

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева»**

На правах рукописи



Нечаева Анна Михайловна

**Электростатическое связывание доксорубицина и
бычьего сывороточного альбумина
самоорганизующимися в водных средах сополимерами
N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н., доцент, Межуев Ярослав Олегович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Амфифильные полимеры	12
1.1.1 Амфифильные блок-сополимеры	14
1.1.2 Привитые амфифильные сополимеры	16
1.1.3 Амфифильные сополимеры со статистическим распределением	18
1.1.4 Гидрофобно-модифицированные гомополимеры	19
1.2. Методы синтеза амфифильных (со)полимеров	22
1.2.1 Живущая анионная полимеризация	22
1.2.2 Радикальная полимеризация	23
1.2.3 Полимеризация с раскрытием цикла	24
1.2.4 Ковалентная конъюгация	25
1.2.5 Подходы к синтезу привитых амфифильных сополимеров	29
1.3 Поведение молекул амфифильных полимеров в растворе	31
1.3.1 Самосборка амфифильных макромолекул в водных растворах	31
1.3.2 Влияние архитектуры амфифильных макромолекул на их способность к самосборке	33
1.3.3 Архитектура агрегатов амфифильных макромолекул	35
1.3.4 Термотропные амфифильные (со)полимеры	37
1.3.5 pH чувствительные амфифильные (со)полимеры	39
1.4 Предпосылки возникновения и основы концепции доставки лекарственных средств	42
1.5 Наноразмерные носители для доставки противоопухолевых препаратов	43
1.6 Применение поли-N-винил-2-пирролидона в биомедицине	48
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	51

2.1	Использованные в работе вещества	51
2.2	Синтез амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой	54
2.2.1	Сополимеризация N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в присутствии 1-октадекантиола	54
2.2.2	Сополимеризация N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в присутствии 1-октантиола	54
2.2.3	Синтез амфифильного поли-N-винил-2-пирролидона с концевой н-октадецилтио- группой.....	55
2.3	Получение наноразмерных агрегатов на основе амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой.....	56
2.4	Иммобилизация лекарственных препаратов агрегатами амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой.....	56
2.5	Электростатическая иммобилизация доксорубина агрегатами амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой и исследование кинетики его высвобождения	57
2.6	Получение комплексов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с БСА.....	58
2.7	Получение микропузырьков на основе комплексов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с БСА	59
2.8	Определение молекулярной массы сополимеров методом обратного йодометрического титрования	59
2.9	Определение содержания карбоксильных групп в сополимерах	60
2.10	Определение диаметра, заряда и распределения по размерам полимерных агрегатов.....	61
2.11	Определение поверхностного натяжения	61

2.12 Визуализация агрегатов амфифильных сополимеров ВП с АК и микропузырьков методами микроскопии	62
2.13 Оценка акустического отклика микропузырьков.....	64
2.14 Исследование цитотоксичности сополимеров ВП с АК, а также агрегатов с включенными противоопухолевыми препаратами на их основе	65
2.15 ЯМР спектроскопия	66
2.16 ИК спектроскопия	66
2.17 MALDI-TOF масс-спектрометрия	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	68
3.1 Синтез амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой	68
3.2 Строение амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой	71
3.3 Установление закономерностей агрегации цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в водных растворах	74
3.3.1 Зависимость критических концентраций агрегации (мицеллообразования) от состава, среднечисловой молекулярной массы и длины концевой гидрофобного фрагмента амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой.....	74
3.3.2 Влияние молекулярной массы амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой на диаметр агрегатов их цепей, образующихся в водных средах	80
3.3.3 Влияние концентрации амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в водном растворе на диаметр агрегатов	82

3.3.4 Влияние соотношения сомономерных звеньев в амфифильных сополимерах N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой на диаметр их агрегатов в водных растворах.....	84
3.4 Иммобилизация лекарственных препаратов агрегатами цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой	91
3.4.1 Исследование цитотоксичности полученных наноразмерных форм паклитаксела и доксорубицина	95
3.5 Кинетика высвобождения доксорубицина иммобилизованного гидрофильной короной агрегатов цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой.....	97
3.6 Комплексы амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с бычьим сывороточным альбумином (БСА)	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы. Установление свойств нетоксичных амфифильных макромолекул, способных к самосборке в водных средах, представляет одну из фундаментальных задач на пути разработки носителей противоопухолевых препаратов и диагностикумов. Полимер-носитель способствует регулированию концентрации лекарства у фармакологической мишени, снижает побочные токсические эффекты, пролонгирует действие препарата, а также в ряде случаев может обеспечить эффект таргетирования. Для достижения перечисленных целей традиционно используются пегилированные блок-сополимеры, однако результаты последних исследований показали, что носители, содержащие гидрофильные фрагменты полиэтиленгликоля, способны активировать систему комплемента и индуцировать продукцию антител. Поэтому необходим поиск альтернативных макромолекулярных носителей лекарств и диагностических агентов, не содержащих гидрофильных оксиэтиленовых последовательностей. В этом отношении значительный интерес представляют сополимеры, гидрофильная часть которых построена остатками N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, а гидрофобная – концевыми тиоалкильными группами (амфифильные сополимеры N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой), одностадийный синтез которых отличается технологичностью и был описан ранее в патентах Кускова А.Н., Куликова П.П., Штильмана М.И. и соавторов (патенты RU2599579C2, RU2580649C1). Данная диссертация, являющаяся продолжением многолетних работ, выполняемых в Учебно-научном центре «Биоматериалы», а затем на Кафедре биоматериалов РХТУ им. Д.И. Менделеева при участии М.И. Штильмана, А.Н. Кускова, П.П. Куликова, А.Л. Лусс, Я.О. Межуева, направлена на установление закономерностей электростатического связывания доксорубина и бычьего сывороточного альбумина самоорганизующимися в водных средах сополимерами N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой. Агрегаты цепей сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, образующиеся в

водных средах, способны к солюбилизации гидрофобных нерастворимых в воде противоопухолевых препаратов, а также к электростатическому связыванию посредством межмолекулярных взаимодействий фармакологически активных веществ, содержащих аминогруппы, подверженные протонированию в кислой среде. К числу таких лекарств относится доксорубин, обладающий широким спектром противоопухолевой активности. В то же время, выраженная кардиотоксичность и значительная растворимость в кислых водных средах осложняет его применение в терапии рака. Таким образом, использование сополимеров N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты может способствовать уменьшению побочных токсических эффектов доксорубина, а также его применению в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами, включенными в агрегаты, что соответствует приоритетам, обозначенным в «Национальной онкологической программе 2030». Также разработаны новые подходы к получению ультразвуковых контрастных агентов (микропузырьков) на основе комплексов бычьего сывороточного альбумина и амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой. Все перечисленное свидетельствует об актуальности темы диссертационной работы.

Цель работы состоит в установлении закономерностей электростатического связывания модельного противоопухолевого препарата доксорубина и бычьего сывороточного альбумина самоорганизующимися в водных средах сополимерами N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой для возможного применения в терапии онкологических заболеваний и получения контрастных агентов, востребованных в ультразвуковой диагностике.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи:**

– тензиометрическим методом установить закономерности самоорганизации (самосборки) цепей бифильных макромолекул на основе сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой различного состава и среднечисловых молекулярных масс в водных средах;

– разработать кинетическую модель процесса высвобождения доксорубина, электростатически иммобилизованного агрегатами цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой;

– оценить цитотоксичность агрегатов цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, содержащих электростатически иммобилизованный доксорубин;

– определить константы скорости процессов связывания и высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубина при варьировании концентрации и состава цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, а также pH среды и температуры, вычислить стандартные термодинамические функции для высвобождения доксорубина в нейтральной среде;

– получить комплексы бычьего сывороточного альбумина и амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой и разработать подход к формированию ультразвуковых контрастных агентов (микропузырьков) на их основе.

Научная новизна диссертационной работы состоит в следующем:

– установлено, что высвобождение электростатически иммобилизованного доксорубина подчиняется кинетическому уравнению для обратимых реакций первого порядка, рассчитаны константы скорости высвобождения и связывания доксорубина при различных концентрациях и составах амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, а также оценены значения стандартных термодинамических параметров для процесса высвобождения доксорубина в нейтральной среде, причем равновесная конверсия высвобождения лекарства значительно возрастает в кислой среде, что может служить фактором таргетирования доставки доксорубина в раковые клетки;

– установлено, что в нейтральной среде высвобождение электростатически иммобилизованного доксорубина происходит со значительной энергией

активации 40,7 кДж/моль, тогда как связывание доксорубина реализуется с низкой энергией активации около 5,6 кДж/моль;

– показано образование комплексов бычьего сывороточного альбумина и амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, а также формирование на их основе наполненных воздухом микросфер (микропузырьков), которые могут быть использованы как контрастные агенты для ультразвуковой диагностики.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые установлены кинетические закономерности и рассчитаны стандартные термодинамические функции для высвобождения в нейтральной среде электростатически иммобилизованного доксорубина агрегатами цепей амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой гидрофобной *n*-октадецилтиогруппой. Экспериментально получены и объяснены зависимости скорости и равновесной конверсии высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубина от концентрации и состава амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, а также температуры и pH среды. Показано образование интерполимерных комплексов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой при взаимодействии с бычьим сывороточным альбумином.

Практическая значимость диссертации состоит в обнаружении зависимости скорости и равновесной конверсии высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубина от pH среды, что может представлять интерес для таргетной терапии опухолевых заболеваний. Также разработаны подходы к созданию микропузырьков на основе комплексов бычьего сывороточного альбумина с амфифильными сополимерами N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, представляющих интерес для ультразвуковой диагностики.

Методология и методы исследования. При выполнении диссертационной работы использованы современные физико-химические методы исследования,

такие как ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия, УФ-спектроскопия, MALDI-TOF масс-спектрометрия, тензиометрия, динамическое лазерное светорассеяние, МТТ-тест, атомно-силовая микроскопия и просвечивающая электронная микроскопия.

Положения, выносимые на защиту:

1. Закономерности изменения критических концентраций агрегации, определенные тензиометрическим методом, при варьировании состава цепи, а также длины гидрофильного и гидрофобного фрагментов синтезированных амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой;
2. Закономерности изменения распределения агрегатов по диаметрам при варьировании концентрации, среднечисловой молекулярной массы и состава амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой;
3. Определение цитотоксичности наносомальных форм электростатически иммобилизованного доксорубина короной агрегатов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в экспериментах *in vitro* на клеточных линиях С6 (глиома крысы) и U87 (глиобластома человека);
4. Кинетические закономерности высвобождения доксорубина, иммобилизованного агрегатами цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой посредством электростатических межмолекулярных взаимодействий с гидрофильной короной;
5. Получение комплексов бычьего сывороточного альбумина с амфифильными сополимерами N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой и их использование для создания ультразвуковых контрастных агентов (газонаполненных микропузырьков).

Степень достоверности результатов. Результаты, представленные в диссертации, получены с использованием комплекса современных методов исследования, адекватных поставленным научным задачам, а также взаимно согласованы, непротиворечивы и являются достоверными.

Апробация работы. Основные результаты, приведенные в диссертационной работе, были представлены на следующих международных

научных конференциях: XV Международная научно-практическая конференция «Образование и наука для устойчивого развития» (Москва, 2023); XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021» (Санкт-Петербург, 2021); XII International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues» (Ираклион, Греция, 2021), X Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2021» (Москва, 2021).

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в десяти печатных работах: из них четыре статьи в изданиях, индексируемых международными базами данных Web of Science и Scopus, а также шесть тезисов докладов на международных конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит 71 рисунок и 10 таблиц, построена традиционно и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение, заключение, список процитированной литературы, содержащий 252 источника.

Личный вклад автора. Личный вклад автора был основополагающим на всех этапах выполнения работы, включая выбор темы исследования, постановку цели и задач, выполнение экспериментальных исследований, написание публикаций и текста диссертации, формулирование выводов.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, заведующему кафедрой биоматериалов РХТУ им. Д.И. Менделеева, д.х.н. Я.О. Межуеву, а также д.х.н. М.И. Штильману, д.х.н. А.Н. Кускову, д.х.н. А.А. Артюхову, к.х.н. П.Г. Рудаковской и сотрудникам лаборатории Биофотоники Сколковского Института Науки и Технологий, к.х.н. А.Л. Лусс, П.П. Куликову, к.ф.-м.н. Д.В. Багрову, а также сотрудникам лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» НИТУ МИСИС..

Финансирование. Данная диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению № 075-15-2020-792 (уникальный идентификатор контракта RF ---- 190220X0031).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Амфифильные полимеры

Амфифильность, а также бифильность или дифильность – свойство молекулы вещества проявлять сродство одновременно к двум разным типам сред. Иными словами, амфифильные вещества – вещества, молекулы которых одновременно обладают и гидрофильными и гидрофобными свойствами [1]. Примером амфифильных низкомолекулярных органических молекул являются молекулы липидов, из которых состоят клеточные мембраны живых организмов. Бифильность молекул, например, фосфоглицеридов, обусловлена наличием гидрофобных углеводородных остатков жирных кислот (R_{1-2}) и полярных остатков ортофосфорной кислоты, или другого полярного радикала (R_3) в одной молекуле (рисунок 1) [2].

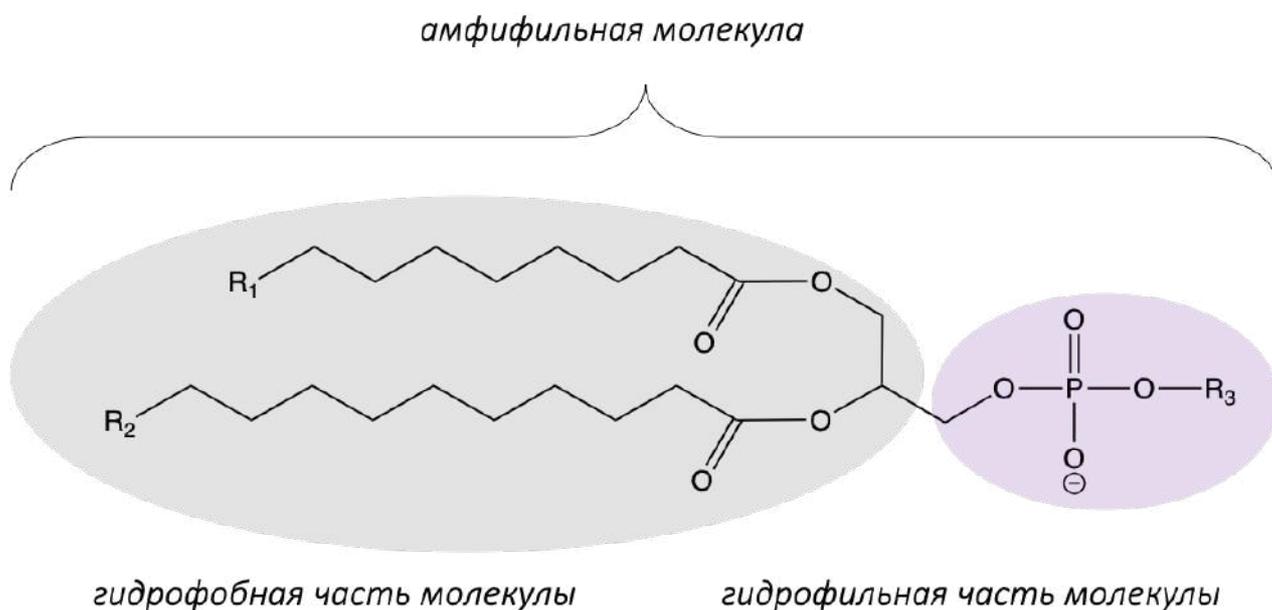


Рисунок 1 – Схематическое строение фосфоглицерида, содержащего остатки двух насыщенных жирных кислот. R_1 и R_2 – углеводородные радикалы, R_3 – атом водорода или полярный радикал

Говоря о высокомолекулярных соединениях – полимерах, под амфифильными полимерами чаще всего подразумевают либо сополимеры,

состоящие из соединенных ковалентной связью полимерных участков или блоков с разным сродством к полярным средам, либо изначально водорастворимые гомополимеры, химически модифицированные гидрофобными низкомолекулярными группами. К первой группе относятся, например, триблок-сополимеры пропиленгликоля и этиленгликоля, известные как полуксамеры или плуроники [3], блок-сополимеры молочной кислоты и этиленгликоля [4] многие другие. К данной группе также относятся сополимеры со случайным или чередующимся распределением мономерных звеньев в цепи и привитые сополимеры различного состава. В качестве примеров амфифильных макромолекул, относящихся ко второй группе, можно привести полиакрилат натрия, модифицированный додециламином [5], модифицированные хитозан, ПЭГ, ксиланы, и другие конъюгаты водорастворимых полимеров с гидрофобными низкомолекулярными соединениями [6–10].

Хотя свойство растворяться в средах с разной полярностью присуще не только сополимерам, но гомополимерам, таким как поли-N-винил-2-пирролидон (ПВП), поливиниловый спирт (ПВС), полиэтиленгликоль (ПЭГ) и многим другим, большинство современных работ в области синтеза и применения амфифильных полимеров относятся к двум вышеупомянутым группам (сополимерам и модифицированным гомополимерам). Такие полимеры, подобно низкомолекулярным амфифильным молекулам, обладают уникальным фазовым поведением – они способны к самоорганизации в растворах в агрегаты различных структур, таких как мицеллы или везикулы (полимеросомы) [11]. Это свойство амфифильных макромолекул эффективно используется во многих областях – от промышленности до косметологии и медицины [11,12].

В данном разделе литературного обзора представлена актуальная информация об основных типах амфифильных (со)полимеров, методах их синтеза их фазовом поведении в водных растворах.

1.1.1 Амфифильные блок-сополимеры

Амфифильные блок-сополимеры представляют собой макромолекулы, в которых несколько блоков, состоящих из гидрофильных и гидрофобных цепей, соединены друг с другом ковалентной связью [13]. Как правило большинство таких сополимеров состоят из двух или трех блоков, но встречаются и варианты мультиблочных сополимеров [14–18]. При этом блок-сополимеры могут иметь как линейное, так и разветвленное строение (рисунок 2) [16].

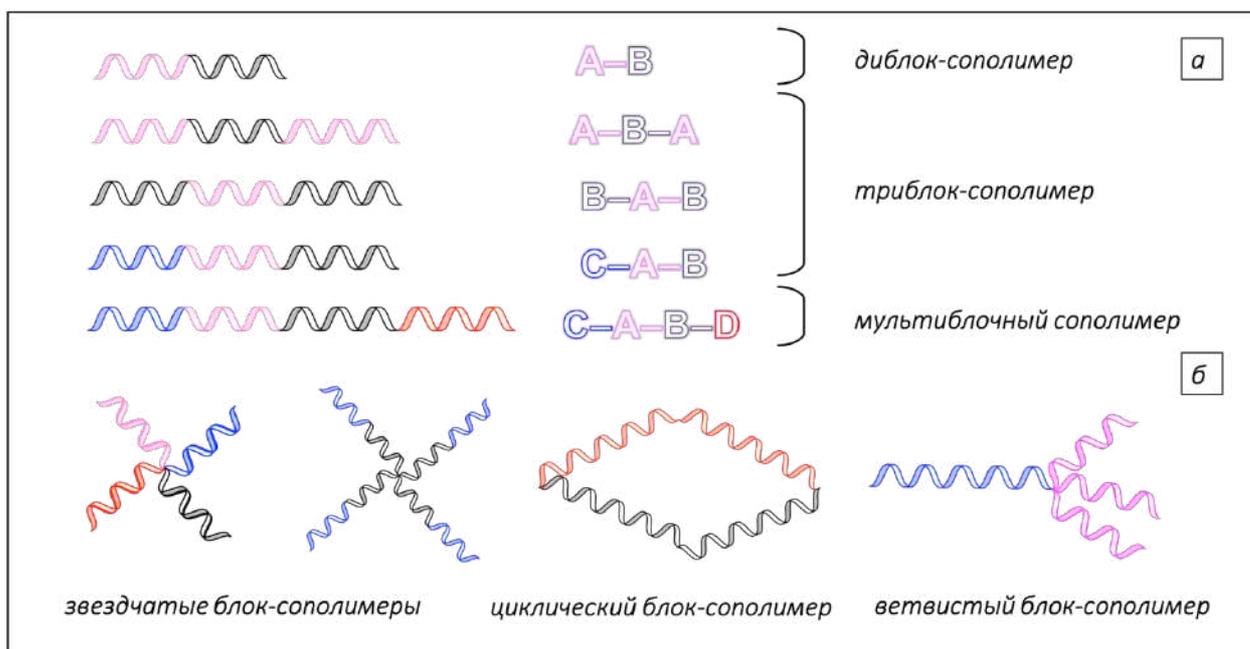


Рисунок 2 – Схематическое изображение структур некоторых линейных (а) и разветвленных (б) блочных сополимеров

Гидрофильная часть макромолекулы может иметь как нейтральный, так и положительный или отрицательный заряд. В качестве гидрофильных блоков в таких сополимерах чаще всего встречаются полиэтиленгликоль, поли-N-винилпирролидон, поливинилкапролактан (ПВКЛ), полиакриламид (ПАА), полиоксазолины и другие известные синтетические и природные биосовместимые гидрофильные полимеры (рисунок 3) [11].

контактировать с пищевыми продуктами и которые могут быть введены в организм человека [19–22]. Помимо полилактида и поликапролактона в качестве гидрофобных блоков часто выступают полипропиленоксид, полибутилен оксид (ПБО), поли(алкил)цианакрилаты, полистирол (ПС), полиуретаны и другие. Некоторые структурные формулы таких полимеров приведены на рисунке 4.

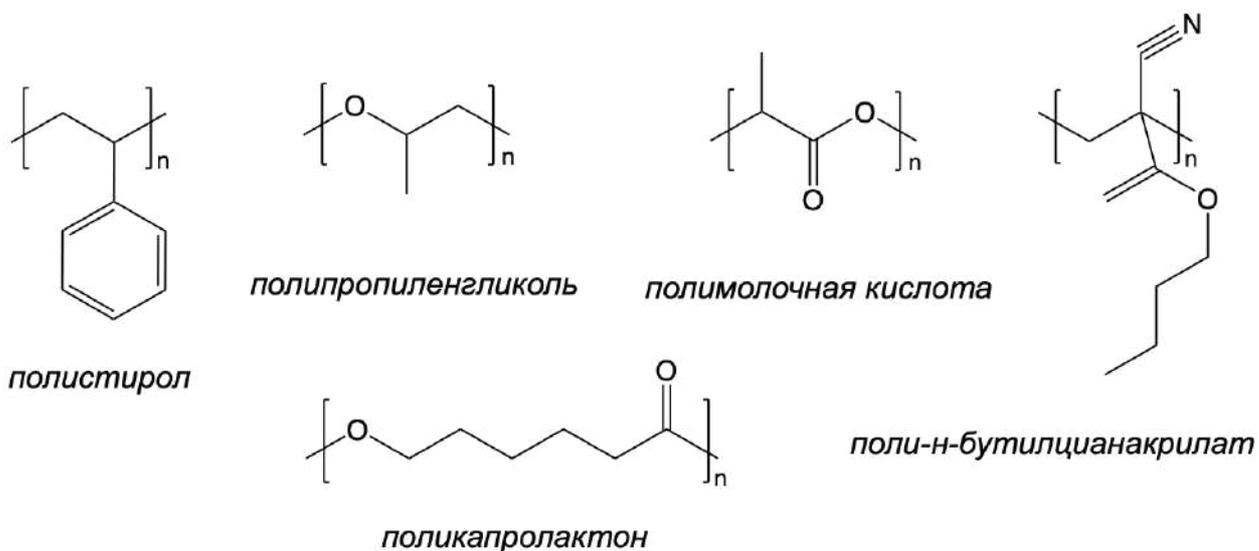


Рисунок 4 – Структурные формулы некоторых полимеров, используемых в качестве гидрофобной части амфифильных амфифильных блок-сополимеров

1.1.2 Привитые амфифильные сополимеры

Другой тип амфифильных сополимеров – привитые сополимеры. Привитой сополимер состоит из основной полимерной цепи, имеющей множество боковых ответвлений, представленных отличающимися по составу и/или строению полимерными цепями (рисунок 5). Аналогично блок-сополимерам, привитые амфифильные сополимеры проявляют все свойства поверхностно-активных веществ и способны к самосборке в селективных растворителях, но их структура и способы получения отличаются от блок-сополимеров [23].

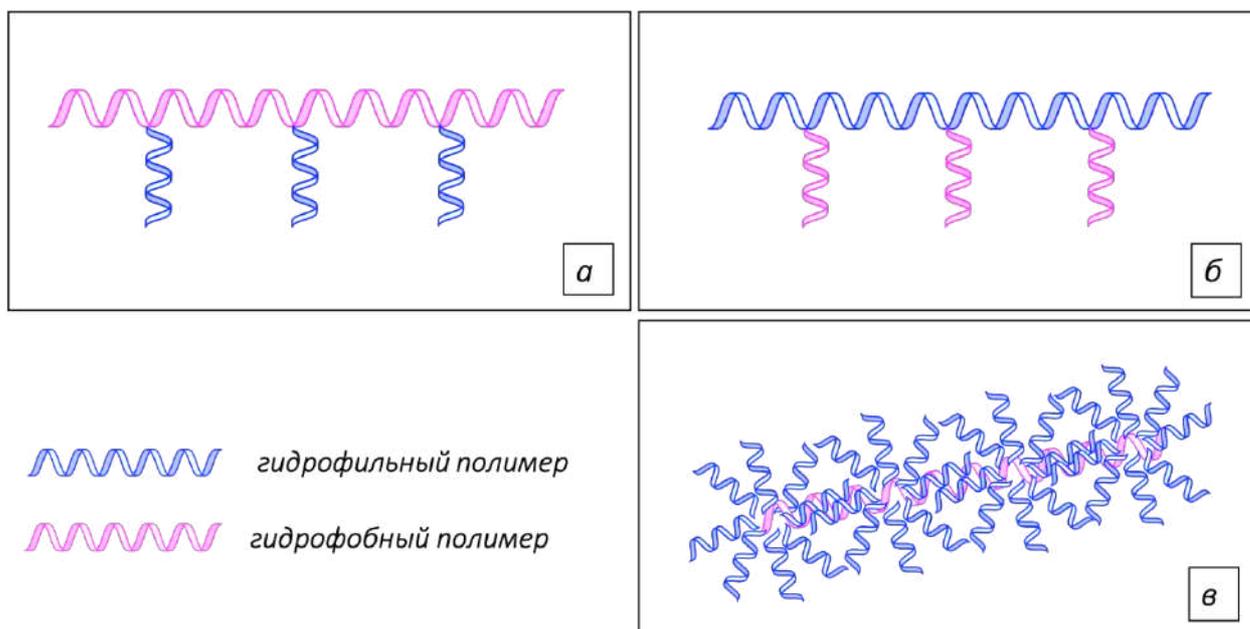


Рисунок 5 – Схематическое изображение структуры привитых амфифильных сополимеров

Привитые сополимеры, имеющие большое количество боковых ответвлений (т.е. высокую плотность прививки), выделяют в отдельную подгруппу, именуемую в англоязычной литературе как «bottlebrush copolymers» (рисунок 5в). Очевидно, что название таким сополимерам дано из-за визуального сходства с вытянутыми щетками округлой формы. Полимеры такой структуры имеют некоторые преимущества перед линейными блок-сополимерами. Например, они способны образовывать агрегаты в растворах с более разнообразной морфологией и обычно имеют более низкую критическую концентрацию агрегации (ККА), чем диблочные сополимеры [24].

В привитых сополимерах основная цепь может быть представлена гидрофобным гомополимером, а боковая – гидрофильным (рисунок 5а), так и наоборот (рисунок 5б) [25].

Например, в работе [26], был получен привитой сополимер, состоящий из гидрофильной основной цепи поли(2-гидроксиэтилакрилата) и боковых гидрофобных цепей из полистирола.

В работе [27] синтезировали биodeградируемый амфифильный привитой сополимер, в котором основная цепь представлена гидрофобным поли(лактид-ко-диазидометилтриметиленкарбонатом), а боковые гидрофильные ответвления

представлены линейным полиэтиленгликолем. Полученный сополимер образовывал в водных растворах устойчивые везикулярные структуры.

1.1.3 Амфифильные сополимеры со статистическим распределением

Амфифильные сополимеры, состоящие из гидрофильных и гидрофобных сегментов со статистическим или градиентным распределением (рисунок 6) мономерных остатков в цепи, аналогично амфифильным маркомолекулам с упорядоченной структурой (блок- и привитые сополимеры) проявляют поверхностно-активные свойства и способны к самоорганизации в растворах в мицеллы или мицеллоподобные агрегаты [28].

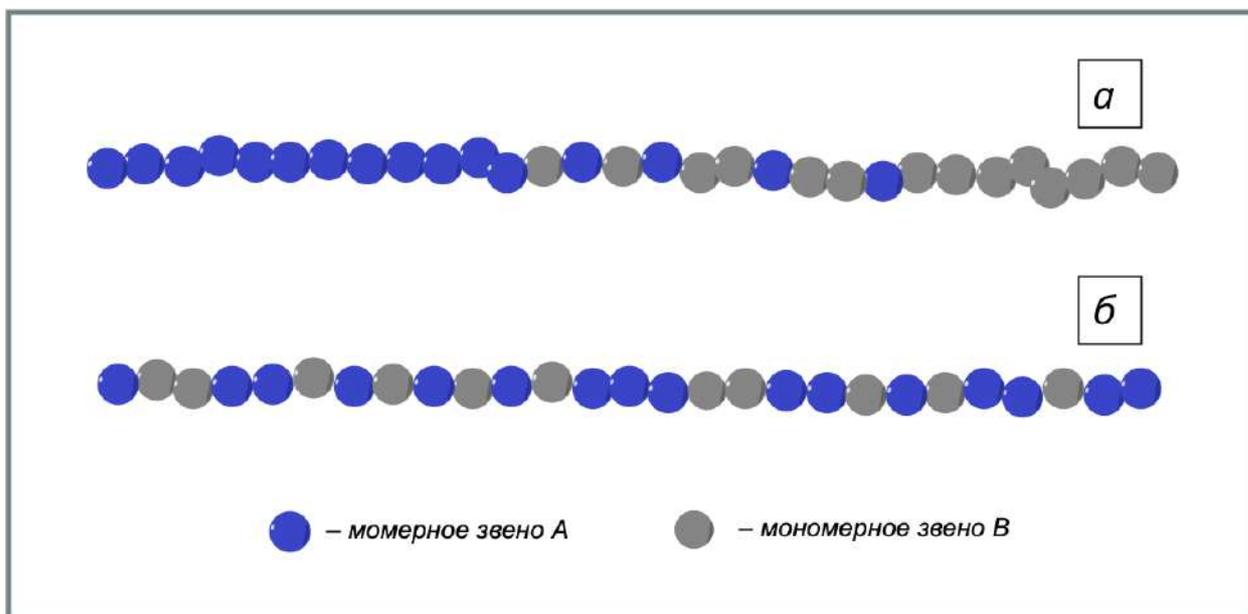


Рисунок 6 – Схематическое изображение структуры амфифильных сополимеров с градиентным (а) и со статистическим (б) распределением мономерных звеньев в цепи

Такие структуры могут быть получены, например, свободно-радикальной полимеризацией в растворе [5,29,30], что является несомненным преимуществом перед блочными и привитыми сополимерам, так как данный метод обеспечивает получение амфифильной макромолекулы всего в одну стадию.

В качестве примера можно привести амфифильные статистические сополимеры, полученные в работе [31]. Сополимеры содержали случайно

распределенные в макромолекулярной цепи гидрофильные остатки этиленгликольметилового эфира метилметакрилата (ЭГМА) и гидрофобные остатки додецилметакрилата (ДМА) в разных соотношениях. Все синтезированные сополимеры образовывали мицеллы в водных растворах – их средний размер лежал в диапазоне от 20 до 50 нм и зависел от степени полимеризации. Более того, концентрированные растворы сополимеров с более высокими степенями полимеризации подвергались структурированию (гелеобразованию) под воздействием температуры.

1.1.4 Гидрофобно-модифицированные гомополимеры

В другую подгруппу амфифильных макромолекул можно объединить гидрофильные природные и синтетические полимеры, модифицированные низкомолекулярными (не полимерными) гидрофобными фрагментами. В данном случае гидрофобная группа может быть концевой или привита к основной цепи полимера в качестве бокового ответвления (рисунок 7).

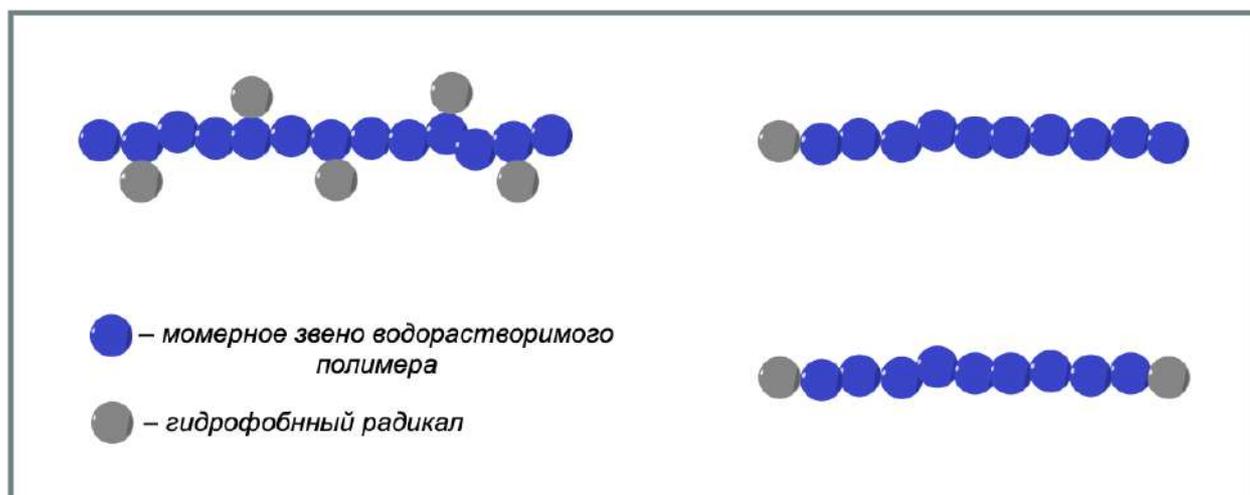


Рисунок 7 – Схематическое изображение структуры модифицированных гидрофобными низкомолекулярными группами водорастворимых полимеров

В качестве гидрофобных групп чаще всего используют соединения, содержащие длинноцепочечный углеводородный радикал $-(\text{CH}_2)_n-$ где $n \geq 8$) и функциональную реакцию способную группу. К таким соединениям относятся алкил– амины и тиолы, например октадециламин (ОДА) и

октадекантиол (ОДТ), жирные кислоты и их ангидриды, альдегиды, спирты и их производные. Такие соединения нельзя отнести к сополимерам, т.к. гидрофобный фрагмент представлен низкомолекулярной молекулой, но, аналогично амфифильным сополимерам любого строения (блок-, привитым- и случайным), гидрофобно-модифицированные полимеры проявляют поверхностно-активные свойства и способны к самосборке в селективных растворителях.

В работе [5] были синтезированы амфифильные полимеры, состоящие из основной гидрофильной цепи полиакрилата натрия, с привитыми боковыми гидрофобными группами додециламина. Синтезированные полимеры подвергались самосборке в водных растворах в сферические мицеллы и были способны к сольubilизации магнитных гидрофобных частиц.

В качестве другого примера можно привести модифицированный гидрофобными алкильными группами хитозан. В работе [32] синтезирован хитозан, модифицированный додецилальдегидом. Полученные макромолекулы за счет своего гидрофобного радикала были способны активно взаимодействовать с мембраной *E. coli*, приводя к коагуляции бактериальных клеток. Чтобы облегчить удаление коагулированных клеток с помощью приложенного магнитного поля, гидрофобно-модифицированный хитозан был привит на поверхность магнитных наночастиц.

В качестве примера амфифильного полимера, содержащего концевую гидрофобную группу, можно привести работу [33]. В этом исследовании для создания амфифильной макромолекулы, способной к самосборке в водных растворах в мицеллы, к гидрофильному метоксилполиэтиленгликолю (мПЭГ), модифицированному линейным полиэтиленимином (ПЭИ) были привиты концевые гидрофобные группы, состоящие из остатков олеиновой кислоты и светочувствительного о-нитробензилсукцината. Мицеллы, образованные полученным полимером, были способны к сольubilизации лекарственного препарата и обладали чувствительностью к рН и воздействию ИК излучения.

Еще одним примером амфифильной макромолекулы, состоящей из гидрофильного гомополимера и гидрофобной концевой группы (рисунок 8), является амфифильный поли-N-винилпирролидон [34–38].

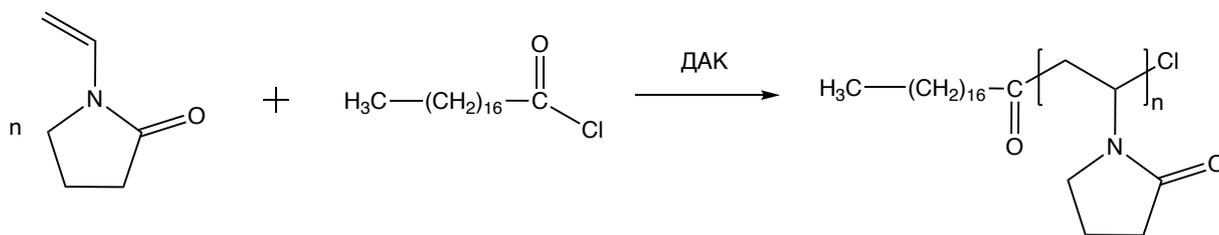


Рисунок 8 – Схема получения амфифильного поли-N-винил-2-пирролидона в присутствии хлорангидрида стеариновой кислоты

Разработаны методы синтеза амфифильных макромолекул ПВП в одну и две стадии [39,40]. В случае двухстадийного синтеза гидрофобная группа была химически привита к гомополимеру N-винил-2-пирролидона, содержащему концевую реакционноспособную группу, представленную остатком меркаптоуксусной кислоты [36]. Одностадийный синтез заключался в использовании длинноцепочечной гидрофобной молекулы, способной к передаче цепи в процессе радикальной полимеризации. Такими молекулами являются ангидриды жирных кислот или алкилтиолы, в частности, октадекантиол, гексадекантиол и декантиол, использованные в работах [35,37]. Тиолы, взаимодействуя с молекулами инициатора, образуют активный радикал, способный к иницированию полимеризации. Таким образом, алкилтиолы в данном случае выполняют две функции – одновременно являются концевой гидрофобной группой макромолекулы и регулируют молекулярную массу синтезируемого полимера.

Макромолекулы амфифильного ПВП подвергались самосборке в водных растворах в агрегаты сферической формы и были способны к инкапсуляции гидрофобных веществ, используемых в терапевтических и диагностических целях [41]. Было показано, что частицы амфифильного ПВП диаметром порядка 100 нм способны доставлять содержащееся в них вещество непосредственно в ядро клетки [42]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали отсутствие токсичности полученных сополимеров и их агрегатов [43,44].

1.2. Методы синтеза амфифильных (со)полимеров

1.2.1 Живущая анионная полимеризация

Новаторская работа по синтезу блок-сополимеров с помощью живущей анионной полимеризации была опубликована Майклом Шварцем и др. в 1956 году [45]. Сам Шварц определил живущую полимеризацию как процесс роста цепи, не сопровождающийся необратимыми реакциями ее обрыва и/или передачи. [46]. Такой метод способен обеспечить синтез блок-сополимеров путем последовательного добавления мономеров разного типа в реакционную смесь или полимеризацией мономера на макроинициаторе. Так, с помощью анионной полимеризации, в работе [47] синтезирован амфифильный сополимер, состоящий из гидрофобного блока, представленного остатками фенилглицидилового эфира и гидрофильного блока метоксиполиэтиленгликоля, который был использован в качестве макроинициатора (рисунок 9).

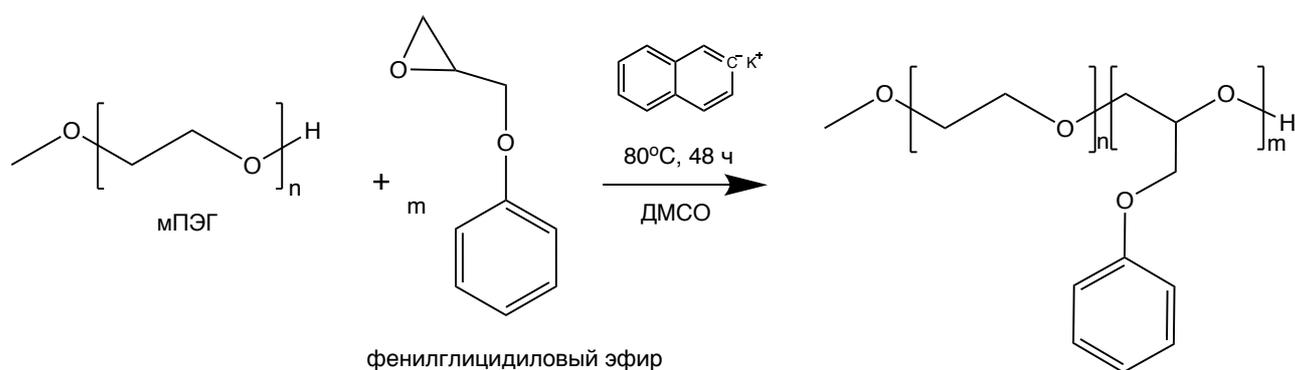


Рисунок 9 – Схема получения амфифильного блок-сополимера этиленгликоля и фенилглицидилового эфира

Несмотря на наличие некоторых недостатков данного метода, таких как ограниченный выбор мономеров и не всегда эффективный контроль над молекулярной массой и полидисперсностью синтезируемого полимера, живущая анионная полимеризация все еще является весьма распространенным методом получения блок-сополимеров на основе виниловых и циклических мономеров, в том числе и в промышленных масштабах [48–50]. Кроме того, с помощью комбинирования методов анионной полимеризации и химической конъюгации

возможен синтез блок-сополимеров со сложной разветвленной архитектурой – звездообразных, дендритных и т.д. [51,52].

1.2.2 Радикальная полимеризация

Широкое применение для синтеза амфифильных сополимеров различной структуры имеют и методы радикальной полимеризации, которые условно можно разделить на два типа – свободнорадикальная полимеризация и контролируемая радикальная полимеризация [53–55].

Свободнорадикальная полимеризация является эффективным методом получения сополимеров со случайным распределением мономерных звеньев в макромолекулярной цепи и подходит для массового производства, т.к. процесс практически не чувствителен к наличию влаги, может осуществляться как в растворе, так и в дисперсной фазе в относительно мягких условиях и широком температурном диапазоне. Получение амфифильных сополимеров в данном случае может быть достигнуто путем сополимеризации гидрофильных и гидрофобных мономеров, как это показано в работах [31,56], а контроль над молекулярной массой может осуществляться с помощью введения в реакцию смесь агентов передачи цепи. Использование гидрофобного передатчика цепи и гидрофильного мономера в процессах свободно-радикальной полимеризации также приводит к образованию амфифильных макромолекул, что отмечено в работах [34,35,37]. При этом контролируемая радикальная полимеризация открывает принципиально новые возможности синтеза блок-сополимеров, в том числе и бифильных [55,57–59]. В контролируемой радикальной полимеризации активен широкий спектр мономеров, что выгодно отличает ее от процессов ионной полимеризации [57,60]. Продукты контролируемой характеризуются достаточно узким молекулярно-массовым распределением и коэффициент полидисперсности (M_w/M_n , где M_w – средневесовая молекулярная масса), как правило, не превышает 1,5 [61].

Несмотря на многочисленные преимущества контролируемой радикальной полимеризации, ее эффективность в синтезе блок-сополимеров зависит от подбора условий, что требует детальных исследований в каждом конкретном случае. Кроме того, при проведении полимеризации с переносом атома (atom transfer radical polymerization, ATRP) и полимеризации с обратимой передачей цепи по механизму «присоединение - фрагментация» (reversible addition fragmentation chain transfer, RAFT) необходима тщательная очистка полимеров от примесей токсичных комплексов меди или никеля и тритиокарбонатов соответственно перед их использованием в фармакологических областях.

Таким образом, свободнорадикальная полимеризация в присутствии активных гидрофобных передатчиков цепи является универсальным, простым и технологичным способом получения амфифильных полимеров.

1.2.3 Полимеризация с раскрытием цикла

Согласно определению международный союза теоретической и прикладной химии (ИЮПАК) полимеризацией с раскрытием цикла является процесс, в котором циклический мономер образует составное повторяющееся звено, являющееся ациклическим или содержащее меньше циклов, чем в исходном мономере [62]. Таким образом, полимеризация с раскрытием цикла (далее – ROP, от англ. ring opening polymerization) является процессом получения макромолекул на основе циклических мономеров определенного строения. К мономерам, вступающим в реакцию полимеризации с раскрытием цикла, относятся лактоны, лактиды, лактамы, циклические эфиры и тиоэфиры, фосфозены и др., при этом сама полимеризация может быть вызвана типичными для ионной полимеризации иницирующими системами [63–65]. Несмотря на ограниченный выбор мономеров, ROP часто используют для синтеза гомо- и сополимеров, в частности, поликапролактона, являющегося одним из наиболее часто используемых гидрофобных полимеров в области биомедицины [66,67].

Например, в работах [68–70] описан способ получения амфифильного блок-сополимера капролактона и этиленгликоля. В данных работах капролактон подвергался полимеризации с раскрытием цикла на метиловом эфире полиэтиленгликоля, выступающего в качестве макроинициатора (рисунок 10).

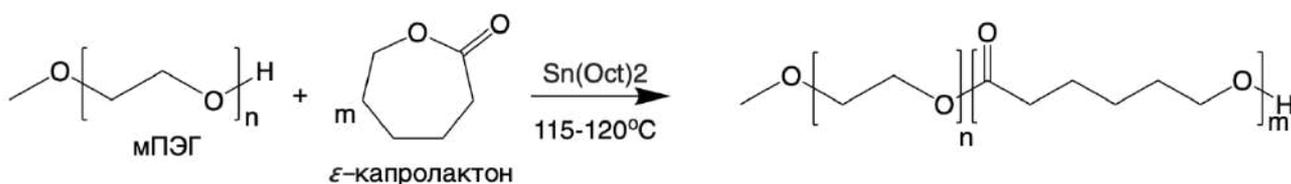


Рисунок 10 – Схема получения амфифильного блок-сополимера этиленгликоля и капролактона

Следует также добавить, что, используя инициаторы со сложной структурой, с помощью ROP можно получить амфифильные блок-сополимеры не только линейного, но и разветвленного строения [71].

