

АВТОРСКА СПРАВКА

на научните приноси на гл.ас. д-р Радостина Генова Калинова, в представени за участие публикации, в конкурса за заемане на академичната длъжност „доцент” по професионално направление 4.2. Химически науки (полимери и полимерни материали) за нуждите на научно направление „Макромолекулно инженерство“, Институт по полимери, БАН, обявен в ДВ бр.65/12.08.2022 г.

За участие в конкурса са представени 18 публикации, 17 от които са публикувани в специализирани списания с импакт-фактор, а 1 публикация е с SJR без IF. Седем от тях са изработени през последните 5 години, а девет са в квантил Q1 за съответната година на публикуване. В публикациите, включени в показател В.4: Хабилюационен труд участие вземат 5 публикации, даващи сумарно 120 точки, а останалите 13 публикации носещи сумарно 241 точки са включени в показател Г.7: Допълнителни публикации извън хабилюационния труд. Общият брой на забелязаните към момента цитати е 140, носещи 280 точки в показател Д.11.

Основните научни приноси на представените в авторската справка публикации (показатели от група В) са свързани с дизайна и получаването на нови мултифункционални (съ)полимери с разнообразна архитектура чрез използването на различни методи за контролиран синтез, както и изследване на възможностите за тяхното потенциално приложение като наноносители в биомедицината. Представени са и публикации (показатели от група Г) свързани със синтез на полимери, възможността за тяхното приложение в кондензатори, полимерни-фотоволтаични клетки, светодиоди (light emitting diodes), както и изследване на свойствата им в разтвор.

I. Хабилюационна справка за научните приноси на кандидата (показатели от група В)

Наноносителите са колоидни наночастици използвани за транспортиране на друго вещество, като лекарство, ген, протеин и др. Разработени са носители на основата на полимери, липозоми, дендримери, твърди липиди, силициеви или въглеродни материали, магнитни и златни наночастици, композити, въглеродни нанотръбички, и т.н. Сред разнообразието от изследвани наноносители, полимерните мицели представляват голям интерес поради тяхната биосъвместимост, биоразградимост, възможност за контролиране на размерите и изключителното им структурно

разнообразие. Полимерите, използвани като биоматериали, могат да бъдат природни, синтетични или комбинация от двата вида. Природните полимери обикновено са биоразградими и притежават добра биосъвместимост. Основният им недостатък обаче е сложността на тяхната структура, което често затруднява модификацията и пречистването им. От друга страна синтетичните полимери осигуряват възможност за фино контролиране на свойствата на наночестителите в зависимост от конкретното им приложение, а развитието на контролираните полимеризационни методи и методите за модификация дават възможност за прецизен контрол върху състава на съполимерите, дисперсността, функционалността, хидрофилно-хидрофобния баланс и фармакинетиката на наночестителите. Разработването на такива наночестители е основното предизвикателство в представените като хабилитационен труд публикации, а резултатите от работата могат да бъдат систематизирани в два раздела:

1. Получаване на функционални полимерни архитектури като носители на лекарствени вещества (публикации 1, 2 и 3).

Научните ми приноси в това направление на изследванията са свързани със синтеза на нови функционални съполимери, изследване на самоасоциирането им във водна среда, физикохимично охарактеризиране на получените мицели, както и възможността наноразмерните агрегати да бъдат натоварени с нискомолекулни лекарствени вещества (ЛВ).

Използването на голяма част от съществуващите терапевтични средства е възпрепятствано от недостатъчната им водоразтворимост, което води до ниска и силно променлива бионаличност. Това налага необходимостта от разработване на нови нетоксични системи каквито са полимерните мицели, които да осигурят солубилизиране и оптимизиране на фармакокинетичните профили на ЛВ. В тази връзка са предложени няколко различни синтетични стратегии за получаване на носители на хидрофобни лекарствени вещества.

