Введение Одной из актуальных проблем современной биомедицинской химии является создание веществ, способных селективно захватывать, транспортировать в целевые органы и высвобождать лекарственные препараты, имеющие малую биодоступность. Инкапсулирование подобных лекарств является наиболее перспективным и дешевым способом улучшения их фармацевтического действия. Например, известный антираковый препарат доксорубин чрезвычайно эффективен, но обладает низкой биодоступностью. Улучшить биодоступность доксорубина можно заключив его в биodeградируемые и нетоксичные макромолекулярные наноконтейнеры. Гиперразветвленные полимеры (ГРП) являются наиболее подходящими системами для этих целей. Это обусловлено большим количеством функциональных групп на поверхности макромолекулы и уникальной сферической структурой ГРП [1-3]. Так гиперразветвленные полиэфиры на основе 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовой кислоты (2,2-бис-МПА), вследствие небольшого размера мономерных звеньев обладают плотной упаковкой терминальных ОН-групп, но в то же время их ядро стерически не загружено. Синтез ГРП существенно менее трудоемок по сравнению с синтезом аналогичных по строению дендримеров [4]. В данной работе в качестве исходной платформы был использован коммерческий гиперразветвленный полиэфиropолиол Boltorn H третьей генерации (рис.1). Модификация терминальных ОН-групп гиперразветвленного полиэфиropолиола различными функционализирующими реагентами является одним из самых эффективных методов вариации его структуры и свойств [5]. В результате такой модификации были синтезированы гиперразветвленные системы, содержащие карбоксильные, amino-, амидо и силиламинные терминальные фрагменты, фосфор-, серо- и фторсодержащие группировки [6-10]. Модифицированные гиперразветвленные полиэфиры приобретают способность к самосборке и образованию нанокапсул, способных удерживать лекарственные вещества. Таким образом, целью настоящей работы является синтез производных гиперразветвленных полиэфиropолиолов и оценка их способности связывать фармацевтические агенты, в том числе антираковые препараты. Рис. 1 - Структура гиперразветвленного полиэфиropолиола Boltorn H30 (1) Экспериментальная часть В качестве платформ для синтеза функционализированных гиперразветвленных полиэфиров использован Boltorn H30 (1) на основе этоксилированного пентаэритрита (ядро) и диметилпропионовой кислоты в качестве мономера (32 гидроксильных группы, $M_r=3608$ г/моль, гидроксильное число 525 мг/г КОН, $t_{пл.}=140-1450C$) . Модифицирующим агентом являлся малеиновый ангидрид (Alfa Aesar 99%). В синтезе были использованы органические растворители: диэтиловый эфир, ацетон, 1,4-диоксан, изопропиловый спирт и бензол, очищенные согласно стандартным методикам [11]. Содержание карбоксильных групп определяли титрованием растворенной