1.2.4 Ковалентная конъюгация

Альтернативным способом получения амфифильных сополимеров является ковалентное связывание двух макромолекул с разной растворимостью в воде. Конъюгация двух макромолекул приводит к образованию блок-сополимеров, в случае если сайт связывания располагается на концах макромолекул, и привитых сополимеров, если сайты связывания расположены внутри полимерной цепи [72]. Последняя стратегия синтеза приводит к образованию привитых сополимеров [24]. Три основные стратегии синтеза привитых сополимеров рассмотрены в следующем подразделе.

Ковалентной конъюгацией также можно получить так называемые гидрофобно-модифицированные полимеры, в которых, как правило, основная цепь представляет собой гидрофильную макромолекулу, а концевая или боковые группы представлены неполимерными гидрофобными фрагментами.

Конъюгация как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных цепей происходит при взаимодействии определенных функциональных групп. Соответственно, применимость данного метода синтеза амфифильных макромолекул определяется наличием реакционноспособных групп, а архитектура синтезируемой макромолекулы – их расположением.

К одним из наиболее распространенных современных реакций ковалентной конъюгации можно отнести реакции этерификации и реакции, входящие в синтетический инструментарий «клик-химии» [73,74].

И гидроксильная, и карбоксильная группы достаточно часто встречаются как в природных (полисахариды, белки) так и в синтетических (поливиниловый спирт, полиакриловая кислота) полимерах. Однако реакционная способность карбоксильных групп невысока, и реакции этерификации обычно проводят, предварительно активировав карбоксильную группу с помощью карбодиимидного или другого подходящего метода [74]. Активированная карбоксильная группа также взаимодействует с аминогруппами, которые присутствуют во многих биополимерах (белки, полисахариды). Например, в работах [75–77] описано получение амфифильного хитозана, модифицированного жирными кислотами, активированными с помощью карбодиимидного метода (рисунок 11).

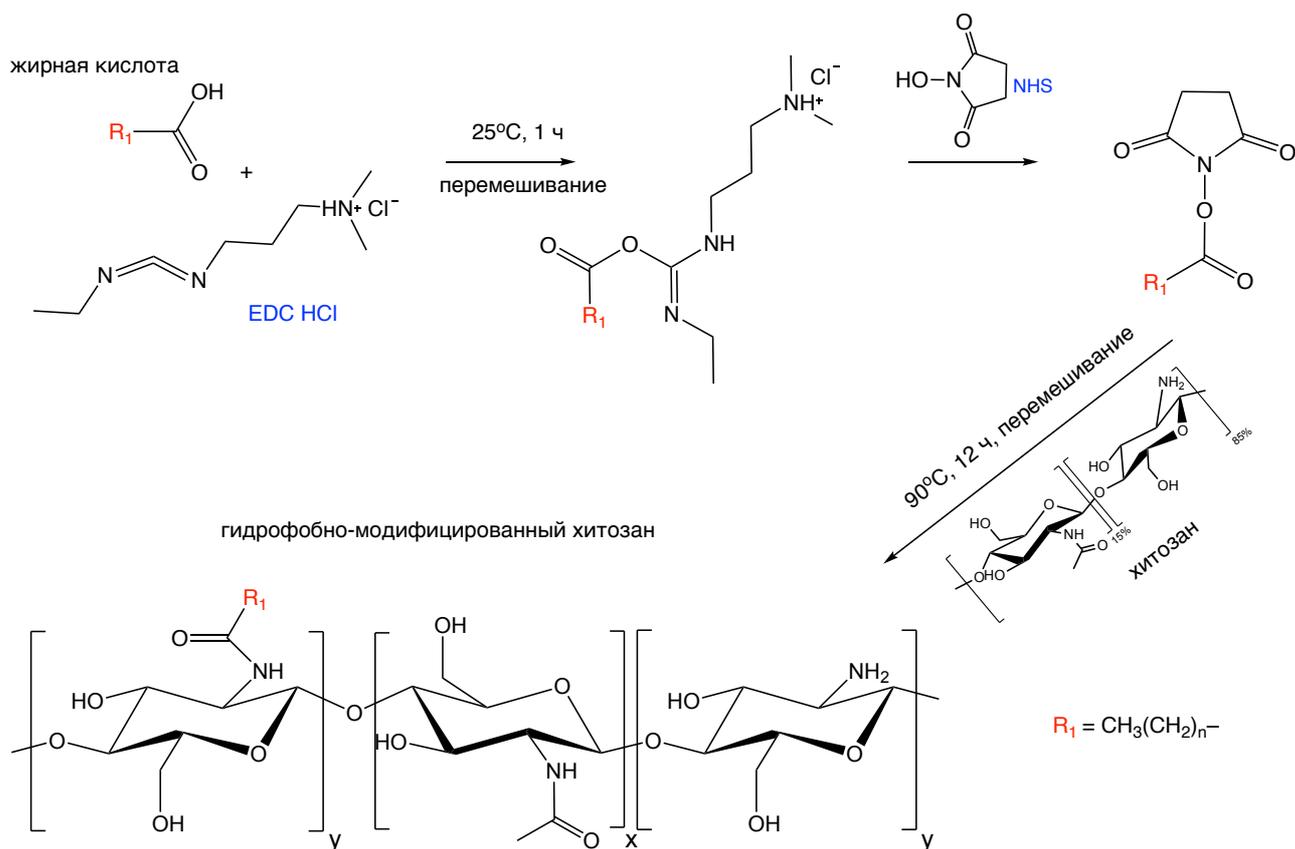


Рисунок 11 – Схема получения хитозана, модифицированного жирными кислотами

Реакции «клик-химии» широко используются для ковалентной конъюгации низкомолекулярных соединений и макромолекул, поскольку эти реакции могут протекать в водных растворах, в мягких условиях и являются высокоселективными. Недостатком таких реакций является необходимость химической функционализации полимеров, так как функциональные группы, вступающие в реакции «клик-химии», не встречаются в природных и редко встречаются в синтетических полимерах.

К методам «клик-химии» относятся, например, реакции циклоприсоединения Дильса-Альдера и реакции азид-алкинового циклоприсоединения. Реакции Дильса-Альдера протекают между диенами, их гетероцепными аналогами и диенофилами, к которым относят алкены, алкины и молекулы, содержащие двойные связи с гетероатомом. Реакции азид-алкинового циклоприсоединения – реакции, протекающие между азидами и алкинами,

приводящие к образованию 1,2,3-триазолов. Реакции азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемые одновалентной медью известны под аббревиатурой CuAAC (от англ. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition).

Например, с помощью азид-алкинового циклоприсоединения в работе [78] был получен привитой амфифильный сополимер капролактона и декстрана. Основная цепь синтезированного сополимера представлена гидрофобным поликапролактоном, а боковые ответвления – макромолекулами гидрофильного декстрана. Связи между фрагментами образованы за счет взаимодействия азидной концевой группы декстрана и алкиновыми группами поликапролактона (степень замещения в расчете на мономерное звено 8%) как показано на рисунке 12.

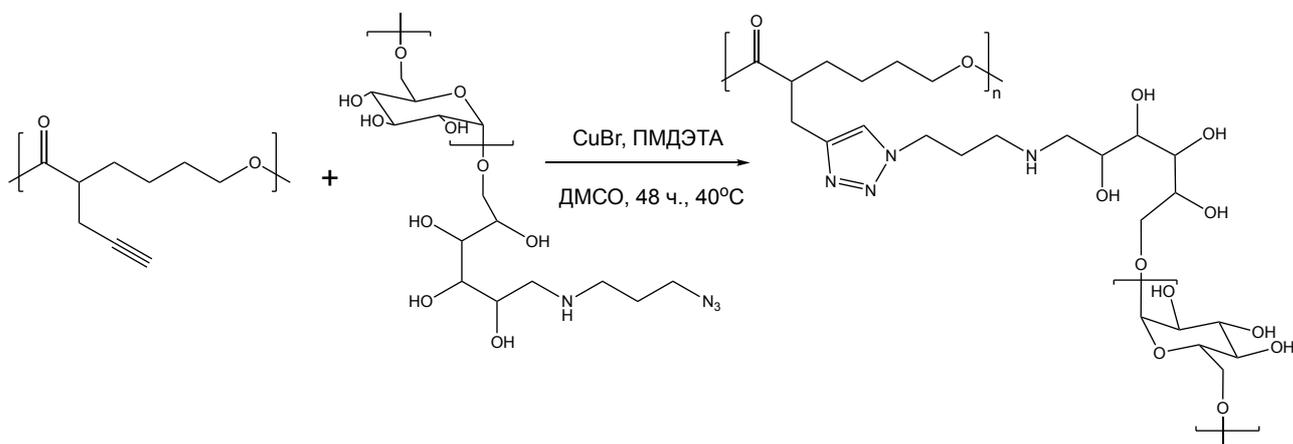


Рисунок 12 – Схема получения амфифильного привитого сополимера капролактона и декстрана

С помощью аналогичных реакций в работе [79] был получен привитой амфифильный сополимер капролактона и этиленгликоля.

По сравнению с контролируемой радикальной или ионной полимеризацией, а также полимеризацией циклов на макроинициаторах, подход к синтезу амфифильных блок-сополимеров с помощью ковалентной конъюгации обеспечивает строгий контроль над молекулярной массой конечного продукта, так как степень полимеризации исходных макромолекул определена заранее. С другой стороны, часто получение амфифильных полимеров таким методом подразумевает несколько стадий, что делает процесс более длительным и трудоемким.

1.2.5 Подходы к синтезу привитых амфифильных сополимеров

Аналогично линейным и разветвленным блок-сополимерам, привитые сополимеры состоят из блоков разного типа, соединенных друг с другом, но их топология существенно отличается. Привитые сополимеры имеют множество точек присоединения боковых ответвлений к основной полимерной цепи, соответственно, подходы к синтезу таких структур несколько иные. Для синтеза привитых сополимеров существует три основных стратегии, именуемых как «прививка на/к» (от англ. «grafting-on/to»), «прививка сквозь» (от англ. «grafting-through»), и «прививка от» (от англ. «grafting-from») [23,25]. Схематическая иллюстрация данных подходов приведена на рисунке 13.

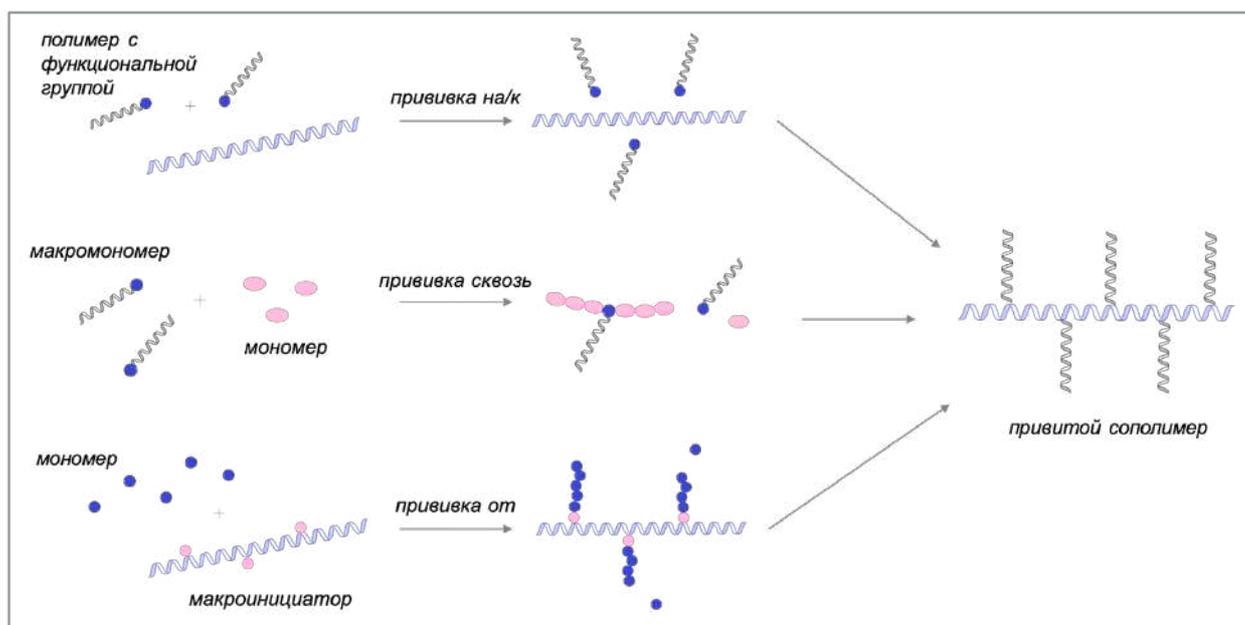


Рисунок 13 – Стратегии синтеза привитых сополимеров

Стратегия подхода «прививки на/к» заключается в том, что боковые полимерные блоки присоединяются к основной полимерной цепи посредством образования ковалентной связи между реакционноспособными функциональными группами основной и боковых цепей. В случае прививаемых цепей функциональная группа должна находиться на конце макромолекулы и быть способна вступать в реакцию с функциональной группой основной полимерной цепи. Как правило, функциональную группу, способную к селективному и высокоэффективному взаимодействию (реакции «клик-химии»)

вводят в основную полимерную цепь путем ее химической модификации, например, как это показано авторами работы [80], получившими азид- и алкиновые производные макромолекул. Азид- и алкиновые функциональные группы, безусловно, не единственные группы, способные к образованию ковалентной связи. К таким группам также можно отнести карбоксильную, гидроксильную, ангидридную, эпоксидную, альдегидную, amino- и другие группы, ведение которых в основную полимерную цепь может быть достигнуто путем полимеризации и сополимеризации соответствующих мономеров [81–83].

Подход «прививки сквозь» также называют методом макромономеров. Суть данного метода состоит в сополимеризации макромономеров – полимерных или олигомерных цепей, имеющих способную к полимеризации концевую группу (как правило терминальную двойную связь), с другими мономерами, которые будут составлять основную полимерную цепь. Так, авторы работы [84] синтезировали привитые амфифильные сополимеры с помощью радикальной сополимеризации бегенилполиэтиленгликоля метакрилата, выступающего в качестве макромономера, и 2,2,2-трифторэтил метакрилата.

Преимуществом данного подхода является то, что плотность «прививки» можно регулировать путем варьирования мольного соотношения мономер/макромономер. Различия в активности сомономеров также используются как инструмент регулирования плотности прививки.

В методе «прививки от», полимеризация боковых цепей происходит непосредственно на реакционных центрах, располагающихся вдоль основной полимерной цепи. Например, в работе [85] синтезировали привитой сополимер уретана и N,N-диметилакриламида. В качестве основной полимерной цепи синтезировали уретановый гомополимер, содержащий боковые группы на основе третиокарбоната, выступающие агентами передачи цепи по механизму обратимого присоединения-фрагментации (RAFT). Полимеризация боковых цепей, представленных мономерными остатками N,N-диметилакриламида происходила в присутствии азобизобутиронитрила непосредственно на RAFT-центрах основной полимерной цепи.

Таким образом, с точки зрения полимерной химии, существенных ограничений для синтеза амфифильных полимеров и сополимеров любого состава и строения нет. Амфифильные макромолекулы могут быть синтезированы с помощью как хорошо изученных, реализуемых на протяжении десятилетий методов, таких как свободно-радикальная полимеризация или полимеризация с раскрытием цикла, так и с помощью более новых, но открывающих новые возможности методов синтеза, таких как методы КРП. Определяющими факторами в выборе метода синтеза амфифильных полимеров являются: 1) желаемая архитектура макромолекулы – линейная, разветвленная, циклическая; 2) химический состав макромолекулы – наличие определенных функциональных групп или возможность их введения; 3) желаемые условия протекания реакции – температура, растворитель, количество стадий, использование катализаторов и т.д. При этом имеющийся арсенал синтетических методов позволяет варьировать структуру и свойства целевых амфифильных сополимеров в широких пределах.

1.3 Поведение молекул амфифильных полимеров в растворе

1.3.1 Самосборка амфифильных макромолекул в водных растворах

Уникальным свойством амфифильных молекул является их способность к самосборке (самоорганизации) в растворе [86]. В частности, способность амфифильных полимеров и сополимеров образовывать агрегаты в нано- и микрометровом размерном диапазоне в водных растворах привлекла значительное внимание для применения в фармакологии [87–90].

Движущей силой самосборки амфифильных молекул в водных средах является стремление минимизировать контакты между гидрофобной частью молекулы и полярным растворителем [91]. Несмотря на то, что образование агрегатов амфифильных макромолекул обеспечивается низкоэнергетическими (при расчете на пару взаимодействующих фрагментов) нековалентными

межмолекулярными взаимодействиями, суммарного эффекта этих взаимодействий достаточно, чтобы обеспечивать агрегатам существенную стабильность [92]. Стабилизация агрегатов обеспечивается водородными связями, образующимися между полярными участками амфифильных молекул и молекулами воды, а также гидрофобными взаимодействиями между неполярными фрагментами [91]. Перенос гидрофобных молекул в воду сопровождается разрушением нативной структуры водородных связей воды и их дальнейшей перегруппировкой. Вокруг гидрофобных молекул образуется новая сеть водородных связей воды, именуемая клатратами. Так как образование клатратов требует существенной реструктуризации водородных связей, этот процесс является энергетически невыгодным. Агрегация гидрофобных молекул в данном случае уменьшает площадь их взаимодействия с молекулами воды, и, соответственно, уменьшает количество водородных связей, которые необходимо реструктурировать. Таким образом, стабилизация агрегатов достигается одновременно за счет процессов образования водородных связей между гидрофильной частью амфифильных молекул и молекулами воды и самопроизвольной агрегации гидрофобных участков молекул [93,94]. Поэтому, образование агрегатов гидрофобных молекул в средах полярных растворителей – процесс энергетически выгодный и протекает самопроизвольно ($\Delta G^0 < 0$). Подобный синергический эффект нековалентных взаимодействий наблюдается и во многих биомолекулах, например, в белках, где в формирование необходимой для их функционирования третичной структуры все вышеупомянутые взаимодействия вносят существенный вклад [2].

В простейшем случае молекулы амфифильного полимера при попадании в воду образуют мицеллы, состоящие из гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки, которую иначе называют «гидрофильной короной» (рисунок 14а). Такие мицеллы называют прямыми. В неполярных или низкополярных растворителях амфифильные макромолекулы способны образовывать структуры с противоположным расположением блоков. Такие мицеллы называются

обратными и состоят из гидрофильного (полярного) ядра, окруженного гидрофобной (неполярной) оболочкой (рисунок 14б) [95,96].

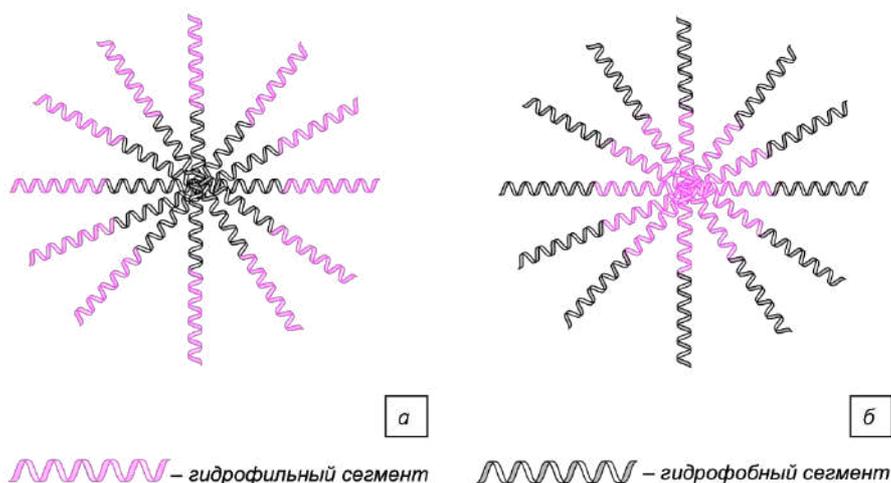


Рисунок 14 – Схематическое изображение прямой (а) и обратной (б) мицеллы

1.3.2 Влияние архитектуры амфифильных макромолекул на их способность к самосборке

На морфологию и размеры образуемых агрегатов существенно влияет химический состав, строение макромолекул, длина гидрофильных и гидрофобных блоков, концентрация макромолекул в растворе, а также температура среды и сродство макромолекулы в целом и отдельных ее частей к растворителю [13,72].

В первую очередь, мицеллы амфифильных макромолекул не образуются в растворах при концентрациях, не достигающих критической концентрации мицеллообразования (ККМ) [97]. Критическая концентрация мицеллообразования является основным параметром, характеризующим процессы ассоциации, происходящие в конкретной системе ПАВ-растворитель. Для некоторых систем существует также критическая температура мицеллообразования (КТМ), которую иногда называют точкой Краффта, ниже которой мицеллообразование в растворе не наблюдается [98].

ККМ и температура находятся в тесной взаимосвязи. Так, ККМ водных растворов амфифильных блок-сополимеров обычно имеет температурную зависимость – как правило, при увеличении температуры наблюдается снижение ККМ в следствии усиления гидрофобного эффекта. Тип растворителя и сродство макромолекулы к нему также имеет важное значение – например, зависимость ККМ от температуры для амфифильных блок-сополимеров в средах органических растворителей носит прямой характер – при увеличении температуры значение ККМ, как правило, тоже возрастает [99].

Важнейшим фактором, влияющим на агрегацию амфифильных полимеров, является качественный и количественный состав макромолекулы, а именно соотношение длины гидрофильных и гидрофобных блоков или гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ), общая молекулярная масса, присутствие функциональных групп в макромолекулярной цепи. Значение ГЛБ определяется исходя из массового соотношения гидрофильных и гидрофобных сегментов макромолекулы и в большинстве случаев лежит в пределах от 1 до 20 [100]. Условно считается, что полимерные ПАВ, имеющие значение ГЛБ > 10 – преимущественно гидрофильные, а имеющие значение < 10 – преимущественно гидрофобные, т.е. склонны к образованию прямых и обратных мицелл соответственно.

Влияние ГЛБ и молекулярной массы на ККМ достаточно хорошо изучено для полоксамеров – линейных амфифильных триблок-сополимеров, состоящих из гидрофобных блоков полипропиленоксида и гидрофильных блоков полиэтиленоксида. Во-первых, относительное количество гидрофобных сегментов в макромолекуле оказывает существенное влияние на величину ККМ. Чем выше отношение длин гидрофобных боков к гидрофильным, тем, соответственно, ниже значение ГЛБ и тем ниже ККМ. Во-вторых, в некоторых случаях увеличение молекулярной массы полоксамеров при постоянном соотношении гидрофильных и гидрофобных блоков (т.е. при одинаковых значениях ГЛБ) приводит к снижению ККМ [101,102]. Однако, следует учесть и тот факт, что высокогидрофобные полоксамеры проявляют меньшую

стабильность в водных растворах и худшую биосовместимость, чем их более гидрофильные гомологи, а использование небiodeградируемых полимеров с молекулярной массой выше 25 кДа в организме человека не предпочтительно, ввиду их возможной нефротоксичности [102,103].

Авторы работы [5] также выявили взаимосвязь между ГЛБ макромолекул и ККМ. Установлено, что критические концентрации милеллообразования синтезированных амфифильных макромолекул зависели по большей части от количества гидрофобных сегментов, которое варьировали в пределах 25 мол. %, но не от молекулярной массы полимеров.

1.3.3 Архитектура агрегатов амфифильных макромолекул

Мицеллы сферической формы – одна из множества возможных форм агрегатов амфифильных макромолекул в растворе. Предсказать форму агрегата возможно с помощью анализа коэффициента упаковки p (от англ. packing parameter), который можно выразить как:

$$p = \frac{V}{A \times l},$$

где V – объем, занимаемый гидрофобными цепями в ядре агрегата, A – эффективная площадь поверхности гидрофильного сегмента макромолекулы на границе раздела фаз агрегат-раствор, l – максимальная эффективная длина цепи (критическая длина цепи) [13,104]. Так, форма агрегатов меняется с увеличением значения p . Сферической структуре агрегатов соответствует значение коэффициента упаковки, не превышающее $1/3$ ($p \leq 1/3$), цилиндрической – лежащее в диапазоне между $1/3$ и $1/2$ ($1/3 \leq p \leq 1/2$), ламеллярной – равное единице ($p = 1$). В случае, когда значение коэффициента упаковки лежит в диапазоне между $1/2$ и 1 ($1/2 \leq p \leq 1$), амфифильные макромолекулы формируют в растворе агрегаты сферической или эллипсоидной формы, состоящие из замкнутых друг на друге бислоев, подобно тому, как фосфолипиды формируют мембраны живых клеток. Значение коэффициента, превышающее

единицу, соответствует обратным мицеллам ($p > 1$) [13]. Все вышеперечисленные структуры представлены на рисунке 15.

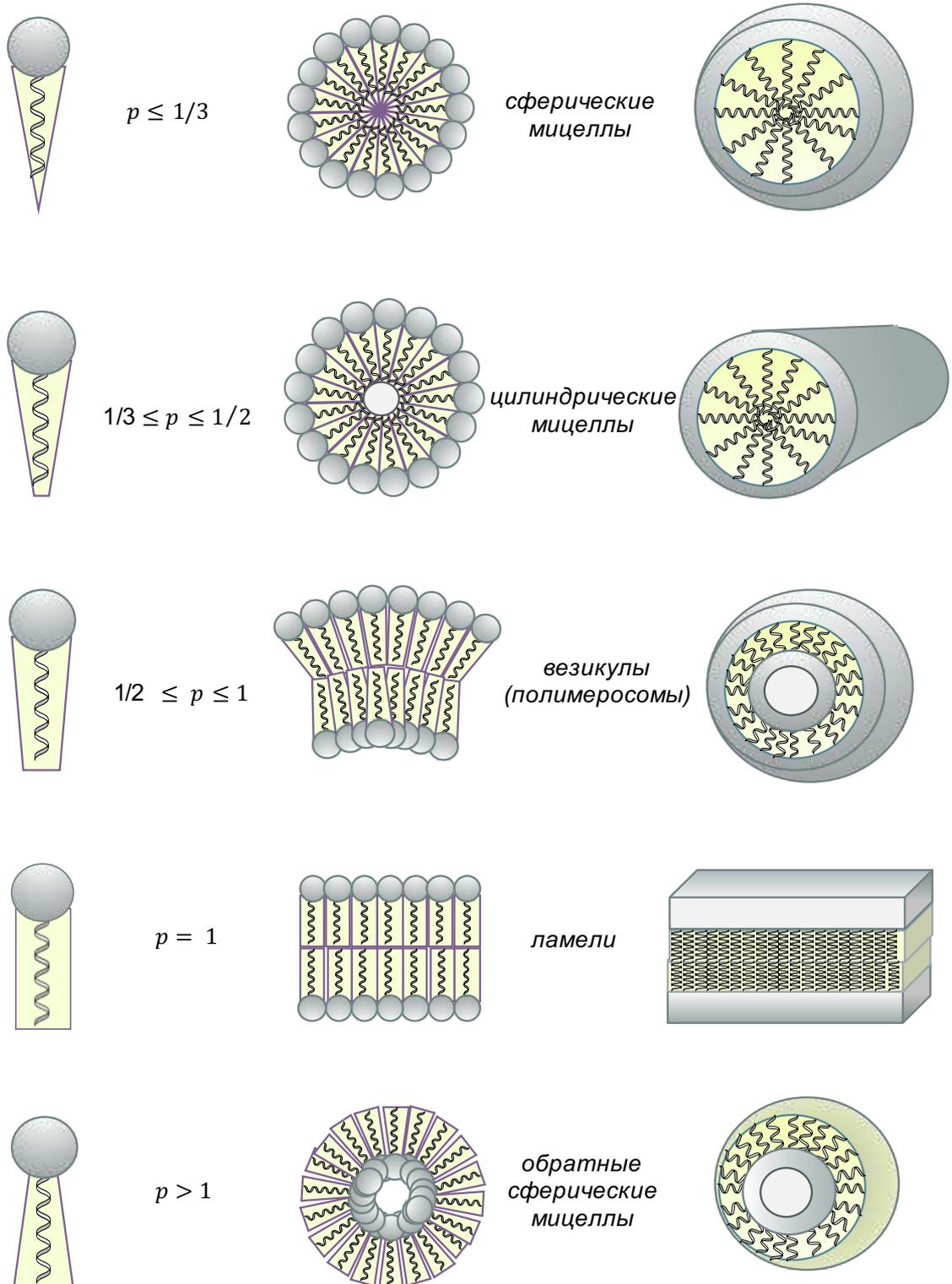


Рисунок 15 – Возможные варианты структур амфифильных макромолекул в растворе и их зависимость от параметра упаковки p

Как было сказано выше, на морфологию и размер агрегатов амфифильных макромолекул существенно влияет их концентрация в растворе. Так, ниже ККМ в растворе могут присутствовать как единичные макромолекулы, так и их первичные ассоциаты [105]. При достижении ККМ, макромолекулы начинают агрегировать с образованием структурированных мицелл или мицеллоподобных агрегатов. Дальнейшее увеличение концентрации амфифильных макромолекул приводит к их реорганизации и еще большей структуризации, подобно тому, как это происходит в лиотропных жидких кристаллах (рисунок 16).

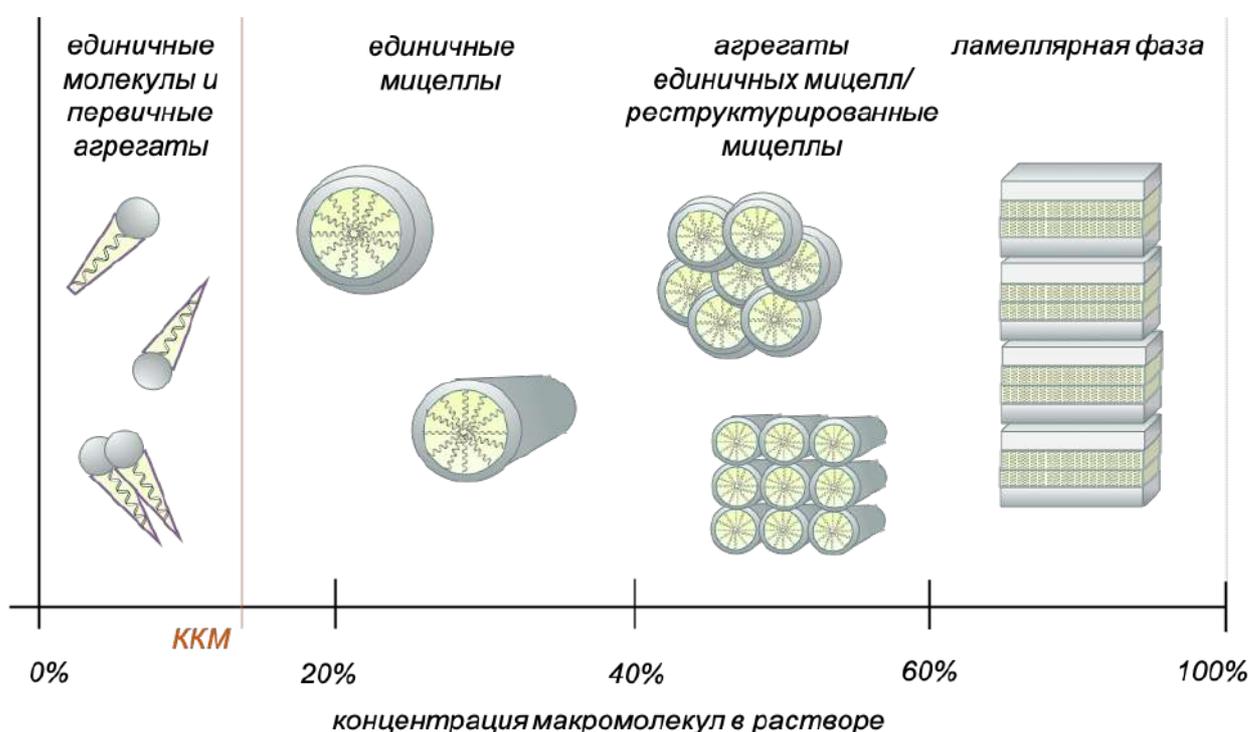
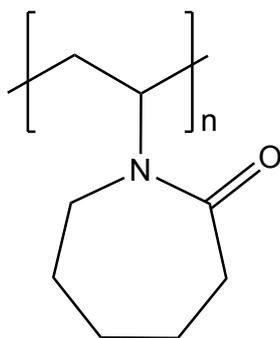


Рисунок 16 – Фазовые превращения в системе амфифильные макромолекулы-вода в зависимости от концентрации

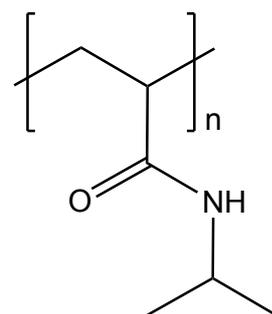
1.3.4 Термотропные амфифильные (со)полимеры

Как было сказано ранее, температура оказывает влияние на процессы агрегации амфифильных макромолекул в водных растворах – при увеличении температуры среды значение ККМ, как правило, снижается. Но существует ряд макромолекул, для агрегации которых температура имеет решающее значение

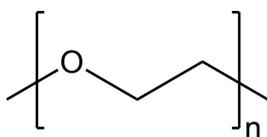
[31,66,106,107]. Такие полимеры называют термотропными или термочувствительными, и их отличительной особенностью является фазовый переход при изменении температуры раствора. Температурная зависимость процессов агрегации таких макромолекул объясняется переходом отдельных ее сегментов от гидратированного к дегидратированному состоянию при изменении температуры. Дегидратация, в свою очередь, сопровождается сближением этих сегментов, т.е., их агрегацией. Температура, при которой начинает реализовываться разделение фаз (образование новых мицелл или реструктуризация уже существующих) называется нижней критической температурой растворения (НКТР). Подобные фазовые переходы описаны для поли-N-изопропилакриламида (ПНИПАМ), полиэтиленгликоля, поливинилкапролакама и некоторых других полимеров, структурные формулы которых представлены на рисунке 17 [11].



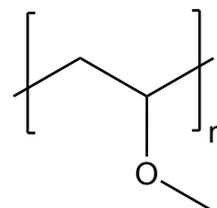
поли-N-винилкапролактам



поли-N-изопропилакриламид



полиэтиленгликоль



поливинилметилловый эфир

Рисунок 17 – Структурные формулы некоторых термочувствительных полимеров

Например, в случае амфифильного сополимера неионогенного этиленгликоля, повышение температуры раствора приводит к частичной дегидратации ПЭГ-сегментов сегментов макромолекул, что стимулирует взаимодействие соседних мицелл друг с другом и их агрегацию [31]. При дальнейшем повышении температуры и/или концентрации в таких системах может наблюдаться обратимое гелеобразование, как это показано в работах [31,66].

1.3.5 рН чувствительные амфифильные (со)полимеры

Некоторые амфифильные макромолекулы проявляют высокую чувствительность к рН [108–112]. Эта чувствительность заключается в определенной ответной реакции макромолекулы на изменение активности ионов водорода в среде. Такой реакцией может быть, например, изменение конформации, растворимости макромолекулы, разрушение меж- и внутримолекулярных нековалентных связей или полная дезагрегация макромолекулярных цепей. Например, предполагаемый механизм дезагрегации заключается в том, что при протонировании/депротонировании на макромолекулах образуются одноименные заряды, провоцирующие электростатическое отталкивание между единичными цепями, приводящее к изменению гидродинамического объема, деформации цепей и диссоциации агрегата. рН-зависимое поведение могут проявлять макромолекулы амфифильных полимеров разного типа, от блочных и привитых до случайных сополимеров, которые можно получить классической свободно-радикальной сополимеризацией.

Как правило, рН чувствительностью обладают макромолекулы, содержащие в своей структуре функциональные группы, способные протонироваться и депротонироваться при изменении концентрации ионов водорода в среде. К полимерам, проявляющим такие свойства, относятся полиакриловая и полиметакриловая кислоты, поливинилфосфорная кислота,

полиаллиламин, поли-N-винилимидазол, некоторые полиаминокислоты и другие соединения [11,113]. Структурные формулы некоторых рН-чувствительных полимеров приведены на рисунке 18.

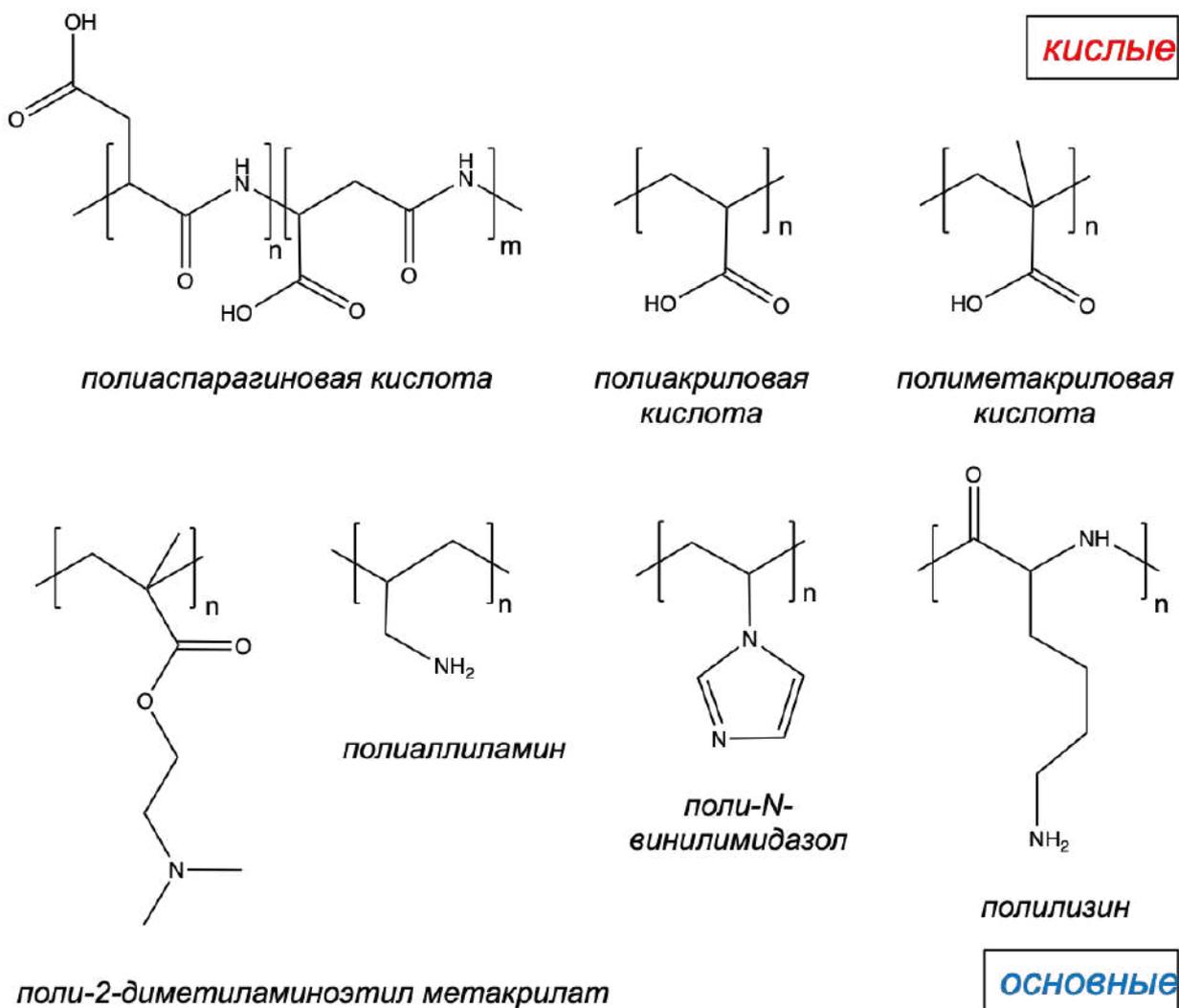


Рисунок 18 – Структурные формулы некоторых рН чувствительных полимеров

Свойство амфифильных полимеров реагировать на изменение рН среды особенно привлекает внимание исследователей, работающих в области биомедицины и, в частности, в области доставки лекарственных средств [111,114,115]. Это связано с тем, что в организме человека присутствует естественный градиент рН [2,93]. Так, значение рН в желудочно-кишечном тракте варьирует в диапазоне от рН=2 (желудок) до рН=9 (кишечник). рН крови, как и рН большинства межклеточных жидкостей здоровых тканей человека

является постоянной величиной и составляет 7,4. Однако известно, что область опухолевых тканей характеризуется более кислой ($pH = 6,5-7,2$) средой [116]. Различные компартменты одной живой клетки также имеют разную кислотность – цитозоль клетки имеет $pH=7,4$, ранняя эндосома имеет $pH=5,0-6,5$, а в лизосомах клетки, где активность гидролитических ферментов достигает своего максимума, pH составляет около 4,0-4,5 [113]. Таким образом, pH -чувствительные системы доставки лекарственных средств на основе амфифильных полимеров могут быть использованы для селективного терапевтического воздействия на определенную ткань организма или даже на отдельный компартмент клетки.

Например, авторы работы [108] синтезировали амфифильные pH -чувствительные сополимеры, состоящие из остатков 2-диизопропиламиноэтилметакрилата и фрагментов метакрилата метилполиэтиленгликоля, привитых к β -циклодекстрину. Синтезированные сополимеры образовывали в водных средах мицеллы, способные к эффективной иммобилизации противоракового препарата доксорубина. При $pH=7,4$ остатки 2-диизопропиламиноэтилметакрилата являются гидрофобными, и мицеллы с иммобилизованным противоопухолевым препаратом оставались стабильными. Однако в кислой среде ($pH=5,0$) наблюдалось протонирование остатков 2-диизопропиламиноэтилметакрилата, вызывающее дезагрегацию мицелл и высвобождение противоопухолевого препарата.

Свойства амфифильных сополимеров реагировать на температуру и pH среды часто используются в комплексе [117,118]. Так, в работе [118] был синтезирован ряд сополимеров, состоящих из мономерных остатков N -изопропилакриламида, 2-акрилоилоксиэтилхолата, этиленгликоля и акриловой кислоты. Благодаря наличию одновременно термочувствительных остатков N -изопропилакриламида и pH -чувствительных остатков акриловой кислоты, синтезированные сополимеры претерпевали обратимую агрегацию/деагрегацию при изменении параметров среды. При этом, сополимеры содержащие остатки акриловой кислоты в составе показали

большую стабильность в растворах с $\text{pH}=6,5$ при температуре 37°C , чем сополимеры аналогичного состава, но не содержащие остатков акриловой кислоты.

Поведение амфифильных полимеров в растворе может изменяться под действием не только температуры и pH , но и других стимулов, таких как УФ, ИК-излучение, окислительно-восстановительный потенциал [33,106,107]. Полимеры, обладающие такими свойствами, объединяют в группу под названием «стимул-чувствительные», «смарт», или «умные» полимеры, представляющую особое значение для биомедицинских применений.

1.4 Предпосылки возникновения и основы концепции доставки лекарственных средств

Несмотря на активные темпы развития медицинских технологий в последние десятилетия, многие проблемы терапии социально-значимых заболеваний до сих пор остаются нерешенными. В частности, эти проблемы связаны с терапией онкологических заболеваний, от которых только в 2020 году во всем мире умерло почти 10 миллионов человек [119].

Одной из причин высокой смертности от рака является недостаточная эффективность фармакотерапии. Лечение онкологических заболеваний, особенно на поздних стадиях, осложнено необходимостью введения высоких доз цитотоксических препаратов, оказывающих пагубное воздействие не только на злокачественные, но и на здоровые клетки человека [120]. Отягощающим фактором является и то обстоятельство, что некоторые часто используемые противораковые лекарственные вещества имеют крайне низкую растворимость в воде, что приводит к неадекватному профилю распределения в организме и их низкой биодоступности [121]. Существует несколько стратегий повышения эффективности химиотерапии онкологических заболеваний, в основе которых лежит разработка систем доставки противораковых препаратов, способных обеспечить нацеленный транспорт терапевтического агента к фармакологической мишени. При этом сама концепция целевого транспорта

лекарственных препаратов была выдвинута в трудах научной школы Пауля Эрлиха и Хельмута Рингсдорфа [122].

В 1975 году Хельмутом Рингсдорфом была предложена рациональная модель фармакологически активного полимера. Предложенная Рингсдорфом модель состояла из конъюгата биосовместимого полимера, обеспечивающего длительную циркуляцию в крови и защиту от деградации, лекарственного средства, связанного ковалентным, но биodeградируемым линкером, и векторной молекулы, обеспечивающей специфичность нацеливания терапевтического комплекса на фармакологическую мишень (рисунок 19) [123].

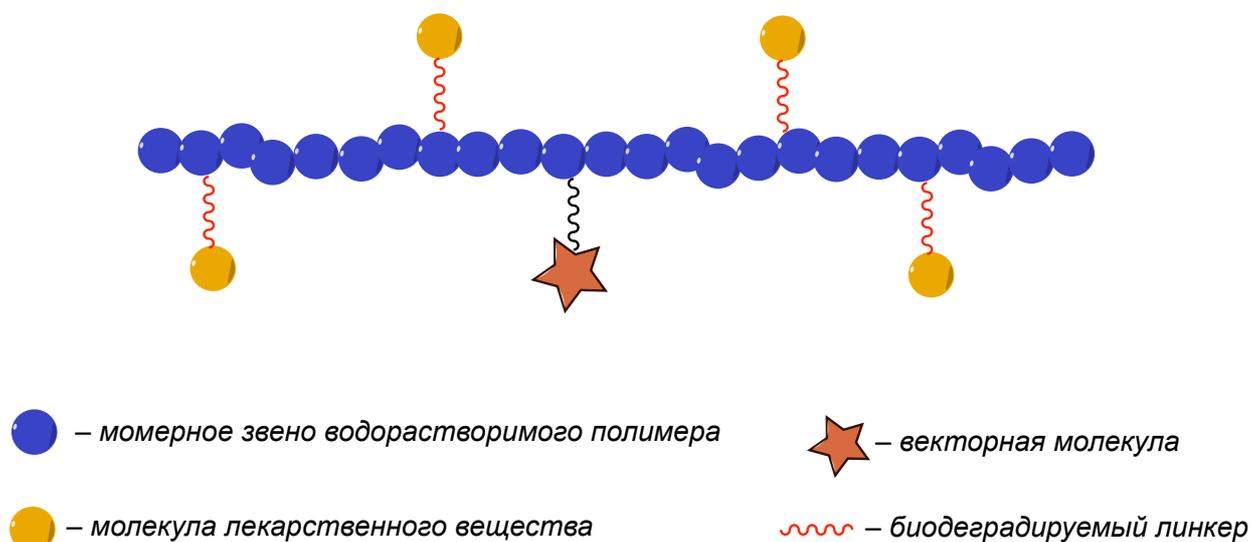


Рисунок 19 – Модель Рингсдорфа

Несмотря на то, что модель Рингсдорфа, основанная на концепции конъюгата «полимер-лекарство» предложена полвека назад, она продолжает оставаться золотым стандартом целеполагания в области доставки фармакологически активных веществ и лежит в основе большинства работ последних лет.

1.5 Наноразмерные носители для доставки противоопухолевых препаратов

Ключевой проблемой доставки противоопухолевых препаратов является разработка универсального носителя, выполняющего роль своеобразного

контейнера, содержащего лекарственное вещество и способного доставить его в определенную область организма [120,121,124,125].