Разработена е нова синтетична стратегия за получаване на мултифункционални амфифилни съполимери на основата на поли(етиленгликол)-поли(лактид-съ-карбонат), която дава възможност за осъществяване на фин контрол върху броя на случайно разпределените по дължината на хидрофобния блок странични групи. За целта чрез контролирана съполимеризация с отваряне на пръстена на D,L-лактид и цикличен карбонат с алкинова функционална група, инициирана от полиоксиетиленов (ПЕО)

макроинициатор беше получен добре дефиниран блоков съполимер със странични алкинови групи, разпределени по дължината на биоразградимия хидрофобен блок. След това чрез високоефективно 1,3-диполярно циклоприсъединяване на азид към алкин, в присъствие на меден катализатор, съполимерът беше частично или напълно функционализиран със странични цинамилни групи. Получените блокови съполимери самоасоцират във водна среда в стабилни мицели и бяха използвани за включване на фенитилов естер на кафеената киселина (CAPE) – природен, биоактивен полифенол. Беше установено, че ефикасността на натоварване с CAPE и профилът на освобождаване на ЛВ могат да бъдат контролирани чрез вариране на броя на съвместяващите цинамилни групи, съдържащи се в хидрофобното ядро на мицелите. По този начин беше показано, че чрез присъединяване на желан брой цинамилни групи към алкин-функционализирания блоков съполимер може да бъде постигнат деликатния баланс между изискването за повишена стабилност на натоварените полимерни мицели, дължаща се на π - π взаимодействия между ароматните групи и CAPE, и успешното освобождаване на лекарството. Това прави тази стратегия алтернатива на необходимостта от синтез на серия от амфифилни съполимери с различен хидрофилно-хидрофобен баланс (*публикация 3*).

Прилагайки триетапна синтетична процедура за пръв път чрез полимеризация с отваряне на пръстен, последвана от две радикалови полимеризации с пренос на атом беше получен триблоков съполимер с биоразградим хидрофобен блок от поли(D,L-лактид), положително натоварен блок от поли((2-диметиламино)етил метакрилат и неутрален хидрофилен блок от поли(олиго(етилен гликол) метил етер метакрилат). С помощта на динамично разсейване на светлината, трансмисионна електронна микроскопия и измерване на ζ -потенциала беше доказано, че получените съполимери самоасоциират във водна среда формирайки стабилни мицели с повърхностен товар, вариращ от силно положителен до неутрален, в зависимост от съдържанието на поли(олиго(етилен гликол) метил етер метакрилат). Мицелите получени от блоковете съполимери с различен състав бяха натоварени с природното ЛВ куркумин. Беше показано, че параметри като степен на натоварване, профил на освобождаване и стабилност на мицелите могат да бъдат контролирани чрез вариране на дължината на хидрофобния блок на съполимерите и големината на повърхностния товар на частиците. Направените изследвания ни дадоха възможността да определим амфифилния триблоков съполимер с оптимален състав, който би имал най-добър потенциал за

приложение в наномедицината като ефективно средство за доставяне на лекарствени вещества (*публикация 2*).

При електростатични взаимодействия между противоположно натоварени хибридни блокови съполимери във водна среда бяха получени полийонни комплексни (ПИК) мицели. За целта от хетеробифункционален инициатор чрез контролирана радикалова полимеризация, последвана от полимеризация с отваряне на пръстен беше синтезиран положително натовареният хибриден блоков съполимер поли(2-хидроксиетил метакрилат)-блок-поли(L-лизин). Противоположно натовареният блоков съполимер поли(етилен гликол)-блок-поли(L-аспаргинова киселина) беше получен чрез полимеризация с отваряне на пръстена на β -бензил-L-аспартат-N-карбоксиианхидрид (BzLAsp-NCA), иницирана от хетеробифункционален поли(етилен гликол), и в последствие беше модифициран с клетъчно насочващ лиганд (лактобионова киселина). При различно молно отношение между натоварените групи на съполимерите бяха формирани ПИК мицели с различен повърхностен товар и с клетъчно насочващ лиганд на повърхността им. За пръв път показахме, че хидрофобно лекарствено вещество (куркумин) може да бъде включено в ПИК мицели, получени от два хидрофилни блокови съполимера с противоположно натоварени сегменти. Бяха оределени степента и капацитета на натоварване на ЛВ вещество, както и профилът му на освобождаване. Установихме, че мицелите получени при еквимолно отношение между пептидните сегменти са най-стабилни и по-добре биха запазили натоварения куркумин при системна циркулация. Проведените антиоксидантни тестове показаха, че включеното хидрофобно лекарство запазва своята антиоксидантна активност (*публикация 1*).

