

УДК 541.64

*Анна РЯБЦЕВА¹, Наталя МІТИНА¹, Наталя БОЙКО², Зоряна НАДАШКЕВИЧ¹,
Ростислав СТОЙКА², Олександр ЗАІЧЕНКО¹*

СИНТЕЗ НОВИХ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЬВМІСНИХ НОСІЇВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

¹Національний університет “Львівська політехніка”,
вул. С.Бандери 12, 79013 Львів, Україна

²Інститут біології клітини НАН України,
вул. Драгоманова 14/16, 79005 Львів, Україна
a.riabtseva@gmail.com

Подано результати досліджень цілеспрямованого синтезу нових поліетиленглікольвмісних олігомерних носіїв, а також їхніх властивостей хемічними та фізико-хемічними методами. Описано можливість отримання нанорозмірних водних систем кон'югатів нових олігомерних носіїв з протипухлинними речовинами.

Ключові слова: полімерні носії, олігопероксиди, ПЕГілювання, системи доставки лікарських препаратів.

Модифікація полімерних носіїв поліетиленгліколем (ПЕГ) – одна з можливих стратегій підвищити розчинність гідрофобних лікарських речовин, збільшити їхній час циркуляції в організмі, зменшити побічні ефекти. Введення в структуру полімерних носіїв фрагментів ПЕГу зазвичай досягається або шляхом кополімеризації з ПЕГ-вмісними мономерами малеїнатного або акрилатного типів або шляхом реакції ПЕГ з реакційно здатними ангідридними, ізоціанатними, епоксидними та іншими групами полімерів.

Мета нашої праці – синтезувати новий ряд біологічно толерантних ПЕГ-вмісних олігомерних носіїв і нанорозмірних систем доставки протипухлинних препаратів в орган-мішень на основі олігомерів з бічними пероксидними та епоксидними групами. Поєднання в структурі носіїв фрагментів ПЕГ з пероксидними групами обумовлює можливість їхнього використання для подальшого молекулярного дизайну носіїв реакціями радикальної прищепленої кополімеризації. Крім того, використання у їхньому складі N-вінілпіролідону дає змогу розраховувати на ліпшу біосумісність отриманих систем.

Для досягнення поставлених цілей запропоновано провести контрольований синтез бінарних і потрійних кополімерів, які поєднують у своїй структурі пероксидні групи, здатні до утворення вільних радикалів у заданому температурному діапазоні, та епоксидні групи, що забезпечують взаємодію з поліетиленгліколями,

спиртами, амінами та іншими сполуками, в тім числі продуктами природного походження, які містять рухливий атом водню.

Полімеризацією в розчині етилацетату при 343К отримали кополімери ненасиченого пероксиду 2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін (ВЕП) і гліцидил метакрилату (ГМА), та N-вінілпіролідону (N-ВП), ВЕП і ГМА загальних структур, які зображені на рис. 1, 2. Полімеризацію контролювали дилатометричним і гравіметричними методами, доводили до конверсії 60 – 65%. Отримані олігоперокси очищали багаторазовим переосадженням із розчинів в ацетоні в надлишок осаджувача гексану. Структури отриманих функціональних олігопероксидів підтверджували ІЧ- та ЯМР-спектроскопією, склад визначали методами елементного та функціонального аналізу, вміст пероксидних фрагментів визначали методом газохроматографічного аналізу продуктів термічного розкладу олігомерів при 483К. Молекулярну масу визначали методом гель-проникної хроматографії, використовуючи рідинний хроматограф “WatersGPC/HPLC” на стирогелевих колонках, елюент – тетрагідрофуран, швидкість елюювання 0,3 мл/год. Поверхневий натяг розчинів олігомерів вимірювали на приладі ППНЛ-1 за методом Ребіндера.

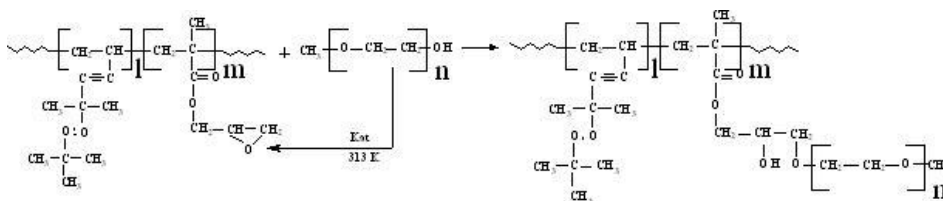


Рис. 1. Схема взаємодії ПЕГ з кополімером складу ВЕП-ГМА.

