

СОВМЕСТНЫЕ АГРЕГАТЫ ДОКСОРУБИЦИНА С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ПОЛИЭФИРОПОЛИОЛАМИ

Ханнанов А.А.¹, Бондарь О.В.¹, Сурнова А.В.¹, Кутырева М.П.¹, Улахович Н.А.¹,
Захарова Л.Я.², Воронин М.А.²

¹ ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18;

² ФГБУН Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, г. Казань, ул. Арбузова д.8.

e-mail: arthann@gmail.com, voronin@iopc.ru

поступила в редакцию 01 ноября 2013 года

Аннотация

Изучено связывание лекарственного препарата доксорубина карбоксильными производными гиперразветвленного полиэфирополиола третьей генерации (Boltorn H30TM) с различной степенью функционализации. Размеры частиц совместных агрегатов доксорубин-гиперразветвленная полиэфирополиакриловая кислота варьируются от 30 до 200 нм. Размер совместных агрегатов оставался стабильным и не изменялся с течением времени.

Ключевые слова: гиперразветвленные полимеры, самоорганизация, транспорт лекарственных препаратов.

Введение. Гиперразветвленные полимеры (ГРП) и дендримеры привлекают все больший интерес для биомедицинских целей. Это обуславливается большим количеством функциональных групп и уникальной шаровидной структурой ГРП [1-3]. Сверхразветвленные полиэфирополикислоты на основе 2,2-бис(гидроксиметил)пропановой кислоты (2,2-бис-МПА), вследствие небольшого размера мономерных звеньев, обладают плотной упаковкой. Их синтез является менее дорогим и трудоемким по сравнению с синтезом дендримеров [4]. Одними из перспективных соединений являются коммерческие гиперразветвленные полиэфиры Boltorn H30 (рисунок 1) псевдо третьего поколения.

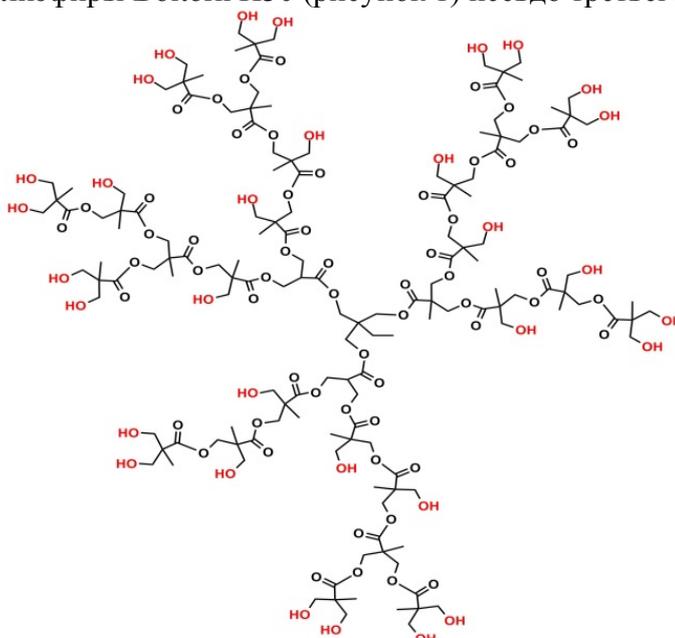


Рисунок 1. – Структура гиперразветвленного полиэфирополиола Boltorn H30 (1).

Модификация терминальных фрагментов гиперразветвленного полиэфира – одна из самых популярных и удобных методик придания ему целевых свойств [5]. Структура и природа модифицирующих реагентов может варьироваться в широких пределах: акриловые

кислоты, аминные, амидные и силиламинные фрагменты, фосфор-, серо- и фторсодержащие фрагменты, олеиновые и стеариновые кислоты, остатки РНК и полноценные лекарственные препараты [6,7].

Одной из актуальных целей, современной химической науки является создание веществ способных селективно захватывать и высвобождать целевые соединения, в том числе лекарственные препараты. Наибольшую перспективность имеют уже существующие лекарственные препараты. К таким соединениям относятся известный антираковый препарат доксорубин, который чрезвычайно эффективен, но обладает низкой биодоступностью. Улучшить биодоступность можно модификацией исходного лекарственного препарата или заключением его в контейнеры из молекул обладающих высокой биоподобностью.

