

«BNVTVS18»

**Одержання поверхнево-активних кополіестерів
з хромофорними ланками в макроланцюгу**

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
1. Одержання нових кополієстерів з хромофорними групами в макроланцюгу	5
2. Дослідження властивостей кополієстерів з хромофорними групами в макроланцюгу	9
2.1 Поверхнево-активні властивості флуоресцеїновмісних кополієстерів.....	9
2.2 Солюбілізація Судану III водними дисперсіями кополієстерів з флуоресцентними фрагментами.....	17
2.3 Визначення коефіцієнту розподілу кополієстерів у системі октанол-вода.....	19
3. Дослідження можливостей практичного застосування отриманих кополієстерів.....	23
ВИСНОВКИ.....	27
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	28
АНОТАЦІЯ.....	29 44

ВСТУП

Розвиток медицини та пов'язаних з нею галузей (фармацевтики, біохімії і хімії), як видно з великої кількості наукових та науково-практичних публікацій, передбачає щораз тісніший взаємозв'язок з можливостями та досягненнями нанотехнологій. І одними із перших завдань, які покликані вирішувати нанотехнології у медицині, це створення нових лікарських форм для нанофармакологічних препаратів і направленого транспорту наноліків до хворих органів. Сьогодні розробляються нові препарати на основі наноносіїв для лікування онкологічних захворювань, які підсилюють основні переваги протиракових засобів і водночас зменшують або зовсім нівелюють їх негативні властивості. При цьому результативність лікування багато в чому визначається ефективністю діагностики, яка дозволяла би виявляти злоякісний процес на ранніх стадіях розвитку, а також визначати місце його локалізації та ступеня поширення.

В дослідженнях пов'язаних з встановленням ефективності наноліків існує проблема моніторингу їх поширення, яка залишається ще не вирішеною повністю до сьогодні. У зв'язку з цим розробка нових підходів до створення нових діагностичних засобів, які можуть бути використані у лікуванні онкологічних захворювань є надзвичайно актуальною [1].

Одним з напрямків розв'язання цієї проблеми є вивчення дисперсних систем на основі амфіфільних полімерів, як перспективної основи для створення ліків нового покоління. Розвиток напрямку нанотерапевтичної доставки ліків - саме через міцелярні структури, дозволяє препаратам виконувати свої функції незалежно від деяких їх несприятливих фізико-хімічних властивостей, наприклад недостатньої розчинності. Вони можуть забезпечити послідовне подолання декількох біологічних бар'єрів з можливістю регулювати час та місце дії, тобто забезпечувати досягнення заданого лікувального ефекту. У таких багатоцільових конструкціях кожен компонент виконує власне завдання – або біоідентифікацію, або захист від

гідролітичної деградації, або зменшення токсичності чи подолання біобар'єрів і нарешті ефективний внутрішньоклітинний транспорт [2].

Метою даної роботи є синтез нових біосумісних кополієстерів - здатних до їх візуалізації методами спектрального аналізу, як полімерної основи, яка відповідає всім вимогам до засобів транспорту терапевтичних речовин в організмі.

Для досягнення цієї мети необхідно було виконати такі завдання:

- провести синтези кополієстерів N-похідних глютамінової кислоти з полієтердіолами різної молекулярної маси та флуоресцеїном;

- вивчити поверхнево-активні властивості амфіфільних кополієстерів в залежності від природи мономерних ланок та кількості хромофорного фрагменту (флуоресцеїну) у основному ланцюгу;

- вивчити перерозподіл кополієстерів в системі вода-октанол в залежності від їх складу та природи мономерів та солюбілізацію водонерозчинних сполук дисперсіями нових флуоресцеїнвмісних кополієстерів;

- продемонструвати шляхи практичного використання отриманих кополієстерів з хромофором у макроланцюгу.

1. Одержання амінофункційних кополієстерів з хромофорними групами в макролакцюгу

Синтез полімерних молекул, в яких флуорофор ковалентно приєднаний в структурі макромолекули, гарантує можливість виявлення таких макромолекул в тканинах організму, візуалізувати наноносії на клітинному рівні і таким чином встановити ефективність носія [3].

Можна виділити декілька відомих фактів, які варто брати до уваги при обґрунтуванні шляхів синтезу кополієстерів (псевдополіамінокислот) за використання флуоресцеїну як одного з мономерів у реакції поліконденсації:

1) в безводних середовищах (в умовах синтезу кополієстерів) флуоресцеїн існує переважно у формі внутрішнього лактона і його молекула містить дві гідроксильні групи (рис. 1); 2) реакційна здатність гідроксильних груп фенольного типу у класичних реакціях естерифікації є невисокою і тому, наприклад, отримання дієстерів карбонових кислот та флуоресцеїну здійснюється через використання високореакційноздатних ангідридів або хлорангідридів кислот.

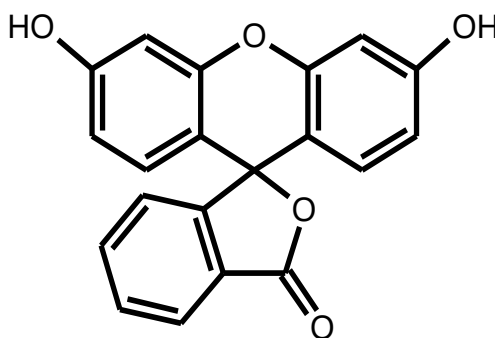


Рис.1. Структурна формула флуоресцеїну (у неводному середовищі)

Разом з тим відомо також, що активація карбоксильної групи кислоти дициклогексилкарбодіїмідом та у присутності високонуклеофільної добавки – диметиламінопіридину у реакції Стегліха суттєво підвищує її реакційну здатність і є літературні дані про те, що така активована форма здатна вступати у взаємодію навіть з малоактивними гідроксильними групами з утворенням естерного зв'язку [4].

Таким чином, є всі теоретичні підстави вважати, що в умовах реакції Стегліха можливе утворення естерів карбонових кислот і флуоресцеїну. А у випадку проведення реакцій поліконденсації (при створенні співвідношення реагуючих груп близького до еквімольного) його можна розглядати як один з комономерів.

Умови проведення синтезу флуоресцеїнвмісних кополімерів передбачали використання співвідношень реагуючих груп (карбоксильних та гідроксильних) близьких до еквімольних, а також різної кількості флуоресцеїну як частки від мономерів з гідроксильними групами у початковій реакційній суміші. При цьому синтез здійснювали в одну стадію через введення заданої кількості флуоресцеїну взамін частини комономерів з гідроксильними функційними групами забезпечуючи задане співвідношення між гідроксильними та карбоксильними групами в реакційній суміші. Перебіг реакції Стегліха в даному випадку можна зобразити схемою на рис.1.

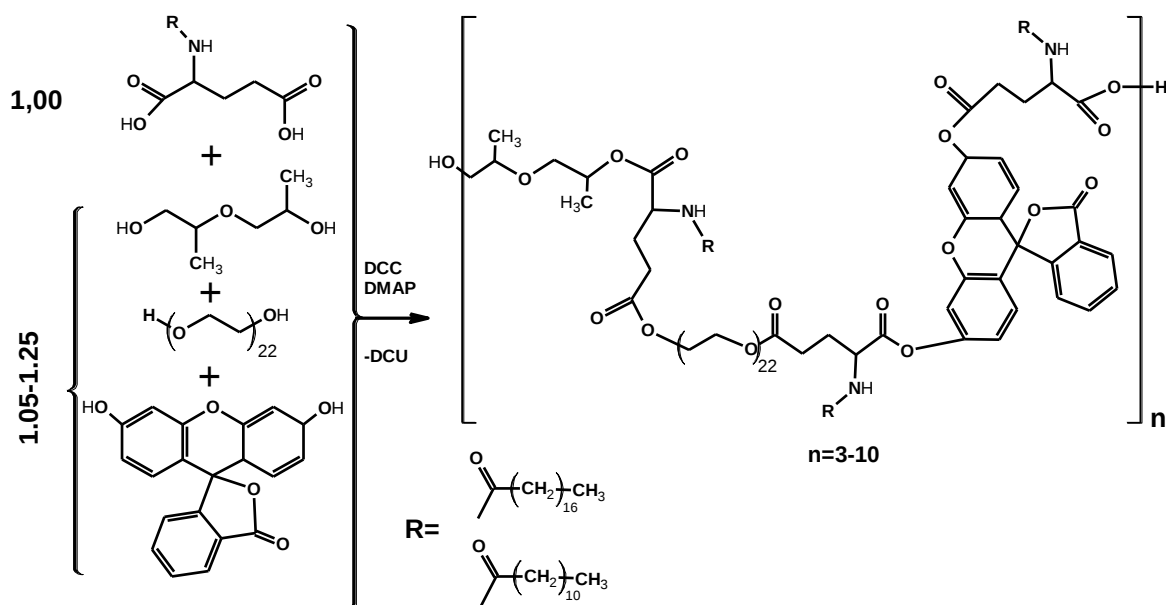


Рис.1. Схема отримання флуоресцеїнвмісного кополіестеру при поліконденсації його з N-заміщеною глутаміновою кислотою і поліетердіолами за реакцією Стегліха

В результаті було отримано та охарактеризовано ряд амфіфільних кополієстерів N-похідних глутамінової кислоти (стеарил-, лаурил-), полієтердіолів (поліетиленгліколів різної молярної маси, дипропіленгліколю) та флуоресцеїну (рис.1). Структуру отриманих кополієстерів підтверджували ІЧ, ПМР та ЯМР C^{13} спектроскопією, молекулярну масу та молекулярно-масовий розподіл - гельпроникною хроматографією.

