПЭМ. На их кривых МУРР в координатах  $\text{Log } I - s$  не происходит возрастания  $I$  в области самых малых волновых векторов, а в координатах Кратки кривые выходят из начала координат, имеют хорошо выраженную колоколообразную форму, которая свидетельствует о компактной структуре исследуемых объектов (Рисунок 3.47).

Поскольку интенсивное рассеяние агрегатами в области малых волновых векторов затрудняет анализ параметров индивидуальных наночастиц, исходные водные суспензии центрифугировали при скорости  $10^5 \text{ g}$  с целью удаления крупных рассеивающих объектов. Кривые МУРР в координатах  $\text{Log } I - s$  для наночастиц в супернатанте представлены на Рисунке 3.48. После ультрацентрифугирования на кривых в области  $s < 0.1 \text{ нм}^{-1}$  более не наблюдается увеличение  $I$ , что свидетельствует об осаждении наночастиц с размером  $\approx 65 \text{ нм}$  и выше. Отсутствие вклада от агрегатов позволяет по кривым рассеяния определить средний размер наночастиц, а именно радиус инерции ( $R_g$ ), несущий информацию о распределении материи относительно центра массы исследуемого объекта.

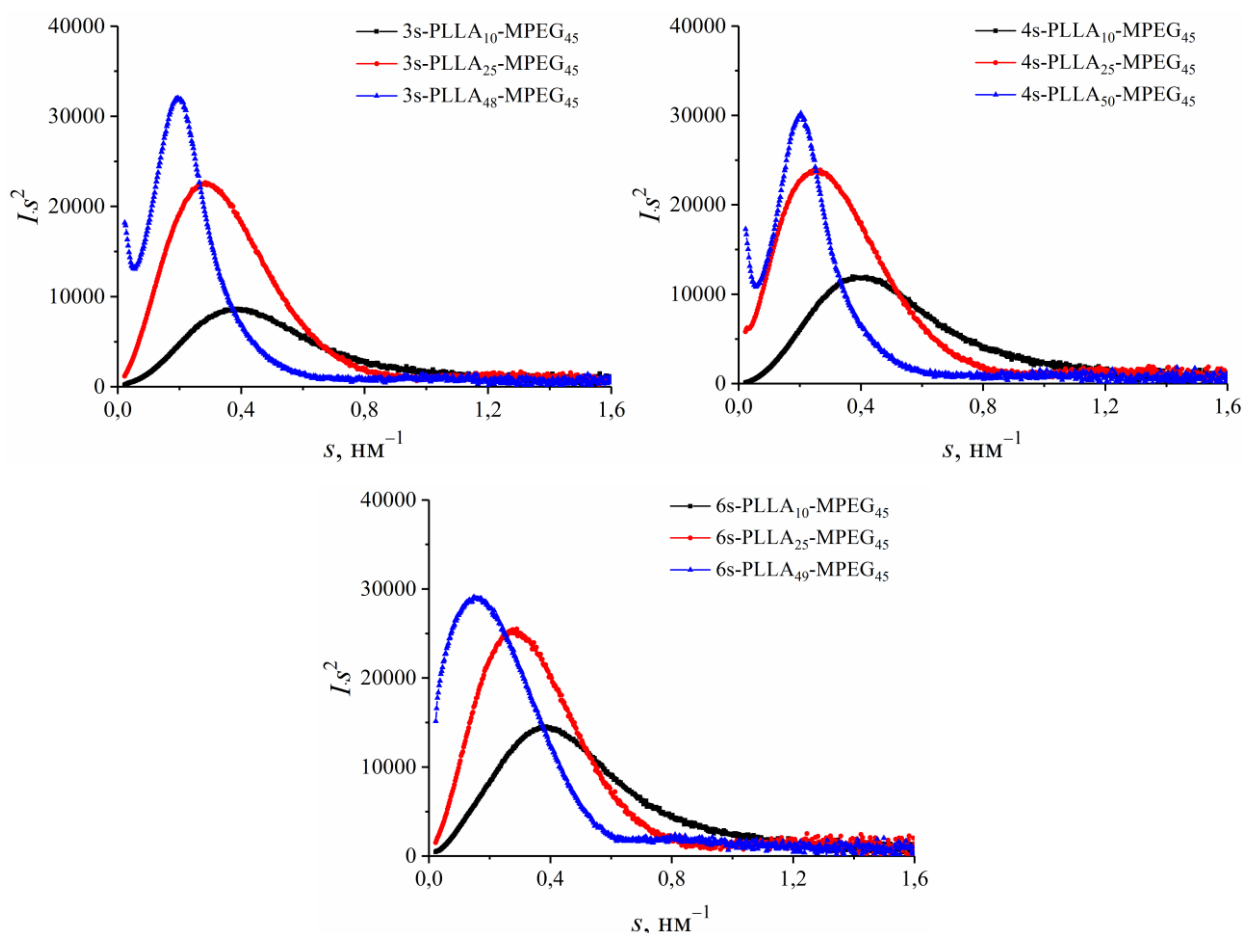


Рисунок 3.47 – Кривые МУРР в координатах Кратки для исходных суспензий наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>

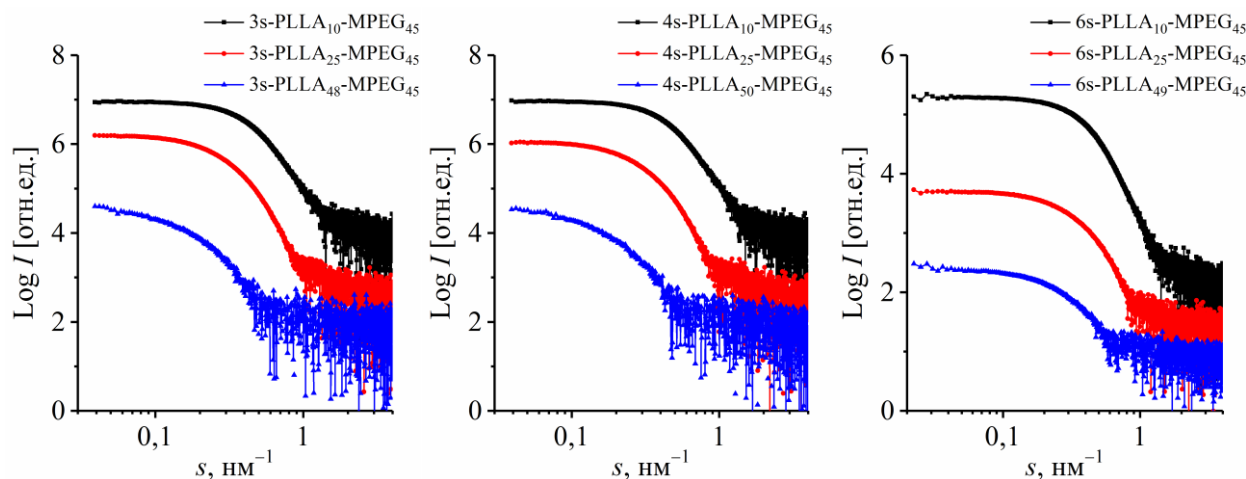


Рисунок 3.48 – Кривые МУРР в координатах  $\text{Log } I - s$  для наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub> после центрифугирования ( $10^5 g$ )

Значение радиуса инерции было определено из наклона прямолинейного участка кривых рассеяния в координатах Гинье  $\text{Ln } I - s^2$  (Таблица 3.9). После

центрифугирования на кривых МУРР наночастиц на основе 3s-PLLA<sub>48</sub>-MPEG<sub>45</sub> и 4s-PLLA<sub>50</sub>-MPEG<sub>45</sub> исчезают характерные максимумы в области  $s \approx 0.2 \text{ нм}^{-1}$ . С учетом известной полидисперсности наночастиц данный факт позволяет предположить, что наблюдаемые на кривых МУРР максимумы скорее отражают среднее расстояние между плотными ядрами PLLA в составе вторичных агрегатов, чем связаны с форм-фактором индивидуальных наночастиц.

Таблица 3.9 – Параметры наночастиц, определенные методом малоуглового рентгеновского рассеяния

| Степень полимеризации PLLA <sub>n</sub>  | $R_g$ , нм (Гинье) | $R_g$ , нм P(R) | $R$ , нм | $D_{max}/2$ , нм |
|------------------------------------------|--------------------|-----------------|----------|------------------|
| 3s-PLLA <sub>n</sub> -MPEG <sub>45</sub> |                    |                 |          |                  |
| 10                                       | 4.4±0.1            | 4.4±0.1         | 5.1      | 6.5              |
| 25                                       | 6.9±0.1            | 7.2±0.1         | 7.1      | 12.4             |
| 48                                       | 10.3±0.1           | 11.7±0.2        | 10.5     | 19.7             |
| 4s-PLLA <sub>n</sub> -MPEG <sub>45</sub> |                    |                 |          |                  |
| 10                                       | 4.2±0.1            | 4.3±0.1         | 4.9      | 6.3              |
| 25                                       | 6.9±0.1            | 7.2±0.1         | 7.0      | 12.7             |
| 50                                       | 11.2±0.2           | 13.8±0.2        | 10.8     | 24.7             |
| 6s-PLLA <sub>n</sub> -MPEG <sub>45</sub> |                    |                 |          |                  |
| 10                                       | 4.5±0.1            | 4.5±0.1         | 5.2      | 6.7              |
| 25                                       | 6.8±0.1            | 7.2±0.1         | 7.0      | 12.5             |
| 49                                       | 8.9±0.1            | 10.4±0.2        | 9.3      | 15.0             |

Радиус инерции наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub> возрастает по мере увеличения степени полимеризации гидрофобного поли-L-лактидного блока. Так, например, для серии наночастиц на основе звездообразных 4-х лучевых блок-сополимеров  $R_g$  возрастает с 4.2 до 11.2 нм. Таким образом, комплексный анализ самоорганизации показал, что в диапазоне исследуемых длин блоков число лучей в исходных макромолекулах в большей степени оказывает влияние не на размер образующихся наночастиц, а на их агрегативную устойчивость, вследствие различной способности к кристаллизации и разнице в плотности гидрофильной оболочки.

Если соотнести радиус инерции  $R_g$  с гидродинамическим радиусом  $R_h$  ( $D_h/2$ ), по данным ДСР, то можно получить полезную информацию о возможной геометрии наночастиц. Например, для сферических частиц с постоянной плотностью параметр  $R_g/R_h$  равняется 0.775, в то время как для объектов с анизотропной геометрией например, стержне- или дискообразной,  $R_g/R_h > 0.775$  [194]. Для большинства исследуемых индивидуальных наночастиц параметр  $R_g/R_h$  составил порядка 0.56, что может указывать на их сферическую морфологию с более высокой электронной плотностью в центре наночастиц, т.е. на структуру по типу «ядро-оболочка» [195].

Функции распределения по расстояниям  $P(R)$  были рассчитаны по экспериментальным данным для индивидуальных наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров (Рисунок 3.49).

Радиусы инерции, определенные по парным функциям  $P(R)$ , представлены в Таблице 3.9 и хорошо коррелируют с аналогичными значениями, рассчитанными в координатах Гинье, для всех типов наночастиц. Анализ функции  $P(R)$ , в свою очередь, позволяет получить информацию о форме наночастицы и оценить ее максимальный размер  $D_{max}$  (Таблица 3.9). Для сферических частиц характерен колоколообразный вид функции  $P(R)$  с максимумом в районе  $D_{max}/2$  [196]. Из представленных данных видно, что для всех исследуемых наночастиц значения  $D_{max}/2$  оказались больше радиуса  $R$ , определенного из положения максимума функции  $P(R)$  (Таблица 3.9). С увеличением длины гидрофобного блока PLLA можно отметить увеличение асимметричности пиков функции  $P(R)$ . В случае с наночастицами, состоящими из блок-сополимеров, такая картина может быть связана с несколькими причинами: с эффектом меняющейся плотности гидрофильной оболочки по мере смещения гидрофильно-гидрофобного баланса, появлением асимметричности формы наночастиц и возрастанием их полидисперсности по размерам.

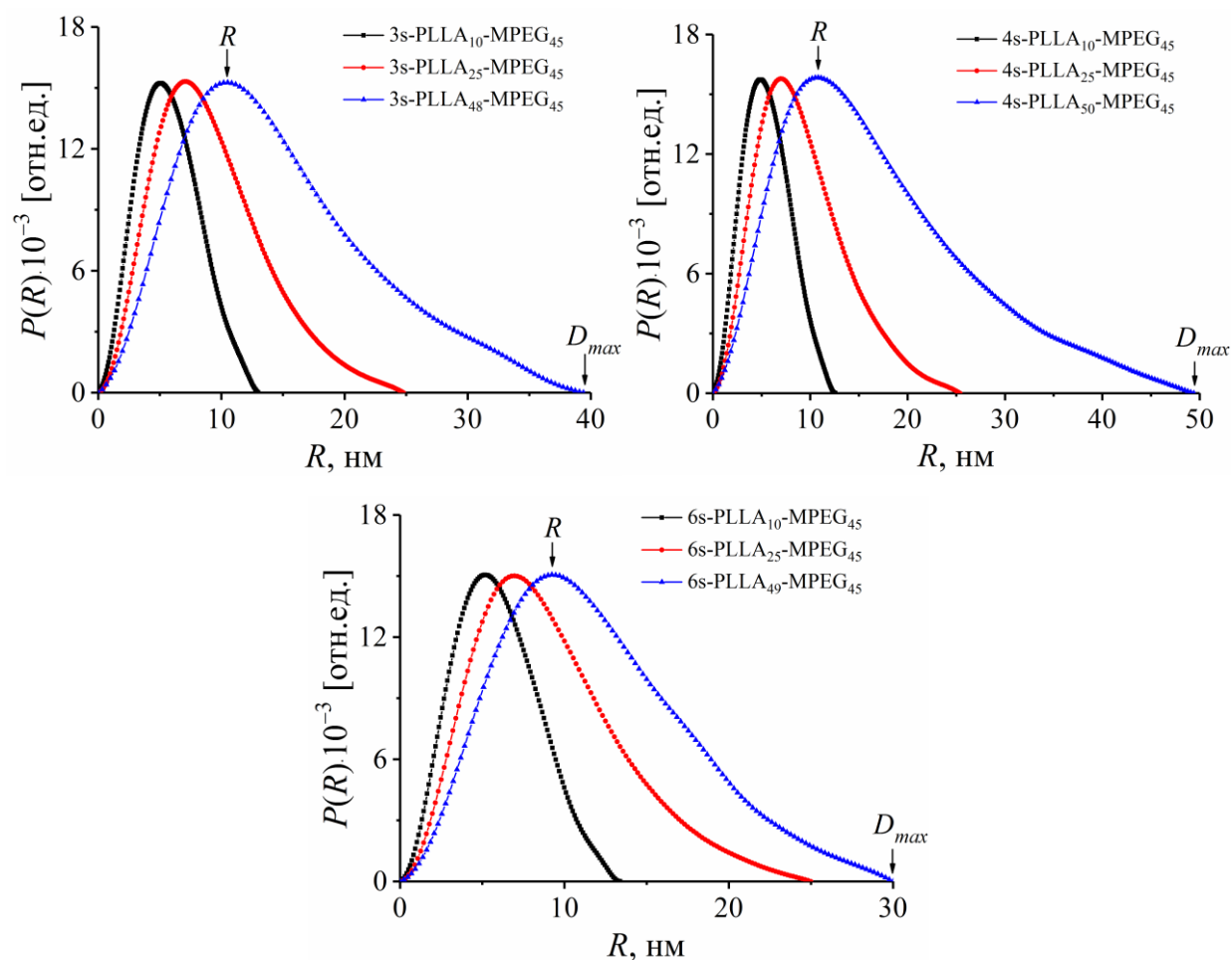


Рисунок 3.49 – Парные корреляционные функции для наночастиц на основе звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub>-MPEG<sub>45</sub>

Наиболее близкими к монодисперсным сферическим объектам, с минимальной разницей между  $D_{max}/2$  и  $R$ , оказались наночастицы на основе звездообразных блок-сополимеров 3s-, 4s- и 6s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>. Минимальная массовая доля крупных агрегатов и устойчивость к седиментации делают эти наночастицы перспективными для создания на их основе систем доставки противораковых средств *in vitro* и *in vivo*.

