

На правах рукописи

Пучков Александр Анатольевич

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

1.4.7 – Высокомолекулярные соединения (химические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в лаборатории функциональных полимерных структур и лаборатории полимерных и композиционных материалов биомедицинского назначения (отдел биополимеров) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук (ИСПМ РАН)

Научный руководитель:	Седуш Никита Геннадьевич , кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией полимерных и композиционных материалов биомедицинского назначения ФГБУН ИСПМ РАН, г. Москва
Официальные оппоненты:	Карлов Сергей Сергеевич , доктор химических наук, профессор РАН, профессор кафедры органической химии химического факультета ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва
	Межуев Ярослав Олегович , доктор химических наук, доцент, заведующий кафедрой биоматериалов ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева, г. Москва
Ведущая организация:	Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», г. Москва

Защита состоится «19» июня 2025 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.116.01 (Д 002.085.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН по адресу: 117393, Москва, Профсоюзная улица, 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИСПМ РАН и на сайте института: <https://www.ispm.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 года.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.116.01 (Д 002.085.01)

доктор химических наук



Борщев О. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 матриц и систем доставки лекарств. Несмотря на широкое распространение, присущая PLA хрупкость, низкая ударная вязкость и прочность расплава может ограничивать его области 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. Большое 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, SnOct_2), систематических данных по синтезу и характеристике 3-х, 4-х и 6-ти лучевых

звездообразных PLA с молекулярной массой (ММ) 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 о 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 ММ 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 ММ, 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. Продемонстрирована 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. Продемонстрирована возможность органокатализируемого синтеза 3-х лучевого PLA с высокой степенью конверсии мономера и функциональных групп со-инициатора. Исследовано влияние строения, ММ, 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.

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 исследований *in vitro* и *in vivo*.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов работы подтверждается использованием в своей основе общепринятых подходов и методик исследования, использованием современного оборудования, прошедшего своевременные проверки, 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 наноконкомпозиты» (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».

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 ссылок на источники литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** отражена актуальность темы диссертационного исследования, научная новизна результатов и их практическая значимость, сформулированы цель и задачи работы,

приведены положения, выносимые на защиту, степень достоверности, полнота опубликования в печати и апробация результатов.

В литературном обзоре (Глава 1) отражены современные подходы к синтезу и исследованию звездообразных сложных полиэфиров, в частности гомо- и сополимеров PLA. Обоснована актуальность и перспективность их использования для решения задач тканевой инженерии и наномедицины. Анализ показал, что для дальнейшего развития данных направлений необходимо изучить кинетику полимеризации лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов с целью получения звездообразных PLA с контролируемым строением и составом, а также определить основные закономерности их гидролитической деградации. Кроме того, изучение влияния параметров амфифильных звездообразных блок-сополимеров PLA-MPEG на размер и морфологию наночастиц остается актуальным на сегодняшний день с точки зрения разработки биосовместимых наносомальных систем доставки противораковых препаратов.

Экспериментальная часть (Глава 2) включает описание всех химических веществ и растворителей, методик синтеза звездообразных PLA с различными концевыми группами (ОН и СООН), в том числе их амфифильных блок-сополимеров PLA-MPEG, методик получения водных суспензий наночастиц и наносомальных форм противораковых препаратов на их основе. Описаны методы исследования, используемые в ходе выполнения диссертационной работы, и соответствующие условия измерений, а также методики экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

Третья глава «Результаты и их обсуждение» включает два раздела. Первый раздел посвящен синтезу и характеристике звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых гомополимеров PLLA и PDLLA с различными концевыми группами, анализу влияния строения и состава полимеров на их теплофизические свойства, кристаллическую структуру и кинетику гидролитической деградации при 37 °С. Во втором разделе рассматриваются синтез звездообразных амфифильных блок-сополимеров PLLA-MPEG, получение и характеристика полимерных наночастиц и наносомальных форм противораковых препаратов, а также исследование их цитотоксических свойств *in vitro* и противоопухолевой эффективности *in vivo*.

3.1 Синтез и исследование звездообразных гомополимеров лактида

3.1.1 Полимеризация лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов

Кинетику полимеризации L- и D,L-лактида в присутствии мультифункциональных гидроксилсодержащих со-инициаторов TMP, PTOL и DPTOL изучали с целью определения оптимальных условий синтеза 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA и PDLLA с заданным строением и составом. Катализатором реакции выступал SnOct₂ (500 ppm по отношению к мономеру). Полимеризацию с раскрытием цикла лактида проводили в массе по механизму «координации-внедрения», в соответствии с которым число ОН-групп в молекулах со-инициаторов определяет количество растущих полимерных лучей (Рисунок 1). Кратко запись формул синтезированных полимеров в соответствии с их молекулярным строением и составом можно представить следующим образом: **3s-, 4s-, 6s-PLLA_n/PDLLA_n**, где «n» это средняя степень полимеризации (DP) полилактидных лучей.

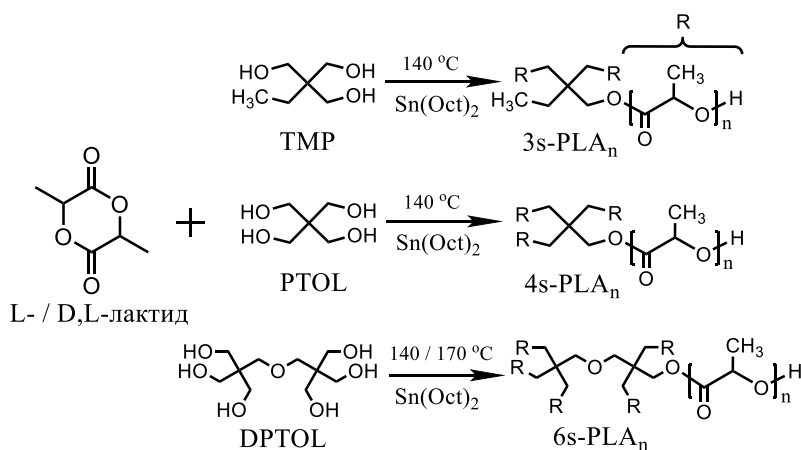


Рисунок 1 – Схема синтеза 3-х, 4-х и 6-ти лучевых звездообразных PLA

Время достижения равновесных значений конверсий L-лактида (95-98%) при целевой DP 10, 25, 50 и 100 для 3s- и 4s-PLLA_n при 140 °C и 6s-PLLA_n при 170 °C в большинстве случаев не превышало 8 ч (Рисунок 2). Исключение составил полимер 6s-PLLA₁₀. Уменьшение скорости полимеризации и скорости иницирования OH-групп молекул

со-инициатора по мере перехода от 3-х к 6-ти лучевым PLLA_n при невысоких значения DP послужило причиной повышения температуры синтеза 6s-PLLA_n до 170 °C.

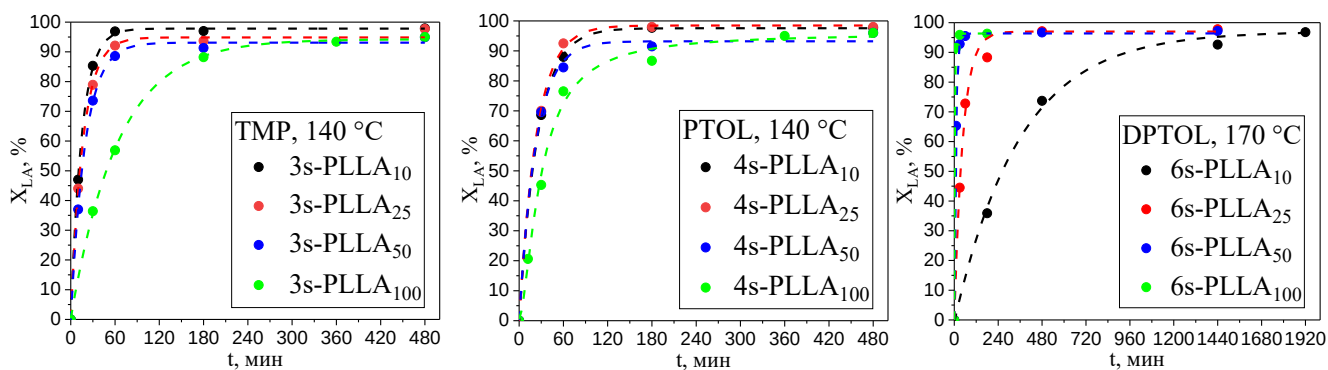


Рисунок 2 – Графики зависимости конверсии L-лактида от времени для 3s-, 4s- и 6s-PLLA_n

