

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-6-38-43
© Коллектив авторов, 2018

О. В. Жукова, Т. Ф. Сергеева, А. И. Гаврина

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПОЛИ-ТРЕТ-БУТИЛМЕТАКРИЛАТ КАК НОСИТЕЛЬ ДОКСОРУБИЦИНА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 603950, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1;
e-mail: ov-zhukova@mail.ru

В качестве полимера-носителя доксорубина для направленного транспорта выбран поли-*трет*-бутилметакрилат (ПТБМА). Выбор связан с возможностью гидролиза с образованием водорастворимых полимеров. Использовали реакцию переноса цепи на тиогликолевую кислоту. Концентрацию тиогликолевой кислоты выбрали равной 1 масс. %, при которой получали полимер с оптимальными биосовместимыми характеристиками (молекулярная масса ≈ 12 кДа, индекс полидисперсности $M_w/M_n \approx 1,5$). Проводили химическую модификацию полимера фолатным вектором. Полученный полимер превращали кислотным гидролизом в водорастворимый сополимер. Затем получили конъюгат доксорубина (DOX) с сополимером *трет*-бутилметакрилата — сополимером *трет*-бутилметакрилата – метакриловой кислоты, модифицированный фолатным вектором по карбоксильным концевым группам. Степень связывания с полимерным DOX составляла $(62,7 \pm 11,8)$ %. Выделение DOX из полимерной системы происходит почти в 3 раза быстрее при pH 4,6, чем при pH 7,4. Цитотоксичность полимерного конъюгата составляла 1,52 мкМ.

Ключевые слова: полимерный носитель; конъюгат доксорубина; фолатный вектор.

В последние десятилетия активно разрабатываются новые способы противоопухолевой терапии. Одной из перспективных разработок в этой области являются транспортные системы селективной доставки лекарственных средств [1 – 7].

Одним из перспективных способов создания таких лекарственных средств является конструирование полимерных систем, содержащих “узнающие” компоненты (векторы).

Целью данной работы явилось получение и изучение физико-химических и цитотоксических свойств модифицированного полимерного конъюгата доксорубина на основе поли-*трет*-бутилметакрилата (ПТБМА) для направленного транспорта.

Экспериментальная часть

Для синтеза полимерного носителя использовали следующие реагенты: *трет*-бутилметакрилат (ТБМА) в качестве мономера (98 %, Aldrich); фолиевая кислота (ФК) (97 %, Fluka); N-гидроксисукцинимид (NHS) (98 %, Fluka); дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК) (98 %, Alfa Aesar); доксорубина гидрохлорид (DOX) (Teva); тиогликолевая кислота (ТГК); гексаметилендиамин (ГМДА); гидразингидрат и динитрил азо-изомасляной кислоты (ДАК) в качестве инициатора радикальной полимеризации.

ПТБМА. Для получения носителя доксорубина использовали метод радикальной полимеризации ТБМА в массе при 70 °С в присутствии $5 \cdot 10^{-2}$ М ДАК и ТГК в качестве передатчика цепи.

Полученный полимер очищали трехкратным пересаживанием из ацетона в воду, а затем сушили в вакууме до постоянной массы.

Кинетику полимеризации ТБМА изучали dilatометрическим методом, основанном на эффекте уменьшения объема системы в ходе процесса.

Молекулярно-массовые характеристики полимеров определяли методом гель-проникающей хроматографии в ТГФ при 40 °С по полиметилметакрилатным стандартам на жидкостном хроматографе Prominence LC-20VP “Shimadzu”, оборудованном 2 колонками, наполненными стирагелем с размером пор 106 и 105 Å, и дифференциальным рефрактометром.

Гидролиз ПТБМА проводили в среде диоксана в присутствии разбавленной HCl (1:2) из расчета 0,5 мл на 0,25 г полимера при температурах 60, 80 и 100 °С в колбе с обратным холодильником. Содержание звеньев метакриловой кислоты (МАК) определяли потенциометрическим кислотно-основным титрованием в смеси метанола с ТГФ 0,1 н. раствором КОН в метаноле.