Такие «контейнеры» должны удовлетворять определенным требованиям, а именно: они должны быть малого размера, чтобы свободно перемещаться по тончайшим капиллярам и проникать внутрь клетки; должны быть стабильны в среде организма и циркулировать в ней достаточно для выполнения поставленных задач время; должны быть биосовместимы, не вызывать аллергических, иммунных или иных потенциально опасных реакций организма; должны быть способны к иммобилизации или инкапсуляции лекарственных веществ и их постепенному высвобождению.

Приставка «нано» происходит от греческого слова «*nanos*», которое переводится как «карлик». ИЮПАК еще в 1947 официально утвердил приставку «нано» для описания одной миллиардной части какой-либо единицы. Соответственно, определение термина «наночастица» звучит как: «структура, размеры которой (в трех измерениях) лежат в диапазоне от 1 до 100 нм» [126]. Однако, размерный диапазон многих наночастиц, используемых в биомедицине в качестве носителей терапевтических препаратов, выходит за рамки формального определения термина наночастица и может достигать нескольких сотен нанометров [121]. Таким образом, в биомедицинских областях, под термином наночастицы часто подразумевают коллоидные частицы сферической или близкой к ней формы, размерами от 1 до 1000 нм [127].

За более чем 30 лет был разработан ряд наноразмерных носителей лекарственных и диагностических веществ, включая квантовые точки, углеродные нанотрубки, липосомы и липидные комплексы, металлические и неорганические частицы, а также всевозможные структуры, полученные на основе синтетических и природных полимеров [128–133].

Безусловно, каждый из видов носителей имеет ограничения, определяющие возможные направления применения в медицине и биологии. Например, в случае углеродных и металлических наноматериалов некоторые опасения вызывает их токсичность, которую чаще всего связывают с маленьким

(1-20 нм) размером частиц и их высокой гидрофобностью, в следствии которой эти частицы с легкостью проникают через биологические мембраны внутрь клетки и жизненно важных органелл, таких как митохондрии и ядро [134–137]. Напротив, липосомы зарекомендовали себя как носители с крайне низкой токсичностью, к тому же, метаболическая система человека располагает эффективными механизмами утилизации липидов, входящих в их состав. Последнее обстоятельство оказывает негативное влияние на стабильность липосом – в организме человека они быстро разрушаются под действием липаз, а при хранении окисляются, поскольку уязвимы для кислорода, света и бактерий [138]. В свою очередь, наноразмерные частицы на основе синтетических полимеров, демонстрируют высокую биосовместимость, низкую токсичность, длительное время циркуляции в организме и стабильность при хранении. Синтетические гидрофильные полимеры также используют в качестве стабилизаторов других типов частиц, например, липосом или частиц на основе белков [139,140].

Существует несколько типов полимерных наноразмерных носителей. К ним относят сплошные полимерные частицы, дендримеры, полимеросомы и мицеллы [133]. Сплошные полимерные частицы выполняют функцию трехмерной матрицы, способной удерживать и высвобождать лекарственное вещество. К такому типу носителей относятся, например, сферические наночастицы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА). Частицы на основе ПЛГА приобрели популярность благодаря высокой биосовместимости – полимерная матрица на основе ПЛГА подвергается биодegradации в организме под действием воды и гидролитических ферментов. Биодеструкция цепей сополимера в конечном счете приводит к образованию нетоксичных мономеров – молочной и гликолевых кислот, которые ассимилируются организмом. Одним из недостатков данного типа носителей является их гидрофобная поверхность, которую часто необходимо функционализировать гидрофильными полимерами, чтобы избежать опсонизации поверхности частиц белками, циркулирующими в кровотоке.

Ограничивающим фактором также является неоптимальный профиль высвобождения включенного лекарства, который определяется преимущественно скоростью его диффузии через матрицу ПЛГА и скоростью биodeградации частицы [141].

В сравнении со сплошными частицами, полимерные мицеллы и мицеллоподобные агрегаты амфифильных макромолекул, как носители лекарственных средств, предоставляют больше возможностей «настройки» своих свойств – от функционализации поверхности векторными или диагностическими молекулами до контроля над высвобождением лекарственного вещества. Последнее может быть достигнуто как с помощью стимулов, приложенных из вне (излучение, ультразвук) так и с помощью стимулов, уже существующих внутри организма (изменение pH).

Полимерные мицеллы (агрегаты) – структуры преимущественно сферической формы, образованные путем самосборки макромолекул амфифильных полимеров. В водных растворах мицеллы имеют гидрофильную оболочку и гидрофобное ядро, способное к солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств. Циркулируя в кровотоке, полимерные мицеллы и подобные им агрегаты склонны накапливаться в опухолевых тканях за счет эффекта увеличенной проницаемости и удерживание (enhanced permeability and retention (EPR) effect) впервые описанном Хироши Маэда и его коллегами в 1986 году (пассивный таргетинг) [142].

Таким образом, полимерные мицеллы (агрегаты макромолекулярных цепей) как носители лекарств выполняют разнообразные функции: увеличивают растворимость гидрофобных лекарственных средств, их время циркуляции, биодоступность; обеспечивают накопление лекарственного средства в целевой области за счет EPR-эффекта (пассивный таргетинг) и снижают побочную токсичность противоопухолевых препаратов по отношению к нормальным тканям; при наличии векторных лигандов способны связываться со специфическими рецепторами опухолевых клеток (активный таргетинг).

Так, авторами работы [143] были получены агрегаты на основе блок-сополимера N-винил-2-пирролидона и винилацетата, содержащие нерастворимый в воде лекарственный препарат клофазимин. Загруженные препаратом агрегаты имели сферическую форму, средний диаметр порядка 190-210 нм, характеризовались достаточно узким распределением по размерам (индекс полидисперсности составлял 0,09) и оставались стабильны в условиях, близких к физиологическим более 18 часов. Результаты исследований *in vitro* показали отсутствие цитотоксического эффекта незагруженного препаратом носителя по отношению к клеточным линиям MDA-MB-231 (клетки рака молочной железы с лекарственной устойчивостью) и MCF12A (нормальные эпителиальные клетки молочной железы). Загруженные клофазимином носители, напротив, существенно подавляли рост опухолевых клеток, причем цитотоксический эффект инкапсулированного клофазимина был более выражен, чем эффект от свободного препарата.

В работе [144] в качестве носителя противоопухолевого препарата доксорубицина были получены агрегаты, состоящие из макромолекул амфифильного триблок-сополимера ПЛГА-ПЭГ-ПЛГА, конъюгированного с аминокислотами (триптофан, тирозин, гистидин). Синтезированный носитель, не содержащий включенного лекарственного препарата, не оказывал токсического эффекта на клеточные линии NIH-3T3 и HeLa в концентрациях 100 мкг/мл, в то время как носитель, содержащий доксорубин, продемонстрировал значительное угнетение клеточной активности. Авторами работы также показано, что облучение и снижение pH приводило к дестабилизации агрегатов и высвобождению препарата в цитоплазме и ядре раковой клетки.

За последние годы опубликован ряд работ, посвященных получению агрегатов амфифильных полимеров и их применению для доставки лекарственных средств [145–149], тераностики и диагностики заболеваний [150–152], что подчеркивает неоспоримую важность этого класса соединений для биомедицины.

1.6 Применение поли-N-винил-2-пирролидона в биомедицине

Водорастворимые синтетические полимеры являются важнейшим классом соединений, используемым в биомедицинских областях, таких как разработка ранозаживляющих материалов, биосовместимых покрытий имплантируемых устройств, систем доставки лекарственных средств и т.д. [153–157]. Полиэтиленгликоль, благодаря хорошей растворимости в воде и высокой биосовместимости, долгие годы считался «золотым стандартом» и использовался для многих биомедицинских приложений. Например, конъюгация полиэтиленгликоля с гидрофобными молекулами приводила к увеличению их растворимости в воде и улучшенному профилю биораспределения, а конъюгация с белками способствовала их защите от протеолиза и увеличенному времени циркуляции. ПЭГ активно использовали для синтеза амфифильных блок-сополимеров, для стабилизации липосом и гидрофобных наночастиц. Некоторые ПЭГ-содержащие препараты были одобрены FDA как безопасные для применения человеком и вышли на фармацевтический рынок, а сама концепция получения таких препаратов получила название пегилирование (от англ. PEGylation) [158]. Однако за последние 10 лет накопилось большое количество исследований, свидетельствующих о том, что ПЭГ обладает выраженной иммуногенностью и человеческий организм способен вырабатывать к нему антитела [159,160]. Последнее обстоятельство приводит к ускоренному клиренсу пегилированных препаратов из крови и значительному снижению их терапевтической активности. Иммуногенность ПЭГ накладывает существенные ограничения на его применение и обуславливает необходимость поиска альтернативных полимеров-носителей [161].

Поли-N-винил-2-пирролидон (повидон, ПВП), являясь водорастворимым и биосовместимым, нетоксичным полимером даже при его высоких концентрациях, представляется альтернативой полиэтиленгликолю.

ПВП был впервые синтезирован Вальтером Реппе в 1938 году, и вскоре после этого стал первым полимером, получившим широкое применение как

заменитель плазмы крови во времена Второй мировой войны [162]. ПВП способен образовывать комплексы с низко- и высокомолекулярными веществами разной природы и строения. Это свойство позволяет использовать ПВП как основу для препаратов, способствующих удалению токсинов из крови [163,164]. ПВП образует водорастворимый комплекс с йодом, известный как повидон-йод, оказывающий бактерицидное, фунгицидное и противовирусное действие [165,166]. Этот комплекс входит в состав многих современных фармакологических препаратов. Известно, что ПВП способен образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами посредством водородных связей и вандерваальсовых взаимодействий, вследствие чего может использоваться для доставки генетического материала [167]. В настоящее время ПВП широко используется в фармацевтической промышленности в производстве лекарственных форм, таких как таблетки, порошки, гранулы, сиропы, растворы для инъекций, мягкие капсулы и т.д. [162]. ПВП признан безопасным как в качестве пищевой добавки, так и в составе фармацевтических препаратов. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила, что предельно допустимой суточной дозой ПВП является 50 мг/кг массы тела [168].

Как ПВП, так и сополимеры N-винил-2-пирролидона, находят широкое применение в разработке носителей лекарственных средств в различных формах, от скаффолдов и микроигл до наноразмерных частиц [169–175].

Так, авторы работы [176] синтезировали амфифильный привитой сополимер N-винил-2-пирролидона и производного хитозана, содержащего фталоильную группу. Синтезированный сополимер был способен к самопроизвольной агрегации в водных растворах уже при низких концентрациях (ККМ составила 0,83 мг/л) с образованием мицеллоподобных агрегатов сферической формы со средним диаметром 89,8 нм. Полученные полимерные носители были загружены гидрофобным лекарством – ацетатом преднизолона. Результаты исследований *in vitro* показали, что высвобождение лекарственного вещества происходило непрерывно в течении 70 часов.

Авторами работы [177] были получены нанокомпозитные гидрогелевые частицы на основе поли-N-винил-2-пирролидона, полиакриловой кислоты и оксида железа, содержащие противоопухолевый препарат доксорубицин. Полученные частицы были почти моодисперсными и имели средний диаметр 319 нм. Результаты проточной цитометрии и МТТ теста показали, что полученный носитель с загруженным доксорубицином обладал большей токсичностью по отношению к клеточной линии рака молочной железы, чем препарат в той же концентрации, но в свободной форме.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Используемые в работе вещества

N-винил-2-пирролидон (ВП) – органическое вещество с брутто-формулой C_6H_9NO , представляет собой бесцветную или слегка желтоватую жидкость с характерным запахом. Растворяется в воде, этаноле, 1,4-диоксане и большинстве других органических растворителей. Молярная масса – 111,14 г/моль, $d = 1,046$ г/мл; $t_{пл.} = 13-14^\circ C$, $t_{кип.} = 92-95^\circ C$ (11 мм рт.ст.). В работе использовали N-винил-2-пирролидон от компании «Sigma Aldrich». Перед введением в сополимеризацию ВП очищали перегонкой под вакуумом.

Акриловая кислота (АК) – органическое соединение с формулой $CH_2=CHCOOH$, алифатическая одноосновная непредельная карбоновая кислота. Вещество представляет собой бесцветную жидкость с характерным резким кислым запахом, смешивается с водой, этанолом, хлороформом, 1,4-диоксаном. Молярная масса – 72,06 г/моль, $t_{пл.} = 13-14^\circ C$, $t_{кип.} = 141^\circ C$ (760 мм рт.ст.); $d = 1,0511$ г/мл (при $25^\circ C$). В работе использовали акриловую кислоту от фирмы «Sigma Aldrich». Перед введением в сополимеризацию АК очищали перегонкой под вакуумом.

Динитрилазобисизомасляной кислоты или азобисизобутиронитрил (ДАК или AIBN) – органическое азотосодержащее вещество, применяется как инициатор радикальной полимеризации брутто-формулы $C_8H_{12}N_4$ с молярной массой 164,21 г/моль. Плохо растворим в воде, хорошо растворим в этаноле, 1,4-диоксане и других органических растворителях. При температуре выше $40^\circ C$ разлагается с образованием двух 2-цианопропильных радикалов и азота. Представляет собой белый порошок с игольчатыми кристаллами. В работе использовали продукт фирмы «Химмед» очищенный перекристаллизацией из этанола.

1,4-Диоксан – апротонный растворитель с брутто-формулой $C_4H_8O_2$, молярной массой 88,11 г/моль. Бесцветная летучая жидкость со сладковатым запахом, смешивается с водой, спиртом и диэтиловым эфиром. Кипит при

температуре 101,4°C (760 мм рт.ст.). В работе использовали 1,4-диоксан фирмы «Химмед», очищенный перегонкой с предварительной сушкой металлическим натрием.

Хлороформ – химическое вещество с формулой CHCl_3 , молярной массой 119,38 г/моль, использующееся преимущественно в качестве органического растворителя. Представляет собой бесцветную летучую жидкость со сладковатым эфирным запахом. Смешивается с большинством органических растворителей, но практически не смешивается с водой (8 г/л при 20 °С). Кипит при температуре 61,2°C (760 мм рт.ст.). В работе использовали хлороформ фирмы «Химмед», квалификации «х. ч.», без дополнительной очистки.

1-октадекантиол или н-октадецилмеркаптан (ОДТ) – химическое соединение с брутто-формулой $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{S}$ – алифатический неразветвленный тиол, используемый как регулятор молекулярной массы и эндкепирующей агент. При температуре 20 °С вещество представляет собой белый порошок с характерным сильным запахом сероводорода. Нерастворим в воде, но растворим в 1,4-диоксане, диэтиловом эфире, этаноле и других органических растворителях. Молярная масса – 286,56 г/моль, $t_{\text{пл.}} = 30\text{-}33^\circ\text{C}$. В работе использовали продукт фирмы «Sigma Aldrich», без дополнительной очистки.

1-октантиол (ОТ) или н-октилмеркаптан – химическое соединение с брутто-формулой $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{S}$ – алифатический неразветвленный тиол, используемый как регулятор молекулярной массы и эндкепирующей агент. При температуре 20 °С вещество представляет собой желтую жидкость с характерным запахом сероводорода. Нерастворим в воде, растворим в 1,4-диоксане, диэтиловом эфире, этаноле и других органических растворителях. Молярная масса – 146,29 г/моль, $d = 0,843$ г/мл при 25 °С. В работе использовали продукт фирмы «Sigma Aldrich», без дополнительной очистки.

Доксорубин гидрохлорид – цитостатический препарат, относящийся к ряду антрациклиновых антибиотиков с брутто-формулой $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{NO}_{11}\text{Cl}$. Применяется для терапии онкологических заболеваний, в том числе эффективен для лечения рака молочной железы, лейкемии, рака легких, рака мочевого

пузыря и др. [178]. Молярная масса использованного препарата составляет 579,98 г/моль. Препарат хорошо растворим в воде, в сухом виде представляет собой порошок ярко-красного цвета. В работе использован доксорубин гидрохлорид производства «Синбиас фарма».

Паклитаксел – цитостатический препарат группы таксанов с брутто-формулой $C_{47}H_{51}NO_{14}$. В настоящее время паклитаксел широко используется как препарат первой линии для лечения рака легких, рака молочной железы, рака яичников, саркомы Капоши и других онкологических заболеваний [179]. Препарат представляет собой порошок белого цвета, нерастворимый в воде, но растворимый в хлороформе, ацетонитриле и этаноле. Молярная масса паклитаксела составляет 853,906 г/моль. В работе был использован препарат фирмы «TCI Chemicals» без дополнительной очистки.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – водорастворимый белок плазмы крови крупного рогатого скота. Ввиду своей доступности и изученности широко используется в лабораторной практике и биомедицинских приложениях. По структуре и аминокислотному составу схож с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) [180]. Зрелый белок имеет молекулярную массу 66,463 Да и состоит из 583 аминокислотных остатков. Насыщен лизином, лейцином, глутаминовой кислотой. Изоэлектрическая точка = 4.7 (H_2O , $25^{\circ}C$) [181]. В работе использовали продукт фирмы «Sigma Aldrich», без дополнительной очистки.

В работе использовали стандарт-титры: натрия гидроокись 0,1 Н; йодид калия 0,1 Н; натрий серноватисто-кислый 0,1 Н; кислота соляная 0,1 Н; и буферные растворы с рН = 4,0; 7,0; 9,0 поставленные фирмой «Химмед».

2.2 Синтез амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

2.2.1 Сополимеризация N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в присутствии 1-октадекантиола

В круглодонную колбу объемом 100 мл с притертой пробкой помещали 9×10^{-2} моль N-винил-2-пирролидона, акриловую кислоту (от 2,5 до 15 мол.% от количества ВП), 1-октадекантиол (от 0,25% до 1,5 мол. % от суммарного количества мономеров), инициатор (ДАК) в количестве 1 масс. % от массы ВП и АК и растворяли в 40 мл диоксана. Колбу с реакционной массой погружали в масляную баню и термостатировали при 70 °С в течении 3 часов при постоянном перемешивании (270 об/мин). По истечении времени реакционную смесь остужали до комнатной температуры и разбавляли пятикратным количеством дистиллированной воды до полного растворения осадка. Растворитель удаляли из реакционной массы используя ротационный испаритель. Далее, очищенную от растворителя массу помещали в диализную мембрану из регенерированной целлюлозы с отсечкой по молекулярной массе в 500 Да и диализовали против дистиллированной воды в течении 4 суток. После диализа полученный раствор замораживали и лиофильно высушивали. Лиофилизат представлял собой белый летучий порошок, хорошо растворимый в воде. Для дополнительной очистки сухие порошки промывали диэтиловым или *трет*-бутилметилловым эфиром.

Принципы синтеза амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона были описаны в патенте [39]

2.2.2 Сополимеризация N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в присутствии 1-октантиола

В круглодонную колбу объемом 100 мл с притертой пробкой помещали 9×10^{-2} моль N-винил-2-пирролидона, акриловую кислоту (от 2,5 до 15 мол.%

от количества ВП), 1-октантиол (от 0,25% до 1,5 мол. % от суммарного количества мономеров), инициатор (ДАК) в количестве 1 масс. % от массы ВП и АК и растворяли в 40 мл диоксана. Колбу с реакционной массой погружали в масляную баню и термостатировали при 70 °С в течении 3 часов при постоянном перемешивании (270 об/мин). По истечении времени реакционную смесь извлекали из бани, быстро остужали до комнатной температуры и разбавляли пятикратным количеством дистиллированной воды до полного растворения осадка. Растворитель удаляли из реакционной смеси используя ротационный испаритель. Далее, очищенную от растворителя массу помещали в диализную мембрану из регенерированной целлюлозы с отсечкой по молекулярной массе в 500 Да и диализовали против дистиллированной воды в течении 4 суток. После диализа полученный раствор подвергали заморозке и лиофильно высушивали. Лиофилизат представлял собой белый летучий порошок, хорошо растворимый в воде. Для дополнительной очистки сухие порошки промывали диэтиловым или *трет*-бутилметиловым эфиром.

Принципы синтеза амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона были описаны в патентах [39,40].

2.2.3 Синтез амфифильного поли-N-винил-2-пирролидона с концевой н-октадецилтио- группой

В круглодонную колбу объемом 100 мл с притертой пробкой помещали 9×10^{-2} моль N-винил-2-пирролидона, 9×10^{-4} моль 1-октадекантиола, 0,1 г динитрила азобисизомасляной кислоты, и растворяли в 40 мл диоксана. Колбу с реакционной массой погружали в масляную баню и термостатировали при 70 °С в течении 3 часов при постоянном перемешивании (270 об/мин). По истечении времени реакционную смесь извлекали из бани, быстро остужали до комнатной температуры и разбавляли пятикратным количеством дистиллированной воды до полного растворения осадка. Растворитель удаляли из реакционной смеси используя ротационный испаритель. Далее, очищенную от растворителя массу

помещали в диализную мембрану из регенерированной целлюлозы с отсечкой по молекулярной массе в 500 Да и диализовали против дистиллированной воды в течении 4 суток. После диализа полученный раствор подвергали заморозке и лиофильно высушивали. Лиофилизат представлял собой белый летучий порошок, хорошо растворимый в воде. Для дополнительной очистки сухие порошки промывали диэтиловым или *трет*-бутилметилловым эфиром.

Принципы синтеза амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона были описаны в патентах [39,40]

2.3 Получение наноразмерных агрегатов на основе амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

Наноразмерные агрегаты амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой получали путем ультразвуковой обработки водных растворов (со)полимеров. Для этого необходимую навеску (со)полимера растворяли в дистиллированной воде или буферном растворе и подвергали обработке ультразвуковым гомогенизатором Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия) в течении 10 минут в режиме пульсации. Полученные растворы при необходимости центрифугировали.

2.4 Иммобилизация лекарственных препаратов агрегатами амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

Наноразмерные агрегаты амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, нагруженные противоопухолевым препаратом паклитакселом получали эмульсионным методом. Для этого готовили раствор паклитаксела в хлороформе и раствор амфифильного сополимера в дистиллированной воде. Раствор амфифильного сополимера подвергали ультразвуковой обработке, как это описано в п. 2.3. В процессе ультразвуковой обработки к раствору сополимера по каплям приливали раствор

паклитаксела в хлороформе. Общее время ультразвуковой обработки составило 20 минут. По завершении обработки из полученной эмульсии с помощью ротационного испарителя удаляли хлороформ. Полученную суспензию, содержащую агрегаты амфифильного сополимера с загруженным в ядро паклитакселом центрифугировали для удаления свободного препарата. Полученные суспензии хранили в стеклянной герметичной таре при комнатной температуре.

Наноразмерные агрегаты амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона и акриловой кислотой, содержащие комбинацию лекарственных препаратов (паклитаксел и доксорубицин) получали путем добавления водного раствора доксорубицина гидрохлорида к суспензии агрегатов, содержащих паклитаксел.

Принципы включения биологически активных веществ в амфифильные сополимеры N-винил-2-пирролидона были описаны в патенте [39]

2.5 Электростатическая иммобилизация доксорубицина агрегатами амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой и исследование кинетики его высвобождения

Навеску 0,1 г синтезированного сополимера N-винил-2-пирролидона акриловой кислоты растворяли в 5 мл дистиллированной воды и подвергали ультразвуковой обработке по методике, описанной в п 2.3. Навеску 0,01г доксорубицина гидрохлорида растворяли в 5 мл дистиллированной воды. Полученные растворы смешивали, затем диализовали против дистиллированной воды (250 мл) с использованием диализной мембраны с молекулярно-массовым отсечением 500 Да. Динамика высвобождения доксорубицина исследовалась в присутствии сополимеров с содержанием остатков акриловой кислоты 0; 3,9; 5,6; 9,8; 15,8 мол.%, полученных в присутствии 1,0 мол.% *n*-октадекантиола. Исследование проводили при температуре 37°C. Концентрацию свободного доксорубицина в воде определяли путем вычисления оптической плотности

раствора при длине волны 480 нм с помощью прибора BioSpectrometer (Eppendorf, Германия)

Зависимость степени и скорости высвобождения доксорубина от концентрации сополимера в системе определяли в присутствии 0,025 г; 0,05 г; 0,1 г и 0,15 г сополимера N-винил-2-пирролидона акриловой кислоты с содержанием остатков АК 3,9 мол.% согласно методике, описанной выше.

Зависимость степени и скорости высвобождения доксорубина от pH среды определяли в среде буферных растворов с pH=4,0; pH=7,0 и pH=9,0 в присутствии 0,1 г сополимера N-винил-2-пирролидона акриловой кислоты с содержанием остатков АК 3,9 мол.% согласно методике, описанной выше.

2.6 Получение комплексов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с БСА

Для получения интерполимерных комплексов использовали БСА и амфифильный сополимер N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой октадецилтиогруппой. Содержание остатков АК в сополимере составило 9,8 мол.%, а $\bar{M}_n = 18000$. Полимер был синтезирован по методике, описанной в п. 2.3.2 в присутствии 9×10^{-2} моль N-винил-2-пирролидона, $2,5 \times 10^{-4}$ моль 1-октадекантиола, 9×10^{-3} моль акриловой кислоты, 0,1 г динитрила азобисизомасляной кислоты и 40 мл диоксана.

Каждый реагент растворяли в дистиллированной воде и термостатировали при 50°C в течение 1 часа (pH=6,4). Компоненты добавляли исходя из общей массовой концентрации равной 52,5 г/л, при массовых соотношениях белка к сополимеру 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:5, 1:10, и 1:15 соответственно.

2.7 Получение микропузырьков на основе комплексов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с БСА

Приготовленные по методике, описанной в п. 2.6 растворы подвергали ультразвуковой обработке с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonopuls HD 4100 (Bandelin, Германия) в течении 3 минут в режиме непрерывного озвучивания при максимальной мощности 100 Вт. После обработки ультразвуком каждый образец термостатировали в стеклянной таре в течение 30 минут при температуре 4°C для стабилизации микропузырьков, которые всплывали на поверхность раствора. По истечении 30 минут фракцию микропузырьков отбирали и ресуспендировали в дистиллированной воде. Синтез микропузырьков осуществляли в лаборатории Биофотоники Сколковского Института Науки и Технологий [182].

2.8 Определение молекулярной массы сополимеров методом обратного йодометрического титрования

Данная методика позволяет определить среднечисловую молекулярную массу полимера (\bar{M}_n) путем определения количества концевых сульфидных групп в навеске полимера.

Для титрования использовали стандартные водные растворы KI (0,1N), Na₂S₂O₃ (0,01N) и спиртовой раствор м-хлорпербензойной кислоты (ХПБК), приготовленный путем растворения 0,6 г бензойной кислоты и 0,7 г м-хлорпербензойной кислоты в 250 мл этилового спирта.

Навеску полимера массой 0,200 г помещали в коническую колбу с притертой пробкой и заливали 20 мл раствора ХПБК и 10 мл дистиллированной воды. Контрольную пробу, не содержащую навеску полимера подготавливали аналогичным образом. Полученные растворы термостатировали при температуре 0-4 °C в течение 24 часов. По истечении времени к каждой пробе приливали 15 мл 0,01N раствора KI. Образцы выдерживали в течение 15 минут

и оттитровывали 0,01N раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до полной нейтрализации окраски йода. Процесс описывается химическими реакциями, представленными на рисунке 20. Подобная методика определения среднечисловой молекулярной массы была описана ранее в работах [34,183].

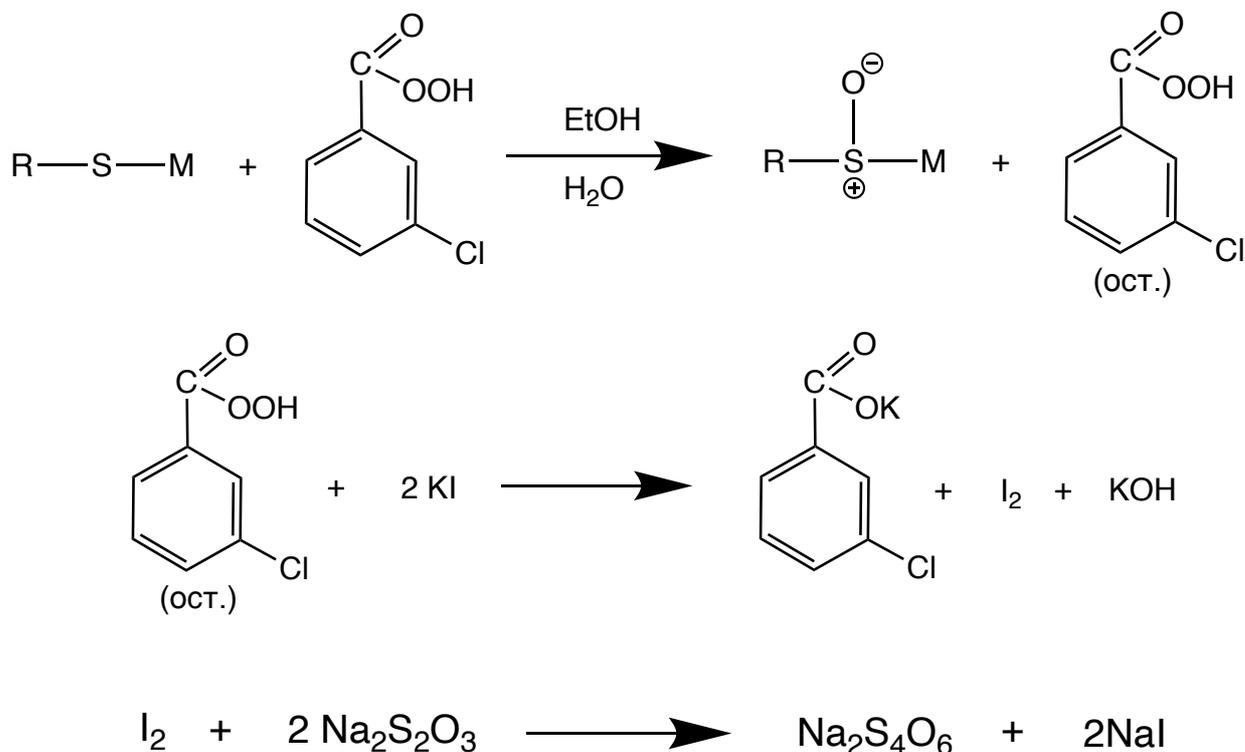


Рисунок 20 – Химические реакции, протекающие при обратном йодометрическом титровании

2.9 Определение содержания карбоксильных групп в сополимерах

Количество карбоксильных групп, содержащихся в макромолекулярной цепи может быть определено титрованием растворенной навески сополимера раствором щелочи в присутствии кислотно-основного индикатора. Для титрования использовали стандартный водный раствор NaOH (0,01 N) и спиртовой раствор фенолфталеина.

Для каждого образца рассчитывали мольную долю карбоксил-содержащих звеньев в макромолекулярной цепи.

2.10 Определение диаметра, заряда и распределения по размерам полимерных агрегатов

Распределение агрегатов синтезированных сополимеров по диаметрам и индекс полидисперсности (ИПД, PDI) оценивали с помощью метода динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) используя прибор Nanoflex II (Colloid Metrix, Германия). Образцы для исследования были приготовлены в соответствии с методикой 2.3 (для агрегатов, не содержащих лекарственных препаратов) или 2.4 (для агрегатов, содержащих иммобилизованные препараты). Измерения проводили при комнатной температуре, объем исследуемого образца составлял не менее 1 мл. Результаты, представленные в данной работе, представляют усредненные диаметры частиц, полученные в результате не менее трех измерений.

Величину электрокинетического потенциала измеряли с помощью прибора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Образцы для исследования были приготовлены в соответствии с методикой 2.3, измерения проводили при комнатной температуре.

2.11 Определение поверхностного натяжения

Поверхностное натяжение синтезированных сополимеров на границе раздела фаз раствор-воздух изучали методом отрыва кольца с помощью тензиометра Kruss К6 (Германия). Калибровка прибора производилась по дистиллированной воде, диапазон рабочих температур – 20-23°C. Необходимую навеску сополимера растворяли в дистиллированной воде и подвергали обработке ультразвуком по методике, описанной в п. 2.3. Ряд растворов, содержащих разные концентрации исследуемого образца, готовили путем последовательного разбавления исходного раствора в 2 раза. Каждый раствор подвергался обработке ультразвуком до разбавления. Перед измерением поверхностного натяжения растворы выдерживали при комнатной температуре

в течении 24 часов для стабилизации агрегатов. Критическую концентрацию агрегации (ККА) каждого сополимера определяли по излому на изотерме поверхностного натяжения, построенной в координатах $\sigma - \ln C$ (C – концентрация сополимера в растворе, г/л), где каждая точка представляет собой усредненное значение σ , полученное на основании 4 измерений. Поверхностное натяжение интерполимерных комплексов БСА и сополимера ВП с АК определяли методом висящей капли. Результат представляет собой усредненное значение σ , полученное на основании 4 измерений.

2.12 Визуализация агрегатов амфифильных сополимеров ВП с АК и микропузырьков методами микроскопии

Визуализацию наноагрегатов синтезированных сополимеров ВП с АК осуществляли с помощью атомно-силовой (АСМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Образцы для АСМ-визуализации наносили на подложку из слюды, предварительно обработанной 2,5 мМ водным раствором $NiCl_2$. Образцы, нанесенные на подготовленную подложку, выдерживали в течении 20-40 с, затем слой жидкости удаляли, а подложки высушивали на воздухе. Измерения проводились с помощью атомно-силового микроскопа Solver PRO-M, оснащенного сканирующей головкой "Смена" (NT-MDT, Российская Федерация). Использовались консоли NSG10 (NT-MDT, Российская Федерация), которые имеют типичную постоянную усилия $k=11,8$ Н/м и радиус кривизны менее 10 нм. Изображение было получено в полуконтактном режиме с разрешением 512x512 точек и частотой сканирования 1,2-1,4 Гц. Изображения были обработаны с помощью программного обеспечения FemtoScan Online (Центр передовых технологий, Российская Федерация) [184].

Образцы для ПЭМ-визуализации наносили на сетки с углеродным покрытием (Ted Pella, США), обработанные с помощью устройства для тлеющего разряда Emitech K100X (Quorum Technologies Ltd., Великобритания)

при 25 мА. Образцы наносили на сетки, выдерживали в течении 30-60 сек, и обрабатывали 1% раствором уранилацетата в течение 60-120 сек, затем удаляли избыток пробы и высушивали. Изображения были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (Jeol, Япония), оснащенного камерой Orius SC1000W (Gatan Inc., США), и обработаны с помощью программного обеспечения ImageJ [185]. Визуализацию агрегатов амфифильных сополимеров ВП с АК с помощью ПЭМ и АСМ осуществляли в лаборатории кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Концентрацию микропузырьков определяли с помощью камеры Горяева и оптического микроскопа Olympus CX33 (Olympus, Япония). 10 мкл суспензии микропузырьков наносили на предметное стекло камеры Горяева, выдерживали при комнатной температуре в течение 5 минут, затем анализировали полученное с помощью оптического микроскопа изображение сетки камеры. Каждое изменение повторяли не менее 5 раз.

Для оценки распределения БСА и сополимера ВП с АК в оболочке микропузырьков, суспензию МП визуализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на приборе Axio Observer.Z1/7 с объективом Plan-Apochromat 40×/1,3 Oil DIC (UV) VIS-NIR M27 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). БСА предварительно был ковалентно конъюгирован с флуоресцеином изоцианатом, а сополимер ВП с АК ковалентно конъюгирован с родамином 6Ж [186]. Очистку меченных компонентов оболочки микропузырьков проводили с помощью диализа против дистиллированной воды с использованием диализной мембраны с молекулярно-массовым отсечением 500 Да.

Форму, диаметры и толщину оболочки микропузырьков исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и просвечивающей электронной криомикроскопии (криоПЭМ). Для СЭМ-визуализации суспензии микропузырьков в дистиллированной воде наносили на кремниевую подложку, которую закрепляли проводящей углеродной двусторонней клейкой лентой на заглушке для СЭМ. Затем стол-держатель с образцом помещали в камеру СЭМ

и откачивали воздух из камеры для достижения уровня вакуума выше 10^{-3} Па. Измерение проводилось при ускоряющем напряжении 5 кВ и токе пучка 64 пА на приборе Thermo Scientific Quattro S SEM (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ. Объем выборки для определения толщины оболочки составлял 50-100 микропузырьков. Для криоПЭМ-визуализации 3 мкл суспензии микропузырьков наносили на медную сетку, покрытую пленкой Lacey carbon (Electron Microscopy Sciences, США). Затем удаляли избыток пробы и погружали образец в жидкий этан с помощью автоматизированной системы погружения Vitrobot (FEI, США). Изображения были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа Tecnai G²12 SPIRIT (FEI, США).

2.13 Оценка акустического отклика микропузырьков

Оценку акустического отклика микропузырьков проводили с помощью системы для ультразвуковой диагностики, состоящей из аппарата Siemens Acuson S2000 (Siemens Healthineers AG, Германия), оснащенного линейным ультразвуковым зондом Acuson 9L4 (частота – 8 МГц, механический индекс – 1,3). Оценку акустического отклика проводили в фантоме, имитирующем мягкую ткань. Фантом был сформирован из геля, полученного при растворении агарозы (3 масс.%) и желатина (7 масс.%) в 100 мл воды при интенсивном перемешивании и нагревании до 100°C. После полного растворения компонентов в гель помещали пластиковую трубку диаметром 2 мм для формирования полого канала и термостатировали при 4°C как минимум 12 часов. Перед применением пластиковую трубку вынимали и подключали к фантому перистальтический насос (Modular BioSystems Inc., США) для обеспечения постоянной скорости потока раствора (2 мл/мин). Измерения проводились при комнатной температуре. Концентрация в рабочем растворе микропузырьков во всех испытуемых образцах составляла 10^8 МП/мл.

2.14 Исследование цитотоксичности сополимеров ВП с АК, а также агрегатов с включенными противоопухолевыми препаратами на их основе

Цитотоксичность наноагрегатов *in vitro* исследовали с помощью стандартной процедуры МТТ-теста с использованием тетразолиевого реагента – (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиума) (MTS). НАДФ-Н-зависимые оксидоредуктазные ферменты жизнеспособных клеток способны восстанавливать MTS до формазановой соли, имеющий максимум поглощения в области $\lambda = 490-500$ нм. Таким образом, МТТ-тест позволяет быстро и достоверно оценить количество жизнеспособных клеток в исследуемом образце [187,188].

Исследования образцов агрегатов синтезированных сополимеров на цитотоксичность были проведены в лаборатории "Биомедицинские наноматериалы" НИТУ "МИСИС". МТТ тест проводили на клеточных линиях С6 и U87 – глиоме мыши и глиобластоме человека соответственно. Культивирование клеточных линий проводили на среде DMEM (1X) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, Cytiva), 1 % 200 мМ L-глутамин (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и 100 ед./мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. Пересев клеток осуществляли с использованием 0,25 % трипсина. МТТ-тест выполнялся согласно общепринятому протоколу с модификациями. Клетки исследуемых линий высаживались в лунки 96-луночного культурального планшета в 100 мкл ростовой среды и культивировались в течении 24 ч. После культивирования в лунки планшета вносили исследуемый препарат в различных концентрациях, полученных путем последовательных разведений. Количество жизнеспособных клеток определяли по истечении 48 ч культивирования с помощью реагента MTS (The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, США), который был добавлен в каждую лунку планшета в количестве 20 мкл. Затем планшет инкубировали при 37 °С в течение 4 ч во влажной атмосфере с 5% CO₂. В качестве положительного контроля служили лунки, без исследуемого

препарата. Оптическую плотность измеряли на микропланшетном спектрофотометре Thermo Scientific Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США) при $\lambda = 490$ нм.

Количество жизнеспособных клеток N_v определяли по формуле:

$$N_v = \frac{A_s - A_r}{A_c - A_r} \times 100\%,$$

где A_s – оптическая плотность образца, содержащего исследуемый препарат, A_r – оптическая плотность культуральной среды в лунках, не содержащих клеток и исследуемого препарата, но содержащих MTS реагент, A_c – оптическая плотность контрольного образца.

2.15 ЯМР спектроскопия

^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР, HSQC спектры регистрировали в растворе ДМСО- D_6 при температуре 25 °С на спектрометре Bruker Avance 500 (Bruker, Швейцария) в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН).

2.16 ИК спектроскопия

ИК-Фурье спектры интерполимерных комплексов БСА и сополимера ВП с АК получены в режиме пропускания с помощью ИК-Фурье спектрометра Bruker Vertex 70v (Bruker, Германия). Все исследуемые образцы наносили на подложку Si/SiO₂. Спектр чистой подложки Si/SiO₂ приведен на рисунке 21.

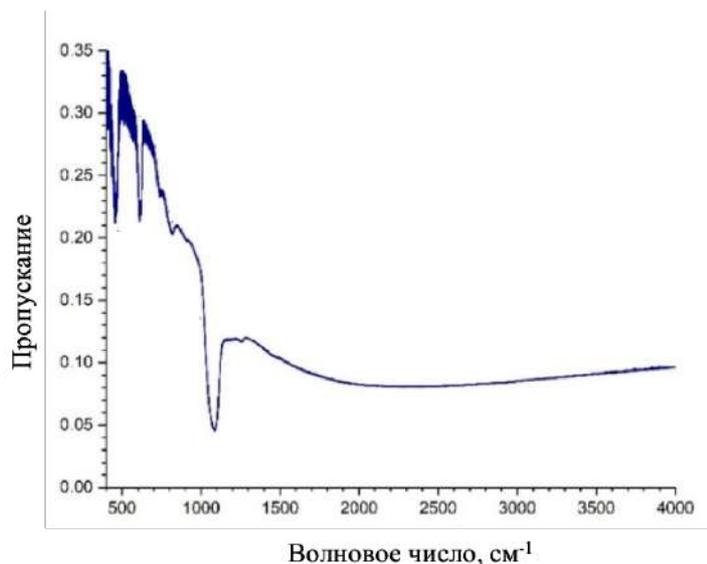


Рисунок 21 – ИК-Фурье спектр пропускания подложки Si/SiO₂

В ИК спектре присутствуют выраженные полосы колебания на частотах ниже 1000 см⁻¹ – 460, 615, 815 и 1080 см⁻¹. На частотах выше 1300 см⁻¹ спектр подложки не имеет выраженных пиков. Таким образом, на полученных спектрах исследуемых образцов, все колебания в спектральной области выше 1300 см⁻¹ относятся к исследуемому образцу.

ИК-Фурье спектры синтезированных амфифильных сополимеров ВП с АК были записаны с помощью спектрометра Nicolet 380 (Thermo Scientific, США). Исследуемые образцы перетирали в ступке с бромидом калия.

2.17 MALDI-TOF масс-спектрометрия

Спектры MALDI-TOF регистрировали с помощью масс-спектрометра Ultraflex II (Bruker, Германия) при ускоряющем напряжении 25 кВ при с помощью лазера Nd: YAG (355 нм). В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Синтез амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

Поли-N-винил-2-пирролидон (ПВП) – водорастворимый, биоинертный, низкотоксичный и высокобиосовместимый полимер, который находит широкое применение в медико-биологических областях. Низкомолекулярный ПВП не обладает выраженной иммуногенностью [43], а при использовании в качестве стабилизатора или оболочки неорганических наночастиц способен даже снижать иммунный ответ организма [189], что особенно важно при его применении в составе лекарственных форм. ПВП используется в качестве заменителя плазмы крови дезинтоксикационного действия, как компонент лекарственных и косметических средств, а его сополимеры, в том числе с хитозаном [176], 4-винилпиридином [190], аспарагиновой кислотой [191], метакриловой кислотой [192,193] и другими сомономерами [194–197] применяются для разработки систем доставки лекарственных средств. Получение сополимеров N-винил-2-пирролидона открывает широкие возможности варьирования функциональных групп, позволяющие обеспечить новые подходы к иммобилизации фармакологически активных веществ и таргетирования носителей.

Радикальная сополимеризация N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в присутствии агента передачи цепи – 1-октадекантиола (ОДТ) или 1-октантиола (ОТ), приводит к образованию амфифильных макромолекул, гидрофильная часть которых представлена мономерными остатками N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, а гидрофобная – углеводородным радикалом тиола (рисунок 22) [39].

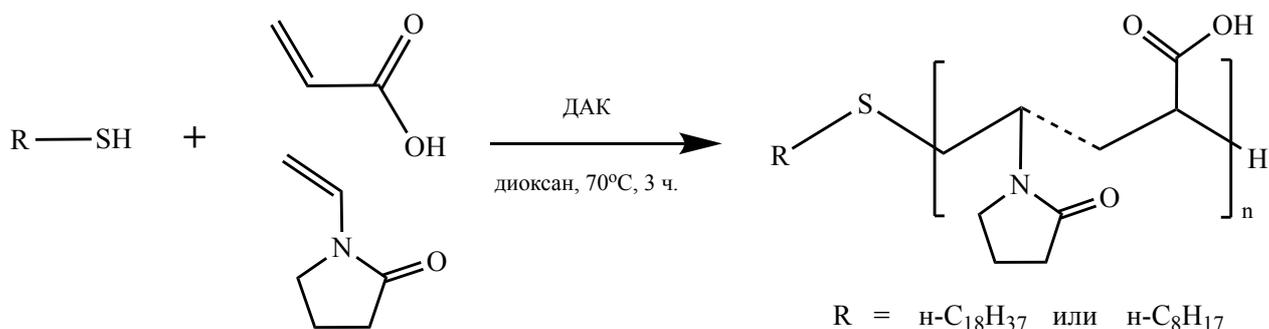


Рисунок 22 – Схема синтеза амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в присутствии тиолов, где ДАК – динитрилазобисизомасляной кислоты

При синтезе целевых амфифильных макромолекул варьировали: количество и строение передатчика цепи (1-октадекантиол (ОДТ) или 1-октантиол (ОТ)) и соотношение сомономеров (ВП и АК) в реакционной системе.

В первом случае соотношение сомономеров оставалось неизменным, в то время как количество тиола, добавленного при синтезе, варьировали для получения сополимеров различной молекулярной массы. Так, добавление ОДТ в реакционную смесь в количестве 1 мол. % в расчете на смесь сомономеров приводило к получению продукта с молекулярной массой близкой к 6 кДа, в то время как добавление вдвое меньшего количества передатчика (0,5 мол.%) приводило к образованию продукта молекулярной массой приблизительно 12 кДа (рисунок 23). При этом длина углеводородного радикала существенно не влияла на степень полимеризации, которая, в данном случае, зависела только от количества добавленного агента передачи цепи. Полученный результат свидетельствует о выполнении принципа равной реакционной способности Флори в отношении активности *n*-алкилтиолов в передаче цепи уже при относительно небольшой длине углеводородного радикала. Зависимости среднечисловой степени полимеризации от соотношения концентраций тиол/(суммарная концентрация сомономеров), полученные при использовании ОДТ и ОТ в качестве передатчиков цепи, представлены на рисунке 23 и линейны в координатах Майо « $\bar{M}_n^{-1} vs. [RSH]/\sum[M]$ ». Относительные константы передачи

цепи на ОДТ и ОТ, определенные по угловому коэффициенту линейных функций на рисунке 23 составили 0,0152 и 0,0155 соответственно и имеют близкие значения.