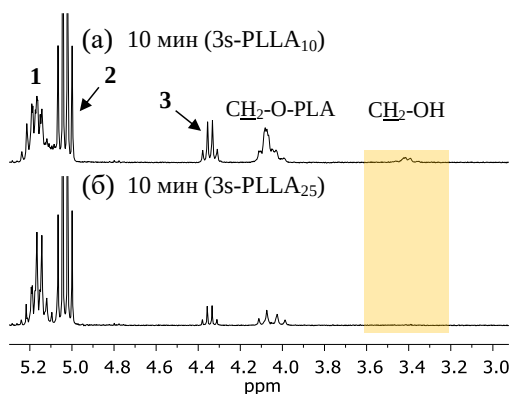


Рисунок 3 – ¹H-ЯМР спектры 3s-PLLA₁₀ (а) и 3s-PLLA₂₅ (б) спустя 10 минут реакции

Конверсию лактида (X_{LA}) на каждом временном этапе синтеза определяли с помощью ¹H-ЯМР спектроскопии исходя из соотношения интегральной интенсивности сигналов от метиновых протонов ($-\underline{\text{CH}}-$) в мономере (2) и полимере (1+3) (Рисунок 3). Уменьшение интенсивности сигнала от метиленовых протонов молекулы со-инициатора $-\underline{\text{CH}}_2-\text{OH}$, граничащих с гидроксильной группой, и появление сигналов от протонов $-\underline{\text{CH}}_2-\text{O}-\text{PLA}$ свидетельствует об успешном протекании реакции полимеризации L-лактида по OH-группам молекул со-инициаторов (Рисунок 3). У 3-х

лучевых звездообразных PLLA_n на начальных стадиях полимеризации ($X_{LA} \approx 40\%$) конверсия OH-групп молекул TMP составляла от 86 до 99% в зависимости от DP, что должно способствовать формированию равномерных по длине лучей и минимизации доли неразветвленных «кометоподобных» структур. Увеличение доли мономера и катализатора SnOct₂ по отношению к OH-группам TMP по мере возрастания целевой DP лучей привело к возрастанию скорости иницирования. Аналогичные закономерности были обнаружены и при использовании в качестве со-инициаторов PTOL и DPTOL. На всем протяжении реакции синтезируемые

соединения характеризовались мономодальным характером ММР, при этом на поздних стадиях полимеризации формирование низкомолекулярных фракций или уширение пиков вследствие протекания побочных реакций не происходило. Кроме того, на «псевдоживой» характер полимеризации L-лактида в присутствии мультифункциональных со-инициаторов указывает линейная зависимость DP и среднечисловой (M_n) молекулярной массы звездообразных PLLA_n от конверсии мономера на всем протяжении реакции. Для примера, на Рисунке 4 приведены соответствующие зависимости для серии 4s-PLLA_n и ММР полимера 4s-PLLA₅₀ в процессе полимеризации при 140 °С.

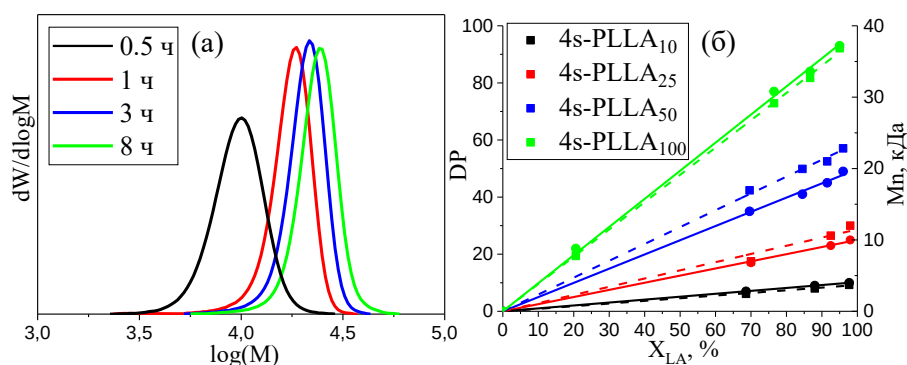


Рисунок 4 – ММР 4-х лучевого PLLA₅₀ (а) и графики зависимости DP (сплошные линии) и M_n (пунктирные линии) для 4-х лучевых PLLA_n (б) в процессе полимеризации при 140 °С

Полимеризация с раскрытием цикла лактида в присутствии SnOct₂ обычно подчиняется уравнению реакции первого порядка по мономеру:

$$-\frac{d[M]}{dt} = k_{эфф}[M]^a$$

$$k_{эфф} = k[CI]^b[SnOct_2]^c$$

$$\ln\left(\frac{1}{1-X}\right) = k_{эфф}t,$$

где k – константа скорости полимеризации; $[M]$, $[CI]$ и $[SnOct_2]$ – концентрация мономера, со-инициатора и катализатора (моль/л); a , b и c – частные порядки реакции; X – конверсия мономера в момент времени t (мин). При этом эффективная константа скорости ($k_{эфф}$) для заданных начальных условий реакции остается постоянной. Как видно из Рисунка 5, кинетические данные довольно хорошо аппроксимируются прямыми в координатах первого порядка, что указывает на правильность предположения о порядке реакции по мономеру при полимеризации в присутствии мультифункциональных со-инициаторов TMP, PTOL и DPTOL.

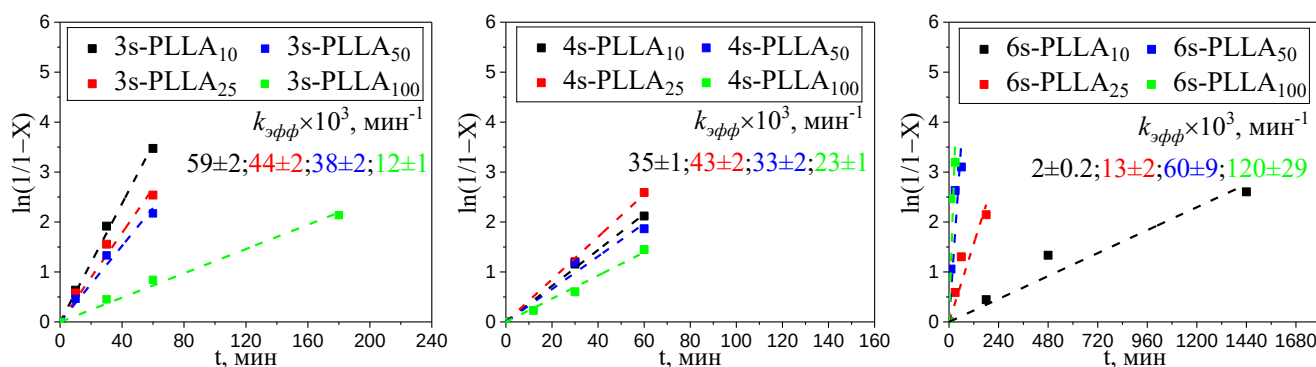


Рисунок 5 – Анаморфозы кинетических кривых полимеризации L-лактида в присутствии TMP, PTOL и DPTOL в координатах реакции первого порядка

По тангенсу угла наклона прямых были рассчитаны значения $k_{эфф}$ (Рисунок 5) и установлено, что скорость полимеризации L-лактида в случае 3-х и 4-х лучевых полимеров закономерно уменьшалась по мере возрастания DP (т.е. с уменьшением концентрации со-инициатора в реакционной системе), в тоже время для 6-ти лучевых аналогов наблюдалась прямо противоположная зависимость. По-видимому, структура молекул со-инициаторов, а также

возникающие стерические затруднения, несмотря на общий первичный характер ОН-групп, способны оказывать влияние не только на скорость инициирования, но и на кинетику полимеризации лактида в целом. Установленные кинетические закономерности необходимо учитывать для проведения контролируемого синтеза звездообразных PLLA_n.

Кинетические кривые полимеризации D,L-лактида в присутствии TMP, PTOL и DPTOL (DP = 25 и 100) приведены на Рисунке 6. Во всех экспериментах X_{LA} от 95 до 97% была достигнута в пределах 3 часов. При сравнении кинетики полимеризации D,L- и L-лактида в присутствии мультифункциональных гидроксилсодержащих со-инициаторов были выявлены схожие закономерности, за исключением времени достижения равновесных конверсий в силу разной активности мономеров. Кроме того, при выбранных условиях синтеза воспроизвелись и такие ранее выявленные закономерности, как линейная зависимость DP и M_n от конверсии мономера и мономодальный характер ММР, что подтверждает протекание реакции в соответствии с механизмом «координации-внедрения».

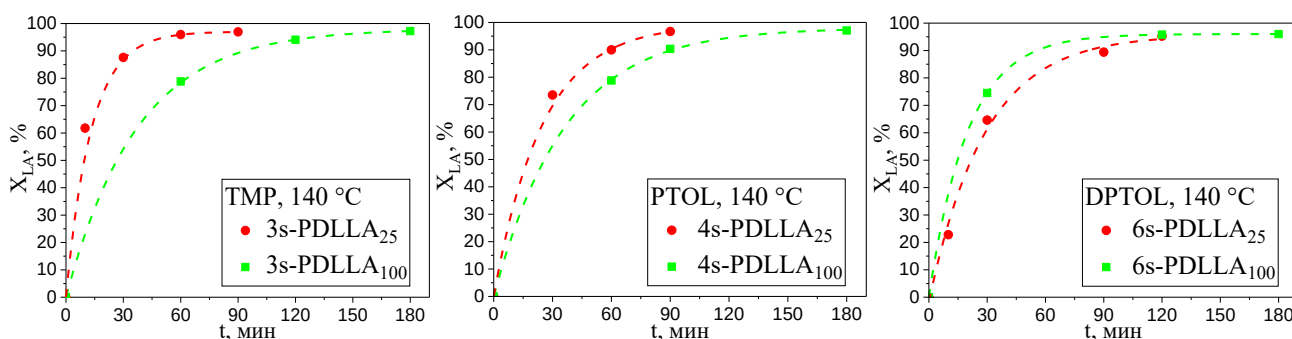


Рисунок 6 – Графики зависимости конверсии D,L-лактида от времени для 3s-, 4s- и 6s-PDLLA_n

Таким образом, благодаря контролю молекулярного состава продуктов реакции в процессе полимеризации методами ГПХ и ЯМР, были определены оптимальные условия синтеза звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA_n (DP = 10, 25, 50 и 100) и PDLLA_n (DP = 25 и 100). В заданных условиях были достигнуты высокие значения конверсии мономеров и функциональных групп со-инициаторов, что наряду с узким ММР обеспечивает синтез звездообразных PLA с контролируемым строением и составом.