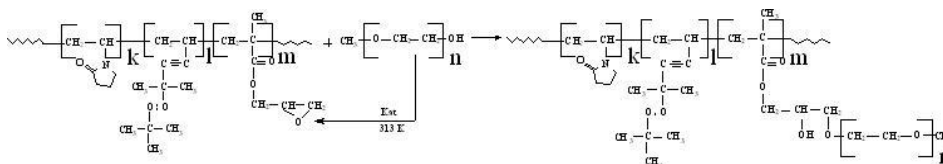


Рис. 2. Схема взаємодії ПЕГ з кополімером складу N-ВП-ВЕП-ГМА.

1. Синтез і характеристики вихідних кополімерів

Із експериментально визначених складів кополімерів і розрахованих параметрів їхньої мікроструктури, поданих у табл. 1, видно, що внаслідок полімеризації ВЕП і ГМА утворюються статистичні кополімери, збагачені пероксидовмісними ланками порівняно з вихідною системою мономерів. Це пояснюється більшою активністю ВЕП при кополімеризації з ГМА і погоджується з розрахованими за величинами Q і e значеннями їхніх констант кополімеризації: $r_1 = 1,32$ та $r_2 = 0,41$, ВЕП і ГМА, відповідно. Аналіз даних складу та мікроструктури кополімерів N-ВП-ВЕП-ГМА в табл. 2 свідчить про те, що внаслідок полімеризації утворюються кополімери з приблизно однаковою довжиною ланок, що пояснюється зростанням констант перехресного росту ланцюга.

Таблиця 1

Склад і мікроструктура кополімеру ВЕП-ГМА ($[ДАК]=5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, етилацетат, 343К, $[мономерів] = 4$ моль/л; ступінь перетворення мономерної суміші – 60-65%)

Склад мономерної суміші, % мол		Склад кополімеру, % мол		Довжина блоків з однакових ланок		R
ВЕП	ГМА	ВЕП-ланки	ГМА-ланки	$l_{\text{ВЕП}}$	$l_{\text{ГМА}}$	
25	75	33,61	66,39	1,35	2,54	24,9
15	85	24,55	75,45	1,18	4,01	20,9
10	90	16,80	83,20	1,11	5,72	15,1
5	95	6,19	93,81	1,06	10,84	6,0

l – середня довжина блоків з мономерних ланок, R – кількість блоків з однакових ланок на 100 ланок кополімеру.

Таблиця 2

Склад і мікроструктура кополімеру N-ВП-ВЕП-ГМА ($[ДАК]=5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, етилацетат, 343К, $[мономерів] = 4$ моль/л; ступінь перетворення мономерної суміші – 60-65%)

Склад мономерної суміші, % мол			Склад кополімеру, % мол			Довжина блоків з однакових ланок			R
N-ВП	ВЕП	ГМА	N-ВП-ланки	ВЕП-ланки	ГМА-ланки	$l_{\text{N-ВП}}$	$l_{\text{ВЕП}}$	$l_{\text{ГМА}}$	
63,14	20,71	16,15	63,35	21,06	15,59	1,1	1,98	1,3	76,05
70,57	16,53	12,90	70,80	14,72	14,48	1,14	1,89	1,27	77,16
75,51	13,76	10,73	74,53	15,73	9,74	1,18	1,81	1,24	76,8
81,09	7,39	11,53	81,90	7,95	10,15	1,24	1,40	1,34	74,28
72,71	6,62	20,67	67,47	5,07	27,46	1,14	1,25	1,69	74,75

l – середня довжина блоків з мономерних ланок, R – кількість блоків з однакових ланок на 100 ланок кополімеру.

Молекулярно-масові характеристики кополімерів (табл. 3, 4 і рис. 3, 4) свідчать про очікуване зменшення величини молекулярної маси олігопероксидів і звуження їхнього розподілу зі збільшенням вмісту пероксидного мономера в вихідній реакційній суміші, що збігається з виявленим раніше [4] фактом участі ВЕП у реакціях передачі та обриву молекулярних ланцюгів.