### 3.2.3 Получение и характеристика наночастиц, нагруженных противоопухолевыми соединениями

С точки зрения размера, морфологии и устойчивости к агрегации наночастицы на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> оказались наиболее подходящими кандидатами для изучения их

солубилизирующей способности по отношению к различным противораковым агентам с целью дальнейшей оценки антипролиферативной активности полученных полимерных наносомальных систем. Как известно, на сегодняшний день химиотерапия злокачественных новообразований в значительной мере базируется на использовании платиносодержащих лекарственных соединений, нарушающих репликацию молекул ДНК посредством сшивания. Однако применение этой группы препаратов может быть связано с рядом серьезных побочных явлений, таких как нефротоксичность, нейротоксичность и анемия. Кроме того, существует риск проявления первичной или возникающей в ходе применения устойчивости к данной группе лекарственных средств. Как обсуждалось ранее, в определенной степени указанные проблемы могут быть решены путем внедрения противораковых соединений в полимерные наночастицы. В связи с этим в качестве агентов для солубилизации в наночастицы на основе звездообразных блок-сополимеров были выбраны два платиносодержащих препарата (Рисунок 3.50).

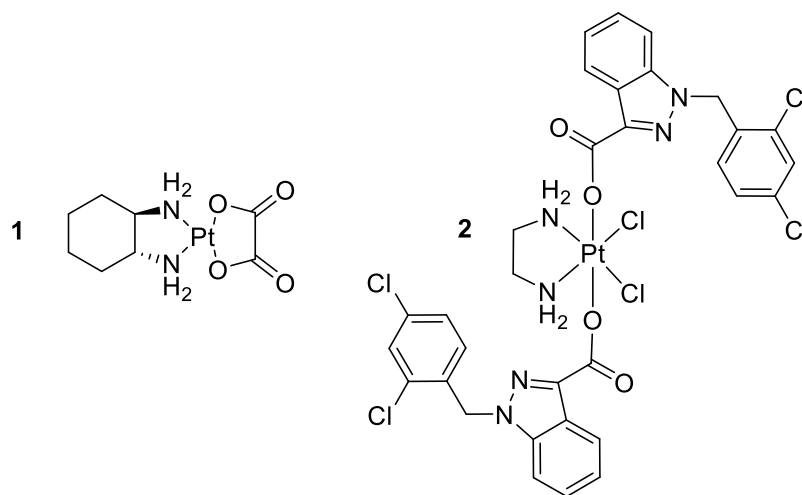


Рисунок 3.50 – Структурные формулы оксалиплатина (1) и комплекса Pt(IV) с лигандом на основе лонидамина (2)

Первый – оксалиплатин, по своей природе является слабогидрофильным комплексом Pt(II), одобренным FDA в 2002 году для лечения колоректального рака в паре с 5-фторурацилом. В качестве второго был выбран гидрофобный комплекс Pt(IV) с лигандом на основе лонидамина. Добавление биологически активного

лиганада, такого как лонидамин, может существенно увеличить избирательность действия комплекса по отношению к раковым клеткам, поскольку сам лонидамин стимулирует производство лактата в здоровых клетках и замедляет гликолиз в опухолевых. Несмотря на высокую активность данного комплекса, одним из лимитирующих факторов для его изучения *in vivo* является высокая липофильность и низкая растворимость в биологически совместимых растворителях, поэтому внедрение его в полимерные наночастицы является актуальной задачей.

Для получения наночастиц содержащих оксалиплатин была использована стандартная методика нанопреципитации, за исключением заранее добавленного в водную фазу комплекса Pt(II) в количестве 5 масс.% по отношению к полимеру. По представленным кривым ДСР видно, что солюбилизация оксалиплатина не приводит к изменению гидродинамических диаметров наночастиц (Рисунок 3.51). Как и в случае с ненагруженными аналогами, в системе присутствует незначительная доля крупных агрегатов, однако преобладающим по количеству остается фракция индивидуальных наночастиц с размером  $16 \pm 5$  нм. Одним из важнейших свойств полимерных наносомальных систем для доставки лекарственных средств является способность к ресуспендированию из порошкообразного состояния после процесса лиофилизации, поскольку только хранение в твердом виде может предотвратить преждевременное высвобождение препарата из наночастиц. Было установлено, что все исследуемые наночастицы, содержащие оксалиплатин, хорошо ресуспендируются в водной среде с сохранением исходного диаметра наночастиц, что подтверждают данные ДСР на примере 4s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> (Рисунок 3.51 (в)).

Содержание оксалиплатина в наночастицах и, соответственно, эффективность загрузки определяли с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Установлено, что содержание оксалиплатина в наночастицах на основе звездообразных блок-сополимеров варьируется от 3.66 до 4.05 масс.%, а эффективность загрузки возрастает от 80.0 до 98.8% с увеличением числа лучей (Таблица 3.10). Данный факт может быть следствием различной плотности гидрофильной оболочки в зависимости от строения исходных

макромолекул и солюбилизации оксалиплатина не в ядро наночастиц, а на их периферии.

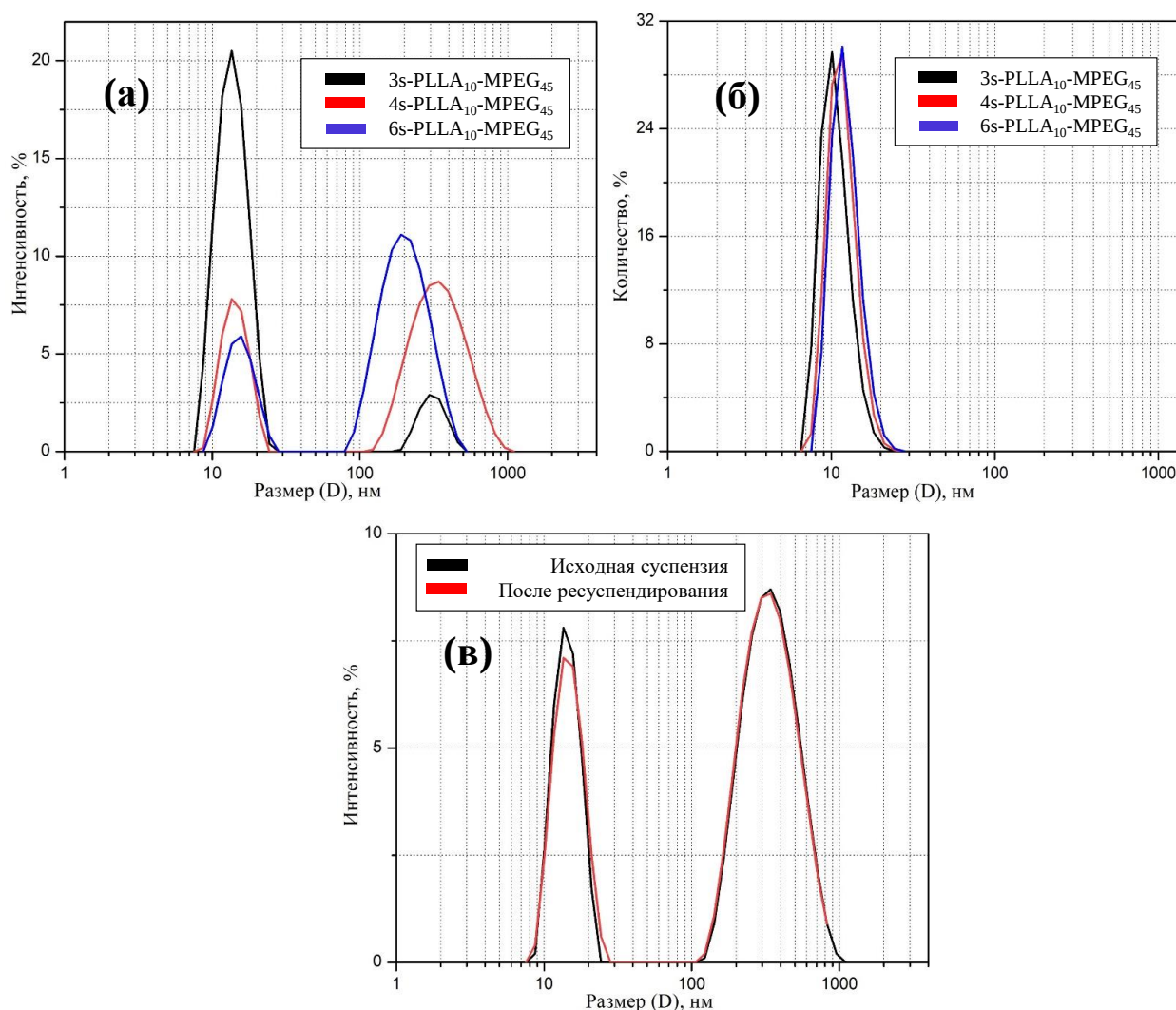


Рисунок 3.51 – Распределения интенсивности рассеянного света (а) и количества наночастиц (б), содержащих оксалиплатин, по их гидродинамическим диаметрам для 3-х, 4-х и 6-ти лучевого PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>. Данные ДСР до и после ресуспендирования для образца 4s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> (в)

Таблица 3.10 – Характеристики наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров, содержащих противораковый препарат оксалиплатин

| Блок-сополимер                            | $D_h$ , нм | Содержание оксалиплатина, масс. % | Эффективность загрузки, % |
|-------------------------------------------|------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 3s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 16±5       | 3.66±0.01                         | 80.0                      |
| 4s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 16±5       | 3.89±0.03                         | 87.3                      |
| 6s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 16±5       | 4.05±0.03                         | 98.8                      |

Для корректной интерпретации данных по антипролиферативной активности наночастиц, необходимо исследовать кинетику высвобождения оксалиплатина. Для этого суспензии диализовали против дистиллированной воды при 37 °С, контролируя оставшуюся концентрацию оксалиплатина в наночастицах. В результате существенного влияния на кинетику релиза оксалиплатина исходная структура макромолекул блок-сополимеров не оказала, причем за первый час во всех случаях высвобождается порядка 70% действующего вещества (Рисунок 3.52). Относительно высокая скорость высвобождения может быть связана с преимущественной солюбилизацией препарата в гидрофильной оболочке наночастиц или на границе раздела с гидрофобным ядром вследствие гидрофильной природы оксалиплатина.

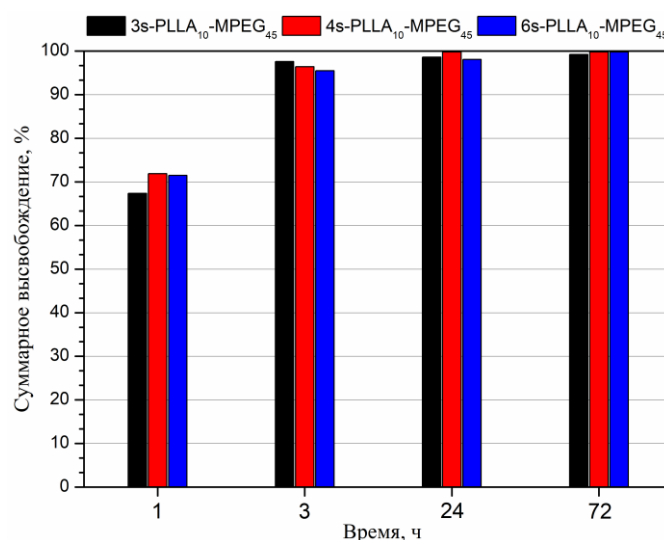


Рисунок 3.52 – Диаграмма высвобождения оксалиплатина из наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> при 37°C

Поскольку противораковый комплекс Pt(IV) с таргетным лигандом на основе лонидамина обладает плохой растворимостью, как в воде, так и в большинстве легколетучих органических растворителей, то для его загрузки в наночастицы на основе звездообразных блок-сополимеров PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> была применена отличающаяся от предыдущей версии методика нанопреципитации [197]. В качестве ключевых отличий модифицированной методики можно выделить: снижение общей концентрации компонентов, растворение препарата в среде тетрагидрофурана в количестве 5 масс.% по отношению к полимеру и изменение

очередности добавления и соотношения фаз. В результате после испарения тетрагидрофурана были получены устойчивые в водной среде суспензии наночастиц, содержащих комплекс Pt(IV). По данным ДСР видно, что картина распределения интенсивности рассеянного света по гидродинамическим диаметрам наночастиц, содержащих гидрофобный комплекс Pt(IV), также характеризуется наличием двух максимумов (Рисунок 3.53). В системе преобладающей фракцией являются наночастицы со средними размерами порядка  $18 \pm 6$  нм, которые также после лиофилизации в отсутствие криопротекторов могут быть восстановлены до водной суспензии с сохранением исходных размеров наночастиц.