3.1.2 Исследование молекулярного строения, состава и теплофизических характеристик звездообразных PLA

Принимая во внимание установленные кинетические закономерности, в оптимальных условиях была синтезирована серия 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA_n и PDLLA_n со степенью полимеризации лучей в интервале от 10 до 100 (Таблица 1). Качественный и количественный анализ синтезированных полимеров проводили с использованием спектроскопии ЯМР, ГПХ с тройным детектированием и спектрометрии МАЛДИ. Все звездообразные PLA характеризовались мономодальным ММР, при этом индекс полидисперсности (PDI) варьировался от 1.06 до 1.19, что является низким показателем для разветвленных PLA, синтезированных одностадийной полимеризацией с раскрытием цикла в присутствии SnOct₂. С помощью ¹H-ЯМР спектроскопии по положению и форме сигналов от метиновых протонов (1) был подтвержден химический состав полимерных цепей и их соответствие заданной изомерии

(Рисунок 7). Присутствие на спектрах сигнала в виде квартета от метиновых протонов (2) в положении 4.35 ppm подтверждает образование концевых ОН-групп. По соотношению интегральных интенсивностей сигналов (1) и (2) были рассчитаны значения средней DP лучей звездообразных PLLA_n и PDLLA_n. Важно отметить, что соответствующая этим значениям M_n полимеров, наряду с абсолютной ММ, определенной с помощью широкоугольного светорассеяния (MALS) в составе ГПХ с тройным детектированием, хорошо коррелирует с расчетной (Таблица 1). Отсутствие на ¹H-ЯМР спектрах сигналов от метиленовых протонов соинициаторов, граничащих с гидроксильными группами (CH₂-ОН), подтверждает формирование полимерных цепей на всех функциональных группах разветвляющих центров. Кроме того, соотношение интегральной интенсивности сигнала (2) и (3) для всех звездообразных PLA оказалось равным двум, что указывает на минимальное протекание полимеризации лактида на возможных гидроксилсодержащих примесях (вода или молочная кислота) с образованием побочных линейных структур.

Таблица 1 – Молекулярно-массовые, структурные и теплофизические характеристики синтезированных звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA_n и PDLLA_n

Образец	М _{расч} , кДа	ГПХ			MALS/ RI	¹ H-ЯМР	[η] _w мл/г	g'	ДСК		
		RI		M _n , кДа		M _n , кДа			T _g , °C	T _m , °C	X _c , %
		M _n , кДа	PDI								
поли-L-лактиды											
3s-PLLA ₁₀	2.3	2.9	1.14	2.4	0.83	2.3	5.5	0.67	32	-	-
3s-PLLA ₂₅	5.5	8.7	1.10	5.3	0.61	5.5	10.8	0.75	51	132	42
3s-PLLA ₄₈	10.9	20.3	1.06	10.1	0.50	10.5	18.4	0.81	57	150	53
3s-PLLA ₉₆	21.7	36.6	1.08	20.1	0.55	20.9	32.6	0.86	60	162	59
4s-PLLA ₁₀	3.0	3.5	1.19	2.8	0.80	3.0	5.7	0.61	37	-	-
4s-PLLA ₂₅	7.3	11.7	1.12	7.3	0.62	7.3	11.8	0.65	54	134	42
4s-PLLA ₅₀	14.5	21.2	1.09	10.5	0.50	14.5	17.2	0.72	58	148	49
4s-PLLA ₁₀₀	28.9	46.6	1.19	29.8	0.64	28.9	38.9	0.78	61	164	54
6s-PLLA ₁₀	4.6	6.3	1.14	5.2	0.83	4.6	6.6	0.46	43	102	2
6s-PLLA ₂₅	11.1	16.8	1.11	10.7	0.64	11.1	13.3	0.55	55	129	38
6s-PLLA ₄₉	21.8	31.5	1.11	21.3	0.68	21.4	25.8	0.65	59	155	45
6s-PLLA ₁₀₀	43.5	64.7	1.13	40.0	0.62	43.5	39.1	0.63	61	162	38
поли-D,L-лактиды											
3s-PDLLA ₂₅	5.5	7.3	1.09	5.4	0.74	5.5	8.2	0.85	34	-	-
3s-PDLLA ₁₀₀	21.7	29.2	1.14	21.1	0.72	21.7	22.1	0.89	51	-	-
4s-PDLLA ₂₅	7.3	9.9	1.14	7.6	0.77	7.3	9.3	0.74	39	-	-
4s-PDLLA ₁₀₀	28.9	39.8	1.16	29.9	0.75	28.9	24.6	0.78	51	-	-
6s-PDLLA ₂₅	11.1	13.8	1.07	10.7	0.78	11.1	9.2	0.59	42	-	-
6s-PDLLA ₁₀₀	43.5	52.3	1.09	43.7	0.84	43.5	24.7	0.62	51	-	-

В силу ограниченной способности высокомолекулярных соединений к ионизации, анализ методом масс-спектрометрии МАЛДИ был проведен только для низкомолекулярных олигомеров (DP = 10), эффективность ионизации которых достаточна для регистрации масс-спектров. Важно

отметить, что на полученных спектрах не было обнаружено фракций макромолекул, соответствующих по ММ побочным линейным или циклическим структурам.

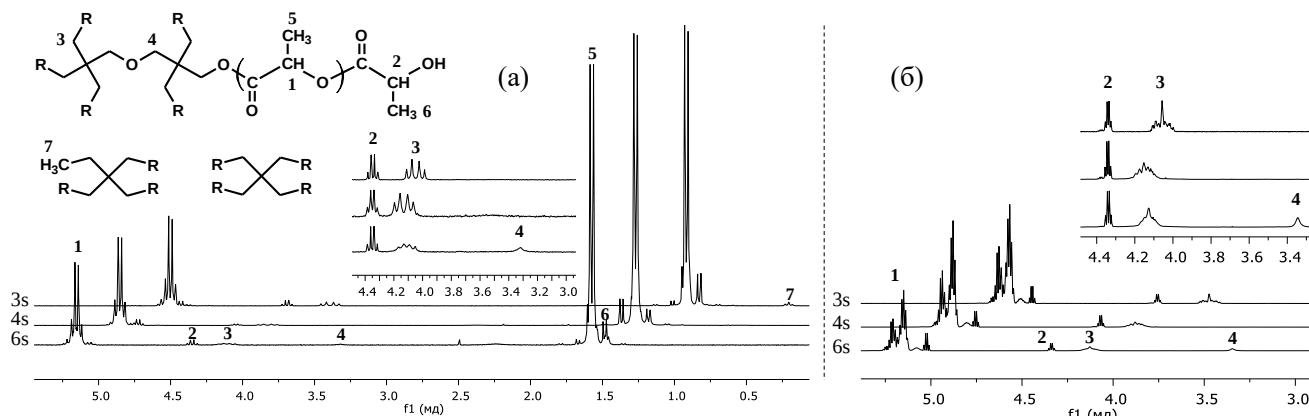


Рисунок 7 – ^1H -ЯМР спектры 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA₂₅ (а) и PDLLA₂₅ (б)

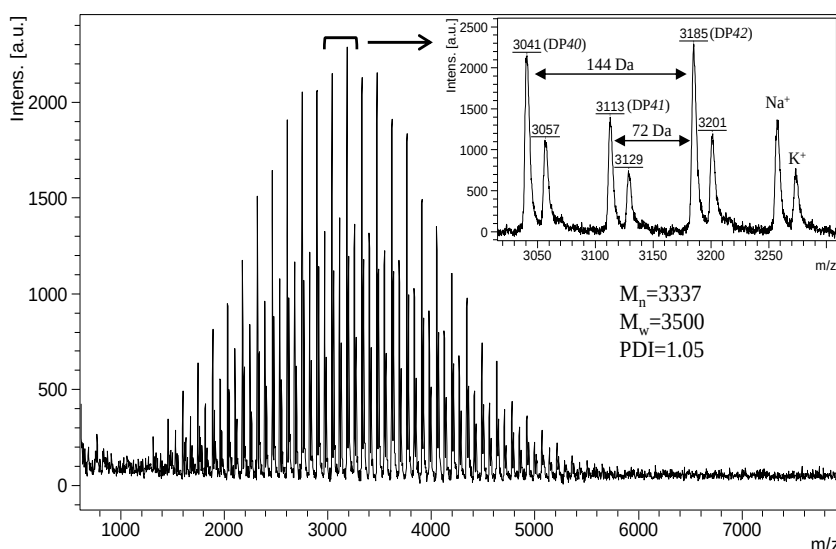


Рисунок 8 – Масс-спектр МАЛДИ звездообразного 4s-PLLA₁₀

Кроме того, при сравнении экспериментальных значений соотношения массы к заряду (m/z) любой из фракций на спектре с теоретическим расчетом, было обнаружено, что их совпадение с точностью до одного г/моль произойдет лишь при учете ММ используемого в процессе синтеза со-инициатора. Для примера, в образце 4s-PLLA₁₀ (Рисунок 8) фракцию с

соотношением $m/z = 3185$ Да можно представить как сумму молекулярных масс PTOL и цепей PLLA с общей DP равной 42: $m/z(3185 \text{ Да}) = MM(PTOL) + MM(\text{Na}^+) + (MM(\text{мономерного звена}) \times DP) = 136.15 + 23 + (72.06 \times 42)$, что подтверждает наличие разветвляющего центра в данной фракции. Присутствие на спектре макромолекул с периодичностью по ММ в 72 Да свидетельствует о протекании в определенной степени побочной реакции сегментального обмена, не приводящей к значимому увеличению PDI (Рисунок 8).

