

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО ПОЛИМЕРИ**

---

**ДИМИТРИНА ГЕОРГИЕВА БАБИКОВА**

**ФУНКЦИОНАЛНИ БЛОКОВИ СЪПОЛИМЕРИ ЗА ПРЕНОС И НАСОЧЕНО  
ДОСТАВЯНЕ НА ЛЕКАРСТВЕНИ ВЕЩЕСТВА В КЛЕТКИ И КЛЕТЪЧНИ  
ОРГАНЕЛИ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**на дисертационен труд, представен за присъждане  
на образователната и научна степен “доктор”**

**научна специалност: Химия на високомолекулните съединения,  
шифър: 01.05.06**

**Научно жури:**

- 1. Проф. дн Красимира Йончева**
- 2. Проф. дн Иво Грабчев**
- 3. Доц. д-р Елена Василева**
- 4. Проф. д-р Даринка Христова**
- 5. Проф. д-р Ивайло Димитров**

**Научен ръководител:**

**/проф. д-р Ивайло Димитров/**

---

**София, 2022 г.**

Дисертационният труд е написан на 126 страници и съдържа 50 фигури, 7 схеми и 6 таблици. Цитирани са 260 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и допуснат за защита на заседание на Колоквиума на Института по полимери – БАН, проведено на 28.10.2022 год.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на ..... 2023 год. от.....ч. в заседателната зала на Института по полимери – БАН.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на Институт по полимери-БАН; София, ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 103В.

Автор: Димитрина Георгиева Бабикова

Заглавие: ФУНКЦИОНАЛНИ БЛОКОВИ СЪПОЛИМЕРИ ЗА ПРЕНОС И НАСОЧЕНО ДОСТАВЯНЕ НА ЛЕКАРСТВЕНИ ВЕЩЕСТВА В КЛЕТКИ И КЛЕТЪЧНИ ОРГАНЕЛИ

*Изказвам своята благодарност на научния си ръководител проф. д-р Ивайло Димитров, за проявеното доверие към мен, за подкрепата, търпението, напътствията и съветите при осъществяване на изследванията и оформянето на дисертационния труд. Благодарна съм и на гл. ас. Радостина Калинова за помощта и съветите през целия период на работата. Благодаря и на всички колеги от лаборатория Полимеризационни процеси за сърдечното отношение и подкрепа.*

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>** – Поли(D,L-лактид)-блок-поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат) с крайна алкинова група и трифенилфосфониеви насочващи лиганди
- ATRP** – Радикалова полимеризация с пренос на атом
- BIBB** – 2-Бromo-2-метилпропионил бромид
- CDCl<sub>3</sub>** – Деутериран хлороформ
- CDDP** – Цисплатин
- CMC** – Критична концентрация на мицелообразуване
- Curc** – Куркумин
- d** – Среден диаметър на мицелите
- DAPI** – 4',6-Диамидино-2-фенилиндол дихидрохлорид
- DCC** – N,N'-дициклохексилкарбодимид
- DE** – Диетиллов етер
- DLC** – Капацитет на включване на лекарственото вещество
- DLE** – Ефективност на включване на лекарственото вещество
- D<sub>m</sub>** – Дисперсност
- DMF** – N,N-диметилформамид
- DMSO-d<sub>6</sub>** – Деутериран диметилсулфоксид
- DOX** – Доксорубицин
- DPH** – 1,6-Дифенил-1,3,5-хексатриен
- DPTS** – 4-(Диметиламино)пиридиниев *p*-толуенсулфонат
- H1299** – Човешки клетки от аденокарцином на белия дроб
- HEK-293** – Човешки ембрионални бъбречни клетки
- HEP-G2** – Човешки клетки от чернодробен карцином
- HL-60** – Човешки клетки от остра миелоидна левкемия
- HL-60/CDDP** – Цисплатин-резистентни човешки туморни клетки
- HL-60/DOX** – Човешки туморни клетки с множествена лекарствена резистентност
- IC<sub>50</sub>** – Еквивалентна концентрация
- JC-1** – Катионно клетъчно-проникващо багрило за маркиране на митохондриите
- LVA** – Лактобионовата киселина
- LVA-PEO-b-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (F-Triblock)** – Полиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид)-блок-поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат) триблоков съполимер, съдържащ лиганди за клетъчно и субклетъчно насочване и отделящ се в слабокисела среда полиетерен блок
- MitoTracker<sup>®</sup>** – Багрило, съдържащо тиол-реактивна хлорометилна част за маркиране на митохондриите чрез химично свързване
- M<sub>n</sub>** – Средна бройна молекулярна маса
- MPEO-b-PLA-b-PDMAEMA (Triblock)** – Нефункционализиран полиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид)-блок-поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат) триблоков съполимер за сравнителни изследвания
- MTT** – (3-(4,5 Диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолиев бромид), жълтата тетразолова сол
- NF-κB (p-65)** – Ядрен транскрипционен фактор (активна форма)
- PBS** – Фосфатен буфер
- PdI** – Разпределение по размери на мицелите
- PDMAEMA** – Поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат)
- PEO** – Полиоксиетилен
- PIC-мицели** – Полийонни комплексни мицели
- PLA** – Полилактид
- TPP<sup>+</sup>** – Трифенилфосфониеви катиони
- THF** – Тетрахидрофуран
- ГПХ** – Геловопроникваща хроматография
- ДРС** – Динамично разсейване на светлината
- ИЧ** – Инфрачервена (спектроскопия)
- ЛВ** – Лекарствено вещество
- ТЕМ** – Трансмисионна електронна микроскопия
- УВ** – Ултравioletова (спектроскопия)
- ЯМР** – Ядрено магнитен резонанс

## Увод

Нанотехнологията обединява широк диапазон от научни проблеми, свързани със синтез и изследване на частици с размери от 1 до 100 нанометра (до 200 нанометра при биомедицински приложения). В модерната медицина тези частици намират приложение като носители на разнообразни ниско- или високомолекулни терапевтични вещества. През последните години вниманието на водещите фармацевтични компании и на редица научни колективи е насочено към разработване на нови системи за контролиран пренос и насочено доставяне на лекарствени вещества (ЛВ) с цел повишаване на терапевтичния им ефект и намаляване нежеланите странични ефекти. Към днешна дата са проведени голям брой изследвания върху мицели, наносфери, везикули (ниозоми и липозоми), нанокапсули, твърди липидни наночастици, микроемулсии и въглеродни нанотръби. Наночастиците притежават редица предимства, които осигуряват ефективното доставяне на активното вещество. Доказано е, че размерът е основен фактор определящ „*in vivo*“ съдбата на частиците. Биологичният транспорт на клетъчно и субклетъчно ниво се повлиява от физичните характеристики на наноносителя, като форма, гъвкавост, както и от химичните му характеристики. От голямо значение е прилагането на синтетични методи, които позволяват получаването на наноструктури с висока степен на подреденост и контрол върху техните физични и химични характеристики. Наночастиците могат да бъдат модифицирани така, че да съхраняват и пренасят ЛВ до желано място в организма или да отговарят на различни физиологични или външни стимули. В тази връзка полимерните наночастици са много подходящи материали за приложение в системите за пренос и доставяне на ЛВ, тъй като позволяват контрол върху основни параметри като молна маса, биоразградимост, размер и т.н. Дизайнът на полимерните наночастици зависи от вида терапия, от прицелното място (орган, тъкан, клетка или клетъчни органели) и от начина на прилагане. Въпреки, че интравенозните инжекции са един от основните начини за въвеждане на полимерни наночастици, те могат да бъдат приложени и трансдермално, орално или през меките тъкани. Във всеки случай тези наночастици трябва да притежават функции, които улесняват преминаването им през различните биологични бариери в организма (кожа, кръв, междуклетъчен матрикс, както и клетъчни и вътреклетъчни бариери).

Полимерните материали, с приложение в наномедицината съдържат биосъвместими, биоразградими, хидрофобни полимерни блокове като поли(естери), поли(амино киселини), ковалентно свързани към биосъвместим, хидрофилен блок, най-често полиоксетилен (PEO). Ефективното хидратиране е от съществено значение в минимизирането на опсонизирането и придаването на „stealth“ свойства на наночастиците. Въпреки това, притежаващите хидрофилна обвивка частици се характеризират с понижена клетъчна интернализация и способност да се освободят от ендозомите. Поради тази причина изследователските усилия са насочени към „декорирането“ на наночастиците с клетъчно разпознаващи молекули за улесненото им навлизане в клетката чрез рецептор-медирана ендцитоза. Напоследък се обръща все по-голямо внимание и на субклетъчното насочване, т.е на специфичното доставяне от наноносители на биологично активни вещества до и вътре в клетъчните органели, тъй като повечето ЛВ проявяват фармакологичните си свойства върху определени обекти на субклетъчно ниво.

Въпреки постигнатия досега напредък, специфичният дизайн на комплексни мултифункционални наноносители на ЛВ, проявяващи желани свойства на различните нива на транспорт и насочване (системна циркулация, клетъчно и субклетъчно насочване) все още представлява голямо предизвикателство.

## ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА

*Целта на дисертационната работа е да се синтезират нови мултифункционални блокови съполимери, способни да самоасоциират във водна среда, както и да се оценят възможностите за тяхното приложение като наноносители за насочено доставяне на хидрофобни лекарствени вещества в прицелни клетки и клетъчни органели.*

За постигането на тази цел изследванията са насочени към решаването на следните задачи:

1. Синтез и охарактеризиране на функционални амфифилни диблокови съполимери, съдържащи биоразградим хидрофобен блок, носещ крайна реакционна група и хидрофилен поликатионен блок, модифициран със субклетъчно насочващи лиганди.

2. Синтез и охарактеризиране на мултифункционален амфифилен триблоков съполимер, съдържащ лиганди за клетъчно и субклетъчно насочване и състоящ се от биосъвместим хидрофилен полиетерен блок, свързан чрез киселинно разградима връзка с биоразградим хидрофобен блок и поликатионен блок.

3. Синтез и охарактеризиране на нефункционализиран амфифилен триблоков съполимер за сравнителни изследвания.

4. Изследване на възможностите за приложение на получените функционални съполимери като наноносители за насочено доставяне на лекарствени вещества в клетки и клетъчни органели:

- формиране и охарактеризиране на функционални мицели от синтезираните съполимери;
- натоварване на мицелите с хидрофобно лекарствено вещество;
- сравнителни *in vitro* изследвания на наноносителите върху човешки клетъчни линии за установяване на предимствата на функционалните полимерни мицели по отношение на цитотоксичност, проапоптотична активност, инхибиране на NF- $\kappa$ B транскрипционния фактор, клетъчна интернализация и вътреклетъчна локализация в прицелни органели.

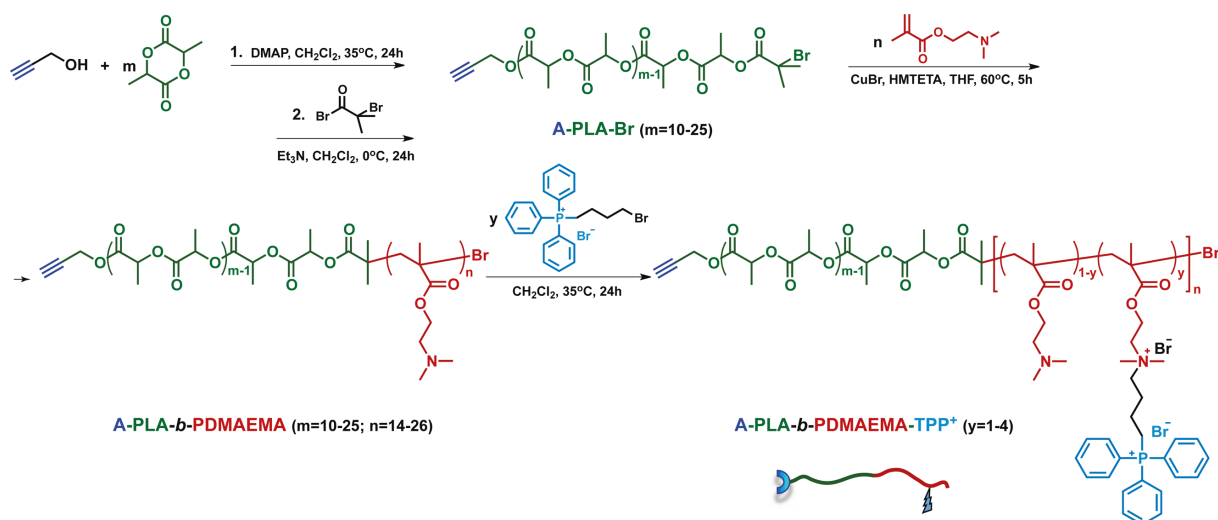
## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От решаващо значение за ефективното доставяне на активни вещества до специфични клетъчни органели е разработването на подходящ наноносител, притежаващ разнообразни функции. Затова основната идея в настоящата дисертационна работа е свързана с дизайн и получаване на нови мултифункционални полимерни наноносители, които натоварени с активни вещества са способни да преодолеят различни биологични бариери, достигайки до специфични клетъчни органели (митохондриите). В тази връзка са и поставените цел и задачи в дисертационната работа, включващи синтез и охарактеризиране на нови амфибилни блокови съполимери, модифицирани с подходящи функционалности, както и изследване на потенциала им за приложение като системи за пренос и насочено доставяне на ЛВ в митохондриите. По-конкретно усилията ни са насочени към получаването и охарактеризирането на два типа нови мултифункционални блокови съполимери чрез прилагане на контролирани полимеризационни процеси и реакции за модифициране. Първият тип съполимери съдържат биоразградим хидрофобен блок от поли(D,L-лактид) с крайна реакционностна група и поликатионен хидрофилен блок от поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат), модифициран със субклетъчно насочващи групи. Понататък диблоквата съполимерна архитектура се допълва с ненатоварен хидрофилен полиетерен блок, свързан чрез киселинно разградима връзка към диблоквия съполимер и носещ клетъчно насочваща крайна функционална група. Изследвано е самоасоциирането на съполимерите във водна среда, натоварването на получените функционални мицели с лекарствено вещество и са проведени *in vitro* изследвания за установяване на потенциала на наноносителите да бъдат приложени като системи за насочено доставяне на лекарствени вещества в клетки и клетъчни органели.

### 1. Получаване и охарактеризиране на нови функционални амфибилни блокови съполимери

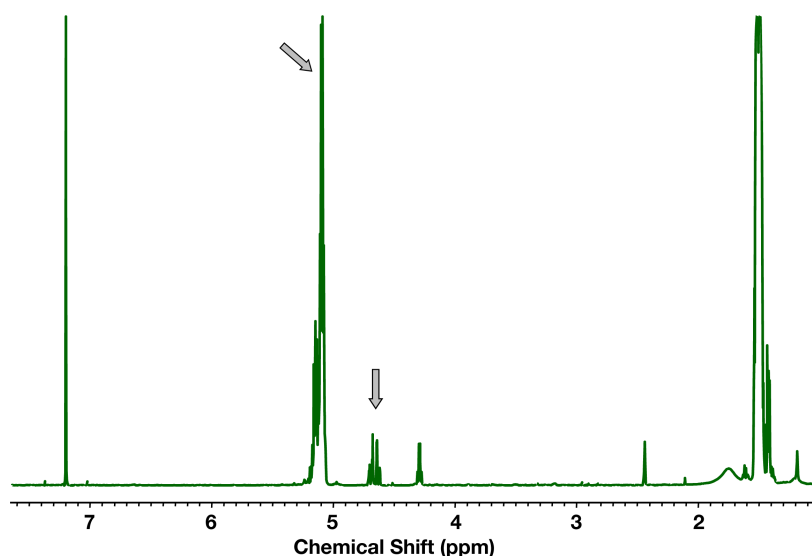
#### 1.1. Амфибилен диблоков съполимер поли(D,L-лактид)-блок-поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат), модифицирани с крайна алкинова група и с трифенилфосфониеви странични групи (A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>)

Получаването на функционалния амфибилен диблоков съполимер A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> е представено на Схема 1 и се осъществява чрез последователно прилагане на контролирани полимеризационни процеси и последваща модификация на полимерната верига. Първоначално се прилага свободна от метали полимеризация с отваряне на пръстена на D,L-лактид за синтез на хидрофобния биоразградим блок от поли(D,L-лактид). За първи път е използван търговския продукт - пропаргилов алкохол като бифункционален инициатор за полимеризацията на D,L-лактид. По този начин докато хидроксилната група иницира полимеризацията, всяка формирана верига директно е количествено функционализирана с крайна алкинова група, без необходимост от допълнителни стъпки на протекция/депротекция. Друго предимство на тази полимеризация е, че протича в отсъствие на метални катализатори. Като катализатор е използван 4-диметиламинопиридин. Варирайки съотношението [мономер]/[инициатор] са получени полимери с различна дължина на полиестерните блокове.



**Схема 1.** Синтетичен подход за получаване на функционални амфибилни диблокови съполимери A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>.

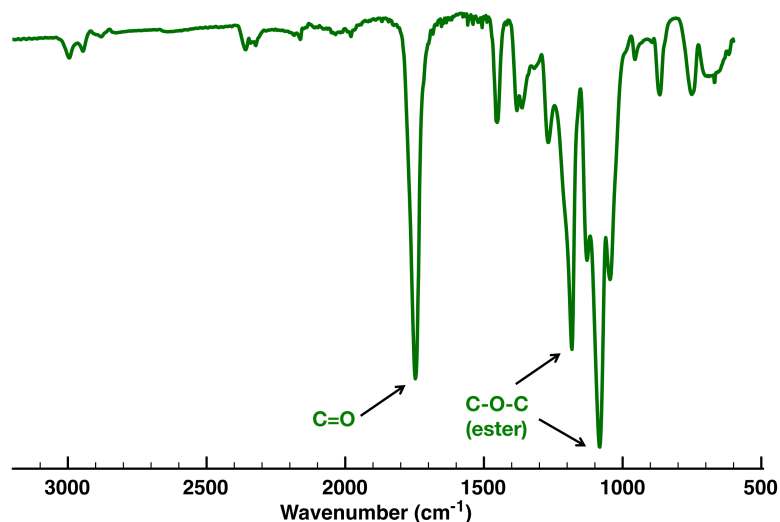
Синтезираните хетреробифункционални полиестери са охарактеризирани чрез <sup>1</sup>H ЯМР и ИЧ- спектроскопия. Средната степен на полимеризация на лактида е определена от <sup>1</sup>H NMR-спектрите чрез отношението на интензитетите на метиновите протони от полиестерните повтарящи се звена при 5.15 ppm и тези, съответстващи на метиленовите протони, разположени до крайната алкинова група при 4.75 ppm (Фигура 1).