Таблиця 3

Молекулярно-масові характеристики кополімерів ВЕП-ГМА

Склад мономерної суміші, %		M_n , г/мол	M_w , г/мол	D
ВЕП	ГМА			
25	75	3500	7250	2,05
15	85	5120	10810	2,11
10	90	5930	13950	2,35
5	95	61100	204680	3,35

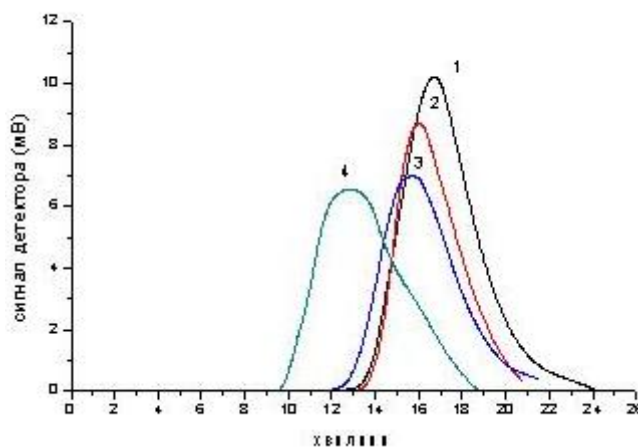


Рис. 3. Функції молекулярно-масового розподілу продуктів кополімеризації ВЕП-ГМА отриманих при різному співвідношенні мономерів: 1 – 25:75; 2 – 15:85; 3 – 10:90; 4 – 5:95.

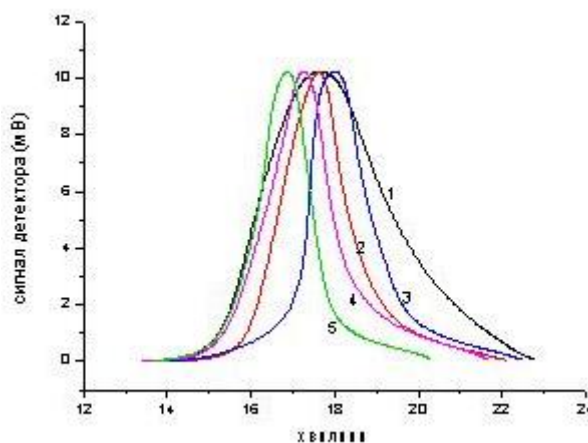


Рис. 4. Функції молекулярно-масового розподілу продуктів кополімеризації N-ВП-ВЕП-ГМА отриманих при різному співвідношенні мономерів: 1 – 63,14:20,71:16,15; 2 – 70,57:16,53:12,90; 3 – 75,51:13,76:10,53; 4 – 81,09:7,39:11,53; 5 – 72,71:6,62:20,67.

Кополімери ВЕП-ГМА містять контрольовану кількість реакційно здатних пероксидних і епоксидних фрагментів (табл. 1), добре розчиняються в полярних органічних розчинниках, але нерозчинні у воді, що обмежує їхнє використання як носіїв для лікарських препаратів.

Олігомери складу N-ВП-ВЕП-ГМА характеризуються меншою молекулярною масою та значенням полідисперсності, що пояснюється наявністю значної кількості

ті N-вінілпіролідону та меншої кількості гліцидил метакрилату у їхньому складі. Вони розчиняються у воді з утворенням мутних розчинів та розчинні у полярних органічних розчинниках.

Таблиця 4

Молекулярно-масові характеристики кополімерів N-ВП-ВЕР-ГМА

Склад мономерної суміші, %			M _n , г/мол	M _w , г/мол	D
N-ВП	ВЕР	ГМА			
63,14	20,71	16,15	2000	4630	1,94
70,57	16,53	12,90	3000	5354	1,77
75,51	13,76	10,73	2500	4157	1,8
81,09	7,39	11,53	3500	6505	1,88
72,71	6,62	20,67	4800	8208	1,68

