

УДК 541.64.536.7:532.77

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ПОЛИМЕРЫ С НИЖНЕЙ КРИТИЧЕСКОЙ ТЕМПЕРАТУРОЙ СМЕШЕНИЯ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ДРУГИХ ВЕЩЕСТВ

© 1993 г. Л. И. Валуев, О. Н. Зефирова, И. В. Обыденнова, Н. А. Платэ

Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчева Российской академии наук
117912 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 17.06.92 г.

Предложен новый подход к направленному термоактивируемому транспорту химических агентов и физиологически активных веществ, заключающийся в иммобилизации этих веществ на водорастворимых полимерах с нижней критической температурой смешения и нагревании места локализации выше критической температуры. Подход экспериментально проверен на примере трипсина, иммобилизованного на сополимерах N-изопропилакриламида, акриламида и N-акрилоилфталимида.

Одной из наиболее важных проблем, связанных с управлением сложными химическими и биохимическими процессами, является избирательное концентрирование из многокомпонентного раствора только одного из растворенных соединений. К таким соединениям могут относиться катализаторы, один из реагентов или один из продуктов реакции, удаление которых может изменять скорость реакции или даже ее направление. Частный и наиболее важный случай данной проблемы – избирательное концентрирование лекарственного вещества в определенном органе-мишени живого организма. Необходимость решения этой задачи определяется не только экономическими соображениями (в условиях обычного применения до 90% лекарства расходуется зря, не действуя на очаг поражения [1]), а главным образом тем обстоятельством, что многие высокоактивные препараты, например некоторые ферменты, цитостатики и т.д., токсичны по отношению к здоровым тканям.

В основе большинства подходов к созданию препаратов направленного действия лежит совместная иммобилизация на растворимом полимере-носителе лекарственного вещества и молекулы-вектора, специфически взаимодействующей с пораженным органом [2]. Сложность этого подхода заключается в том, что для каждого конкретного лекарства и органа-мишени необходимо искать, выделять и иммобилизовать свои молекулы-векторы.

Концентрирование препарата может быть достигнуто также с использованием внешних физических воздействий, например магнитного поля [3]. В таком случае лекарственное вещество

иммобилизуют на носителе, обладающем ферромагнитными свойствами.

Цель настоящей работы – разработка подхода к созданию универсальной системы для направленного транспорта разнообразных веществ на основе термочувствительных полимерных систем с НКТС. Использование термоактивации в качестве движущей силы процесса транспорта, например, лекарства, представляется достаточно перспективным, поскольку в зонах воспаления или новообразований нередко наблюдается местное повышение температуры, что должно обеспечить самопроизвольное концентрирование лекарства в этих зонах [4]. Кроме того, почти всегда существует возможность локального нагревания органа-мишени и принудительного транспорта лекарства в органы.

В литературе описано довольно много полимерных систем с НКТС. Наибольшее внимание исследователей привлекают полимерные гидрогели, способные к резкому и обратимому изменению объема в узком интервале температур. Последнее используют для регулирования скоростей каталитических реакций [5], контролируемого выделения физиологически активных соединений [6] и т.д. Между тем не меньший интерес должны вызывать и растворимые макромолекулярные системы с НКТС, способные к скачкообразному изменению конформации и плотности полимерного клубка в области НКТС.

В настоящей работе в качестве полимерных носителей были использованы водорастворимые сополимеры N-изопропилакриламида (N-ИПАА) с N-акрилоилфталимидом (N-АФИ) или тройные сополимеры N-ИПАА, N-АФИ и акриламида, а в

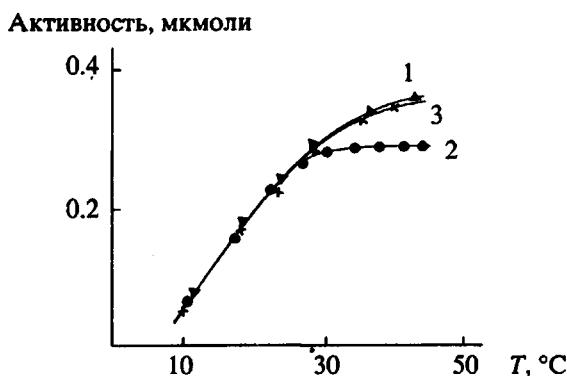


Рис. 1. Зависимость активности трипсина от температуры. 1 – нативный трипсин; 2 – трипсин, иммобилизованный на сополимере N-ИПАА с N-АФИ; 3 – трипсин, иммобилизованный на сополимере акриламида с N-АФИ.