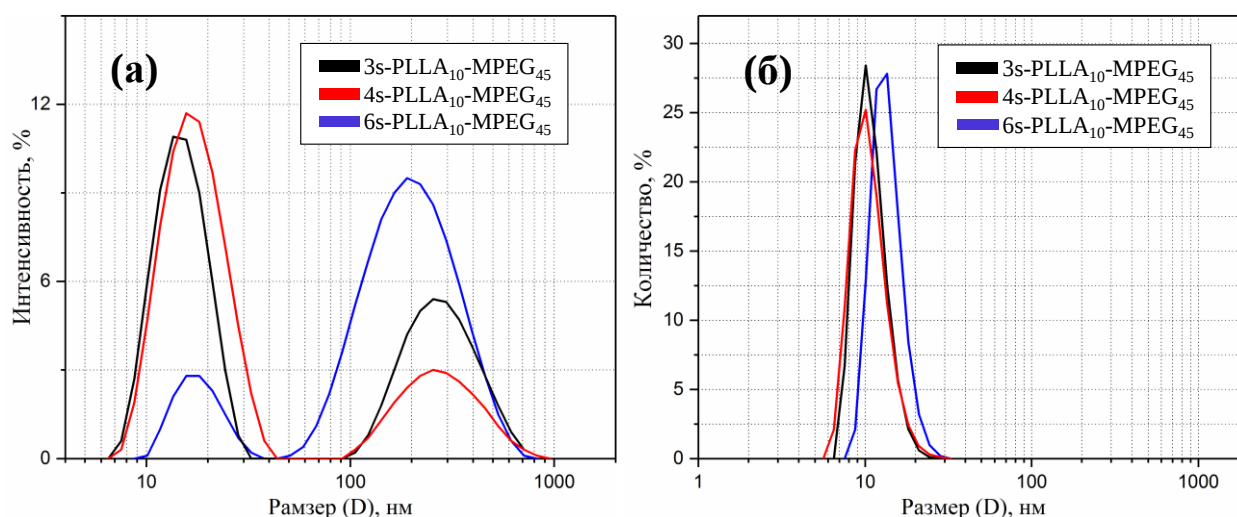


Рисунок 3.53 – Распределения интенсивности рассеянного света (а) и количества наночастиц (б), содержащих комплекс Pt(IV), по их гидродинамическим диаметрам для 3-х, 4-х и 6-ти лучевого PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>

Эффективность загрузки гидрофобного платинового комплекса оказалась ниже по сравнению с оксалиплатином и варьировалась в зависимости от строения блок-сополимеров от 63.5 до 68.5% (Таблица 3.11). Данный факт может быть напрямую связан с ограниченной растворимостью комплекса в используемых при нанопреципитации средах. Наибольшую эффективность сольubilизации, как и в экспериментах с оксалиплатином, продемонстрировали наночастицы на основе 6-ти лучевого блок-сополимера 6s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>.

Таблица 3.11 – Характеристики наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров, содержащих противораковый комплекс Pt(IV) с лигандом на основе лонидамина

| Блок-сополимер                            | $D_h$ , нм | Содержание комплекса Pt(IV), масс. % | Эффективность загрузки, % |
|-------------------------------------------|------------|--------------------------------------|---------------------------|
| 3s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 16±5       | 3.67±0.03                            | 63.5                      |
| 4s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 16±5       | 3.19±0.02                            | 66.3                      |
| 6s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 18±6       | 3.63±0.03                            | 68.5                      |

При изучении кинетики высвобождения комплекса Pt(IV) из наночастиц при 37 °С было обнаружено, что в течение первых 24 часов количество высвободившегося препарата варьируется от 72 до 86%, причем наиболее медленный релиз наблюдается из наночастиц на основе 4-х лучевого блок-сополимера (Рисунок 3.54). Стоит отметить, что скорость высвобождения препарата после первых суток существенно снижается и к 72 часам суммарное количество высвободившегося препарата во всех случаях возрастает лишь на несколько процентов. При этом оставшиеся 20-30% гидрофобного комплекса платины могут высвобождаться медленнее за счет диффузии и постепенного биоразложения поли-L-лактидных цепей, входящих в состав блок-сополимеров.

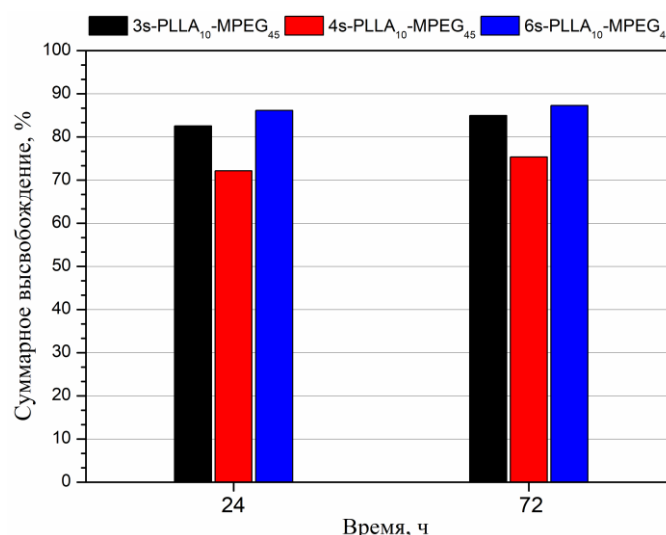


Рисунок 3.54 – Диаграмма высвобождения комплекса Pt(IV) из наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> при 37°С

Прежде чем перейти к изучению цитотоксических свойств полученных полимерных наносомальных систем, содержащих платиновые комплексы, было важно оценить могут ли наночастицы на основе звездообразных блок-сополимеров эффективно солюбилизовать комбинацию противоопухолевых препаратов с целью выявления возможного синергического эффекта в дальнейших испытаниях *in vitro*. Для этого по стандартной методике нанопреципитации был проведен дополнительный эксперимент по загрузке в наночастицы комбинации оксалиплатина и 5-фторурацила. Последний относится к группе антиметаболитов и является распространенным препаратом для лечения различных типов рака, в том числе рака толстой кишки в паре с оксалиплатином. Несмотря на широкое применение, 5-фторурацил обладает довольно коротким периодом полувыведения и слабой способностью проникать через мембраны клеток, поэтому внедрение его в полимерные наночастицы может способствовать повышению эффективности противоопухолевой терапии.

В качестве исходного звездообразного блок-сополимера был выбран 6s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>, наночастицы на основе которого продемонстрировали наилучшие показатели в отношении солюбилизации платиновых комплексов. После процедуры очистки от несвязанных препаратов методом диализа было установлено, что эффективность загрузки составила 82.0 и 95.9% по оксалиплатину и 5-фторурацилу, соответственно (Таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Характеристики наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров, содержащих оксалиплатин и 5-фторурацил

| Блок-сополимер                            | Оксалиплатин           |                           | 5-фторурацил           |                           |
|-------------------------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
|                                           | Массовое содержание, % | Эффективность загрузки, % | Массовое содержание, % | Эффективность загрузки, % |
| 6s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 3.1                    | 82.0                      | 15.6                   | 95.9                      |

Преимуществом также является факт, что масса этих препаратов в наночастицах соотносится как 1:5, что соответствует общепринятым терапевтическим нормам в отношении лечения рака толстой кишки. Средний

гидродинамический диаметр наночастиц, загруженных комбинацией препаратов, в данном случае варьируется в пределах  $15 \pm 3$  нм, что слабо отличается от ненагруженных наночастиц.

В результате было установлено, что наночастицы на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых звездообразных блок-сополимеров PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> демонстрируют высокие показатели эффективности загрузки, от 63 до 98%, различных по своей природе противоопухолевых препаратов. Внедрение в наночастицы лекарственных средств в количестве от 3 до 15 масс.% не оказало существенного влияния на их размер. Было показано, что солюбилизация гидрофобного комплекса Pt(IV) может не только придать ему коллоидную растворимость в водной среде, но и обеспечить пролонгированный характер высвобождения из наночастиц.

### **3.2.4 Исследование цитотоксичности и внутриклеточного распределения наночастиц *in vitro***

Антипролиферативную активность *in vitro* наночастиц, нагруженных комплексом Pt (IV) с лигандом на основе лонидамина, оксалиплатином и его комбинацией с 5-фторурацилом исследовали методом МТТ-теста. В эксперименте участвовали две линии клеток: раковые клетки аденокарциномы толстой кишки человека (HCT116) и здоровые клетки фибробластов легкого эмбриона человека (WI38). После инкубации клеток в течение 72 ч со свободными и наносомальными формами противоопухолевых препаратов, были построены кривые выживаемости клеток в процентах относительно концентрации активного агента и определены значения IC<sub>50</sub> (Таблица 3.13). Этот параметр характеризует уровень цитотоксичности и соответствует концентрации препарата, вызывающей снижение выживаемости клеток на 50%. В первую очередь стоит отметить, что наночастицы на основе звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>, не содержащие противоопухолевых препаратов, не проявляли цитотоксических свойств в широком диапазоне концентраций ( $\gg 100$  мкМ), как по отношению к раковой, так и к здоровой линии клеток.

Таблица 3.13 – Значения  $IC_{50}$  для свободных форм цитостатиков и их наносомальных форм на основе звездообразных блок-сополимеров

| Образец                                   | Оксалиплатин          |      | Комплекс Pt (IV) |         | Комбинация оксалиплатина и 5-фторурацила |         |
|-------------------------------------------|-----------------------|------|------------------|---------|------------------------------------------|---------|
|                                           | IC <sub>50</sub> , μM |      |                  |         |                                          |         |
|                                           | HTC116                | WI38 | HTC116           | WI38    | HTC116                                   | WI38    |
| Свободная форма                           | 2.3±0.6               | 15±2 | 0.43±0.1         | 1.3±0.1 | 2.2±0.3                                  | 12±4    |
| 3s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 2.6±0.1               | 14±4 | 1.30±0.2         | 3.8±0.3 | -                                        | -       |
| 4s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 3.4±0.8               | 38±7 | 1.45±0.1         | 4.4±0.2 | -                                        | -       |
| 6s-PLLA <sub>10</sub> -MPEG <sub>45</sub> | 6.6±0.7               | 44±2 | 1.9±0.3          | 6.7±0.1 | 0.43±0.1                                 | 2.5±0.5 |

При внедрении оксалиплатина и комплекса Pt(IV) с лигандом на основе лонидамина в наночастицы уровень цитотоксического действия препаратов остался в той же области низких микромолярных концентраций. Этот факт, с учетом возможного неполного высвобождения комплексов платины из наночастиц, указывает на сохранение антипролиферативной активности препаратов в наносомальной форме в сравнении со свободной. Исходя из значений  $IC_{50}$  можно сказать, что с возрастанием количества лучей в используемых блок-сополимерах с 3-х до 6-ти наблюдается небольшое увеличение избирательности действия наносомальных форм к раковым клеткам, по сравнению с нераковой клеточной линией WI38. Исследование антипролиферативной активности наночастиц на основе 6s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>, содержащих комбинацию оксалиплатина и 5-фторурацила в соотношении 1:5, показало меньшие значения  $IC_{50}$  в сравнении со свободной формой этих препаратов, взятых в идентичном соотношении (Таблица 3.13). Наблюдаемое повышение цитотоксических свойств наносомальной формы можно объяснить более эффективным проникновением гидрофильного 5-фторурацила в составе наночастиц через липидные мембраны человеческих клеток.

Эффективность интернализации и внутриклеточная локализация наночастиц были исследованы с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для этого флуоресцентно-меченые наночастицы на основе 6s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>, содержащие флуоресцеин изотиоцианат в количестве 4 масс.% инкубировали с раковыми клетками аденокарциномы молочной железы человека линии MCF7 в течение фиксированного времени. Ядра исследуемых клеток были

окрашены красителем DAPI, обладающим флуоресценцией в синей области спектра. Из представленных ортогональных проекций (Рисунок 3.55) видно, что уже спустя один час инкубирования интенсивная зеленая флуоресценция, относящаяся к флуоресцентно-меченым наночастицам, наблюдается внутри клетки в виде равномерного распределения в области цитоплазмы. Быстрый темп проникновения наночастиц через клеточную мембрану и их эффективное накопление может способствовать преимущественному высвобождению активных компонентов непосредственно в раковых клетках даже в случае отсутствия эффекта пролонгированного высвобождения. Дальнейшее увеличение времени инкубации привело к существенному возрастанию количества наночастиц проникших внутрь или находящихся в области ядер клеток. Наблюдаемая способность у исследуемых наночастиц эффективно накапливаться в раковых клетках, даже в отсутствие специфического механизма проникновения, может существенно повысить уровень терапии в целом. В частности, накопление наночастиц в области ядра может быть особенно актуально для доставки препаратов на основе координационных соединений платины, чей механизм действия заключается в нарушении процесса репликации ДНК.

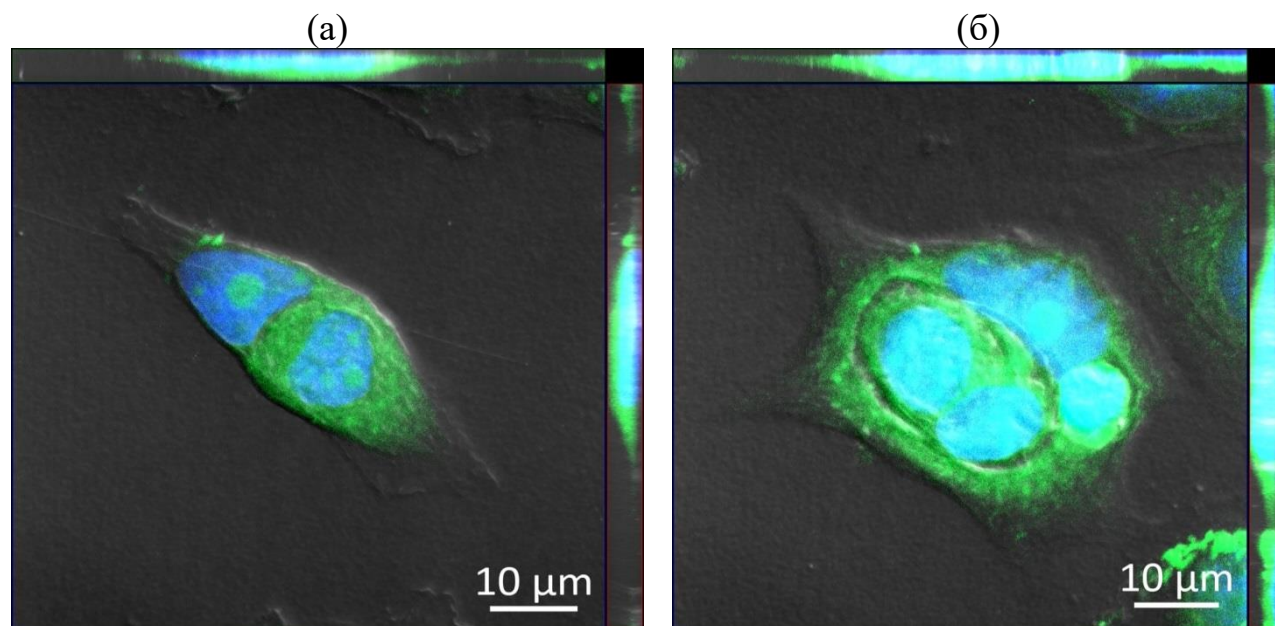


Рисунок 3.55 – Ортогональная проекция клеток MCF7 после инкубации с наночастицами на основе 6s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> содержащих флуоресцеин в течение 1 (а) и 4 (б) часов

### 3.2.5 Сравнение эффективности действия и биораспределения оксалиплатина в свободной и наносомальной форме в эксперименте *in vivo*

Для изучения противоопухолевой эффективности и биораспределения разработанной наносомальной лекарственной формы оксалиплатина в сравнении со свободным препаратом было проведено исследование на животных, т.к. только модель *in vivo* может дать полную и объективную информацию о наличии преимуществ в лечении наносомальной формой. Поскольку наночастицы на основе 6-ти лучевого блок-сополимера PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> продемонстрировали наибольшую эффективность, как в отношении солубилизации оксалиплатина, так и в испытаниях *in vitro*, именно они были выбраны для участия в исследовании на животных. Содержание оксалиплатина в наночастицах составило 4.2 масс.%.