Экспериментальная часть.

В качестве платформ для синтеза функционализированных гиперразветвленных полиэфиров использовали гиперразветвленный полиэфирополиол третьей генерации (**1**) на основе этоксилированного пентаэритрита (ядро) и диметилпропионовой кислоты в качестве мономера (32 гидроксильных группы, $M_r=3608$ г/моль, гидроксильное число 525 мг/г КОН, $t_{пл.}=140-145^\circ\text{C}$) фирмы Perstorp Speciality Chemicals AB, Швеция.

Для модификации использовали малеиновый ангидрид $\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_3$ (Alfa Aesar 99%). В синтезе были использованы органические растворители: диэтиловый эфир $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$, ацетон $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, 1,4-диоксан $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, изопропиловый спирт $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ и бензол C_6H_6 , очищенные согласно стандартным методикам [8].

Содержание карбоксильных групп определяли титрованием растворенной навески исследуемого вещества 0.1 н. водно-ацетоновым (1:1) раствором щелочи по методике [9].

В качестве противоопухолевого антибиотика использовался (8S-цис)-10-(3-амино-2,3,6-тридезоксид-альфа-L-ликогексо-пиранозил)окси-7,8,9,10-тетра-гидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксилацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион (Доксорубин (DOX)), код АТХ L01DB01 фирмы TEVA Pharmaceutical Industries (Israel)

Методика синтеза полиэфирополиакриловых кислот $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$

Навеску Boltorn Н30 (**1**) 4 г нагревали до 140°C , охлаждали до 50°C и затем растворяли в 10 мл ацетона (15 мл диоксана). К нагретому раствору Boltorn Н30 добавляли стехиометрическое количество 1,32 г (**2**), 2,64 г (**3**), 3,12 г (**4**) малеинового ангидрида в мольном соотношении 1:12 растворенного в 5 мл ацетона, и в мольном соотношении 1:24 и 1:28, растворенного в 6 мл диоксана. Смесь перемешивали при температуре кипения растворителя 56°C в течение 14 часов для мольного соотношения 1:12 и 98°C для мольных соотношений 1:24 и 1:28 в течение 28 и 42 часов соответственно. После охлаждения смесь обрабатывали бензолом в двукратном избытке по отношению к раствору. Образовавшийся желто-белый продукт отделяли и высушивали в вакууме. Получили 2,70 г (выход 67,56%) соединения (**2**), 2,70 г (выход 72,62%) соединения (**3**) и 2,35 г (выход 58,95%) соединения (**4**) в виде белых веществ творожистой фактуры.

Спектральные характеристики полученных соединений:

Соединение (**2**) $\text{ВН30}(\text{CH}=\text{CHCOOH})_{12}$:

ИК спектр, ν , см^{-1} : 3394 ($\text{OH}_{\text{связ}}$); 2978 ($\text{CH}_{3\text{ас}}$); 2945, 2883 ($\text{CH}_{2\text{ас}}$, $\text{CH}_{2\text{с}}$); 1721 ($\text{C}=\text{O}$); 1643 ($\text{C}=\text{C}$), 1465 (деформационные CH_3); 1375 (деформационные CH_2); 1214 ($\text{C}-\text{O}$); 1119 ($\text{O}-\text{C}$)_{эфир}.

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., (J , Гц): 1,14, 1,21, 1,32 уш. с ($\text{OC}(\text{O})\text{CCH}_3$); 3,63-3,72 м (OCH_2CH_2); 4,11, 4,13 два с ($\text{C}(\text{CH}_2\text{OC})_4$); 4,28-4,30 м ($\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 6,40 с ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д., (J , Гц): 18,1, 19,4, 20,7 ($-\text{CH}_3$); 43,7 ($\text{C}(\text{CH}_2\text{OC})_4$); 50,5 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_2)_2$); 64,9-68,9 ($-\text{CH}_2-$); 132,1 ($-\text{CH}=\text{CH}-$); 175,1 ($-\text{C}=\text{O}$).