2. Синтез і характеристики модифікованих поліетиленглікольвмісних кополімерів

З метою створення розчинних у воді олігомерних носіїв на основі кополімеру ВЕР-ГМА, поліпшення розчинності кополімерів N-ВП-ВЕР-ГМА, а також поліпшення проникності їхніх кон'югатів з ліками через клітинну мембрану досліджено можливість введення в їхню структуру молекул гідрофільного монозаміщеного поліетиленгліколю (м-ПЕГ) молекулярної маси 750 г/моль (Aldrich). Реакцію полімераналогічного перетворення виконували взаємодією гідроксильної групи м-ПЕГ з бічними епоксидними групами кополімерів. Шляхом підбору оптимальних умов модифікацію проводили так: модифікацію ВЕР-ГМА – в середовищі сухого діоксану, а модифікацію N-ВП-ВЕР-ГМА – в середовищі хлороформу при температурі 313 К. Як каталізатор використовували етерат трифтористого бору. Отримані внаслідок реакції пастоподібний продукт ВЕР-(ГМА+ПЕГ) та кристалічний N-ВП-ВЕР-ГМА добре розчинні у воді або, залежно від складу вихідного олігопероксиду, утворюють стабільні водні колоїдні системи.

Загальні схеми утворення олігопероксидів з ковалентно зв'язаними ПЕГ-вмісними фрагментами показано на рис. 3, 4.

У продукті полімераналогічного перетворення кополімерів ВЕР-ГМА та N-ВП-ВЕР-ГМА немає епоксидної групи. Структуру отриманих продуктів взаємодії олігомерів з монозаміщеним ПЕГ підтверджено ІЧ-спектроскопією (рис. 5, 6).

Як видно з рис. 5, в області 3000–2800 см⁻¹ у спектрах вихідного та кінцевого продуктів є характерні смуги поглинання, які відповідають СН₂-групам у вуглецевому скелеті. В спектрі ПЕГ-вмісного кополімеру з'являється широкий пік (3403 см⁻¹), характерний для –ОН груп, немає у вихідному кополімері, що підтверджує наявність ПЕГ фрагментів у молекулі продукту реакції. Сильно виражені смуги поглинання при 1300–1050 см⁻¹, властиві етерним групам. У спектрі вихідного олігопероксиду наявні смуги симетричних валентних коливань епоксидного кільця при 1248 см⁻¹, характерні для епоксидів смуги поглинання при 950–810 та 840–750 см⁻¹, яких немає в продукті його взаємодії з м-ПЕГ.

Аналогічно на рис. 6 видно зменшення інтенсивності піків у смугах поглинання 950–810 та 840–750 см⁻¹, та появи піка в області 1300–1050 см⁻¹, що свідчить про збільшення кількості етерних груп завдяки приєднанню фрагментів ПЕГ.

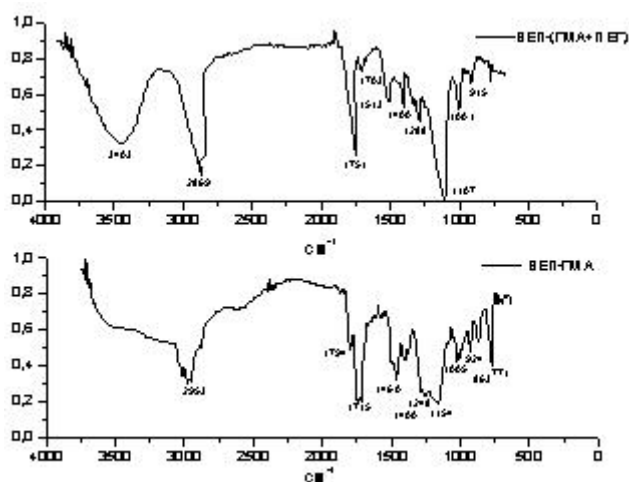


Рис. 5. ІЧ-спектри вихідного ВЕП-ГМА та модифікованого ВЕП-(ГМА+ПЕГ) олігомерів.