**Фигура 1.** <sup>1</sup>H ЯМР (600 MHz) спектър в CDCl<sub>3</sub> на функционализиран с крайна алкинова група поли(D,L-лактид) (A-PLA<sub>19</sub>-OH).

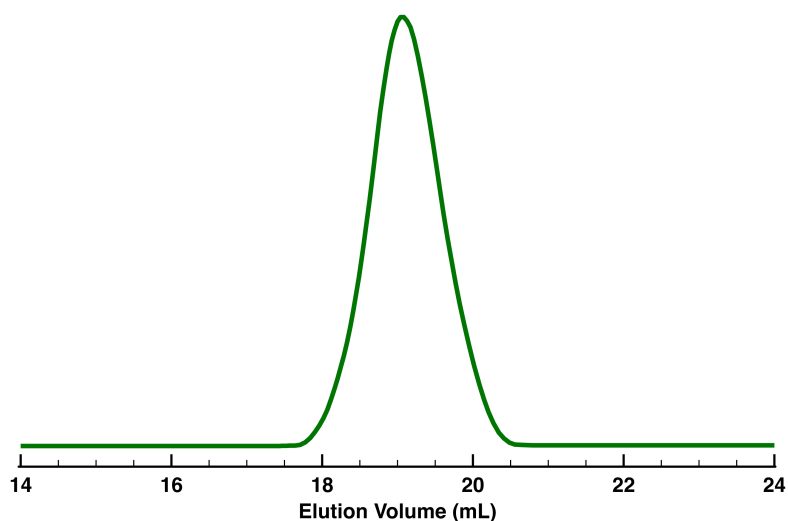
Чрез ИЧ-спектроскопия е установено наличието на интензивни спектрални ивици при 1082, 1182 и 1748 cm<sup>-1</sup>, съответстващи на C–O–C (симетрични и асиметрични) и C=O валентни колебания, което потвърждава наличието на полиестерен блок в изследваните проби (Фигура 2).





**Фигура 2.** Инфрачервен спектър на функционализиран с крайна с алкинова група поли(D,L-лактид) (A-PLA<sub>19</sub>-OH).

Молекулно-масовите разпределения на полимерите са определени с геловопроникваща хроматография, проведена в THF. Средните бройни молекулни маси са получени след калибриране на системата с полистиренови стандарти. Хроматограмите, получени при ГПХ-анализите показват мономодално разпределение по молекулни маси с дисперсност ( $D_M$ ) между 1.15 и 1.20 (Фигура 3).

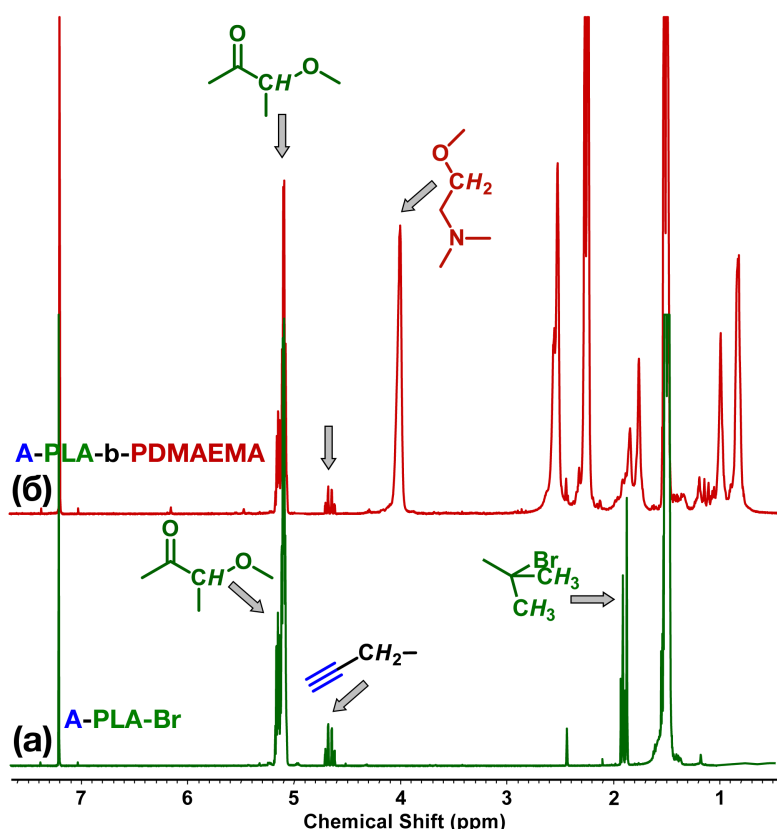


**Фигура 3.** Геловопроникваща хроматография на поли(D,L-лактид) (A-PLA<sub>19</sub>-OH) в THF ( $M_n = 3900 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $D_M = 1.18$ , полистиренови стандарти).

Следващият етап от синтетичната процедура включва количествено превръщане на полученият полиестер в макроинициатор (A-PLA-Br) за контролирана радикалова полимеризация с пренос на атом чрез реакция на крайната хидроксилна група на полимера с ВІВВ (Схема 1). От особено значение тук е пълното отстраняване от продукта на излишъка от реагента, използван при реакцията на естерификация. Това се постига чрез продължително разбъркване на реакционната смес с активен въглен. Пълното превръщане на крайната хидроксилна група на полимера е потвърдено с <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопия. Резонансите при 4.36 и 1.49 ppm, съответстващи съответно на метиновия и на метиловите протони, намиращи се до крайната хидроксилна група напълно изчезват,

като се наблюдава нов сигнал при 1.98 ppm, съответстващ на шестте метилови протони от 2-бромоизобутириловата крайна група (Фигура 4a).

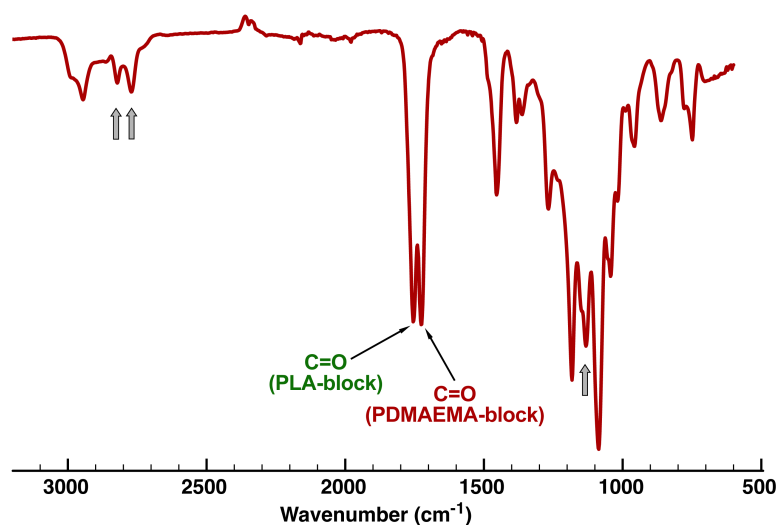
Вторият полимерен блок с желана дължина е получен чрез контролирана радикалова полимеризация на DMAEMA, инициирана от макроинициатора A-PLA-Br (Схема 1). Полимеризацията протича в THF в рамките на 5 часа. Каталитичната система, съдържаща мед е отделена чрез прекарване на реакционната смес през колона с  $Al_2O_3$ . Добивът на амфибилния блок съполимер е над 85%. Средната степен на полимеризация на поликатионния блок от PDMAEMA е изчислена от  $^1H$  ЯМР-спектрите на пречистените продукти въз основа на отношението между интензитетите на метиленовите протони (намиращи се до естерната група на DMAEMA-звената) при 4.06 ppm и тези съответстващи на метиновите протони от PLA-блока при 5.1 ppm (Фигура 4b).