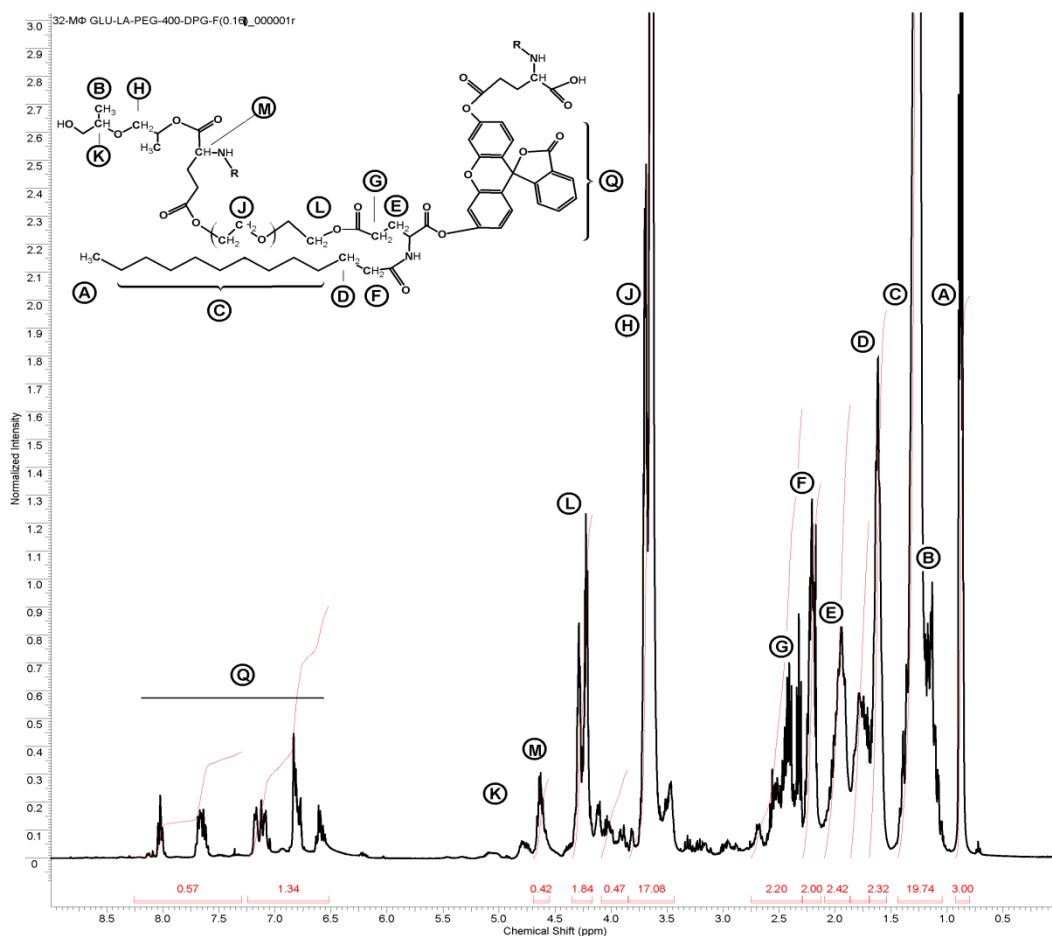


Рис. 2. ПМР спектр кополієстеру флуоресцеїну з 2-додеканамінопентадіоною та поліетиленгліколю 400 і дипропіленгліколю МФ32

Отриманий ПМР спектр (рис.2) дозволяє провести віднесення сигналів протонів і за їх інтегралами розрахувати вміст компонентів. Сигнали від 10 протонів, які належать фрагменту флуоресцеїну, на спектрі позначені як Q проявляються в області від 6,5 до 8,2 м.ч.

Опираючись на оцінку інтенсивності сигналів від протонів метильної групи фрагменту лаурилового замісника 2-додеканамінопентадіонової кислоти

із хімічним зсувом 0,87 м.ч. (інтеграл 1) і враховуючи доволі точне співпадіння величини сумарної інтенсивності сигналів від протонів метиленових груп у фрагменті 2-додеканамінопентадіонової кислоти (інтеграл 2) можна розрахувати співвідношення фрагментів різної природи в отриманому продукті.

Аналіз результатів, наведених в таблиці 1, дають можливість встановити, що залежності молекулярної маси кополієстерів від зміни кількості флуоресцеїну у початковій мономерній суміші в заданому діапазоні (до 16% мольн) не спостерігається.

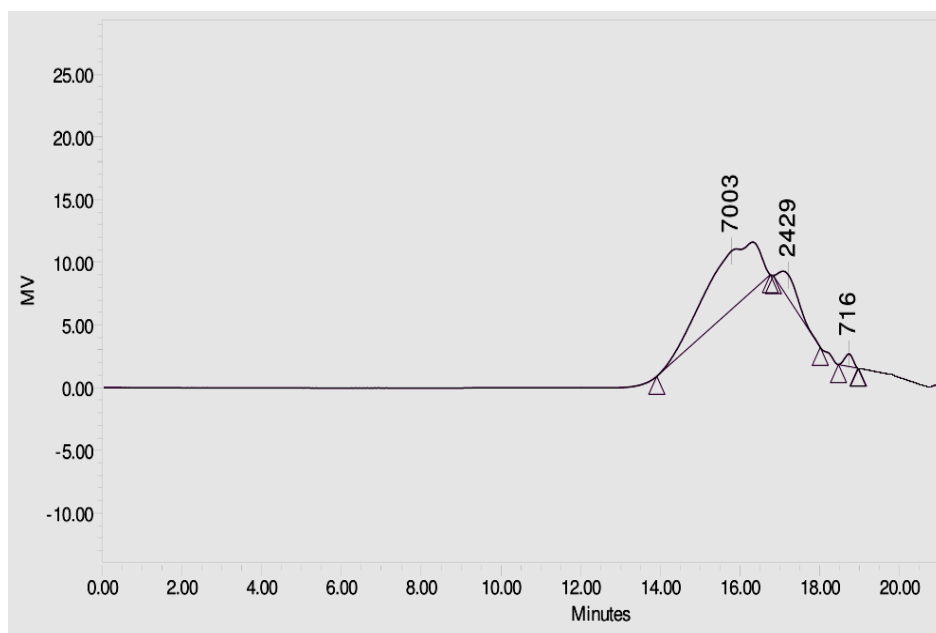


Рис. 3. Молекулярно масовий розподіл кополієстеру 34-МФ Glu(La)-PEG1000-DPG-F(5.56%)

Таким чином в результаті проведеної роботи за реакцією Стегліха синтезовано кополієстери, які містять хромофорні фрагменти флуоресцеїну в основному макроланцюзі, та підтверджено їх склад та будову. Розроблений метод синтезу дозволяє на основі N-похідних глутамінової кислоти, полієстерів різної ММ та природи отримувати кополієстери, макромолекули яких містять задану кількість хромофорних фрагментів.

Таблиця 1.