навески исследуемого вещества 0.1 н. водно-ацетоновым (1:1) раствором щелочи по методике [12]. В качестве противоопухолевого антибиотика использовался (8S-цис)-10-(3-амино-2,3,6-тридезокси-альфа-L-ликсогексо-пиранозил)окси-7,8,9,10-тетра-гидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксилацетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион (Доксорубин (DOX)), код АТХ L01DB01 фирмы TEVA Pharmaceutical Industries (Israel) Методика синтеза полиэфирополиакриловых кислот $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$ Навеску Voltorn Н30 (1) 4 г нагревали до 1400С, охлаждали до 500С и затем растворяли в 10 мл ацетона (15 мл диоксана). К нагретому раствору Voltorn Н30 добавляли 1.32 г (2), 2.64 г(3), 3,12 г(4)) малеинового ангидрида, растворенного в 5 мл ацетона(2) или 6 мл диоксана (3,4) при мольных соотношениях 1:12, 1:24 и 1:28. Смесь перемешивали при температуре кипения растворителя 560С в течение 14 часов для мольного соотношения 1:12 и 98 0С для мольных соотношений 1:24 и 1:28 в течение 28 и 42 часов соответственно. После охлаждения смесь обрабатывали бензолом, образовавшийся желто-белый продукт отделяли и высушивали в вакууме. Получили 2.70 г (выход 67.56%) соединения (2), 2.70 г (выход 72.62%) соединения (3) и 2.35 г (выход 58.95%) соединения (4) в виде белых аморфных веществ. Спектральные характеристики полученных соединений: Соединение (2) $\text{ВН30}(\text{CH}=\text{CHCOOH})_{12}$: ИК спектр, ν , см⁻¹ : 3394 (ОНсвяз); 2978(CH_3as ,); 2945, 2883 (CH_2as , CH_2s); 1721 (C=O); 1643(C=C), 1465 (деформационные CH_3s); 1375 (деформационные CH_2s); 1214 (C-O); 1119 (O-C)эфир. Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 1,14, 1,21, 1,32 уш.с (OC(O)CCH₃); 3.63-3.72 м (OCH₂CH₂); 4,11, 4,13 (C(CH₂OC)₄); 4,28-4,30 м (CH₂OC(O)); 6,40 с (-CH=CH-). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 18,1, 19,4, 20,7 (-CH₃); 43,7 (C(CH₂OC)₄); 50,5 (H₃C-C(CH₂)₂); 64.9-68.9 (-CH₂-);132,1 (-CH=CH-); 175,1 (-C=O). Соединение (3) $\text{ВН30}(\text{CH}=\text{CHCOOH})_{24}$: ИК спектр, ν , см⁻¹: 3423 (ОНсвяз); 2974(CH_3as ,); 2941, 2883 (CH_2as , CH_2s); 1725 (C=O); 1643(C=C), 1465 (деформационные CH_3s); 1371 (деформационные CH_2s); 1218 (C-O); 1119 (O-C)эфир Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 1,14, 1,21, 1,32 уш. с (OC(O)CCH₃); 3.63-3.72 м (OCH₂CH₂); 4,11, 4,14 (C(CH₂OC)₄); 4,28-4,30 м (CH₂OC(O)); 6,40 с (-CH=CH-). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 17,1, 18,4, 19,7 (-CH₃); 42,7 (C(CH₂OC)₄); 49,5 (H₃C-C(CH₂)₂); 64.0-67.6 (-CH₂-);133,2 (-CH=CH-); 174,2 (-C=O). Соединение (4) $\text{ВН30}(\text{CH}=\text{CHCOOH})_{28}$: ИК спектр, ν , см⁻¹: 3452 (ОНсвяз); 2978(CH_3as ,); 2949, 2891 (CH_2as , CH_2s); 1721 (C=O); 1638(C=C), 1466 δ (CH_3s); 1375 δ (CH_2s); 1222 (C-O); 1119 (O-C)эфир Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 1,13, 1,21, 1,32 уш. с (OC(O)CCH₃); 3.64-3.71 м (OCH₂CH₂); 4,11, 4,14 (C(CH₂OC)₄); 4,28-4,33 м (CH₂OC(O)); 6,41 с (-CH=CH-). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 18,1, 19,4, 20,7 (-CH₃); 43,8 (C(CH₂OC)₄); 50,5 (H₃C-C(CH₂)₂); 64.9-67.8 (-CH₂-);133,6 (-CH=CH-); 175,2 (-C=O). Методика формирования совместных агрегатов в системах $\text{ВН30}(\text{COOH})$ -DOX Для приготовления бинарных смесей $\text{ВН30}(\text{COOH})_x$ -DOX использовался бидистиллят. В мерную колбу на 10мл вносили постоянную навеску доксорубина (0.46мМ), затем приливали от 25 мкл до 5 мл раствора гиперразветвленной