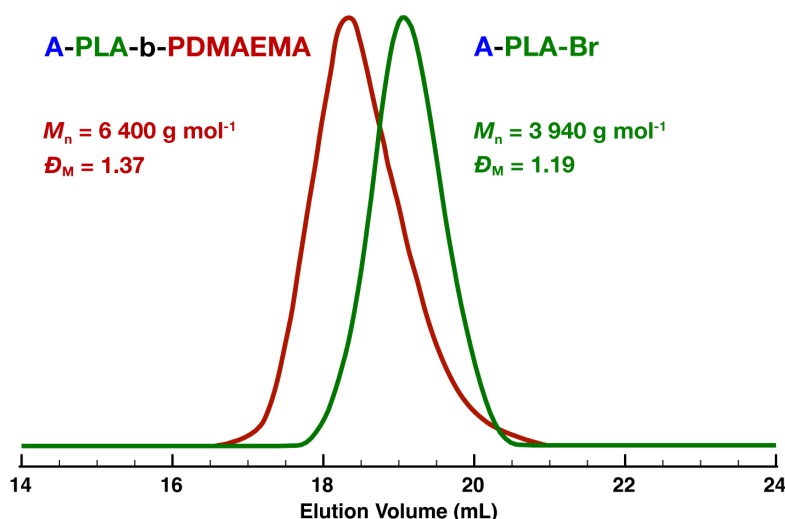
**Фигура 4.**  $^1H$  ЯМР (600 MHz) спектър в  $CDCl_3$  на: (a) A-PLA<sub>19</sub>-Br макроинициатор, и (б) амфибилен диблоков съполимер A-PLA<sub>19</sub>-b-PDMAEMA<sub>26</sub>.

Изчислената степен на полимеризация на PDMAEMA е близка до теоретичната (определена от отношението [мономер]/[макроинициатор]), което е указание за добър контрол върху полимеризационния процес. Чрез вариране на съотношението между [мономер]/[макроинициатор] са получени амфибилни диблокови съполимери с желан хидрофилно/хидрофобен баланс и крайна алкинова функционалност. Наличието на DMAEMA-звена е потвърдено и от ИЧ-спектрите на продуктите. Наблюдават се допълнителни ивици при 1132, 1726, 2772 и 2821  $cm^{-1}$ , съответстващи на C-N, C=O, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> валентни колебания, дължащи се на втория полимерен блок (Фигура 5). Формирането на блокова архитектура е доказано чрез ГПХ в THF (Фигура 6). Молекулните маси на съполимерите са изчислени спрямо полистиренови стандарти и се различават от тези, изчислени от ЯМР-спектрите, но по-важният резултат от ГПХ-анализа е ясно наблюдаваното изместване към по-малки обеми на задържане (съответстващо на по-високи молекулни маси) при блоковия съполимер в сравнение със

съответния макроинициатор. Също така се наблюдава мономодално разпределение по молекулни маси и за блоковете съполимери с  $D_M$  между 1.35 и 1.40.



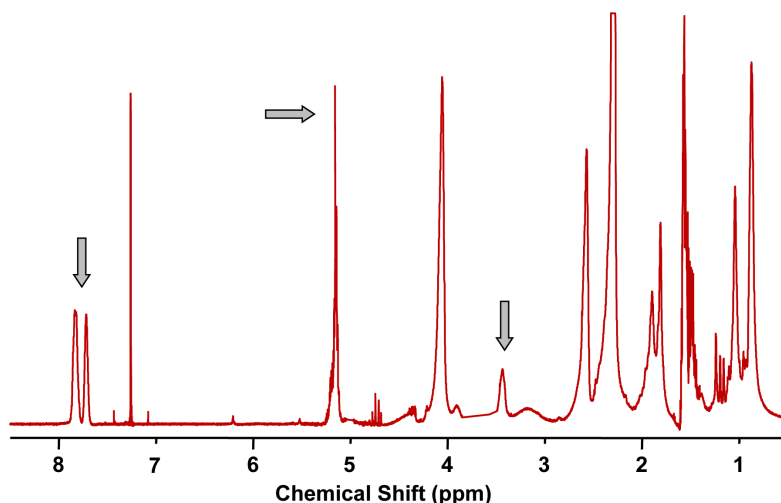
**Фигура 5.** Инфрачервен спектър на амфифилен диблоков съполимер A-PLA<sub>19</sub>-b-PDMAEMA<sub>26</sub>.



**Фигура 6.** Геловопроникваща хроматография на макроинициатор (A-PLA<sub>19</sub>-Br) и на съответния диблоков съполимер (A-PLA<sub>19</sub>-b-PDMAEMA<sub>26</sub>) в THF.

Последният етап в синтетичната процедура е свързан с въвеждане на субклетъчно насочващ лиганд в поликатионния блок на съполимера. Трифенилфосфониевите функционални групи са известни като насочващи към клетъчни органели (по-конкретно към митохондриите) лиганди. За да бъдат въведени в синтезираните амфифилни диблокови съполимери е използвано алкилхалогенидно производно на трифенилфосфониевия бромид за частично кватернизирани на диметиламино групите в PDMAEMA-блоковете (Схема 1). Наличието на алкилна група в реагента за кватернизирани позволява редуциране на стеричното пречене на обемните ароматни пръстени. Степента на кватернизирани е определена от отношението между интензитетът на ароматните протони при 7.65-7.9 ppm и този на метиновите протони от PLA-блока при 5.15 ppm (Фигура 7). Освен това се наблюдава нов резонанс при 3.44 ppm, съответстващ на протоните на диметиламониевите групи в кватернизирания съполимер (A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>). Важно е да се отбележи, че крайните алкинови

групи на полилактидния блок остават напълно незасегнати след формирането на втория полимерен блок и последващата реакция на модифициране, което се доказва със наличието на сигнал при 4.75 ppm в  $^1\text{H}$  ЯМР-спектъра на крайния продукт.



**Фигура 7.**  $^1\text{H}$  ЯМР (600 MHz) спектър в  $\text{CDCl}_3$  на амфифилен диблоков съполимер, модифицирани с трифенилфосфониеви лиганди (A-PLA<sub>19</sub>-b-PDMAEMA<sub>26</sub>-TPP<sup>+</sup>).

Молекулно-масовите характеристики на синтезираните макроинициатори и съответните им диблокови съполимери са обобщени в Таблица 1.

**Таблица 1.** Характеристики на макроинициаторите и на съответните функционални амфифилни диблокови съполимери.

Макроинициатор			Блоков съполимер				TPP <sup>+</sup> лиганд <sup>z</sup>
Код	$M_n^a$ (g mol <sup>-1</sup> )	$D_M^b$	Код	$DP_n^a$	$MI_{\text{eff}}^e$	$D_M^b$	Код
A-PLA <sub>10</sub> -Br	1650	1.20	A-PLA <sub>10</sub> -b-PDMAEMA <sub>19</sub>	19	0.79	1.39	B1
A-PLA <sub>19</sub> -Br	2900	1.19	A-PLA <sub>19</sub> -b-PDMAEMA <sub>26</sub>	26	0.86	1.37	B2
			A-PLA <sub>19</sub> -b-PDMAEMA <sub>17</sub>	17	0.88	1.40	B3
A-PLA <sub>15</sub> -Br	2350	1.18	A-PLA <sub>15</sub> -b-PDMAEMA <sub>21</sub>	21	0.84	1.37	B4
A-PLA <sub>25</sub> -Br	3750	1.15	A-PLA <sub>25</sub> -b-PDMAEMA <sub>14</sub>	14	0.71	1.35	B5

<sup>a</sup> Средни бройни молекулни маси ( $M_n$ ) и степени на полимеризация ( $DP_n$ ), определени чрез  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопия. <sup>b</sup> Разпределения по молекулни маси ( $D_M$ ), определени чрез ГПХ в THF. <sup>e</sup> Ефективност на макроинициаторите ( $MI_{\text{eff}} = DP_n^{\text{теорет.}}/DP_n^{\text{ЯМР}}$ ). <sup>z</sup> TPP<sup>+</sup>- модифицирани амфифилни диблокови съполимери (10 mol % от съответните DMAEMA-звена).

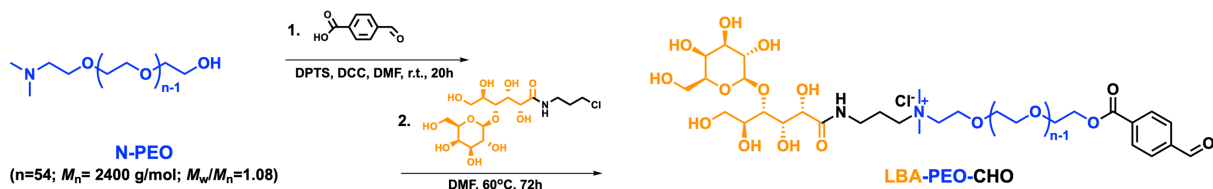
## 1.2. Функционален амфифилен триблоков съполимер полиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид)-блок-поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат), съдържащ лиганди за клетъчно, субклетъчно насочване и киселинно-разградима връзка между полиетерния и полилактидния блок (LBA-PEO-b-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>, F-Triblock)

Комплексната мултифункционална макромолекулна архитектура, предназначена за насочено доставяне на хидрофобни лекарствени вещества в прицелни клетки и клетъчни органели е получена в триетапна синтетична процедура.