Умови синтезу та основні характеристики кополієстерів на основі Glu(A)

	Позначення	Формула	Склад мономерної суміші, Частка мольна				Вихід полієстеру, %	Вміст флуоресцеїну в полімері, %	Середня ММ кополієстеру Мп
			Двоосновна к-та	PEG	DPG	F			
1	32-МФ	GluLa-PEG400-DPG- F	1.00	0.614	0.274	0.163	80,39	9,64	2950
2	27-MF	GluLa-PEG600-DPG- F		0,678	0,271	0,10	92,3	5,2	3520
3	28-MF	GluLa-PEG600-DPG- F		0,548	0,274	0,232	86,4	13,07	3920
4	36-МФ	GluLa-PEG1000-DPG- F		0,716	0,286	0,053	83,52	1,87	5460
5	33-МФ	GluLa-PEG1000-DPG- F		0,673	0,269	0,103	85,05	3,75	3510
6	34-МФ	Glu-La-PEG1000-DPG- F		0,613	0,260	0,165	90,42	5,56	4930
7	41-МФ	Glu-La-PEG1000-DPG		0,751	0,302	0	81,03	0	6875
8	39-МФ	GluST-PEG400-DPG- F		0.680	0.273	0.103	88,4	4,7	3640
9	29-МФ	GluST-PEG600-DPG- F		0.676	0.269	0.101	73,54	4,03	3725
10	38-МФ	GluST-PEG1000-DPG -F		0.679	0.253	0.101	86,3	2,87	3360
11	37-МФ	GluST-PEG1000-DPG -F		0.610	0.270	0.165	72,3	5,87	6010
12	40-МФ	Glu-ST-PEG1000-DPG		0,749	0,301	0	77,08	0	8855

Поєднання в одній молекулі фрагментів ліпофільної природи таких як N-похідні глутамінової кислоти та гідрофільних фрагментів поліоксиетиленгліколів забезпечує амфіфільність таких структур і приводить до здатності понижати поверхневий натяг водних розчинів та утворювати самостабілізовані колоїдні системи.

2. Дослідження властивостей одержаних кополієстерів

2.1 Поверхнево-активні властивості амфіфільних флуоресцеїновмісних кополієстерів

Колоїдно-хімічні властивості амфіфільних сполук перш за все визначаються їх здатністю понижати поверхневий натяг на межі розділу фаз та

здатністю утворювати самостабілізовані дисперсії полімерних наночастинок у воді [5]. Величина критичної концентрації міцелоутворення (ККМ) – важлива колоїдно-хімічна характеристика поверхнево-активних речовин. Вона пов’язана з гідрофільно-олеофільним балансом (ГЛБ) молекул ПАР, характеризує їх здатність до утворення міцелярних структур і служить мірою олеофільності цих структур.

У таблиці 2 наведено колоїдно-хімічні характеристики водних дисперсій синтезованих кополієстерів, в яких флуоресцеїн входить в різних кількостях як один з комономерів.

Таблиця 2

Колоїдно-хімічні характеристики дисперсій синтезованих кополієстерів у воді

Назва полімеру	Вміст флуоресцеїну в кополієстері, %	ККМ, %	ККА, %	Максимальне пониження поверхневого натягу, мН/м
27-МФ Glu-La-PEG600-DPG-F(0,102)	5,2	0,0069	0,0403	36,05
36-МФ Glu-La-PEG1000-DPG-F(0,05)	1.87	0,0094	0,2391	35,7
33-МФ Glu-La-PEG1000-DPG-F(0,1)	3.75	0,0093	0,0933	36,3
34-МФ Glu-La-PEG1000-DPG-F(0,165)	5.56	0,01	-	36,6
45-МФ Glu-La-PEG1000-DPG	0	0,0095	0,45	37,4
44-МФ Glu-La-PEG1000-DEG-F(0,165)	6,815	0,0107	0,082	41,5
43-МФ Glu-La-PEG1000 - F(0,16)	5.32	0,0095	0,0776	42
39-МФ Glu-ST-PEG400-DPG-F(0,1031)	4,7	0,0131	0,0448	45,7
29-МФ Glu-ST-PEG600-DPG- F(0,10111)	4,026	0,0096	0,0415	44,7
38-МФ Glu-ST-PEG1000-DPG-F(0,1006)	2,87	0,0128	0,236	41,6
37-МФ Glu-ST-PEG1000-DPG-F(0,1655)	5,87	0,0052	0,031	46,5
40-МФ Glu-ST-PEG1000-DPG	0	0,0109	0,084	49,72

Аналіз ізоTERM поверхневого натягу для кополієстерів на основі лаурилглутамінової кислоти дозволяє стверджувати, що у випадку використання флуоресцеїну як одного з комономерів при його вмісті в кополієстерах до 10% поверхнево-активні властивості змінюються по різному в залежності від молекулярної маси гідрофільного комономеру (рис.4, 5).

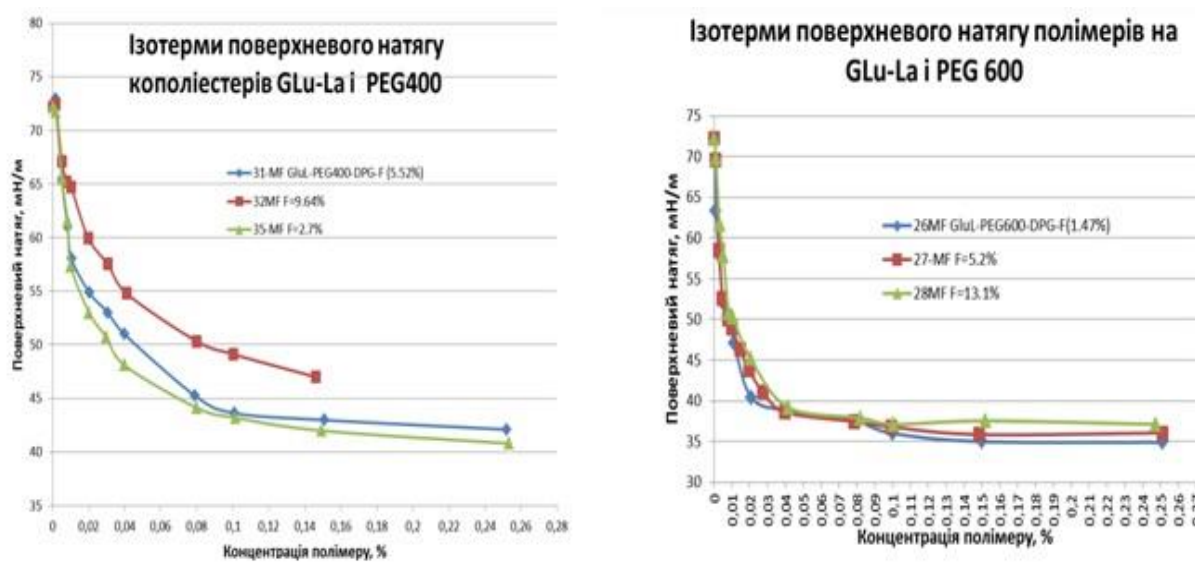


Рис.4. Ізотерми поверхневого натягу кополієстерів GluLa і полієтердіолів PEG400, PEG600 і DPG з різним вмістом флуоресцеїну

Про це свідчать значення максимального пониження поверхневого натягу їх розчинів у воді. З наведених даних видно, що у випадку кополієстерів з флуоресцеїном та при використанні як гідрофільного мономеру у синтезі поліетиленгліколів різної молекулярної маси плато максимального пониження поверхневого натягу однакове тільки для кополієстерів з ПЕГ600 і з ПЕГ1000 і складає 35-37 мН/м.

У випадку використання для синтезу кополієстерів як гідрофільного комомера ПЕГ400, плато пониження має більші значення (43-47 мН/м). Крім того, отримання дисперсій на основі таких кополієстерів вимагає тривалого диспергування з застосуванням ультразвукової обробки. Відповідно стійкість таких дисперсій дуже невисока. Уже у випадку використання ПЕГ 600 як

комономеру для синтезу отримані кополіестери здатні до диспергування і значення плато поверхневого натягу наближаються до 35-37 мН/м.

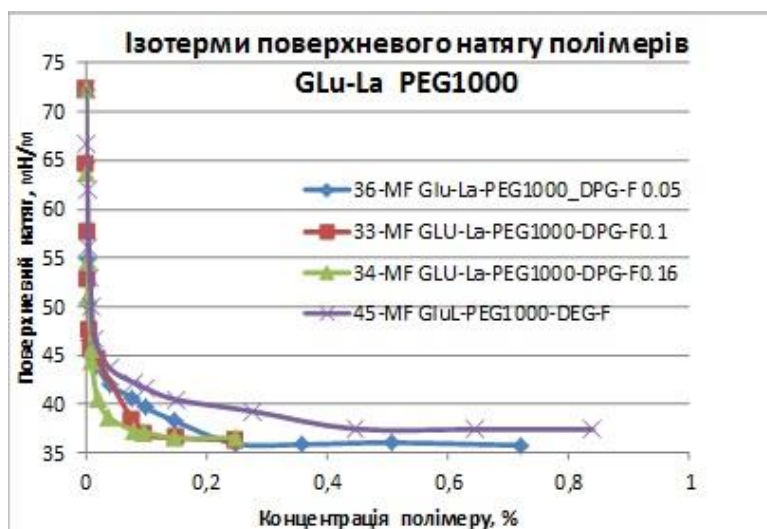


Рис.5. Ізотерми поверхневого натягу у воді для кополіестерів на основі GluLa з PEG1000 з різним вмістом флуоресцеїну

Найбільш явно залежність поверхневого натягу від вмісту флуоресцеїну спостерігається у ряді кополіестерів, у синтез яких проведено за використання як гідрофільного комономеру ПЕГ1000. Хоча для цих кополіестерів плато пониження на ізотермі поверхневого натягу на такому ж рівні як і у випадку ПЕГ600, проте можна відмітити певні особливості.