Синтез фолатного вектора (ФВ) проводили карбодиимидным методом согласно описанной методике

[8, 9]. Регистрацию ИК-спектров исследуемых соединений проводили на ИК Фурье-спектрометре ФСМ 1201 (ООО Мониторинг, Санкт-Петербург) в спектральном диапазоне от 400 до 4000 см⁻¹; число сканов 32; окна КВг. Образцы готовили в виде суспензии в вазелиновом масле.

Модификация полимера ФВ по концевым группам ПТБМА проводилась в 2 последовательные стадии: реакция получения NHS-производного (полимер А) и химическая реакция взаимодействия между полимером А и ФВ (продукт — полимер Б).

Полимер А получали добавлением к раствору ПТБМА ($M_n = 12800$, $M_w/M_n = 1,35$) в ТГФ с концентрацией 0,02 г/мл, ДЦГК и NHS в мольном соотношении ПТБМА — ДЦГК — NHS = 1:1,5:1,5 и выдерживанием смеси в холодильнике в течение не менее 12 ч. Полимер Б получали при взаимодействии раствора полимера А в ТГФ с растворенным в диметилсульфоксиде (ДМСО) ФВ в эквимольном соотношении при комнатной температуре. Через 12 ч из раствора осаждением в воду выделяли полимер Б.

Синтез полимерного производного DOX проводили согласно методике следующим образом [8, 9].

УФ-спектры растворов сополимеров в ДМСО с концентрацией $4 \cdot 10^{-7}$ г/мл записывали на УФ-спектрометре Shimadzu UV 1650 DC (рабочий спектральный диапазон 190 – 1100 нм, погрешность установки длины волны 0,3 нм).

Спектры ядерного магнитного резонанса (¹H ЯМР) регистрировали на спектрометре Bruker FT-80-спектрометре (Bruker). Прибор работает на частоте 400 МГц; химические сдвиги (δ) регистрировали относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана. С этой целью CDCl₃ использовали в качестве растворителя для ПТБМА, в то время как DOX, сополимер ТБМА — МАК, конъюгат сополимера с DOX, растворяли в (d₆) ДМСО.

Элементный анализ осуществляли с использованием элементного анализатора Vario EL Cube для одновременного определения С, Н, N, S.

Степень прививки DOX к сополимеру. Степень присоединения DOX к сополимеру ТБМА — МАК — ФВ определяли фотометрически на приборе UVmini-1240 Shimadzu. Для этого получали калибровочный график зависимости оптической плотности растворов DOX (2 мг/мл) от концентрации при $\lambda = 490$ нм. Затем по величине оптической плотности исследуемого раствора (надосадочной жидкости) и калибровочному графику находили искомую концентрацию DOX, не вступившего в реакцию. Степень прививки DOX к полимеру рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{m_0 - m_x}{m_0} \cdot 100, \quad (1)$$

где P — степень прививки DOX, %; m_0 — масса всего DOX, мг; m_x — масса несвязанного DOX, мг.

Степень высвобождения DOX из полимерного носителя *in vitro*. Определение степени высвобождения

DOX проводили в буферном растворе при pH = 4,8 и 7,4 в диализаторе, ячейки которого разделены мембраной CelluSep T1, MW 3500 Да. Полимерный конъюгат растворяли в буферном растворе (2 мг/мл) и помещали в один из отсеков диализатора. В другой отсек помещали соответствующий буферный раствор. После этого диализатор помещали в термостат при 37 °С. Через определенные промежутки времени из отсека с буферным раствором отбирали пробу для определения содержания свободного DOX (все содержимое отсека) и заполняли свежим раствором.