полиэфирополиакриловой кислоты с концентрацией 1 мМ. Растворы доводили до 10 мл бидистиллированной водой и фильтровали через мембранные фильтры "Millipore" с диаметром пор 0.45 мкм для удаления пыли. Определение степени связывания доксорубина. Оценку степени связывания доксорубина проводили в бинарных системах ВН30(СООН)х-DOX. Для определения степени связывания осуществляли серию экспериментов по определению оптической плотности при $\lambda = 485$ нм в бинарных смесях при постоянной концентрации доксорубина и переменной концентрации ВН30(СООН)х. Концентрацию связавшегося доксорубина находили по разности между их исходной и оставшейся в растворе концентрациями методом спектрофотометрии по градуировочному графику: Концентрацию связавшегося доксорубина определяли по формуле: Исходя из количественного значения связанного доксорубина, рассчитывается степень связывания (%). Аппаратура ИК-спектры поглощения веществ регистрировали на ИК Фурье-спектрометре, Spectrum 400 (Perkin Elmer) с приставкой НВПО Алмаз KRS-5: разрешение 4 см⁻¹, накопление 5 сканов, время регистрации 16 с, диапазон съёмки 4000-400 см⁻¹. Электронные спектры поглощения снимали на спектрофотометре Lambda 750 (Perkin Elmer, UK) в области длин волн 190-1000 нм, при T=25±0.01°C с использованием термостатирующей системы, включающей термостатируемый держатель кювет, проточный термостат Julabo MB-5A и термостат Пельте РТР-1. Для измерения использовали кварцевые кюветы, толщина которых равна 1 см. Точность измерения оптической плотности (A) составляла ±1%. Спектры ЯМР в (CD₃)₂СО были записаны на многофункциональном спектрометре ЯМР с Фурье-преобразованием "Avance 400" (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц на ядрах ¹H и 125.77 МГц на ядрах ¹³C. Размеры частиц измеряли методом динамического рассеяния света на анализаторе наночастиц «Malvern Zetasizer Nano» фирмы «Malvern» (Великобритания). Измерения проводили при угле рассеяния 1730. Перед измерениями образцы фильтровали через мембранные фильтры "Millipore" с диаметром пор 0.45 мкм для удаления пыли. Автокорреляционные функции флуктуаций интенсивности рассеянного света анализировали с использованием метода кумулянтов, позволяющего оценить распределение агрегатов по размерам (ISO 13321:1996). Кислотное число (КЧ) определяли методом рН-метрического титрования по методике [12]. Обсуждение результатов Модификацией платформы гиперразветвленного полиэфирополиола третьей генерации Boltorn H30 малеиновым ангидридом синтезированы полидентатные гиперразветвленные полиэфирополикарбоновые кислоты (соединения 2, 3, 4), содержащие фрагменты акриловой кислоты в терминальном положении (схема 1). Схема 1 Чистоту полученных продуктов контролировали методом ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье и ЯМР спектроскопии на ядрах ¹³C и ¹H. В спектрах ЯМР ¹H соединений (2-4) сигналы протонов этенильного фрагмента -CH=CH- находятся в цис-положении, что соответствует наличию

синглета при δ_{H} 6.42 м.д. во всех соединениях. В спектре ^{13}C сигналы данных протонов проявляются в виде дублета при резонансных частотах δ_{C} 130.9 м.д., δ_{C} 130.7 м.д. Кислотное число (КЧ) и содержание кислотных групп (n) в синтезированных соединениях определяли рН-метрическим титрованием по стандартной методике [12] (табл.1). Таблица 1 - Характеристики полиэфирополиакриловых кислот (n = 3, $\rho = 0.95$)

Соединение, №	Степень функционализации (f,%)	Кислотное число, мг КОН/г COOH , %
(2)	56.3	137.7 ± 6.9
(3)	11.1 ± 0.55	74.7 ± 5.1
(4)	22.2 ± 0.74	271.4 ± 5.1
(4)	87.5	315.7 ± 3.1
(4)	24.8	24.8 ± 0.16

Гиперразветвленные полиэфирополиакриловые кислоты (2-4) обладают способностью к самоассоциации с образованием агрегатов [13, 14], поэтому они могут быть использованы в качестве инкапсулирующих реагентов для фармацевтических препаратов. В качестве объекта для инкапсуляции был выбран лекарственный препарат доксорубин (DOX) (рис. 2). Рис. 2 - Структурная формула противоопухолевого антибиотика доксорубин. Данный цитостатический препарат относится к антибиотикам антрациклинового ряда, производится из даунорубина или продуцируется микроорганизмами *Streptomyces coeruleorubidus*, оказывает антимикотическое и антипролиферативное воздействие, эффективно воздействует более чем на 20 видов раковых опухолей, включая такие распространенные как рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак желудка, саркома мягких тканей, рак яичников [15, 16]. Набор функциональных групп (ОН, С=О и COOH группами) в синтезированных гиперразветвленных полиэфирополикислотах обеспечивает комплиментарность их взаимодействия со структурными фрагментами доксорубина (ОН, С=О и NH_2 группы), следовательно, связывание лекарственного препарата. Метод УФ/ВИД спектрофотометрии был выбран для оценки связывания доксорубина в бинарных системах $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{12}\text{-DOX}$, $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{24}\text{-DOX}$ и $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{28}\text{-DOX}$. Электронный спектр поглощения доксорубина содержит два максимума (рис.3). Рис. 3 - Электронные спектры поглощения в бинарной системе $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{24}\text{-DOX}$ в водном растворе, $\text{C}_{\text{DOX}} = 0.46$ мМ. Первый максимум при длине волны 290 нм и второй максимум при длине волны 450 нм имеет два плеча при 485 и 525 нм. Введение в раствор гиперразветвленных полиэфирополиакриловых кислот $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{12}$, $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{24}$ и $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{28}$ доксорубина приводит к уменьшению оптической плотности при всех длинах волн. Для оценки связывания доксорубина в бинарных системах $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{12}\text{-DOX}$, $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{24}\text{-DOX}$ и $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{28}\text{-DOX}$ была изучена зависимость оптической плотности водных растворов, содержащих постоянную концентрацию DOX (0.46 мМ) при различной концентрации $\text{ВН}(\text{COOH})_x$ (табл. 2). Установлено, что наиболее эффективное связывание доксорубина наблюдается для системы $\text{ВН}_{30}(\text{COOH})_{24}$. Для данной системы связывание доксорубина происходит при всех концентрациях полимера с максимальным значением при соотношении полимер : доксорубин