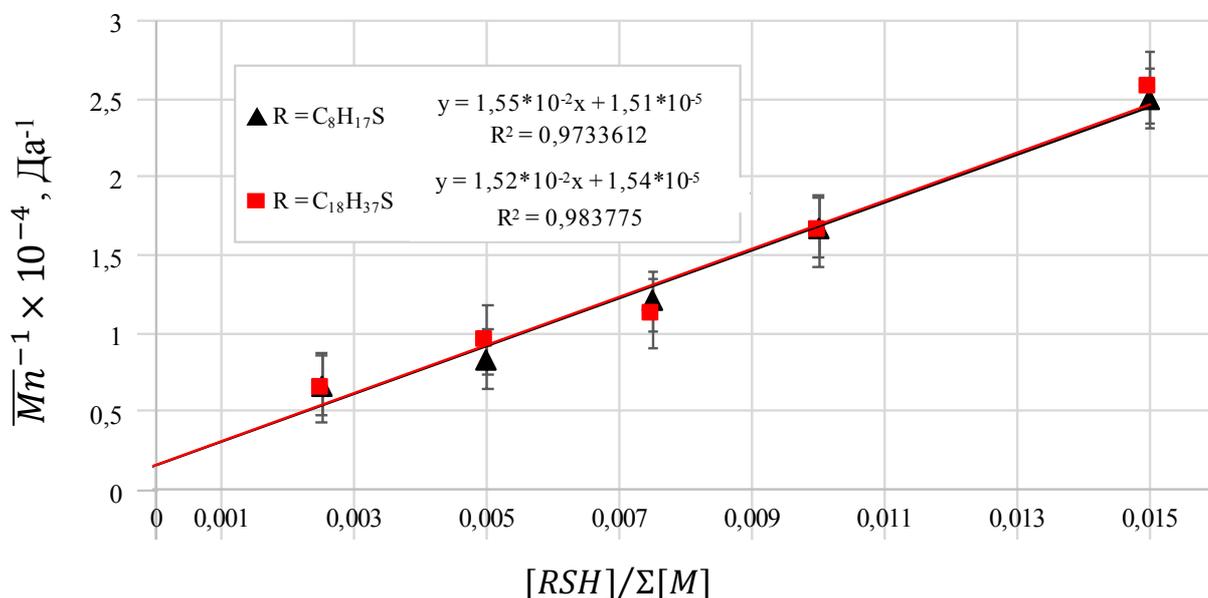


Рисунок 23 – Зависимость среднечисловой молекулярной массы сополимеров от количества введенного в реакцию тиола

Таким образом, использование тиолов с разной длиной углеводородного радикала позволяет одновременно регулировать как молекулярную массу, так и гидрофильно-липофильный баланс (раздел 3.3.1) макромолекул.

Во втором случае использовали фиксированное количество передатчика цепи (1 мол.% в пересчете на сумму концентраций сомономеров), необходимое для достижения заданного значения среднечисловой молекулярной массы, и разное соотношение сомономеров. Акриловую кислоту добавляли в количестве 0; 2,5; 5; 10; 15 мол.% от содержания N-винил-2-пирролидона в исходной реакционной смеси. Среднечисловая молекулярная масса всех синтезированных сополимеров составила 6000 ± 500 Да, что указывает на незначительное изменение константы передачи цепи на тиол при варьировании состава сополимеров ВП с АК в исследованных пределах (таблица 1).

Таблица 1 – Среднечисловые молекулярные массы амфифильных сополимеров ВП с АК различного состава, полученных в присутствии ОДТ (1 мол.%).

Название образца	Среднечисловая молекулярная масса, Да	Содержание АК, мол.%
0% АК	5800	0
3,9% АК	6400	3,9
5,6% АК	6250	5,6
9,8% АК	6000	9,8
15,8% АК	6100	15,8

Выход сополимеров после очистки диализом был оценен гравиметрически и составил приблизительно $65\pm 5\%$ для всех образцов.

3.2 Строение амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

Строение полученных сополимеров определяли с помощью ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии, MALDI-TOF масс-спектроскопии.

ЯМР ^{13}C , ЯМР ^1H и HSQC спектры синтезированного амфифильного сополимера подтверждают наличие всех характерных сигналов для остатков N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в макромолекулярной цепи [198,199]. Отнесение сигналов в ЯМР ^1H , ЯМР ^{13}C и HSQC спектрах приведено на рисунке 24.

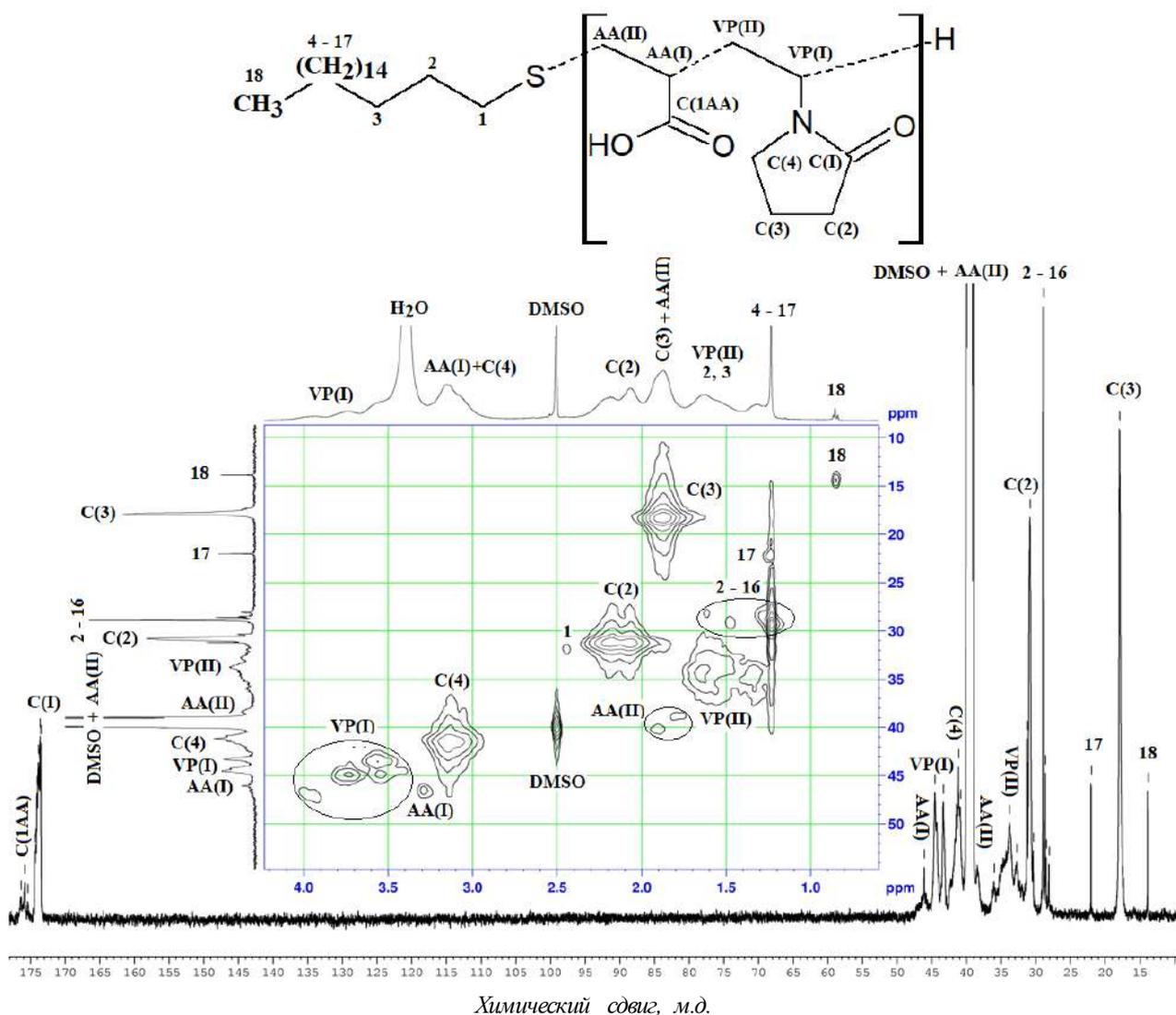


Рисунок 24 – HSQC, ЯМР ^1H , ^{13}C ЯМР спектры амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой

MALDI-TOF масс-спектр амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%), записанный в режиме детектирования положительно заряженных ионов, показывает наличие разностей отношения m/z для сигналов равных 72, 111 и 183 (рисунок 25), что согласуется с присутствием остатков как N-винил-2-пирролидона, так акриловой кислоты в составе макромолекул.

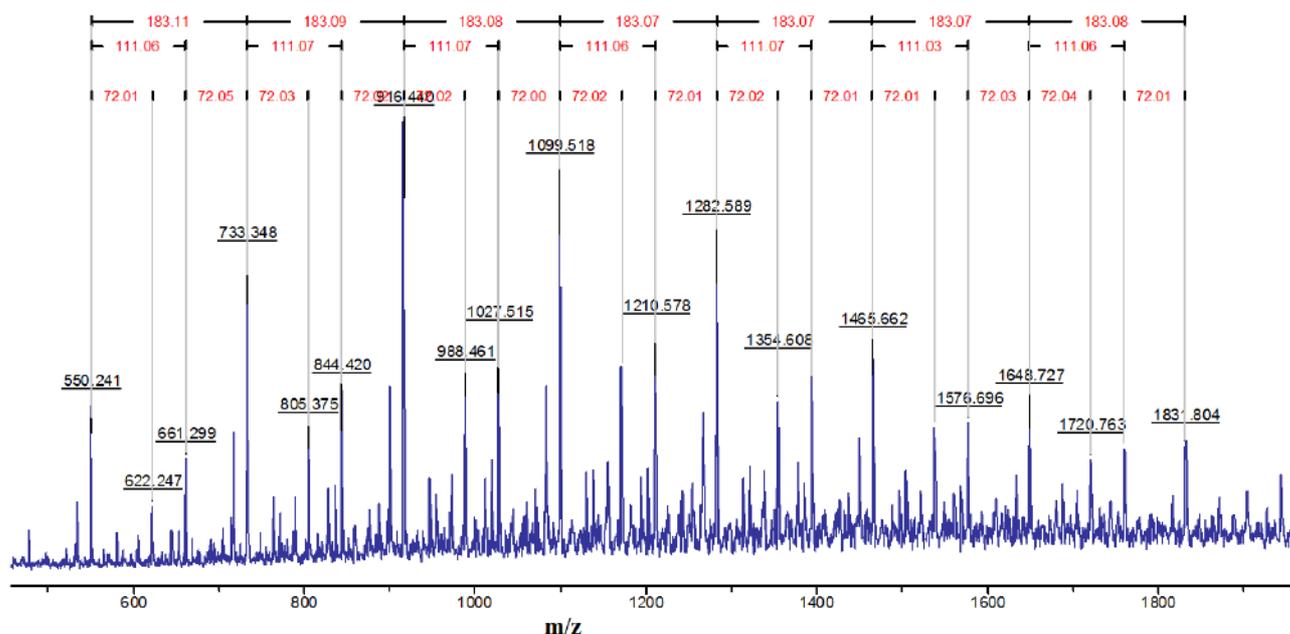


Рисунок 25 – MALDI-TOF масс-спектр амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с содержанием звеньев акриловой кислоты 15 мол.%, записанный в режиме детектирования положительно заряженных ионов

При проведении сополимеризации акриловой кислоты со значительным избытком N-винил-2-пирролидона, ИК-спектры (рисунок 26) полученного сополимера имеют все характерные для поли-N-винил-2-пирролидона сигналы [199]. В области 3440 см^{-1} присутствует широкий интенсивный сигнал, связанный с валентными колебаниями O—H-связей в карбоксильных группах остатков акриловой кислоты, которые участвуют в образовании водородной связи с амидным карбонилем остатков N-винил-2-пирролидона. Полосы поглощения $2955,7$ и $2925,4\text{ см}^{-1}$ относятся к валентным колебаниям C—H-связей, а полосы поглощения $1462,7$; $1436,7$; $1374,1$; $1082,1$ и $844,3\text{ см}^{-1}$ соответствуют колебаниям деформационным колебаниям C—H-связей. Сигналы $1494,9$ и $1318,0\text{ см}^{-1}$ могут быть связаны с колебаниями в системах атомов O=C—N и CH₂—C—N пирролидонового кольца. Наиболее интенсивная полоса поглощения $1661,1\text{ см}^{-1}$ относится к валентным колебаниям C=O связи амидной группы. Сигнал 1291 см^{-1} относится к валентным колебаниям C—N-связи, тогда как полоса поглощения 1227 см^{-1} , по-видимому, обусловлена валентными колебаниями C—O-связи карбоксильных групп остатков акриловой кислоты [200].

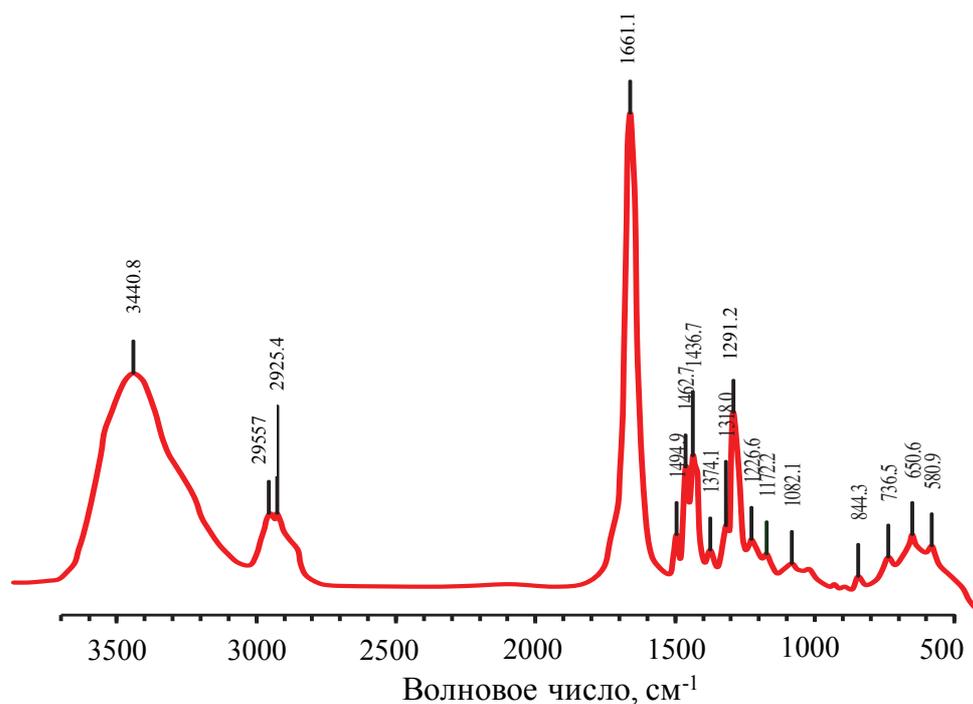


Рисунок 26 – Фурье-ИК-спектр амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой [200]

3.3 Установление закономерностей агрегации цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в водных растворах

3.3.1 Зависимость критических концентраций агрегации (мицеллообразования) от состава, среднечисловой молекулярной массы и длины концевого гидрофобного фрагмента амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

Процессы агрегации амфифильных макромолекул в водной среде исследовали тензиометрическим методом (отрыва кольца) – для водных растворов ряда синтезированных сополимеров ВП с АК были получены изотермы поверхностного натяжения на границе раздела фаз «жидкость-газ». По данным тензиометрии, при построении зависимостей в координатах “ σ - $\ln C$ ” в точке излома начинает реализовываться агрегация (мицеллообразование)

полимерных цепей с образованием наноразмерных структур посредством гидрофобных взаимодействий.

Критические концентрации агрегации, определенные для ряда синтезированных амфифильных сополимеров, приведены в таблице 2. С увеличением молекулярной массы сополимеров, при сохранении неизменной длины гидрофобного блока, ККА закономерно возрастают в обеих группах сополимеров, содержащих концевые гидрофобные октадецилтио- и октилтио-фрагменты. Соответственно, ККА полученных сополимеров определяется отношением длины гидрофобного блока к гидрофильному, и снижается с увеличением общей гидрофобности макромолекулы. Подобная зависимость описана для многих амфифильных макромолекул, в том числе для статистических сополимеров акрилата натрия и додецилакриламида [5] и для триблок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида (полоксамеров) [102].

Таблица 2 – Значения ККА водных растворов ($\text{pH} = 4,6 \pm 0,1$) синтезированных сополимеров N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%).

R = n-C₈H₁₇S			R = n-C₁₈H₃₇S		
\bar{M}_n , Да	ККА, г/л	ККА, мМоль/л	\bar{M}_n , Да	ККА, г/л	ККА, мМоль/л
15000 ± 500	-	-	15500 ± 500	4,95	0,32
12000 ± 500	-	-	10500 ± 500	2,23	0,21
8500 ± 500	24,0	2,82	9000 ± 500	1,82	0,2
6000 ± 500	12,2	2,03	6000 ± 500	1,1	0,18
3500 ± 500	6,0	1,71	4000 ± 500	0,4	0,1

При сопоставимых значениях среднечисловых молекулярных масс, ККА для ряда сополимеров с более гидрофобной *n*-октадецилтиогруппой была ожидаемо меньше, чем для ряда сополимеров с концевой *n*-октилтиогруппой. Стоит также отметить, что характер зависимости ККА сополимеров от их молекулярной массы в обеих группах несколько отличался – в ряду сополимеров

концевой *n*-октадецилтилтиогруппой изменение значения ККА с ростом \bar{M}_n менее выражено (рисунок 27). По всей видимости, длинноцепочечный октадецилтио-радикал вносит в общую гидрофобность макромолекулы вклад, достаточный для формирования устойчивых агрегатов посредством гидрофобных взаимодействий во всем исследуемом диапазоне молекулярных масс, поэтому влияние длины гидрофильной части молекулы на ККА в данном случае менее выражено, чем в ряду сополимеров с менее гидрофобной *n*-октилтиогруппой.

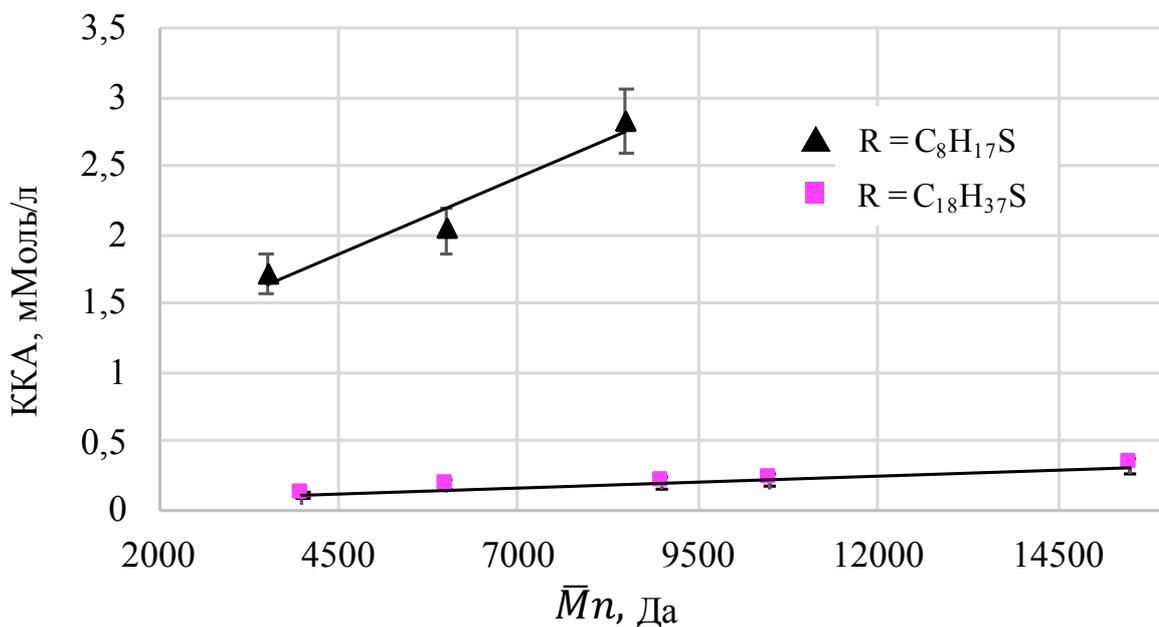


Рисунок 27 – Зависимость ККА сополимеров N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%) от среднечисловой молекулярной массы ($pH = 4,6 \pm 0,1$)

При этом для сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой *n*-октилтиогруппой и среднечисловой молекулярной массой более 12000 Да в исследуемом диапазоне концентраций излом на кривой “ $\sigma - \ln C$ ” не наблюдался, что свидетельствует об отсутствии выраженной агрегации макромолекул. Для сравнения, ниже приведены зависимости поверхностного натяжения от концентрации для растворов сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой *n*-октилтиогруппой молекулярной массой 12000 Да (рисунок 28) и 6000 Да (рисунок 29). Изотерма поверхностного

натяжения, приведенная на рисунке 29, типична для растворов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, способных к образованию наноразмерных агрегатов.

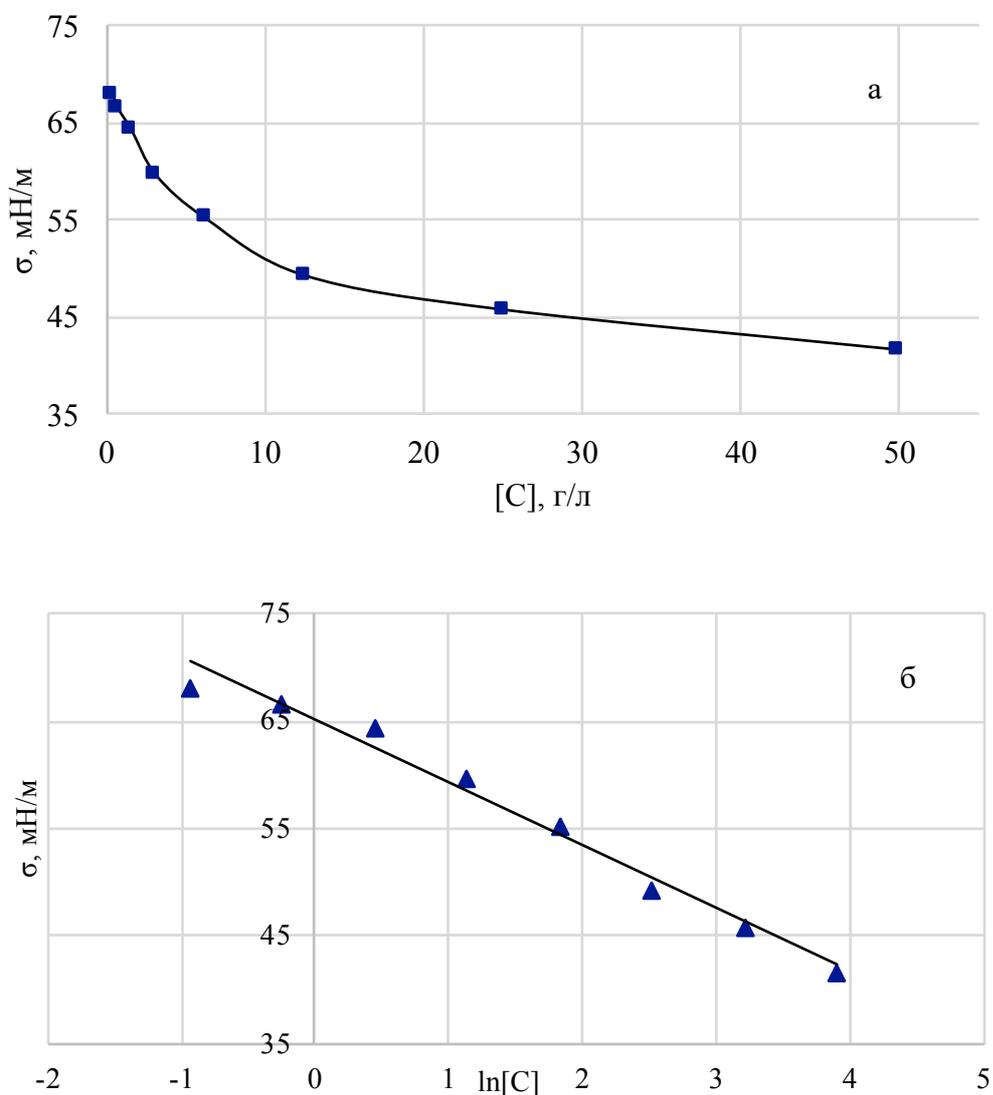


Рисунок 28 – Изотерма поверхностного натяжения водного раствора амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%) с концевой *n*-октилтиогруппой группой и молекулярной массой 12000 Да: (а) в координатах “ $\sigma - C$ ”, (б) в координатах “ $\sigma - \ln[C]$ ”

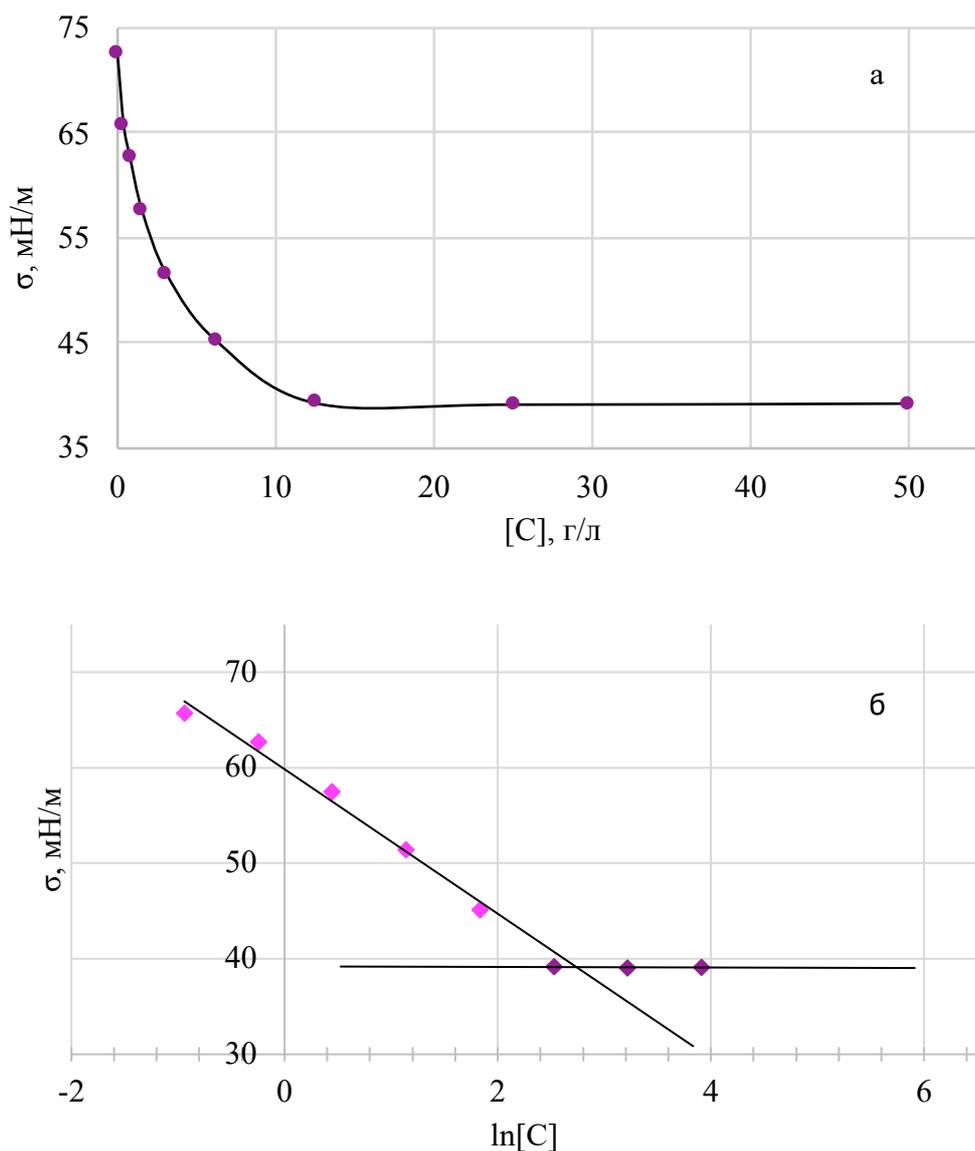


Рисунок 29 – Изотерма поверхностного натяжения водного раствора амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%) с концевой *n*-октилтиогруппой группой и молекулярной массой 6000 Да, (а) в координатах “ σ - C”, (б) в координатах “ σ – $\ln[C]$ ”

Зависимость ККА от мольной доли остатков акриловой кислоты была установлена для ряда амфифильных сополимеров с N-винил-2-пирролидоном, полученных в присутствии 1 мол.% 1-октадекантиола. При введении уже небольших количеств акриловой кислоты в макромолекулярную цепь значение ККА несколько увеличивалось относительно полимера, не содержащего фрагментов акриловой кислоты в гидрофильной цепи. Так, для макромолекул с

одинаковой длиной как гидрофильной, так и гидрофобной части и среднечисловой молекулярной массой близкой к 6000 Да, ККА линейно возрастает с увеличением количества карбоксильных групп в сополимерах (рисунок 30). В данном случае увеличение ККА может быть связано с увеличением плотности отрицательного заряда и, соответственно, с усилением электростатического отталкивания между сегментами макромолекул.

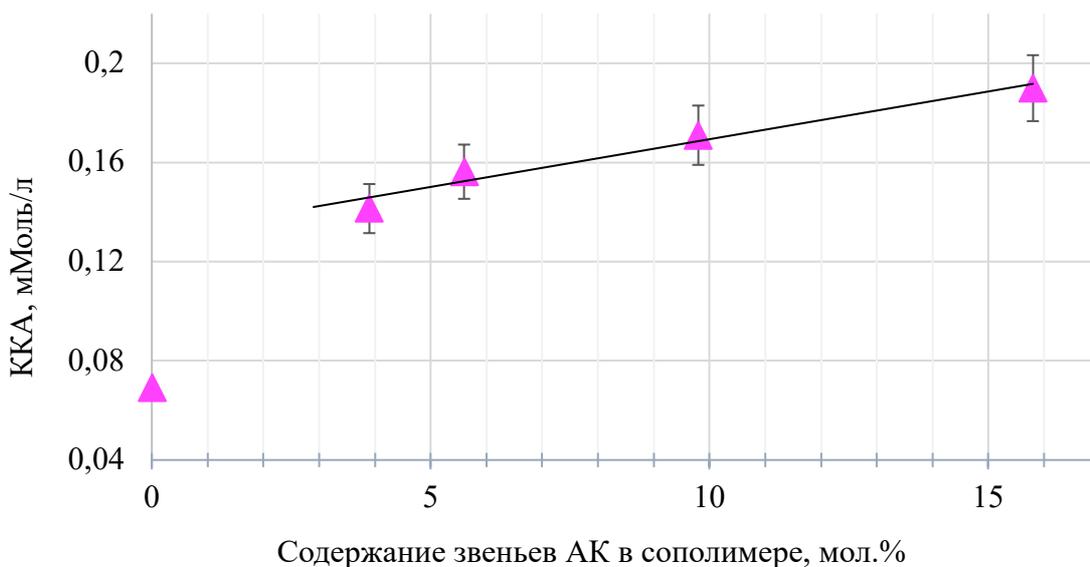


Рисунок 30 – Зависимость ККА от содержания остатков акриловой кислоты в гидрофильной цепи сополимеров ($pH = 4,6 \pm 0,1$)

Данные динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) подтверждают образование агрегатов амфифильных сополимеров в растворе и согласуются с результатами тензиометрии. Поскольку значения ККА для сополимеров, содержащих концевую *n*-октадецилтиогруппу на порядок меньше, чем для сополимеров, содержащих более короткий *n*-октилтио-радикал, они представляются наиболее подходящими для получения наноразмерных носителей лекарственных средств. Таким образом, опираясь на определенные значения ККА, для изучения характеристик образуемых агрегатов методом ДЛС, был выбран ряд сополимеров с концевой *n*-октадецилтиогруппой.

3.3.2 Влияние молекулярной массы амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой на диаметр агрегатов их цепей, образующихся в водных средах

Все синтезированные сополимеры N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой (содержание звеньев АК 15 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой в диапазоне молекулярных масс от 4000 до 15000 Да образовывали агрегаты в водном растворе. При этом с увеличением среднечисловой молекулярной массы наблюдалась тенденция к уменьшению усредненных по интенсивности и числу диаметров частиц и увеличению индекса их полидисперсности (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристики агрегатов, образованных цепями амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона (85 мол.%) с акриловой кислотой (15 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой различных среднечисловых молекулярных масс с концентрацией 20 г/л в водном растворе с pH = 4,3 ± 0,1 (d_I – гидродинамический диаметр частиц, усредненный по интенсивности сигнала, d_N – гидродинамический диаметр, усредненный по числу частиц, PDI – индекс полидисперсности частиц)

Образец, №	\bar{M}_n , Да	d_I , нм	d_N , нм	PDI
1	15500 ± 500	137,1 ± 11,9	9,7 ± 0,4	0,703 ± 0,13
2	10500 ± 500	247,9 ± 9,6	10,6 ± 0,3	0,364 ± 0,06
3	9000 ± 500	305,0 ± 8,8	150,9 ± 6,4	0,369 ± 0,07
4	6000 ± 500	365,7 ± 13,6	215,7 ± 5,7	0,267 ± 0,04
5	4000 ± 500	424,8 ± 16,9	277,1 ± 7,2	0,153 ± 0,03

На кривых распределения интенсивности сигнала по диаметрам (рисунок 31а) для частиц, образованных сополимерами со среднечисловыми молекулярными массами от 10500 до 15000 Да присутствует фракция мелких частиц диаметром от 10 до 50 нм, в то время как для образцов с меньшей молекулярной массой данная фракция отсутствует. При этом, на кривых

числового распределения частиц амфифильных сополимеров ВП с АК с молекулярной массой 10500 и 15000 Да присутствует единственный пик в области 5-15 нм (рисунок 31б), что говорит решающем о вкладе большого количества мелких частиц в общее их число в образце.

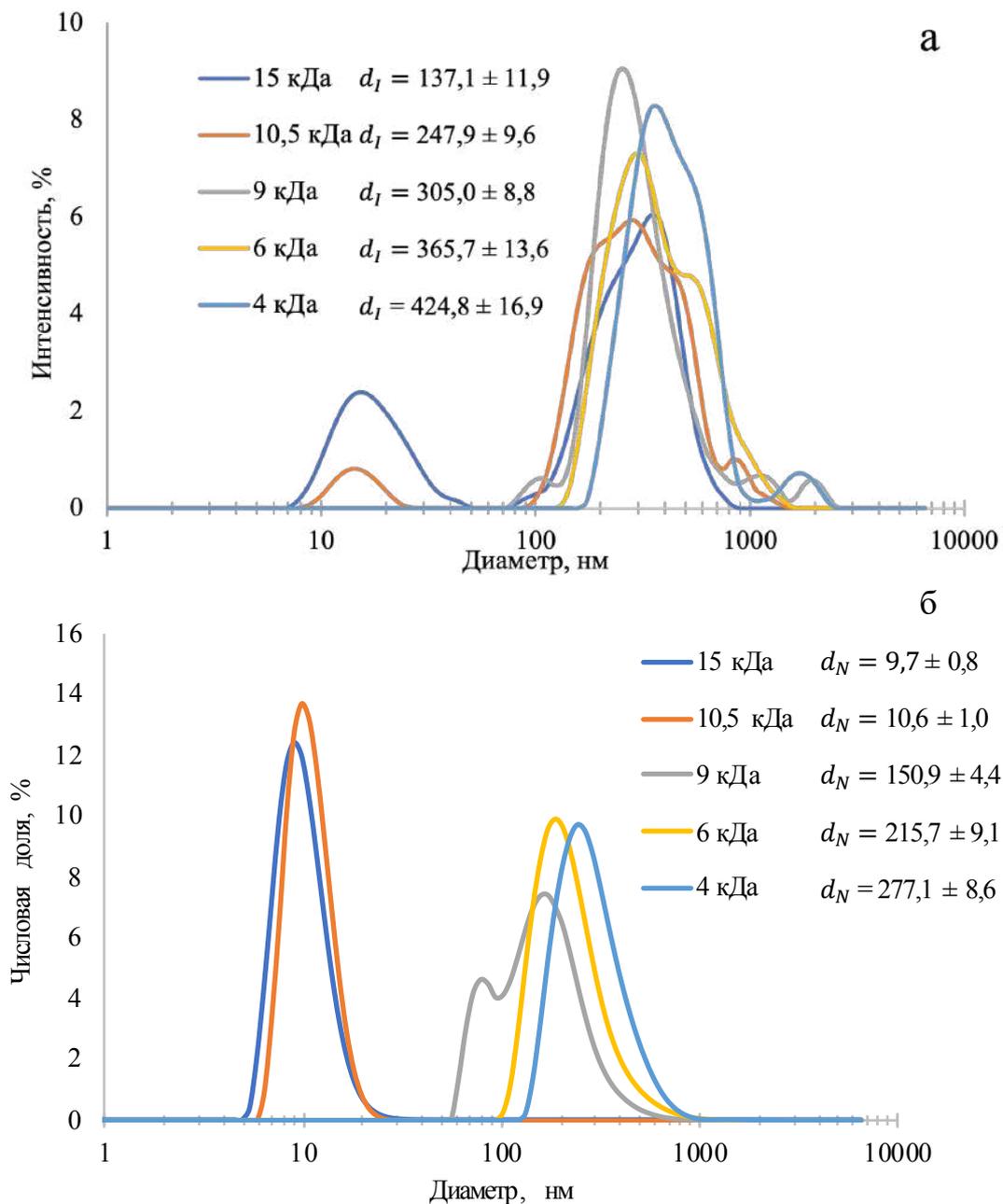


Рисунок 31 – Распределения интенсивности сигнала (а) и числа (б) агрегатов амфифильных сополимеров ВП (85 мол.%) с АК (15 мол.%) различных среднечисловых молекулярных масс по диаметрам в водных растворах концентрацией 20 г/л ($pH = 4,3 \pm 0,1$)

Таким образом, уменьшение усредненных по интенсивности и числу диаметров агрегатов с увеличением среднечисловой молекулярной массы цепей амфифильных сополимеров ВП с АК вызвано образованием фракции малых частиц диаметром до 50 нм. Вероятно, данная фракция соответствует агрегатам, сформированным за счет образования водородных связей, поскольку увеличение размера гидрофильного блока увеличивает вероятность образования водородных связей между остатками акриловой кислоты и N-винил-2-пирролидона. Примечательно, что подобные эффекты отмечались при самосборке многих амфифильных молекул [105,201,202].

3.3.3 Влияние концентрации амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой в водном растворе на диаметр агрегатов

В таблице 4 приведены данные для сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой (содержание звеньев АК в цепи составляет 5 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой со среднечисловой молекулярной массой 4000 Да. Из полученных данных видно, что при разведении раствора амфифильного сополимера ВП с АК в диапазоне концентраций от 80 до 10 г/л диаметры агрегатов, усредненные по числу и интенсивности, уменьшаются (рисунок 32). Таблица 4 – Зависимости диаметров агрегатов, усредненных по числу (d_N) и интенсивности сигнала (d_I), а также индекса полидисперсности агрегатов (PDI) от концентрации (C) амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона (95 мол.%) с акриловой кислотой (5 мол.%) с концевой *n*-октадецилтиогруппой со среднечисловой молекулярной массой 4000 Да (pH = 4,2 ± 0,2)

C, г/л (M, ммоль/л)	d_I , нм	d_N , нм	PDI
40 (10)	502,3 ± 21,5	319,7 ± 15,5	0,230 ± 0,06
20 (5)	335,8 ± 16,3	187,6 ± 9,7	0,243 ± 0,07
10 (2,5)	320,4 ± 15,8	128,6 ± 10,4	0,233 ± 0,04
5 (1,125)	262,2 ± 11,7	70,3 ± 9,6	0,199 ± 0,05

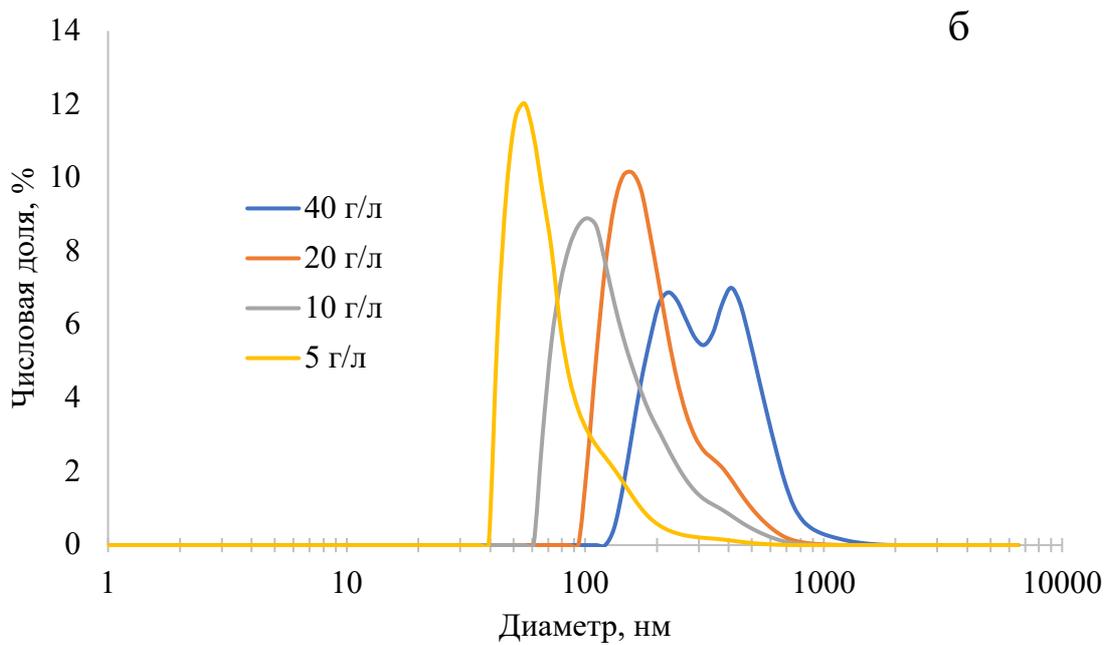
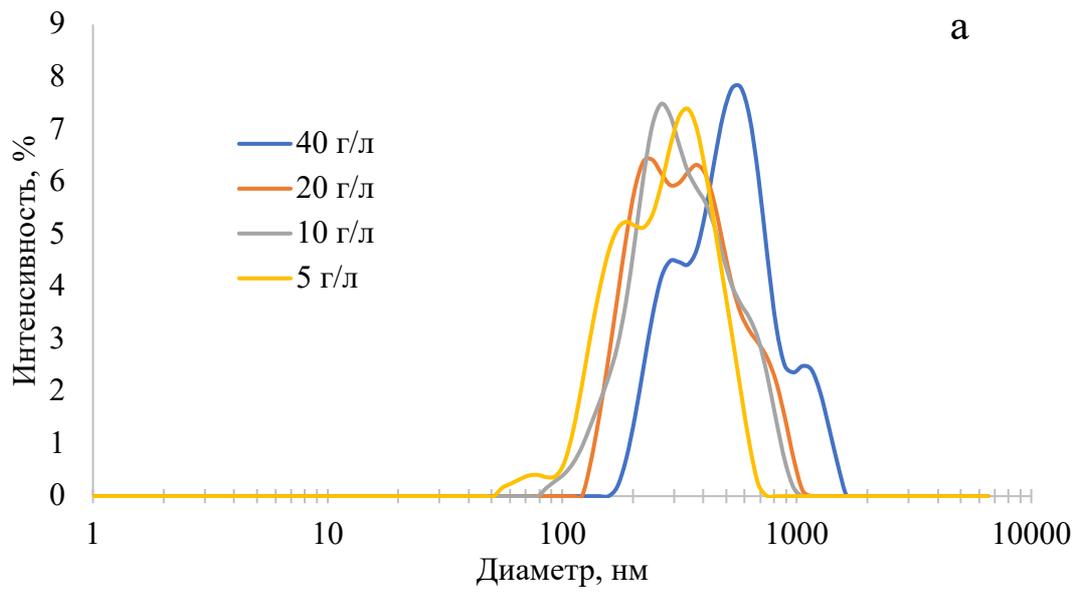


Рисунок 32 – Распределения агрегатов амфифильных сополимеров ВП с АК по диаметрам: а) – по интенсивности рассеянного света, б) – по числу частиц ($\text{pH} = 4,2 \pm 0,2$)

3.3.4 Влияние соотношения сомономерных звеньев в амфифильных сополимерах N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой на диаметр их агрегатов в водных растворах

На рисунке 33 представлены кривые распределения интенсивности сигнала и числа частиц по диаметрам, для агрегатов цепей амфифильных сополимеров ВП с АК различного состава с концентрацией 10 г/л. В целом при увеличении мольной доли остатков акриловой кислоты в цепях амфифильных сополимеров ВП с АК наблюдается уменьшение размеров их агрегатов, образующихся в водных средах. Особенно значительное воздействие увеличение мольной доли остатков акриловой кислоты в цепях амфифильных сополимеров ВП с АК оказывает на содержание фракций агрегатов с малым диаметром. Поэтому числовое распределение агрегатов по диаметрам оказывается более чувствительным к изменению содержания остатков акриловой кислоты, чем распределение агрегатов по интенсивности сигнала. Так, можно отметить, что с увеличением мольной доли остатков акриловой кислоты в цепях амфифильных сополимеров ВП с АК среднечисловой диаметр агрегатов почти линейно убывает (рисунок 34).