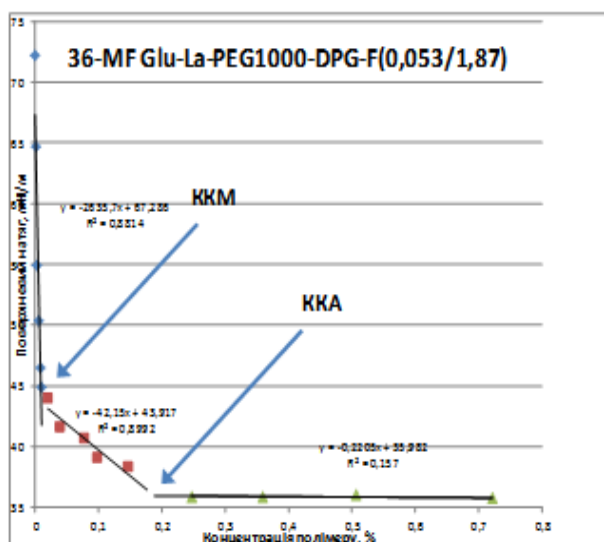


Рис.6. Характерна ізотерма поверхневого натягу кополіестеру отриманого на основі стеаройлглутамінової кислоти, ПЕГ1000 і ДПГ.

Для кополієстерів-аналогів, які синтезовані в тих же умовах але без флуоресцеїну на ізотермах поверхневого натягу як правило спостерігаються два характерні перегини (рис. 6).

Проте у випадку кополієстерів з флуоресцеїном такий характер кривих найбільш явно спостерігається тільки для продуктів, у яких гідрофільним фрагментом виступає поліоксиетиленгліколь з молярною масою 1000 (Рис. 5).

Інтерпретація цих зламів може бути проведена опираючись на аналогічні ізотерми поверхневого натягу, які отримувались для більшості кополієстерів, які в попередніх роботах були синтезовані без використання флуоресцеїну [6]. Перший злам відповідає істинному значенню концентрації, при якій у розчині з'являються первинні міцели - ККМ. Другий злам може бути інтерпретований як концентрація при якій закінчуються процеси організованої перебудови первинних частинок міцелярної фази у більш складні агрегати - ККА. І саме цей параметр виявився чутливим до збільшення вмісту флуоресцеїну у кополієстерах.

Значення ККМ для всіх кополієстерів синтезованих з використанням ПЕГ1000 практично однакові і лежать у межах близьких до 0,01% (рис.6). Цей параметр не залежить від вмісту флуоресцеїну в кополієстері. Інша картина спостерігається для значень ККА. Якщо для кополієстеру 45МФ (GluLa-PEG1000-DPG) який отримано в аналогічних умовах, але без флуоресцеїну, закінчення процесів перебудови спостерігається при концентрації кополієстеру 0,45%, то, як видно з наведеного графіка (рис.5), введення флуоресцеїну, не приводячи до суттєвих змін у значеннях плато максимального пониження поверхневого натягу, суттєво змінює значення ККА. Зміну ККА у ряді кополієстерів на основі лаурилглутамінової кислоти та ПЕГ1000 з різним вмістом флуоресцеїну продемонстровано на рис.7. Збільшення кількості флуоресцеїну у кополієстері приводить до зменшення концентрації, при якій завершуються процеси перебудови у частинках дисперсної фази.



Рис.7. Зміна значень ККА для кополієстерів на основі GluLa і PEG1000 в залежності від вмісту флуоресцеїну

І уже для кополієстеру GluLa і PEG1000 синтезованого з вмістом флуоресцеїну (5,56%) який був максимальним у цій серії можна вважати, що ККА взагалі не спостерігається (рис. 7). Ефект, який спостерігається в цьому випадку, може бути пояснений ефектом від входження в макромолекули об'ємного фрагменту флуоресцеїну, який в цілому не має суттєвого впливу на загальний ГЛБ макромолекул, проте має значний вплив на процеси самоагрегації, які відбуваються з первинними міцелами в колоїдному розчині при збільшенні концентрації амфіфільного кополієстеру. Зосереджений у фрагменті флуоресцеїну потенціал гідрофобних взаємодій реалізується в значно більшій мірі при його високому вмісті в кополієстері. Ці гідрофобні взаємодії пришвидшують процеси надмолекулярної самоагрегації дисперсної фази частинок, які утворилися при перевищенні концентрації кополієстеру понад ККМ. Тому очевидно у розчинах кополієстерів з високим вмістом флуорисцеїну перебудова частинок дисперсної фази відбувається зразу після досягнення ККМ і ізотерма поверхневого натягу набуває класичної для полімерів форми - без чітко вираженого другого зламу. Така ж тенденція спостерігається у ряду кополієстерів із зменшенням величини гідрофільного комономеру ПЕГ. Це може пояснюватися також неоднорідністю функціональності кінцевих фрагментів макромолекул та молекулярно-масового

розподілу кополієстерів, для яких згідно GPC коефіцієнт полідисперсності складає 2-4.

Дослідженнями поверхневого натягу було також показано, що використання дипропіленгліколю як додаткового слаболіпофільного комономеру у структурі кополімерів має доволі великий вплив на поверхневу активність кополієстерів флуоресцеїну. На рис. 8 наведено ізотерми поверхневого натягу водних розчинів кополієстерів з близьким вмістом флуоресцеїну в структурі макромолекули, які проте відрізняються наявністю або відсутністю діпропіленгліколю (ДПГ) або його заміною на більш гідрофільний діетиленгліколь (ДЕГ).

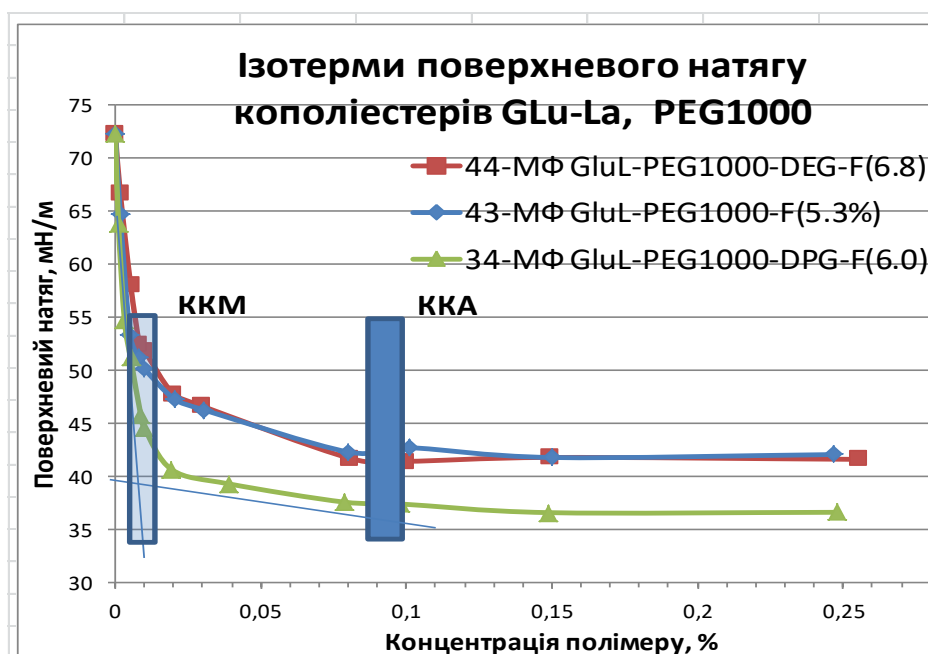


Рис. 8. Ізотерми поверхневого натягу кополієстерів GluLa, PEG1000 різної молекулярної архітектури з близькими значеннями вмісту флуоресцеїну (5-7%)

Як видно з наведеного графіка, в цілому характер ізотерм поверхневого натягу для всіх кополієстерів є подібним, тобто нема особливих відмінностей у значеннях ККМ та ККА для різних кополієстерів. Разом з тим кополієстер синтезований з використанням ДПГ як комономеру проявляє вищу поверхневу активність і понижає поверхневий натяг у його водному розчині до 36 мН/м. А для кополієстерів, які синтезовані або взагалі за відсутності третього

комономеру (43МФ) або із його заміною на еквімольну кількість ДЕГ (44МФ) максимальне пониження поверхневого натягу складає тільки 42 мН/м (табл.2). Підвищення поверхневої активності кополієстерів з флуоресцеїном у макроланцюзі добре узгоджується з такими ж залежностями отриманими раніше для аналогічних статистичних кополієстерів, але без флуоресцеїну – введення у структуру молекули слаболіпофільного мономеру дипропіленгліколю сприяє пониженню плато поверхневого натягу та покращенню стабільності дисперсної системи на їх основі.