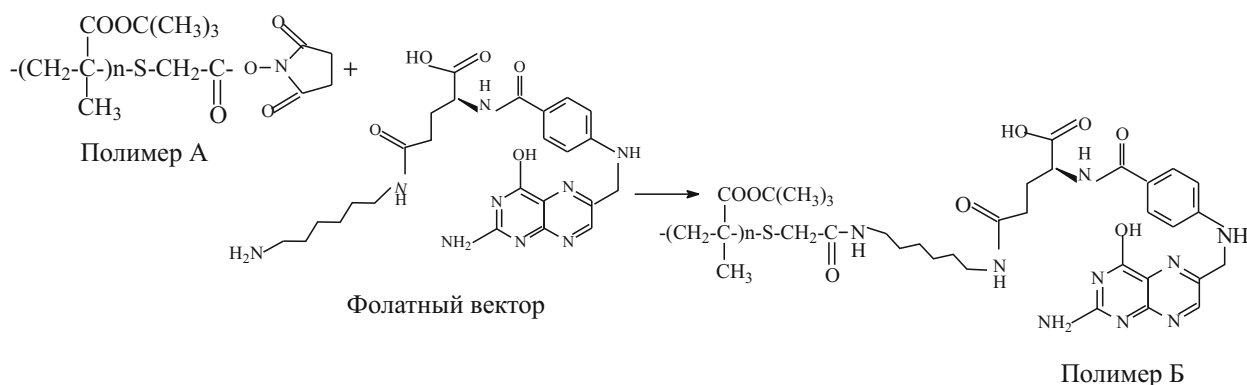
Цитотоксичность полученных систем. В работе использовали клеточную линию колоректального рака человека НСТ116. Цитотоксическое действие DOX исследовали с помощью МТТ-теста, основанного на способности митохондриальных дегидрогеназ в жизнеспособных клетках восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Измерение концентрации формазана в растворе после взаимодействия с ДМСО позволяет определить количество жизнеспособных клеток, а в цитотоксических исследованиях оценить специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным агентом [10].

Клетки НСТ116 высевали на 96-луночный планшет в количестве 2000 клеток на 1 лунку в 200 мкл среды DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащей 2 мМ глутамина, 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10 % FBS (HyClone, США), затем помещали в инкубатор на 24 ч (37 °С, 5 % CO₂). Через 1 сут исходную среду заменяли на полную среду DMEM с DOX. Концентрация варьировала от 0,005 до 200 мкМ. Через 48 ч производили смену среды на питательную среду с МТТ (0,5 мг/мл) по 100 мкл на лунку. Планшет помещали в CO₂-инкубатор на 1 ч, после чего среду отбирали и в каждую лунку прибавляли по 100 мкл раствора ДМСО. Затем измеряли оптическую плотность полученного раствора формазана в ДМСО на планшетном спектрофотометре SynergyMX (BioTek, США) при длине волны 570 нм. За 100 % выживаемость принимали интенсивность окраски в контрольных лунках с клетками, не обработанными DOX и его производными. Для исследования ответа клеток на воздействие была выбрана концентрация препарата, при которой за 48 ч жизнеспособность теряют 50 % клеток (IC₅₀).

Результаты и их обсуждение

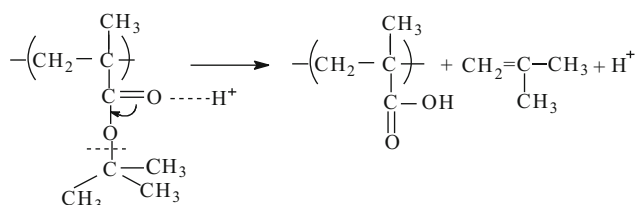
Выбор в качестве полимерного носителя ПТБМА обусловлен возможностью его гидролиза в относительно “мягких” условиях с образованием водорастворимых биосовместимых сополимеров ТБМА — МАК либо ПМАК. Поскольку молекулярная масса (ММ) небиodeградируемых полимеров не должна превышать значений почечного порога ($M_n \leq 30000$), для регулирования этого параметра мы использовали реакцию передачи цепи на ТГК, которая позволила не только

Схема 1



Получение фолат-модифицированного полимера Б.

Схема 2



Реакция кислотного гидролиза ПТБМА.