В первую очередь при изучении противоопухолевой активности препаратов определяют динамику роста опухоли в различных группах. Объем опухоли мышей (*V*) определяли неинвазивным способом, вычисляя его по измеряемым параметрам, таким как длина (*L*) и ширина (*W*) (Формула 3.13).

$$V = \frac{L \times W^2}{2} \quad (3.13)$$

На Рисунке 3.56 представлена диаграмма изменения среднего объема опухоли мышей на сроках от 15 до 37 дня после инокуляции раковых клеток. На всем протяжении эксперимента в группе, получавшей лечение в виде наночастиц содержащих оксалиплатин, опухоль оказалась значительно меньше по сравнению с группой свободного оксалиплатина и контроля. К 37-м суткам в группе со свободным оксалиплатином число мышей сократилось из-за высокой смертности до количества недостаточного для статистического анализа данных.

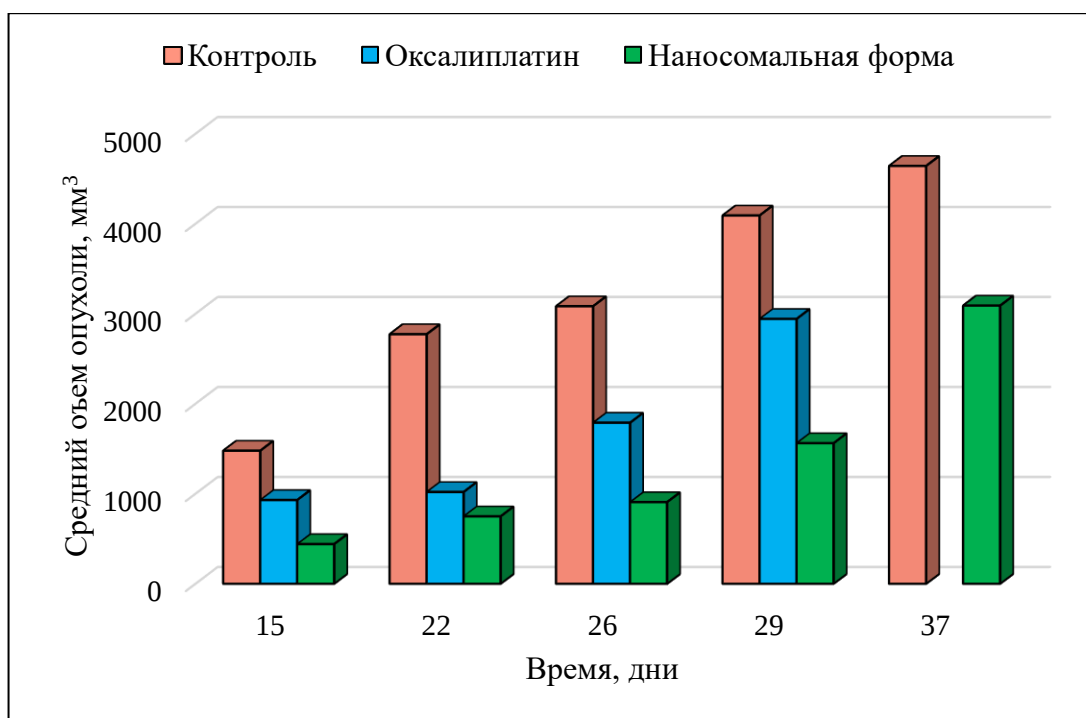


Рисунок 3.56 – Диаграмма изменения среднего объема опухоли у мышей в группе контроля и группах, получавших лечение в виде свободного оксалиплатина и его наносомальной формы на основе звездообразного блок-сополимера 6s-PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>

Для количественной оценки эффективности лечения наносомальной формой препарата по сравнению со свободным оксалиплатином был произведен расчет индекса торможения роста опухоли (ТРО) по Формуле 3.14. В соответствии с руководствами по доклиническим исследованиям значимой является разница в ТРО от 30% и выше. Такой уровень эффекта наблюдался для разработанной наносомальной формы на основе звездообразного 6-ти лучевого блок-сополимера PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub> на всем протяжении исследования за исключением 22-го дня (Рисунок 3.57). Максимальная эффективность при этом отмечается на 29-й день и составляет 34%.

$$\text{ТРО} = \frac{V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}}{V_{\text{контроль}}} \times 100\% \quad (3.14)$$

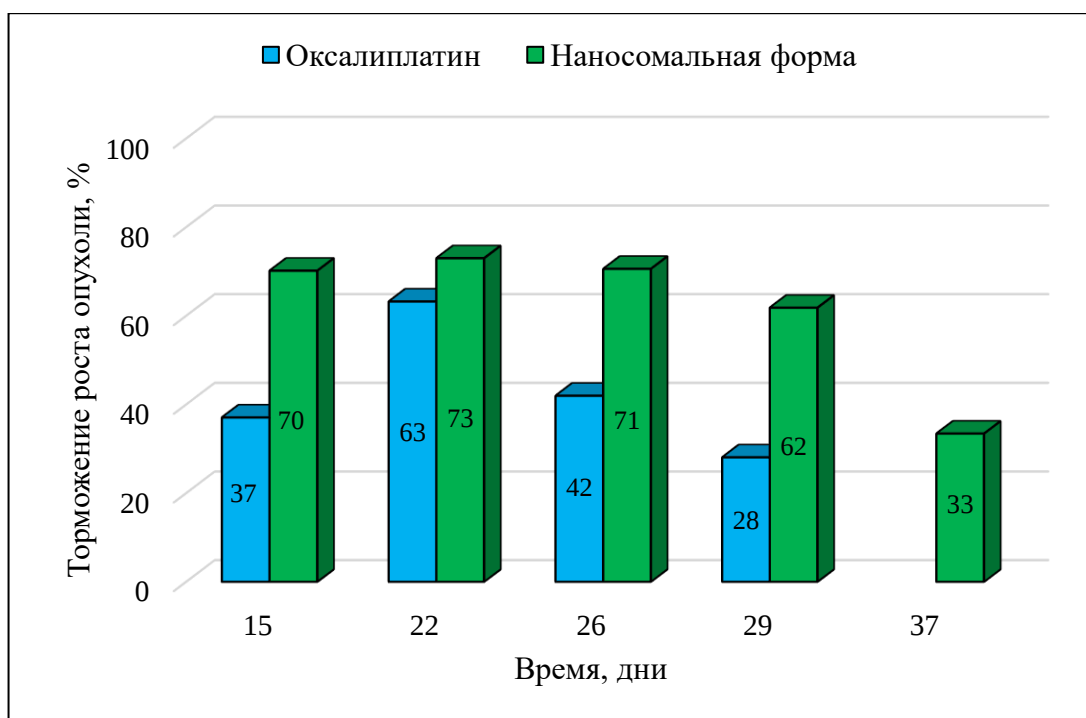


Рисунок 3.57 – Индекс торможения роста опухоли у мышей в группах, получавших лечение в виде свободного оксалиплатина и его наносомальной формы на основе звездообразного блок-сополимера

Клинический осмотр мышей показал, что у животных в группе свободного препарата на всем протяжении эксперимента наблюдалось обезвоживание, сопутствующее неактивное поведение и слабая реакция на внешние раздражители, что указывает на высокий уровень токсичности оксалиплатина. Кроме того, у мышей в этой группе после первой инъекции было зафиксировано появление местной реакции на кожном покрове в области введения препарата, чего у группы с наночастицами обнаружено не было. Интенсивное токсическое воздействие свободного оксалиплатина на весь организм отразилось на средней (СПЖ) и удельной (УПЖ) продолжительности жизни мышей (Формула 3.15, Таблица 3.14). В среднем животные из группы свободного оксалиплатина погибали раньше на 5 дней по сравнению с группой контроля. В тоже время УПЖ группы, которая получала инъекции наносомальной формы, выросла на 21.9%, что свидетельствует о положительной динамике противораковой терапии.

$$\text{УПЖ} = \frac{\text{СПЖ}_{\text{опыт}} - \text{СПЖ}_{\text{контроль}}}{\text{СПЖ}_{\text{контроль}}} \times 100\% \quad (3.15)$$

Таблица 3.14 – Средняя и удельная продолжительности жизни животных в различных группах

|          | Контроль | Оксалиплатин | Наносомальная форма |
|----------|----------|--------------|---------------------|
| СПЖ, дни | 30.6     | 25.5         | 37.3                |
| УПЖ, %   | -        | -16.7        | +21.9               |

Исследование биораспределения оксалиплатина по органам проводили через 1, 4 и 24 ч после однократной инъекции двух соответствующих лекарственных форм. По истечении этого времени животных эвтаназировали методом цервикальной дислокации с последующей изоляцией, заморозкой и лиофилизацией органов. В каждой группе участвовали по 9 мышей, по три особи на временную точку соответственно. Содержание платины определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Из представленных диаграмм видно, что для свободной формы оксалиплатина более характерным является почечный клиренс, а для наносомальной формы – печеночный (Рисунок 3.58). В группе мышей с наносомальной формой в течение 24 часов наблюдается практически полное отсутствие накопления препарата в мозге ( $<0.07$  масс.%) и сердце ( $<0.2$  масс. %) в отличие от свободной формы оксалиплатина. Накопление препарата в селезенке, легких и почках относительно введенного оказалось также существенно ниже у группы с наносомальной формой. Обнаруженные закономерности в биораспределении могут являться причиной увеличения средней продолжительности жизни мышей в группе с наносомальной формой препарата. Что касается накопления препарата в опухоли, то у группы животных с наносомальной формой максимум этого значения пришелся на первый час и составил  $6.56 \pm 0.35$  масс.%, а у группы со свободной формой оксалиплатина максимальное значение  $4.23 \pm 0.26$  масс.% было достигнуто к 24 часам. Наблюдаемые изменения тенденции накопления препарата в случае свободной формы оксалиплатина могут вносить непредсказуемых характер в план фармакологического лечения, однако стоит отметить, что для большего понимания процесса биораспределения требуется проведение дополнительных исследований в более широком временном интервале.

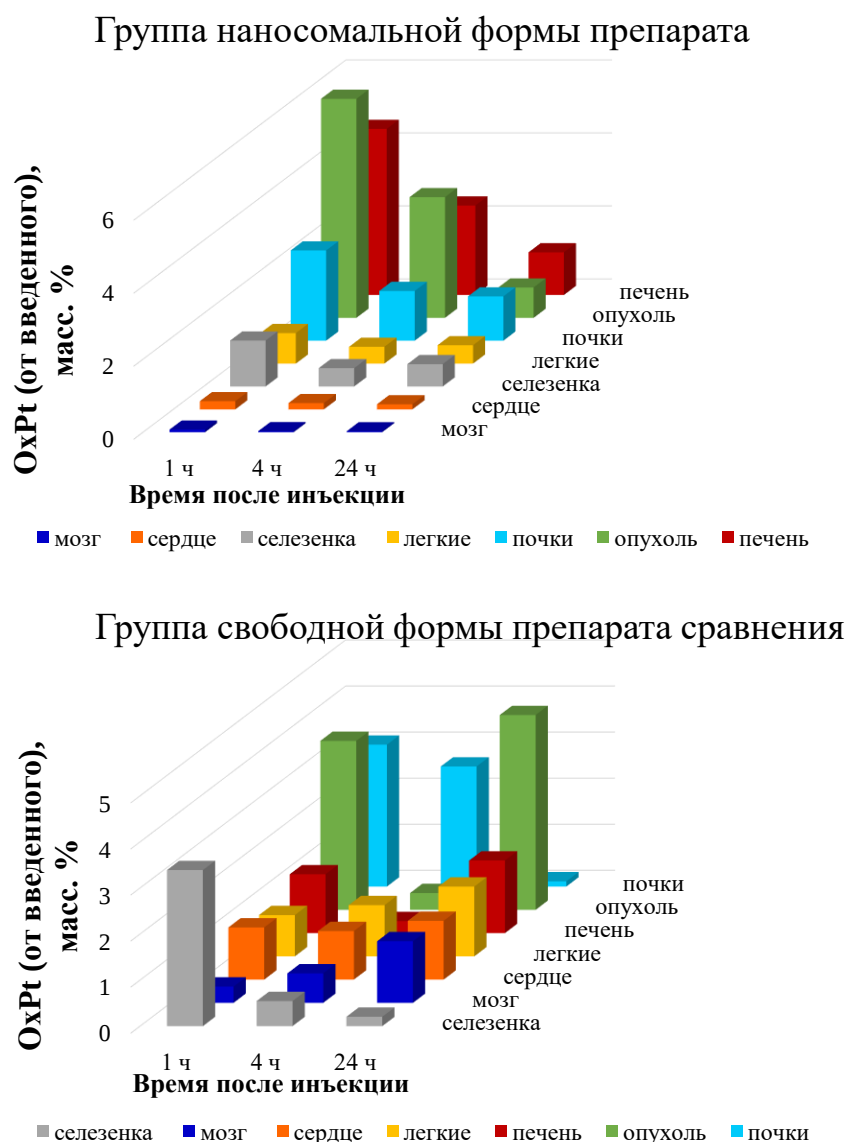


Рисунок 3.58 – *Ex vivo* биораспределение оксалиплатина в свободной и наносомальной форме

В результате можно сделать вывод, что солюбилизация оксалиплатина в наночастицы на основе звездообразного блок-сополимера поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль может способствовать снижению общего уровня токсического действия препарата на организм наряду с увеличением эффективности его действия по отношению к развивающимся раковым клеткам. Так, на разных этапах лечения торможение роста опухоли протекало эффективнее от 10 до 34% относительно препарата сравнения, а удельная продолжительность жизни животных увеличилась на 21% по сравнению с группой контроля.