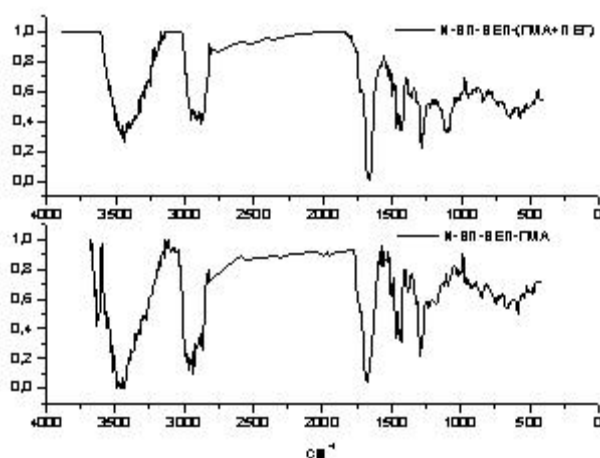


Рис. 6. ІЧ-спектри вихідного N-ВП-ВЕП-ГМА та модифікованого N-ВП-ВЕП-(ГМА+ПЕГ) олігомерів.

Крім того, успішне проведення реакції між епоксидвмісними олігомерами та ПЕГ підтверджують функції молекулярно-масового розподілу кополімеру ВЕП-ГМА та модифікованого ВЕП-(ГМА+ПЕГ) та ізотерми поверхневого натягу N-ВП-ВЕП-ГМА та N-ВП-ВЕП-(ГМА+ПЕГ).

З рис. 7 видно, що ПЕГ-вмісний олігомерний носій ВЕП-(ГМА+ПЕГ) має суттєво більший час затримки при елюванні в стирогелевій колонці, що пояснюється, як відомо [5], утворенням компактно упакованої конформаційної структури

олігомеру в розчині внаслідок утворення гребенеподібного кополімеру з полярними бічними ПЕГ-вмісними гілками.

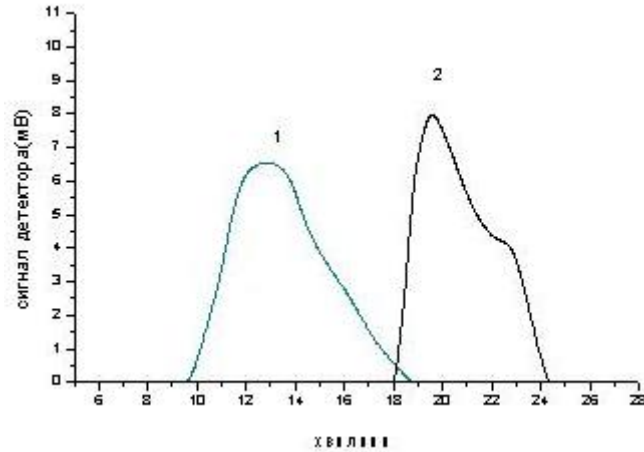


Рис. 7. Функції молекулярно-масового розподілу кополімеру ВЕП-ГМА (5:95) (1) та прищепленого кополімеру ВЕП-ГМА (5:95) – graft-ПЕГ (2).

Ізотерми поверхневого натягу (рис. 8) N-ВП-вмісного олігомеру до і після модифікації поліетиленгліколем свідчать про суттєве зростання поверхневої активності, внаслідок зміни гідрофільно-ліпофільного балансу при пегілюванні.

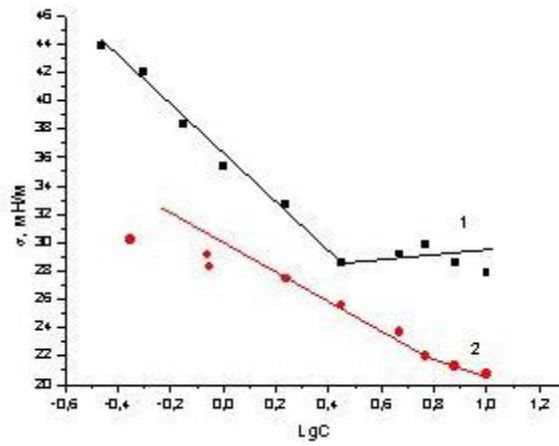


Рис. 8. Ізотерма поверхневого натягу полімеру N-ВП-ВЕП-ГМА (1) та кон'югату N-ВП-ВЕП-(ГМА+ПЕГ) (2).