равном 1 : 46. Таблица 2 - Зависимость оптической плотности (А) в бинарных системах ВН30(СООН)х-DOX от концентрации ВН30(СООН)х при $\lambda=485$ нм

Концентрация ВН30(СООН)х, моль/л	ВН30(СООН)12	ВН30(СООН)24	ВН30(СООН)28
2×10^{-7}	0.726	0.542	1.652
5×10^{-7}	0.528	0.487	1.598
7×10^{-7}	0.549	0.490	1.464
1×10^{-6}	0.670	0.489	1.522
$2,5 \times 10^{-6}$	0.438	0.438	1.521
5×10^{-6}	0.732	0.538	1.579
7×10^{-6}	0.952	0.652	1.622
1×10^{-6}	1.025	0.565	Опалесцирует
1×10^{-6}	0.854	0.685	1.622
2×10^{-6}	Опалесцирует	0.679	1.272

В свою очередь, в бинарной системе ВН30(СООН)12-DOX также наблюдается связывание DOX при любых концентрациях полимера, которое при соотношении 1:46 достигает максимальной эффективности. В бинарной системе ВН30(СООН)28-DOX наиболее эффективное связывание лекарственного препарата приходится на соотношение 1:23. Данные спектрофотометрии использованы для расчета степени связывания доксорубицина полимерной капсулой, которая составила для ВН30(СООН)12, ВН30(СООН)24 и ВН30(СООН)28 80%, 78% и 47% соответственно (рис 4.). Для оценки размеров совместных агрегатов в системах ВН30(СООН)х/DOX был использован метод динамического светорассеяния. Методом динамического светорассеяния зафиксировано образование совместных агрегатов ВН30(СООН)х- DOX во всех системах с размерами от 30 до 200 нм (рис. 5). Для систем ВН30(СООН)12-DOX и ВН30(СООН)24-DOX в областях концентраций полимера 0.01 мМ – 0.05 мМ наблюдается наименьший разброс частиц по размеру, что однозначно говорит об образовании стабильных агрегатов. С ростом концентрации размер и разброс совместных агрегатов возрастает. Однако в системе ВН30(СООН)28-DOX наблюдается резкое уменьшение размеров агрегатов с 1000 нм до 50 с ростом концентрации ВН30(СООН)х. Рис. 4 - Зависимость степени связывания доксорубицина от концентрации ВН30(СООН)х Рис. 5 - Зависимость среднего гидродинамического диаметра в системах ВН30(СООН)х/DOX от концентрации полимера При дальнейшем росте концентрации размер агрегатов и их разброс меняются слабо. Из этого следует что, насыщение ВН30(СООН)х доксорубицином происходит во всем диапазоне концентраций, а совместные агрегаты устойчивы. Таким образом, синтезированы новые гиперразветвленные полиэфирополиакриловые кислоты третьей генерации ВН30(СООН)х, содержащие 12, 24 и 28 фрагментов акриловой кислоты в терминальных положениях. Доказано, что ВН30(СООН)х способны связывать антираковый препарат доксорубицин. Эффективность связывания возрастает в ряду производных ВН30(СООН)28 - ВН30(СООН)24 - ВН30(СООН)12, что можно объяснить оптимальным соотношением в молекуле полимера (2) гидроксильных и карбоксильных групп, обеспечивающим наиболее сильное взаимодействие с комплементарными функциональными группами доксорубицина. Гиперразветвленные полиэфирополиакриловые кислоты ВН30(СООН)х потенциально могут быть использованы в качестве эффективных переносчиков

доксорибуцина, обеспечивая его биодоступность.