Збільшення величини ацильного замісника атома нітрогену у глутаміновій кислоті з лаурильного до стеарильного закономірно приводить до збільшення ліпофільності отриманих полімерів, що проявляється у погіршенні їх колоїдної розчинності у воді.

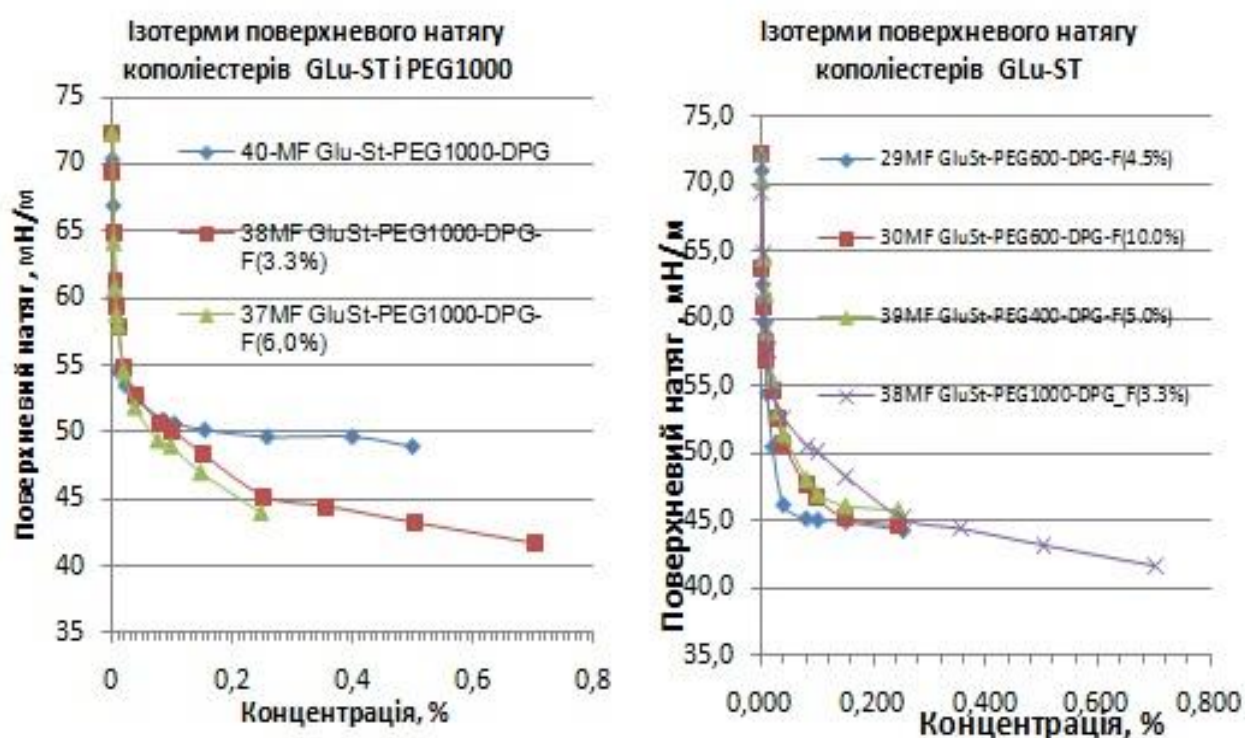


Рис.9. Ізотерми поверхневого натягу кополієстерів GluSt, PEG1000 з різним вмістом флуоресцеїну (а), GluSt і поліоксиетиленгліколів різної молекулярної маси (б)

Значення ККМ кополієстерів синтезованих з використанням GluSt як і для GluLa в межах похибки визначення лежить в околі концентрації 0,01%.

Проте значення максимального пониження поверхневого натягу для цих продуктів є значно вищим і складає 42-45 мН/м (рис.9).

Таким чином кополіестери, які отримані з використанням N-похідних глютамінової кислоти та PEG, в структурі макромолекул яких є фрагменти флуоресцеїну, мають високі поверхнево-активні властивості та здатність до стабілізації дисперсної фази в водних середовищах. Найвищу поверхневу активність і здатність до самостабілізації проявляють кополіестери, макромолекули яких містять одночасно фрагменти PEG та DPG. При цьому їх поверхнева активність визначається співвідношенням молекулярних мас ліпофільного алкільного та гідрофільного PEG фрагментів у їх структурі. Флуоресцеїн в структурі таких макромолекул, не впливаючи на загальну здатність понижати поверхневий натяг у водних розчинах, прискорює процеси перебудови в системі первинних міцел, що проявляється в зменшенні ККА з ростом його вмісту у кополіестері.

2.2 Солюбілізація нерозчинних у воді органічних сполук водними дисперсіями кополіестерів з флуоресцентними фрагментами

Здатність до солюбілізації частинками дисперсної фази полімерів перевіряли в дослідженнях з барвником Судан III, який є малорозчинним у воді і використовується для моделювання солюбілізації терапевтичних препаратів. Дослідження проводили для кополіестерів різного складу, дані наведені у таблиці 3. Максимальні значення кількості судану солюбілізованого розчинами кополіестерів у воді спостерігалися для кополіестерів 34-МФ (Glu-La-PEG1000-DPG-F(5,56%)) і 38-МФ (Glu-ST-PEG1000-DPG-F(2,87%)).

На рисунку 10 наведені характерні криві солюбілізації судану синтезованими кополіестерами з флуоресцентними фрагментами у макроланцюгу. Побудовані криві солюбілізації дозволяють зробити висновок, що в області невисоких концентрацій кополіестеру залежність має яскраво виражений екстремальний характер з максимумом.

Таблиця 3

Солюбізація судану водними дисперсіями кополіестерів з
флуоресцентними фрагментами в макроланцюгу

Назва полімеру	Кількість флуоресцеїну в кополіестері, %	Максимум солюбілізації г судану/г полімеру	Солюбілізація судану за ККА г судану/г полімеру
27-МФ Glu-La- PEG600- DPG- F(0,1002)	5,2	2,38	1,9 - 2,2
36-МФ Glu-La- PEG1000-DPG-F(0,05)	1.87	5,88	1 - 1,5
33-МФ Glu-La- PEG1000-DPG-F(0,1)	3.75	2,71	1,9 - 3
34-МФ Glu-La- PEG1000-DPG-F(0,165)	5.56	5,85	0,24 - 1,4
43-МФ Glu-La- PEG1000-F(0,16)	5.32	3,14	1,6 - 2,7
39-МФ Glu-ST- PEG400-DPG-F(0,1031)	4,7	5,42	1,3
29-МФ Glu-ST- PEG600-DPG- F(0,10111)	4,03	3.84	3,5 - 4,5
38-МФ Glu-ST- PEG1000-DPG- F(0,1006)	2,87	3,27	0,9 - 2
37-МФ Glu-ST- PEG1000-DPG- F(0,1655)	5,87	3,91	1,4 - 2

З аналізу кривих солюбілізації судану дисперсіями кополіестерів видно, що максимум солюбілізації знаходиться в концентраційному інтервалі між ККМ та ККА. За межами цього діапазону кількість солюбілізованого судану на грам кополіестеру зменшується.

З даних, наведених на рис.10, можна побачити, що максимальна кількість солюбілізованого судану на одиницю маси полімеру коливається в межах 6 грам на один грам кополіестеру у розчині. Кількість солюбілізованого судану при вищих концентраціях становить від 0,5 до 2,1 г на грам. Крім того, з наведених кривих видно, що із збільшенням вмісту флуоресцеїну в кополіестері кількість солюбілізованого судану характер залежностей зберігається, а

кількість солюбілізованого судану зменшується. При цьому для кополієстерів цього типу солюбілізація мало залежить від величини замісника глютамінової кислоти.