Соединение (**3**) $\text{ВН30}(\text{CH}=\text{CHCOOH})_{24}$:

ИК спектр, ν , см^{-1} : 3423 ($\text{OH}_{\text{связ}}$); 2974 ($\text{CH}_{3\text{ас}}$); 2941, 2883 ($\text{CH}_{2\text{ас}}$, $\text{CH}_{2\text{с}}$); 1725 ($\text{C}=\text{O}$); 1643 ($\text{C}=\text{C}$), 1465 (деформационные CH_3); 1371 (деформационные CH_2); 1218 ($\text{C}-\text{O}$); 1119 ($\text{O}-\text{C}$)_{эфир}

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., (J , Гц): 1,14, 1,21, 1,32 уш. с (OC(O)CCH_3); 3,63-3,72 м (OCH_2CH_2); 4,11, 4,14 два с ($\text{C(CH}_2\text{OC)}_4$); 4,28-4,30 м ($\text{CH}_2\text{OC(O)}$); 6,40 с ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д., (J , Гц): 17,1, 18,4, 19,7 ($-\text{CH}_3$); 42,7 ($\text{C(CH}_2\text{OC)}_4$); 49,5 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C(CH}_2)_2$); 64,0-67,6 ($-\text{CH}_2-$); 133,2 ($-\text{CH}=\text{CH}-$); 174,2 ($-\text{C}=\text{O}$).

Соединение (4) **ВН30(CH=CHCOOH)₂₈**:

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3452 ($\text{OH}_{\text{связ}}$); 2978 ($\text{CH}_{3\text{ас}}$); 2949, 2891 ($\text{CH}_{2\text{ас}}$, $\text{CH}_{2\text{с}}$); 1721 ($\text{C}=\text{O}$); 1638 ($\text{C}=\text{C}$), 1466 δ ($\text{CH}_{3\text{с}}$); 1375 δ ($\text{CH}_{2\text{с}}$); 1222 ($\text{C}-\text{O}$); 1119 ($\text{O}-\text{C}$)_{эфир}

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д., (J , Гц): 1,13, 1,21, 1,32 уш. с (OC(O)CCH_3); 3,64-3,71 м (OCH_2CH_2); 4,11, 4,14 два с ($\text{C(CH}_2\text{OC)}_4$); 4,28-4,33 м ($\text{CH}_2\text{OC(O)}$); 6,41 с ($-\text{CH}=\text{CH}-$).

Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д., (J , Гц): 18,1, 19,4, 20,7 ($-\text{CH}_3$); 43,8 ($\text{C(CH}_2\text{OC)}_4$); 50,5 ($\text{H}_3\text{C}-\text{C(CH}_2)_2$); 64,9-67,8 ($-\text{CH}_2-$); 133,6 ($-\text{CH}=\text{CH}-$); 175,2 ($-\text{C}=\text{O}$).

Методика создания бинарных смесей:

Для приготовления бинарных смесей $\text{ВН30(COOH)}_x/\text{DOX}$ использовался бидистиллят. В мерную колбу на 10 мл вносили постоянную навеску доксорубина (0,46 мМ), затем приливали от 25 мкл до 5 мл раствора гиперразветвленной полиэфирополиакриловой кислоты с концентрацией 1 мМ. Растворы доводили до 10 мл бидистиллированной водой, и перед исследованием образцы фильтровали через мембранные фильтры "Millipore" с диаметром пор 0,45 мкм для удаления пыли

Аппаратура:

ИК-спектры поглощения веществ регистрировали на ИК Фурье-спектрометре Spectrum 400 (Perkin Elmer) с приставкой НВПО Алмаз KRS-5: разрешение 4 cm^{-1} , накопление 5 сканов, время регистрации 16 с, диапазон съёмки $4000-400 \text{ cm}^{-1}$. Предварительная пробоподготовка не требовалась.

UV/VIS спектры поглощения регистрировались на спектрометре Lambda 750 (Perkin Elmer)

Спектры ЯМР в $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ были записаны на многофункциональном спектрометре ЯМР с Фурье-преобразованием "Avance 400" (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц на ядрах ^1H и 125,77 МГц на ядрах ^{13}C . Изучение структуры полиэфирополикарбоновых кислот Voltorn Н методом ЯМР на ядрах ^{13}C и ^1H проводили в растворе дейтерированного ацетона $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (Deutero GmbH).