## ВЫВОДЫ

1. В результате исследования кинетики полимеризации L- и D,L-лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов триметилпропана, пентаэритрита и дипентаэритрита при целевой степени полимеризации лучей  $n = 10, 25, 50$  и  $100$ , были определены эффективные константы скорости реакции, показано, что полимеризация имеет «псевдоживой» характер и подчиняется уравнению первого порядка по мономеру. Установлено влияние структуры со-инициатора на кинетику полимеризации и скорость инициирования функциональных групп.
2. Комплексом методов (ЯМР, ГПХ, МАЛДИ) показано, что в оптимальных условиях была синтезирована серия звездообразных PLLA<sub>n</sub> и PDLLA<sub>n</sub> с молекулярной массой от 2 до 44 кДа, числом лучей  $f = 3, 4$  и  $6$  и минимальным содержанием побочных неразветвленных продуктов. По мере увеличения  $f$  коэффициент ветвления  $g'$  уменьшается с  $0.89$  до  $0.46$ , что подтверждает формирования заданной разветвленной структуры.
3. Методами рентгеновской дифракции и ДСК показано, что увеличение степени ветвления при аналогичной молекулярной массе лучей может приводить к затруднению процесса кристаллизации цепей и увеличению температуры стеклования звездообразных полилактидов. При  $n = 10$  и  $25$  разница в температуре стеклования 3-х и 6-ти лучевых образцов может достигать  $11\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В зависимости от состава и строения поли-D,L- и L-лактидов их  $T_g$  варьируется в пределах от  $32$  до  $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а  $T_m$  последних от  $102$  до  $164\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
4. Установлено, что гидролитическая деградация 3-х и 6-ти лучевых PLLA<sub>n</sub> и PDLLA<sub>n</sub> ( $n = 25$  и  $100$ ) протекает в соответствии с объемным механизмом и сопровождается формированием мультимодального молекулярно-массового распределения. Показано, что в исследуемом диапазоне молекулярных масс регулирование параметров макромолекул и природы концевых групп (ОН или COOH) позволяет варьировать срок деградации материалов от 1.5 месяцев до 2 лет.

5. Для получения наночастиц была проведена модификация звездообразных PLLA<sub>n</sub> (n от 10 до 50) гидрофильным полиэтиленгликолем с молекулярной массой 2 кДа. Анализ водных дисперсий наночастиц на основе синтезированных блок-сополимеров показал, что число лучей в исходных макромолекулах в большей степени оказывает влияние не на размер образующихся наночастиц, а на их агрегативную устойчивость. Методом МУРР установлено, что радиус инерции наночастиц увеличивается с 4 до 11 нм по мере возрастания средней степени полимеризации гидрофобного блока.
6. Продемонстрировано, что наночастицы на основе звездообразных блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль являются биосовместимыми и способны с высокой эффективностью накапливаться в раковых клетках, солюбилизировать противоопухолевые препараты из группы координационных соединений платины до 4 масс.% и 5-фторурацил до 15 масс.%, что делает их перспективными носителями для адресной доставки лекарственных средств.
7. В эксперименте *in vivo* было показано, что относительно препарата сравнения разработанная наносомальная форма оксалиплатина, на основе 6-ти лучевого блок-сополимера PLLA<sub>10</sub>-MPEG<sub>45</sub>, способна на 34% эффективнее замедлять рост опухоли, повышает удельную продолжительность жизни животных и демонстрирует улучшенный профиль биораспределения.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, к.ф. -м.н. Седушу Никите Геннадьевичу, за его профессионализм, отзывчивость, переданные знания в области химии и физики полимеров, внимание к деталям, а также помощь и поддержку, оказываемую в ходе всего исследования и подготовки диссертации. Кулебякиной Алевтине Игоревне за ценные советы и значительный вклад, внесенный на стадии обсуждения результатов работы и процесса написания диссертации. Бузину Александру Игоревичу и Дмитрякову Петру Владимировичу за исследование образцов методами ДСК и ТГА. Кузнецовой Екатерине Владимировне за интерпретацию результатов МУРР. Малахову Сергею Николаевичу за анализ полимеров методом ИК-спектроскопии. Бакирову Артему Вадимовичу за помощь в обработке результатов и проведение исследований методом рентгеновской дифракции. Борисову Роману Сергеевичу за анализ полимеров методом масс-спектрометрии МАЛДИ. Гомзяку Виталию Ивановичу за вклад в развитие навыков работы в области полимерной химии. Назарову Алексею Анатольевичу за синтез и предоставление противоопухолевых комплексов платины. Посыпановой Галине Ароновне, Шуватовой Валентине Георгиевне и Крашенинниковой Анне Андреевне за проведение исследований *in vitro* и *in vivo* наносомальных форм препаратов.

Отдельную благодарность автор выражает всему коллективу лаборатории функциональных полимерных структур ИСПМ РАН и лаборатории полимерных материалов НИЦ КИ за дружескую атмосферу и плодотворную работу. Своей семье и друзьям за проявленную поддержку и веру.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- AAP – путь активации спирта
- ATRP – радикальная полимеризация с переносом атома
- CT26 – клетки карциномы кишечника мыши
- DAPI – 4',6-диамидин-2-фенилиндолом
- DBU – 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен
- DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид
- DMAP – 4-(диметиламино)пиридин
- DPTOL – 2,2'-(оксибис(метилен))бис(2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол
- FDA - управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарств
- HTC116 – клетки линии аденокарциномы толстой кишки человека
- MALS – многоголовое светорассеяния
- MCF7 – клетки аденокарциномы молочной железы человека
- MPEG – метиловый эфир полиэтиленгликоля
- MTBD - *N*-метил-1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ен
- MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид
- NAP – путь нуклеофильной активации
- OROP – органокатализируемая полимеризация с раскрытием цикла
- PCL – поли-ε-капролактон
- PDI – индекс полидисперсности
- PDLA – поли-D-лактид
- PDLLA – поли-D,L-лактид
- PEG – полиэтиленгликоль
- PLA - полилактид
- PLLA – поли-L-лактид
- PTOL – 2,2-бис(гидроксиметил)пропан-1,3-диол
- RAFT – радикальная полимеризация с обратимой передачей цепи
- RDRP - радикальной полимеризации с обратимой дезактивацией
- RI - рефрактометр

ROP – полимеризация с раскрытием цикла  
TBD – 1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дец-5-ен  
TEA – триэтиламин  
TMP – 2-этил-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол  
WI38 – клетки фибробластов легкого эмбриона человека  
ГПХ – гель-проникающая хроматография  
ДСК – дифференциально-сканирующая калориметрия  
ИК – инфракрасная  
ЛС – лекарственное средство  
МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация  
МК – молочная кислота  
ММ – молекулярная масса  
ММР – молекулярно-массовое распределение  
МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние  
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия  
СПЖ – средняя продолжительность жизни  
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия  
ТГА – термогравиметрический анализ  
ТРО – торможение роста опухоли  
УПЖ – удельная продолжительность жизни  
УФ – ультрафиолетовая  
ЯМР – ядерный магнитный резонанс  
5-Fu – 5-фторурацил  
SnOct<sub>2</sub> – 2-этилгексаноат, октаноат олова

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Geyer, R. Production, use, and fate of all plastics ever made / R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Law // *Science Advances*. – 2017. – Vol. 3. – № 7. – P. 1-5.
2. The global threat from plastic pollution / M. MacLeod, H. P. H. Arp, M. B. Tekman, A. Jahnke // *Science*. – 2021. – Vol. 373. – № 6550. – P. 61-65.
3. Bartolo, A. Di. A Review of Bioplastics and Their Adoption in the Circular Economy / A. Di Bartolo, G. Infurna, N. T. Dintcheva // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – № 8. – P. 1229.
4. PLA bioplastic production: From monomer to the polymer / J. Yu, S. Xu, B. Liu [et al.] // *European Polymer Journal*. – 2023. – Vol. 193. – P. 112076.
5. Pohanka, M. D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection / M. Pohanka // *BioMed Research International*. – 2020. – Vol. 2020. – № 1. – P. 1-9.
6. Pretula, J. Polylactides—Methods of synthesis and characterization / J. Pretula, S. Slomkowski, S. Penczek // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 107. – P. 3-16.
7. Datta, R. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives / R. Datta // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1995. – Vol. 16. – № 2-3. – P. 221-231.
8. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes / P. Pal, J. Sikder, S. Roy, L. Giorno // *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. – 2009. – Vol. 48. – № 11-12. – P. 1549-1559.
9. Atom Economical Aqueous-Phase Conversion (APC) of Biopolyols to Lactic Acid, Glycols, and Linear Alcohols Using Supported Metal Catalysts / X. Jin, D. Roy, P. S. Thapa [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2013. – Vol. 1. – № 11. – P. 1453-1462.
10. Ahmed, J. Polylactides—Chemistry, Properties and Green Packaging Technology: A Review / J. Ahmed, S. K. Varshney // *International Journal of Food Properties*. – 2011. – Vol. 14. – № 1. – P. 37-58.
11. Jiménez, A. Poly(lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties,

Additives and Applications : Polymer Chemistry Series / eds. A. Jiménez, M. Peltzer, R. Ruseckaite. – Royal Society of Chemistry, 2014. – 353 p.

12. Moon, S. I. Melt polycondensation of L-lactic acid to poly(L -lactic acid) with Sn(II) catalysts combined with various metal alkoxides / S. I. Moon, Y. Kimura // *Polymer International*. – 2003. – Vol. 52. – № 2. – P. 299-303.

13. The basic properties of poly(lactic acid) produced by the direct condensation polymerization of lactic acid / M. Ajioka, K. Enomoto, K. Suzuki, A. Yamaguchi // *Journal of Environmental Polymer Degradation*. – 1995. – Vol. 3. – № 4. – P. 225-234.

14. Takenaka, M. Molecular weight increase driven by evolution of crystal structure in the process of solid-state polycondensation of poly(l-lactic acid) / M. Takenaka, Y. Kimura, H. Ohara // *Polymer*. – 2017. – Vol. 126. – P. 133-140.

15. Masutani, K. Chapter 1. PLA Synthesis. From the Monomer to the Polymer / K. Masutani, Y. Kimura // *Poly(lactic acid) Science and Technology. Processing, Properties, Additives and Applications* / ed. R. A. R. A. Jiménez, M.A. Peltzer. – 2014. – P. 1-36.

16. Dubois, P. Handbook of Ring-Opening Polymerization. / eds. P. Dubois, O. Coulembier, J. Raquez. – Wiley, 2009. – 418 p.

17. Star-shaped and branched polylactides: Synthesis, characterization, and properties / A. Michalski, M. Brzezinski, G. Lapienis, T. Biela // *Progress in Polymer Science*. – 2019. – Vol. 89. – P. 159-212.

18. Richard G. Jones. Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature, IUPAC Recommendations 2008 / eds. R. G. Jones, E. S. Wilks, W. V. Metanowski [et al.]. – Royal Society of Chemistry, 2009. – 443 p.

19. Star Polymers / J. M. Ren, T. G. McKenzie, Q. Fu [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2016. – Vol. 116. – № 12. – P. 6743-6836.

20. Gao, H. Synthesis of functional polymers with controlled architecture by CRP of monomers in the presence of cross-linkers: From stars to gels / H. Gao, K. Matyjaszewski // *Progress in Polymer Science*. – 2009. – Vol. 34. – № 4. – P. 317-350.

21. Spiniello, M. Synthesis and characterization of fluorescently labeled core cross-linked star polymers / M. Spiniello, A. Blencowe, G. G. Qiao // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2008. – Vol. 46. – № 7. – P. 2422-2432.