### 1.2.1. Синтез и охарактеризиране на PEO, функционализиран с клетъчно насочващ лиганд и алдехидна крайна група (LBA-PEO-CHO)

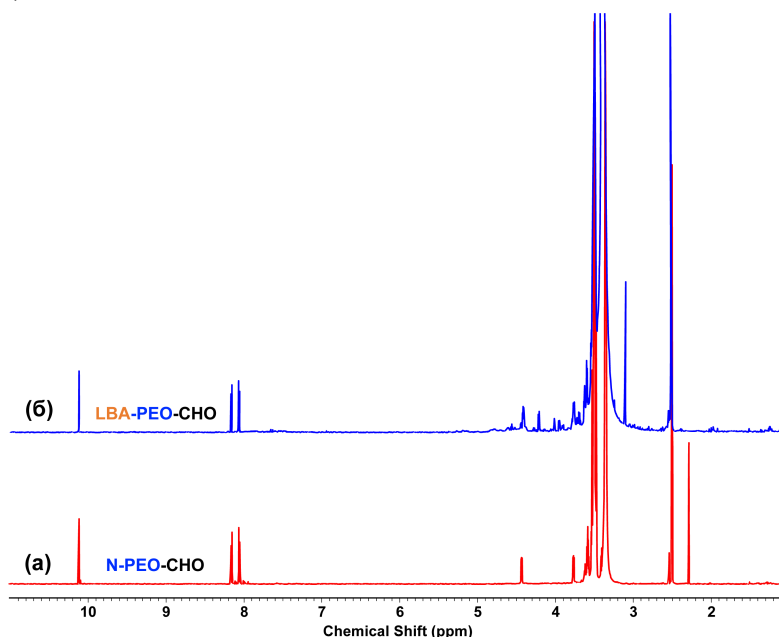
За реакциите на модификация е използван хетеробифункционален полиоксиетилен (N-PEO), предварително синтезиран и охарактеризиран в Лаборатория

„Полимеризационни процеси“ на Института по полимери-БАН. Полимерът съдържа крайни диметиламино и хидроксилна функционални групи и е получен чрез “жива” анионна полимеризация на етиленов оксид, иницирана от *N,N*-диметилетаноламин. Първоначално крайната хидроксилна група на полимера се превръща в ароматен алдехид чрез реакция на естерифициране по Стейглих на 4-формилбензоена киселина в присъствие на DCC и DPTS. Естерификацията се извършва при меки реакционни условия (Схема 2).



**Схема 2.** Получаване на полиоксиетилен, функционализиран с клетъчно насочваща (лактобионова) и алдехидна крайни групи (LBA-PEO-CHO).

Количественото превръщане на крайната хидроксилна група на полимера в алдехидна е потвърдено с  $^1\text{H}$  ЯМР от появата и интензитета на резонанси при 10.1 ppm, съответстващи на алдехиден протон и при 8.1 ppm, характерни за протони от ароматното ядро (Фигура 8a).



**Фигура 8.**  $^1\text{H}$  ЯМР (600 MHz) спектър в  $\text{DMSO-d}_6$  на хетеробифункционален PEO, функционализиран с: (а) крайна алдехидна група (N-PEO-CHO) и (б) крайни лактобионова и алдехидна групи (LBA-PEO-CHO).

Крайната алдехидна група в полимера е необходима за последващо свързване с други полимерни блокове чрез формиране на киселинно разградима ароматна иминна връзка. Наличието на крайна третична аминна група в полимера (N-PEO-CHO) позволява лесното въвеждане на желана насочваща функционалност чрез реакция на кватернизирание. Като клетъчно насочващ лиганд за настоящото изследване е подбрана лактобионовата киселина (LBA), тъй като е известно, че определени туморни клетки свърхекспресират гликопротеинови рецептори върху повърхността си. Тези рецептори разпознават и се свързват с *D*-галктозни и *N*-ацетилгалктозни остатъци, проявявайки висока специфичност и ефективност.

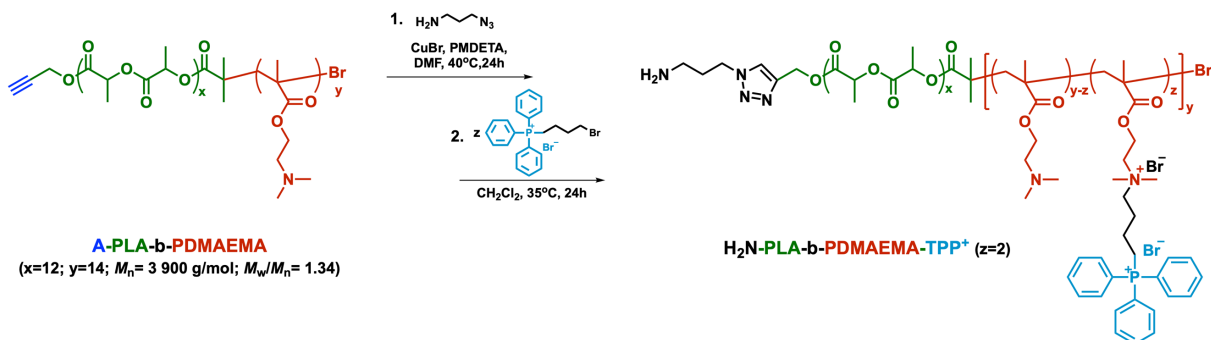
За реакцията на модифициране е синтезирано халогенно производно на лактобионовата киселина (LBA-Cl) чрез активиране на киселината и последващо амидиране с 3-хлоропропиламин, прилагайки карбодиимидния метод. След това LBA-Cl се използва за кватернизация на крайната третична аминогрупа в N-PEO-CHO. Така се получава хетеробифункционалният пололиоксиетилен, съдържащ крайни захаридна и ароматна алдехидна групи (Схема 2).

$^1\text{H}$  ЯМР-спектърът на крайния продукт доказва успешното му модифициране с лактобионова крайна група (Фигура 8б). Количественото кватернизация на крайните третични аминогрупи е установено от химичното отместване на резонанса за шестте протона в съседство с азотния атом от 2.28 на 3.09 ppm в спектъра на продукта. Там също така, макар и не толкова интензивни поради понижената им подвижност, се наблюдават и резонансите, характерни за протоните от LBA (3.50 – 4.60 ppm). Функционалната полимерната верига притежава модулен характер, в смисъл, че дава възможност в нея сравнително лесно да бъдат въведени различни клетъчно насочващи лиганди чрез кватернизация в зависимост от конкретния случай.

*1.2.2. Синтез и охарактеризиране на амфифилен диблоков съполимер поли(D,L-лактид)-блок-поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат), модифициран с крайна първична аминогрупа и с трифенилфосфониеви странични групи ( $\text{H}_2\text{N-PLA-b-PDMAEMA-TPP}^+$ )*

Амфифилният диблоков съполимер, съдържащ функционализиран с крайна алкинова група полиестерен блок и поликатионен блок (A-PLA-b-PDMAEMA) е получен и охарактеризиран както е описано вече в т.1.1. По-нататъшната модификация на съполимера е извършена в две последователни стъпки, представени на Схема 3. Първоначално, крайната алкинова група в съполимера е използвана за високоефективна „клик“-реакция, представляваща катализирано от мед 1,3-диполярно циклоприсъединяване на азид към алкин. За реакцията е използван синтезираният от нас азидопропиламин. Тъй като отношението между броя на въглеродните и на азотните атоми в NPA е по-малко от 1 са взети всички необходими мерки за безопасност при получаването и по-нататъшното използване на органичния азид, а именно:

- получава се непосредствено преди използването му в „клик“-реакцията;
- получава се в малки количества (< 0.2 g);
- не се изолира, а се съхранява и използва по-нататък като разреден разтвор в DMF (изолират са само няколко mg от продукта за определяне на точната му концентрация и за ЯМР анализ);
- разтворът в DE/DMF не се нагрява при отстраняването на етера от сместа.

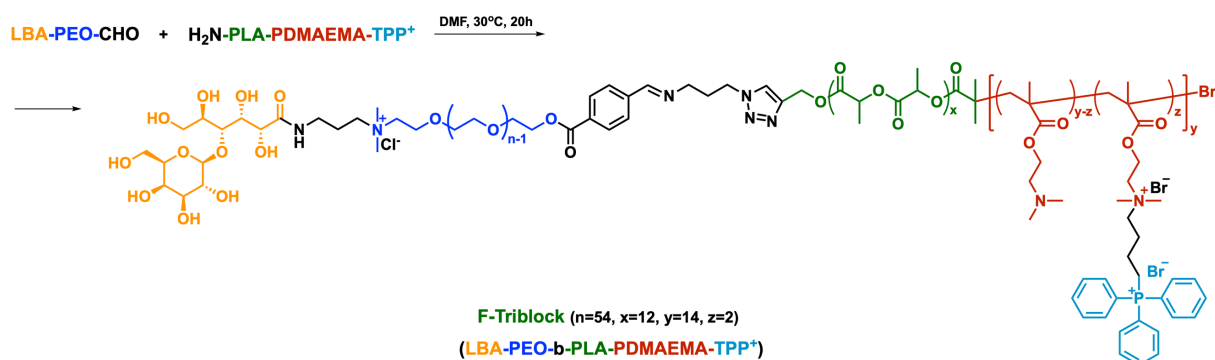


**Схема 3.** Получаване на амфифилен диблоков съполимер, функционализиран с крайна първична аминогрупа и с трифенилфосфониеви странични групи ( $\text{H}_2\text{N-PLA-b-PDMAEMA-TPP}^+$ ).