2. Дизайн и синтез на функционални съполимери за комплексообразуване и пренос на биологични макромолекули (публикации 4 и 5).

Научните ми приноси в тази област са свързани отново със синтеза и физикохимичното охарактеризиране на нови хибридни блокови съполимери, както и с получаването на комплексите им с биологични молекули и изследване на техните отнасяния във водна среда.

Ефективното и безопасно доставяне на нуклеинови киселини до прицелните клетки е едно от главните предизвикателства в генната терапия. Системите за доставяне на гени включват вирусни и невирусни вектори. Невирусните вектори се характеризират с ниска себестойност, по-добра възпроизводимост и безопасност от вирусните и липсата на

ограничение за размера на ДНК. Основният им недостък обаче е тяхната ниска ефективност на трансфекция, което налага продължаване на усилията за разработване на нови системи.

Присадена хибридна блокова архитектура с гъсто разположени къси странични ПЕО-вериги и блок от поли(L-лизин) беше получена чрез използването на специално синтезиран бифункционален инициатор. Инициаторът позволи провеждането на контролирана радикалова полимеризация на метакрилатен ПЕО-макромономер (ОЕГМА), която да бъде последвана от полимеризация с отваряне на пръстена на ZLLys-NCA. За пръв път N-Вос-защитен ATRP инициатор беше използван за контролиран синтез на ПОЕГМА. Хибридният полимер, получен след освобождаване на страничните аминокрупи в полипептидната верига от Z- защитните групи, комплексообразува с ДНК. Формираните наноразмерни полиплекси притежават изключителна колоидна стабилност, дължаща се на късите ПЕО-вериги в полимерните архитектури, които стабилизират допълнително повърхността на частиците. Ниската цитотоксичност на полиплексите, както и резултатите получени за трансфекционната им ефективност (32%) дават оптимизъм за тяхното бъдещо изследване и потенциалното им използване като носители на ДНК (*публикация 4*).

Получени е и хибриден линеен блоков съполимер на основата на етиленов оксид и L-лизин, и е изследвана възможността му да комплексообразува с инсулин посредством електростатични взаимодействия. С помощта на динамично, статично и електрофоретично светлоразсейаване са изследвани процесът на комплексообразуване и структурата на хибридните наночастици в зависимост от концентрацията на протеина в серия от буфери, както и в биологична среда. Доказано е, че при увеличаване на концентрацията на инсулина разпределението по размери на комплексите намалява, особено при най-високата йонна сила. В биологична среда не се наблюдава значително нарастване на размера на комплексите, което е указание за ниска степен на взаимодействие със серумните протеини, благодарение на обвивката от ПЕО. Получените резултати показват, че тези системи могат да бъдат използвани като наноносители на протеини и пептиди за *in vivo* приложения (*публикация 5*).

II. Други научни приноси от публикациите по показателите от група Г

Научните ми приноси в публикациите, обобщени в този раздел (публикации 6-18) от приложения *Списък на научните публикации* са свързани основно с получаването на

нови полимери със специфични свойства, предназначени за приложения в областта на преноса на лекарствени вещества и ДНК, кондензатори и фотоволтаици и др. Приносите ми към тези научни трудове могат да бъдат систематизирани в няколко основни направления:

Част от тях могат да бъдат обединени с научните приноси в първите две направления:

1. Получаване на функционални полимерни архитектури като носители на лекарствени вещества (публикации 9,10).

Синтезирани са нови мултифункционални полимерни наноносители за насочено доставяне на лекарствени вещества със сложна архитектура. След комбинация от контролирани полимеризационни методи и реакции на модификации, са получени макромолекули, които самоасоциират във функционални мицели, притежаващи биоразградимо хидрофобно ядро за включване на лекарственото вещество, поликатионен слой за улесняване на ендозомното им освобождаване, киселинно отделяща се обвивка от неутрален хидрофилен полимер за удължена циркулация и клетъчно- и субклетъчно насочващи лиганди. Установено е, че натоварените с куркумин наноносители проявяват по-голяма способност да индуцират апоптоза и да инхибират активната форма на ядрения фактор NF- κ B (p65) в човешки туморни клетъчни линии и в техните лекарствено-резистентни варианти в сравнение със свободния куркумин, и по-важно в сравнение с нефункционализиран съполимер с подобен състав. Доказано е и преимущественото натрупване на функционалните наноносители в прицелни клетъчни органели (митохондриите) (публикации 9,10).