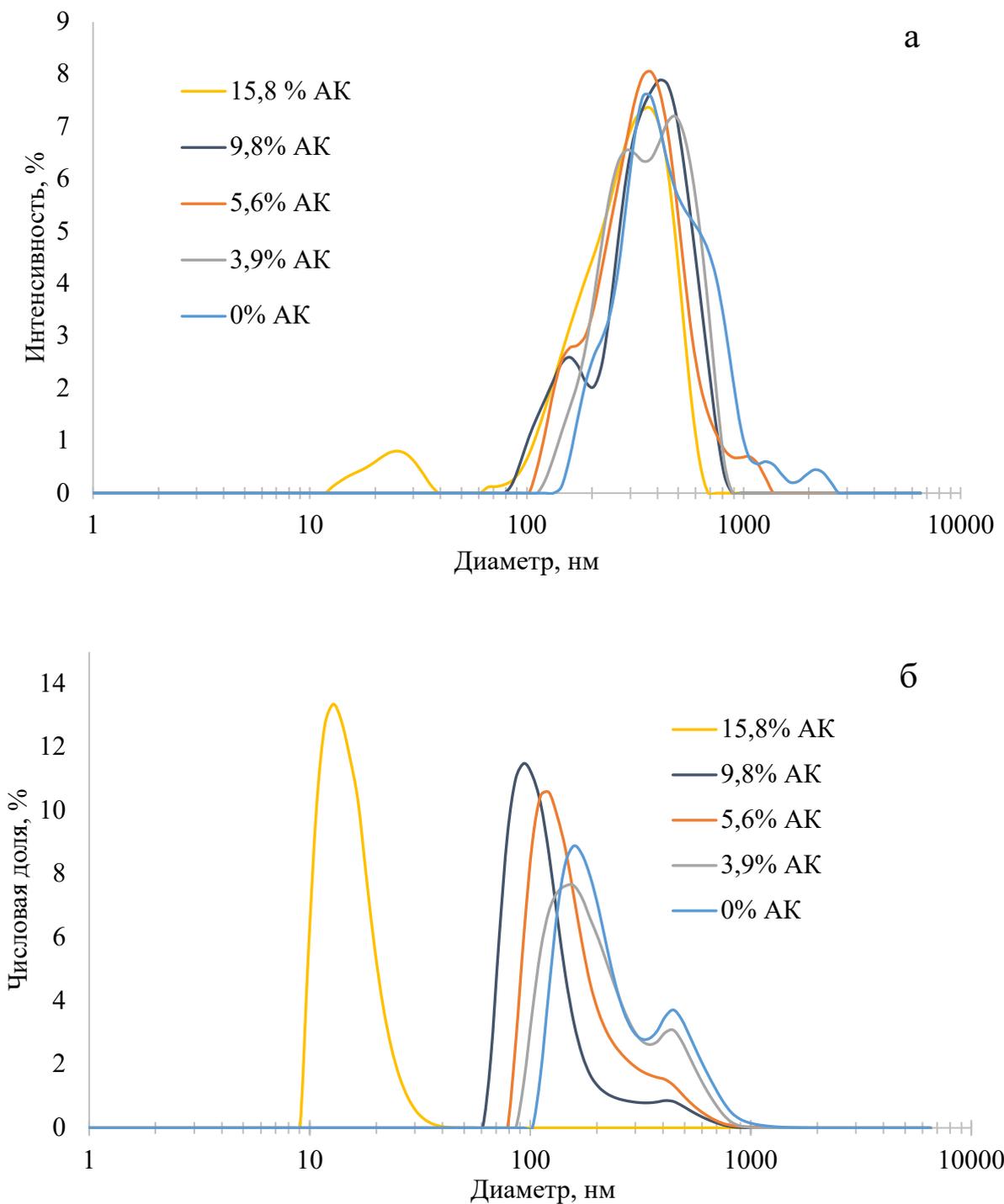


Рисунок 33 – Распределения интенсивности сигнала (а) и числа (б) агрегатов по диаметрам для амфифильных сополимеров ВП с АК различного состава в водных растворах ($\text{pH} = 4,3 \pm 0,1$, концентрация 10 г/л) [203]

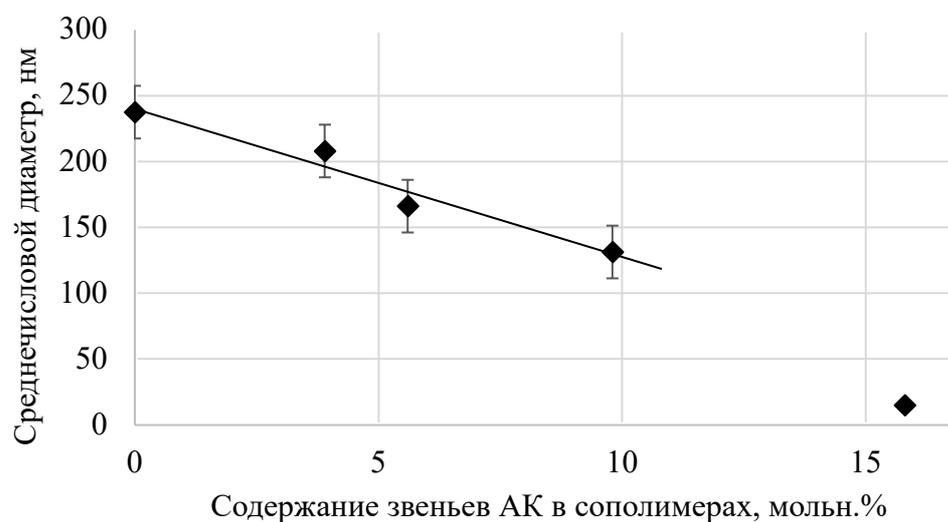


Рисунок 34 – Зависимость среднечисловых диаметров агрегатов от содержания остатков акриловой кислоты в цепи амфифильных сополимеров ВП с АК ($pH = 4,3 \pm 0,1$, концентрация 10 г/л)

Примечательно, что зависимости среднечислового диаметра и электрокинетического потенциала агрегатов цепей амфифильных сополимеров ВП с АК от содержания остатков акриловой кислоты почти синбатны (рисунок 34 и 35).

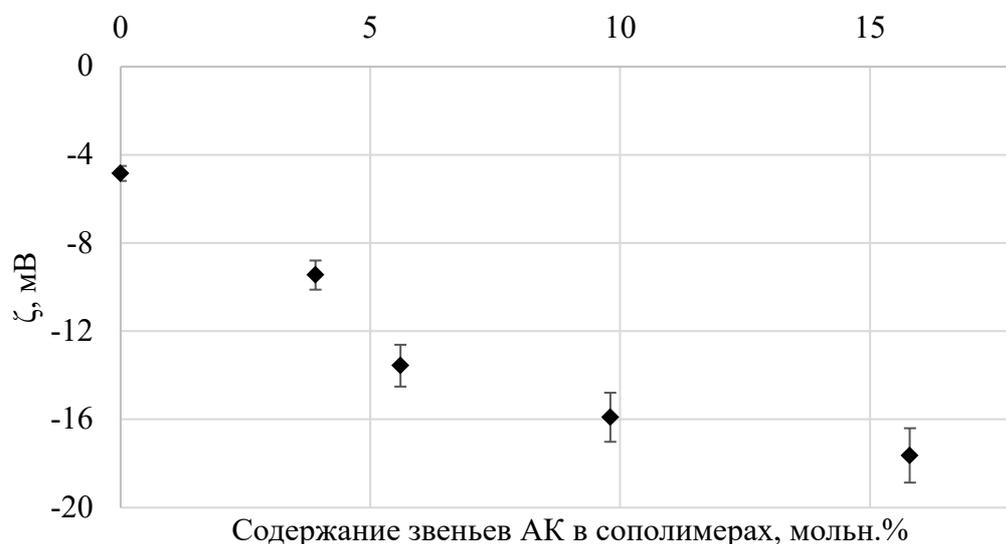


Рисунок 35 – Зависимость электрокинетического потенциала от содержания остатков акриловой кислоты в цепи сополимера ($pH = 4,3 \pm 0,1$, концентрация 10 г/л) [203]

Таким образом, можно предполагать, что основной вклад в наблюдаемый эффект уменьшения среднечислового диаметра агрегатов с увеличением содержания остатков акриловой кислоты вносит электростатическое отталкивание отрицательно заряженных карбоксилат-анионов. Последнее обстоятельство также позволяет предположить участие остатков N-винил-2-пирролидона в качестве основания в акте диссоциации карбоксильных групп остатков акриловой кислоты (рисунок 36).

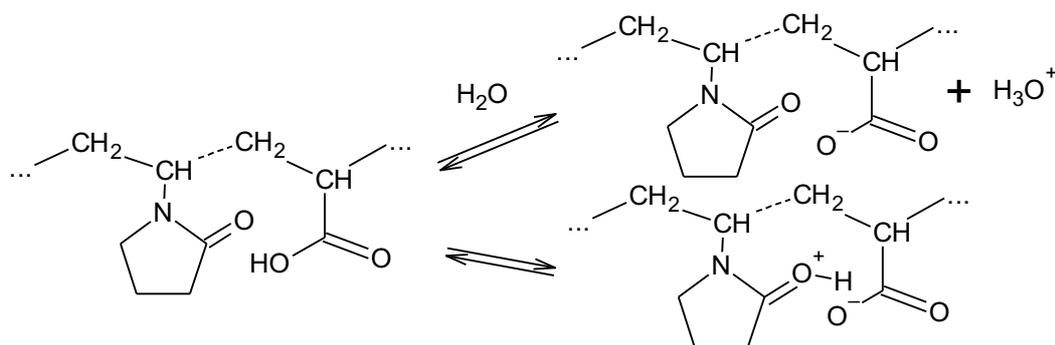


Рисунок 36 – Возможные процессы, обеспечивающие диссоциацию карбоксильных групп амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

Как видно, для амфифильных сополимеров ВП с АК с содержанием последних не превышающим 10 мол.% наблюдается почти линейное уменьшение среднечислового диаметра с уменьшением электрокинетического потенциала (более отрицательный), вызванного увеличением числа карбоксильных групп (рисунок 37).

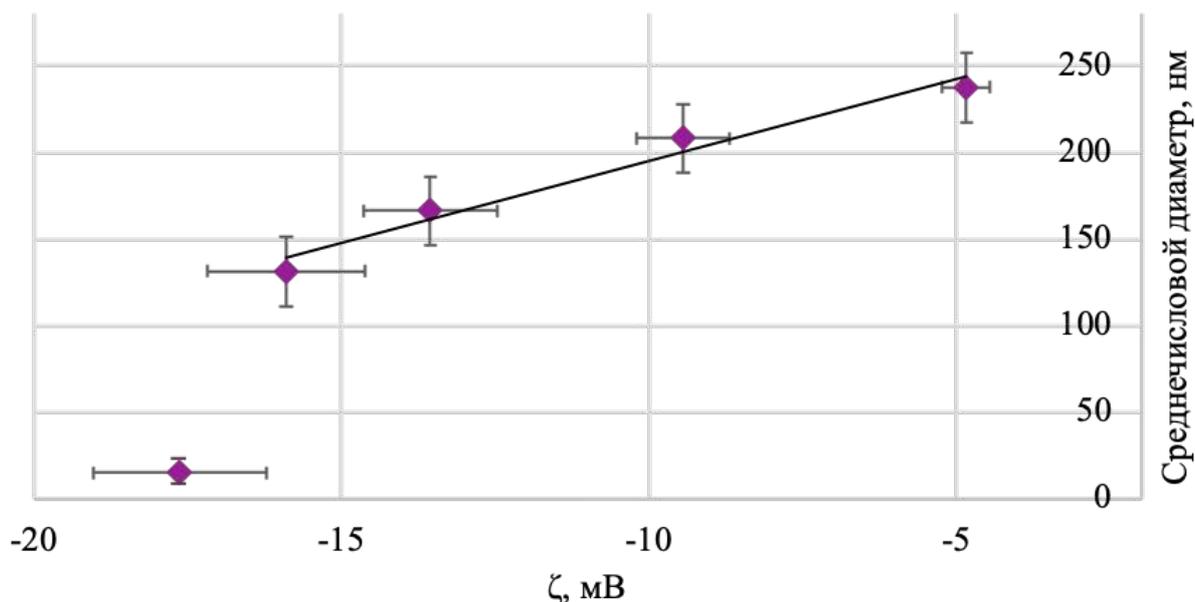


Рисунок 37 – Зависимость среднечислового диаметра от электрокинетического потенциала наночастиц, сформированных цепями амфифильных сополимеров ВП с АК различного состава ($pH = 4,3 \pm 0,1$, концентрация 10 г/л)

Увеличение доли ионизированных карбоксильных групп при увеличении pH с 6,82 до 9,07 приводило к уменьшению среднечислового диаметра частиц с сотен нанометров до размера порядка 10 нм, что связано с электростатическим отталкиванием цепей, формирующих агрегат (рисунок 38). Так среднечисловой диаметр частиц составил 253 нм, 296 нм, 298 нм, 10,3 нм и 9,9 нм при pH среды 4,2, 6,18, 6,82, 9,07 и 9,87 соответственно.

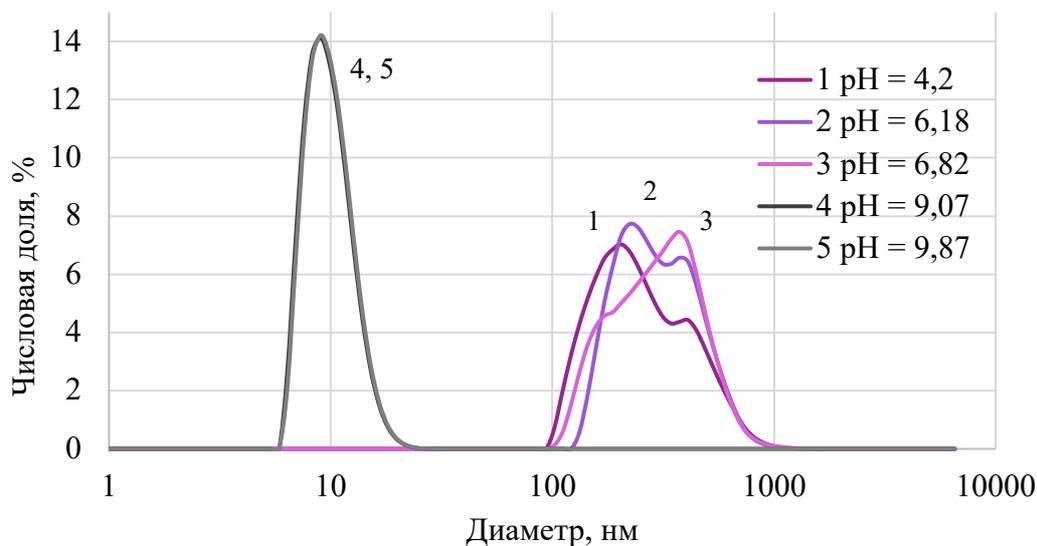


Рисунок 38 – Кривые числового распределения наночастиц по диаметрам для амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона (95 мол.%) с акриловой кислотой (5 мол.%) с концевой н-октадецилтиогруппой со среднечисловой молекулярной массой 6000 Да при концентрации в растворе 20 г/л, полученные при различных рН среды: 1 – 4,2; 2 – 6,18; 3 – 6,82; 4 – 9,07; 5 – 9,87.

Агрегаты амфифильных сополимеров ВП с АК были визуализированы с помощью АСМ и ПЭМ (рисунок 39).

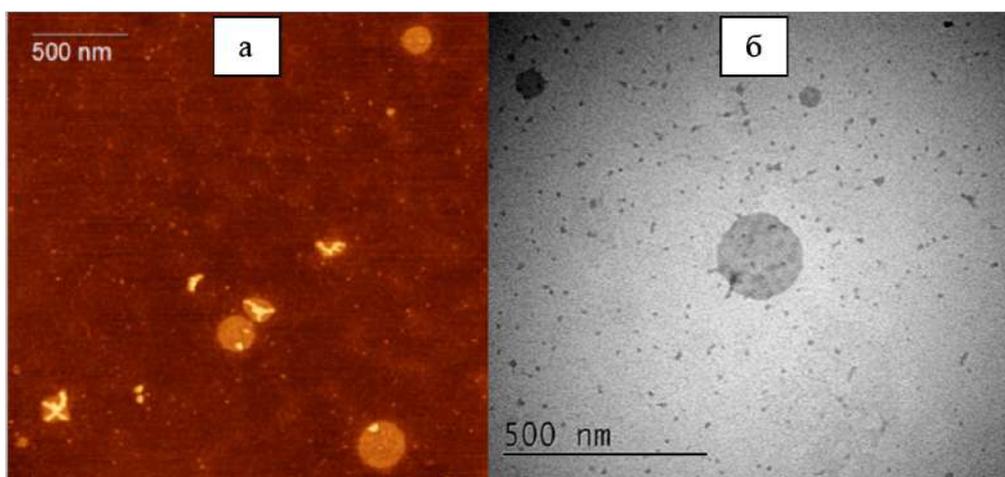


Рисунок 39 – Электронные микрофотографии агрегатов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, полученные с помощью а) АСМ б) ПЭМ

Данные АСМ и ПЭМ согласуются друг с другом – средние значения диаметров частиц составляют 167 ± 26 нм и 145 ± 24 нм соответственно (рисунок 40). При этом диаметры единичных наночастиц, определенные с использованием АСМ и ПЭМ закономерно меньше диаметров агрегатов, полученных на основе данных динамического лазерного светорассеяния. Последнее связано с формированием гидратной оболочки гидрофильной короны агрегатов цепей амфифильных сополимеров ВП с АК, которая не может быть визуализирована методами микроскопии.

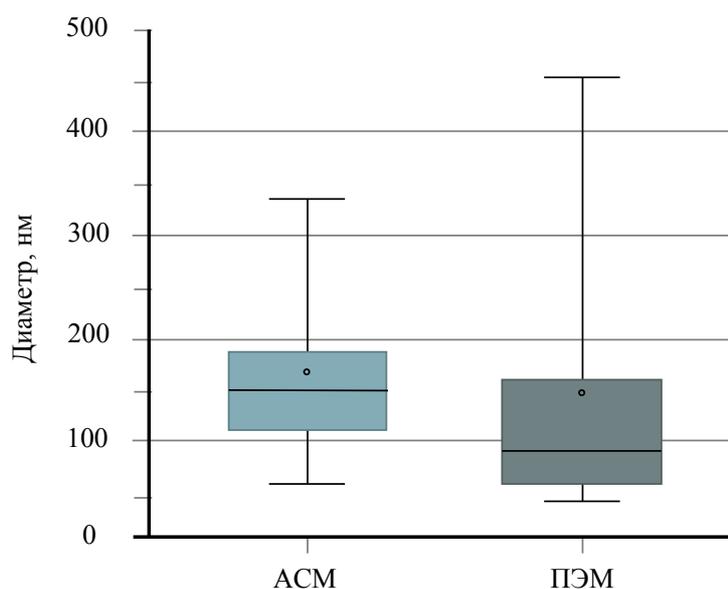


Рисунок 40 – Характеристики размеров частиц, рассчитанные по данным АСМ и ПЭМ (вертикальные линии – диаметры частиц входящих диапазон 5-95%, горизонтальная линия означает медианный диаметр, в прямоугольные рамки выделены диаметры частиц, входящих в диапазон 25-75%, а точкой отмечен средний диаметр) [203]

Таким образом, на основании вышеизложенных данных можно прийти к выводу, что для разработки систем доставки лекарственных препаратов наиболее подходящими являются сополимеры N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой октадецильной группой с молекулярной массой от 4000 до 6000 Да и небольшим содержанием остатков акриловой кислоты (до 10 мол.%). Однако количество карбоксилсодержащих звеньев в макромолекулярной цепи может существенно повлиять на степень связывания гидрофильных основных

лекарственных препаратов, поэтому окончательный вывод об оптимальном соотношении мономерных остатков в сополимерах можно будет сделать после исследования кинетики высвобождения иммобилизованного модельного фармакологически активного препарата.

(Материалы раздела 3.2 и 3.3 отражены в статьях, опубликованных по теме диссертации: **Nechaeva A.M.** The Synthesis and Properties of a New Carrier for Paclitaxel and Doxorubicin Based on the Amphiphilic Copolymer of N-vinyl-2-pyrrolidone and Acrylic Acid / **A.M. Nechaeva**, A.A. Artyukhov, A.L. Luss, M.I. Shtilman, A.Y. Svistunova, M.V. Motyakin, I.I. Levina, E.G. Krivoborodov, I.Y. Toropygin, E.M. Chistyakov, A.M. Tsatsakis, L. Gurevich, Y.O. Mezhuev // *Macromolecular Chemistry and Physics*. – 2022. – V. 223. – № 17. – P. 2200081. DOI: 10.1002/macp.202200081 и Artyukhov A.A. Nanoaggregates of Biphilic Carboxyl-Containing Copolymers as Carriers for Ionically Bound Doxorubicin / A.A. Artyukhov, **A.M. Nechaeva**, M.I. Shtilman, E.M. Chistyakov, A.Y. Svistunova, D.V. Bagrov, A.N. Kuskov, A.O. Docea, A.M. Tsatsakis, L. Gurevich, Y.O. Mezhuev // *Materials*. – 2022. – V. 15. – № 20. – P. 7136. DOI: 10.3390/ma15207136)

3.4 Иммобилизация лекарственных препаратов агрегатами цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

Важной задачей работы являлось изучение возможности одновременной иммобилизации двух противораковых препаратов на одном макромолекулярном носителе, что также обусловило выбор амфифильного сополимера ВП с АК в качестве объекта исследования. Известно, что комбинированная терапия рака значительно превосходит по эффективности монотерапию и является одним из приоритетных направлений развития медицины в части лечения онкологических заболеваний [204–206]. Кроме того, необходима разработка подходов к лечению широкого круга онкологических заболеваний различной локализации и гистологической картины. Поэтому в качестве модельных лекарств были выбраны препараты с широким спектром противораковой активности, а именно,

доксорубицин (DOX) и паклитаксел (PTX) [207,208]. Доксорубицин и паклитаксел относятся к препаратам с широкой противоопухолевой активностью, которые в некоторых случаях проявляют синергетический эффект при совместном применении [209]. В тоже время, паклитаксел имеет крайне низкую биодоступность из-за его высокой гидрофобности [210]. Включение гидрофобного паклитаксела в ядро агрегатов амфифильных сополимеров открывает путь к повышению его биодоступности, а иммобилизация доксорубицина гидрофильной короной агрегатов, может стать ценным подходом к снижению его кардиотоксичности [211–214].

На основании результатов тензиометрии и ДЛС, изложенных в разделе 3.3, для иммобилизации лекарственных препаратов был выбран сополимер N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с концевой *n*-октадецилтиогруппой и мольной долей карбоксилсодержащих звеньев в сополимере 5,3 мол. %, с молекулярной массой – 4000 ± 400 Да. На первом этапе работы получали частицы, с загруженным в ядро паклитакселом. Для этого, раствор паклитаксела в хлороформе по каплям добавляли к водному раствору сополимера при непрерывной ультразвуковой обработке в течении 20 минут. По завершении обработки растворов ультразвуком, из полученной эмульсии на роторном испарителе удаляли хлороформ. Суспензию наночастиц центрифугировали.

Далее, суспензию загруженных паклитакселом частиц разделяли на две эквивалентные части. К одной части добавляли водный раствор доксорубицина гидрохлорида. Агрегаты сополимера, не содержащие лекарственных препаратов, получали ультразвуковой обработкой водного раствора сополимера. Агрегаты сополимера с иммобилизованным доксорубицином получали ультразвуковой обработкой водного раствора сополимера и последующим добавлением к нему водного раствора доксорубицина гидрохлорида. Концентрации компонентов в растворе представлены в таблице 5. Для агрегатов на основе амфифильных сополимеров ВП с АК, содержащих иммобилизованный доксорубицин и паклитаксел было получено распределение частиц по диаметрам (рисунок 41).

Таблица 5 – Исходные концентрации компонентов в растворе: $C_{п}$ – концентрация полимера в растворе, $C_{РТХ}$ – концентрация паклитаксела в растворе, C_{DOX} – концентрация доксорубина в растворе, $C_{лп}$ – суммарная концентрация препаратов в растворе.

Раствор	Название	$C_{п}$, г/л	$C_{РТХ}$, ммоль/л	C_{DOX} , ммоль/л	$C_{лп}$, ммоль/л
0	п(ВП-АК)	10	0	0	0
1	пРТХ	13,3	1,56	0	1,56
2	п(РТХ+DOX)	10	0,78	0,78	1,56
3	пDOX	13,3	0	1,56	1,56

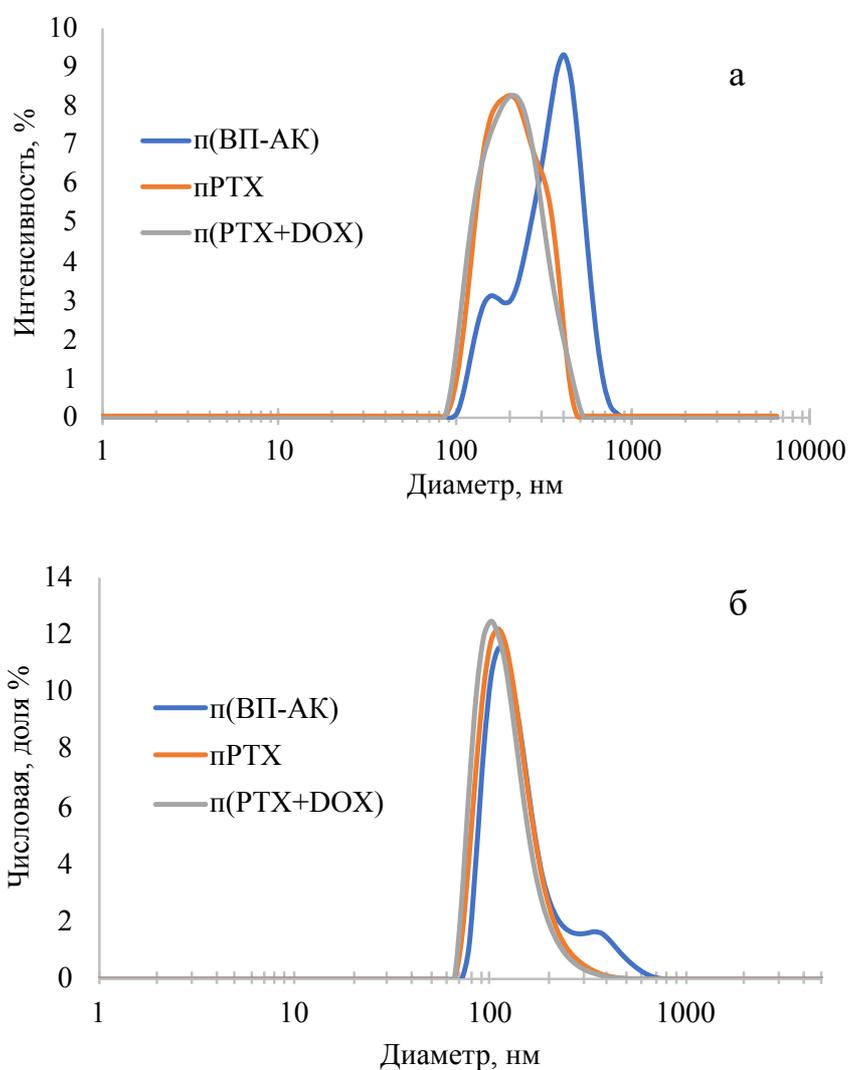


Рисунок 41 – Кривые распределения интенсивности сигнала (а) и числа частиц (б) по диаметрам для амфифильных сополимеров ВП с АК после включения паклитаксела и доксорубина

Как видно, частицы (таблица 6), содержащие включенный гидрофобный препарат паклитаксел в ядре, имеют меньший диаметр и полидисперсность, чем пустые агрегаты

Таблица 6 – Данные ДЛС для загруженных лекарственными препаратами частиц. d_I – гидродинамический диаметр частиц, усредненный по интенсивности сигнала; d_N – гидродинамический диаметр, усредненный по числу частиц; Q_{90-1} – максимальный диаметр частиц, входящих в 90-й перцентиль; PDI – индекс полидисперсности частиц.

№	Название	d_I , нм	d_N , нм	Q_{90-1} , нм	PDI
0	п(ВП-АК)	$318,6 \pm 14,1$	$145,8 \pm 8,7$	505 ± 27	$0,168 \pm 0,031$
1	пРТХ	$219,2 \pm 6,4$	$120,8 \pm 2,2$	$357,9 \pm 20,5$	$0,152 \pm 0,022$
2	п(РТХ+DOX)	201 ± 2	$109,6 \pm 4,8$	$326,8 \pm 7,0$	$0,15 \pm 0,020$

Если бы паклитаксел был включен в гидрофобные ядра агрегатов за счет простого захвата гидрофобного компонента (без пересборки агрегатов вокруг нового гидрофобного ядра), то следовало бы ожидать увеличения диаметра частиц. Однако размер агрегатов уменьшался после включения паклитаксела, что позволяет предположить реализацию процессов реструктурирования частиц, связанных с распадом агрегатов и их последующей сборкой вокруг нового гидрофобного центра, образованного включаемым в частицы компонентом. При этом иммобилизация короной агрегатов небольшого количества водорастворимого доксорубина не оказывала значительного влияния на размер агрегатов и их полидисперсность. Таким образом, амфифильные сополимеры ВП с АК, являются подходящей основой для получения наноразмерных форм паклитаксела и доксорубина, представляющих интерес в комбинированной терапии рака. Диаметр загруженных агрегатов находился в пределах 200 – 220 нм, что соответствует размерной области подавляющего большинства наноматериалов фармакологического назначения [215,216].

3.4.1 Исследование цитотоксичности полученных наноразмерных форм паклитаксела и доксорубицина

Цитотоксичность наноагрегатов исследовали с помощью МТТ теста на клеточных линиях глиомы крысы (С6) и глиобластомы человека (U87). После культивирования клеток в течении 24 часов в лунки 96-луночного планшета вносили препарат исследуемых наночастиц в различных концентрациях. По истечении 48 часов культивирования определяли количество жизнеспособных клеток. Положительным контролем служили лунки с клетками без исследуемого препарата. Графики зависимости количества живых клеток от десятичного логарифма концентрации исследуемого препарата представлены на рисунке 42.

Как видно, клетки линии С6 проявляют большую устойчивость к воздействию противоопухолевых препаратов, чем клетки линии U87. При этом амфифильный сополимер ВП с АК не оказывает токсического действия даже при концентрации 10 мкмоль/мл для клеток линии U87, тогда как для клеток С6 токсичности полимера-носителя не наблюдается даже при концентрации 50 мкмоль/мл. При этом диапазон терапевтических концентраций паклитаксела и доксорубицина на один-два порядка ниже. Таким образом, амфифильные сополимеры N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой могут рассматриваться в качестве перспективных носителей для комбинированной терапии опухолевых заболеваний доксорубицином и паклитакселом.

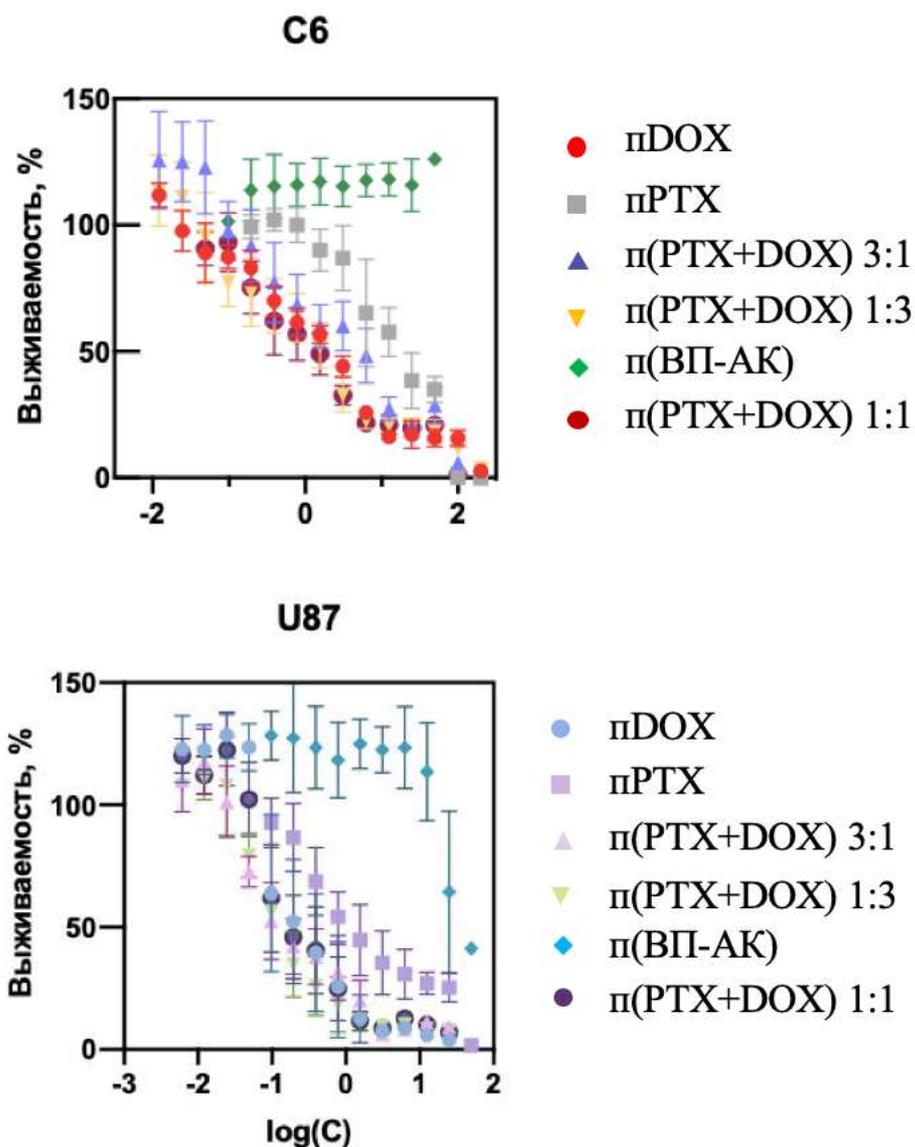


Рисунок 42 – Зависимости доли выживших клеток после обработки агрегатами амфифильных сополимеров ВП с АК, содержащих включенные лекарства (С – суммарная молярность паклитаксела и доксорубина в исходном растворе, в подписях приведены мольные соотношения противоопухолевых препаратов в исходном растворе)

Материалы раздела 3.4.1 получены совместно с сотрудниками лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» НИТУ МИСИС.

3.5 Кинетика высвобождения доксорубина иммобилизованного гидрофильной короной агрегатов цепей амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой

При исследовании кинетики высвобождения доксорубина из водных растворов, содержащих добавки коммерческого поли-N-винил-2-пирролидона без ионогенных групп и поли-N-винил-2-пирролидона с концевыми карбоксильными группами, полученного в результате радикальной полимеризации ВП в присутствии тиогликолевой кислоты, было отмечено небольшое замедление скорости высвобождения лекарства в присутствии поли-N-винил-2-пирролидона без ионогенных групп (рисунок 45) [217]. Схема синтеза сополимера N-винил-2-пирролидона с концевыми карбоксильными группами и характеристика его строения представлены на рисунках 43 и 44 соответственно.

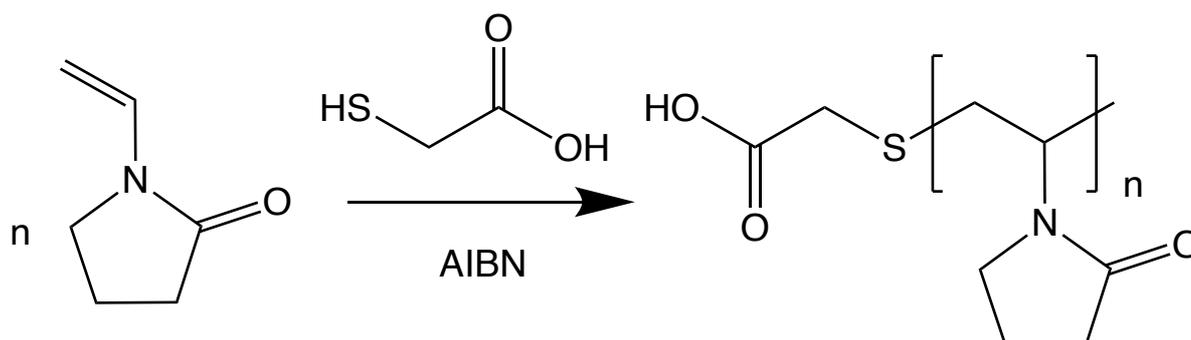


Рисунок 43 – Синтез поли-N-винил-2-пирролидона с концевой карбоксильной группой [217]

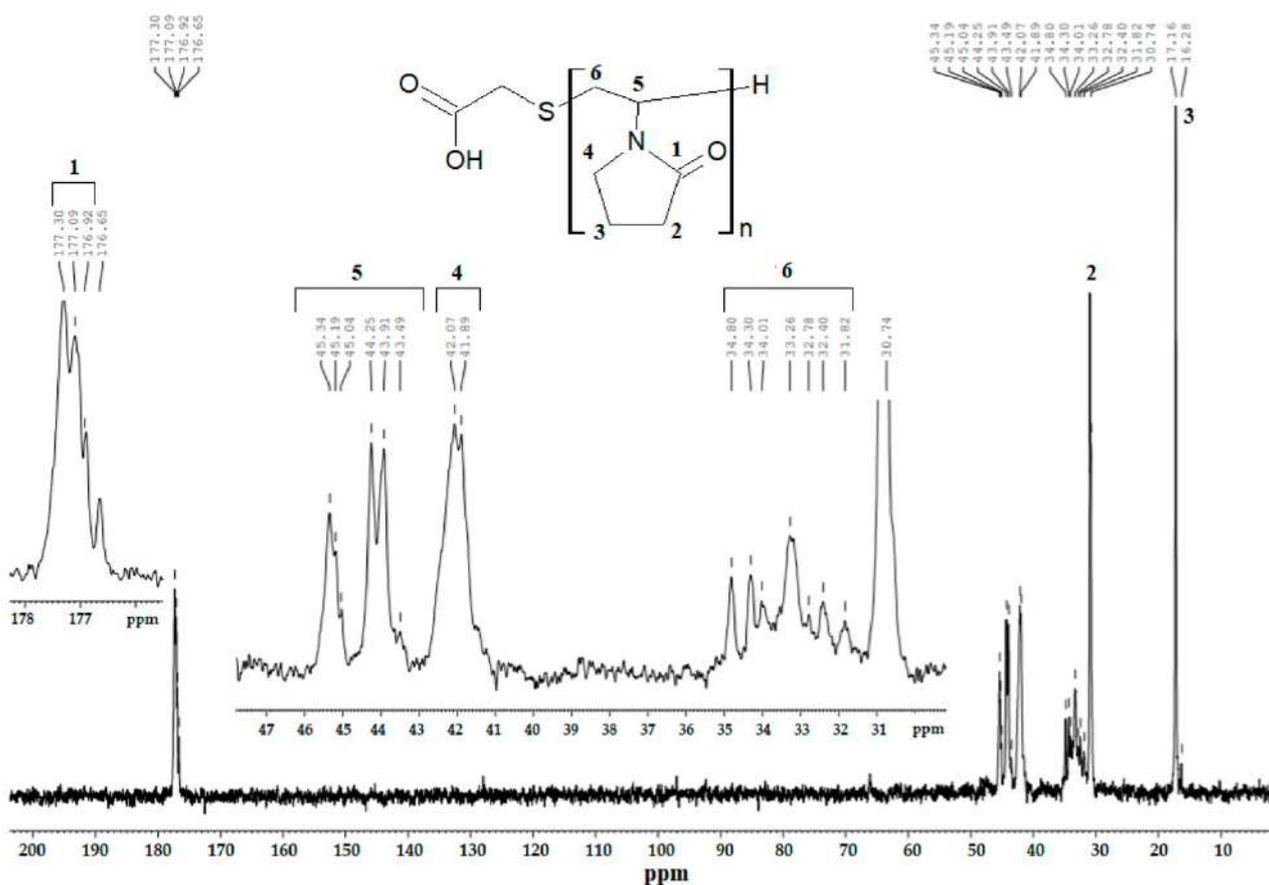


Рисунок 44 – Характеристика строения поли-N-винил-2-пирролидона с концевой карбоксильной группой [217]

Замедление высвобождения можно объяснить образованием водородных связей между остатками ВП в цепи, а также гидроксильными и аминогруппами, содержащимися в молекуле доксорубина. При этом введение даже одной концевой карбоксильной группы на цепь поли-N-винил-2-пирролидона приводило к существенному уменьшению скорости высвобождения доксорубина. Примечательно, что полученные кинетические данные по высвобождению доксорубина в результате диализа через мембрану с отсечением 500 Да с контролем концентрации препарата методом УФ спектроскопии, позволили выявить подчинение зависимостей уравнению 1 [217]:

$$\ln(A_{\infty} - A) = -kt + const \quad (1)$$

где: A_{∞} - предельное значение оптической плотности в воде, против которой осуществлялся диализ; A – текущее значение оптической плотности; t –

длительность высвобождения доксорубина; k – эффективная константа скорости.

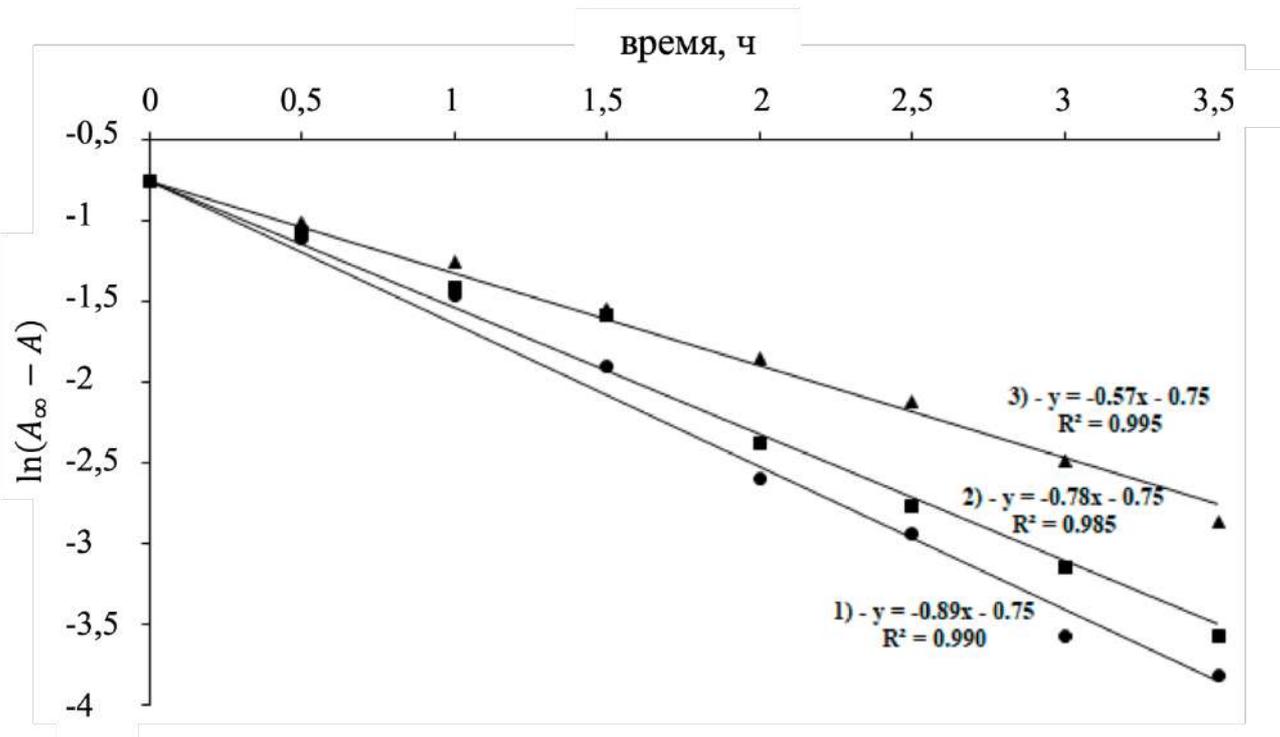


Рисунок 45 – Кинетика высвобождения доксорубина из водных растворов: 1 – не содержащих добавок поли-N-винил-2-пирролидона; 2 – содержащих поли-N-винил-2-пирролидон без ионогенных групп; 3 – содержащих поли-N-винил-2-пирролидон с концевой карбоксильной группой [217]

С одной стороны подчинение кинетики высвобождения доксорубина уравнению 1 указывает на обратимый характер иммобилизации, с другой стороны значительное уменьшение скорости высвобождения препарата при введении всего одной карбоксильной группы на одну цепь, указывает на значительные перспективы этого подхода при увеличении их концентрации в цепи. Если при наличии всего одной карбоксильной группы на одну цепь, вклад ионной иммобилизации доксорубина сопоставим с вкладом водородных связей, которые могут образовываться с участием каждого остатка ВП в цепи (рисунок 46), то при увеличении числа карбоксильных групп в полимерной цепи электростатическое связывание будет доминирующим механизмом иммобилизации [217].

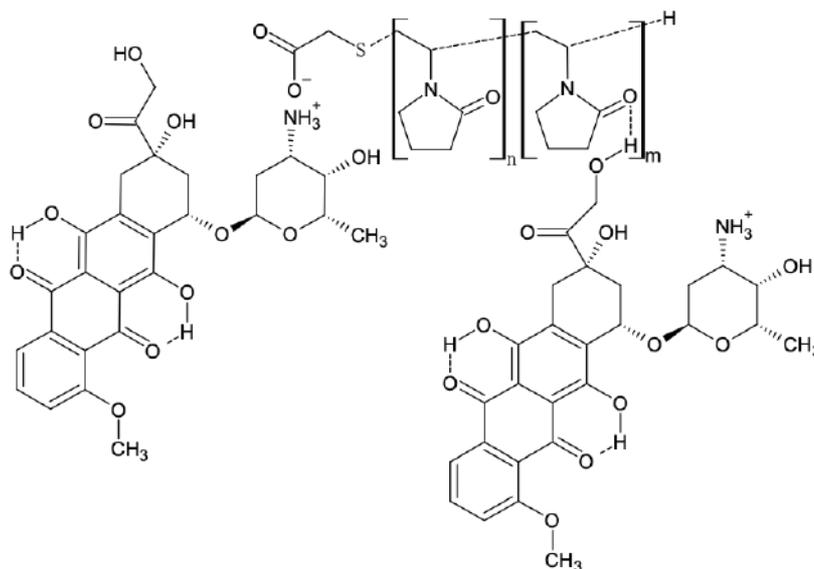


Рисунок 46 – Предполагаемый механизм связывания доксорубина поли-N-винил-2-пирролидоном с концевой карбоксильной группой посредством образования водородных и ионных связей [217]

Поэтому использование амфифильных сополимеров ВП с АК может способствовать увеличению эффективности ионной иммобилизации доксорубина.

Таким образом, высвобождение доксорубина является следствием обратимой реакции (рисунок 47) [203].