Количественото превръщане на крайната алкинова група в първична аминогрупа е установено с  $^1\text{H}$  ЯМР-анализ от изчезването на сигнала за метиленовите протони до алкинова група при 4.75 ppm и от появата на сигнали при 7.63 и 5.38 ppm, които са характерни съответно за протона от триазоловия пръстен и за оксиметиленовите протони, разположени в съседство с пръстена. Следващата стъпка от синтеза включва въвеждането на странични трифенилфосфониеви групи в поликатионния блок от PDMAEMA чрез описаната по-горе реакция на кватернизирание с трифенилфосфониев бутилбромид (Схема 3). По този начин са въведени средно по две субклетъчно насочващи (към митохондриите) странични групи на полимерна верига, изчислени от  $^1\text{H}$  ЯМР-спектъра на продукта (вижте Фигура 7 и текста към нея).

1.2.3. Получаване мултифункционален амфифилен триблоков съполимер (F-Triblock) чрез формиране на иминна връзка между дблоковия съполимер  $\text{H}_2\text{N-PLA-b-PDMAEMA-TPP}^+$  и  $\text{LBA-PEO-CHO}$

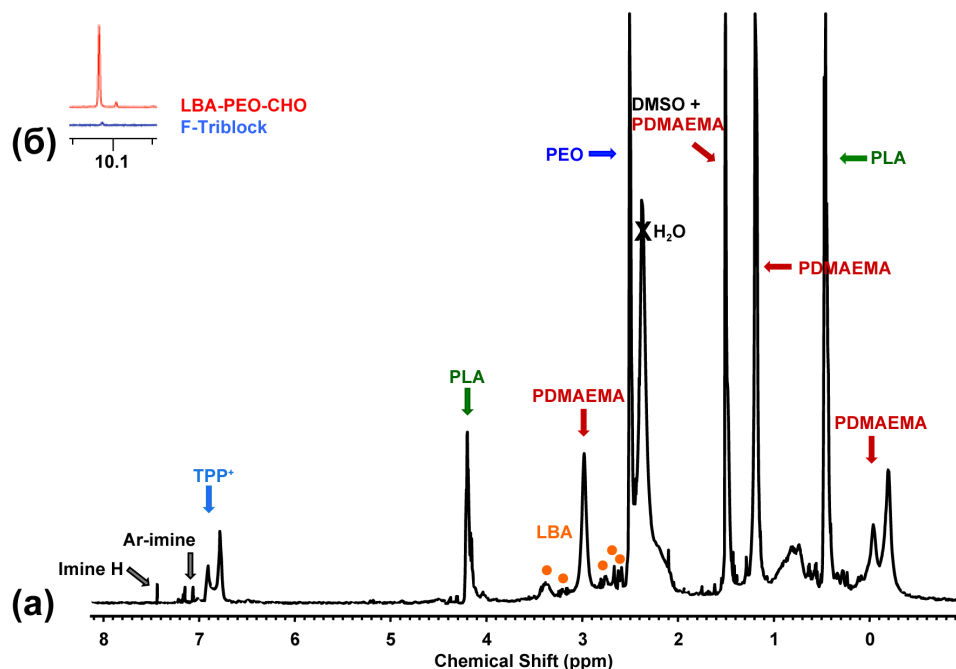
Последният етап от синтеза на комплексната мултифункционална макромолекула включва сдвояване на синтезираните в т. 1.2.1. и 1.2.2.  $\text{LBA-PEO-CHO}$  и  $\text{H}_2\text{N-PLA-b-PDMAEMA-TPP}^+$  чрез формиране на рН-чувствителна ароматна иминна връзка при реакцията между крайните алдехидна и първична аминна групи на съответните полимери (Схема 4).



**Схема 4.** Получаване на мултифункционален амфифилен триблоков съполимер  $\text{LBA-PEO-b-PLA-b-PDMAEMA-TPP}^+$  (F-Triblock).

Тази ароматна иминна връзка е стабилна в неутрална и в основна среда, но хидролизира в слабо кисела среда ( $\text{pH} \sim 6.8$ ). Наличието на такава лабилна в слабо кисела среда връзка в точката на свързване между полиетерния и полилактидния блокове на мултифункционалния триблоков съполимер би осигурило „стелт“-свойства на наноносителя по време на циркулацията му в кръвния поток, избягвайки адсорбцията на протеини. При достигане в близост до туморните клетки, където  $\text{pH}$  е около 6.8, хидролизата на иминната връзка би довела до отделяне на полиетерните вериги от повърхността на наноносителя и съответно до подобрената му клетъчната интернализация. Реакцията между първичната аминна и алдехидната крайни групи протича в сух DMF при меки условия. След старателно пречистване формирането на мултифункционалната триблокова архитектура се потвърждава чрез  $^1\text{H}$  ЯМР-анализ в  $\text{DMSO-d}_6$  (Фигура 9). Всички сигнали за протони от трите съставни полимерни блокове, двата насочващи лиганда (LBA и  $\text{TPP}^+$ ) и рН-чувствителната ароматна иминна връзка ясно се виждат на ЯМР-спектъра на крайния продукт (Фигура 9а). Отношението на интензитетите на протоните от повтарящите се мономерни звена на различните блокове предполагат количествено протичане на реакцията на сдвояване. Освен това, сигналът за алдехиден протон при 10.12 ppm, характерен за полиетерното производно ( $\text{LBA-PEO-}$

СНО) липсва в спектъра на мултифункционалния триблоков съполимер, потвърждавайки количественото формиране на иминна връзка, а също така и успешното пречистване на крайния продукт от излишъка на LBA-PEO-CHO, използван в реакционната процедура (Фигура 9б).

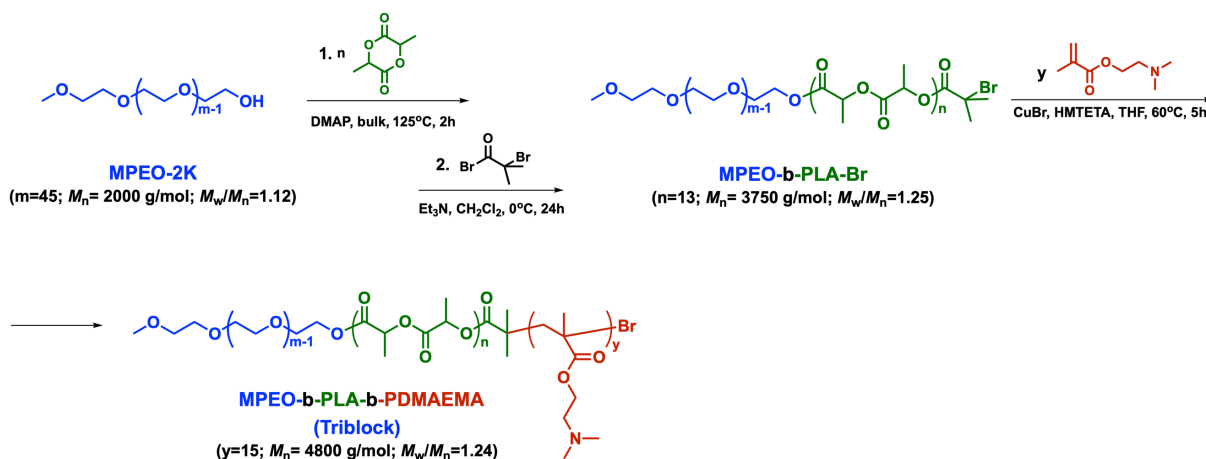


**Фигура 9.** <sup>1</sup>H ЯМР (600 MHz) спектри в DMSO-d<sub>6</sub> на: (а) мултифункционален амфифилен триблоков съполимер LBA-PEO-b-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (F-Triblock); (б) отрезки в интервала 10.05 – 10.15 ppm от спектрите на алдехид-функционализирания полиоксиетилен (LBA-PEO-CHO) и на мултифункционалния триблоков съполимер (F-Triblock).