качестве модельного препарата – протеолитический фермент трипсин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сополимеризацию N-ИПАА с N-АФИ проводили в ДМФА при 80°C в течение 8 ч (инициатор азо-бис-изобутиронитрил). Сополимеры выделяли после испарения ДМФА переосаждением в системе ацетон-гексан. Тройные сополимеры акриламида, N-ИПАА и N-АФИ получали в водном растворе под действием окислительно-восстановительной системы N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин-персульфат аммония и выделяли методом гель-фильтрации на Сефадексе G-10.

Для иммобилизации трипсина в раствор сополимера в 0.1 м. *tris-HCl* буфере (pH = 8.0) вводили раствор трипсина в 0.001 м. HCl и перемешивали 6 ч при комнатной температуре, добавляя в реакционную смесь хлорид кальция для предотвращения автолиза трипсина. Коньюгат отделяли от непрореагировавшего фермента гель-фильтрацией на Сефарозе 4B.

НКТС сополимеров определяли из кривой зависимости пропускания ($\lambda = 500$ нм) растворов со-

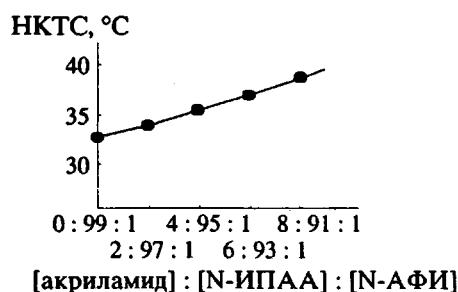


Рис. 2. Зависимость НКТС водных растворов сополимеров N-ИПАА с N-АФИ и акриламидом от состава сополимеров.

полимеров от температуры, полученной на спектрофотометре "HITACHI U-3410" с терморегулируемой приставкой (скорость нагревания и охлаждения кювет состояла 1 град/мин) [7].

Активность нативного и иммобилизованного трипсина определяли по степени гидролиза специфического субстрата в 0.05 м. *tris-HCl* (pH = 8.0) буфере. При определении активности по методу Какадэ [8] в качестве субстрата использовали *n*-нитроанилид-N- α -бензоил-D,L-аргинин.

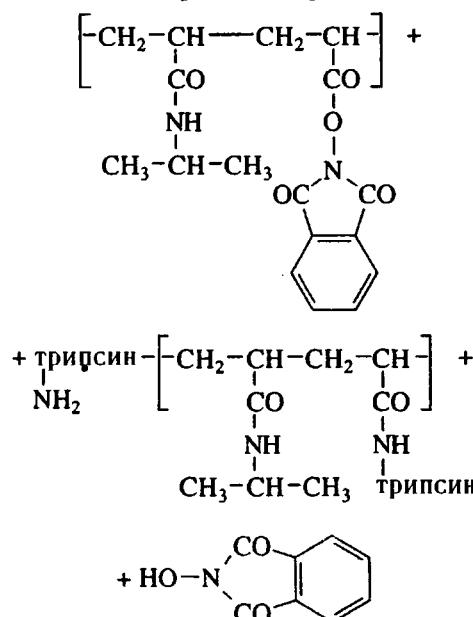
Оценку конформационного состояния молекул трипсина проводили, регистрируя спектры кругового дихроизма на спектрополяризаторе "JASCO J-500" в интервале длин волн 200 – 230 нм.

Нестабилизированные фибриновые сгустки получали реакцией фибриногена с тромбином по методике [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку в основу создания систем термоактивированного транспорта лекарственных препаратов было положено свойство полимерных систем с НКТС претерпевать фазовое расслоение при температуре выше критической, синтез таких систем включал в основном две стадии. Во-первых, получение активированных полимеров, способных реагировать с молекулами лекарственного препарата и имеющих в водных растворах НКТС, несколько превышающую физиологическое значение (37°C); во-вторых, иммобилизацию на полимере лекарства без существенного изменения его физиологической активности.