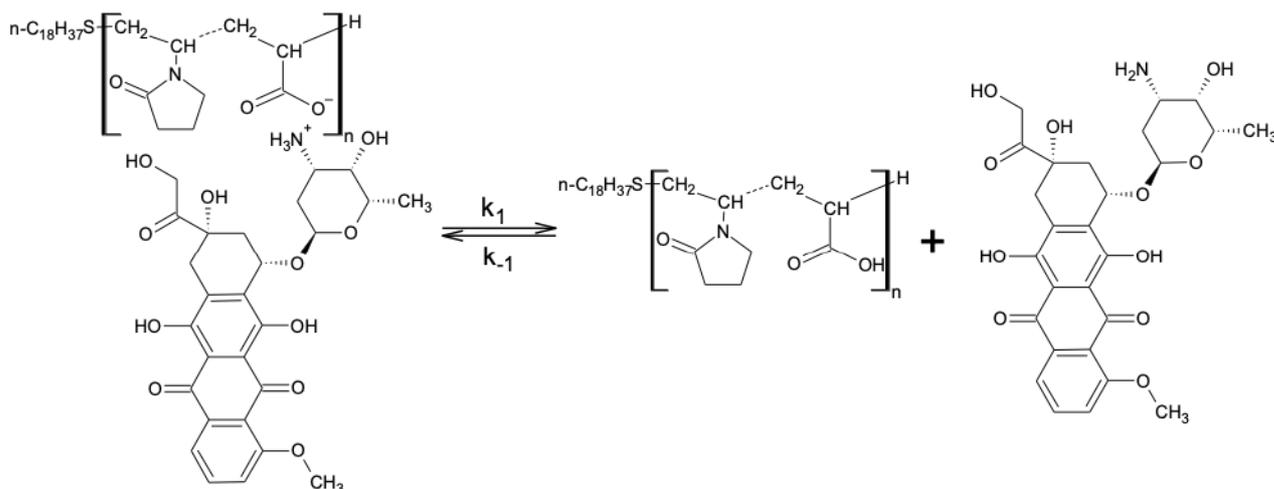


Рисунок 47 – Механизм высвобождения иммобилизованного посредством ионного (электростатического) связывания доксорубина, где k_1 – константа скорости высвобождения доксорубина; k_{-1} – эффективная константа скорости связывания лекарства [203]

Следовательно, скорость высвобождения доксорубицина соответствует уравнению 2 [203]:

$$\frac{dC_{DOX}}{dt} = k_1 C_{IDOX} - k'_{-1} C_{COOH} C_{DOX} = k_1 C_{IDOX} - k_{-1} C_{DOX} \quad (2)$$

где: C_{IDOX} – концентрация связанного доксорубицина; C_{COOH} – концентрация карбоксильных групп; $C_{DOX} = C_{DOX}^{max} - C_{IDOX}$ – концентрация несвязанного доксорубицина (концентрация доксорубицина высвободившегося из диализной мембраны в воду); C_{DOX}^{max} – предельно достижимая концентрация доксорубицина при его полном высвобождении; $k_1, k_{-1} = k'_{-1} C_{COOH}$ – константа скорости высвобождения и эффективная константа скорости связывания лекарства; k'_{-1} – истинная константа скорости связывания лекарства; t – длительность высвобождения доксорубицина.

После интегрирования в пределах от 0 до C_{DOX} и от 0 до t , было получено уравнение (3) [203]:

$$\ln\left(1 - \frac{C_{DOX}}{\overline{C_{DOX}}}\right) = -(k_1 + k_{-1})t \quad (3)$$

где: $\overline{C_{DOX}}$ – концентрация высвободившегося доксорубицина, достигаемая к моменту установления равновесия.

Вводя конверсию (ξ) и равновесную конверсию (ξ_∞) для реакции, приведенной на рисунке 47, в соответствии с уравнениями (4) и (5), можно записать эквивалентное (3) выражение (6) [200,203].

$$\xi = \frac{C_{DOX}}{C_{DOX}^{max}} \quad (4)$$

$$\xi_\infty = \frac{\overline{C_{DOX}}}{C_{DOX}^{max}} \quad (5)$$

$$\ln(\xi_\infty - \xi) = \ln\xi_\infty - (k_1 + k_{-1})t \quad (6)$$

Также в момент равновесия, очевидно, справедливо уравнение (7) для константы равновесия (K) [200,203].

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{\overline{C_{DOX}}}{C_{IDOX}} = \frac{\overline{C_{DOX}}}{C_{DOX}^{max} - \overline{C_{DOX}}} = \frac{\xi_\infty}{1 - \xi_\infty} \quad (7)$$

Экспериментальное определение ξ_{∞} позволяет рассчитать по уравнению (7) непосредственно K , т.е. определить отношение $\frac{k_1}{k_{-1}}$. Причем $k = k_1 + k_{-1} = -tga$ также подлежит экспериментальному определению по угловому коэффициенту (tga) линейных зависимостей « $\ln(\xi_{\infty} - \xi) - t$ ». При вычислении ξ , доксорубицин в воде за пределами диализной мембраны считался высвободившимся, причем объем раствора за пределами диализной мембраны значительно превышал объем раствора в диализном мешке, а перенос лекарства сквозь мембрану принимали быстрым процессом.

После решения описанной системы уравнений возможен расчет констант скоростей высвобождения и ионного связывания лекарства по уравнениям (8) и (9) соответственно, а также константы k'_{-1} согласно уравнению (10) [203].

$$k_1 = \frac{kK}{1+K} \quad (8)$$

$$k_{-1} = \frac{k}{1+K} \quad (9)$$

$$k'_{-1} = \frac{k_{-1}}{C_{COOH}} = \frac{k}{(1+K)C_{COOH}} \quad (10)$$

Таким образом, кинетика высвобождения доксорубицина подчиняется тем же закономерностям, что и обратимые химические реакции первого порядка. Следует также отметить, что ранее упомянутое уравнение 1, записанное через величины оптических плотностей, аналогично выведенному уравнению (6).

Электростатическую иммобилизацию протонированного доксорубицина гидрофильной короной агрегатов и исследование кинетики его высвобождения проводили в соответствии с методикой, описанной в пункте 2.5 [203].

Увеличение мольной доли остатков АК в амфифильном сополимере ВП с АК приводило к значительному уменьшению скорости и величины ξ_{∞} (рисунок 48) [203]. Экспериментальные данные для высвобождения модельного лекарства в присутствии амфифильных сополимеров ВП с АК различного состава, подчиняются выведенному уравнению (6), о чем свидетельствует удовлетворительная линейность, наблюдаемая при построении графика « $\ln(\xi_{\infty} - \xi) - t$ » (рисунок 49) [203].

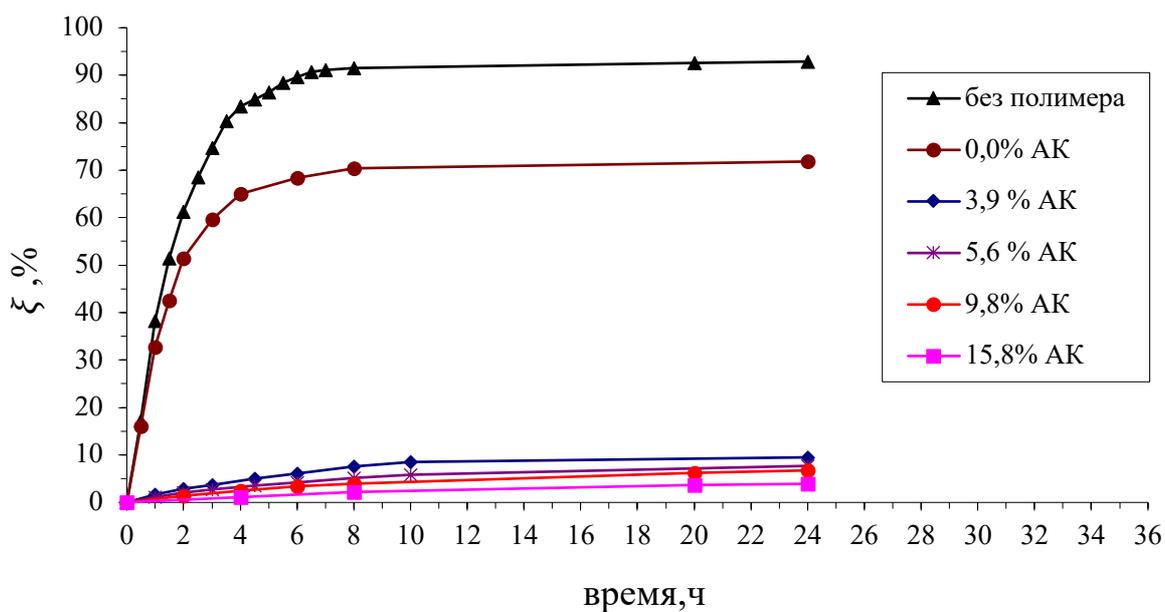


Рисунок 48 – Зависимости “ $\xi - t$ ”, для высвобождения доксорубицина в отсутствие полимера, в присутствии амфифильного гомополимера и в присутствии амфифильных сополимеров ВП с АК с различной мольной долей АК (рН = 7) [203]

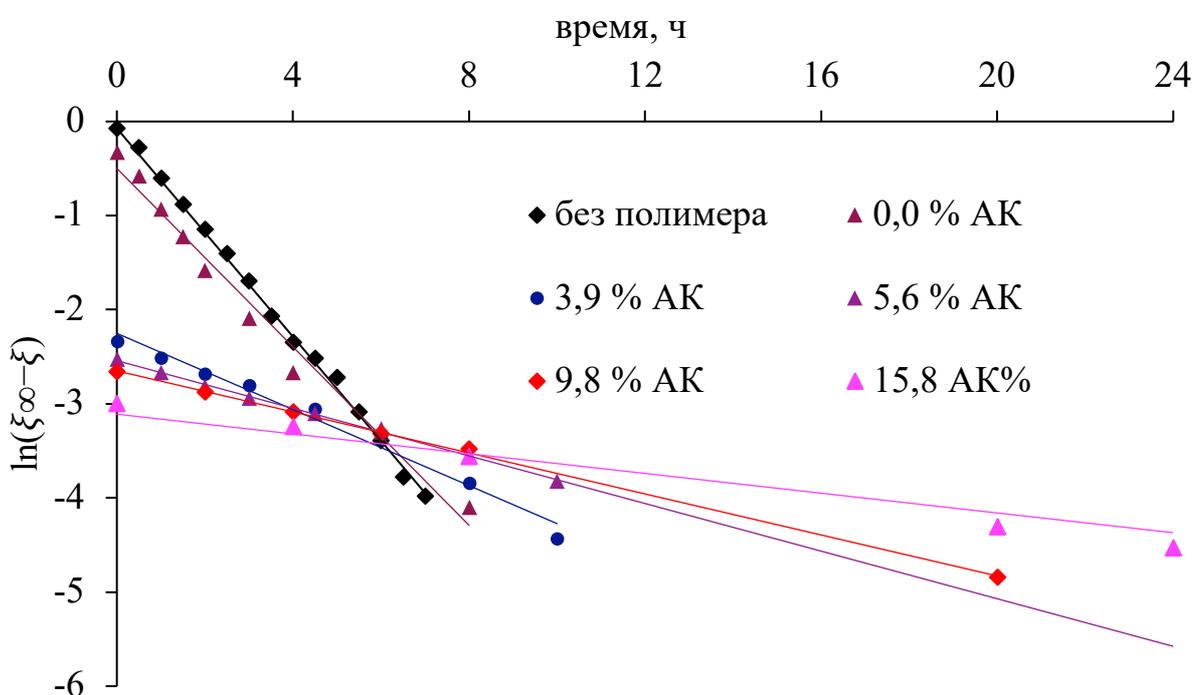


Рисунок 49 – Зависимости “ $\ln(\xi_{\infty} - \xi) - t$ ” для высвобождения доксорубицина в присутствии агрегатов амфифильных сополимеров ВП с АК, с различным содержанием остатков АК (рН = 7) [203]

Рассчитанные константы k_1 и k_{-1} при концентрации амфифильных сополимеров ВП с АК 10 г/л различного состава цепи, суммированы в таблице 7 [203].

Таблица 7 – Значения k_1 и k_{-1} для высвобождения доксорубицина в присутствии амфифильных сополимеров ВП с АК различного состава (концентрация амфифильного сополимера 10 г/л, 37°C, pH = 7) [203].

Мольная доля остатков АК в составе сополимера	3,9 мол.%	5,6 мол.%	9,8 мол.%	15,8 мол.%
$k_1, \text{ч}^{-1}$	0,0165	0,0103	0,00758	0,0028
$k_{-1}, \text{ч}^{-1}$	0,153	0,118	0,101	0,053

Профиль высвобождения модельного лекарства обнаруживал зависимость от концентрации амфифильного сополимера ВП с АК в системе при сохранении неизменного состава цепи (содержание остатков АК 3,9 мол.%). Увеличение концентрации сополимера приводило к уменьшению скорости высвобождения доксорубицина и величины ξ_{∞} (рисунок 50) при сохранении линейности графиков “ $\ln(\xi_{\infty} - \xi) - t$ ” (рисунок 51) [203].

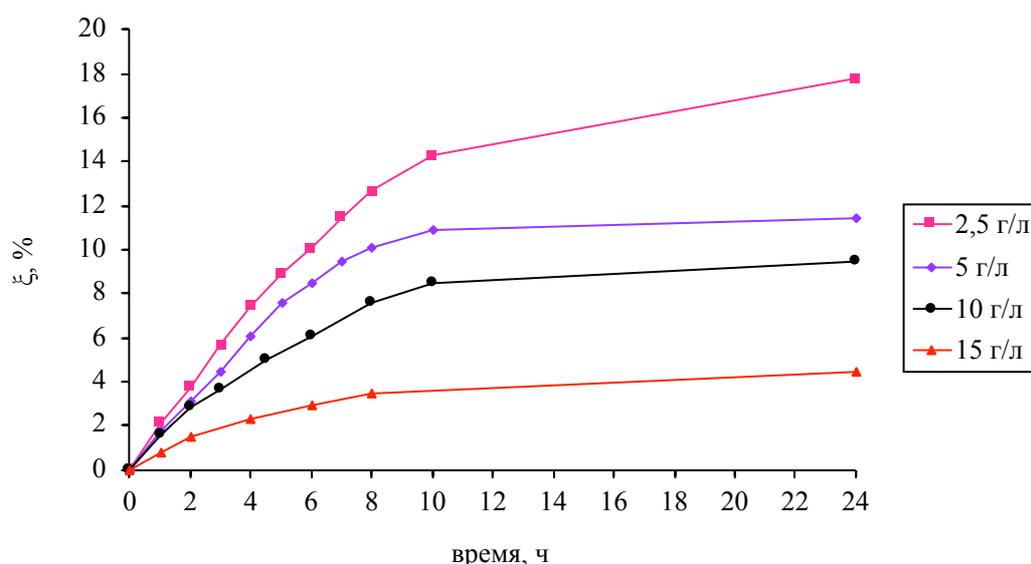


Рисунок 50 – Зависимости “ $\xi - t$ ”, для высвобождения доксорубицина в присутствии амфифильных сополимеров ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) различной концентрации (pH = 7) [203]

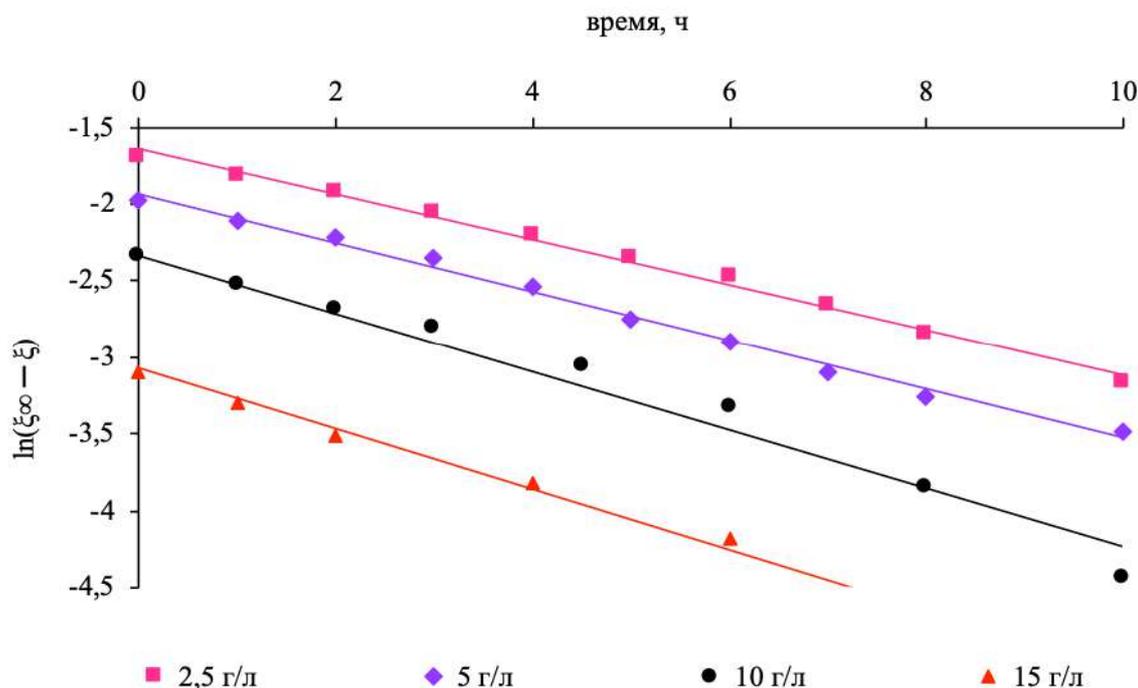


Рисунок 51 – Зависимости “ $\ln(\xi_{\infty} - \xi) - t$ ” для высвобождения доксорубина в присутствии агрегатов амфифильных сополимеров ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) различной концентрации (рН = 7) [203]

Рассчитанные константы k_1 и k_{-1} в присутствии сополимеров ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) различной концентрации в водном растворе, суммированы в таблице 8 [203].

Таблица 8 – Значения k_1 и k_{-1} для высвобождения модельного лекарства в присутствии амфифильных сополимеров ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) различной концентрации в водном растворе (температура 37°C, рН = 7) [203].

Концентрация сополимера, г/л	2,5	5	10	15
$k_1, \text{ч}^{-1}$	0,0256	0,0216	0,0165	0,0088
$k_{-1}, \text{ч}^{-1}$	0,113	0,133	0,153	0,186

Следовательно, независимо от того, чем вызвано увеличение концентрации карбоксильных групп в растворе, увеличением концентрации амфифильного сополимера ВП – АК постоянного состава или увеличением содержания остатков АК в цепи при неизменной концентрации сополимера, отмечается уменьшение

k_1 . Этот результат очевидно связан с увеличением плотности отрицательного заряда для агрегатов цепей амфифильных сополимеров ВП с АК. Примечательно, что k_1 уменьшается быстрее при увеличении концентрации сополимера в растворе, чем при увеличении мольной доли АК в составе амфифильного сополимера той же концентрации (рисунок 52). Это обстоятельство, вероятно, связано с электростатическим отталкиванием одноименно заряженных катионов протонированного доксорубина расположенных на меньших расстояниях друг от друга при увеличении концентрации карбоксильных групп в составе полимерных цепей, чем при увеличении концентрации сополимеров ВП с АК постоянного состава [203].

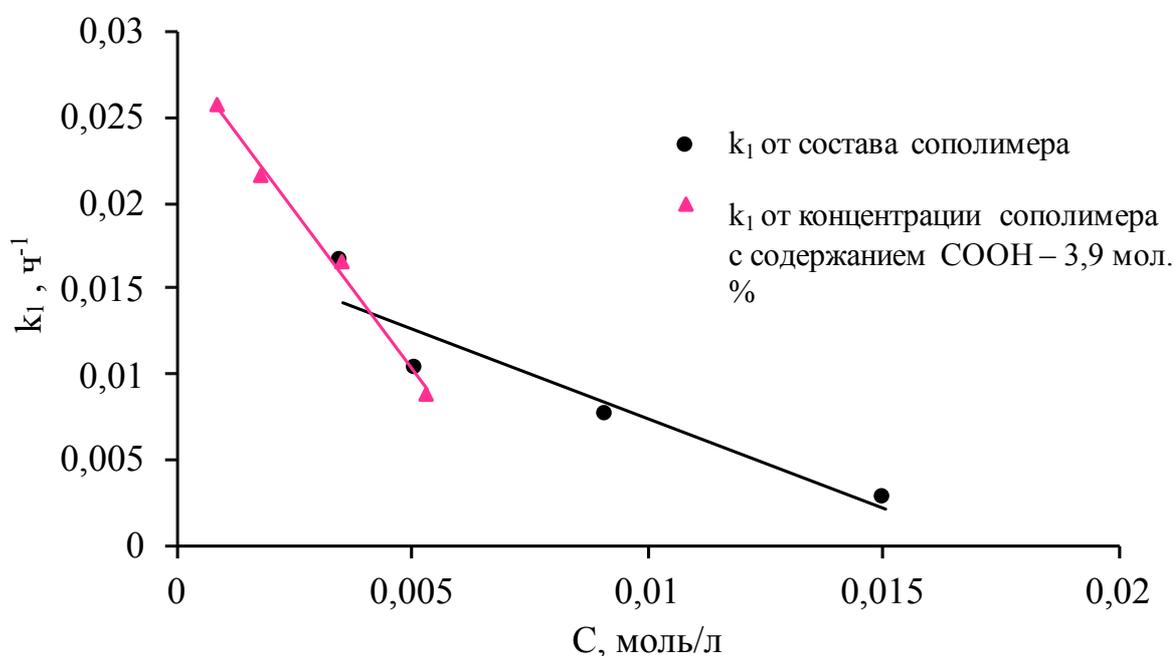


Рисунок 52 – Зависимость k_1 от концентрации остатков акриловой кислоты в растворе ($\text{pH} = 7$) [203]

Так как с ростом концентрации ионизированных карбоксильных групп возрастает pK_a слабых поликислот (константа диссоциации убывает) вследствие увеличения электростатического притяжения протонов в результате роста плотности отрицательного заряда, то способность карбоксильных групп амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой к протонированию основной формы доксорубина (рисунок 47) также убывает с

ростом концентрации ионизированных карбоксильных групп (C_{COO^-}), что проявляется в убыли константы скорости связывания k'_{-1} с увеличением концентрации C_{COO^-} . С другой стороны, в буферных растворах полиэлектролитов $C_{COO^-} \sim C_{COOH}$ (так как $pK_a + \Delta pK_a = pH - \lg \left(\frac{C_{COO^-}}{C_{COOH}} \right)$ и $C_{COO^-} = C_{COOH} 10^{pH - pK_a - \Delta pK_a}$, ΔpK_a – прирост pK_a вследствие диссоциации полиэлектролита). Таким образом, можно ожидать, что константа скорости связывания (k'_{-1}) должна убывать с ростом концентрации карбоксильных групп в системе (C_{COOH}), причем последнее предположение согласуется с экспериментальными данными (рисунок 53).

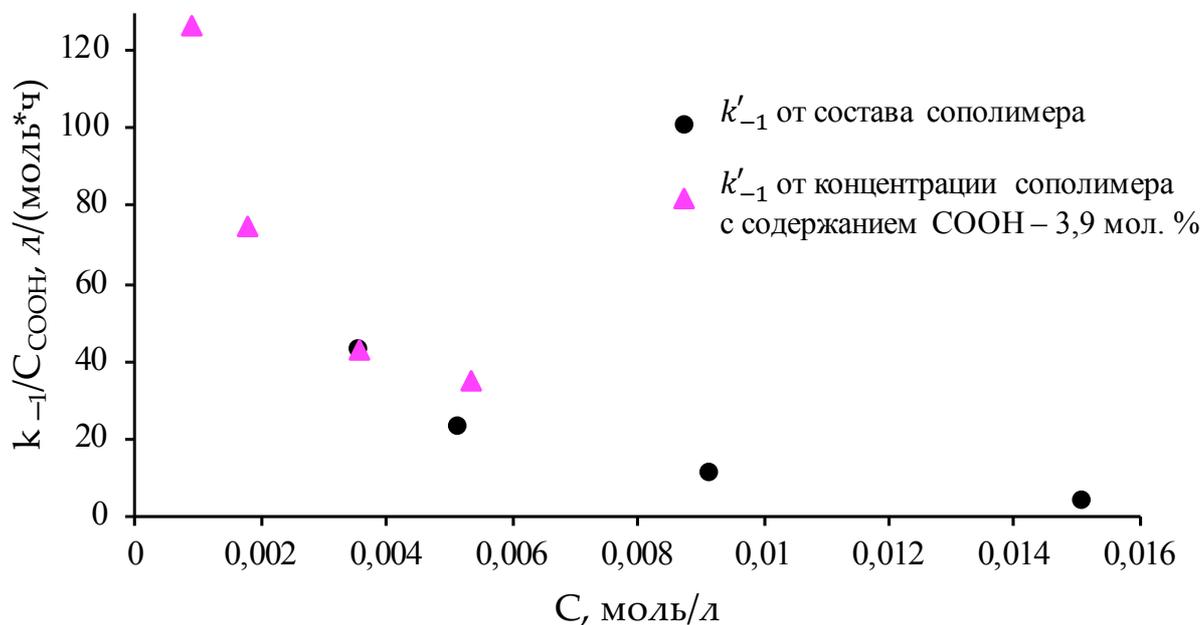


Рисунок 53 – Зависимость $k'_{-1} = \frac{k_{-1}}{C_{COOH}}$ от концентрации остатков акриловой кислоты в растворе ($C = C_{COOH}$) ($pH = 7$) [203]

Увеличение температуры приводило к приросту скорости высвобождения модельного лекарства, а также к увеличению ξ_{∞} (рисунок 54 и 55). Константы скоростей k_1 и k_{-1} при различных температурах были определены по графикам “ $\ln(\xi_{\infty} - \xi) - t$ ” в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л (рисунок 56 и 57) [203].

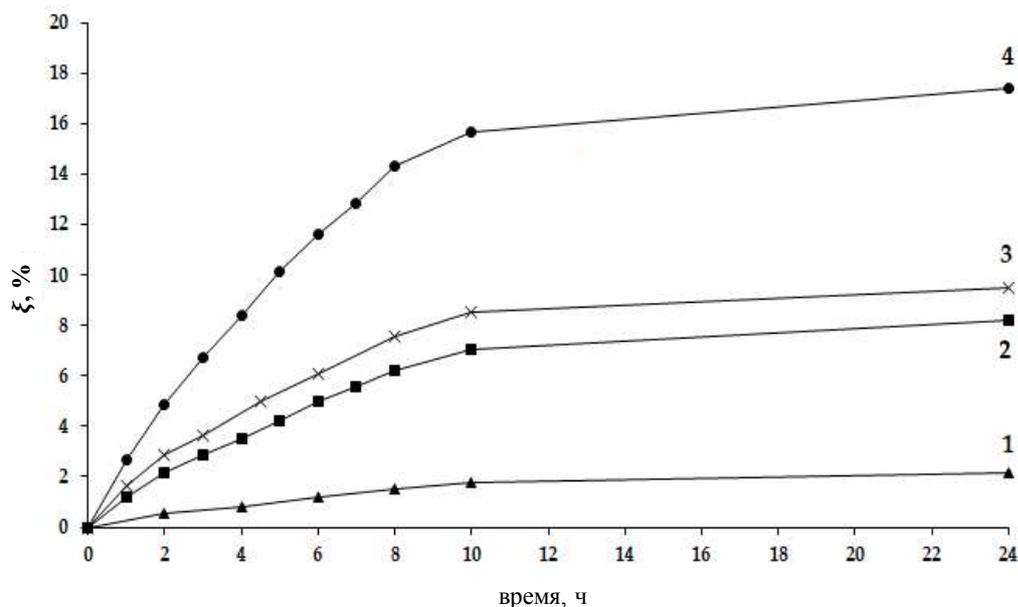


Рисунок 54 – Зависимости “ $\xi - t$ ”, для высвобождения доксорубицина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л при температурах: 1 – 5 °C; 2 – 25 °C; 3 – 37 °C; 4 – 50 °C (pH = 7) [203]

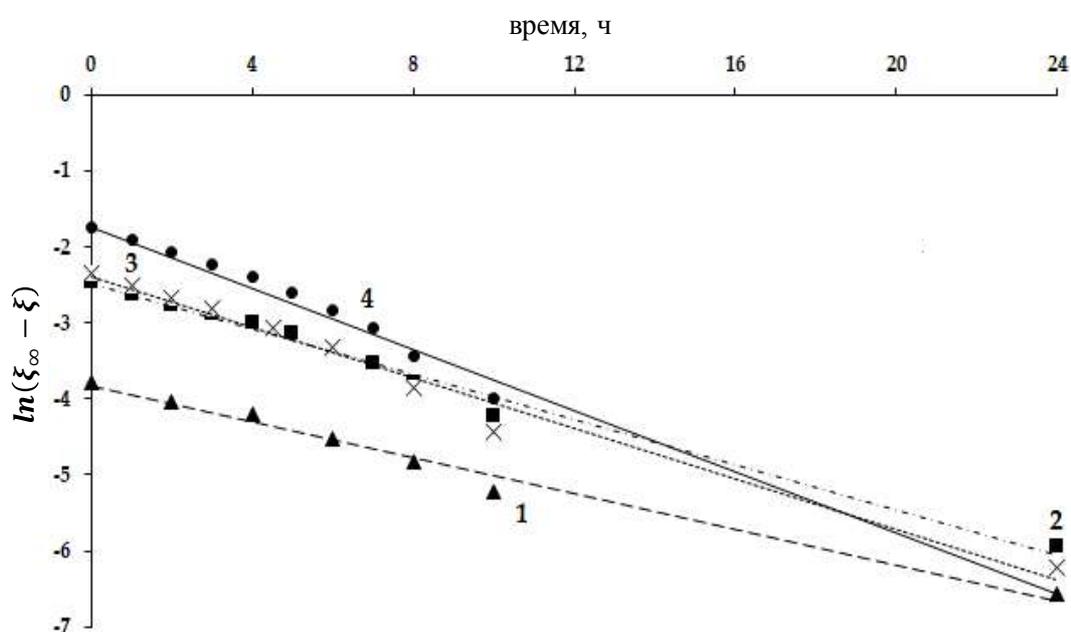


Рисунок 55 – Зависимости “ $\ln(\xi_{\infty} - \xi) - t$ ”, для высвобождения доксорубицина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л при температурах: 1 – 5 °C; 2 – 25 °C; 3 – 37 °C; 4 – 50 °C (pH = 7) [203]

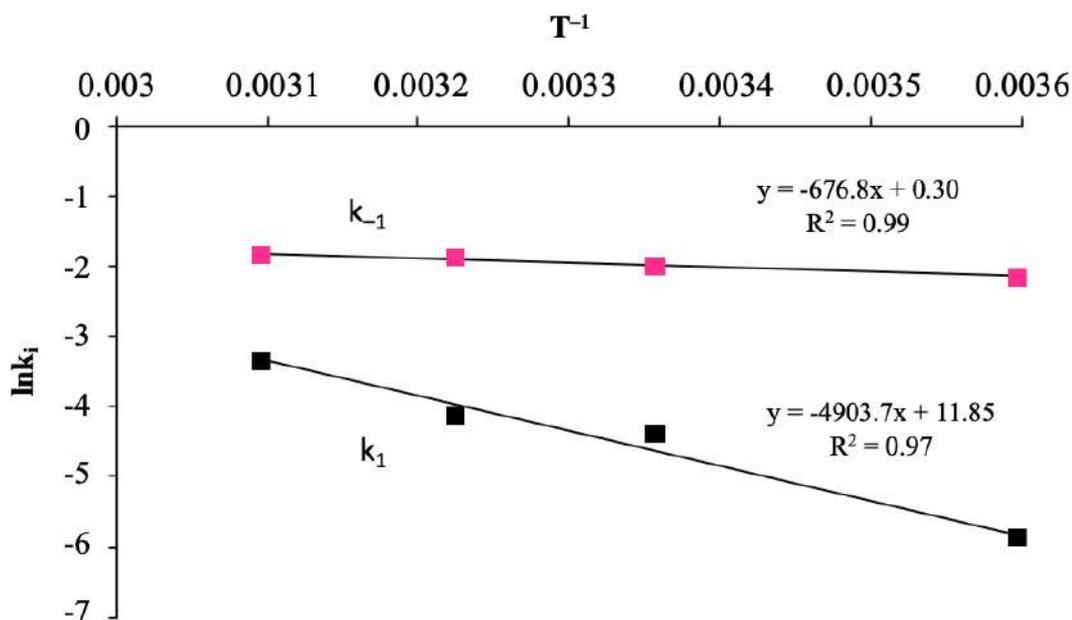


Рисунок 56 – Зависимости " $\ln k_1 - 1/T$ " и " $\ln k_{-1} - 1/T$ " для высвобождения доксорубицина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л при разных температурах (pH = 7) [203]

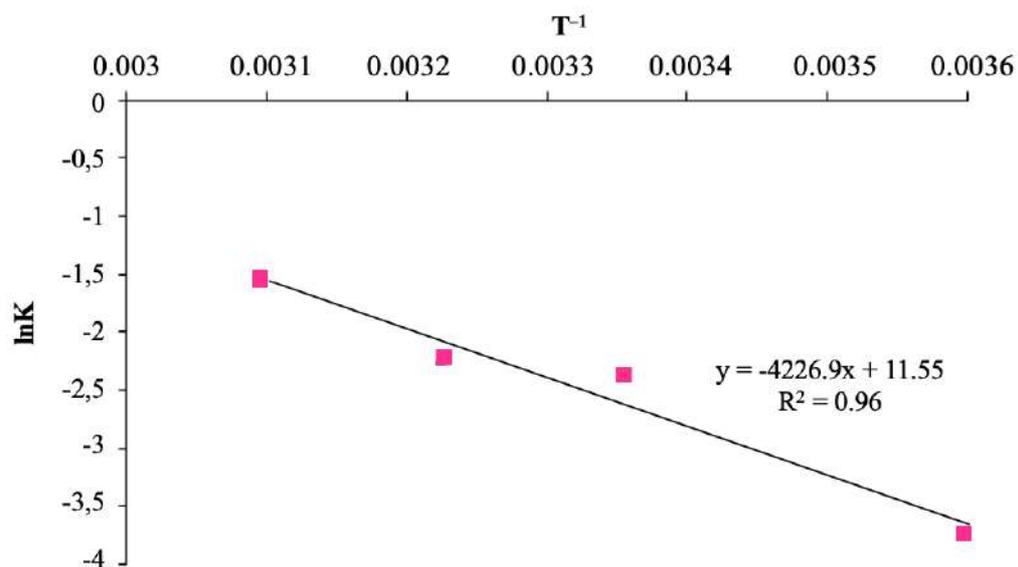


Рисунок 57 – Зависимость " $\ln K$ vs. $1/T$ " – (Γ) для высвобождения доксорубицина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л при разных температурах (pH = 7) [203]

Константы k_1 и k_{-1} , определенные для различных температур сведены в таблицу 9 [203].

Таблица 9 – Константы скорости k_1 и k_{-1} для высвобождения модельного лекарства при различных температурах в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л (рН = 7) [203].

Температура эксперимента	5 °С	25 °С	37 °С	50 °С
$k_1, \text{ч}^{-1}$	0,0028	0,0127	0,0165	0,0352
$k_{-1}, \text{ч}^{-1}$	0,119	0,137	0,153	0,166

Энергия активации процесса высвобождения электростатически иммобилизованного доксорубина значительна и составляет приблизительно 40,7 кДж/моль, в то время как связывание доксорубина происходит с небольшой энергией активации приблизительно 5,6 кДж/моль. Таким образом, константа равновесия должна увеличиваться с ростом температуры, что наблюдается в действительности (рисунок 57). Кроме того, стандартная энтальпия для равновесного высвобождения лекарства составляет около 35 кДж/моль и может быть определена непосредственно по угловому коэффициенту зависимости “ $\ln K$ vs. $1/T$ ” или как разность энергий активации высвобождения и связывания доксорубина. Линейность графика “ $\ln K$ vs. $1/T$ ”, представленного на рисунке 57, указывает на минимальную зависимость стандартной энтальпии от температуры в исследованном интервале от 5 до 50°С. Стандартная энергия Гиббса для высвобождения модельного лекарства может быть рассчитана по уравнению изотермы Вант-Гоффа (11) для каждой температуры [203]

$$\Delta G_T^0 = -RT \ln K \quad (11)$$

С учетом известных ΔG_T^0 и ΔH_T^0 для каждой температуры можно рассчитать ΔS_T^0 по уравнению (12) [203].

$$\Delta S_T^0 = \frac{\Delta H_T^0 - \Delta G_T^0}{T} \quad (12)$$

ΔS_T^0 почти не зависит от температуры при ее варьировании в интервале от 5 до 50 °С и равна 98 Дж/(моль*К) [203].

Так как ΔH_T^0 и ΔS_T^0 почти не зависят от температуры в интервале от 5 °С до 50 °С, то ΔG_T^0 убывает почти линейно с увеличением температуры (рисунок 58) [203]. Значительное увеличение энтропии при высвобождении лекарства можно связать с депротонированием протонированной формы доксорубицина, которое сопровождается исчезновением заряженных ионов, способствующих структурированию молекул воды посредством ион-дипольных взаимодействий. Положительная стандартная энтальпия высвобождения лекарства также указывает на депротонирование солевой формы доксорубицина и характерна для диссоциации солей аминов [203].

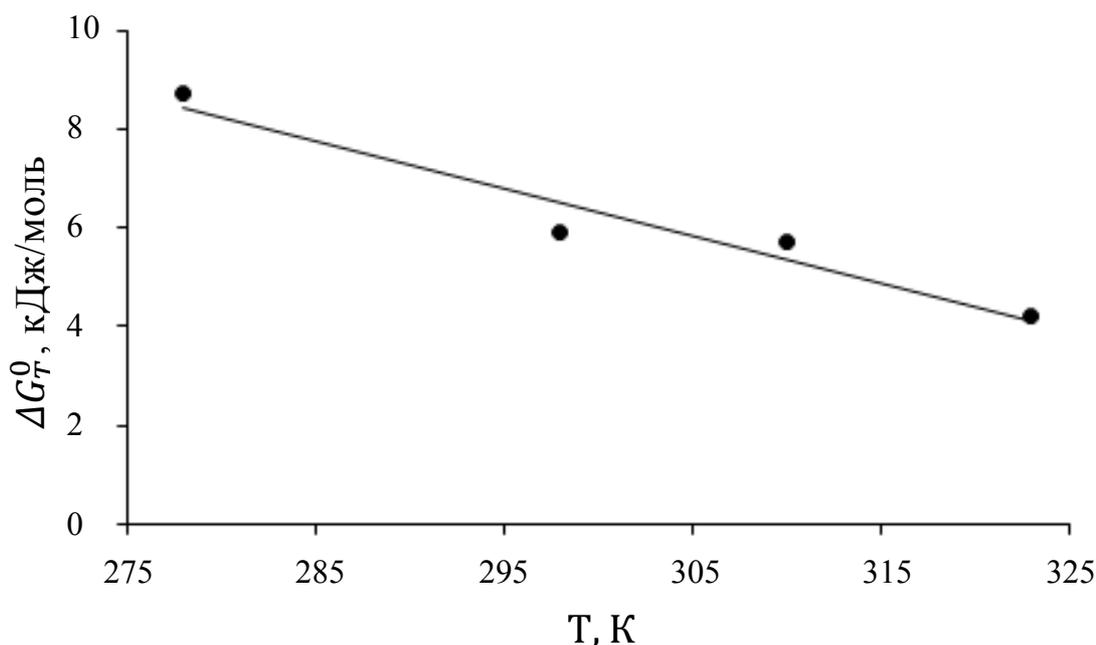


Рисунок 58 – Зависимость " $\Delta G_T^0 - T$ " для высвобождения доксорубицина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) и АК (3,9 мол.%) (рН = 7) [203]

Все приведенные выше экспериментальные данные были получены в среде буферного раствора с нейтральным рН. При этом переход как в кислую, так и в щелочную область рН приводит к ускорению высвобождения доксорубицина.

Скорость высвобождения доксорубина в кислой (рН=4) и щелочной (рН=9) среде была выше, чем скорость высвобождения в среде с рН=7 (рисунок 59 и 60). Константы скорости высвобождения (k_1) и связывания (k_{-1}) доксорубина в присутствии амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с содержанием карбоксильных групп 3.9 мол.% в концентрации 10 г/л представлены в таблице 10 [203].

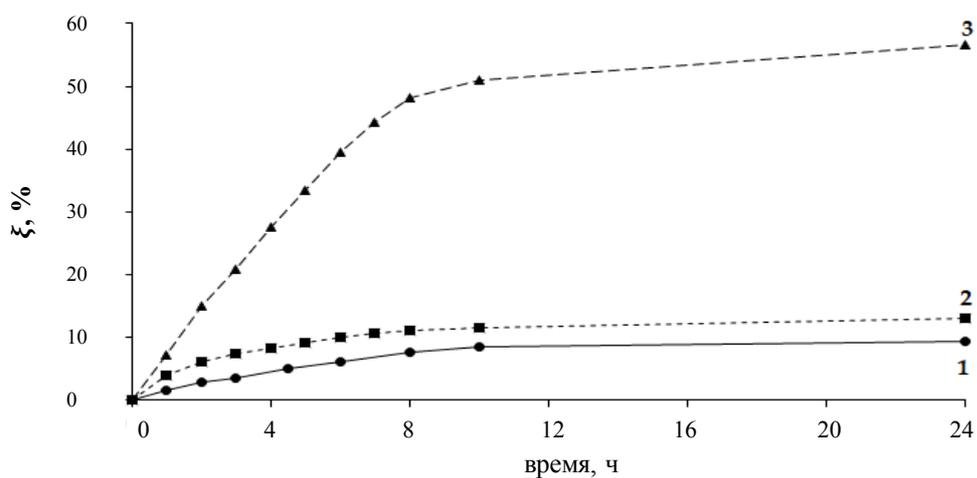


Рисунок 59 – Зависимости “ $\xi - t$ ” для высвобождения доксорубина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) с АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л при температуре 37 °С и рН равных: 1 – 7; 2 – 9; 3 – 4 [203]

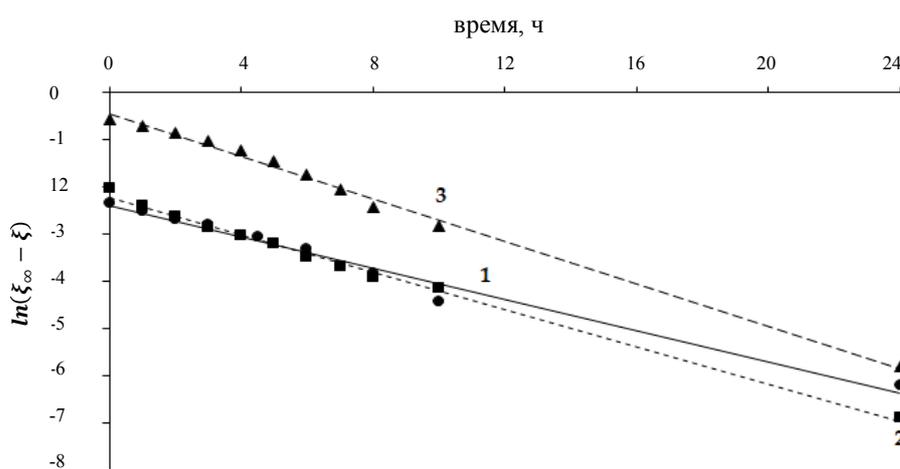


Рисунок 60 – Зависимость “ $\ln(\xi_{\infty} - \xi) - t$ ” для высвобождения доксорубина в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) и АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л при температуре 37 °С и рН равных: 1 – 7; 2 – 9; 3 – 4 [203]

Таблица 10 – Константы скорости k_1 и k_{-1} для высвобождения модельного лекарства при температуре 37 °С и различных рН среды в присутствии амфифильного сополимера ВП (96,1 мол.%) и АК (3,9 мол.%) с концентрацией в водном растворе 10 г/л [203].

рН буферного раствора (Т = 37 °С)	4	7	9
$k_1, \text{ч}^{-1}$	0,0282	0,0127	0,0165
$k_{-1}, \text{ч}^{-1}$	0,185	0,137	0,153

Если в нейтральной среде, как следует из термодинамических данных, высвобождается нейтральная молекула доксорубина, то в щелочной среде эта форма тем более должна преобладать, так как карбоксильные группы находятся в форме карбоксилат-анионов. Напротив, в кислой среде следует ожидать вытеснения катионов доксорубина из соответствующих поликарбоксилатов с образованием преимущественно неионизированных карбоксильных групп. Таким образом, предполагаемая схема высвобождения доксорубина при различных рН, приведена на рисунке 61 [203].

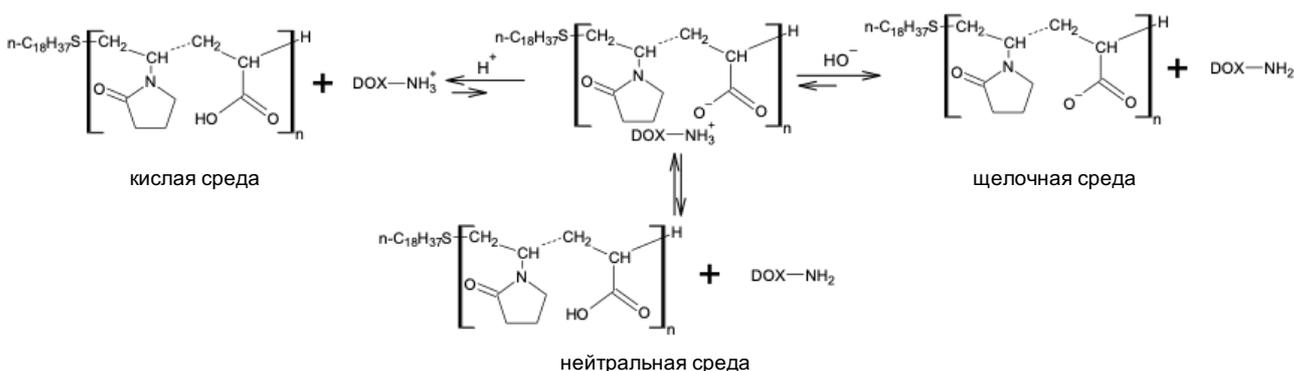


Рисунок 61 – Высвобождение электростатически иммобилизованного доксорубина в различных средах

Такой профиль скорости высвобождения доксорубина в зависимости от кислотности среды может быть эффективно использован в терапии некоторых онкологических заболеваний. Известно, что по сравнению с нормальными клетками, для многих раковых клеток характерны более низкое значение рН в их

микроокружении и более высокая интенсивность метаболических процессов, в частности, повышенная скорость эндоцитоза [218,219]. Поскольку в эндосомах рН среды составляет 4-5 [220], можно ожидать, что повышенная скорость высвобождения доксорубина в кислой среде (рисунок 59) в сочетании с повышенной интенсивностью эндоцитоза и накоплением частиц в раковых клетках за счет EPR эффекта, может обеспечить селективность воздействия полученной лекарственной формы на целевые клетки. В целом, для скорости высвобождения доксорубина, электростатически связанного с носителем, характерна высокая чувствительность к кислотности среды, как это было отмечено при электростатической иммобилизации доксорубина на поверхности наночастиц золота, стабилизированных полисахаридами [221,222].

Время, необходимое для достижения равновесного высвобождения доксорубина, электростатически иммобилизованного агрегатами амфифильных сополимеров ВП с АК, было близко к определенному в ряде других работ, например, при иммобилизации доксорубина на стабилизированных пектином наночастицах золота [221] или при использовании микроэмульсий в качестве носителей [223,224]. При использовании пегилированного сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА-ПЭГ) в качестве носителя, время, необходимое для достижения равновесного высвобождения лекарства было значительно больше, причем в начальный момент времени наблюдалось импульсное высвобождение около 20% фармакологически активного вещества, что затрудняет применение подобных систем [216]. Полученные данные (рисунок 48, 50, 59) свидетельствуют о том, что при использовании амфифильных сополимеров ВП с АК импульсного высвобождения лекарственного средства в начальный момент времени не наблюдается. Последнее обстоятельство выгодно отличает разработанные амфифильные сополимеры ВП с АК от аналогов на основе ПЛГА-ПЭГ, признанных «золотыми стандартами» систем доставки фармакологически активных веществ.