Дополнительно для оценки степени разветвленности звездообразных PLA были определены коэффициенты ветвления (g'), как отношение их характеристической вязкости ($[\eta]_w$) к аналогичному значению PLA линейного строения (Таблица 1). Характеристическая вязкость линейных PLA со средневесовой молекулярной массой равной звездообразным полимерам, была рассчитана по уравнению Марка-Куна-Хаувинка. Необходимые константы уравнения (a и K) были определены экспериментально на основе анализа кривых коммерчески доступных линейных PLA. В результате было установлено, что коэффициент ветвления g' для всех звездообразных PLLA_n и PDLLA_n оказался меньше единицы и закономерно уменьшался по мере увеличения числа лучей. При этом наименее компактной структурой обладал 3-х лучевой

PDLLA₁₀₀ с $g' = 0.89$, а наиболее компактной 6-ти лучевой PLLA₁₀ с $g' = 0.46$. Кроме того, у полимеров с близкими значениями M_n по мере увеличения числа лучей можно также отметить уменьшение их характеристической вязкости. Так, например, у 3s-PLLA₄₈ и 6s-PLLA₂₅ с M_n порядка 10 кДа $[\eta]_w$ составила 18.4 и 13.3 мл/г, соответственно. Было установлено, что для звездообразных PLA отклонение g' от теоретического коэффициента ветвления, рассчитанного по формуле для звездообразных полимеров с равномерным распределением мономерных звеньев, как функцию числа лучей f [1], не превышает 18%. Это подтверждает отсутствие так называемых «кометоподобных» макромолекул, по строению напоминающих линейные полимеры.

В результате строение и состав синтезированных звездообразных PLA 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 PLA, характеризующихся мономодальным ММР и ММ от 2 до 44 кДа. Это обеспечивает возможность проведения дальнейшего достоверного анализа взаимосвязи структуры звездообразных молекул с комплексом их физико-химических свойств.

С помощью ДСК были определены значения температуры стеклования (T_g), температуры плавления (T_m) и степени кристалличности (X_c) синтезированных звездообразных PLA (Таблица 1). При наличии на ДСК кривых (Рисунок 9 (а)) бимодальных пиков плавления, связанных с присутствием в полимере кристаллитов, отличающихся размерами и степенью дефектности, за T_m было принято значение более высокотемпературной фазы. T_g для обеих серий звездообразных PLLA_n и PDLLA_n находилась в диапазоне от 32 до 61 °С, увеличивалась по мере возрастания средней DP лучей и слабо зависела от их общего числа для большинства полимеров. Влияние разветвленности на T_g и, соответственно, на сегментальную подвижность хорошо прослеживалось на полимерах с невысокой степенью полимеризации лучей. Было установлено, что для звездообразных PLLA₁₀ и PDLLA₂₅ T_g может увеличиваться вплоть до 11 °С по мере увеличения степени ветвления при аналогичной ММ лучей. T_m и X_c звездообразных PLLA_n увеличивались с ростом длины лучей за счет образования более совершенных кристаллитов, обеспечиваемых уменьшающимся воздействием концевых участков цепей. Изменение T_m в пределах от 102 до 164 °С в основном обусловлено влиянием длины лучей, а не их количеством, в то время как X_c в явном виде уменьшалась в ряду 3s, 4s, 6s при аналогичной DP лучей.

Схожее влияние разветвленности на процесс кристаллизации было обнаружено при анализе отоженных полимеров методом рентгеновской дифракции в больших углах. Кроме того, было установлено, что 3-х и 4-х лучевые PLLA₁₀ являются полностью аморфными, в то время как на дифрактограмме 6-ти лучевого PLLA₁₀ был обнаружен ряд рефлексов невысокой интенсивности ($X_c = 13\%$) (Рисунок 9 (б)). Одним из возможных объяснений данного явления может служить меньший критический размер зародыша, обусловленный затрудненной подвижностью цепей, связанных с точкой ветвления в виде молекулы DPTOL. Для остальных звездообразных PLLA_n с $DP \geq 25$ на дифрактограммах наблюдались два основных кристаллических рефлекса при значениях вектора рассеяния (q) 11.9 и 13.6 нм⁻¹. Эти два пика

имеют индексы (200)/(110) и (203)/(113) α -формы кристаллического PLLA. Другие рефлексы, четко наблюдаемые на дифрактограммах, а именно (004)/(103), (110), (115), также подтверждают

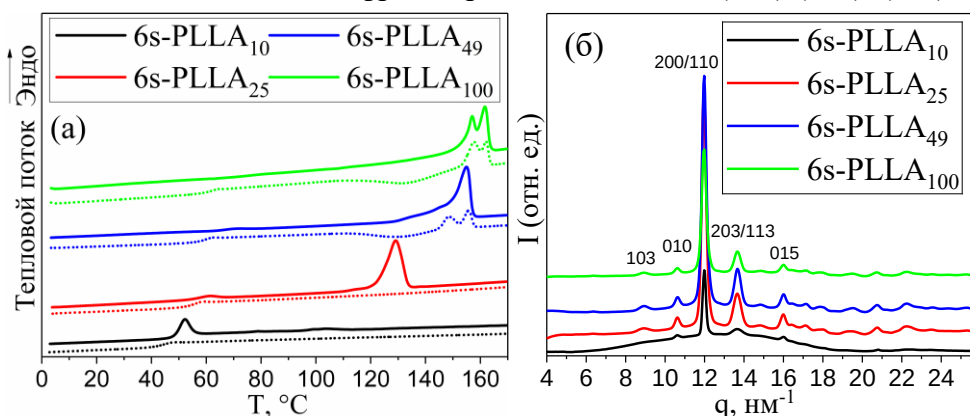


Рисунок 9 – ДСК кривые (а) и дифрактограммы (б) звездообразных 6s-PLLA_n после отжига (сплошные линии) и аморфизации (пунктирные линии)

образование α -кристаллической фазы. Поперечный размер кристаллитов, рассчитанный по уравнению Селякова-Шеррера, для большинства полимеров составил порядка 18 ± 1 нм и слабо зависел от длины и числа лучей.

3.1.3 Гидролитическая деградация звездообразных PLA

Гидролитическую деградацию PLA изучали в условиях, моделирующих физиологические параметры организма (pH 7.4, 37 °C). Для исследования влияния строения, ММ и X_c звездообразных 3s-PLLA_n (DP = 25 и 96) и 6s-PLLA_n (DP = 25 и 100) с концевыми ОН-группами на кинетику деградации были получены два вида образцов с высокой и низкой долей кристаллической фазы, посредством отжига и аморфизации, соответственно. Процесс формования образцов дискообразной формы и массой порядка 100 мг сопровождался понижением давления с целью дегазации расплавов полимеров. Молекулярно-массовые характеристики звездообразных PLA в процессе формования образцов не изменялись.

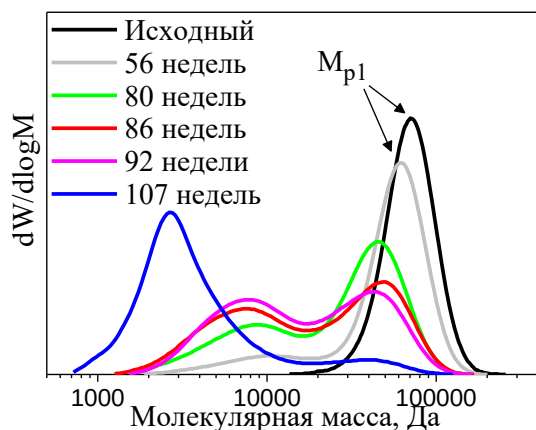


Рисунок 10 – ММР аморфного 6s-PLLA₁₀₀-ОН в различные временные интервалы гидролитической деградации

Примечательно, что в отличие от линейных аналогов, гидролитическая деградация звездообразных PLLA_n сопровождалась формированием мультимодального ММР (Рисунок 10), поэтому далее на графиках зависимости ММ от времени представлено изменение ММ основной фракции полимера в точке экстремума пика (M_{p1}) и массовая доля низкомолекулярной фракции (ω_2). Для всех серий образцов значение ММ низкомолекулярной фракции, формирующейся на начальном этапе процесса деградации, было сопоставимо с ММ одного луча в каждом отдельном случае. Данный факт позволяет предположить, что

процесс гидролитической деградации звездообразных PLA протекает как за счет разрыва сложноэфирных связей внутри полимерных цепей, так и за счет отрыва лучей от молекул разветвляющих центров.