регулировать ММ, но и функционализировать макромолекулы полимера карбоксильными группами, наличие которых делает полимер пригодным для дальнейшей модификации ФК.

Для получения полимера с заданными характеристиками изучено влияние концентрации ТГК как на начальную скорость полимеризации ТБМА, так и на ММ полимера. Скорость полимеризации ТБМА снижается в 1,5 раза уже при введении 0,5 % ТГК и далее практически не зависит от концентрации передатчика цепи.

Уменьшение скорости полимеризации связано с тем, что радикал $\text{HOOCCH}_2\text{S}^*$, образующийся по реакции передачи цепи, более стабилизирован, а следовательно, менее активен, чем радикал ТБМА.

В ходе исследования определена оптимальная концентрация ТГК, которая составила 1 %. При данной концентрации за 4 ч достигается конверсия ~ 98 %, и образуется ПТБМА с оптимальными для биосовместимых полимеров характеристиками: $M_n = 12400$ и $M_w/M_n = 1,35$. Для оценки степени функционализации этого полимера концевыми карбоксильными группами был применен простой теоретический расчет при допущении, что константа передачи цепи не меняется в течение всего процесса полимеризации. Суть его состоит в следующем. Исходя из пропорции расхода 1 моль ТГК на x моль ТБМА, а $[S]_0 - [S]$ моль ТГК — на $[M]_0 - [M]$ моль ТБМА, получаем: $x = [M]_0 - [M] / ([S]_0 - [S])$, в частности, для конверсии 98 % $x = 0,98[M]_0 / ([S]_0 - [S])$. Незвестная в этом соотношении концентрация передатчика цепи $[S]$ при данной конверсии может быть рассчитана из уравнения:

$$\frac{[S]}{[S]_0} = \left(\frac{[M]}{[M]_0} \right)^{C_s} \quad (2)$$

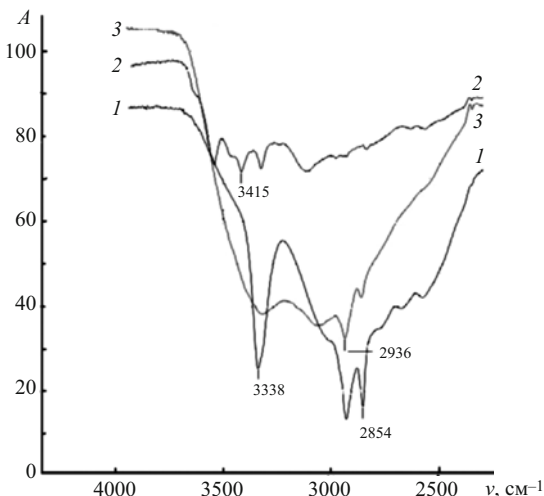


Рис. 1. ИК-спектры ГМДА (1), ФК (2) и гексаметилендиамин фолата (ФВ)(3).

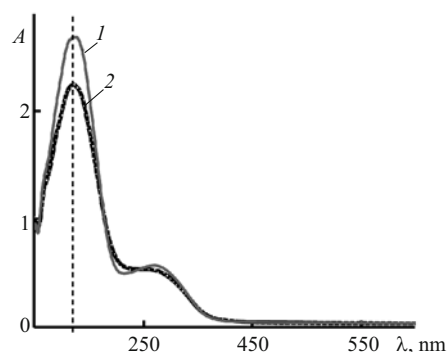
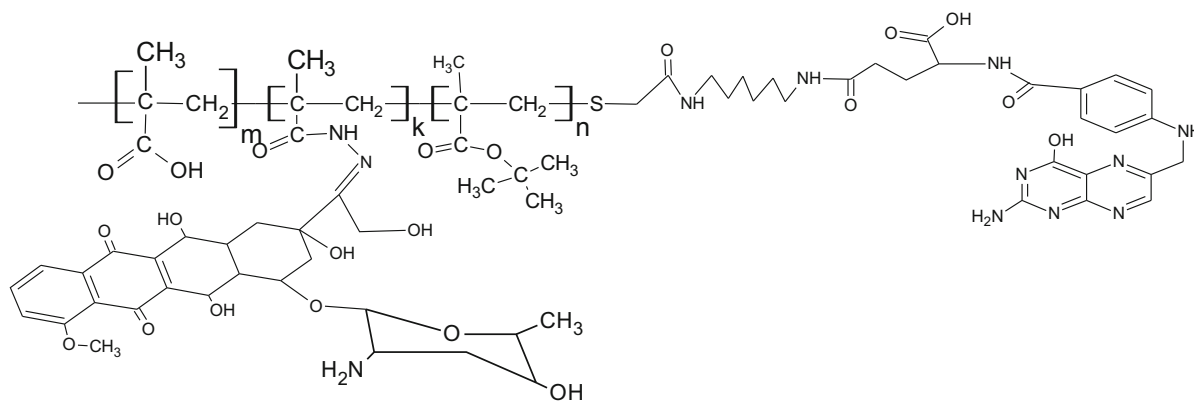