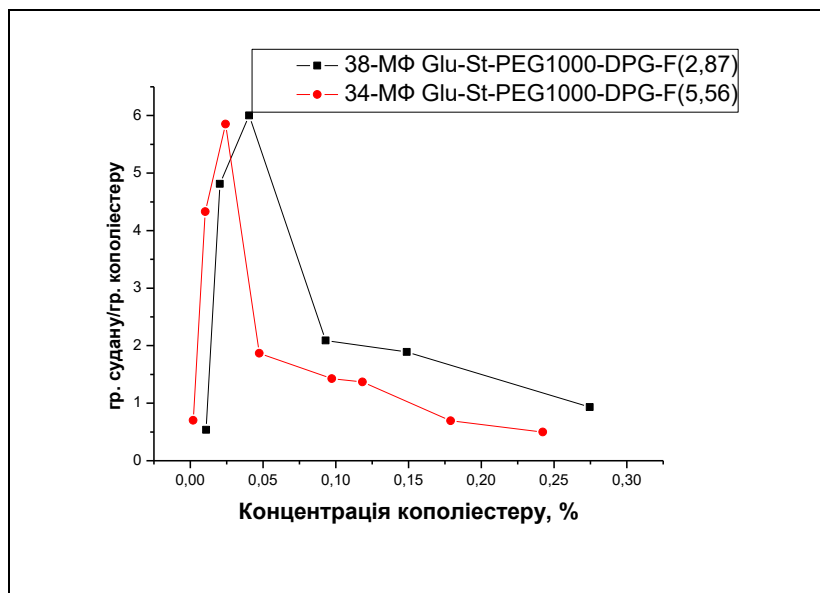


Рис.10. Характерні залежності солюбілізації Судану III у водних дисперсіях кополієстерів з фрагментами флуоресцеїну в структурі

Наведені дослідження дозволяють зробити висновок про те, що синтезовані кополієстери з флуоресцентними фрагментами у своїй структурі забезпечують значну солюбілізацію малорозчинних у воді органічних сполук їх водними дисперсіями, що дозволяє розглядати їх як основу для багатофункційних систем доставки терапевтичних препаратів.

2.3 Визначення коефіцієнту розподілу октанол-вода

При створенні лікарських препаратів на основі нових класів хімічних сполук одним з основних є питання про механізми проникнення сполук в живі клітини та про взаємодію цих сполук з клітинними мембранами. Метою даного етапу роботи було визначення ліофільності досліджуваних кополієстерів через аналіз їх перерозподілу в системі вода-октанол, яка моделює біологічні мембрани.

Для визначення ефективності доставки лікарських сполук і їх лікарських форм до органів-мішеней важливо мати інформацію про здатність речовини проникати через клітинну мембрану або накопичуватися в ній. Для кількісної

оцінки цієї здатності використовується поняття «ліпофільність». Коефіцієнт розподілу необхідний також для оцінки розподілу лікарських препаратів у певних середовищах організму. Гідрофобні препарати з високим коефіцієнтом розподілу переважно розподіляються в гідрофобні зони, наприклад, в біліпідному шарі клітин, в той час як гідрофільні препарати (низький коефіцієнт розподілу) переважно знайдені в гідрофільних зонах, наприклад, в сироватці крові. Класичним методом оцінки ліпофільності речовин є визначення коефіцієнта розподілу в системі 1-октанол/вода, запропонованій Фуджита і Хеншо [7]. Октиловий спирт (1-октанол) практично не розчиняється у воді, не схильний до утворення емульсій і є нейтральною сполукою. Розподіл речовини між 1-октанолом (модель фосфоліпідної мембрани) і водою (міжклітинна рідина) є чисельною характеристикою розподілу речовини між цими фазами і характеризує ступінь її ліпофільності.

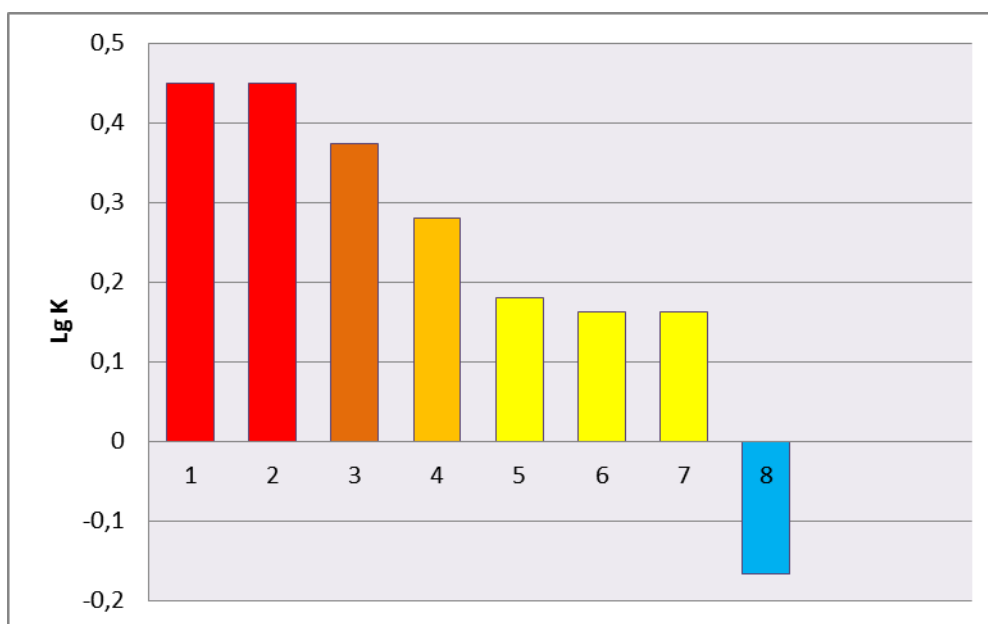
Було виявлено, що отримані кополіетери в більшості проявляють слабо виражені гідрофобні властивості (табл. 4). Слід зазначити загальну тенденцію наближення значень $\lg(K)$ до 0 при збільшенні молекулярної маси поліоксиетиленгліколю в складі кополіестеру, що свідчить про те, що отримані полімери можуть за певного співвідношення гідрофільних та ліпофільних ланок одночасно проявляти як гідрофобні так і гідрофільні властивості рис.11.

Таблиця 4

Залежність коефіцієнту розподілу від мономерного складу кополіестерів та вмісту флуоресцеїну

№	Назва	Конц Ф в полімері, %	$K_{o/w}$	$\lg K$
1	31-MF GluLa-PEG400-DPG-F	5.532	2.03	0,307
2	39-MF GluST-PEG400-DPG-F	4.699	2.83	0,45
3	27-MF GluLa-PEG600-DPG-F	5.2	2.85	0,45
4	29-MF GluST-PEG600-DPG-F	4.026	2.858	0,456
5	38-MF GluST-PEG1000-DPG-F	2.868	2.36	0,373
6	33-MF GluLa-PEG1000-DPG-F	3.748	1.45	0,163

Також в результаті проведених досліджень було виявлено, що збільшення вмісту флуоресцеїну в кополієстері незначно, але понижає коефіцієнт розподілу. Особливо добре це проявляється у випадку кополієстерів на основі Glu-St та PEG1000: кополієстер з невисоким вмістом флуоресцеїну (38МФ) проявляє гідрофобні властивості, а з вищим (37МФ) більш гідрофільні.



- 1- 27-MF GluLa-PEG600-DPG-F(5,2%)
- 2- 29-MФ GluST-PEG600-DPG-F(4,03%)
- 3- 38-MФ GluST-PEG1000-DPG-F(2,87%)
- 4- 28-MF GluLa-PEG600-DPG-F(13,07%)
- 5- 30-MФ GluST-PEG600-DPG-F(9,69%)
- 6- 33-MФ GluLa-PEG1000-DPG-F(3,75%)
- 7- 34-MФ GluLa-PEG1000-DPG-F(5,56%)
- 8- 37-MФ GluST-PEG1000-DPG-F(5,87%)

Рис. 11. Залежність коефіцієнту розподілу ($\lg(K)$) від структури кополієстерів

Окрім молекулярної маси ПЕГу на коефіцієнт розподілу, великий вплив на властивості кополієстерів має природа низькомолекулярного етеру у його складі (табл. 5). Як видно, наявність у структурі фрагмента дипропіленгліколю

чи його відсутність не суттєво впливає на властивості кополієстеру і він проявляє слабкі гідрофобні властивості, однак при введенні у структуру кополієстеру диетилєнглїколю спостерігаються різкі зміни $Lg K$. Цей факт дає можливість створювати кополієстери, з керованими властивостями у доволі широкому діапазоні щодо значень коефіцієнту розподїлу - вони можуть бути як ліпофільні, так і гідрофільні або мати проміжні властивості.