2. Дизайн и синтез на функционални съполимери за комплексобразуване и пренос на биологични макромолекули (публикация 7).

Беше проведено високоефективно радикалово присъединяване на 2-аминоетантиол хидрохлорид към алиловата двойна връзка на блокови съполимери на основата на лиенеен полиглицидол и втори блок от поли(алил глицидил етер). Модифицираните със странични amino групи съполимери формират агрегати със силно положителен повърхностен заряд във водна среда и са способни да кондензират ДНК в стабилни и компактни полиплекси. Полиплексите притежават средна цитотоксичност, а проследяването на клетъчната интернализация показва способността им успешно да доставят ДНК до туморни клетки (публикация 7).

3. Синтез на нови линейни (съ)полимери и изследване на отнасянията им в различни разтворители (публикации 11, 15 и 18).

Получена е серия от поли(диметилсилоксан)-блок-поли(акрилова киселина) съполимери с различна дължина на втория блок. С помощта на атомно-силова микроскопия (АСМ) и динамично разсейване на светлината (ДРС) са изследвани способността на блоковите съполимери да агрегират, както и влиянието на концентрацията, на дължината на блока от поли(акрилова киселина), вида на разтворителя и термичното отгряване върху размера и формата на получените агрегатите. Резултатите показаха, че морфологията на мицелите не зависи от концентрацията и състава на съполимерите, но зависи от вида на разтворителя. Според резултатите получени от АСМ и ДРС при нарастване на концентрацията на съполимерите се наблюдава намаляване на размера на мицелите. С нарастването на дължината на блока от поли(акрилова киселина) размерът също намалява, а при термично отгряване се наблюдава преход от цилиндрични в сферични мицели (публикация 11).

Синтезирани са и три различни полимера на основата на 1,3,4-оксадиазол, като са варирани вида на спрегнатите сегменти и дължина на свързващите ги спейсъри. С помощта на статично разсейване на светлината са изследвани отнасянията им в диметилформаид (ДМФ). Установено е, че при полимерите с най-дълги спейсъри не се наблюдава агрегиране, дължащо се вероятно на нарасналата подвижност на полимерната верига. При останалите два полимера се наблюдава същия феномен на агрегиране, както при пръчковидните мицели с плътна корона, а размерите на агрегатите нарастват с увеличаване на полярността на разтворителя (публикация 15).

Сулфобетаинови съполимери с различна структура на основната верига са синтезирани чрез двуетапна модификация на съполимерен прекурсор, съдържащ звена от фталимидакрилат. Сулфобетаиновият съполимер, съдържащ N-винил-2-пиролидонови звена в основната верига, се разтваря само в солеви воден разтвор над определена концентрация на солта, а при ниски концентрации на сол и в чиста вода формира агрегати. Нарастването на концентрацията на сол води само до слабо увеличаване на граничния вискозитет. За разлика от него, сулфобетаиновият съполимер на основата на стирен, образува мицели във вода и граничния му вискозитет намалява в присъствие на сол (публикация 18).

4. Полимери и полимерни филми с потенциални приложения в кондензатори, полимерни-фотоволтаични клетки и светодиоди (публикации 6, 8 и 17).

Многоетапна синтетична процедура е приложена за получаване на полийонни течности (ПЙТ) на основата на пиролидинови производни, които са използвани за импрегниране на композитни електроди или като добавки в ПЙТ електролити. В присъствието на 35% ПЙТ в ДМФ, разработеният симетричен суперкондензатор показва стабилност за повече от 7000 цикъла и висока ефективност на процеса на зареждане-разреждане (над 98%) (*публикация 8*).