### 1.3. Синтез на сравнителен амфифилен триблоков съполимер полиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид)-блок-поли(N,N-диметиламиноетил метакрилат) (MPEO-b-PLA-b-PDMAEMA, Triblock)

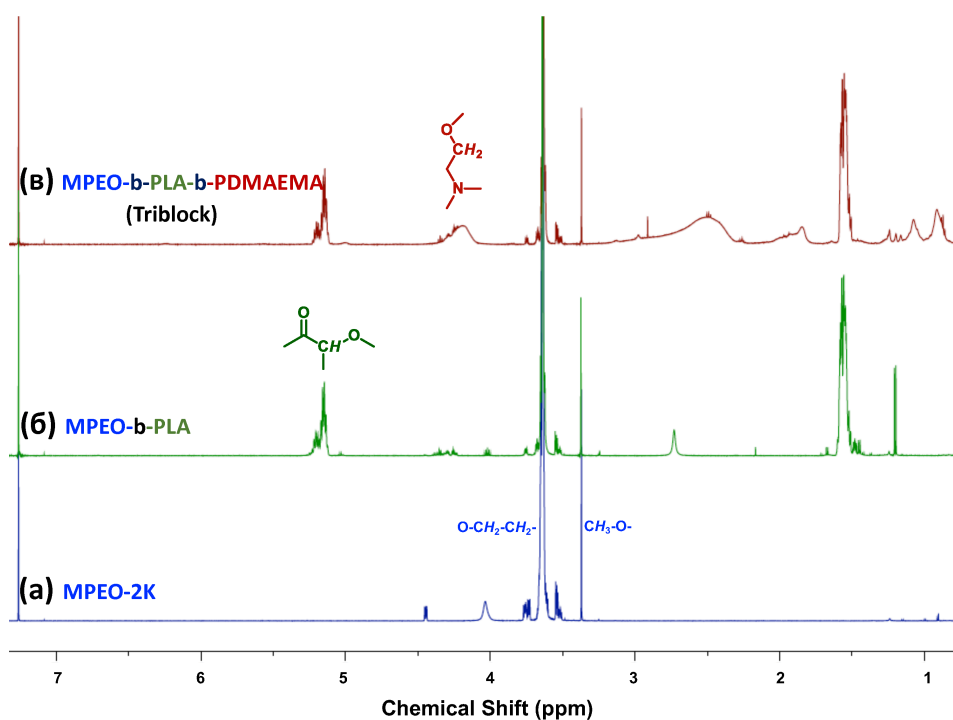
Във връзка с провеждането на сравнителни изследвания е синтезиран амфифилен триблоков съполимер MPEO-b-PLA-b-PDMAEMA (Triblock) с аналогичен на мултифункционалния триблоков съполимер (F-Triblock) състав, но не съдържащ клетъчно и субклетъчно насочващи лиганди, както и без рН-чувствителна връзка в точката на свързване между полиетерния и полилактидния блокове. Последователността от синтетични стъпки за получаването на триблоковия съполимер е представена на Схема 5. За целта първоначално е използван търговският полиоксиетилен MPEO-2K, съдържащ крайни метокси и хидроксилна групи. Крайната хидроксилна група на полиетера е използвана за инициране на свободна от метали полимеризация с отваряне на пръстена на D,L-лактид. Така е получен добре дефиниран амфифилен диблоков съполимер (MPEO-b-PLA). Впоследствие той е превърнат в макроинициатор за контролирана радикалова полимеризация с пренос на атом чрез реакция на естерифициране на крайната хидроксилна група на полилактидния блок с ВІВВ. Третият етап от синтеза е формирането на блок от PDMAEMA с желана дължина чрез ATRP на DMAEMA (Схема 5).





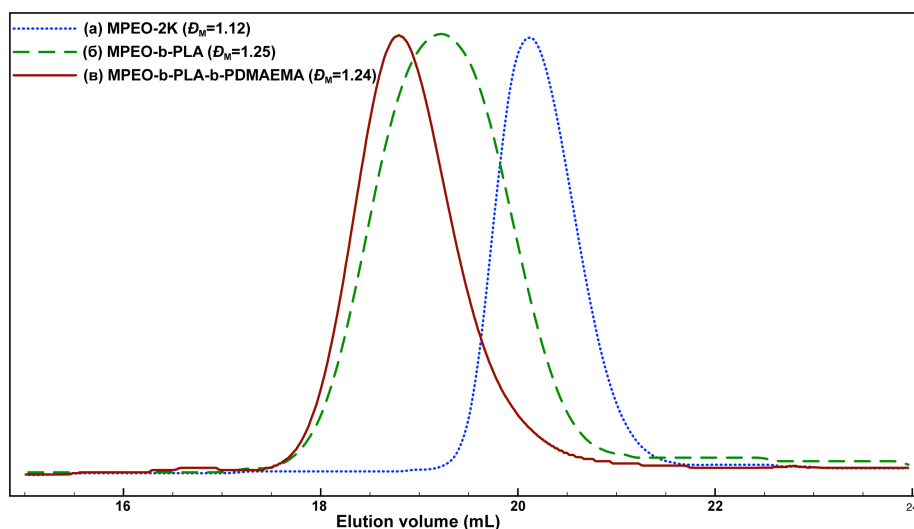
**Схема 5.** Синтетичен подход за получаването на нефункционализиран амфифилен триблоков съполимер MPEO-b-PLA-b-PDMAEMA (Triblock).

Така е получен нефункционализираният амфифилен триблоков съполимер (Triblock) с предварително зададен състав. Средните степени на полимеризация на двата мономера (D,L-лактид и DMAEMA) са определени от ЯМР-спектрите съответно на диблоковия и на триблоковия съполимер, знаейки молекулната маса на MPEO-2K (Фигура 10).



**Фигура 10.**  $^1\text{H}$  ЯМР (600 MHz) спектри в  $\text{CDCl}_3$  на: (а) метоксиполиоксиетилен (MPEO-2K); (б) метоксиполиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид) (MPEO-b-PLA); (в) метоксиполиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид)-блок-поли(*N,N*-диметиламиноетил метакрилат) (MPEO-b-PLA-b-PDMAEMA, Triblock).

ГПХ-анализите на всеки етап от синтеза потвърждават формирането последователно на ди- и триблокова съполимерни архитектури (Фигура 11). Хроматограмите показват мономодални криви на елуиране с ясно отместване към повисоки молекулни маси след всеки етап на полимеризация. Дисперсността на полимерите, получени на всеки етап от синтеза е в рамките на 1.12 – 1.25.



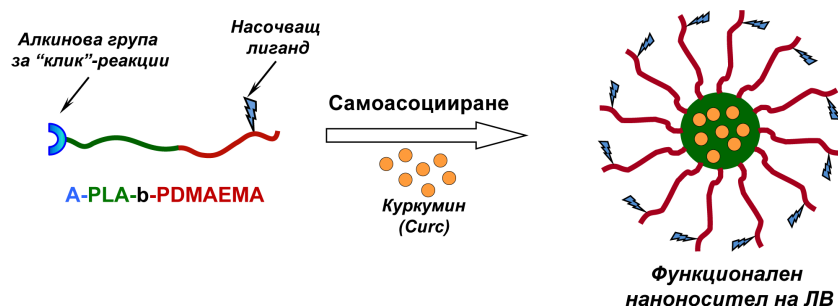
**Фигура 11.** Геловопронираща хроматография в THF (полистиренови стандарти) на: (а) метоксиполиоксиетилен (МРЕО-2К); (б) метоксиполиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид) (МРЕО-*b*-PLA); (в) метоксиполиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид)-блок-поли(*N,N*-диметиламиноетил метакрилат) (МРЕО-*b*-PLA-*b*-PDMAEMA, Triblock).

## 2. Самоасоцииране на амфифилните блокови съполимери и физикохимично охарактеризиране на получените функционални наноносители на хидрофобни лекарствени вещества

Поради своята амфифилна природа синтезираните нови ди- и триблокови функционални съполимери са склонни към самоасоцииране във водна среда над определена концентрация, наречена критична концентрация на мицелообразуване. Описаните в този раздел изследвания са свързани с формирането и последващото охарактеризиране на наноразмерни полимерни мицели, състоящи се от биоразградими хидрофобни ядра и функционални хидрофилни обвивки с потенциално приложение като системи за насочено доставяне на хидрофобни лекарствени вещества в прицелни клетки и клетъчни органели. Изследвана е и възможността за натоварване на моделно ЛВ в ядрата на мицелите като също така са проследени и профилите на освобождаването му от носителите.

### 2.1. Функционални полимерни мицели от амфифилни диблокови съполимери *A-PLA-b-PDMAEMA-TPP*<sup>+</sup>

Дизайнът и получаването на амфифилните диблокови съполимери с предварително зададени състав и функционалност (*A-PLA-b-PDMAEMA-TPP*<sup>+</sup>) бяха насочени към последващото формиране на наноносители, състоящи се от биоразградими полиестерни хидрофобни ядра (способни да солубилизират ЛВ) и стабилизираща хидрофилна обвивка от поликатионни вериги, носещи субклетъчно насочващи трифенилфосфониеви лиганди, както е илюстрирано на Схема 6.



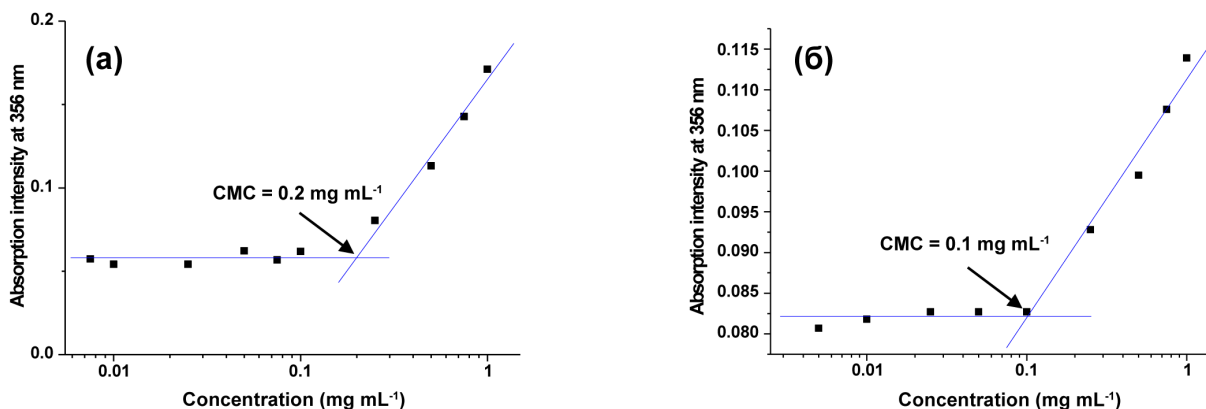
**Схема 6.** Формиране на функционален полимерен наноносител на хидрофобни лекарствени вещества чрез самоасоцииране на амфифилен диблоков съполимер A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> във водна среда.