22. Star polymers composed entirely of amino acid building blocks: a route towards stereospecific, biodegradable and hierarchically functionalized stars / A. Sulistio, A. Widjaya, A. Blencowe [et al.] // *Chem. Commun.* – 2011. – Vol. 47. – № 4. – P. 1151-1153.
23. Hans R. Kricheldorf, R. D. Mechanism of the cationic polymerization of L,L-dilactide / R. D. Hans R. Kricheldorf // *Die Makromolekulare Chemie.* – 1986. – Vol. 187. – № 7. – P. 1611-1625.
24. Kricheldorf, H. R. Syntheses and application of polylactides / H. R. Kricheldorf // *Chemosphere.* – 2001. – Vol. 43. – № 1. – P. 49-54.
25. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones: Traditional Approaches and Alternative Strategies / J. Engel, A. Cordellier, L. Huang, S. Kara // *ChemCatChem.* – 2019. – Vol. 11. – № 20. – P. 4983-4997.
26. Uyama, H. Mechanistic Studies on the Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones / H. Uyama, S. Namekawa, S. Kobayash // *Polymer Journal.* – 1997. – Vol. 29. – № 3. – P. 299-301.
27. Chronological Review of the Catalytic Progress of Polylactic Acid Formation through Ring Opening Polymerization / S. Dubey, H. Abhyankar, V. Marchante [et al.] // *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry.* – 2016. – Vol. 12. – № 3. – P. 1-20.
28. Kricheldorf, H. R. Syntheses of polylactides by means of tin catalysts / H. R. Kricheldorf, S. M. Weidner // *Polymer Chemistry.* – 2022. – Vol. 13. – № 12. – P. 1618-1647.
29. Code of Federal Regulations-Title 21-Food and Drugs : официальный сайт. – USA. – Обновляется в течение суток. – URL: <https://www.ecfr.gov/current/title-21> (дата обращения: 11.02.2025). – Текст : электронный.
30. Ouhadi, T. Mechanism of  $\epsilon$ -Caprolactone polymerization by Aluminum Alkoxides / T. Ouhadi, C. Stevens, P. Teyssié // *Die Makromolekulare Chemie.* – 1975. – Vol. 1. – № S19751. – P. 191-201.
31. Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 4. Mechanism and kinetics of lactide homopolymerization by aluminum isopropoxide / P. Dubois, C. Jacobs,

- R. Jerome, P. Teyssie // *Macromolecules*. – 1991. – Vol. 24. – № 9. – P. 2266-2270.
32. Kricheldorf, H. R. Polylactones 3. Copolymerization of glycolide with L, L-lactide and other lactones / H. R. Kricheldorf, J. M. Jonté, M. Berl // *Die Makromolekulare Chemie*. – 1985. – Vol. 12. – № S19851. – P. 25-38.
33. Kricheldorf, H. R. Poly(lactones). 9. Polymerization mechanism of metal alkoxide initiated polymerizations of lactide and various lactones / H. R. Kricheldorf, M. Berl, N. Scharnagl // *Macromolecules*. – 1988. – Vol. 21. – № 2. – P. 286-293.
34. Schindler, A. Aliphatic polyesters. III. Molecular weight and molecular weight distribution in alcohol-initiated polymerizations of  $\epsilon$ -caprolactone / A. Schindler, Y. M. Hibionada, C. G. Pitt // *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*. – 1982. – Vol. 20. – № 2. – P. 319-326.
35. Mechanism of lactide polymerization in the presence of stannous octoate: The effect of hydroxy and carboxylic acid substances / X. Zhang, D. A. MacDonald, M. F. A. Goosen, K. B. McAuley // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 1994. – Vol. 32. – № 15. – P. 2965-2970.
36. Kricheldorf, H. R. Polylactones: 31. Sn(II)octoate-initiated polymerization of L-lactide: a mechanistic study / H. R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, C. Boettcher // *Polymer*. – 1995. – Vol. 36. – № 6. – P. 1253-1259.
37. Kowalski, A. Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(II) octoate, 1. Polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone / A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek // *Macromolecular Rapid Communications*. – 1998. – Vol. 19. – № 11. – P. 567-572.
38. Kowalski, A. Kinetics and Mechanism of Cyclic Esters Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. 3. Polymerization of L,L-Dilactide / A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek // *Macromolecules*. – 2000. – Vol. 33. – № 20. – P. 7359-7370.
39. Kricheldorf, H. R. Polylactones 48. SnOct<sub>2</sub>-Initiated Polymerizations of Lactide: A Mechanistic Study / H. R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, A. Stricker // *Macromolecules*. – 2000. – Vol. 33. – № 3. – P. 702-709.
40. Kowalski, A. Mechanism of Cyclic Ester Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. 2. Macromolecules Fitted with Tin(II) Alkoxide Species Observed Directly in

MALDI-TOF Spectra / A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek // *Macromolecules*. – 2000. – Vol. 33. – № 3. – P. 689-695.

41. Kricheldorf, H. R. High molar mass cyclic poly(L-lactide) obtained by means of neat tin(II) 2-ethylhexanoate / H. R. Kricheldorf, S. M. Weidner // *Polymer Chemistry*. – 2020. – Vol. 11. – № 32. – P. 5249-5260.

42. Bruin, A. P. Design and synthesis of biodegradable poly(ester-urethane) elastomer networks composed of non-toxic building blocks / A. P. Bruin, G. J. Veenstra, A. J. Nijenhuis // *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*. – 1988. – Vol. 9. – № 8. – P. 589-594.

43. Rheology and Crystallization of Long-Chain Branched Poly(L-lactide)s with Controlled Branch Length / L. Wang, X. Jing, H. Cheng [et al.] // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2012. – Vol. 51. – № 33. – P. 10731-10741.

44. Multi-arm star polymers of lactide obtained in melt in the presence of hyperbranched oligoglycerols / A. Kundys, A. Plichta, Z. Florjańczyk [et al.] // *Polymer International*. – 2016. – Vol. 65. – № 8. – P. 927-937.

45. Characterization of star-shaped poly(L-lactide)s by liquid chromatography at critical conditions / T. Biela, A. Duda, K. Rode, H. Pasch // *Polymer*. – 2003. – Vol. 44. – № 6. – P. 1851-1860.

46. Wang, L. Synthesis, crystallization kinetics, and spherulitic growth of linear and star-shaped poly(L-lactide)s with different numbers of arms / L. Wang, C.-M. Dong // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2006. – Vol. 44. – № 7. – P. 2226-2236.

47. Multifunctional initiation of lactide polymerization by stannous octoate/pentaerythritol / S. H. Kim, Y. Han, Y. Ha [et al.] // *Die Makromolekulare Chemie*. – 1992. – Vol. 193. – № 7. – P. 1623-1631.

48. Tsuji, H. Hydrolytic degradation and crystallization behavior of linear 2-armed and star-shaped 4-armed poly(L-lactide)s: Effects of branching architecture and crystallinity / H. Tsuji, T. Hayashi // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2015. – Vol. 132. – № 20. – P. 1-13.

49. Heparin-conjugated star-shaped PLA for improved biocompatibility / D. H. Go,

- Y. K. Joung, S. Y. Park [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2008. – Vol. 86A. – № 3. – P. 842-848.
50. Strong Electroactive Biodegradable Shape Memory Polymer Networks Based on Star-Shaped Polylactide and Aniline Trimer for Bone Tissue Engineering / M. Xie, L. Wang, J. Ge [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2015. – Vol. 7. – № 12. – P. 6772-6781.
51. Baimark, Y. Biodegradable Linear/Star-shaped Poly(L-lactide) Blends Prepared by Single Step Ring-opening Polymerization / Y. Baimark, Y. Srisuwan // *Journal of Applied Sciences*. – 2012. – Vol. 12. – № 13. – P. 1364-1370.
52. Investigation of Poly(lactide) Stereocomplexes: 3-Armed Poly(L-lactide) Blended with Linear and 3-Armed Enantiomers / J. Shao, J. Sun, X. Bian [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2012. – Vol. 116. – № 33. – P. 9983-9991.
53. Modified PLA Homochiral Crystallites Facilitated by the Confinement of PLA Stereocomplexes / J. Shao, J. Sun, X. Bian [et al.] // *Macromolecules*. – 2013. – Vol. 46. – № 17. – P. 6963-6971.
54. Inkinen, S. Effect of blending ratio and oligomer structure on the thermal transitions of stereocomplexes consisting of a D-lactic acid oligomer and poly(L-lactide) / S. Inkinen, M. Stolt, A. Södergard // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2011. – Vol. 22. – № 12. – P. 1658-1664.
55. Biela, T. Enhanced Melt Stability of Star-Shaped Stereocomplexes As Compared with Linear Stereocomplexes / T. Biela, A. Duda, S. Penczek // *Macromolecules*. – 2006. – Vol. 39. – № 11. – P. 3710-3713.
56. Jing, Z. Rheology and crystallization behavior of asymmetric PLLA/PDLA blends based on linear PLLA and PDLA with different structures / Z. Jing, X. Shi, G. Zhang // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2016. – Vol. 27. – № 8. – P. 1108-1120.
57. Melchels, F. P. W. A poly(D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography / F. P. W. Melchels, J. Feijen, D. W. Grijpma // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – № 23-24. – P. 3801-3809.
58. The Effect of Branching (Star Architecture) on poly(D,L-lactide) (PDLLA) Degradation and Drug Delivery / J. Burke, R. Donno, R. D'Arcy [et al.] //

Biomacromolecules. – 2017. – Vol. 18. – № 3. – P. 728-739.

59. Moravek, S. J. Polymerization kinetics of rac-lactide initiated with alcohol/stannous octoate using in situ attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy: An initiator study / S. J. Moravek, J. M. Messman, R. F. Storey // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2009. – Vol. 47. – № 3. – P. 797-803.

60. Fabrication of Polylactide-Based Biodegradable Thermoset Scaffolds for Tissue Engineering Applications / R. Sakai, B. John, M. Okamoto [et al.] // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2013. – Vol. 298. – № 1. – P. 45-52.

61. Korhonen, H. Synthesis of polylactides in the presence of co-initiators with different numbers of hydroxyl groups / H. Korhonen, A. Helminen, J. V. Seppälä // *Polymer*. – 2001. – Vol. 42. – № 18. – P. 7541-7549.

62. Synthesis of biodegradable material poly(lactic acid-co-sorbitol) via direct melt polycondensation and its reaction mechanism / S.-H. Luo, Q.-F. Wang, J.-F. Xiong, Z.-Y. Wang // *Journal of Polymer Research*. – 2012. – Vol. 19. – № 9. – P. 9962.

63. Witzke, D. R. Reversible Kinetics and Thermodynamics of the Homopolymerization of l-Lactide with 2-Ethylhexanoic Acid Tin(II) Salt / D. R. Witzke, R. Narayan, J. J. Kolstad // *Macromolecules*. – 1997. – Vol. 30. – № 23. – P. 7075-7085.

64. Sedush, N. G. Kinetics and thermodynamics of l-lactide polymerization studied by differential scanning calorimetry / N. G. Sedush, S. N. Chvalun // *European Polymer Journal*. – 2015. – Vol. 62. – P. 198-203.

65. Weidner, S. M. The Role of Transesterification in SnOct2-Catalyzed Polymerizations of Lactides / S. M. Weidner, H. R. Kricheldorf // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2017. – Vol. 218. – № 3. – P. 1600331.

66. Synthesis of high molecular weight linear and branched polylactides: A comprehensive kinetic investigation / K. Karidi, T. Mantourlias, A. Seretis [et al.] // *European Polymer Journal*. – 2015. – Vol. 72. – P. 114-128.

67. Choochottiros, C. Effect of polycaprolactone-co-polylactide copolyesters' arms in enhancing optical transparent PLA toughness / C. Choochottiros // *Macromolecular Research*. – 2016. – Vol. 24. – № 9. – P. 838-846.

68. Minimizing the initial burst of octreotide acetate from glucose star PLGA microspheres prepared by the solvent evaporation method / A. Beig, R. Ackermann, Y. Wang [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 624. – P. 121842.
69. Cholic acid-functionalized nanoparticles of star-shaped PLGA-vitamin E TPGS copolymer for docetaxel delivery to cervical cancer / X. Zeng, W. Tao, L. Mei [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – № 25. – P. 6058-6067.
70. Docetaxel-loaded nanoparticles based on star-shaped mannitol-core PLGA-TPGS diblock copolymer for breast cancer therapy / W. Tao, X. Zeng, T. Liu [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9. – № 11. – P. 8910-8920.
71. Synthesis and characterization of well-defined random and block copolymers of  $\epsilon$ -caprolactone with L-lactide as an additive for toughening polylactide: Influence of the molecular architecture / M. D. Deokar, S. B. Idage, B. B. Idage, S. Sivaram // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2016. – Vol. 133. – № 14. – P. 1-12.
72. Odelius, K. Versatile and controlled synthesis of resorbable star-shaped polymers using a spirocyclic tin initiator-Reaction optimization and kinetics / K. Odelius, A. Finne, A.-C. Albertsson // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2006. – Vol. 44. – № 1. – P. 596-605.
73. Finne, A. Controlled Synthesis of Star-Shaped L-Lactide Polymers Using New Spirocyclic Tin Initiators / A. Finne, A.-C. Albertsson // *Biomacromolecules*. – 2002. – Vol. 3. – № 4. – P. 684-690.
74. Rubber toughened linear and star-shaped poly(d,l-lactide-co-glycolide): synthesis, properties and in vitro degradation / C. A. . Joziassse, H. Veenstra, M. D. . Topp [et al.] // *Polymer*. – 1998. – Vol. 39. – № 2. – P. 467-474.
75. Jahandideh, A. Star-shaped lactic acid based systems and their thermosetting resins; synthesis, characterization, potential opportunities and drawbacks / A. Jahandideh, K. Muthukumarappan // *European Polymer Journal*. – 2017. – Vol. 87. – P. 360-379.
76. Kricheldorf, H. R. Telechelic and Star-Shaped Poly(L-lactide)s by Means of Bismuth(III) Acetate as Initiator / H. R. Kricheldorf, H. Hachmann-Thiessen, G. Schwarz // *Biomacromolecules*. – 2004. – Vol. 5. – № 2. – P. 492-496.
77. Bio-safe synthesis of linear and branched PLLA / S. Malberg, D. Basalp, A. Finne-

- Wistrand, A.-C. Albertsson // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2010. – Vol. 48. – № 5. – P. 1214-1219.
78. Novel synthesis of biodegradable linear and star block copolymers based on  $\epsilon$ -caprolactone and lactides using potassium-based catalyst / Y. Lemmouchi, M. C. Perry, A. J. Amass [et al.] // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2008. – Vol. 46. – № 16. – P. 5363-5370.
79. Shaver, M. P. Tacticity Control in the Synthesis of Poly(lactic acid) Polymer Stars with Dipentaerythritol Cores / M. P. Shaver, D. J. A. Cameron // *Biomacromolecules*. – 2010. – Vol. 11. – № 12. – P. 3673-3679.
80. Facile Synthesis of Hydroxyl-Ended, Highly Stereoregular, Star-Shaped Poly(lactide) from Immortal ROP of rac -Lactide and Kinetics Study / W. Zhao, D. Cui, X. Liu, X. Chen // *Macromolecules*. – 2010. – Vol. 43. – № 16. – P. 6678-6684.
81. New Paradigms for Organic Catalysts: The First Organocatalytic Living Polymerization / F. Nederberg, E. F. Connor, M. Möller [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2001. – Vol. 40. – № 14. – P. 2712-2715.
82. Amidine-Mediated Zwitterionic Polymerization of Lactide / H. A. Brown, A. G. De Crisci, J. L. Hedrick, R. M. Waymouth // *ACS Macro Letters*. – 2012. – Vol. 1. – № 9. – P. 1113-1115.
83. Guanidine and Amidine Organocatalysts for Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters / B. G. G. Lohmeijer, R. C. Pratt, F. Leibfarth [et al.] // *Macromolecules*. – 2006. – Vol. 39. – № 25. – P. 8574-8583.
84. Sherck, N. J. Elucidating a Unified Mechanistic Scheme for the DBU-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactide to Poly(lactic acid) / N. J. Sherck, H. C. Kim, Y. Y. Won // *Macromolecules*. – 2016. – Vol. 49. – № 13. – P. 4699-4713.
85. Thomas, C. Hydrogen-bonding organocatalysts for ring-opening polymerization / C. Thomas, B. Bibal // *Green Chem.* – 2014. – Vol. 16. – № 4. – P. 1687-1699.
86. Johnson, R. M. Metalloinitiation Routes to Biocompatible Poly(lactic acid) and Poly(acrylic acid) Stars with Luminescent Ruthenium Tris(bipyridine) Cores / R. M. Johnson, C. L. Fraser // *Biomacromolecules*. – 2004. – Vol. 5. – № 2. – P. 580-588.
87. Dove, A. Organic Catalysis for Polymerisation : Polymer Chemistry Series / eds.