Изследвани са фотолуминесцентните свойства на успешно синтезирани полидифенилацетилени с Шифови бази като крайни групи. Доказано е, че полимерите са фотолуминесцентни не само в разтвор, но и под формата на филм. Това ги прави подходящ кандидат за използването им в електрониката като светодиоди (light emitting diodes) (*публикация 17*).

Получени са и полимер-органични фотоелементи (ПОФ) върху пластични субстрати от полиетилен терефталат (PET) с активен слой от спрегнат полимер (P3HT) и фулереново производно (PC60BM). Активният слой е нанесен центрофужно върху дупко-проводящ слой от PEDOT:PSS разположен над анод от ITO. Измерени са волт-амперните (V-A) характеристики на получените ПОФ, фактора на запълване и ефективността на елементите. Беше установено, че елементите върху новите PET субстрати не отстъпват по V-A характеристики на тези, разположени върху класически стъклени субстрати. Нанасянето на ZnO подобрява V-A характеристики на фотоелементите (тока на късо съединение и напрежението на отворена верига) и премахва S-образността на характеристиките, което от своя страна оптимизира фактора на запълване и ефективността (*публикация 6*).

5. Други тематика (публикации 12, 13, 14 и 16).

С цел да се илюстрира големия синтетичен потенциал на метатезните реакции в обзорна статия са представени възможностите на олефиновата метатеза за получаването на ациклични съединения и макроцикли с помощта на кръстосана метатеза и метатеза за затваряне на пръстена (*публикации 13*).

Карбонил-олефиновата обменна реакция (COER) е проведена успешно за пръв път в Института по полимери през 1983 г. Реакцията протича само в един частен случай,

когато двете функционални групи (олефинова и карбонилна) са в една молекула и са спрегнати. Резултатът от реакцията е полиацетилен. Интерес представляваше дизайна на преходен метален комплекс, който е способен да катализира карбонил-олефинова метатеза, когато двете функционални групи са в две отделни молекули и не са спрегнати, като към това бяха насочени усилията ни. Това би направило COER алтернатива на някои от съществуващите реакции за формиране на въглерод-въглеродни връзки (публикации 14 и 16).

Полидиметилсилоксанът (PDMS) е универсален материал, притежаващ уникални свойства, но силната му хидрофобна природа ограничава неговото използване в различни конвенционални и авангардни технологии. По тази причина са разработени и представени различни физични и химични методи за въвеждане на функционални групи на повърхността му. Те обаче притежават редица недостатъци. Обещаващ нов подход за модификация на повърхността на полидиметилсилоксана, е разработения от нас метод за включване на амфифилни блокови съполимери в състава му при процеса на омрежване. Въпреки това дизайнът на PDMS повърхности с дълготрайни хидрофилни и адхезионни свойства остава истинско техническо предизвикателство (публикация 12).

Списък на научните публикации

1. R. Kalinova, I. Dimitrov,
“Functional Polyion Complex Micelles for Potential Targeted Hydrophobic Drug Delivery”,
Molecules 2022, **27**, 2178.
2. R. Kalinova, I. Dimitrov,
“Triblock Copolymer Micelles with Tunable Surface Charge as Drug Nanocarriers: Synthesis and Physico-Chemical Characterization”,
Nanomaterials 2022, **12**, 434.
3. R. Kalinova, Y. Yordanov, B. Tzankov, V. Tzankova, K. Yoncheva, I. Dimitrov,
“Cinnamyl modified polymer micelles as efficient carriers of caffeic acid phenethyl ester”,
Reactive and Functional Polymers 2020, **157**, 104763.