Графики зависимости массы от времени деградации для аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA_n-ОН приведены на Рисунке 11. В случае более низкомолекулярных полимеров (DP = 25)

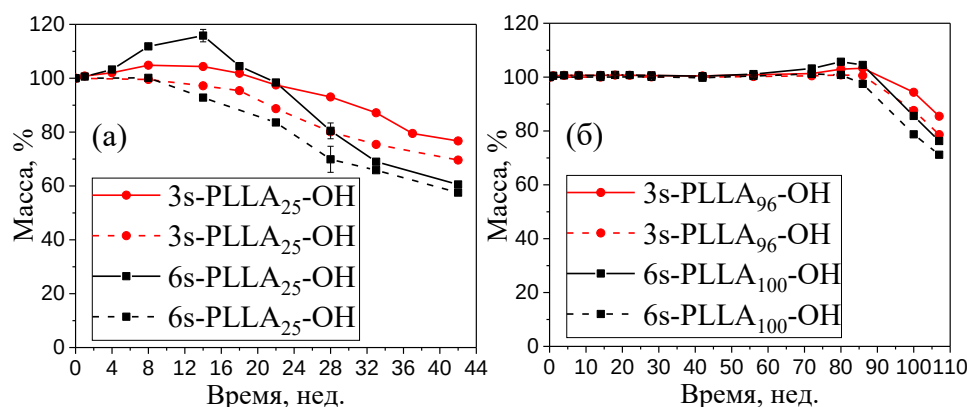


Рисунок 11 – Графики зависимости массы от времени гидролиза для аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA_n-ОН до (сплошные линии) и после (пунктирные линии) сушки в вакуум-сушильном шкафу

максимальная сорбция воды, вплоть до 15 масс.%, наблюдалась для 6s-PLLA₂₅-ОН, по сравнению с 5 масс.% у 3-х лучевого аналога (Рисунок 11 (а)). Кроме того, анализ массы образцов после сушки показал, что начиная с 14-ой недели и до

момента фрагментации образцов, процесс деградации 6s-PLLA₂₅-ОН сопровождался более интенсивным снижением их массы. Наряду с изменением массы, с определенного момента времени аморфные 6s-PLLA₂₅-ОН характеризовались более интенсивным снижением ММ по сравнению с 3-х лучевыми аналогами (Рисунок 12 (а)).

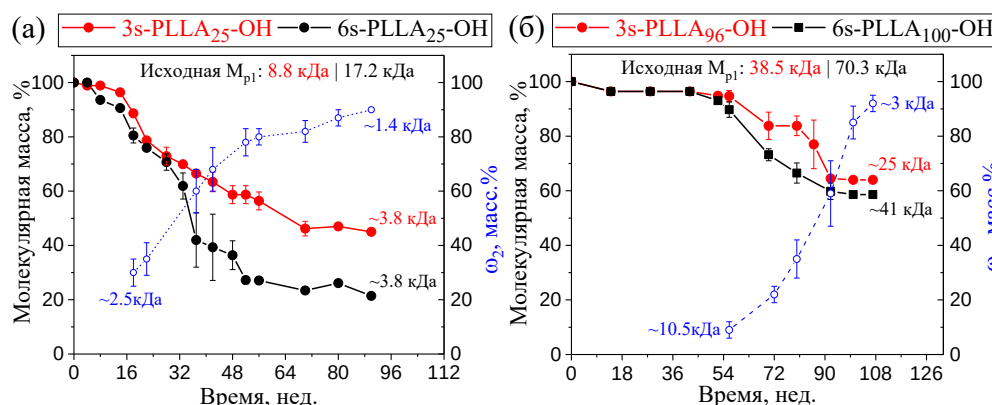


Рисунок 12 – Графики зависимости нормированной ММ и доли низкомолекулярной фракции (w_2) от времени гидролиза для аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA_n-ОН

Наблюдаемая разница в степени водопоглощения и скорости деградации изначально аморфных 3-х и 6-ти лучевых PLLA₂₅-ОН может быть связана с изменением их X_c во времени. Было установлено, что у 3s-PLLA₂₅-ОН к 14-й неделе X_c увеличивалась с исходных 5 до 36%, в то время как у 6s-PLLA₂₅-ОН к этому времени она оставалась практически неизменной (Рисунок 13 (а)), что вероятно привело к существенной разнице в степени водопоглощения образцов. Поскольку в рассматриваемом временном интервале у 3s-PLLA₂₅-ОН не наблюдалось значимого снижения массы, увеличение его X_c можно связать не с деградацией и вымыванием аморфной части, а с процессом кристаллизации. Данный факт подтверждает, что повышение степени ветвления может затруднять кристаллизацию звездообразных PLLA_n.

При увеличении DP лучей в 4 раза ожидаемо уменьшилась степень водопоглощения образцов (Рисунок 11 (б)). Так, в начале эксперимента аморфные 3s-PLLA₉₆-ОН и 6s-PLLA₁₀₀-ОН сорбировали порядка 0.5 масс.% воды и сохраняли это состояние длительное время вплоть до 80-й недели, а максимальное водопоглощение, не превышающее 5 масс.%, было зафиксировано в период с 80-й по 86-ю неделю. Скорость гидролитической деградации у высокомолекулярных аморфных 3-х и 6-ти лучевых полимеров оказалась существенно ниже по сравнению с их

низкомолекулярными аналогами (Рисунок 12). Так доля ω_2 порядка 60 масс.% в первом случае была достигнута только лишь к 92-й неделе по сравнению с 37-й неделей во втором. Для образцов из высокомолекулярных аморфных PLLA_n можно также проследить тенденцию увеличения скорости потери массы и ММ по мере возрастания числа лучей, однако данный эффект

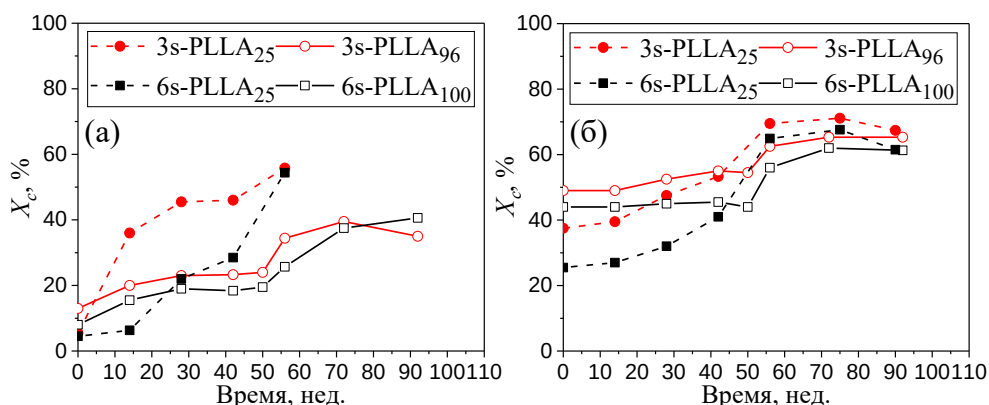


Рисунок 13 – Зависимость степени кристалличности аморфных (а) и частично-кристаллических (б) 3-х и 6-ти лучевых PLLA_n-ОН от времени гидролиза

проявляется в меньшей степени по сравнению с 3s- и 6s-PLLA₂₅-ОН. Причиной этого может являться минимальная разница в X_c для 3s-PLLA₉₆-ОН и 6s-PLLA₁₀₀-ОН на всем протяжении деградации (Рисунок 13(а)).

По аналогии с аморфными образцами в ходе данной работы была исследована гидролитическая деградация их частично-кристаллических аналогов, полученных посредством кристаллизации в процессе медленного охлаждения из расплава. Стоит отметить, что максимальные значения массы сорбированной воды для частично-кристаллических 3s- и 6s-PLLA₂₅-ОН составили 1.5 и 3.7 масс.%, что в несколько раз меньше по сравнению с их аморфными аналогами. Кроме того, доля низкомолекулярной фракции порядка 60 масс.% независимо от числа лучей была достигнута лишь к 52-й неделе. Такое поведение материалов связано с тем, что присутствие кристаллической фазы уменьшает молекулярную подвижность и долю свободного объема, повышает плотность упаковки макромолекул, что в результате приводит к низкой сорбции воды и снижению скорости гидролитической деградации. Однако как для низко-, так и для высокомолекулярной серии частично-кристаллических звездообразных PLLA_n выраженного влияния числа лучей при их аналогичной степени полимеризации на скорость потери массы и ММ не прослеживалось. Данный факт хорошо коррелирует с профилями изменения X_c частично-кристаллических 3-х и 6-ти лучевых PLLA_n-ОН в процессе гидролиза (Рисунок 13 (б)).