3. Застосування одержаних поліетиленглікольовмісних носіїв

На основі синтезованих олігомерних носіїв шляхом їхньої взаємодії з лікарським препаратом у спільному розчиннику та подальшому ультразвуковому диспергуванні суміші у фізіологічному розчині було отримано нанорозмірні водні системи з протипухлинним препаратом доксорубіцином. Одержані внаслідок біологічних досліджень дані свідчать про те, що синтезовані ПЕГ-вмісні полімери в досліджуваному діапазоні концентрацій нетоксичні та ефективні і перспективні як носії протипухлинних препаратів.

Наприклад, носій ВЕП-(ГМА+ПЕГ) забезпечує протипухлинну дію антинеопластичного препарату доксорубіцину в концентрації 0,1 мкг/мл, аналогічну до дії чистого доксорубіцину в концентрації 1 мкг/мл, тобто в 10 разів більшій.

Використання таких носіїв у хеміотерапії раку може допомогти суттєво знизити токсичний ефект протипухлинних препаратів на організм пацієнтів, що надзвичайно важливо для лікування дітей, пацієнтів похилого віку або дуже ослаблених онкохворих.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Masayuki Yokoyama* Polymeric Micelles for the Targeting of Hydrophobic Drugs // *Polymeric Drug Delivery Systems*. – 2005. – Vol. 148. – P.533-576.
2. *Vladimir P. Torchilin* Polymeric Micelles as Pharmaceutical Carriers // *Polymers in Drug Delivery*. – 2006. – P.111-125.
3. *Alcantar N.A., Avdil E.S., Israelachvili T.N.* Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces // *Journal of biomedical materials research*. – 2000. – Vol. 51, №3. – P.343-351.
4. *Токарев В.С., Минько С.С., Заиченко А.С., Воронов С.А., Кучер Р.В., Рябова О.Я.* Об эффекте слабого ингибирования радикальной полимеризации пероксидами с сопряженными системами связей // *Наука. Доклады Академии Навк СССР*. – 1987. – Т. 292, №6. – с.1434-1436.
5. *Таимухамедов С.А., Акбаров Х.И., Тиллаев Р.С.* Межмолекулярные взаимодействия в растворах привитых сополимеров // *Успехи химии*. – 1986. – Вып.11. – с.1920-1935.

SUMMARY

Anna RIABTSEVA¹, Natalya MITINA¹, Natalya BOYKO², Zoryana NADASHKEVYCH¹,
Rostyslav STOIKА², Oleksandr ZAICHENKO¹

SYNTHESIS OF NOVEL PEGYLATED CARRIERS FOR NANOSCALE DRUG DELIVERY SYSTEMS

¹*Lviv Polytechnic National University,
S. Bandery 12, 79013 Lviv, Ukraine*

²*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine,
Drahomanova 14/16, 79005 Lviv, Ukraine
a.riabtseva@gmail.com*

The results of purposeful synthesis of new oligomeric PEGylated carriers and their properties studied by chemical and physical-chemical methods are presented in the article. It is shown the opportunity to obtain nanoscale water systems of conjugates of novel oligomeric carriers with anticancer substances.

Keywords: polymeric carriers, oligoperoxides, PEGylation, drug delivery systems.

РЕЗЮМЕ

Анна РЯБЦЕВА¹, Наталя МИТИНА¹, Наталя БОЙКО², Зоряна НАДАШКЕВИЧ¹, Ростислав СТОЙКА², Александр ЗАИЧЕНКО¹

**СИНТЕЗ НОВЫХ ПЕГИЛИРОВАННЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ДОСТАВКИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

*¹Национальный университет "Львовская политехника",
ул. С.Бандеры 12, 79013 Львов, Украина*

*²Институт биологии клетки НАН Украины,
ул. Драгоманова 14/16, 79005 Львов, Украина
a.riabtseva@gmail.com*

Представлены результаты исследований целенаправленного синтеза новых пегелированных олигомерных носителей, а также их свойств химическими и физико-химическими методами. Показана возможность получения наноразмерных водных систем конъюгатов новых олигомерных носителей с противоопухолевыми веществами.

Ключевые слова: полимерные носители, олигопероксиды, ПЕГилирование, системы доставки лекарственных препаратов.

Надійшла 30.05.2011.
Після доопрацьована 30.06.2011.
Прийнята до друку 07.07.2011.