- A. Dove, H. Sardon, S. Naumann. – The Royal Society of Chemistry, 2018. – 668 p.
88. Role of self-assembly conditions and amphiphilic balance on nanoparticle formation of PEG-PDLLA copolymers in aqueous environments / H. Phan, R. I. Minut, P. McCrorie [et al.] // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2019. – Vol. 57. – № 17. – P. 1801-1810.
  89. Versatile Preparation of Branched Polylactides by Low-Temperature, Organocatalytic Ring-Opening Polymerization in N-Methylpyrrolidone and Their Surface Degradation Behavior / G. Scoconi, N. Francini, V. Paradiso [et al.] // *Macromolecules*. – 2021. – Vol. 54. – № 20. – P. 9482-9495.
  90. Deokar, M. D. Toughening Poly(L-lactide) Blends: Effectiveness of Sequence-Controlled Six-Arm Star-Branched Block Copolymers of Poly(L-lactide) and Poly( $\epsilon$ -caprolactone) / M. D. Deokar, B. Garnaik, S. Sivaram // *ACS Omega*. – 2022. – Vol. 7. – № 11. – P. 9118-9129.
  91. Wang, J.-S. Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes / J.-S. Wang, K. Matyjaszewski // *Journal of the American Chemical Society*. – 1995. – Vol. 117. – № 20. – P. 5614-5615.
  92. Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization / M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura // *Macromolecules*. – 1995. – Vol. 28. – № 5. – P. 1721-1723.
  93. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization: From Mechanisms to Applications / K. Matyjaszewski // *Israel Journal of Chemistry*. – 2012. – Vol. 52. – № 3-4. – P. 206-220.
  94. Synthesis and Self-Assembly of AB<sub>n</sub> Miktoarm Star Polymers / M. W. Bates, S. M. Barbon, A. E. Levi [et al.] // *ACS Macro Letters*. – 2020. – Vol. 9. – № 3. – P. 396-403.
  95. ATRP of Methacrylic Derivative of Camptothecin Initiated with PLA toward Three-Arm Star Block Copolymer Conjugates with Favorable Drug Release / A. Plichta,

S. Kowalczyk, K. Kamiński [et al.] // *Macromolecules*. – 2017. – Vol. 50. – № 17. – P. 6439-6450.

96. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process / J. Chiefari, Y. K. (Bill) Chong, F. Ercole [et al.] // *Macromolecules*. – 1998. – Vol. 31. – № 16. – P. 5559-5562.

97. Vora, A. A new approach to 3-miktoarm star polymers using a combination of reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) and ring opening polymerization (ROP) via “Click” chemistry / A. Vora, K. Singh, D. C. Webster // *Polymer*. – 2009. – Vol. 50. – № 13. – P. 2768-2774.

98. Multi-Dimensional Self-Assembly of a Dual-Responsive ABC Miktoarm Star Terpolymer / F. Xu, D. Wu, Y. Huang [et al.] // *ACS Macro Letters*. – 2017. – Vol. 6. – № 4. – P. 426-430.

99. Synthesis and characterization of well-defined star-shaped poly(L-lactides) / A. A. Puchkov, N. G. Sedush, A. I. Buzin [et al.] // *Polymer*. – 2023. – Vol. 264. – P. 125573.

100. Weidner, S. M. Transesterification in Alcohol-Initiated ROPs of l- and *meso* - Lactide Catalyzed by Sn(II) and Sn(IV) Compounds at Low Temperatures / S. M. Weidner, H. R. Kricheldorf // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2018. – Vol. 219. – № 24. – P. 1-10.

101. Zimm, B. H. The Dimensions of Chain Molecules Containing Branches and Rings / B. H. Zimm, W. H. Stockmayer // *The Journal of Chemical Physics*. – 1949. – Vol. 17. – № 12. – P. 1301-1314.

102. Zimm, B. H. Dynamics of branched polymer molecules in dilute solution / B. H. Zimm, R. W. Kilb // *Journal of Polymer Science*. – 1959. – Vol. 37. – № 131. – P. 19-42.

103. Yu, L. Low-angle laser light scattering–aqueous size exclusion chromatography of polysaccharides: Molecular weight distribution and polymer branching determination / L. Yu, J. E. Rollings // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1987. – Vol. 33. – № 6. – P. 1909-1921.

104. Star-shaped poly(L-lactide)s with variable numbers of hydroxyl groups at polyester arms chain-ends and directly attached to the star-shaped core—Controlled synthesis and characterization / T. Biela, A. Duda, H. Pasch, K. Rode // *Journal of Polymer Science*

Part A: Polymer Chemistry. – 2005. – Vol. 43. – № 23. – P. 6116-6133.

105. New way to obtain the poly(L-lactide-co-D,L-lactide) blend filled with nanohydroxyapatite as biomaterial for 3D-printed bone-reconstruction implants / S. Targonska, M. Dobrzynska-Mizera, M. Wujczyk [et al.] // European Polymer Journal. – 2022. – Vol. 165. – P. 110997.

106. Akbarzadeh, R. Effects of processing parameters in thermally induced phase separation technique on porous architecture of scaffolds for bone tissue engineering / R. Akbarzadeh, A.-M. Yousefi // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2014. – Vol. 102. – № 6. – P. 1304-1315.

107. 3D printing of PLA composites scaffolds reinforced with keratin and chitosan: Effect of geometry and structure / L. E. Rojas-Martínez, C. G. Flores-Hernandez, L. M. López-Marín [et al.] // European Polymer Journal. – 2020. – Vol. 141. – P. 110088.

108. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications / B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – Vol. 107. – P. 163-175.

109. Nanoparticles from supramolecular polylactides overcome drug resistance of cancer cells / M. Brzeziński, S. Wedepohl, B. Kost, M. Calderón // European Polymer Journal. – 2018. – Vol. 109. – P. 117-123.

110. Polylactic acid nano- and microchamber arrays for encapsulation of small hydrophilic molecules featuring drug release via high intensity focused ultrasound / M. Gai, J. Frueh, T. Tao [et al.] // Nanoscale. – 2017. – Vol. 9. – № 21. – P. 7063-7070.

111. Patterned Drug-Eluting Coatings for Tracheal Stents Based on PLA, PLGA, and PCL for the Granulation Formation Reduction: In Vivo Studies / O. A. Sindeeva, E. S. Prikhodzhenko, I. Schurov [et al.] // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – № 9. – P. 1437.

112. Линейные и разветвленные полимеры лактида для систем направленной доставки лекарственных средств / В. И. Гомзяк, Н. Г. Седуш, А. А. Пучков [и др.] // Высокомолекулярные соединения Б. – 2021. – Т. 63. – № 3. – С. 190-206.

113. Star Telechelic Poly(l-lactide) Ionomers / A. Kulkarni, A. Lele, S. Sivaram [et al.] // Macromolecules. – 2015. – Vol. 48. – № 18. – P. 6580-6588.

114. Sakamoto, Y. Crystallization behavior and physical properties of linear 2-arm and

branched 4-arm poly(l-lactide)s: Effects of branching / Y. Sakamoto, H. Tsuji // *Polymer*. – 2013. – Vol. 54. – № 9. – P. 2422-2434.

115. Fox, T. G. Influence of molecular weight and degree of crosslinking on the specific volume and glass temperature of polymers / T. G. Fox, S. Loshaek // *Journal of Polymer Science*. – 1955. – Vol. 15. – № 80. – P. 371-390.

116. Flory, P. J. Thermodynamics of Crystallization in High Polymers. IV. A Theory of Crystalline States and Fusion in Polymers, Copolymers, and Their Mixtures with Diluents / P. J. Flory // *The Journal of Chemical Physics*. – 1949. – Vol. 17. – № 3. – P. 223-240.

117. Crystallization of Star-Shaped Poly(L-lactide)s with Arm Chains Aligned in the Same Direction in Two-Dimensional Crystals in a Langmuir Monolayer / S. Yamazaki, M. Harada, Y. Watanabe [et al.] // *Langmuir*. – 2023. – Vol. 39. – № 15. – P. 5486-5494.

118. Kim, E. S. Structural effect of linear and star-shaped poly(L-lactic acid) on physical properties / E. S. Kim, B. C. Kim, S. H. Kim // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 2004. – Vol. 42. – № 6. – P. 939-946.

119. Blown film extrusion of poly(lactic acid) without melt strength enhancers / S. S. Karkhanis, N. M. Stark, R. C. Sabo, L. M. Matuana // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2017. – Vol. 134. – № 34. – P. 1-10.

120. Corneillie, S. PLA architectures: the role of branching / S. Corneillie, M. Smet // *Polymer Chemistry*. – 2015. – Vol. 6. – № 6. – P. 850-867.

121. Stoiljkovich, D. Mechanism of the short chain branching in low density polyethylene / D. Stoiljkovich, S. Jovanovich // *Die Makromolekulare Chemie*. – 1981. – Vol. 182. – № 10. – P. 2811-2820.

122. Dorgan, J. R. Melt rheology of poly(lactic acid): Entanglement and chain architecture effects / J. R. Dorgan, J. S. Williams, D. N. Lewis // *Journal of Rheology*. – 1999. – Vol. 43. – № 5. – P. 1141-1155.

123. Nouri, S. Effect of chemical and physical branching on rheological behavior of polylactide / S. Nouri, C. Dubois, P. G. Lafleur // *Journal of Rheology*. – 2015. – Vol. 59. – № 4. – P. 1045-1063.

124. Dorgan, J. R. Thermal and rheological properties of commercial-grade poly(lactic acids)s / J. R. Dorgan, H. Lehermeier, M. Mang // *Journal of Polymers and the*

Environment. – 2000. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-9.

125. Scoponi, G. Production of Green Star/Linear PLA Blends by Extrusion and Injection Molding: Tailoring Rheological and Mechanical Performances of Conventional PLA / G. Scoponi, N. Francini, A. Athanassiou // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2021. – Vol. 306. – № 5. – P. 1-10.

126. Ro, A. J. Synthesis and thermal properties of telechelic poly(lactic acid) ionomers / A. J. Ro, S. J. Huang, R. A. Weiss // *Polymer*. – 2008. – Vol. 49. – № 2. – P. 422-431.

127. Dolog, R. Shape Memory Behavior of a Polyethylene-Based Carboxylate Ionomer / R. Dolog, R. A. Weiss // *Macromolecules*. – 2013. – Vol. 46. – № 19. – P. 7845-7852.

128. Larrañaga, A. A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters / A. Larrañaga, E. Lizundia // *European Polymer Journal*. – 2019. – Vol. 121. – P. 109296.

129. Zaaba, N. F. A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation / N. F. Zaaba, M. Jaafar // *Polymer Engineering & Science*. – 2020. – Vol. 60. – № 9. – P. 2061-2075.

130. Schmitt, E. A. Importance of distinct water environments in the hydrolysis of poly(DL-lactide-co-glycolide) / E. A. Schmitt, D. R. Flanagan, R. J. Linhardt // *Macromolecules*. – 1994. – Vol. 27. – № 3. – P. 743-748.

131. Branched Poly(lactide) Synthesized by Enzymatic Polymerization: Effects of Molecular Branches and Stereochemistry on Enzymatic Degradation and Alkaline Hydrolysis / K. Numata, R. K. Srivastava, A. Finne-Wistrand [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2007. – Vol. 8. – № 10. – P. 3115-3125.

132. Enzymatic Degradation of Monolayer for Poly(lactide) Revealed by Real-Time Atomic Force Microscopy: Effects of Stereochemical Structure, Molecular Weight, and Molecular Branches on Hydrolysis Rates / K. Numata, A. Finne-Wistrand, A.-C. Albertsson [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2008. – Vol. 9. – № 8. – P. 2180-2185.

133. Hydrolytic degradation of poly(D,L-lactide) as a function of end group: Carboxylic acid vs. hydroxyl / J. S. Wiggins, M. K. Hassan, K. A. Mauritz, R. F. Storey // *Polymer*. – 2006. – Vol. 47. – № 6. – P. 1960-1969.

134. Synthesis and degradation of end-group-functionalized polylactide / S.-H. Lee, S.

Hyun Kim, Y.-K. Han, Y. H. Kim // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2001. – Vol. 39. – № 7. – P. 973-985.

135. Gavas, S. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges / S. Gavas, S. Quazi, T. M. Karpiński // *Nanoscale Research Letters*. – 2021. – Vol. 16. – № 1. – P. 173.

136. Yu, M. Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles / M. Yu, J. Zheng // *ACS Nano*. – 2015. – Vol. 9. – № 7. – P. 6655-6674.

137. Maeda, H. The link between infection and cancer: Tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect / H. Maeda // *Cancer Science*. – 2013. – Vol. 104. – № 7. – P. 779-789.

138. Matsumura, Y. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. / Y. Matsumura, H. Maeda // *Cancer research*. – 1986. – Vol. 46. – № 12 Pt 1. – P. 6387-92.

139. Oda, T. Facilitated internalization of neocarzinostatin and its lipophilic polymer conjugate, SMANCS, into cytosol in acidic pH. / T. Oda, F. Sato, H. Maeda // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1987. – Vol. 79. – № 6. – P. 1205-11.

140. Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting / H. Kang, S. Rho, W. R. Stiles [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 8-15.

141. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size / H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno [et al.] // *Nature Nanotechnology*. – 2011. – Vol. 6. – № 12. – P. 815-823.

142. Renal clearance of quantum dots / H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2007. – Vol. 25. – № 10. – P. 1165-1170.

143. Xu, F. Thermosensitive t-PLA-b-PNIPAAm tri-armed star block copolymer nanoscale micelles for camptothecin drug release / F. Xu, S.-Z. Zheng, Y.-L. Luo // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2013. – Vol. 51. – № 20. – P. 4429-4439.

144. Amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrin-based star-like block copolymer unimolecular

micelles for facile in situ preparation of gold nanoparticles / N. Yao, W. Lin, X. Zhang [et al.] // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2016. – Vol. 54. – № 1. – P. 186-196.

145. Characterization, Stability and Biological Activity In Vitro of Cathelicidin-BF-30 Loaded 4-Arm Star-Shaped PEG-PLGA Microspheres / Y. Bao, S. Wang, H. Li [et al.] // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – № 2. – P. 497.