Рис. 2. УФ-спектры растворов анализируемых веществ в ДМСО ($C = 4 \cdot 10^{-7}$ г/мл): ФВ (1) (разведение в 10 раз), ФК (2) (разведение в 100 раз).

Схема 3



Полимерный конъюгат сополимера ТБМА — МАК — ФВ с DOX.

При заданных значениях $[M]_0$ и $[S]_0$, (полимеризация ТБМА в массе, 1 % ТГК) с помощью уравнения (2) получаем, что $x = 70$ моль ТБМА. Это означает, что на каждые 70 звеньев ТБМА приходится один остаток ТГК. В нашем случае при $M_n = 12400$ каждая макромолекула содержит $12400:142 = 87$ звеньев ТБМА, т.е. можно считать, что практически все макромолекулы ПТБМА функционализированы карбоксильными звеньями.

Данные расчеты подтверждаются результатами элементного анализа, содержание S составило $(0,28 \pm 0,05) \%$. Данный результат согласуется с теоретическим содержанием серы $0,26 \%$.

Теоретическое содержание серы в образце ПТБМА рассчитывали как отношение атомной массы элемента к средней молекулярной массе полимера:

$$S_{\text{теор}} = \frac{32}{12400} \cdot 100 \%$$

Наличие свободной карбоксильной группы было использовано для модификации полимера ФК, которая является вектором к опухолевым клеткам. Для этого карбодимидным методом карбоксильные группы ПТБМА были превращены в гидроксисукцинимидные

Данные УФ-спектроскопии DOX $4 \cdot 10^{-7}$ г/мл (разведение в 100 раз), сополимера ТБМА — МАК = 20:80 масс. % $4 \cdot 10^{-7}$ г/мл и конъюгата ТБМА — МАК) — DOX — ФВ $4 \cdot 10^{-7}$ г/мл

Анализируемое соединение	Характерные пики	
	289 нм, ФВ	широкий пик 480 – 500 нм $\lambda_{\text{max}} = 480$ нм или $\lambda_{\text{max}} = 490$ нм в зависимости от растворителя и pH среды DOX
Сополимер ТБМА — МАК = 20:80, масс. %	–	–
Конъюгат (ТБМА — МАК — ФВ — DOX)	+	+
		$\lambda_{\text{max}} = 503$ нм (батохромный сдвиг)
DOX	–	+
		$\lambda_{\text{max}} = 483$ нм $\lambda_{\text{max}} = 500$ нм

(полимер А), а из ФК получен ФВ — гексаметилендиамин фолат по реакциям взаимодействия ФК с NHS, ДЦГК и ГМДА. Доказательством образования последнего являются данные ИК-Фурье спектроскопии (рис. 1). Видно, что в спектре гексаметилендиамин фолата имеются полосы, отвечающие валентным колебаниям метиленовых групп молекулы ГМДА в области 2854 и 2936 см^{-1} , которых нет в спектре ФК.