Таблиця 5

Залежність коефіцієнту розподїлу від низькомолекулярної складової кополієстеру (ДПГ і ДЕГ)

№	Назва	Конц Ф в полімері, %	$K_{o/w}$	$Lg K$
1	34-МФ GluLa-PEG1000-DPG-F	5.56	1.45	0.162
2	44-МФ GluLa-PEG1000-DEG-F	6.815	0.307	-0,51
3	43-МФ GluLa-PEG1000-F	5.322	1.76	0,245

Наявність ліпофільних фрагментів і формування гідрофобного ядра є необхідною умовою для можливості наповнення наночатинок кополієстеру лікарськими препаратами (які в основному є ліпофільними малорозчинними у воді сполуками) та сприяє проникненню в клітини, а гідрофільні фрагменти забезпечують стабілізацію наночастинок у водному середовищі та полегшує введення і доставку лікарського препарату з потоком крові і міжклітинної рідини до органів мішеней. Слід зазначити, що всі досліджувані кополієстери мають досить невеликі значення логарифма коефіцієнта розподїлу (від -0,5 до 0,45), а отже можуть однаково розпридїлятись між водною і ліпідною фазами, що вважається найбільш оптимальним при створенні дисперсних систем доставки ліків.

3. Дослідження можливостей практичного застосування отриманих кополієстерів

Сьогодні кополімери поліоксиетилену та поліоксипропілену, які відомі під торговою маркою «Pluronic», є найпоширенішою основою для розробки полімерних систем доставки, як такі, що найкраще відповідають сучасному рівню вимог до полімерних компонентів систем транспорту ліків. Кополієстери синтез та дослідження яких описано в попередніх розділах в яких при синтезі в якості діолів використані фрагменти поліоксиетилену та/або поліоксипропілену об'єднують основні переваги «плуроніків» та унікальні властивості амінокислот: біосумісність, нетоксичність, хімічну і структурну різноманітність, просте вивільнення продуктів деградації.

Комплекс властивостей синтезованих кополієстерів та їх водних дисперсій створює передумови для їх використання як дисперсних полімерних систем транспорту терапевтичних препаратів в організмі. Найбільш часто використовують їх парентеральне введення при якому передбачається, що частинки дисперсної фази контактуватимуть з плазмою крові і тому необхідно відслідкувати їх взаємодію з водорозчинними білками плазми.

Істотну роль у розподілі лікарських засобів в органах і тканинах відіграють також різні біологічні бар'єри: стінки капілярів, оболонки клітин, гематоенцефалічний, плацентарний та інші бар'єри. Відомо що для використання в системах транспорту ліків необхідно оперувати дисперсіями наночастинок з розмірами до 150 нм. При тому для проникнення через гематоенцефалічний бар'єр (із крові в головний мозок чи цереброспінальну рідину) розмір частинок лікарських засобів не повинен перевищувати 5-10 нм.

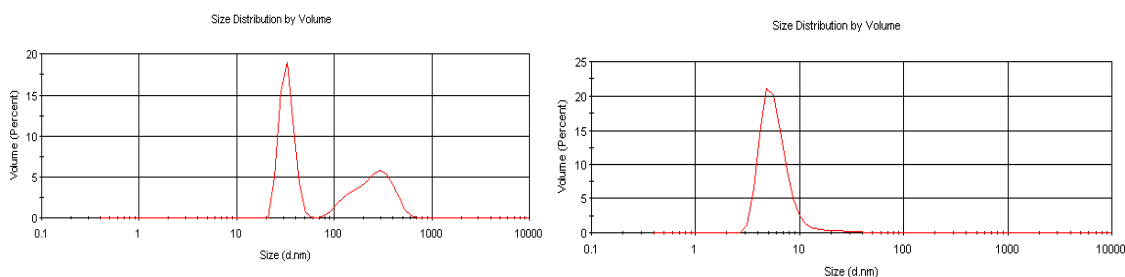
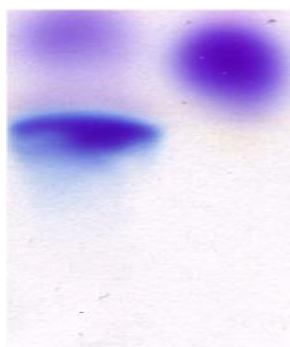


Рис.12. Гістограми розподілу діаметру частинок дисперсної фази 1 – кополіестер [Glu-La-PEG1000-DPG-F]; 2- кополіестер [Glu-La-PEG1000-DPG-F] + BSA

Тому на даному етапі роботи було поставлено завдання відслідкувати зміну властивостей кополіестерів у комплексі з бичачим сироватковим альбуміном як модельним об'єктом.

Спочатку було проведено дослідження розміру частинок дисперсії флуоресциювмісних кополіестерів та вплив на розмір їх частинок альбуміну. На рис.12 наведено гістограми середньочисельного розподілу частинок за розміром, отримані методом DLS. Гістограми з номером 1 відповідають розподілу частинок за відсутності альбуміну, з номером 2 – в присутності альбуміну. Як видно з рис.12 розподіл частинок дисперсної фази кополіестеру за відсутності альбуміну має бімодальний характер із розміром частинок 32 нм та 295 нм, крива 2 рис. 12 демонструє, що у комплексі з альбуміном розподіл набуває мономодального характеру із середнім розміром частинок дисперсної фази ≈ 5 нм.



А Б

Рис.13. Електрофореграма у 5% поліакриламідному гелі БСА у комплексі з GluLa-DPG-PEG600-F (А) та БСА (Б).

Дослідження здатності GluLa-DPG-PEG600-F зв'язувати білки крові за допомогою електрофорезу у 5 % поліакриламідному гелі окремо та у комплексі з БСА показало, що кополіестер здатний зв'язуватись з БСА (рис.13.). Ця здатність зв'язуватись з БСА є позитивною характеристикою кополіестерів як транспортерів лікарських засобів, зокрема для створення вакцин, оскільки відомо, що білки часто є основними антигенними складовими вакцин.

Важливо щоб макромолекули кополіестерів використання яких передбачається в системх транспорту ліків не проявляли токсичних ефектів на організм а також нетоксичними були продукти їх деградації і не складали додаткових загроз для організму.

Вивчення токсичності кополіестеру GluLa-DPG-PEG600-F на організм лабораторних тварин проводились через дослідження біохімічних маркерів структурного і функціонального стану печінки та нирок. Результати досліджень показали короточасний токсичний ефект, який тривав до 7 доби експерименту з подальшим зменшенням впливу, а вже на 21 добу негативного впливу на структуру і функціональний стан печінки та нирок щурів, після двох введень GluLa-DPG-PEG600-F(5,2%) виявлено не було. Результат експериментів може свідчити про адаптацію організму щурів до введення кополіестеру GluLa-DPG-PEG600-F(5,2%), оскільки на 14 та 21 добу експерименту встановлено, що токсичний вплив на печінку та нирки тварин є незначним [8].

В роботі методом нефелометрії було досліджено інтенсивність флуоресценції кополіестерів з флуоресцентними фрагментами в макроланцюгу у порівнянні з інтенсивністю флуоресценції флуоресцеїну від значень рН середовища.

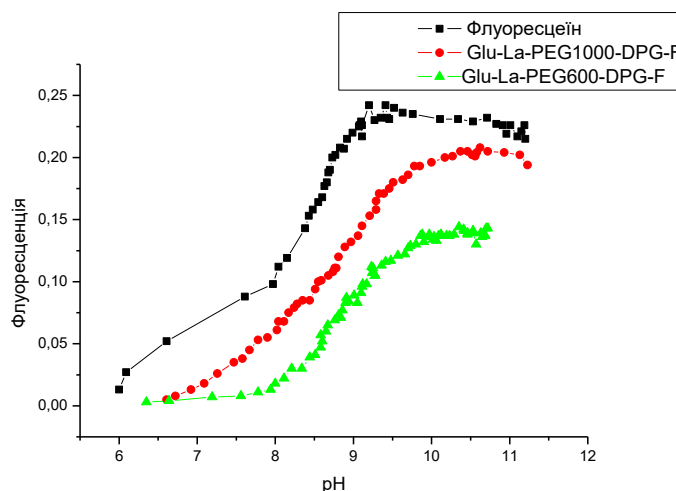


Рис.14. Залежність інтенсивності флуоресценції від значення рН розчину

Дослідження інтенсивності флуоресценції кополієстерів з однаковим вмістом флуоресцеїну, але з різною молекулярною масою ПЕГ в їх структурі показало, що довжина ланцюга поліетиленгліколю впливає на інтенсивність флуоресценції кополієстеру. Видно, що збільшення молекулярної маси ПЕГу призводить до збільшення інтенсивності флуоресценції рис.14. Це підтверджує той факт, що відстань між флуорофорами в макромолекулі має важливе значення для уникнення ефекту «внутрішньомолекулярного гасіння флуоресценції». Тому для використання отриманих кополієстерів в діагностиці та візуалізації засобів доставки лікарських препаратів найбільш доцільно використовувати кополієстери отримані за використання поліетиленгліколів з молярною масою (1000-1500 Да). Вони характеризуються високими поверхнево-активними властивостями, здатні солюбілізувати малорозчинні у воді сполуки та проявляють вищу інтенсивність флуоресценції, що сприятиме їх виявленню в організмі.