Исходя из анализа графиков ММР, а также зависимостей массы образцов и ММ от времени деградации, можно сделать вывод, что для звездообразных PLLA_n более характерен объемный механизм деградации, нежели чем поверхностный, с преобладанием случайного разрыва цепей над концевым. Об этом свидетельствует отсутствие периода уменьшения массы образцов без изменения ММ полимера и появление выраженной низкомолекулярной фракции наряду со значимым уменьшением M_{p1} . В результате изучения гидролитической деградации 3-х и 6-ти лучевых PLLA_n-ОН было установлено, что в зависимости от сочетания ММ лучей и исходной X_c время их гидролитической деградации при 37 °С может варьироваться от 56 до 100 недель. Показано, что количество лучей при DP = 25 оказывает влияние на скорость деградации за счет различной способности к кристаллизации у звездообразных макромолекул.

Для исследования влияния типа концевой группы на процесс гидролитической деградации в отсутствие вклада от кристаллизации, дополнительно к их аналогам с концевыми OH-группами, была синтезирована серия PDLLA_n с концевыми COOH-группами: **3s-/6s-PDLLA_n-COOH** (DP = 25 и 100). Схема реакции модификации янтарным ангидридом 3-х лучевого PDLLA_n-OH представлена на Рисунке 14.

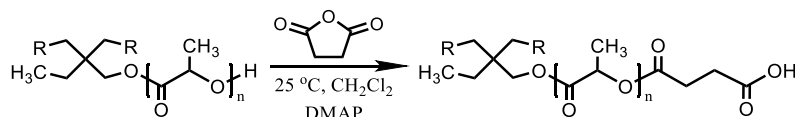
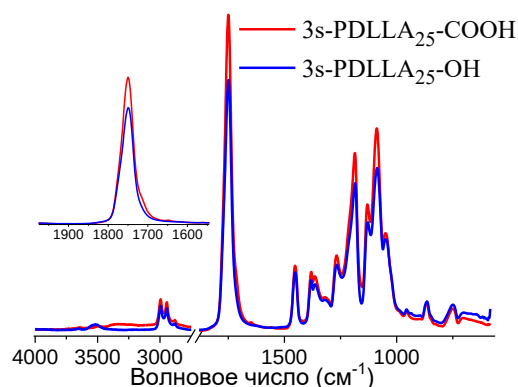


Рисунок 14 – Схема реакции карбоксилирования 3-лучевого PDLLA_n и ИК-спектры 3s-PDLLA₂₅ до и после модификации янтарным ангидридом



На ИК-спектрах карбоксилированных полимеров отсутствовала полоса поглощения (3500 см⁻¹), соответствующая исходным концевым OH-группам, и возникала новая полоса поглощения в области 1710 см⁻¹, относящаяся к колебаниям C=O связи в COOH-группах (Рисунок 14). После перефункционализации звездообразные PDLLA_n-COOH характеризовались ММ от 6 до 44 кДа и средней степенью модификации янтарным ангидридом более 85% (Таблица 2).

Таблица 2 – Молекулярно-массовые характеристики звездообразных 3-х и 6-ти лучевых PDLLA_n с концевыми карбоксильными группами

Образец	ГПХ		ЯМР	
	M _w , кДа	PDI	M _n , кДа	Степень модификации, %
3s-PDLLA ₂₅ -COOH	6.4	1.44	5.9	99
3s-PDLLA ₁₀₀ -COOH	32.0	1.18	22.1	85
6s-PDLLA ₂₅ -COOH	9.2	1.52	12.0	99
6s-PDLLA ₁₀₀ -COOH	51.5	1.26	44.1	85

3s- и 6s-PLLA₂₅-OH к температуре проведения эксперимента привели к тому, что уже к 6-8 неделе в обоих случаях полимеры деградировали до ММ порядка 2.5 кДа. С увеличением DP до 100 у звездообразных PDLLA_n-OH увеличилась стабильность по отношению к гидролизу, при этом количество лучей оказало слабое влияние на этот процесс. Для примера на Рисунке 15 приведены графики зависимости массы и нормированной ММ для аморфных 3s-PLLA₂₅/PLLA₁₀₀ с концевыми OH- и COOH-группами. Установлено, что введение концевых COOH-групп привело к существенному увеличению сорбции воды вплоть до 50 масс.% к 9-й неделе, при этом в аналогичный период это значение для полимеров с OH-группами не превышало нескольких процентов, подобно ранее исследованным высокомолекулярным аморфным PLLA_n.

Замена концевых OH-групп на COOH-группы также привела к значительному повышению скорости гидролитической деградации, причем в большей степени это можно наблюдать для серии звездообразных полимеров PDLLA₁₀₀ (Рисунок 15 (б)). Так, к 15-й неделе 3s- и 6s-

Деградация аморфных звездообразных 3-х и 6-ти лучевых PDLLA₂₅/PDLLA₁₀₀-OH протекала быстрее по сравнению с PLLA_n-OH. В первую очередь это может быть связано с более низкими значениями T_g у соответствующих полимеров и отсутствием кристаллических областей. Близкие значения T_g у

PDLLA₁₀₀-COOH полностью деградировали с 90-95% потерей ММ от исходной, в то время как их аналоги с ОН-группами к этому времени теряли лишь порядка 10%. В результате можно предположить, что концевые карбоксильные группы могут приводить к появлению «автокаталитического эффекта», результатом которого является повышение общей скорости процесса деградации звездообразных PLA.

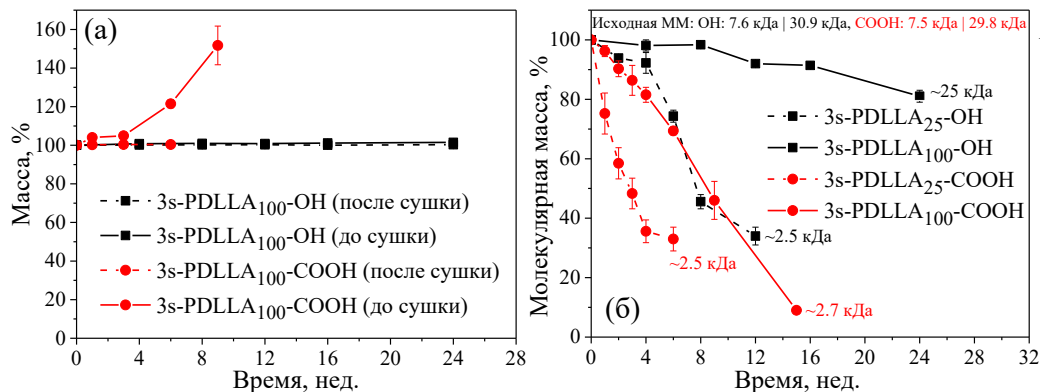


Рисунок 15 – Графики зависимости массы (а) и нормированной ММ (б) от времени гидролиза для аморфных 3-х лучевых PLLA₂₅/PLLA₁₀₀ с концевыми ОН- и COOH-группами

3.2 Звездообразные блок-сополимеры лактида для систем доставки ЛС

3.2.1 Исследование влияния строения звездообразных блок-сополимеров PLLA-MPEG на параметры наночастиц

Синтез звездообразных амфифильных блок-сополимеров PLLA-MPEG проводили в среде метилхлорида карбодиимидным методом посредством реакции этерификации между COOH-группами модифицированного MPEG₄₅ (ММ = 2 кДа) и концевыми ОН-группами звездообразных PLLA_n (Рисунок 16). В качестве активатора COOH-групп использовали *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC), а катализатором реакции выступал 4-диметиламинопиридин (DMAP).

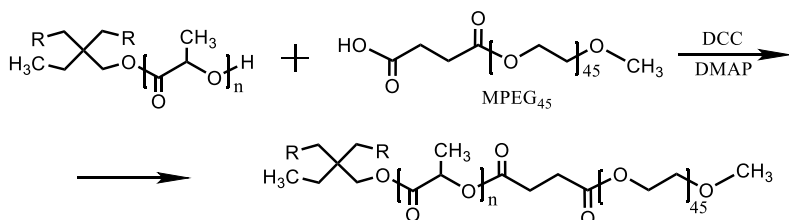


Рисунок 16 – Схема синтеза звездообразных 3-х лучевых блок-сополимеров PLLA_n-MPEG₄₅

Успешное протекание реакции было подтверждено уменьшением интегральной интенсивности сигнала от концевых метиновых протонов PLA лучей, на основании чего была рассчитана средняя степень модификации звездообразных PLLA_n гидрофильными молекулами MPEG₄₅. Увеличение ММ блок-сополимеров по сравнению с исходными гомополимерами PLLA_n также подтверждает формирование блочных структур (Таблица 3). В результате, синтезированные звездообразные 3-х, 4-х и 6-ти лучевые блок-сополимеры PLLA_n-MPEG₄₅ (DP от 10 до 50) характеризовались узким ММР с ММ от 8 до 30 кДа.

Благодаря своей амфифильной природе синтезированные 3-х, 4-х и 6-ти звездообразные блок-сополимеры способны самоорганизовываться в наночастицы в водной среде, которые могут быть использованы в качестве «контейнеров» для направленной доставки ЛС. Для исследования влияния строения и состава синтезированных блок-сополимеров на размер и морфологию наночастиц, т.е. на одни из основных параметров во многом определяющих фармакокинетику

наносомальной формы препарата, методом замены растворителя (нанопреципитации) была получена серия водных суспензий наночастиц. На Рисунке 17 приведены кривые МУРР в координатах $\text{Log } I - s$ для суспензий наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA_n-MPEG₄₅ с концентрацией 5 мг/мл.