Для ФВ, как и для ФК, характерен выраженный пик при $\lambda = 289$ нм (рис. 2).

Затем полимер А превращали в полимер Б — ПТБМА с концевыми группами ФК (схема 1).

Изучена кинетика кислотного гидролиза ПТБМА для получения биосовместимого полимера, содержащего звенья МАК. Как видно из схемы 2, гидролиз ПТБМА носит автокаталитический характер и является необратимым процессом по причине выделения газообразного изобутилена.

Для оценки энергии активации этого процесса проведены исследования при $60, 80$ и $100 \text{ }^\circ\text{C}$. На основании одного из основных уравнений химической кинетики, уравнения Аррениуса, определяющего зависимость скорости реакции от температуры было рассчитано значение энергии активации кислотного гидролиза ПТБМА $E_a = (9,34 \pm 0,08) \text{ кДж/моль}$ (рис. 3). Такая низкая величина E_a может указывать на диффузионный контроль процесса. Увеличить ско-

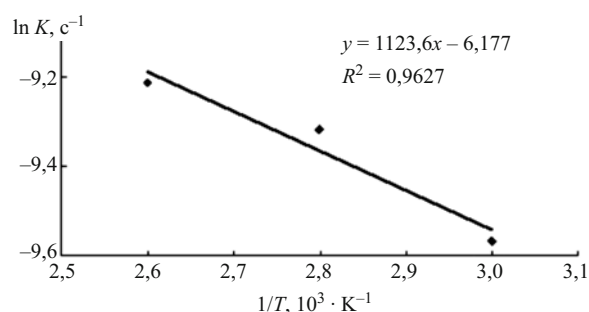


Рис. 3. Зависимость константы скорости реакции гидролиза ПТБМА от температуры в Аррениусовских координатах.

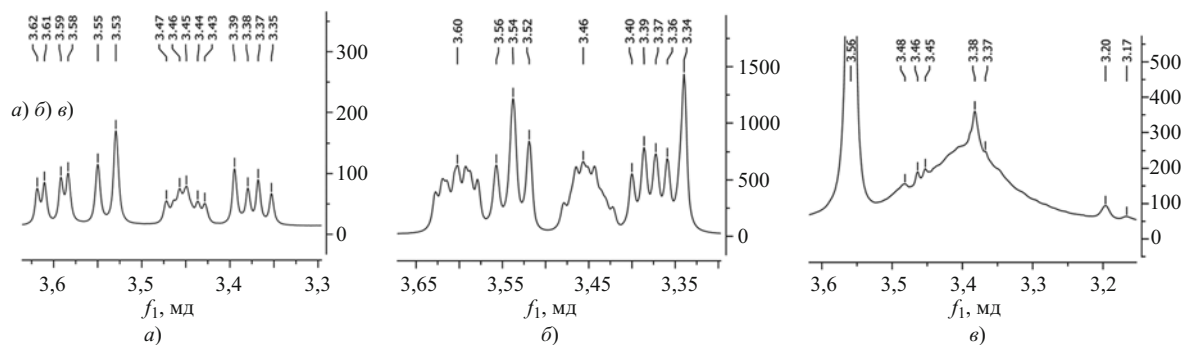


Рис. 4. Фрагменты ЯМР-спектров ТБМА — МАК — ФВ — DOX (а), DOX (б), ТБМА — МАК (в)

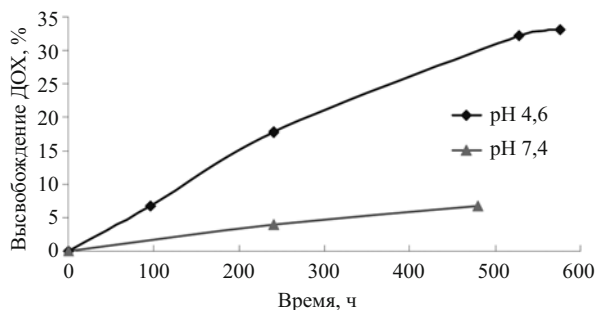


Рис. 5. Степень высвобождения DOX из полимерного конъюгата.