Размеры частиц измеряли методом динамического рассеяния света на характеристизаторе наночастиц «Malvern Zetasizer Nano» фирмы «Malvern» (Великобритания). Измерения проводили при угле рассеяния 173° . Перед измерениями образцы фильтровали через мембранные фильтры "Millipore" с диаметром пор 0,45 мкм для удаления пыли. Автокорреляционные функции флуктуаций интенсивности рассеянного света анализировали с использованием метода кумулянтов, позволяющего оценить распределение агрегатов по размерам (ISO 13321:1996). Кислотное число (КЧ) определяли методом рН-метрического титрования по методике [9].

Обсуждение результатов.

Гиперразветвленные полиэфирополиакриловые кислоты ВН30(COOH)_{12} , ВН30(COOH)_{24} и ВН30(COOH)_{28} синтезированы путем модификации гидроксильных групп ГРП Н30 ангидридом малеиновой кислоты [10] при мольных соотношениях полимер:функционализирующий реагент 1:12, 1:24, 1:28. Чистоту полученных продуктов контролировали методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье по отсутствию полос характеристических частот колебаний карбонильной группы малеинового ангидрида при $1848, 1790 \text{ cm}^{-1}$. Кислотное число (КЧ) и содержание кислотных групп в синтезированных соединениях определяли рН-метрическим титрованием [11].

Электронный спектр поглощения доксорубина содержит два максимума (рисунок 2). Первый при длине волны 290 нм и второй максимум при длине волны 450 нм имеет два плеча при 485 и 525 нм. Введение в раствор гиперразветвленных полиэфирополиакриловых кислот ВН30(COOH)_{12} , ВН30(COOH)_{24} и ВН30(COOH)_{28} приводит к уменьшению

оптической плотности при всех длинах волн. Поэтому метод УФ/ВИД спектрофотометрии был выбран для оценки связывания доксорубина в бинарных системах $\text{ВН30}(\text{COOH})_{12}/\text{DOX}$, $\text{ВН30}(\text{COOH})_{24}/\text{DOX}$ и $\text{ВН30}(\text{COOH})_{28}/\text{DOX}$. Изучена зависимость оптической плотности водных растворов, содержащих постоянную концентрацию DOX (0,46 мМ) при различной концентрации $\text{ВН}(\text{COOH})_x$ (таблица 1)

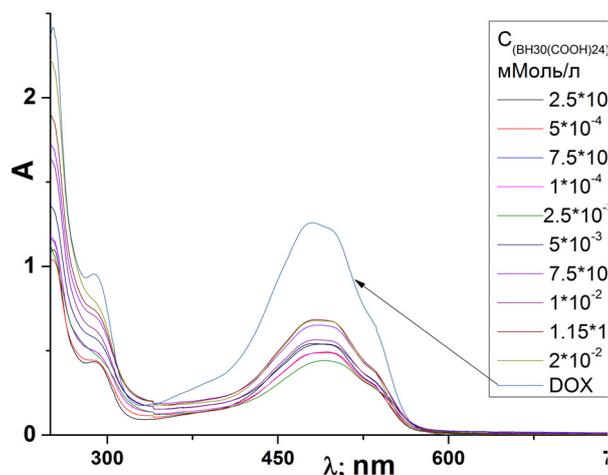


Рисунок 2. – Электронные спектры поглощения в бинарной системе $\text{ВН30}(\text{COOH})_{24}/\text{DOX}$ в водном растворе, $C_{\text{DOX}}=0.46$ мМ.

Установлено, что наиболее эффективное связывание доксорубина наблюдается для системы $\text{ВН30}(\text{COOH})_{24}$.

Таблица 1. – Зависимость оптической плотности (A) в бинарных системах $\text{ВН30}(\text{COOH})_x/\text{DOX}$ от концентрации $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$ при $\lambda=485$ нм.