Таблица 3 – Молекулярно-массовые характеристики звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров PLLA_n-MPEG₄₅ и параметры наночастиц, полученных на их основе

Образец	ГПХ		ЯМР		ДСР	МУРР
	M _n , кДа	PDI	M _n , кДа	Степень модификации, %	R _h , нм	R _g , нм (Гинье)
3s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	9.9	1.10	8.6	95	8±2	4.4±0.1
3s-PLLA ₂₅ -MPEG ₄₅	13.7	1.12	10.9	85	12±4	6.9±0.1
3s-PLLA ₄₈ -MPEG ₄₅	23.4	1.10	15.3	79	27±6	10.3±0.1
4s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	13.6	1.08	11.4	96	8±2	4.2±0.1
4s-PLLA ₂₅ -MPEG ₄₅	17.9	1.09	13.2	70	11±3	6.9±0.1
4s-PLLA ₅₀ -MPEG ₄₅	27.8	1.11	20.2	70	22±5	11.2±0.1
6s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	17.4	1.09	15.6	92	8±2	4.5±0.1
6s-PLLA ₂₅ -MPEG ₄₅	23.4	1.09	20.1	75	12±4	6.8±0.1
6s-PLLA ₄₉ -MPEG ₄₅	32.2	1.15	30.4	75	17±6	8.9±0.1

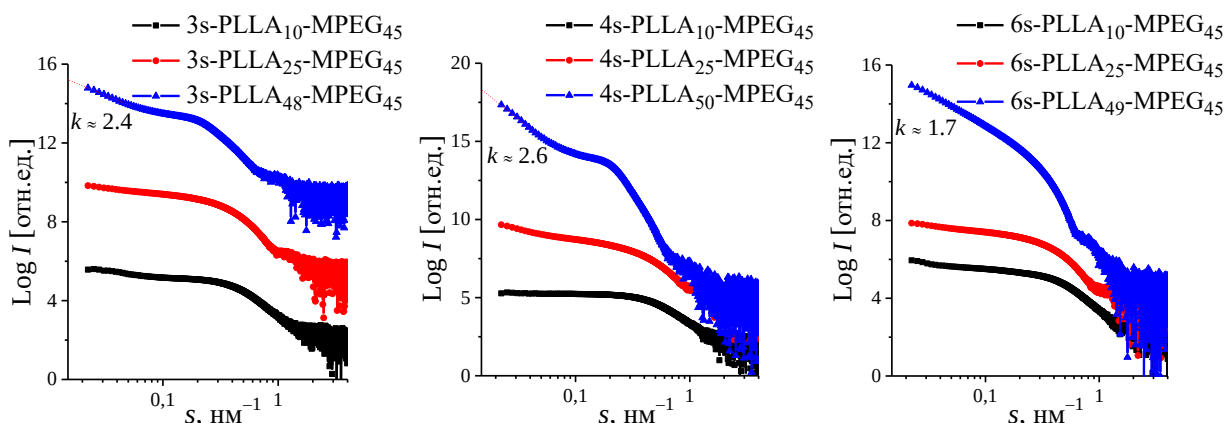


Рисунок 17 – Кривые МУРР в координатах $\text{Log } I - s$ для суспензий наночастиц на основе 3-х, 4-х и 6-ти лучевых блок-сополимеров PLLA_n-MPEG₄₅ ($c = 5$ мг/мл)

Важно отметить, что наночастицы на основе блок-сополимеров с коротким гидрофобным блоком ($DP = 10$) во всех случаях оказались близки к узкодисперсным системам. На их кривых МУРР не происходит возрастания интенсивности 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. В то же время по мере увеличения DP гидрофобного блока PLLA на кривых МУРР, особенно в случае 3-х и 4-х лучевых блок-сополимеров, можно отметить возрастание интенсивности рассеяния в области самых малых волновых векторов $s < 0.1 \text{ нм}^{-1}$, что свидетельствует о наличии в суспензиях помимо индивидуальных наночастиц (с размером менее 50 нм) их вторичных более крупных агрегатов. Величина коэффициента наклона начальных участков (k) для кривых 3s-PLLA₄₈-MPEG₄₅ и 4s-PLLA₅₀-MPEG₄₅ составила порядка 2.5, что может указывать на агрегацию наночастиц с формированием плотных структур, размер которых

по данным ДСР может достигать нескольких микрон. Гравиметрически было установлено, что массовая доля этих агрегатов может превышать 90% по отношению к индивидуальным наночастицам. В отличие от менее разветвленных аналогов, водная суспензия на основе 6s-PLLA₄₉-MPEG₄₅ не характеризовалась высокой долей вторичных агрегатов микронного размера, при этом значение $k \approx 1.7$ свидетельствует о протекании диффузионно-лимитированной агрегации индивидуальных наночастиц и формировании рыхлых структур. Кроме того, при анализе распределений интенсивности рассеянного света по гидродинамическим диаметрам наночастиц методом ДСР было установлено, что для всех суспензий, кроме 3s-PLLA₄₈-MPEG₄₅ и 4s-PLLA₅₀-MPEG₄₅, рассеяние от индивидуальных наночастиц присутствовало в виде интенсивного пика, что может указывать на их численное преобладание над вторичными агрегатами. В противном случае, при массовой доле вторичных агрегатов несколько процентов и выше, детектирование рассеяния от более мелких наночастиц методом ДСР было бы затруднено. При исследовании водных суспензий наночастиц методом рентгеновской дифракции в больших углах было обнаружено, что рефлекс (200)/(110), относящийся к α -форме кристаллического PLLA, наблюдался на дифрактограммах водных суспензий наночастиц 3s-PLLA₄₈-MPEG₄₅ и 4s-PLLA₅₀-MPEG₄₅. В то же время на дифрактограммах наночастиц на основе 6-ти лучевых блок-сополимеров отсутствовали 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, для 3s-PLLA₄₈-MPEG₄₅ и 4s-PLLA₅₀-MPEG₄₅ одной из движущих сил активной вторичной агрегации наночастиц, по-видимому, может являться процесс кристаллизации блоков PLLA. 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

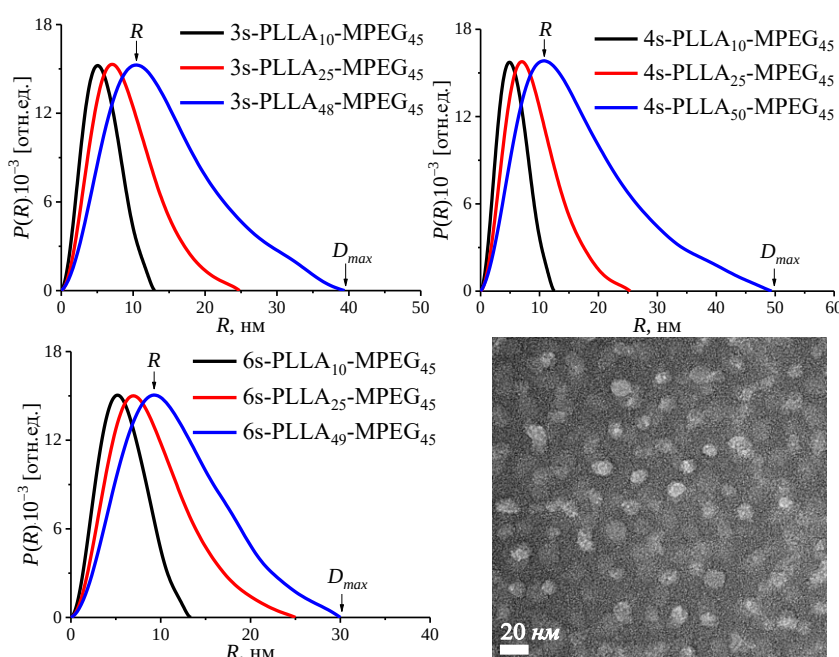


Рисунок 18 – Парные корреляционные функции для наночастиц на основе звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA_n-MPEG₄₅. ПЭМ изображение наночастиц на основе 3s-PLLA₁₀-MPEG₄₅

по мере увеличения размеров наночастиц. После удаления крупных вторичных агрегатов посредством центрифугирования исходных суспензий, были проанализированы параметры индивидуальных наночастиц и рассчитаны функции распределения по расстояниям $P(R)$ (Рисунок 18). Было установлено, что радиус инерции наночастиц (R_g), определенный из наклона прямолинейного участка кривых рассеяния в координатах Гинье $\ln I - s^2$, возрастал в интервале от 4 до 11 нм по мере увеличения DP

гидрофобного блока PLLA_n и слабо зависел от числа лучей (Таблица 3). Для большинства исследуемых индивидуальных наночастиц соотношение R_g к гидродинамическому радиусу (R_h) составило порядка 0.56, что может указывать на более высокую электронную плотность в центре наночастиц, т.е. на их структуру по типу «ядро-оболочка». Известно, что для сферических частиц характерен колоколообразный вид функции $P(R)$ с максимумом R в районе $D_{max}/2$. Отклонение от данной картины в случае наночастиц на основе блок-сополимеров может быть связано с эффектом от изменяющейся плотности гидрофильной оболочки по мере смещения гидрофильно-гидрофобного баланса, появлением асимметричности формы наночастиц и возрастанием их полидисперсности по размерам. В то же время, наиболее близкими к узкодисперсным сферическим объектам, с минимальной разницей между $D_{max}/2$ и R , оказались наночастицы на основе звездообразных блок-сополимеров 3s-, 4s- и 6s-PLLA₁₀-MPEG₄₅. Минимальная массовая доля крупных агрегатов и устойчивость к седиментации делают эти наночастицы перспективными для создания на их основе систем доставки ЛС. Дополнительно их морфология была изучена с помощью ПЭМ, данные которой хорошо коррелируют с представленными ранее и подтверждают формирование индивидуальных наночастиц по форме близкой к сферической (Рисунок 18).