рость реакции возможно перемешиванием среды, снижая диффузионные затруднения.

Подтверждением наличия в сополимере концевого остатка в виде ФВ, не разрушающегося в результате гидролиза, являются данные ЯМР-спектроскопии. В ЯМР-спектре модифицированного ФВ сополимера появляются пики при 1,23; 1,26 м.д., которые наблюдаются в ЯМР-спектре ФВ и отсутствуют в спектре “чистого” сополимера. В спектре ФВ регистрируются пики при 2,36, 2,39 и 2,40 м.д., а также при — 7,12; 7,22; 7,34 м.д., которые имеют место и в спектре модифицированного сополимера (2,38; 2,39; 2,41 и 7,02; 7,15; 7,28 м.д. соответственно).

Полученный сополимер ТБМА — МАК (20:80 масс. %) использован в качестве носителя для противоопухолевого средства DOX. Для этого проводили химическую “прививку” по реакции карбоксильных групп, предварительно модифицированных гидразидом, получая полимерный конъюгат DOX.

Аналогично получен конъюгат DOX с сополимером ТБМА — МАК, модифицированным ФВ по конечным карбоксильным группам (схема 3).

Свидетельством образования конъюгата, имеющего в своем составе ФВ и DOX, являются данные УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии.

Согласно результатам УФ-спектроскопии, в полимерном конъюгате (ТБМА — МАК) — DOX — ФВ появляется выраженный пик при $\lambda = 289$ нм, который характерен для ФК и ФВ. Этот пик отсутствует в спектрах соединений, не имеющих в своем составе ФВ (таблица).

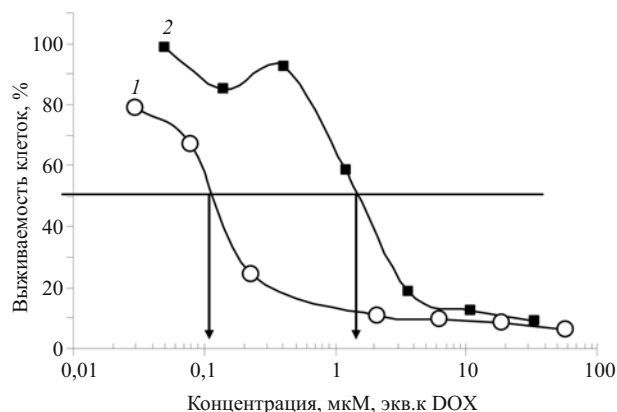


Рис. 6. Цитотоксичность DOX (1), ТБМА — МАК — ФВ — DOX (2) относительно клеток НСТ116.

Смещение длины волны максимума пика полимерного производного DOX объясняется образованием гидразоновой связи между гидразидом полимерного производного и тетрациклического антрахиноидного агликаона DOX.

Также подтверждением образования конъюгата сополимера ТБМА — МАК — ФВ с DOX являются данные ЯМР-спектроскопии (рис. 4). Кривая ЯМР-спектра конъюгата в области 3,35 – 3,62 повторяет ЯМР-спектр DOX.

Степень привязки DOX к полимерному носителю составила $(62,7 \pm 11,8)$ %.

Исследования по определению степени высвобождения DOX из полимерного носителя в условиях, имитирующих биосреду, показали, что высвобождение лекарственного вещества происходит быстрее почти в 3 раза при pH = 4,6 нежели при pH = 7,4 (рис. 5).

Цитотоксическое действие конъюгата оценено на клеточной линии колоректального рака человека НСТ116 с помощью МТТ-теста. “Чистый” DOX использовался в качестве контроля. Уровень устойчивости клеток определяли по концентрации DOX, при которой наблюдается гибель 50 % клеток ($IC_{50}^{DOX} = 0,12$ мкМ; $IC_{50}^{ТБМА-МАК-ФВ-DOX} = 1,52$ мкМ (в эквиваленте к DOX) (рис. 6).