В настоящей работе активированный полимер получали сополимеризацией N-ИПАА с N-АФИ, а иммобилизацию трипсина проводили по схеме



Исследование зависимости НКТС сополимера N-ИПАА с N-АФИ от его состава показало, что

введение в поли-N-ИПАА звеньев N-АФИ в количестве до 2 мас. % не приводит к изменению НКТС полимера, которая находится в области $31 \pm 1^\circ\text{C}$. При дальнейшем увеличении содержания N-АФИ сополимер перестает растворяться в воде в изученном интервале температур ($20 - 40^\circ\text{C}$).

Иммобилизация трипсина на сополимере в количестве 1 - 5 молекул на одну молекулу сополимера с $M = (1.5 - 2.0) \times 10^5$ также не изменяет НКТС системы (зависимость тождественна изображенной на рис. 2). Этого и следовало ожидать, так как в результате иммобилизации образуется привитой сополимер фермента на цепи синтетического полимера, а характер конформационных изменений основной цепи в таких системах мало зависит от природы привитых цепей при их не-высоком содержании [10]. Аналогичный результат был получен в работе [11] при исследовании иммобилизации моноклонального иммуноглобулина на сополимер N-ИПАА с N-акрилоилсукцинимидом.

Результаты изучения активности иммобилизованного трипсина представлены на рис. 1. Видно, что если активность нативного трипсина с повышением температуры в области $10 - 40^\circ\text{C}$ непрерывно увеличивается, то для иммобилизованного на сополимере N-ИПАА трипсина в области выше НКТС активность перестает зависеть от температуры. Уменьшение активности иммобилизованного трипсина по сравнению с нативным при температуре выше НКТС обратимо и при охлаждении раствора активность трипсина полностью восстанавливается.

Причиной уменьшения активности иммобилизованного трипсина при температуре выше НКТС могут быть конформационные изменения молекулы фермента. Эти изменения могут происходить либо в результате ее присоединения к растворимому сополимеру, либо вследствие взаимодействия гидрофобных участков полимера-носителя и фермента. Оценка конформации рассматриваемых макромолекул, проведенная методом кругового дихроизма, показала, что степень спиральности нативного и иммобилизованного трипсина при температурах ниже НКТС сополимера практически одинакова (10.2 ± 1.3 и $9.6 \pm 1.2\%$ соответственно). Кроме того, активность трипсина, иммобилизованного на модельном сополимере акриламида с N-АФИ, не имеющем НКТС, полностью совпадает с активностью нативного фермента во всем изученном интервале температур. Следовательно, изменение конформации трипсина, иммобилизованного на сополимере N-ИПАА с N-АФИ, при повышении температуры выше НКТС обусловлено гидрофобизацией полимеро-носителя. Если это так, то с увеличением температуры разность между активностями нативного и иммобилизованного трипсина должна возрастать вследствие

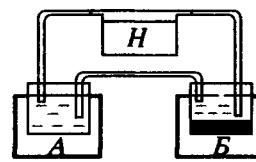


Рис. 3. Схема установки для изучения транспорта иммобилизованного трипсина. Пояснения в тексте.

усиления гидрофобных взаимодействий, что действительно и наблюдается в эксперименте.

Что касается структуры конъюгата трипсина с активированным сополимером, то изучение зависимости между количеством вступившего в реакцию трипсина и количеством выделившегося при этом N-гидроксифталимида показало, что в образовании связи между молекулами сополимера и фермента участвуют в среднем четыре-пять свободных аминогрупп последнего.