4. R. Kalinova, J. A. Doumanov, K. Mladenova, D. Janevska, M. Georgieva, G. Miloshev, T. Topouzova-Hristova, I. Dimitrov, “Rational Design of Polypeptide-Based Block Copolymer for Nonviral Gene Delivery”, *ChemistrySelect* 2017, **2**, 12006.
5. N. Pippa, R. Kalinova, I. Dimitrov, S. Pispas, C. Demetzos, “Insulin/poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine) Complexes: Physicochemical Properties and Protein Encapsulation”, *J. Phys. Chem. B* 2015, **119**, 6813.
6. G. Grancharov, M.-D. Atanasova, R. Kalinova, R. Gergova, G. Popkirov, C. Dikov, M. Sendova-Vassileva, “Flexible Polymer–Organic Solar Cells Based on P3HT:PCBM Bulk Heterojunction Active Layer Constructed under Environmental Conditions”, *Molecules* 2021, **26**, 6890.
7. R. Kalinova, M. Valchanova, I. Dimitrov, S. Turmanova, I. Ugrinova, M. Petrova, Z. Vlahova, S. Rangelov, “Functional Polyglycidol-Based Block Copolymers for DNA Complexation”, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**, 9606.
8. R. Kalinova, I. Dimitrov, C. Novakov, S. Veleva, A. Stoyanova, “Modular Platform for Synthesis of Poly(Ionic Liquid) Electrolytes for Electrochemical Applications in Supercapacitors”, *ChemistrySelect* 2021, **6**, 3795.
9. D. Babikova, R. Kalinova, D. Momekova, I. Ugrinova, G. Momekov, I. Dimitrov, “Multifunctional Polymer Nanocarrier for Efficient Targeted Cellular and Subcellular Anticancer Drug Delivery”, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, **5**, 2271.
10. D. Babikova, R. Kalinova, I. Zhelezova, D. Momekova, S. Konstantinov, G. Momekov, I. Dimitrov, “Functional block copolymer nanocarriers for anticancer drug delivery”, *RCS Advances* 2016, **6**, 84634.

11. R. Kalinova, T. C. Ngo, R. Mincheva, R. Lazzaroni, P. Leclère, P. Dubois,
“From cylindrical to spherical nanosized micelles by self-assembly of
poly(dimethylsiloxane)-b-poly(acrylic acid) diblock copolymers”,
Polymer Bulletin 2016, **73**, 2129.
12. R. Kalinova, R. Mincheva, Ph. Dubois,
“Imparting Adhesion Property to Silicone Materials: Challenges and Solutions”,
Reviews of Adhesion and Adhesives 2014, **2**, 30.
13. D. Bicchielli, Y. Borguet, L. Delaude, A. Demonceau, I. Dragutan, C. Jossifov, R.
Kalinova, F. Nicks, X. Sauvage,
"Recent application of alkene metathesis in fine chemical synthesis", in “Green Metathesis
Chemistry, Great Challenges in Synthesis, Catalysis and Technology”,
NATO science for peace and security Series A: Chemistry and biology, Eds. V. Dragutan,
A. Demonceau, I. Dragutan, E. S. Finkelshtein, Springer Netherlands **2010**, p. 207-274.
14. C. Jossifov, R. Kalinova,
"Carbonyl-olefin exchange reaction and related chemistry", in “Green Metathesis
Chemistry, Great Challenges in Synthesis, Catalysis and Technology”,
NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology, Eds. V. Dragutan,
A. Demonceau, I. Dragutan, E. S. Finkelshtein, Springer Netherlands **2010**, p. 305-314.
15. H. Spasevska, A. Andonovski, C. Brachkov, S. Stoykova, R. Kalinova, V. Sinigersky, I.
Schopov,
"Synthesis and static light scattering studies of hairy rod polymers containing 1,3,4-
oxadiazole rings in the repeating units",
Bulgarian Chemical Communications **2009**, 41, 297.
16. C. Jossifov, R. Kalinova, A. Demonceau,
"Carbonyl olefin metathesis",
Chimica Oggi- Chem. Today 2008, **26**, 85.
17. R. Kalinova, C. Jossifov,

"Polydiphenylacetylene with Schiff Base End Groups: Synthesis and Characterization", in
"Metathesis Chemistry: From Nanostructure Design to Sustainable Technologies for
Synthesis of Advanced Materials",

NATO Science Series II- Mathematics Physics and Chemistry, Eds. Y. Imamoglu, V.
Dragutan, Springer Netherlands **2007**, p. 413-420.

18. I. V. Berlinova, I. V. Dimitrov, R. G. Kalinova, N. G. Vladimirov,

"Synthesis and aqueous solution behaviour of copolymers containing sulfobetaine
moieties in side chains",

Polymer 2000, **41**, 831.

Изготвил справката:

/гл.ас.д-р Радостина Калинова/