(Материалы, описанные в разделе 3.5, отражены в публикациях Kuskov A.N. Kinetics and mechanism of synthesis of carboxyl-containing N-vinyl-2-pyrrolidone telechelics for pharmacological use / A.N. Kuskov, A.L. Luss, I.A. Gritskova, M.I. Shtilman, M.V. Motyakin, I.I. Levina, **A.M. Nechaeva**, O.Y. Sizova, A.M. Tsatsakis, Y.O. Mezhuev // *Polymers*. – 2021. – V. 13. – № 15. – P. 2569. и Artyukhov A.A. Nanoaggregates of Biphilic Carboxyl-Containing Copolymers as Carriers for Ionically Bound Doxorubicin / A.A. Artyukhov, **A.M. Nechaeva**, M.I. Shtilman, E.M. Chistyakov, A.Y. Svistunova, D.V. Bagrov, A.N. Kuskov, A.O. Docea, A.M. Tsatsakis, L. Gurevich, Y.O. Mezhuev // *Materials*. – 2022. – V. 15. – № 20. – P. 7136.)

3.6 Комплексы амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с бычьим сывороточным альбумином (БСА)

Возможной областью применения амфифильных сополимеров ВП с АК может стать не только терапия социально-значимых заболеваний, таких как онкология, но и их диагностика. В этом отношении интерес представляет возможность образования устойчивых комплексов сополимеров ВП с АК с макромолекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА). При ультразвуковой обработке таких комплексов формируются микропузырьки (МП) – полые сферы размером в несколько микрон с гибридной полимер-белковой оболочкой, наполненные воздухом.

Микропузырьки являются регулярно используемыми контрастными агентами для ультразвуковой диагностики широкого спектра заболеваний и патологий строения тканей и органов [225]. Усиление эхосигнала при использовании микропузырьков достигается за счет изменения взаимодействия ткани исследуемой области и ультразвуковых колебаний. Увеличивая число отражающих поверхностей, микропузырьки влияют на скорость распространения ультразвука и рассеивают его энергию в разных направлениях, что приводит к возрастанию акустического отклика, регистрируемого от тканей и увеличению контрастности изображения [226]. Также известно, что

определенная интенсивность ультразвука способна воздействовать на клеточную мембрану, приводя к образованию в ней микроскопических пор [227]. Одновременно с этим, индуцированная ультразвуком кавитация микропузырьков оказывает механическое воздействие на окружающие ткани, стимулируя, например, временное разрушение плотных контактов между эндотелиальными клетками гистогематического барьера [228]. Совокупность этих динамических процессов приводит к обратимому повышению проницаемости клеточных мембран. Таким образом, применение микропузырьков не ограничивается диагностикой патологических состояний, и может быть эффективно использовано для усиления проникновения лекарственных препаратов в ткани при их одновременном использовании.

МП представляют собой стабильные при физиологических условиях коллоидные системы, дисперсной фазой которых являются газонаполненные пузырьки с диаметрами, сопоставимыми с диаметром человеческих эритроцитов (1-10 мкм). Оболочка микропузырьков как правило состоит из липидов, белков и полимеров, а их внутренняя полость заполнена воздухом или другим биосовместимым газом [225]. Человеческий и гомологичный ему бычий сывороточный альбумин являются наиболее хорошо изученным и часто используемым материалом для получения оболочки микропузырьков [229–232]. Белковая оболочка одновременно эластичная и достаточно прочная, чтобы удерживать газ внутри пузырька, а ее химическая структура определяет возможность прививки векторных или терапевтических молекул [230,233]. Основным ограничением альбуминовых микропузырьков является их быстрый клиренс, связанный с распознаванием белка системой мононуклеарных фагоцитов и его уязвимостью перед протеолитическими ферментами. Конъюгация с синтетическими гидрофильными полимерами является известным способом увеличения стабильности и времени циркуляции белковых препаратов *in vivo* [139,234,235]. Таким образом, получение устойчивых комплексов альбумина и сополимера ВП с АК является актуальной задачей биомедицинского материаловедения.

Амфифильный гомополимер N-винил-2-пирролидона, не содержащий карбоксильных групп в макромолекулярной цепи был не способен образовывать конъюгаты с БСА, в то время как введение уже небольших количеств (до 10 мол.%) остатков акриловой кислоты в цепь сополимера приводило к формированию устойчивых комплексов [236]. Значительное увеличение аффинности амфифильного сополимера ВП с АК к БСА, по всей видимости, связано с образованием ионных связей между карбоксильными группами остатков акриловой кислоты и катионными участками белка, содержащего остатки основных аминокислот, таких как лизин и аргинин.

Комплексы между БСА и амфифильным сополимером ВП с АК (содержание остатков акриловой кислоты в сополимере 9,8 мол.%; $\overline{M}_n = 18000$; концевая группа = $C_{18}H_{37}S-$) синтезировали в водном растворе при 50°C в течение 1 часа. Общая концентрация двух компонентов в растворе составляла 52,5 г/л, при массовых соотношениях белка и сополимера 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:5, 1:10, и 1:15 соответственно [236]. Для формирования микропузырьков полученные растворы обрабатывали ультразвуком в соответствии с методикой, описанной в работах научного коллектива лаборатории Биофотоники Сколковского Института Науки и Технологий [182,237]. Схематическое изображение процесса представлено на рисунке 62. Суммарная концентрация реагентов 5 масс.% обеспечивала необходимую для формирования микропузырьков вязкость раствора. Увеличение концентрации реагентов в растворе сверх 5 масс.% приводило к образованию гелей и препятствовало формированию микропузырьков. Таким образом, все приведенные экспериментальные данные получены при использовании для синтеза микропузырьков растворов комплексов с общей массовой концентрацией реагентов 5 масс.% при различном соотношении БСА и амфифильного сополимера ВП с АК [236].

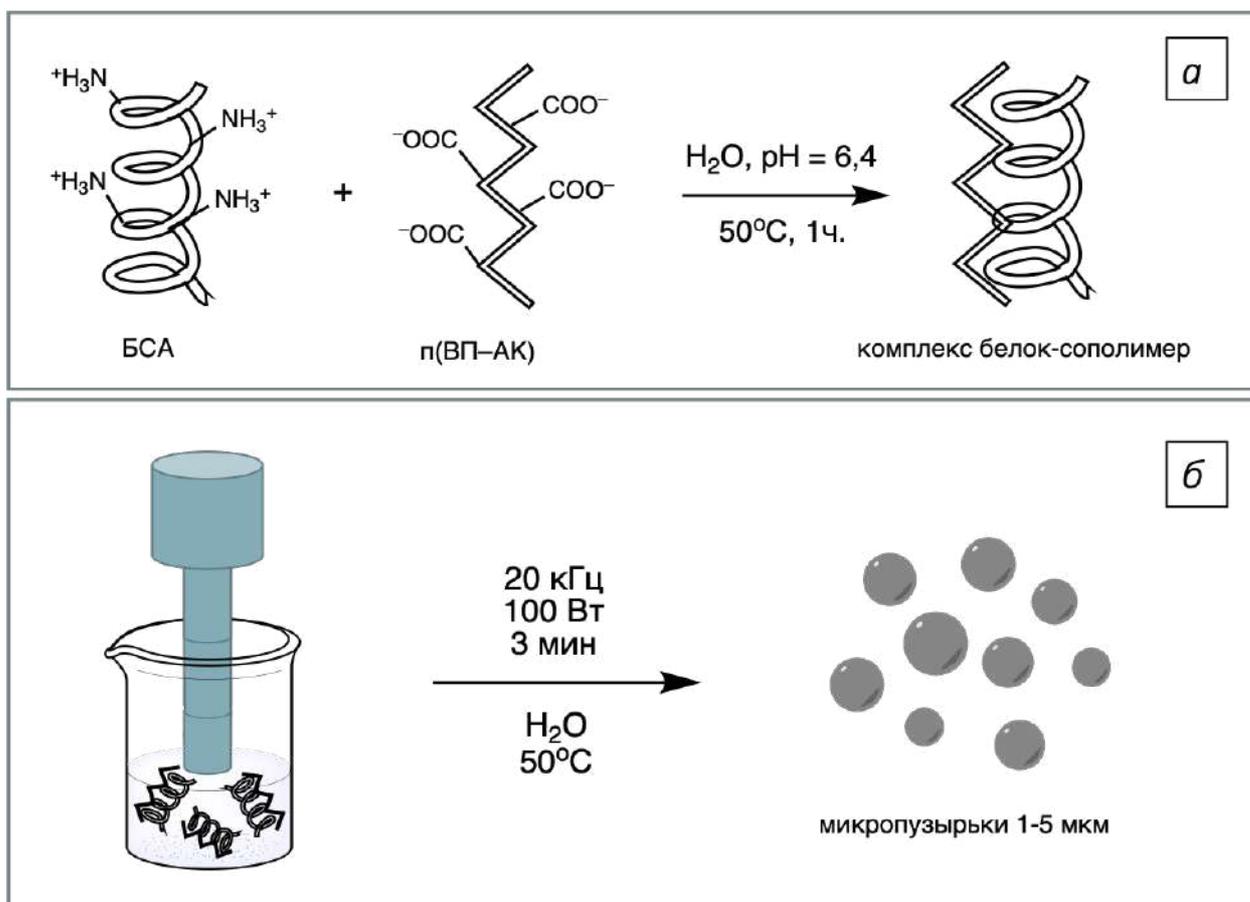


Рисунок 62 – Схематическое изображение процесса синтеза комплексов белок-сополимер (а) и микропузырьков с гибридной оболочкой на их основе (б)

Возможность получения микропузырьков обеспечивается, в частности, снижением поверхностного натяжения на границе раздела жидкость-газ [238–240], поэтому для определения подходящих для формирования микропузырьков соотношения реагентов необходимо было определить этот параметр и оценить его зависимость от соотношения БСА и амфифильного сополимера ВП с АК. Зависимость поверхностного натяжения раствора от соотношения БСА и амфифильного сополимера ВП с АК, представлена на рисунке 63 [236].

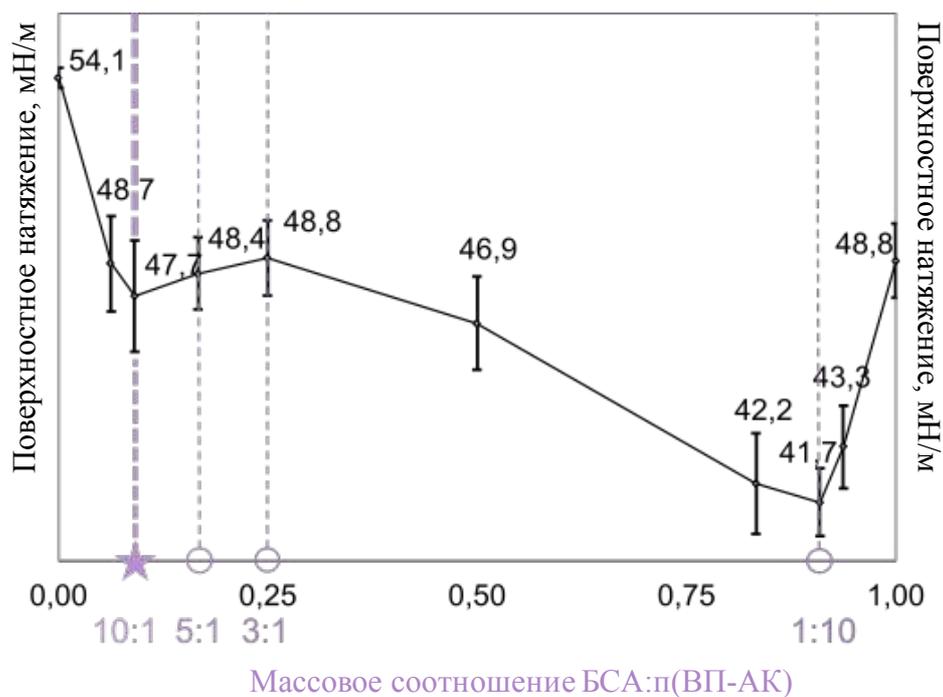


Рисунок 63 – Зависимость поверхностного натяжения от состава растворов комплексов белок-полимер [236]

На рисунке 63 можно наблюдать два минимума значения поверхностного натяжения раствора – локальный минимум при массовом соотношении БСА к амфифильному сополимеру ВП с АК 10 : 1, и глобальный, регистрируемый для раствора с соотношением БСА к амфифильному сополимеру ВП с АК 1 : 10. При попытке синтезировать микропузырьки из раствора с концентрацией, соответствующей глобальному минимуму поверхностного натяжения (белок-полимер 1 к 10), в системе наблюдалось интенсивное образование агрегатов размером $\approx 100-200$ нм, препятствующих дальнейшему формированию микропузырьков. В данном случае минимум поверхностного обеспечивается вследствие значительной адсорбции макромолекул амфифильного сополимера ВП с АК на поверхности раздела фаз «жидкость – газ». При массовом соотношении БСА и амфифильного сополимера ВП с АК 10 : 1, соответствующему локальному минимуму поверхностного натяжения, образования мицеллоподобных агрегатов в растворе не наблюдалось, и микропузырьки были успешно сформированы. В целом, диапазон приемлемых соотношений БСА и амфифильного сополимера ВП с АК для формирования

устойчивых микропузырьков варьирует от 10 : 1 до 3 : 1, которые и были использованы в последующих экспериментах [236].

При исследовании интерполимерных комплексов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в режиме линейной записи в широкой области m/z (рисунок 64а) были зарегистрированы сигналы, характерные для исходного БСА, содержащего примеси пепсина, трипсина и протеазы [181,241–243]. При исследовании комплексов в области низких молекулярных масс наблюдались сигналы с разницей m/z , близкой к 111, что практически идентично MALDI-TOF, полученному для чистого амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой (рисунок 64б). Последнее обстоятельство указывает на разрушение интерполимерного комплекса в условиях лазерной десорбции [236].

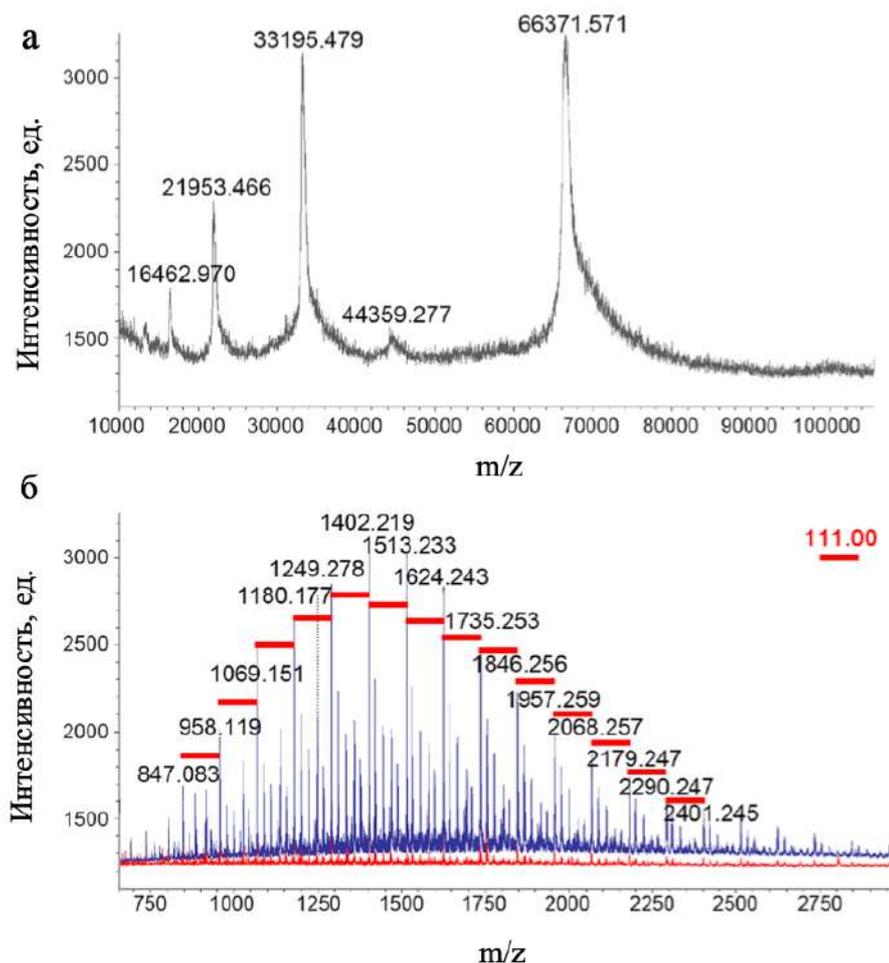


Рисунок 64 – MALDI-TOF масс-спектры: а) интерполимерного комплекса и б) наложение MALDI-TOF масс-спектров чистого сополимера (синяя линия) и комплекса (красная линия) в области низких молекулярных масс [236]

Характерные полосы поглощения амфифильного сополимера ВП с АК, БСА и интерполимерных комплексов сконцентрированы в двух спектральных областях – 1150-1750 и 2850-3350 см^{-1} [199,244,245]. При анализе ИК спектров интерполимерных комплексов, полученных при разных соотношениях исходных компонентов, можно наблюдать (рисунок 66) плавный переход спектра от характерного для БСА к характерному для сополимера ВП с АК. Как видно, полосы валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ уширяются и смещаются, в сторону меньших значений волновых чисел, что характерно при образовании как водородных, так ионных связей (превращение карбоксильной группы в карбоксилат-анион) [236].

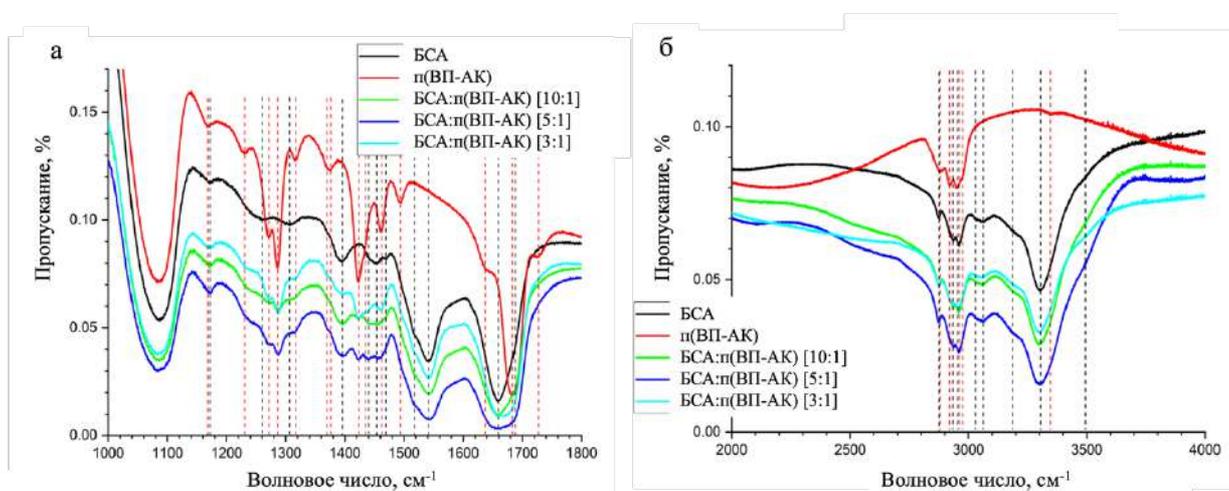


Рисунок 65 – ИК спектры БСА, амфифильного сополимера ВП с АК и их интерполимерных комплексов, полученных при различных соотношениях исходных реагентов [236]

С целью оценить распределение макромолекулярных компонентов в оболочке микропузырьков были подготовлены ковалентно меченный флуоресцеином БСА, меченный родамином 6Ж амфифильный сополимер ВП с АК, получены комплексы и микропузырьки на их основе. На рисунке 66 представлены изображения флуоресцентно меченных микропузырьков, полученные с помощью конфокальной микроскопии. На изображениях отчетливо видно, что оба компонента входят в состав оболочки и распределены в ней равномерно. Если бы БСА и амфифильный сополимер ВП с АК не образовывали интерполимерных комплексов, то наблюдалась бы картина неравномерного распределения флуоресцентных меток, так как специфически

невзаимодействующие макромолекулы термодинамически несовместимы ввиду малой величины энтропии смешения. Таким образом, между БСА и амфифильным сополимером ВП с АК предполагаются специфические экзотермические взаимодействия, так как именно энтальпийный фактор в этом случае может обуславливать отрицательную энергию Гиббса образования интерполимерного комплекса [236].

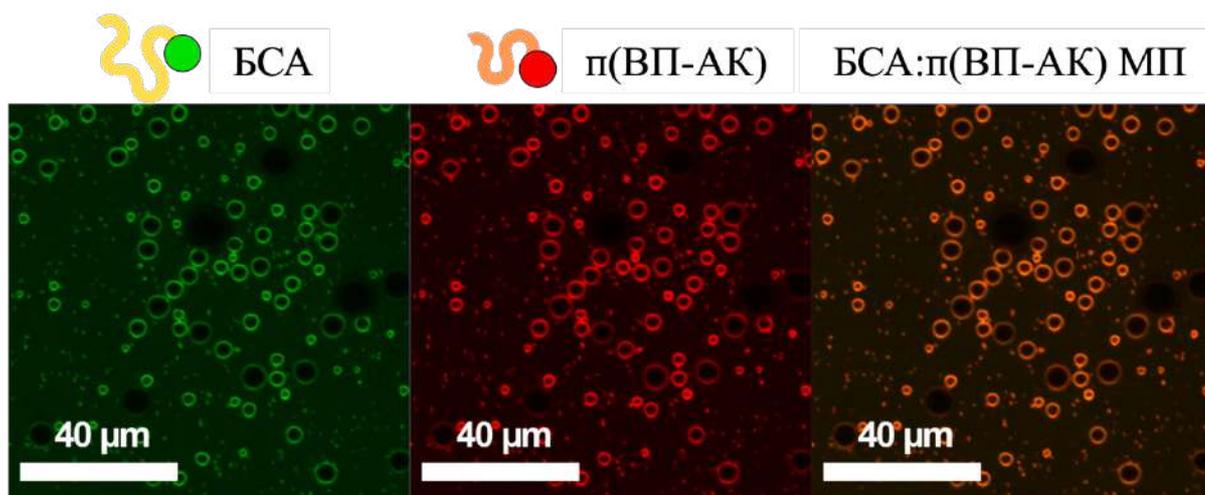


Рисунок 66 – Изображения флуоресцентно-меченных микропузырьков, полученные с помощью конфокальной микроскопии [236]

Концентрацию микропузырьков в растворе и их средний диаметр оценивали с помощью оптической микроскопии в соответствии с методом, описанным в работах [182,237].

Результаты измерения концентрации микропузырьков (рисунок 67) согласуются с результатами измерения поверхностного натяжения (рисунок 63): раствор комплекса с массовым соотношением белка к сополимеру 10 : 1 имел наименьшее значение поверхностного натяжения и приводил к получению самой высокой частичной концентрации микропузырьков ($1,0 \pm 0,35 \cdot 10^{10}$ МП/мл). По мере увеличения значений поверхностного натяжения исходных растворов наблюдалось снижение частичной концентрации МП после синтеза. При этом, концентрация микропузырьков, полученных из комплексов с массовым соотношением белка к сополимеру 10 : 1 была в 100 раз выше, чем концентрация

микропузырьков, полученных из раствора чистого БСА при тех же условиях [236].

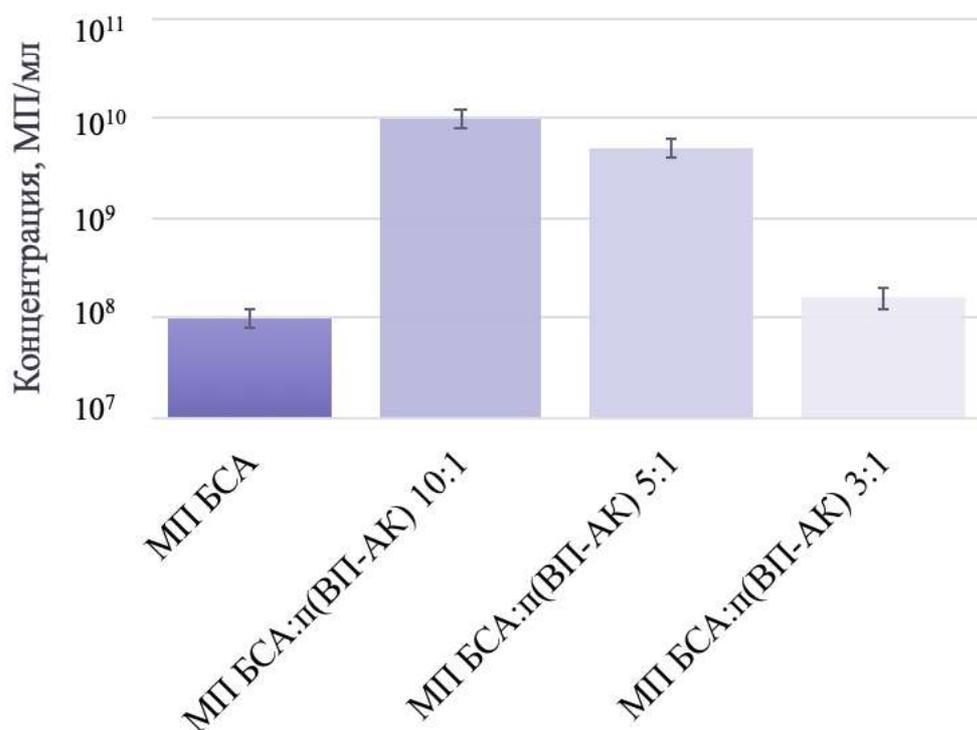


Рисунок 67 – Зависимость концентрации микропузырьков от соотношения БСА и амфифильного сополимера ВП с АК при их получении [236]

По мере увеличения массовой доли амфифильного сополимера ВП с АК в исходной системе, средний диаметр микропузырьков увеличивался (рисунок 68), что связано с уменьшением их числа вследствие роста поверхностного натяжения, как это обсуждалось выше. Соответственно, микропузырьки с наибольшим средним диаметром ($4,7 \pm 1,2$ мкм) были получены из раствора комплекса с соотношением белка к полимеру 3 к 1 [236]. При этом все полученные образцы соответствовали критериям среднего размера для клинически используемых контрастных веществ в США (диаметр менее 7 мкм) [225].

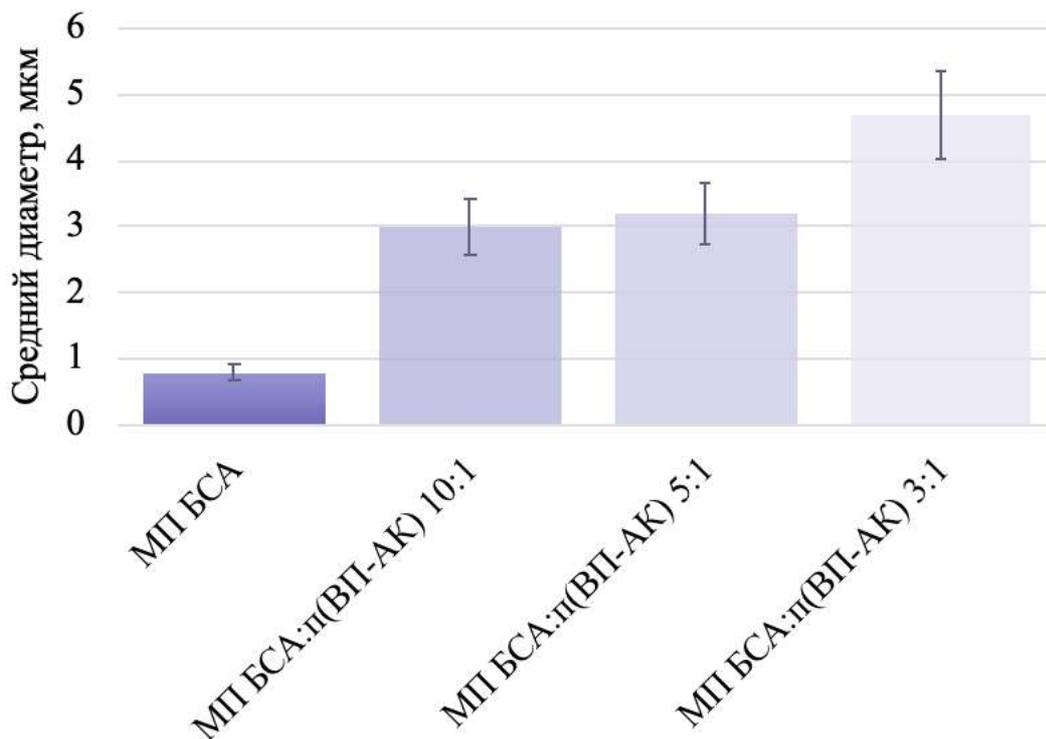


Рисунок 68 – Зависимость среднего диаметра микропузырьков от соотношения БСА и амфифильного сополимера ВП с АК при их получении [236]

Толщину оболочки и морфологию микропузырьков исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Как показано на рисунке 69, увеличение доли амфифильного сополимера ВП с АК в исходной системе приводило к увеличению толщины оболочки микропузырьков с 28 ± 8 нм (для оболочки из чистого белка) до 50 ± 8 нм (для оболочки из комплекса с соотношением белок-сополимер 3 к 1). Полученные результаты согласуются с данными литературы – толщина белковой оболочки микропузырьков, как правило, находится в пределах $\approx 15-30$ нм, а для пузырьков с полимерной оболочкой характерна большая толщина – от 40 нм и более [246–250]. Например, измеренная с помощью СЭМ толщина поли-*n*-бутилцианоакрилатной оболочки микропузырьков, варьирует в диапазоне 40-300 нм [251].

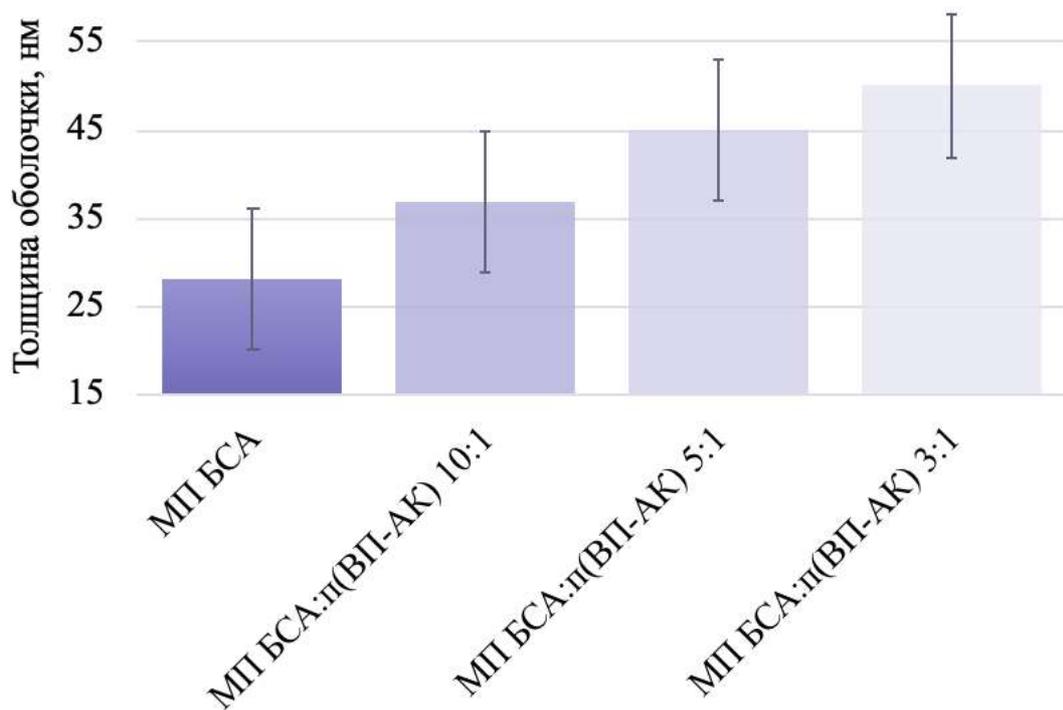


Рисунок 69 – Зависимость толщины оболочки микропузырьков от соотношения БСА и амфифильного сополимера ВП с АК при их получении [236]

Изображения, полученные с помощью просвечивающей электронной криомикроскопии (криоПЭМ) (рисунок 70), удовлетворительно согласуются с данными оптической микроскопии и демонстрируют сохранение первоначальной сферической формы микропузырьков при замораживании [236].

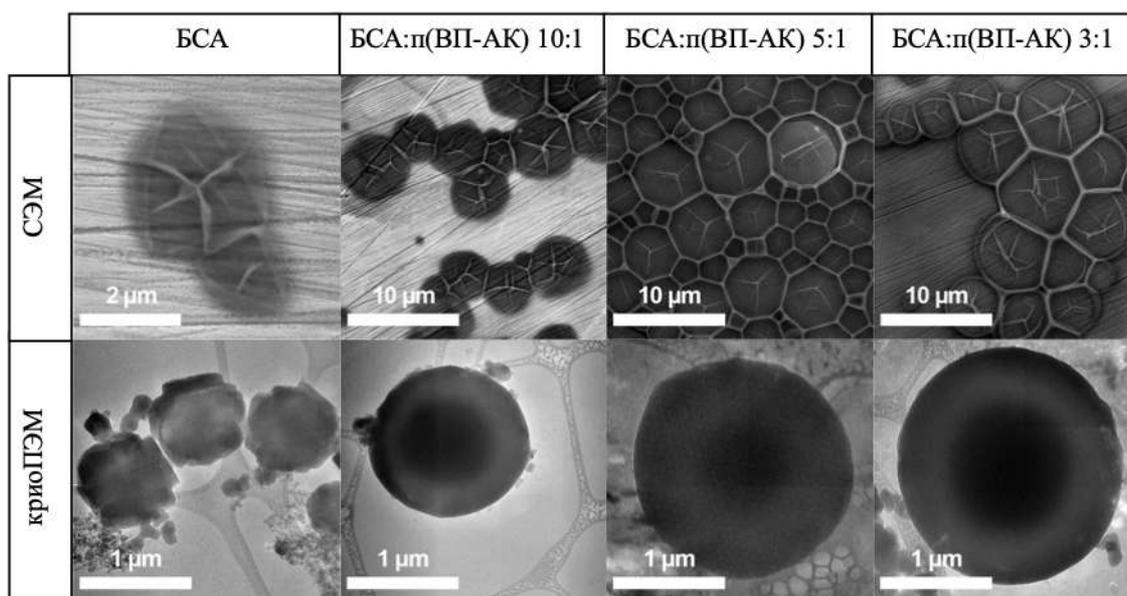


Рисунок 70 – Электронные фотографии микропузырьков, полученные с помощью СЭМ и криоПЭМ [236]

Эффективность микропузырьков как контрастных агентов для ультразвуковой диагностики заключается в том, что пузырьки обладают характерным акустическим откликом, позволяющим получить более четкое и информативное изображение исследуемой области [226,252].

Оценка акустического отклика микропузырьков на частоте 8 МГц проводилась с помощью клинически используемого устройства визуализации. Результаты УЗ-визуализации полученных контрастов в проточной камере фантома, имитирующей мягкую ткань, представлены на рисунке 71. В качестве контроля использовали дистиллированную воду и альбуминовые микропузырьки [236].

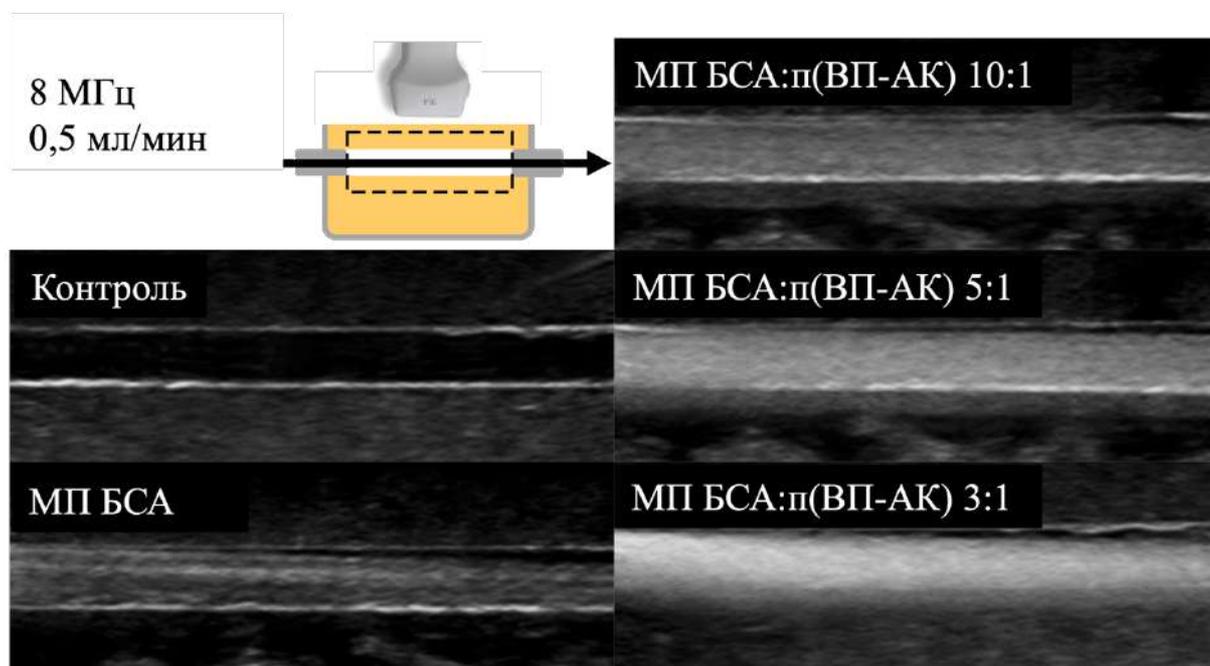


Рисунок 71 – Ультразвуковая визуализация микропузырьков в фантоме, имитирующем мягкую ткань [236]

На изображениях отчетливо видно, что по сравнению с дистиллированной водой, используемой в качестве контроля, все растворы, содержащие микропузырьки, проявляли акустический отклик. Также видно, что микропузырьки с оболочкой на основе комплексов БСА с амфифильным сополимером ВП с АК демонстрировали более высокую контрастность относительно белковых микропузырьков [236].

В порядке возрастания контрастности УЗИ и продолжительности времени, когда контраст был виден, образцы могут быть расположены следующим образом: МП БСА – 2 мин, МП БСА-сополимер 10 к 1 – 4 мин, МП БСА-сополимер 5 к 1 – 5 мин, МП БСА-сополимер 3 к 1 – 7 мин (рисунок 71). Полученные результаты согласуются со средними размерами микропузырьков, представленными на рисунке 68: микропузырьки с большим средним диаметром содержат большее количество воздуха. Таким образом, результирующий сигнал должен быть более интенсивным по сравнению с агентами небольшого размера. Таким образом, даже небольшие количества сополимера, включенного в гибридную оболочку микропузырьков, могут значительно повысить их акустическую стабильность и усилить контрастность изображения [236].

Подводя итог к данному разделу, можно заключить, что микропузырьки с гибридной оболочкой, состоящей из интерполимерного комплекса БСА и амфифильного сополимера ВП с АК демонстрируют улучшенные по сравнению с белковыми микропузырьками свойства, которые заключаются в увеличении концентрации микропузырьков при их синтезе, подходящем среднем размере, улучшенном акустическом отклике и стабильности [236].

(Материалы, описанные в разделе 3.6, получены в сотрудничестве с научным коллективом лаборатории Биофотоники Сколковского Института Науки и Технологий и отражены в публикации Estifeeva T.M. Hybrid (bovine serum albumin)/poly (N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid)-shelled microbubbles as advanced ultrasound contrast agents / T.M. Estifeeva, R.A. Barmin, P.G. Rudakovskaya, **A.M. Nechaeva**, A.L. Luss, Y.O. Mezhev, V.S. Chernyshev, E.G. Krivoborodov, O.A. Klimenko, O.A. Sindeeva, P.A. Demina, K.S. Petrov, R.N. Chuprov-Netochin, E.P. Fedotkina, O.E. Korotchenko, E.A. Sencha, A.N. Sencha, M.I. Shtilman, D.A. Gorin // ACS Applied Bio Materials. – 2022. – V. 5. – № 7. – P. 3338-3348.)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных в работе исследований можно сформулировать следующие **выводы**:

1. Установлено, что диаметр агрегатов цепей уменьшается при уменьшении концентрации и увеличении мольной доли остатков акриловой кислоты, а также увеличении среднечисловой молекулярной массы амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой.
2. Тензиометрическим методом (отрыва кольца) показано уменьшение критической концентрации агрегации (мицеллообразования) при увеличении длины гидрофобного фрагмента, а также уменьшении среднечисловой молекулярной массы и мольной доли остатков акриловой кислоты в цепи амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой.
3. Показана возможность иммобилизации гидрохлорида доксорубина гидрофильной короной агрегатов амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, причем скорость высвобождения противоопухолевого препарата подчиняется кинетическому уравнению для обратимых реакций первого порядка и значительно увеличивается при переходе из нейтральной среды в кислую среду, что может способствовать таргетированию доставки лекарства.
4. Оценены значения изменения стандартной энтальпии и энтропии для процесса высвобождения доксорубина электростатически иммобилизованного агрегатами амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой, которые составили 35 кДж/моль и 98 Дж/(моль×К), а также показано, что энергия активации высвобождения лекарства равна 40,7 кДж/моль и значительно превышает энергию активации его связывания, которая составляет около 5,6 кДж/моль.
5. Установлено образование интерполимерных комплексов при взаимодействии амфифильных сополимеров N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты с бычьим сывороточным альбумином, которые могут быть

использованы для формирования ультразвуковых контрастных агентов (микропузырьков).

Перспективы дальнейшей разработки темы связаны с проведением биологических исследований *in vivo* полученных наноразмерных форм доксорубина и интерполимерных комплексов сополимеров N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой с бычьим сывороточным альбумином, показавших перспективы использования для получения контрастных агентов для ультразвуковой диагностики.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АК – акриловая кислота
- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- ВП – N-винил-2-пирролидон
- ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс
- ДАК – динитрилазобисизомасляной кислоты
- ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние
- ИЮПАК – международный союз теоретической и прикладной химии
- ККА – критическая концентрация агрегации
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
- криоПЭМ – просвечивающая электронная криомикроскопия
- КРП – контролируемая радикальная полимеризация
- КТМ – критическая температура мицеллообразования
- мПЭГ – метоксилполиэтиленгликоль
- ОДТ – 1-октадекантиол
- ОТ – 1-октантиол
- ПАА – полиакриламид
- ПБО – полибутиленоксид
- ПВП – поли-N-винил-2-пирролидон
- ПВС – поливиниловый спирт
- ПКЛ – поликапролактон
- ПЛА – полилактид, полимолочная кислота
- ПЛГА – полилактид-ко-гликолид
- ПНИПАМ – поли-N-изопропилакриламид
- ППГ – полипропиленгликоль
- ПС – полистирол
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ПЭИ – полиэтиленимин
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

DOX – doxorubicin – доксорубицин

EPR – enhanced permeability and retention – повышенная
проницаемость и удерживание

FDA – U.S. Food and Drug Administration – Управление по
санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и
медикаментов США

PTX – paclitaxel – паклитаксел

ROP – ring opening polymerization – полимеризация с раскрытием
цикла

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Facci P. Semiconductor nanocrystals from langmuir-blodgett films: synthesis, characterization, and applications // Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials. Elsevier, 2001. P. 281–310.
2. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman, 2021. 1–1248 p.
3. Li Y. et al. Effect of pharmaceutical excipients on micellization of Pluronic and the application as drug carrier to reverse MDR // J Mol Liq. 2023. Vol. 383. P. 122182.
4. Li J. et al. Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) block copolymer based shell or core cross-linked micelles for controlled release of hydrophobic drug // RSC Adv. 2015. Vol. 5, № 25. P. 19484–19492.
5. Iatridi Z. et al. Application of hydrophobically modified water-soluble polymers for the dispersion of hydrophobic magnetic nanoparticles in aqueous media // Dalton Trans. 2014. Vol. 43, № 23. P. 8633–8643.
6. Mohan T. et al. Designing Hydrophobically Modified Polysaccharide Derivatives for Highly Efficient Enzyme Immobilization // Biomacromolecules. 2015. Vol. 16, № 8. P. 2403–2411.
7. Cheng H.N., Gu Q.-M. Enzyme-Catalyzed Modifications of Polysaccharides and Poly(ethylene glycol) // Polymers (Basel). 2012. Vol. 4, № 2. P. 1311–1330.
8. Cheng H.N. et al. Synthesis and Characterization of Hydrophobically Modified Xylans // Polymers (Basel). 2021. Vol. 13, № 2. P. 291.
9. Bignotti F. et al. Hydrophobically-Modified PEG Hydrogels with Controllable Hydrophilic/Hydrophobic Balance // Polymers (Basel). 2021. Vol. 13, № 9. P. 1489.
10. Lunkov A.P. et al. Chemical modification of chitosan for developing of new hemostatic materials: A review // Int J Biol Macromol. 2023. Vol. 253. P. 127608.

11. Kuperkar K. et al. Amphiphilic Block Copolymers: Their Structures, and Self-Assembly to Polymeric Micelles and Polymersomes as Drug Delivery Vehicles // *Polymers (Basel)*. 2022. Vol. 14, № 21. P. 4702.
12. Panova I.G. et al. A Dramatic Change in Rheological Behavior of a Clay Material Caused by a Minor Addition of Hydrophilic and Amphiphilic Polyelectrolytes // *Polymers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 21. P. 3662.
13. Lombardo D. et al. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches // *Advances in Condensed Matter Physics*. 2015. Vol. 2015. P. 1–22.
14. Loiola L.M.D. et al. Amphiphilic multiblock copolymers of PLLA, PEO and PPO blocks: Synthesis, properties and cell affinity // *Eur Polym J*. 2015. Vol. 68. P. 618–629.
15. Bae Y.H. et al. Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications // *Journal of Controlled Release*. 2000. Vol. 64, № 1–3. P. 3–13.
16. Hadjiantoniou N.A. et al. Synthesis and Characterization of Amphiphilic Multiblock Copolymers: Effect of the Number of Blocks on Micellization // *Macromolecules*. 2009. Vol. 42, № 15. P. 5492–5498.
17. Figueroa-Ochoa E.B. et al. Structural Behavior of Amphiphilic Triblock Copolymer P104/Water System // *Polymers (Basel)*. 2023. Vol. 15, № 11. P. 2551.
18. Garnier S., Laschewsky A. New Amphiphilic Diblock Copolymers: Surfactant Properties and Solubilization in Their Micelles // *Langmuir*. 2006. Vol. 22, № 9. P. 4044–4053.
19. Tyler B. et al. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications // *Adv Drug Deliv Rev*. 2016. Vol. 107. P. 163–175.
20. Kim H.-K. et al. Fabrication of Nanostructured Polycaprolactone (PCL) Film Using a Thermal Imprinting Technique and Assessment of Antibacterial Function for Its Application // *Polymers (Basel)*. 2022. Vol. 14, № 24. P. 5527.
21. Wu K., Yu L., Ding J. Synthesis of PCL–PEG–PCL Triblock Copolymer via Organocatalytic Ring-Opening Polymerization and Its Application as an Injectable

Hydrogel—An Interdisciplinary Learning Trial // *J Chem Educ.* 2020. Vol. 97, № 11. P. 4158–4165.