Концентрация $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$, моль/л	$A_{\lambda=485 \text{ нм}}$		
	$\text{ВН30}(\text{COOH})_{12}$	$\text{ВН30}(\text{COOH})_{24}$	$\text{ВН30}(\text{COOH})_{28}$
2×10^{-7}	0,7262	0,542	1,6525
5×10^{-7}	0,5288	0,4875	1,5983
7×10^{-7}	0,5494	0,49	1,4645
1×10^{-6}	0,6705	0,4895	1,5228
2.5×10^{-6}	0,4385	0,4385	1,5212
5×10^{-6}	0,7329	0,5389	1,5791
7.5×10^{-6}	0,9523	0,6522	1,6224
1×10^{-5}	1,0255	0,5658	Опалесцирует
1×10^{-5}	0,8545	0,6858	1,6224
2×10^{-5}	Опалесцирует	0,6792	1,2725
DOX	1,2517	1,2517	2,002

Для данной системы связывание доксорубина происходит при всех концентрациях полимера, с максимальным значением при соотношении полимер:доксорубин равном 1:46.

В свою очередь, в бинарной системе $\text{ВН30}(\text{COOH})_{12}/\text{DOX}$ также наблюдается связывание DOX при любых концентрациях полимера, которое при соотношении 1:46 достигает максимальной эффективности. В бинарной системе $\text{ВН30}(\text{COOH})_{28}/\text{DOX}$ наиболее эффективное связывание лекарственного препарата приходится на соотношение 1:23. Данные спектрофотометрии использованы для расчета степени связывания доксорубицина полимерной капсулой, которая составила для $\text{ВН30}(\text{COOH})_{12}$, $\text{ВН30}(\text{COOH})_{24}$ и $\text{ВН30}(\text{COOH})_{28}$ 80%, 78% и 47% соответственно (рисунок 3).

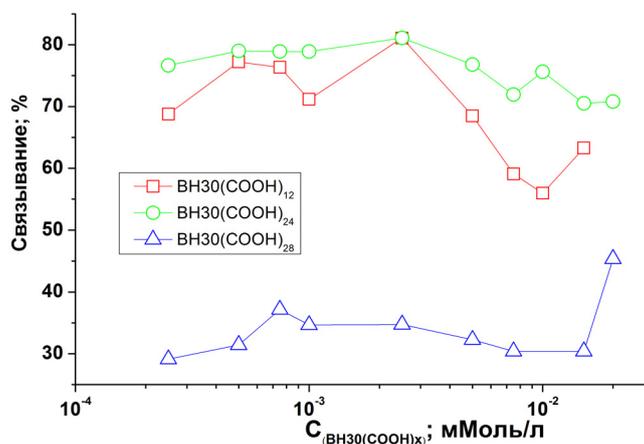


Рисунок 3. – Зависимость степени связывания доксорубицина от концентрации $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$.

Для оценки размеров совместных агрегатов в системах $\text{ВН30}(\text{COOH})_x/\text{DOX}$ был использован метод динамического светорассеяния. Методом динамического светорассеяния зафиксировано образование совместных агрегатов $\text{ВН30}(\text{COOH})_x/\text{DOX}$ во всех системах с размерами от 30 до 200 нм (рисунок 4).

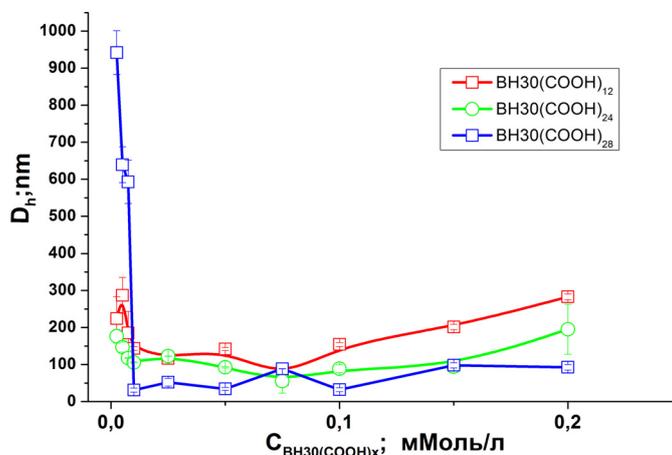


Рисунок 4. – Зависимость среднего гидродинамического диаметра в системах $\text{ВН30}(\text{COOH})_x/\text{DOX}$ от концентрации полимера.