146. Amphiphilic Multi-Arm Block Copolymer Based on Hyperbranched Polyester, Poly(L-lactide) and Poly(ethylene glycol) as a Drug Delivery Carrier / M. Prabakaran, J. J. Grailer, S. Pilla [et al.] // *Macromolecular Bioscience*. – 2009. – Vol. 9. – № 5. – P. 515-524.

147. Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers as chemotherapeutic carrier / P. Jie, S. S. Venkatraman, F. Min [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2005. – Vol. 110. – № 1. – P. 20-33.

148. Self-assembled thermosensitive micelles based on poly(L-lactide-star block- *N* -isopropylacrylamide) for drug delivery / H. Wei, X. Zhang, W. Chen [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2007. – Vol. 83A. – № 4. – P. 980-989.

149. Multifunctional nanoplatform based on star-shaped copolymer for liver cancer targeting therapy / X. Gong, Y. Zheng, G. He [et al.] // *Drug Delivery*. – 2019. – Vol. 26. – № 1. – P. 595-603.

150. Synthesis and characterization of star poly( $\epsilon$ -caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) and poly(L-lactide)-b-poly(ethylene glycol) copolymers: Evaluation as drug delivery carriers / F. Wang, T. K. Bronich, A. V. Kabanov [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2008. – Vol. 19. – № 7. – P. 1423-1429.

151. Methotrexate-Loaded Four-Arm Star Amphiphilic Block Copolymer Elicits CD8 + T Cell Response against a Highly Aggressive and Metastatic Experimental Lymphoma / S. K. Hira, K. Ramesh, U. Gupta [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2015. – Vol. 7. – № 36. – P. 20021-20033.

152. Fluorescent supramolecular micelles for imaging-guided cancer therapy / M. Sun, W. Yin, X. Dong [et al.] // *Nanoscale*. – 2016. – Vol. 8. – № 9. – P. 5302-5312.

153. Controlled drug release system based on cyclodextrin-conjugated poly(lactic acid)-

- b-poly(ethylene glycol) micelles / Q. He, W. Wu, K. Xiu [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 443. – № 1-2. – P. 110-119.
154. Ibuprofen-loaded micelles based on star-shaped erythritol-core PLLA-PEG copolymer: effect of molecular weights of PEG / A. Ding, Y. Zhou, P. Chen, W. Nie // *Colloid and Polymer Science*. – 2017. – Vol. 295. – № 9. – P. 1609-1619.
155. Synthesis of Star Block, Thermosensitive Poly(L-lactide)-star block-poly(N-isopropylacrylamide-co-N-hydroxymethylacrylamide) Copolymers and Their Self-Assembled Micelles for Controlled Release / H. Wei, W.-Q. Chen, C. Chang [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2008. – Vol. 112. – № 8. – P. 2888-2894.
156. Synthesis of PLGA–mPEG star-like block copolymer to form micelle loaded magnetite as a nanocarrier for hydrophobic anticancer drug / M. Ashjari, F. Panahandeh, Z. Niazi, M. M. Abolhasani // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2020. – Vol. 56. – P. 101563.
157. Doxorubicin-loaded micelles based on multiarm star-shaped PLGA–PEG block copolymers: influence of arm numbers on drug delivery / G. Ma, C. Zhang, L. Zhang [et al.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2016. – Vol. 27. – № 1. – P. 1-15.
158. Nicolas, J. Drug-Initiated Synthesis of Polymer Prodrugs: Combining Simplicity and Efficacy in Drug Delivery / J. Nicolas // *Chemistry of Materials*. – 2016. – Vol. 28. – № 6. – P. 1591-1606.
159. Grem, J. L. Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyridamole / J. L. Grem, P. H. Fischer // *Pharmacology & Therapeutics*. – 1989. – Vol. 40. – № 3. – P. 349-371.
160. Failure of orally administered dipyridamole to enhance the antineoplastic activity of fluorouracil in combination with leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: a prospective randomized trial. / C. H. Köhne, W. Hiddemann, J. Schüller [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 1995. – Vol. 13. – № 5. – P. 1201-1208.
161. Star-Shaped Polylactide Dipyridamole Conjugated to 5-Fluorouracil and 4-Piperidinopiperidine Nanocarriers for Bioimaging and Dual Drug Delivery in Cancer Cells / D. Moorkoth, K. M. Nampoothiri, S. Nagarajan [et al.] // *ACS Applied Polymer*

Materials. – 2021. – Vol. 3. – № 2. – P. 737-756.

162. Recent advances in modified poly (lactic acid) as tissue engineering materials / S. Castañeda-Rodríguez, M. González-Torres, R. M. Ribas-Aparicio [et al.] // Journal of Biological Engineering. – 2023. – Vol. 17. – № 1. – P. 21.

163. Synthesis and electrospinning of star-shaped poly(L-lactide) with different arm lengths / A. A. Puchkov, T. K. Tenchurin, V. G. Mamagulashvili [et al.] // Journal of Physics: Conference Series. – 2019. – Vol. 1347. – № 1. – P. 012098.

164. Electrospun microstructured PLA-based scaffolds featuring relevant anisotropic, mechanical and degradation characteristics for soft tissue engineering / L. Gangolphe, C. Y. Leon-Valdivieso, B. Nottelet [et al.] // Materials Science and Engineering: C. – 2021. – Vol. 129. – P. 112339.

165. Massoumi, B. Biodegradable and conductive hyperbranched terpolymers based on aliphatic polyester, poly(D,L-lactide), and polyaniline used as scaffold in tissue engineering / B. Massoumi, R. Sarvari, S. Agbolaghi // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. – 2018. – Vol. 67. – № 13. – P. 808-821.

166. Kubisa, P. Star-shaped copolymers with PLA–PEG arms and their potential applications as biomedical materials / P. Kubisa, G. Lapienis, T. Biela // Polymers for Advanced Technologies. – 2021. – P. 1-10.

167. Stereocomplex Mediated Gelation of PEG-(PLA)<sub>2</sub> and PEG-(PLA)<sub>8</sub> Block Copolymers / C. Hiemstra, Z. Zhong, P. J. Dijkstra, J. Feijen // Macromolecular Symposia. – 2005. – Vol. 224. – № 1. – P. 119-132.

168. Buwalda, S. J. In situ forming stereocomplexed and post-photocrosslinked acrylated star poly(ethylene glycol)-poly(lactide) hydrogels / S. J. Buwalda, P. J. Dijkstra, J. Feijen // European Polymer Journal. – 2017. – Vol. 94. – P. 152-161.

169. Degradable Bioadhesives Based on Star PEG–PLA Hydrogels for Soft Tissue Applications / M. Grosjean, E. Girard, A. Bethry [et al.] // Biomacromolecules. – 2023. – Vol. 24. – № 10. – P. 4430-4443.

170. Enhancing the Cytotoxic Activity of Anticancer Pt IV Complexes by Introduction of Lonidamine as an Axial Ligand / Y. N. Nosova, L. S. Foteeva, I. V. Zenin [et al.] // European Journal of Inorganic Chemistry. – 2017. – Vol. 2017. – № 12. – P. 1785-1791.

171. Mankaev, B. N. Metal Complexes in the Synthesis of Biodegradable Polymers: Achievements and Prospects / B. N. Mankaev, S. S. Karlov // *Materials*. – 2023. – Vol. 16. – № 20. – P. 6682.
172. Aluminum and titanium complexes bearing 2,6-Bis(2-hydroxyphenyl)pyridines for ring-opening polymerization of lactide,  $\epsilon$ -caprolactone and their copolymerization: Effect of a ligand on coordination chemistry and reactivity / B. N. Mankaev, V. A. Serova, M. U. Agaeva [et al.] // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2024. – Vol. 1005. – P. 122973.
173. Gallium (III) Complexes Based on Aminobisphenolate Ligands: Extremely High Active ROP-Initiators from Well-Known and Easily Accessible Compounds / B. N. Mankaev, L. F. Hasanova, A. V. Churakov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 24. – P. 15649.
174. Kinetics of L-lactide bulk polymerization initiated with zirconium(IV) acetylacetonate studied by non-isothermal differential scanning calorimetry / K. T. Kalinin, D. R. Streltsov, P. V. Dmitryakov [et al.] // *Thermochimica Acta*. – 2024. – Vol. 742. – P. 179872.
175. Kinetics of D,L-Lactide Polymerization Initiated with Zirconium Acetylacetonate / K. T. Kalinin, N. G. Sedush, P. V. Dmitryakov, S. N. Chvalun // *ChemistryOpen*. – 2020. – Vol. 9. – № 10. – P. 1027-1032.
176. Полимеризация D,L-лактида в присутствии биосовместимого катализатора субсалицилата висмута / А. А. Атаманова, К. Т. Калинин, А. П. Плахов [и др.] // *Пластические массы*. – 2024. – № 11-12. – С. 3-5.
177. Исследование кинетики полимеризации L-лактида в присутствии  $Ti(Tbse)_2$  методом дифференциальной сканирующей калориметрии / С. С. Москвичев, П. В. Дмитриков, Н. Г. Седуш, С. Н. Чвалун // *Химическая физика*. – 2023. – Т. 42. – № 7. – С. 33-40.
178. Синтез биоразлагаемых полимеров на основе L-лактида в присутствии безметаллового органического катализатора / А. А. Пучков, Н. Г. Седуш, А. С. Чиркова [и др.] // *Высокомолекулярные Соединения Б*. – 2023. – Т. 65. – № 4. – С. 265-274.
179. Molar mass determination via linear regression from SEC measurements: The case

- of polylactide, polycaprolactone and poly(2,2-dimethylthrimethylene carbonate) / B. Kost, M. Socka, K. Cichoń [et al.] // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2024. – Vol. 35. – № 1. – P. 1-7.
180. Crystallization and Melting Behavior of Polylactides / J.-R. Sarasua, R. E. Prud'homme, M. Wisniewski [et al.] // *Macromolecules*. – 1998. – Vol. 31. – № 12. – P. 3895-3905.
181. Righetti, M. C. Amorphous Fractions of Poly(lactic acid) BT - Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid) / M. C. Righetti // eds. M. L. Di Lorenzo, R. Androsch. – Springer International Publishing, 2018. – P. 195-234.
182. Crystallization of star-shaped and linear poly(l-lactide)s / J. Bojda, E. Piorkowska, G. Lapienis, A. Michalski // *European Polymer Journal*. – 2018. – Vol. 105. – P. 126-134.
183. Lorenzo, M. L. Di. Influence of  $\alpha'$ -/ $\alpha$ -crystal polymorphism on properties of poly(L-lactic acid) / M. L. Di Lorenzo, R. Androsch // *Polymer International*. – 2019. – Vol. 68. – № 3. – P. 320-334.
184. Crystal Modifications and Thermal Behavior of Poly(L-lactic acid) Revealed by Infrared Spectroscopy / J. Zhang, Y. Duan, H. Sato [et al.] // *Macromolecules*. – 2005. – Vol. 38. – № 19. – P. 8012-8021.
185. Monodisperse Enantiomeric Lactic Acid Oligomers: Preparation, Characterization, and Stereocomplex Formation / S. J. de Jong, W. N. E. van Dijk-Wolthuis, J. J. Kettenes-van den Bosch [et al.] // *Macromolecules*. – 1998. – Vol. 31. – № 19. – P. 6397-6402.
186. Supramolecular aggregates of linear and star-shaped polylactides with different number of hydroxyl or carboxyl end-groups / A. Michalski, M. Brzeziński, P. Kubisa, T. Biela // *Reactive and Functional Polymers*. – 2018. – Vol. 128. – P. 67-73.
187. Zalipsky, S. Attachment of drugs to polyethylene glycols / S. Zalipsky, C. Gilon, A. Zilkha // *European Polymer Journal*. – 1983. – Vol. 19. – № 12. – P. 1177-1183.
188. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives / D. Shi, D. Beasock, A. Fessler [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2022. – Vol. 180. – P. 114079.
189. mPEG-PLA and PLA-PEG-PLA nanoparticles as new carriers for delivery of recombinant human Growth Hormone (rhGH) / R. Ghasemi, M. Abdollahi, E.

- Emamgholi Zadeh [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 9854.
190. Разуваева, Е. В. Влияние молекулярного строения амфифильных блоксополимеров лактида и оксида этилена на их самоорганизацию в разбавленных водных растворах : специальность 02.00.06 "Высокомолекулярные соединения" : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Разуваева Екатерина Владимировна. – М., 2019. – 167 с.
191. Detection Limits of DLS and UV-Vis Spectroscopy in Characterization of Polydisperse Nanoparticles Colloids / E. Tomaszewska, K. Soliwoda, K. Kadziola [et al.] // Journal of Nanomaterials. – 2013. – Vol. 2013. – № 1. – P. 1-10.
192. Наносомальные лекарственные формы на основе биоразлагаемых сополимеров лактида с различной молекулярной структурой и архитектурой / Н. Г. Седуш, Ю. А. Кадина, Е. В. Разуваева [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2021. – Т. 16. – № 4. – С. 462-481.
193. Effect of Composition and Molecular Structure of Poly(l-lactic acid)/Poly(ethylene oxide) Block Copolymers on Micellar Morphology in Aqueous Solution / E. V. Razuvaeva, A. I. Kulebyakina, D. R. Streltsov [et al.] // Langmuir. – 2018. – Vol. 34. – № 50. – P. 15470-15482.
194. Synthesis, micelle formation and bulk properties of poly(ethylene glycol)-b-poly(pentafluorostyrene)-g-polyhedral oligomeric silsesquioxane amphiphilic hybrid copolymers / H. Hussain, B. H. Tan, K. Y. Mya [et al.] // Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry. – 2010. – Vol. 48. – № 1. – P. 152-163.
195. Core–Shell Structure, Biodegradation, and Drug Release Behavior of Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Block Copolymer Micelles Tuned by Macromolecular Stereostructure / C. Ma, P. Pan, G. Shan [et al.] // Langmuir. – 2015. – Vol. 31. – № 4. – P. 1527-1536.
196. Svergun, D. I. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution / D. I. Svergun, M. H. J. Koch // Reports on Progress in Physics. – 2003. – Vol. 66. – № 10. – P. 1735-1782.
197. Физико-химические характеристики и антипролиферативная активность водорастворимой наносомальной формы комплекса Pt<sup>IV</sup> с лигандом на основе

лонидамина / А. А. Пучков, Н. Г. Седуш, А. А. Назаров, С. Н. Чвалун // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2024. – Т. 73. – № 1. – С. 213-220.