22. Oh J.K. Polylactide (PLA)-based amphiphilic block copolymers: synthesis, self-assembly, and biomedical applications // *Soft Matter.* 2011. Vol. 7, № 11. P. 5096.

23. Nishimura T. et al. Manipulating the Morphology of Amphiphilic Graft-Copolymer Assemblies by Adjusting the Flexibility of the Main Chain // *Macromolecules.* 2021. Vol. 54, № 14. P. 7003–7009.

24. Verduzco R. et al. Structure, function, self-assembly, and applications of bottlebrush copolymers // *Chem Soc Rev.* 2015. Vol. 44, № 8. P. 2405–2420.

25. Sakamoto Y., Nishimura T. Recent advances in the self-assembly of sparsely grafted amphiphilic copolymers in aqueous solution // *Polym Chem.* 2022. Vol. 13, № 46. P. 6343–6360.

26. Jiang X. et al. The first amphiphilic graft copolymer bearing a hydrophilic poly(2-hydroxyethyl acrylate) backbone synthesized by successive RAFT and ATRP // *Polym. Chem.* 2014. Vol. 5, № 17. P. 4915–4925.

27. Wang Y. et al. Protein-Resistant Biodegradable Amphiphilic Graft Copolymer Vesicles as Protein Carriers // *Macromol Biosci.* 2015. Vol. 15, № 9. P. 1304–1313.

28. Ohshio M., Ishihara K., Yusa S. Self-Association Behavior of Cell Membrane-Inspired Amphiphilic Random Copolymers in Water // *Polymers (Basel).* 2019. Vol. 11, № 2. P. 327.

29. Terashima T. Controlled Self-Assembly of Amphiphilic Random Copolymers into Folded Micelles and Nanostructure Materials // *J Oleo Sci.* 2020. Vol. 69, № 6. P. 529–538.

30. Peng F. et al. Anion amphiphilic random copolymers and their performance as stabilizers for O/W nanoemulsions // *RSC Adv.* 2019. Vol. 9, № 26. P. 14692–14700.

31. Shibata M., Terashima T., Koga T. Micellar aggregation and thermogelation of amphiphilic random copolymers in water hierarchically dependent on chain length // *Eur Polym J.* 2022. Vol. 168. P. 111091.
32. Vo D.-T., Whiteley C.G., Lee C.-K. Hydrophobically Modified Chitosan-Grafted Magnetic Nanoparticles for Bacteria Removal // *Ind Eng Chem Res.* 2015. Vol. 54, № 38. P. 9270–9277.
33. Zhang J. et al. Oleic Acid Copolymer as A Novel Upconversion Nanomaterial to Make Doxorubicin-Loaded Nanomicelles with Dual Responsiveness to pH and NIR // *Pharmaceutics.* 2020. Vol. 12, № 7. P. 680.
34. Kulikov P.P. et al. Amphiphilic poly-n-vinyl-2-pyrrolidone: Synthesis, properties, nanoparticles // *Polymer Science, Series D.* 2017. Vol. 10, № 3. P. 263–268.
35. Shtilman M.I. et al. Synthesis and Study of the Properties of Amphiphilic Poly-N-Vinylpyrrolidone with Terminal Thioalkyl Groups // *Journal of Siberian Federal University. Biology.* 2019. P. 258–265.
36. Kuskov A.N. et al. Self-assembling nanoscaled drug delivery systems composed of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones // *J Non Cryst Solids.* 2007. Vol. 353, № 41–43. P. 3969–3975.
37. Kuskov A.N. et al. Preparation of polymer nanoparticles by self-assembling of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone derivatives in aqueous media // *Russian Journal of Applied Chemistry.* 2016. Vol. 89, № 9. P. 1461–1468.
38. Кусков А.Н. Амфифильные полимеры N-винилпирролидона и наноразмерные лекарственные формы на их основе: дис. д-р. хим. наук: 03.01.06, 02.00.06. - М., 2017. - 327 с.
39. Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И., Тзатзаракис М.А., Тсатсакис А.М. Водосовместимые полимерные композиции для доставки биологически активных веществ: патент РФ 2580649; заявл. 27.03.15; опубл. 10.04.16, Бюл. № 10.
40. Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И., Тсатсакис А.М. Амфифильные сополимеры и способ их получения: патент РФ 2599579; заявл. 17.10.14; опубл. 10.10.16, Бюл. № 28.

41. Kuskov A. et al. Amphiphilic Poly-N-vinylpyrrolidone Nanoparticles as Carriers for Nonsteroidal, Anti-Inflammatory Drugs: Pharmacokinetic, Anti-Inflammatory, and Ulcerogenic Activity Study // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, № 5. P. 925.
42. Luss A.L. et al. Nanosized carriers based on amphiphilic poly-N-vinyl-2-pyrrolidone for intranuclear drug delivery // *Nanomedicine*. 2018. Vol. 13, № 7. P. 703–715.
43. Tsatsakis A. et al. In vitro blood compatibility and in vitro cytotoxicity of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles // *Food and Chemical Toxicology*. 2019. Vol. 127. P. 42–52.
44. Kuskov A.N. et al. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles: Cytotoxicity and acute toxicity study // *Food and Chemical Toxicology*. 2016. Vol. 96. P. 273–279.
45. Szwarc M., Levy M., Milkovich R. Polymerization initiated by electron transfer to monomer. A new method of formation of block polymers. // *J Am Chem Soc*. 1956. Vol. 78, № 11. P. 2656–2657.
46. Szwarc M. 'Living' Polymers // *Nature*. 1956. Vol. 178, № 4543. P. 1168–1169.
47. Le Dévédec F., Houdaihed L., Allen C. Anionic Polymerization of an Amphiphilic Copolymer for Preparation of Block Copolymer Micelles Stabilized by p-p Stacking Interactions // *Journal of Visualized Experiments*. 2016. № 116.
48. Hirao A., Loykulnant S., Ishizone T. Recent advance in living anionic polymerization of functionalized styrene derivatives // *Prog Polym Sci*. 2002. Vol. 27, № 8. P. 1399–1471.
49. Hong K., Uhrig D., Mays J.W. Living anionic polymerization // *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 1999. Vol. 4, № 6. P. 531–538.
50. Hadjichristidis N. et al. Macromolecular architectures by living and controlled/living polymerizations // *Prog Polym Sci*. 2006. Vol. 31, № 12. P. 1068–1132.

51. Hirao A., Hayashi M., Haraguchi N. Synthesis of well-defined functionalized polymers and star branched polymers by means of living anionic polymerization using specially designed 1,1-diphenylethylene derivatives // *Macromol Rapid Commun.* 2000. Vol. 21, № 17. P. 1171–1184.
52. Hadjichristidis N. et al. Polymers with Complex Architecture by Living Anionic Polymerization // *Chem Rev.* 2001. Vol. 101, № 12. P. 3747–3792.
53. Jiang S., Deng J., Yang W. Block Copolymers Prepared by Free Radical Polymerization Using α -Methylstyrene-containing Precopolymer as Macroinitiator // *Polym J.* 2008. Vol. 40, № 6. P. 543–548.
54. Rambarran T., Sheardown H.D. Block copolymer synthesis using free-radical polymerization and thiol–maleimide ‘click’ conjugation // *RSC Adv.* 2021. Vol. 11, № 55. P. 34631–34635.
55. Chen Y. et al. Amphiphilic gradient copolymers: Synthesis, self-assembly, and applications // *Eur Polym J.* 2016. Vol. 85. P. 489–498.
56. Takahashi H. et al. Molecular Design, Structures, and Activity of Antimicrobial Peptide-Mimetic Polymers // *Macromol Biosci.* 2013. Vol. 13, № 10. P. 1285–1299.
57. Jennings J. et al. Advantages of Block Copolymer Synthesis by RAFT-Controlled Dispersion Polymerization in Supercritical Carbon Dioxide // *Macromolecules.* 2013. Vol. 46, № 17. P. 6843–6851.
58. Dau H. et al. Linear Block Copolymer Synthesis // *Chem Rev.* 2022. Vol. 122, № 18. P. 14471–14553.
59. Gao H., Matyjaszewski K. Synthesis of functional polymers with controlled architecture by CRP of monomers in the presence of cross-linkers: From stars to gels // *Prog Polym Sci.* 2009. Vol. 34, № 4. P. 317–350.
60. de Marco B.A. et al. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review // *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2019. Vol. 27, № 1. P. 1–8.

61. Parkatzidis K. et al. Recent Developments and Future Challenges in Controlled Radical Polymerization: A 2020 Update // *Chem.* 2020. Vol. 6, № 7. P. 1575–1588.
62. ring-opening polymerization // *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology.* Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2014. P. 2308–2308.
63. Penczek S. Cationic ring-opening polymerization (CROP) major mechanistic phenomena // *J Polym Sci A Polym Chem.* 2000. Vol. 38, № 11. P. 1919–1933.
64. Sudo A. Anionic Ring-Opening Polymerization // *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. P. 1–11.
65. Tardy A. et al. Radical Ring-Opening Polymerization: Scope, Limitations, and Application to (Bio)Degradable Materials // *Chem Rev.* 2017. Vol. 117, № 3. P. 1319–1406.
66. Lin G. et al. Injectable and thermogelling hydrogels of PCL-g-PEG: mechanisms, rheological and enzymatic degradation properties // *J Mater Chem B.* 2013. Vol. 1, № 9. P. 1249.
67. Lee R.-S. et al. Passive targeting of thermosensitive diblock copolymer micelles to the lungs: synthesis and characterization of poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(ϵ -caprolactone) // *J Nanobiotechnology.* 2015. Vol. 13, № 1. P. 42.
68. Risangud N. et al. Amphiphilic polymeric photoinitiator composed of PEG-b-PCL diblock copolymer for three-dimensional printing of hydrogels // *Eur Polym J.* 2022. Vol. 168. P. 111094.
69. Aliabadi H.M. et al. Micelles of methoxy poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of cyclosporine A // *Journal of Controlled Release.* 2005. Vol. 104, № 2. P. 301–311.
70. Shuai X. et al. Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery // *Journal of Controlled Release.* 2004. Vol. 98, № 3. P. 415–426.

71. Zeng X. et al. Poly(L-lysine)-based cylindrical copolyptide brushes as potential drug and gene carriers // *Colloid Polym Sci.* 2016. Vol. 294, № 12. P. 1909–1920.
72. Perin F., Motta A., Maniglio D. Amphiphilic copolymers in biomedical applications: Synthesis routes and property control // *Materials Science and Engineering: C.* 2021. Vol. 123. P. 111952.
73. Xi W. et al. Click Chemistry in Materials Science // *Adv Funct Mater.* 2014. Vol. 24, № 18. P. 2572–2590.
74. Chen C., Ng D.Y.W., Weil T. Polymer bioconjugates: Modern design concepts toward precision hybrid materials // *Prog Polym Sci.* 2020. Vol. 105. P. 101241.
75. Tabatabaei M. et al. Effect of type of fatty acid attached to chitosan on walnut oil-in-water Pickering emulsion properties // *Carbohydr Polym.* 2022. Vol. 291. P. 119566.
76. Hosseini E. et al. Preparation of Pickering Flaxseed Oil-in-Water Emulsion Stabilized by Chitosan-Myristic Acid Nanogels and Investigation of Its Oxidative Stability in Presence of Clove Essential Oil as Antioxidant // *Food Biophys.* 2020. Vol. 15, № 2. P. 216–228.
77. Sharma D., Singh J. Synthesis and Characterization of Fatty Acid Grafted Chitosan Polymer and Their Nanomicelles for Nonviral Gene Delivery Applications // *Bioconjug Chem.* 2017. Vol. 28, № 11. P. 2772–2783.
78. Delorme V. et al. Reverse poly(ϵ -caprolactone)-g-dextran graft copolymers. Nano-carriers for intracellular uptake of anticancer drugs // *Carbohydr Polym.* 2020. Vol. 232. P. 115764.
79. Zhang K. et al. Synthesis, characterization, and micellization of PCL-g-PEG copolymers by combination of ROP and “Click” chemistry via “Graft onto” method // *J Polym Sci A Polym Chem.* 2012. Vol. 50, № 10. P. 2045–2052.
80. Savaş B. et al. Synthesis and characterization of comb-type graft copolymers by redox polymerization and “click” chemistry method // *SN Appl Sci.* 2020. Vol. 2, № 2. P. 181.

81. Deng J.-R. et al. Amphiphilic Graft Copolymers of Hydroxypropyl Cellulose Backbone with Nonpolar Polyisobutylene Branches // Chinese Journal of Polymer Science. 2021. Vol. 39, № 8. P. 1029–1039.
82. Hou S.-S., Kuo P.-L. Synthesis and characterization of amphiphilic graft copolymers based on poly(styrene- co -maleic anhydride) with oligo(oxyethylene) side chains and their GPC behavior // Polymer (Guildf). 2001. Vol. 42, № 6. P. 2387–2394.
83. Purohit P. et al. Polymer Grafting and its chemical reactions // Front Bioeng Biotechnol. 2023. Vol. 10.
84. Moon S.J. et al. Fluorine-Containing, Self-Assembled Graft Copolymer for Tuning the Hydrophilicity and Antifouling Properties of PVDF Ultrafiltration Membranes // Polymers (Basel). 2023. Vol. 15, № 17. P. 3623.
85. Yuan J. et al. Well-defined polyurethane-graft-poly(N,N-dimethylacrylamide) copolymer with a controlled graft density and grafted chain length: synthesis and its application as a Pickering emulsion // RSC Adv. 2016. Vol. 6, № 64. P. 58970–58978.
86. Feng H. et al. Block Copolymers: Synthesis, Self-Assembly, and Applications // Polymers (Basel). 2017. Vol. 9, № 12. P. 494.
87. Yorulmaz Avsar S. et al. Biomolecules Turn Self-Assembling Amphiphilic Block Co-polymer Platforms Into Biomimetic Interfaces // Front Chem. 2019. Vol. 6.
88. Torchilin V.P. The Use of Polychelating and Amphiphilic Polymers in Gamma, MR and CT Imaging // Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics. Boston, MA: Springer US, 2002. P. 268–284.
89. Luo Z. et al. Cationic micelle based vaccine induced potent humoral immune response through enhancing antigen uptake and formation of germinal center // Colloids Surf B Biointerfaces. 2015. Vol. 135. P. 556–564.
90. Trimaille T., Lacroix C., Verrier B. Self-assembled amphiphilic copolymers as dual delivery system for immunotherapy // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2019. Vol. 142. P. 232–239.

91. Su Z. et al. The role of architectural engineering in macromolecular self-assemblies via non-covalent interactions: A molecular LEGO approach // *Prog Polym Sci.* 2020. Vol. 103. P. 101230.
92. Cui X. et al. Mechanism of Surfactant Micelle Formation // *Langmuir.* 2008. Vol. 24, № 19. P. 10771–10775.
93. Koolman J., Roehm K.H. *Color Atlas of Biochemistry.* Thieme, 2004.
94. Finney J. The structural basis of the hydrophobic interaction // *Hydration Processes in Biology: Theoretical and Experimental Approaches.* 1999. P. 115–124.
95. Xu R. et al. Light-scattering study of the association behavior of styrene-ethylene oxide block copolymers in aqueous solution // *Macromolecules.* 1991. Vol. 24, № 1. P. 87–93.
96. Desjardins A., Van de Ven T.G.M., Eisenberg A. Colloidal properties of block ionomers. 2. Characterization of reverse micelles of styrene-*b*-methacrylic acid and styrene-*b*-metal methacrylate diblocks by dynamic light scattering // *Macromolecules.* 1992. Vol. 25, № 9. P. 2412–2421.
97. Chen L.-J. et al. Temperature dependence of critical micelle concentration of polyoxyethylenated non-ionic surfactants // *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 1998. Vol. 135, № 1–3. P. 175–181.
98. Manojlovic J. The Krafft temperature of surfactant solutions // *Thermal Science.* 2012. Vol. 16, № suppl. 2. P. 631–640.
99. Liu T., Liu L.-Z., Chu B. Formation of Amphiphilic Block Copolymer Micelles in Nonaqueous Solution // *Amphiphilic Block Copolymers.* Elsevier, 2000. P. 115–149.
100. Kralova I., Sjöblom J. Surfactants Used in Food Industry: A Review // *J Dispers Sci Technol.* 2009. Vol. 30, № 9. P. 1363–1383.
101. Alvarez-Lorenzo C., Sosnik A., Concheiro A. PEO-PPO Block Copolymers for Passive Micellar Targeting and Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Therapy // *Curr Drug Targets.* 2011. Vol. 12, № 8. P. 1112–1130.

102. Naharros-Molinero A. et al. Direct and Reverse Pluronic Micelles: Design and Characterization of Promising Drug Delivery Nanosystems // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, № 12. P. 2628.
103. Pitto-Barry A., Barry N.P.E. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances // *Polym. Chem.* 2014. Vol. 5, № 10. P. 3291–3297.
104. Israelachvili J.N. Thermodynamic and Geometric Aspects of Amphiphile Aggregation into Micelles, Vesicles and Bilayers, and the Interactions between them // *Proc. Int. School Phys. Enrico Fermi Course XC*. 1985.
105. Szutkowski K. et al. Clear distinction between CAC and CMC revealed by high-resolution NMR diffusometry for a series of bis-imidazolium gemini surfactants in aqueous solutions // *RSC Adv.* 2018. Vol. 8, № 67. P. 38470–38482.
106. Wei M. et al. Stimuli-responsive polymers and their applications // *Polym Chem.* 2017. Vol. 8, № 1. P. 127–143.
107. Stuart M.A.C. et al. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials // *Nat Mater.* 2010. Vol. 9, № 2. P. 101–113.
108. Shi X. et al. pH-Responsive unimolecular micelles based on amphiphilic star-like copolymers with high drug loading for effective drug delivery and cellular imaging // *J Mater Chem B.* 2017. Vol. 5, № 33. P. 6847–6859.
109. Bener S., Puglisi A., Yagci Y. pH-Responsive Micelle-Forming Amphiphilic Triblock Copolymers // *Macromol Chem Phys.* 2020. Vol. 221, № 11.
110. Muppalla R. et al. Adsorption of pH-responsive amphiphilic copolymer micelles and gel on membrane surface as an approach for antifouling coating // *Appl Surf Sci.* 2013. Vol. 268. P. 355–367.
111. Son I. et al. pH-Responsive Amphiphilic Polyether Micelles with Superior Stability for Smart Drug Delivery // *Biomacromolecules.* 2021. Vol. 22, № 5. P. 2043–2056.
112. Zhou X.X. et al. pH-responsive polymeric micelles self-assembled from amphiphilic copolymer modified with lipid used as doxorubicin delivery carriers // *R Soc Open Sci.* 2018. Vol. 5, № 3. P. 171654.

113. Krishnan A., Roy S., Menon S. Amphiphilic block copolymers: From synthesis including living polymerization methods to applications in drug delivery // *Eur Polym J.* 2022. Vol. 172. P. 111224.
114. Bami M.S. et al. pH-responsive drug delivery systems as intelligent carriers for targeted drug therapy: Brief history, properties, synthesis, mechanism and application // *J Drug Deliv Sci Technol.* 2022. Vol. 70. P. 102987.
115. Halacheva S.S. et al. Injectable Biocompatible and Biodegradable pH-Responsive Hollow Particle Gels Containing Poly(acrylic acid): The Effect of Copolymer Composition on Gel Properties // *Biomacromolecules.* 2014. Vol. 15, № 5. P. 1814–1827.
116. Rofstad E.K. et al. Acidic Extracellular pH Promotes Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells in Athymic Nude Mice // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66, № 13. P. 6699–6707.
117. Gao X. et al. pH- and thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid derivative) copolymers and hydrogels with LCST dependent on pH and alkyl side groups // *J Mater Chem B.* 2013. Vol. 1, № 41. P. 5578.
118. Castro-Hernández A., Cortez-Lemus N.A. Thermo/pH Responsive Star and Linear Copolymers Containing a Cholic Acid-Derived Monomer, N-Isopropylacrylamide and Acrylic Acid: Synthesis and Solution Properties // *Polymers (Basel).* 2019. Vol. 11, № 11. P. 1859.
119. Sung H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA Cancer J Clin.* 2021. Vol. 71, № 3. P. 209–249.
120. Mitra A.K. et al. Novel delivery approaches for cancer therapeutics // *Journal of Controlled Release.* 2015. Vol. 219. P. 248–268.
121. Chiang C.-L., Cheng M.-H., Lin C.-H. From Nanoparticles to Cancer Nanomedicine: Old Problems with New Solutions // *Nanomaterials.* 2021. Vol. 11, № 7. P. 1727.
122. Strebhardt K., Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress // *Nat Rev Cancer.* 2008. Vol. 8, № 6. P. 473–480.

123. Deb P.K. et al. *Pharmaceutical and Biomedical Applications of Polymers // Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier, 2019. P. 203–267.
124. Anand U. et al. *Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics // Genes Dis*. 2023. Vol. 10, № 4. P. 1367–1401.
125. Arpicco S. et al. *Anticancer Prodrugs: An Overview of Major Strategies and Recent Developments // Curr Top Med Chem*. 2011. Vol. 11, № 18. P. 2346–2381.
126. Joudeh N., Linke D. *Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists // J Nanobiotechnology*. 2022. Vol. 20, № 1. P. 262.
127. McNamara K., Tofail S.A.M. *Nanoparticles in biomedical applications // Adv Phys X*. 2017. Vol. 2, № 1. P. 54–88.
128. Ghosn Y. et al. *Inorganic Nanoparticles as Drug Delivery Systems and Their Potential Role in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukaemia // Technol Cancer Res Treat*. 2019. Vol. 18. P. 153303381985324.
129. Tenchov R. et al. *Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement // ACS Nano*. 2021. Vol. 15, № 11. P. 16982–17015.
130. Jung H.N. et al. *Lipid nanoparticles for delivery of RNA therapeutics: Current status and the role of in vivo imaging // Theranostics*. 2022. Vol. 12, № 17. P. 7509–7531.
131. Badıllı U. et al. *Role of quantum dots in pharmaceutical and biomedical analysis, and its application in drug delivery // TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 131. P. 116013.
132. Zare H. et al. *Carbon Nanotubes: Smart Drug/Gene Delivery Carriers // Int J Nanomedicine*. 2021. Vol. Volume 16. P. 1681–1706.
133. Begines B. et al. *Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects // Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, № 7. P. 1403.
134. Zhang N., Xiong G., Liu Z. *Toxicity of metal-based nanoparticles: Challenges in the nano era // Front Bioeng Biotechnol*. 2022. Vol. 10.

135. Sengul A.B., Asmatulu E. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review // *Environ Chem Lett*. 2020. Vol. 18, № 5. P. 1659–1683.
136. Saleemi M.A. et al. Toxicity of Carbon Nanotubes: Molecular Mechanisms, Signaling Cascades, and Remedies in Biomedical Applications // *Chem Res Toxicol*. 2021. Vol. 34, № 1. P. 24–46.
137. Sharma M. Understanding the mechanism of toxicity of carbon nanoparticles in humans in the new millennium: A systemic review // *Indian J Occup Environ Med*. 2010. Vol. 14, № 1. P. 3.
138. Sainaga Jyothi V.G.S. et al. Stability characterization for pharmaceutical liposome product development with focus on regulatory considerations: An update // *Int J Pharm*. 2022. Vol. 624. P. 122022.
139. Gupta V. et al. Protein PEGylation for cancer therapy: bench to bedside // *J Cell Commun Signal*. 2019. Vol. 13, № 3. P. 319–330.
140. Pasarin D. et al. Coating Materials to Increase the Stability of Liposomes // *Polymers (Basel)*. 2023. Vol. 15, № 3. P. 782.
141. Fredenberg S. et al. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review // *Int J Pharm*. 2011. Vol. 415, № 1–2. P. 34–52.
142. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application // *J Pers Med*. 2021. Vol. 11, № 8. P. 771.
143. Bailly N., Thomas M., Klumperman B. Poly(N-vinylpyrrolidone)-blockpoly(vinyl acetate) as a Drug Delivery Vehicle for Hydrophobic Drugs // *Biomacromolecules*. 2012. Vol. 13, № 12. P. 4109–4117.
144. Addisu K.D. et al. Fabrication of amino acid conjugated polymeric micelles for controlled anticancer drug delivery using radiation and pH-stimuli-triggering systems // *J Drug Deliv Sci Technol*. 2023. Vol. 80. P. 104170.
145. Vlassi E., Papagiannopoulos A., Pispas S. Amphiphilic poly(2-oxazoline) copolymers as self-assembled carriers for drug delivery applications // *Eur Polym J*. 2017. Vol. 88. P. 516–523.

146. Yadav S. et al. Redox-responsive properties of core-cross-linked micelles of poly(ethylene oxide)-b-poly(furfuryl methacrylate) for anticancer drug delivery application // *React Funct Polym.* 2022. Vol. 175. P. 105271.
147. Bláhová M. et al. Graft copolymers with tunable amphiphilicity tailored for efficient dual drug delivery via encapsulation and pH-sensitive drug conjugation // *Polym Chem.* 2020. Vol. 11, № 27. P. 4438–4453.
148. Razavi B. et al. Light-, temperature-, and pH-responsive micellar assemblies of spiropyran-initiated amphiphilic block copolymers: Kinetics of photochromism, responsiveness, and smart drug delivery // *Materials Science and Engineering: C.* 2020. Vol. 109. P. 110524.
149. Guo Y. et al. A novel polymer micelle as a targeted drug delivery system for 10-hydroxycamptothecin with high drug-loading properties and anti-tumor efficacy // *Biophys Chem.* 2021. Vol. 279. P. 106679.
150. Bai T. et al. pH-responsive dithiomaleimide-amphiphilic block copolymer for drug delivery and cellular imaging // *J Colloid Interface Sci.* 2019. Vol. 552. P. 439–447.
151. Liu F. et al. Synthesis of enzyme-responsive theranostic amphiphilic conjugated bottlebrush copolymers for enhanced anticancer drug delivery // *Acta Biomater.* 2022. Vol. 144. P. 15–31.
152. Bakewell S.J. et al. Imaging the delivery of drug-loaded, iron-stabilized micelles // *Nanomedicine.* 2017. Vol. 13, № 4. P. 1353–1362.
153. Komsthöft T. et al. Polymer functionalization of inorganic nanoparticles for biomedical applications // *Curr Opin Chem Eng.* 2022. Vol. 37. P. 100849.
154. Bayliss N., Schmidt B.V.K.J. Hydrophilic polymers: Current trends and visions for the future // *Prog Polym Sci.* 2023. Vol. 147. P. 101753.
155. Song X. et al. Design, preparation, and characterization of lubricating polymer brushes for biomedical applications // *Acta Biomater.* 2024. Vol. 175. P. 76–105.
156. Kalirajan C. et al. A Critical Review on Polymeric Biomaterials for Biomedical Applications // *Polymers (Basel).* 2021. Vol. 13, № 17. P. 3015.

157. Zhang D. et al. Dealing with the Foreign-Body Response to Implanted Biomaterials: Strategies and Applications of New Materials // *Adv Funct Mater.* 2021. Vol. 31, № 6.
158. Zhang X. et al. Effects of pharmaceutical PEGylation on drug metabolism and its clinical concerns // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014. Vol. 10, № 12. P. 1691–1702.
159. Sebak A.A. Limitations of pegylated nanocarriers: unfavourable physicochemical properties, biodistribution patterns and cellular and subcellular fates // *International Journal of Applied Pharmaceutics.* 2018. Vol. 10, № 5. P. 6.
160. Hong L. et al. Antibodies against polyethylene glycol in human blood: A literature review // *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2020. Vol. 102. P. 106678.
161. Hoang Thi T.T. et al. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation // *Polymers (Basel).* 2020. Vol. 12, № 2. P. 298.
162. Teodorescu M., Bercea M. Poly(vinylpyrrolidone) – A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications // *Polym Plast Technol Eng.* 2015. Vol. 54, № 9. P. 923–943.
163. Zheng J. et al. Controlling the Integration of Polyvinylpyrrolidone onto Substrate by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation To Achieve Excellent Protein Resistance and Detoxification // *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016. Vol. 8, № 29. P. 18684–18692.
164. Barinov S.V. et al. Detoxification treatment in Gynecology using a modified molded sorbent // *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2023. Vol. 88. P. 102346.
165. Zhao Y. et al. Use of polyvinylpyrrolidone-iodine solution for sterilisation and preservation improves mechanical properties and osteogenesis of allografts // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 38669.
166. Nair B. Final Report On the Safety Assessment of Polyvinylpyrrolidone (PVP) // *Int J Toxicol.* 1998. Vol. 17, № 4_suppl. P. 95–130.

167. Lalani J., Misra A. Gene Delivery Using Chemical Methods // Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics. Elsevier, 2011. P. 127–206.
168. Kurakula M., Rao G.S.N.K. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition // J Drug Deliv Sci Technol. 2020. Vol. 60. P. 102046.
169. Zare M.R. et al. Dissolvable carboxymethyl cellulose/polyvinylpyrrolidone microneedle arrays for transdermal delivery of Amphotericin B to treat cutaneous leishmaniasis // Int J Biol Macromol. 2021. Vol. 182. P. 1310–1321.
170. Li Y. et al. Micelles based on polyvinylpyrrolidone VA64: A potential nanoplatform for the ocular delivery of apocynin // Int J Pharm. 2022. Vol. 615. P. 121451.
171. Elbarbary A.M. et al. Radiation cross-linking of pH-sensitive acrylic acid hydrogel based polyvinylpyrrolidone/ 2-dimethylamino ethyl methacrylate loaded with betamethasone dipropionate drug and in vitro anti-inflammatory assessment // J Drug Deliv Sci Technol. 2023. Vol. 89. P. 105024.
172. Shamsabadipour A. et al. Nanoemulsion carriers of porous γ -alumina modified by polyvinylpyrrolidone and carboxymethyl cellulose for pH-sensitive delivery of 5-fluorouracil // Int J Biol Macromol. 2023. Vol. 233. P. 123621.
173. Cesur S. Combination techniques towards novel drug delivery systems manufacturing: 3D PCL scaffolds enriched with tetracycline-loaded PVP nanoparticles // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2024. Vol. 194. P. 36–48.
174. Ng L., Swami S. Copolymers of acrylic acid with N-vinylpyrrolidinone and 2-hydroxyethyl methacrylate as pH-responsive hydrogels synthesized through a photoinitiator-free photopolymerization technique // Polym Int. 2006. Vol. 55, № 5. P. 535–544.
175. Kızılbey K. et al. An In vivo study: Adjuvant activity of poly-n-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid on immune responses against Melanoma synthetic peptide // Bioengineered. 2018. Vol. 9, № 1. P. 134–143.

176. Bian F. et al. Self-assembled micelles of N-phthaloylchitosan-g-polyvinylpyrrolidone for drug delivery // *Carbohydr Polym.* 2009. Vol. 76, № 3. P. 454–459.
177. Mohammadi A.B. et al. Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone/iron oxide nanocarrier for efficient delivery of doxorubicin // *Inorg Chem Commun.* 2024. Vol. 161. P. 112037.
178. Shafei A. et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2017. Vol. 95. P. 1209–1218.
179. Surapaneni M.S., Das S.K., Das N.G. Designing Paclitaxel Drug Delivery Systems Aimed at Improved Patient Outcomes: Current Status and Challenges // *ISRN Pharmacol.* 2012. Vol. 2012. P. 1–15.
180. Majorek K.A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins // *Mol Immunol.* 2012. Vol. 52, № 3–4. P. 174–182.
181. Ketrat S., Japrun D., Pongprayoon P. Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin // *J Mol Graph Model.* 2020. Vol. 98. P. 107601.
182. Barmin R. et al. Air-Filled Bubbles Stabilized by Gold Nanoparticle/Photodynamic Dye Hybrid Structures for Theranostics // *Nanomaterials.* 2021. Vol. 11, № 2. P. 415.
183. Лусс А.Л. Наноразмерные агрегаты амфифильного поли-N винилпирролидона, как носители лекарственных веществ. 2017.
184. Yaminsky I., Akhmetova A., Meshkov G. Femtoscan online software and visualization of nano-objects in high-resolution microscopy // *Nanoindustry Russia.* 2018. № 6. P. 414–416.
185. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat Methods.* 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.

186. Barmin R.A. et al. Impact of fluorescent dyes on the physicochemical parameters of microbubbles stabilized by albumin-dye complex // *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2022. Vol. 647. P. 129095.
187. Patravale V., Dandekar P., Jain R. *Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles* // *Nanoparticulate Drug Delivery.* Elsevier, 2012. P. 123–155.
188. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods.* 1983. Vol. 65, № 1–2. P. 55–63.
189. Zhi X. et al. The immunotoxicity of graphene oxides and the effect of PVP-coating // *Biomaterials.* 2013. Vol. 34, № 21. P. 5254–5261.
190. Mishra A.K. et al. Control drug release behavior by highly stable and pH sensitive poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(4-vinylpyridine) copolymer micelles // *Polymer (Guildf).* 2021. Vol. 213. P. 123329.
191. Yao X. et al. Platinum-Incorporating Poly(N-vinylpyrrolidone)-poly(aspartic acid) Pseudoblock Copolymer Nanoparticles for Drug Delivery // *Biomacromolecules.* 2015. Vol. 16, № 7. P. 2059–2071.
192. Kurmaz S. V. et al. Doxorubicin compositions with biocompatible terpolymer of N-vinylpyrrolidone, methacrylic acid and triethylene glycol dimethacrylate // *Mendeleev Communications.* 2023. Vol. 33, № 2. P. 255–258.
193. Kurmaz S. V. et al. Nanoscale systems folic acid—amphiphilic copolymer of N-vinylpyrrolidone with methacrylic acid, branched with triethylene glycol dimethacrylate // *Russian Chemical Bulletin.* 2023. Vol. 72, № 6. P. 1349–1365.
194. Kurmaz S. V. et al. Macromolecular Design and Engineering of New Amphiphilic N-Vinylpyrrolidone Terpolymers for Biomedical Applications // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, № 20. P. 15170.
195. Peng H. et al. Redox-responsive degradable prodrug nanogels for intracellular drug delivery by crosslinking of amine-functionalized poly(N-vinylpyrrolidone) copolymers // *J Colloid Interface Sci.* 2019. Vol. 540. P. 612–622.

196. Winninger J. et al. Micellization of novel biocompatible thermo-sensitive graft copolymers based on poly(ϵ -caprolactone), poly(N-vinylcaprolactam) and poly(N-vinylpyrrolidone) // *Eur Polym J*. 2019. Vol. 119. P. 74–82.

197. Kozlovskaya V. et al. Temperature-Responsive Polymersomes of Poly(3-methyl-N-vinylcaprolactam)-block-poly(N-vinylpyrrolidone) To Decrease Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity // *Biomacromolecules*. 2019. Vol. 20, № 10. P. 3989–4000.

198. Spváček J., Suchopárek M., Al-Alawi S. Characterization of the stereochemical structure of poly(acrylic acid) by one- and two-dimensional ^{13}C - ^1H nuclear magnetic resonance spectra // *Polymer (Guildf)*. 1995. Vol. 36, № 21. P. 4125–4130.

199. Mireles L.K. et al. Physicochemical Characterization of Polyvinyl Pyrrolidone: A Tale of Two Polyvinyl Pyrrolidones // *ACS Omega*. 2020. Vol. 5, № 47. P. 30461–30467.

200. Nechaeva A.M., Artyukhov A.A., Luss A.L., Shtilman M.I., Svistunova A.Y., Motyakin M.V., Levina I.I., Krivoborodov E.G., Toropygin I.Y., Chistyakov E.M., Tsatsakis A.M., Gurevich L., Mezhev Y.O. The Synthesis and Properties of a New Carrier for Paclitaxel and Doxorubicin Based on the Amphiphilic Copolymer of N-vinyl-2-pyrrolidone and Acrylic Acid // *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2022. Vol. 223, № 17. P. 2200081.

201. Velcer T. et al. Fluorescence study of some structural and compositional effects on the aggregation of hydrophobized hyaluronan // *Colloid Interface Sci Commun*. 2022. Vol. 51. P. 100677.

202. Do T.T., Van Hooghten R., Van den Mooter G. A study of the aggregation of cyclodextrins: Determination of the critical aggregation concentration, size of aggregates and thermodynamics using isodesmic and K₂–K models // *Int J Pharm*. 2017. Vol. 521, № 1–2. P. 318–326.

203. Artyukhov A.A., Nechaeva A.M., Shtilman M.I., Chistyakov E.M., Svistunova A.Y., Bagrov D.V., Kuskov A.N., Docea A.O., Tsatsakis A.M., Gurevich

L., Mezhuev Y.O. Nanoaggregates of Biphilic Carboxyl-Containing Copolymers as Carriers for Ionically Bound Doxorubicin // *Materials*. 2022. Vol. 15, № 20. P. 7136.

204. Ismail M. et al. Prevalence and significance of potential drug-drug interactions among cancer patients receiving chemotherapy // *BMC Cancer*. 2020. Vol. 20, № 1. P. 335.

205. Frei E. et al. The Effectiveness of Combinations of Antileukemic Agents in Inducing and Maintaining Remission in Children with Acute Leukemia // *Blood*. 1965. Vol. 26, № 5. P. 642–656.

206. Mokhtari R.B. et al. Combination therapy in combating cancer // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 23. P. 38022–38043.

207. Markman M., Mekhail T.M. Paclitaxel in cancer therapy // *Expert Opin Pharmacother*. 2002. Vol. 3, № 6. P. 755–766.

208. Sritharan S., Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin // *Life Sci*. 2021. Vol. 278. P. 119527.

209. Li Y. et al. Co-delivery of doxorubicin and paclitaxel by reduction/pH dual responsive nanocarriers for osteosarcoma therapy // *Drug Deliv*. 2020. Vol. 27, № 1. P. 1044–1053.

210. Ying N. et al. Nano delivery system for paclitaxel: Recent advances in cancer theranostics // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023. Vol. 228. P. 113419.

211. Prados J. et al. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy // *Anticancer Agents Med Chem*. 2012. Vol. 12, № 9. P. 1058–1070.

212. Peltier S. et al. Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules // *Pharm Res*. 2006. Vol. 23, № 6. P. 1243–1250.

213. Pooja D. et al. Improving Efficacy, Oral Bioavailability, and Delivery of Paclitaxel Using Protein-Grafted Solid Lipid Nanoparticles // *Mol Pharm*. 2016. Vol. 13, № 11. P. 3903–3912.

214. Zanganeh S. et al. Critical Aggregation Concentration Can be a Predictor of Doxorubicin Delivery Performance of Self-Assembling Amphiphilic Peptides with Different Hydrophobic Tails // *J Pharm Sci.* 2024.
215. Sun L. et al. Smart nanoparticles for cancer therapy // *Signal Transduct Target Ther.* 2023. Vol. 8, № 1. P. 418.
216. Wang H. et al. Enhanced anti-tumor efficacy by co-delivery of doxorubicin and paclitaxel with amphiphilic methoxy PEG-PLGA copolymer nanoparticles // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, № 32. P. 8281–8290.
217. Kuskov A.N., Luss A.L., Gritskova I.A., Shtilman M.I., Motyakin M.V., Levina I.I., Nechaeva A.M., Sizova O.Y., Tsatsakis A.M., Mezhuev Y.O. Kinetics and Mechanism of Synthesis of Carboxyl-Containing N-Vinyl-2-Pyrrolidone Telechelics for Pharmacological Use // *Polymers (Basel).* 2021. Vol. 13, № 15. P. 2569.
218. Piasentin N., Milotti E., Chignola R. The control of acidity in tumor cells: a biophysical model // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 13613.
219. Recouvreux M.V., Commisso C. Macropinocytosis: A Metabolic Adaptation to Nutrient Stress in Cancer // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017. Vol. 8.
220. Ko M., Quiñones-Hinojosa A., Rao R. Emerging links between endosomal pH and cancer // *Cancer and Metastasis Reviews.* 2020. Vol. 39, № 2. P. 519–534.
221. Borker S., Pokharkar V. Engineering of pectin-capped gold nanoparticles for delivery of doxorubicin to hepatocarcinoma cells: an insight into mechanism of cellular uptake // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018. Vol. 46, № sup2. P. 826–835.
222. Manivasagan P. et al. Doxorubicin-loaded fucoidan capped gold nanoparticles for drug delivery and photoacoustic imaging // *Int J Biol Macromol.* 2016. Vol. 91. P. 578–588.
223. Rahdar A. et al. Pluronic F127/Doxorubicin microemulsions: Preparation, characterization, and toxicity evaluations // *J Mol Liq.* 2022. Vol. 345. P. 117028.
224. Rahdar A. et al. Lignin-Stabilized Doxorubicin Microemulsions: Synthesis, Physical Characterization, and In Vitro Assessments // *Polymers (Basel).* 2021. Vol. 13, № 4. P. 641.

225. Fournier L., de La Taille T., Chauvierre C. Microbubbles for human diagnosis and therapy // *Biomaterials*. 2023. Vol. 294. P. 122025.
226. Sirsi S.R., Borden M.A. Microbubble compositions, properties and biomedical applications // *Bubble Sci Eng Technol*. 2009. Vol. 1, № 1–2. P. 3–17.
227. Tu J., Yu A.C.H. Ultrasound-Mediated Drug Delivery: Sonoporation Mechanisms, Biophysics, and Critical Factors // *BME Front*. 2022. Vol. 2022.
228. Ohta S. et al. Investigating the optimum size of nanoparticles for their delivery into the brain assisted by focused ultrasound-induced blood–brain barrier opening // *Sci Rep*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 18220.
229. Anderson D.R. et al. Albumin-based Microbubbles Bind Up-regulated Scavenger Receptors following Vascular Injury // *Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285, № 52. P. 40645–40653.
230. Du J. et al. DNA-loaded microbubbles with crosslinked bovine serum albumin shells for ultrasound-promoted gene delivery and transfection // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018. Vol. 161. P. 279–287.
231. Borrelli M.J. et al. Production of uniformly sized serum albumin and dextrose microbubbles // *Ultrason Sonochem*. 2012. Vol. 19, № 1. P. 198–208.
232. Dhara P. et al. Influence of protein nativity on the stability of bovine serum albumin coated microbubbles // *iScience*. 2024. Vol. 27, № 3. P. 109286.
233. Barmin R.A. et al. Albumin microbubbles conjugated with zinc and aluminum phthalocyanine dyes for enhanced photodynamic activity // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022. Vol. 219. P. 112856.
234. Wright T.A., Page R.C., Konkolewicz D. Polymer conjugation of proteins as a synthetic post-translational modification to impact their stability and activity // *Polym Chem*. 2019. Vol. 10, № 4. P. 434–454.
235. Dozier J., Distefano M. Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins // *Int J Mol Sci*. 2015. Vol. 16, № 10. P. 25831–25864.
236. Estifeeva T.M. Barmin R.A., Rudakovskaya P.G., Nechaeva A.M., Luss A.L., Mezhev Y.O., Chernyshev V.S., Krivoborodov E.G., Klimenko O.A., Sindeeva O.A., Demina P.A., Petrov K.S., Chuprov-Netochin R.N., Fedotkina E.P., Korotchenko

O.E., Sencha E.A., Sencha A.N., Shtilman M.I., Gorin D.A. Hybrid (Bovine Serum Albumin)/Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid)-Shelled Microbubbles as Advanced Ultrasound Contrast Agents // *ACS Appl Bio Mater.* 2022. Vol. 5, № 7. P. 3338–3348.

237. Maksimova E.A. et al. Air-Filled Microbubbles Based on Albumin Functionalized with Gold Nanocages and Zinc Phthalocyanine for Multimodal Imaging // *Micromachines (Basel)*. 2021. Vol. 12, № 10. P. 1161.

238. Mendoza-Ortega E.E., Dubois M., Krafft M.P. Fluorocarbon Gas Exposure Induces Disaggregation of Nanodiamond Clusters and Enhanced Adsorption, Enabling Medical Microbubble Formation // *ACS Appl Nano Mater.* 2020. Vol. 3, № 9. P. 8897–8905.

239. Ando Y. et al. Microbubbles with a Self-Assembled Poloxamer Shell and a Fluorocarbon Inner Gas // *Langmuir*. 2016. Vol. 32, № 47. P. 12461–12467.

240. Barmin R.A. et al. Optoacoustic/Fluorescent/Acoustic Imaging Probe Based on Air-Filled Bubbles Functionalized with Gold Nanorods and Fluorescein Isothiocyanate // *ACS Omega*. 2021. Vol. 6, № 5. P. 3809–3821.

241. Abdelouahab N. et al. Molecular Weight Determination of a Protease Extracted from *Mucor pusillus*. Comparison Methods // *Food Nutr Sci*. 2015. Vol. 06, № 03. P. 348–354.

242. Rho Y. et al. Chemically Denatured Structures of Porcine Pepsin using Small-Angle X-ray Scattering // *Polymers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 12. P. 2104.

243. Liu C.-H., Shiu Y.-L., Hsu J.-L. Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* // *Fish Physiol Biochem*. 2012. Vol. 38, № 3. P. 837–848.

244. Grdadolnik J., Marchal Y. Bovine serum albumin observed by infrared spectrometry. I. Methodology, structural investigation, and water uptake // *Biopolymers*. 2001. Vol. 62, № 1. P. 40–53.

245. Fearheller W.R., Katon J.E. The vibrational spectra of acrylic acid and sodium acrylate // *Spectrochim Acta A*. 1967. Vol. 23, № 8. P. 2225–2232.

246. Levene H.B. et al. Characterization of Albunex® // *J Acoust Soc Am*. 1990. Vol. 87, № S1. P. S69–S70.
247. Cavalieri F. et al. Ligands Tethering to Biocompatible Ultrasound Active Polymeric Microbubbles Surface // *Macromol Symp*. 2006. Vol. 234, № 1. P. 94–101.
248. Ahmed M. et al. Molecular Imaging of a New Multimodal Microbubble for Adhesion Molecule Targeting // *Cell Mol Bioeng*. 2019. Vol. 12, № 1. P. 15–32.
249. Doinikov A.A., Dayton P.A. Spatio-temporal dynamics of an encapsulated gas bubble in an ultrasound field // *J Acoust Soc Am*. 2006. Vol. 120, № 2. P. 661–669.
250. Grishenkov D. et al. In vitro contrast-enhanced ultrasound measurements of capillary microcirculation: Comparison between polymer- and phospholipid-shelled microbubbles // *Ultrasonics*. 2011. Vol. 51, № 1. P. 40–48.
251. Appold L. et al. Physicochemical Characterization of the Shell Composition of PBCA-Based Polymeric Microbubbles // *Macromol Biosci*. 2017. Vol. 17, № 10.
252. Kooiman K. et al. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery // *Adv Drug Deliv Rev*. 2014. Vol. 72. P. 28–48.