Цитотоксичность конъюгата была ниже по сравнению с “чистым” DOX. Об этом сообщалось и ранее для других полимерных конъюгатов DOX [11, 12].

Данное обстоятельство связано с низкой скоростью поглощения (эндоцитоз) полимерного конъюгата по сравнению со свободным лекарственным средством, которое способно диффундировать через мембрану вследствие своей малой ММ. Также определенное время необходимо для эндосомальной/лизосомальной активации полимерного носителя, которая заключается в гидролизе гидронозной связи в кислой среде и выделении свободного DOX.

В исследовании использованы данные, полученные на оборудовании центра коллективного пользования “Аналитический центр ИМХ РАН” (Нижний Новгород).

Выражаем благодарность за помощь в получении ИК-спектров образцов О. В. Кузнецовой, к.х.н., старшему научному сотруднику лаборатории физико-химических методов анализа ИМХ РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Nori, K. D. Jensen, M. Tijerina, et al., *Bioconjugate Chem.*, **14**, 44 – 50 (2003).
2. A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz, *Clin. Pharm.*, **42**, 419 – 436 (2003).
3. H. S. Yoo, K. H. Lee, J. E. Oh, T. G. Park, *J. Control. Rel.*, **68**, 419 – 431 (2000).
4. Y. Bae, T. A. Diezi, A. Zhao, G. S. Kwon, *J. Control. Rel.*, **122**, 324 – 330 (2007).
5. M. L. Adams, A. Lavasanifar, G. S. Kwon, *J. Pharm. Sci.*, **92**, 1343 – 1355 (2003).
6. G. Gaucher, R. H. Marchessault, J. C. Leroux, *J. Contr. Rel.*, **143**(1), 2 – 12 (2010).
7. R. Duncan, *Nat. Rev. Cancer.*, **6**(9), 688 – 701 (2006).
8. O. Zhukova, S. Bulgakova, *J. App. Pharm. Sci.*, **6**(7), 20 – 26 (2016).
9. O. Zhukova, S. Bulgakova, *Pharm. Chem. J.*, **48**(12), 813 – 817 (2015).
10. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.*, **65**(1 – 2), 55 – 63 (1983).
11. F. M. Veronese, O. Schiavon, G. Pasut, et al., *Bioconjugate Chem.*, **16**, 775 (2005).
12. N. Lavignac, J. L. Nicholls, P. Ferruti, R. Duncan, *Macromol. Biosci.*, **9**, 480 – 487 (2009).

Поступила 22.03.17

MODIFIED POLY(*tert*-BUTYLMETHACRYLATE) AS DOXORUBICIN CARRIER FOR TARGETED TRANSPORT

O. V. Zhukova*, T. F. Sergeeva, and A. I. Gavrina

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, 603950 Russia;

* e-mail: ov-zhukova@mail.ru

Poly(*tert*-butylmethacrylate) (PTBMA) is proposed as polymeric carrier of doxorubicin (DOX) for targeted transport. This choice is associated with the possibility of hydrolysis to form water-soluble polymers and the reaction of chain-transfer to thioglycolic acid used for the control of this process. The concentration of thioglycolic acid was selected equal to 1 wt. %, at which the conversion reaches ~ 98 % for 4 h and PTBMA was formed with optimum characteristics for biocompatible polymer, including molecular weight M_w 12 kDa the polydispersity index M_w/M_n 1.5. Then the polymer converted by acid hydrolysis into a water-soluble copolymer. The activation energy of the acid hydrolysis PTBMA was $E_a = 9.34 \pm 0.08$ kJ/mol. Finally, DOX conjugate was obtained with copolymer of *tert*-butylmethacrylate – methacrylic acid modified by folate vector on terminal carboxyl groups. The degree of DOX binding to the polymer was 62.7 ± 11.8 %. The DOX release is faster about 3 times at pH 4.6 than at pH 7.4. The cytotoxicity of the polymer conjugate was 1.52 mM (equivalent to DOX).

Keywords: polymer carriers; doxorubicin conjugate; folate vector.