Отримані полієстери можуть бути використаний в якості компонентів систем транспорту ліків,- так званих «тераностиків», які поєднують функцію доставки ліків і можливість одночасного флуоресцентного контролю за даним процесом.

ВИСНОВКИ

1. Методом активованої поліконденсації за реакцією Стегліха синтезовано кополіестери N-захищеної глутамінової кислоти з поліетердіолами різної молекулярної маси та флуоресцеїном. Встановлено будову отриманих сполук за допомогою ІЧ- та ЯМР –спектроскопії.
2. Досліджено поверхнево-активні властивості отриманих амфифільних кополіестерів в залежності від природи мономерних ланок та кількості хромофорного фрагменту (флуоресцеїну) у основному ланцюгу;
3. Досліджено особливості перерозподілу отриманих кополіестерів в системі вода-октанол в залежності від їх складу та природи мономерів, показано можливість отримання кополіестерів, які проявляють ліпофільні або гідрофільні властивості в залежності від їх структури.
4. Вивчено закономірності сольобілізації частинками дисперсної фази флуоресцеїновмісних кополіестерів судану та вивільнення водонерозчинних сполук дисперсіями. Показано, що отримані самостабілізовані дисперсії здатні сольобілізувати до 6 г судану на 1 г полімеру в залежності від будови кополіестеру.
5. Проведені дослідження щодо можливостей практичного застосування отриманих кополіестерів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gross L., Ringsdorf H., Schupp H. Polymeric Anti-Tumor Agents on a Molecular and on a Cellular Level // *Angew. Chem. Int. Edit.* - 1981. -Vol.-20. -№ 4.- P. 305-325.
2. Tasciotti E., Liu X., Bhavane R., Plant K., Leonard A., Price B., et al. Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications. // *Nat. Nanotechnol.* - 2008. – Vol. 3(3), P. 151-157.
3. Shimizu N, Kawazoe Y. - A new method for permeabilization of the plasma membrane of cultured mammalian cells. III. Internalization of fluorescent dextrans into cultured mammalian cells by vortex-stirring in the presence of high molecular weight polyacrylic acid. - *Biol Pharm Bull.* - 1996. -Vol.-19. - № 8.- P.1023-1028.
4. Shelkov R., Nahmanya M., Melman. A. Selective esterifications of alcohols and phenols through carbodiimide couplings // *Org. Biomol. Chem.* - 2004. – № 2. – P. 397-401.
5. Varvarenko S.M., Tarnavchyk I.T., Voronov A.S., Fihurka N.V., Dron I.A., Nosova N.G., Taras R.S., Samaryk V. Ya., Voronov S.A. Synthesis and colloidal properties of polyesters based on glutamic acids and glycols of different nature // *Chemistry and Chemical Technology.* - 2013. - Vol.7. - N.2. - P.164-168.
6. Варваренко С.М., Самарик В.Я., Влізло В.В., Остапів Д.Д., Носова Н.Г., Тарнавчик І.Т., Фігурка Н.В., Ференс М.В., Нагорняк М.І., Тарас Р.С., Яремчук І.М., Воронов А.С., Воронов С.А. Флуоресцентні тераностики на основі псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення лікарських засобів // *Полімерний журнал.* - 2015. - т. 37. - №2. – С. 193-199.
7. Hansch C., Fujita T. ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. Vol. 86. P. 1616–1626.
8. Chekh B.O., Ferens M.V., Ostapiv D.D., Samaryk V.Y., Varvarenko S.M., Vlizlo V.V. Characteristics of novel polymer based on pseudo-polyamino acids GluLa-DPG-PEG600: binding of albumin, biocompatibility, biodistribution and potential crossing the blood-brain barrier in rats // *Ukr.Biochem.J.* – 2017. – Vol. 89. - Issue 4. - P. 13-21

Анотація

Органічні сполуки, з спеціальними фотофізичними властивостями, важливі для розробки багатьох продуктів, таких як біомаркери, біосенсори, елементи фотодинамічної терапії та інші технологічні продукти. Флуоресцентні сполуки привертають увагу багатьох вчених, так як вони можуть бути застосовані як "тихі" маркери, оскільки можуть бути легко виявлені через їх специфічний відгук при опроміненні світлом. Проте існують, звичайно, невирішені проблеми при досягненні «ідеального» флуоресцентного маркера, що робить дослідження в цій галузі дуже перспективними.

Актуальність даної роботи полягає у одержанні нових біотолерантних, поверхнево-активних кополієстерів на основі природних двоосновних амінокислот та поліоксиетилендіолів з хромофорними фрагментами у макроланцюгу, які, окрім здатності транспортувати лікарські засоби, дозволяють оцінити ефективність цього транспорту через можливість виявлення зони накопичення наночастинок з ліками в певних тканинах організму.

Тому метою даної роботи є синтез нових біосумісних кополієстерів - здатних до їх візуалізації методами спектрального аналізу, як полімерної основи, яка відповідає вимогам до засобів транспорту терапевтичних речовин в організмі.

Для досягнення цієї мети необхідно було виконати наступні завдання:

- провести синтези кополієстерів N-заміщеної глутамінової кислоти з полієтердіолами різної молекулярної маси та флуоресцеїном;
- вивчити поверхнево-активні властивості амфіфільних кополієстерів в залежності від природи мономерних ланок та кількості хромофорного фрагменту (флуоресцеїну) у основному ланцюгу;
- вивчити перерозподіл в системі вода-октанол в залежності від їх складу та природи мономерів та солюбілізацію водонерозчинних сполук частинками водних дисперсій нових флуоресцеїновмісних кополієстерів;

- провести дослідження можливостей практичного застосування отриманих кополієстерів з хромофором у макроланцюгу.

Для досягнення цих цілей було використано такі методи досліджень: ПМР-спектроскопія, ІЧ-спектроскопія, метод динамічного світлорозсіювання (DLS), гель-проникна хроматографія, спектрофотометрія, визначення поверхневого натягу водних дисперсій полімерів та критичної концентрації міцелоутворення методом відриву кільця (Дю-Нуї).

Запропоновано використання N-захищеної глютамінової кислоти, комономерів з ряду PEG, DPG а також флуоресцеїн, як будівельні блоки для одержання амфіфільних маркерних полімерів. Створення полімерних молекул з ковалентно приєднаним флуорофором в структурі гарантує можливість виявлення таких макромолекул в тканинах організму, візуалізувати наноносії на клітинному рівні і таким чином підсилити ефективність терапії.

Підтверджено, що в умовах активованої поліконденсації за реакцією Стегліха вміст флуоресцеїну в кополієстері однозначно задається співвідношенням його в мономерній суміші. Встановлено основні фактори, які мають вплив на характеристики кополієстерів, що дало можливість одержувати продукт з бажаним вмістом хромофора.

В залежності від співвідношення гідрофільних та ліпофільних фрагментів у структурі макроланцюга вдається керувати колоїдно-хімічними властивостями отриманих кополієстерів та їх здатністю до перерозподілу у системі вода:октанол. Серед досліджених зразків максимальну солубілізацію проявляли кополієстери на основі лаурилглютамінової кислоти і PEG1000.

Отримано ряд кополієстерів, які здатні понижати поверхневий натяг водних розчинів, придатні для солубілізації водонерозчинних сполук та проявляють флуоресцентні властивості. В той же час, вони є нетоксичними і біосумісними. Біотолерантність таких кополієстерів, здатність створювати стабільні дисперсії нанометричних розмірів дозволяє створювати на їх основі нові системи транспорту ліків багатоцільового призначення.