3.2.2 Исследования наносомальных форм противоопухолевых соединений на основе звездообразных блок-сополимеров PLLA-MPEG *in vitro* и *in vivo*

Известно, что на сегодняшний день химиотерапия злокачественных новообразований в значительной мере базируется на использовании платиносодержащих препаратов, нарушающих репликацию молекул ДНК посредством образования внутри- и межцепочечных сшивок. В связи с этим в качестве агентов для солюбилизации в наночастицы на основе звездообразных блок-сополимеров были выбраны два комплекса платины (Рисунок 19). Первый – комплекс Pt(II) (оксалиплатин), обладающий ограниченной растворимостью в воде и одобренный FDA в 2002 году для лечения колоректального рака в паре с 5-фторурацилом (5-Fu). В качестве второго был выбран гидрофобный комплекс Pt(IV) с лигандом на основе лонидамина, способного селективно замедлять гликолиз в опухолевых клетках. Из представленных данных (Таблица 4) видно, что внедрение от 3-х до 4-х масс.% комплексов Pt в полимерные наночастицы на основе звездообразных PLLA₁₀-MPEG₄₅ не привело к изменению их размеров. Наночастицы в обоих

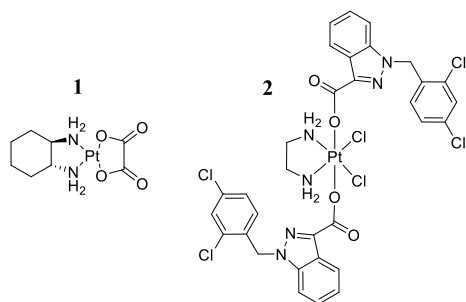


Рисунок 19 – Структурные формулы оксалиплатина (1) и комплекса Pt(IV) с лигандом на основе лонидамина (2)

Таблица 4 – Характеристики наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров, содержащих оксалиплатин (1) и комплекс Pt(IV) (2)

	Блок-сополимер	R_h , нм	Содержание комплекса, масс. %	ЕЕ, %
1	3s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	8±2	3.66±0.01	80.0
	4s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	8±2	3.89±0.03	87.3
	6s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	8±2	4.05±0.03	98.8
2	3s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	8±2	3.67±0.03	63.5
	4s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	8±2	3.19±0.02	66.3
	6s-PLLA ₁₀ -MPEG ₄₅	9±3	3.63±0.03	68.5

случаях демонстрировали высокие показатели эффективности загрузки (ЕЕ) от 63 до 98%. Более низкие значения для комплекса Pt(IV) могут быть связаны с его низкой растворимостью в используемых при нанопреципитации органических растворителях. Установлено, что наночастицы на основе 6s-PLLA₁₀-MPEG₄₅ были способны к одновременной солюбилизации комбинации оксалиплатина с 5-Fu с массовым содержанием 3.1 и 15.6%, соответственно. Соотношение препаратов 1:5 соответствует общепринятым терапевтическим нормам в отношении лечения рака толстой кишки. Как показали исследования *in vitro*, наночастицы на основе звездообразных 3-х, 4-х и 6-ти лучевых PLLA₁₀-MPEG₄₅, не содержащие противоопухолевых препаратов, не проявляли цитотоксических свойств как по отношению к раковой, так и к здоровой линии клеток. По результатам конфокальной микроскопии было установлено, что флуоресцентно-меченые наночастицы способны эффективно проникать и накапливаться в раковых клетках, что может существенно повысить уровень терапии в целом (Рисунок 20). В тоже время при внедрении противораковых соединений в наночастицы уровень цитотоксического действия препаратов остался в области низких микромолярных концентраций, что, с учетом возможного неполного высвобождения их из наночастиц, указывает на сохранение антипролиферативной активности препаратов в наносомальной форме в сравнении со свободной. Благодаря этому наносомальная форма оксалиплатина на основе звездообразного 6s-PLLA₁₀-MPEG₄₅, обладающая максимальной ЕЕ по отношению к этому комплексу, была исследована *in vivo*. Эксперимент проводили на мышах-самцах линии Balb/c с привитыми клетками карциномы кишечника СТ26. На всем протяжении исследования в группе, получавшей лечение в виде полимерных наночастиц содержащих оксалиплатин, объем опухоли оказался значительно меньше по сравнению с группой свободного оксалиплатина и группой контроля (Рисунок 20). В результате разработанная наносомальная форма обеспечивала значимое с точки зрения доклинических испытаний ($\geq 30\%$) торможение роста опухоли на всех этапах эксперимента, кроме 22-го дня.

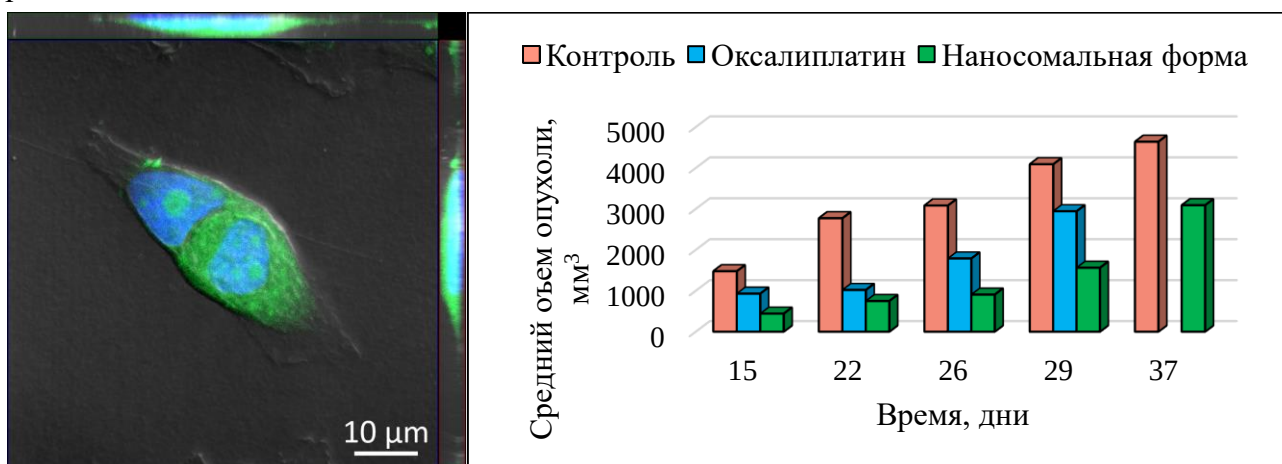


Рисунок 20 – Ортогональная проекция раковых клеток после инкубации с флуоресцентно-мечеными наночастицами на основе 6s-PLLA₁₀-MPEG₄₅ и диаграмма изменения среднего объема опухоли у мышей в группе контроля и группах, получавших лечение в виде оксалиплатина и его наносомальной формы

Анализ биораспределения платины показал, что в группе мышей с наносомальной формой в течение 24 часов наблюдалось практически полное отсутствие накопления препарата в мозге

(<0.07 масс.%) и сердце (<0.20 масс.%), в отличие от свободной формы оксалиплатина. Накопление препарата в селезенке, легких и почках относительно введенного оказалось также существенно ниже. По-видимому, улучшенный профиль биораспределения позволил снизить общий уровень токсического действия препарата и увеличить удельную продолжительность жизни животных на 21% по сравнению с группой контроля. Данный факт подтверждает эффективность использования полимерных наночастиц на основе звездообразных блок-сополимеров для направленной доставки оксалиплатина.

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_n и PDLLA_n 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 формирование 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 °C. В зависимости от состава и строения поли-D,L- и L-лактидов их T_g варьируется в пределах от 32 до 61 °C, а T_m последних от 102 до 164 °C.

4. Установлено, что гидролитическая деградация 3-х и 6-ти лучевых PLLA_n и PDLLA_n ($n = 25$ 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_n (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. Продemonстрировано, что наночастицы на основе звездообразных блок-сополимеров поли-L-лактид-блок-полиэтиленгликоль являются биосовместимыми и способны с высокой эффективностью накапливаться в раковых клетках, солюбилизовать 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 PLLA₁₀-MPEG₄₅, способна на 34% эффективнее замедлять рост опухоли, повышает удельную продолжительность жизни животных и демонстрирует улучшенный профиль биораспределения.

Список цитируемой литературы:

1. Douglas, J. F. Characterization of branching architecture through “universal” ratios of polymer solution properties / J. F. Douglas, J. Roovers, K. F. Freed // *Macromolecules*. – 1990. – Vol. 23. – № 18. – P. 4168-4180.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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).