Для систем $\text{ВН30}(\text{COOH})_{12}/\text{DOX}$ и $\text{ВН30}(\text{COOH})_{24}/\text{DOX}$ в областях концентраций полимера 0,01 мМ – 0,05 мМ наблюдается наименьший разброс частиц по размеру, что однозначно говорит об образовании стабильных агрегатов. С ростом концентрации размер и разброс совместных агрегатов возрастает. Однако в системе $\text{ВН30}(\text{COOH})_{28}/\text{DOX}$ наблюдается резкое уменьшение размеров агрегатов с 1000 нм до 50, с ростом концентрации $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$. С дальнейшим ростом концентрации размер агрегатов и их разброс по значению слабо колеблются. Из чего следует, что насыщение $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$ доксорубицином происходит во всем диапазоне концентраций, а совместные агрегаты устойчивы.

Заключение. Синтезированы новые гиперразветвленные полиэфиropолиакриловые кислоты третьей генерации $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$, содержащие 12, 24 и 28 фрагментов акриловой кислоты в терминальном положении.

Доказано, что $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$ способны связывать антираковый препарат доксорубин. Эффективность связывания возрастает в ряду производных $\text{ВН30}(\text{COOH})_{28}$ – $\text{ВН30}(\text{COOH})_{24}$ – $\text{ВН30}(\text{COOH})_{12}$.

Гиперразветвленные полиэфиropолиакриловые кислоты $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$ могут быть использованы в качестве эффективных переносчиков доксорубина, обеспечивая его биодоступность.

Благодарность. Работа выполнена в рамках «Программы развития деятельности студенческих объединений КФУ на 2012-2013 гг.» (0613/06.13.02292).

Список литературы

- 1) Aryal S., Prabakaran M., Pilla S., Gong S. Biodegradable and biocompatible multi-arm star amphiphilic block copolymer as a carrier for hydrophobic drug delivery. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2009. V.44. P.346-352.
- 2) Chen S., Zhang X.Z., Cheng S.X., Zhuo R.X., Gu Z.W. Functionalized amphiphilic hyperbranched polymers for targeted drug delivery. // *Biomacromolecules* 2008. V.9. P.2578-2585.
- 3) Agueros M., Areses P., Campanero M.A., Salman H., Quincoces G., Penuelas I., Irache J.M. Bioadhesive properties and biodistribution of cyclodextrinpoly(anhydride) nanoparticles. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009. V.37. P.231-240.
- 4) Hibbeler R.C. *Statics and mechanics of materials.* New Jersey: Prentice Hall. 1995. 810 p.
- 5) Zou J., Shi W., Wang J., Bo J. Encapsulation and controlled release of a hydrophobic drug using a novel nanoparticle-forming hyperbranched polyester. // *Macromol. Biosci.* 2005. V.5. P.662-668.
- 6) Nguyen J., Steele T.W.J., Merkel O., Reul R., Kissel T. Fast degrading polyesters as siRNA nano-carriers for pulmonary gene therapy. // *J. Control. Release.* 2008. V.132. P.243-251.
- 7) Reul R., Nguyen J., Kissel T. Amine-modified hyperbranched polyesters as non-toxic, biodegradable gene delivery systems. // *Biomaterials.* 2009. V.29. P.5815-5824.
- 8) Malmström E., Johansson M., Hult A. The effect of terminal alkyl chains on hyperbranched polyesters based on 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid // *J. Macromol. Chem. Phys.* 1996. V.197, №10. P.3199-3207.
- 9) Александров В.В. Кислотность в неводных растворах. Харьков: Высш. школа. 1981. 152 с.
- 10) Кутырева М.П., Усманова Г.Ш., Улахович Н.А., Медведева О.И., Сякаев В.В., Зиганшина С.А., Кутырев Г.А. // *ВМС. Серия Б.* 2013. Т.55, Вып.4. С.463-474.
- 11) Торопцева А.М., Белгородская К.В., Бондаренко В.М. Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений. М.: Химия. 1972. 360 с.