Известно, что введение в состав поли-N-ИПАА звеньев акриламида приводит к повышению НКТС его водных растворов [12]. Значения НКТС сополимеров N-ИПАА с N-АФИ и акриламидом в воде приведены на рис. 2. Видно, что и в случае тройных сополимеров с увеличением содержания акриламида в сополимере НКТС их водных растворов повышается. Все дальнейшие исследования проводили с сополимером состава [акриламид] : [N-ИПАА] : [N-АФИ] = 7 : 92 : 1, НКТС которого равна $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

Установка для изучения возможности транспорта лекарства представлена на рис. 3 и состоит из двух отдельно термостатируемых сообщающихся сосудов объемом 1.5 мл. Непрерывное протекание раствора через сосуды со скоростью 1.5 мл/мин обеспечивали с помощью перистальтического насоса Н. В каждый сосуд помещали фибриновые сгустки (на рис. 3 обозначены черным цветом) объемом 0.5 мл и систему заполняли 10 мл раствора нативного или иммобилизованного трипсина (концентрация фермента составляла 0.03 мкмоль).

В том случае, когда температура обоих сосудов была ниже НКТС сополимера N-ИПАА (36°C) при использовании раствора нативного трипсина (образец 1), трипсина, иммобилизованного на сополимере акриламида (образец 2), или трипсина, иммобилизованного на сополимере N-ИПАА (образец 3), время полного растворения фибриновых сгустков в обоих сосудах было одинаково и составляло ≈ 15 ч. При использовании образцов 1 и 2 нагревание сосуда А до 38°C не изменяет наблюданную картину: время растворения сгустков в обоих сосудах составляло ≈ 15 ч. При использовании же образца 3 с НКТС 37.2°C наблюдается резкое ускорение скорости гидролиза сгустка в сосуде А — время полного растворе-

ния сгустка уменьшалось до ≈ 1 ч. в сосуде *B*, находящемся при температуре 36°C, растворения сгустка не происходило и при временах выдерживания > 15 ч.

Очевидно, что единственной причиной наблюдаемого эффекта является концентрирование всего количества иммобилизованного трипсина в сосуде *A* за счет выделения в отдельную фазу сополимера и химически связанного с ним фермента. Если после растворения сгустка в сосуде *A* этот сосуд охладить до 36°C, а сосуд *B* нагреть до 38°C, то весь иммобилизованный трипсин переходит в сосуд *B* и сгусток в этом сосуде растворяется в течение 1 ч.

Таким образом, полученные результаты дают основание полагать, что использование водорастворимых полимерных носителей с НКТС может явиться новым подходом к созданию систем направленного транспорта лекарственных препаратов и других химических соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Торчилин В.П., Клибанов А.А. // ЖВХО им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. 32. № 5. С. 502.
2. Gregoriadis G. // Lancet. 1981. V. II. P. 241.
3. Плявинь Ю.А., Блум Э.Я. // Магнитная гидродинамика. 1983. № 4. С. 3.
4. Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. // ЖВХО им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. 32. № 5. С. 485.
5. Hoffman A.S., Affrassiabi A., Dong L.C. // J. Contr. Release. 1986. V. 4. P. 213.
6. Li X., Bennett O.B., Adams N.W., Kim S.W. Polym. Prepr. 1990. V. 31. N. 2. P. 198.
7. Fujeshige S., Kuebota K., Ando I. // J. Phys. Chem. 1989. V. 93. P. 3311.
8. Kakade M.L., Simons N., Liener J.E. // Cereal Chem. 1969. V. 46. N. 5. P. 518.
9. Панченко В.Е. // Клиническая коагулология. М.: Медицина, 1970.
10. Цереза Р. // Блок- и привитые сополимеры. М.: Мир, 1964.
11. Cole C.A., Schreiner S. M., Monji N. // Polym. Preprints. 1986. V. 27. N. 1. P. 237.
12. Dong L.C., Hoffman A.S. // Reversible Gels and Related Systems. ACS Symposium Series. New York, 1987. P. 236.

Water-Soluble Polymers Having Lower Critical Solution Temperature for Targeted Delivery of Drugs and Other Compounds

L. I. Valuev, O. N. Zefirova, I. V. Obydennova, and N. A. Platé

Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Leninskii Prospekt 29, Moscow, 117912 Russia

Abstract – A new approach to the targeted thermally activated transport of chemical agents and physiologically active compounds is reported. The approach involves the immobilization of these compounds on water-soluble polymers having a lower solution temperature and heating the delivery site above the critical temperature. The approach was verified with trypsin immobilized on *N*-isopropylacrylamide–acrylamide–*N*-acryloylphthalimide ternary copolymers.