Положително натоварената повърхност на носителите би подобрила клетъчната им интернализация посредством електростатични взаимодействия с отрицателно натоварената клетъчна мембрана. Освен това съдържащите се в поликатионните вериги аминокислотни групи притежават достатъчен буфериращ капацитет, който би осигурил освобождаването на наноносителите от ендозомите в кисела среда. Накрая, синтезираните съполимери носят крайни алкинови функционални групи, което ги превръща в платформи за разнообразни по-нататъшни „модулни“ модификации с подходящи реагенти или полимерни вериги.

### 2.1.1. Формиране и охарактеризиране на съполимерни мицели

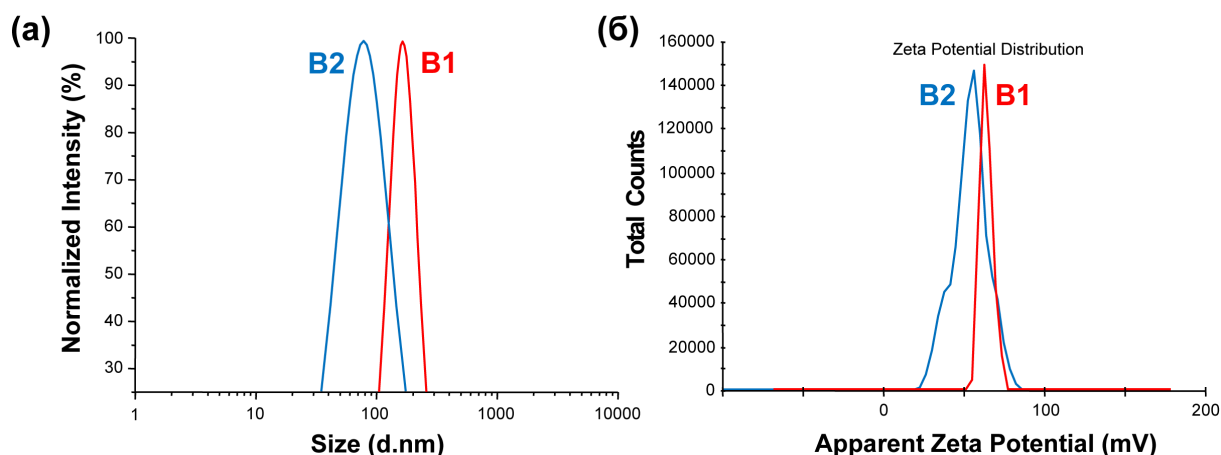
За формирането на мицели от типа хидрофобно ядро/хидрофилна обвивка от амфифилните диблокви съполимери е приложена техниката на наноутаяване, която изисква използването на два смесваеми разтворителя. Точно претеглено количество от съполимера се разтваря в органичен разтворител (ацетон), който е добър разтворител и за двата му съставни блока. При добавяне на полимерния разтвор към водата настъпва наноутаяване чрез бързо десолватизиране на полимера. Следва разбъркване на сместа за едно денонощие, при което леснолетливия ацетон се изпарява и остават полимерните мицели, диспергирани във вода. Накрая, концентрацията на дисперсията се довежда до 1 mg mL<sup>-1</sup> за извършването на анализи.

След установяване на оптималните условия за формиране на мицели от диблоковите съполимери (A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>) се пристъпва към определяне на критичната им концентрация на мицелообразуване, която е фундаментален параметър, характеризиращ термодинамичната стабилност на мицелите. По-ниските стойности на СМС са указание за по-голяма термодинамична стабилност. Използван е багрилен метод, състоящ се в проследяване с УВ-спектроскопия на солубилизацията на хидрофобното багрило 1,6-дифенил-1,3,5-хексатриен в ядрата на мицелите на водни дисперсии на съполимерите с различна концентрация. Тъй като багрилото не се разтваря във вода, то се солубилизира в хидрофобното ядро на формиращите се полимерни мицели, давайки характерен спектър с абсорбиционен максимум при 356 nm. Стойностите на СМС са получени чрез нанасяне на абсорбиционния максимум на ДРН като функция от концентрацията на съполимера (Фигура 12). Получените стойности на критичната концентрация на мицелообразуване са в интервала от 0.1 – 0.2 mg mL<sup>-1</sup>. Концентрацията на дисперсиите за последващите анализи (1 mg mL<sup>-1</sup>) значително надвишава и най-високите стойности на СМС, получени за съполимерите.



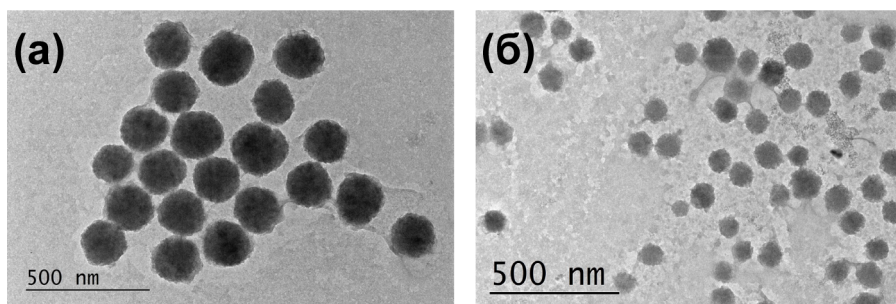
**Фигура 12.** Ефект на концентрацията на модифицирани с трифенилфосфониеви лиганди блокови съполимери (A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>) върху интензитета на поглъщане на DPH при 356 nm във водна среда за: (a) A-PLA<sub>10</sub>-b-PDMAEMA<sub>19</sub>-TPP<sup>+</sup> (съполимер **B1**); (б) APLA<sub>19</sub>-b-PDMAEMA<sub>26</sub>-TPP<sup>+</sup> (съполимер **B2**).

Проведени са изследвания на мицелните дисперсии във водна среда чрез динамично разсейване на светлината. Получените резултати показват мономодално, сравнително тясно разпределение на частиците по размери в зависимост от дължината на съставните полимерни блокове и от хидрофилно/хидрофобния баланс (Фигура 13а). Частиците са със средни размери в интервала между 80 и 165 nm. Съполимерът с най-късия хидрофобен блок (B1) формира частици с най-големи средни размери, най-вероятно поради големия брой от макромолекули, необходими за стабилизиране на структурата ядро-обвивка. Измерването на зета-потенциалите потвърждава, че повърхността на мицелите е положително натоварена ( $\zeta = 64.5$  mV за B1 и  $\zeta = 55.7$  mV за B2), което се дължи на катионните групи на PDMAEMA-блока, както и на свързаните TPP<sup>+</sup>-лиганди (Фигура 13б).



**Фигура 13.** Измервания чрез динамично и електрофоретично разсейване на светлината на 1 mg mL<sup>-1</sup> водни дисперсии на диблокови съполимери: (а) криви на разпределение по размери за съполимери B1 (d = 165 nm; PdI: 0.079) и B2 (d = 76 nm; PdI: 0.270); (б) криви на разпределение по зета – потенциали ( $\zeta = 64.5$  mV за B1 и  $\zeta = 55.7$  mV за B2).

Морфологията на частиците е изследвана с ТЕМ (Фигура 14). От ТЕМ-изображенията се вижда, че формираните частици са със сферична форма. Измерените средни диаметри, макар и малко по-големи са близки до тези, получени от измерванията във водна среда.



**Фигура 14.** TEM-изображения на мицели, получени от функционални диблокови съполимери A-PLA-b-PDMAEMA-TRP<sup>+</sup>: (а) B1 (среден диаметър на частиците  $187 \pm 14$  nm); (б) B2 (среден диаметър на частиците  $84 \pm 10$  nm).

### 2.1.2. Натоварване на полимерните наноносители с лекарствено вещество

За изследване на потенциалното приложение на функционалните мицели в системите за пренос на лекарствени вещества са избрани два от синтезираните блокови съполимери (B1 и B2), отличаващи се с различна дължина на блоковете (различен хидрофилно/хидрофобния баланс) и съответно различни характеристики (средни размери и разпределение по размери) на получените от тях мицели. (Фигура 13, Таблица 2). Като моделно хидрофобно лекарствено вещество за натоварване в полимерните наноносители е избран куркуминът. Той представлява нетоксичен полифенол, извлек от растението *Curcuma longa* и е известен с множеството си терапевтични свойства, включващи антитуморна, антиоксидантна, противовъзпалителна и антисептична активност. Механизмите, по които тя се изявява са разнообразни и главно оказват влияние върху регулирането на процесите на клетъчен растеж и апоптоза.

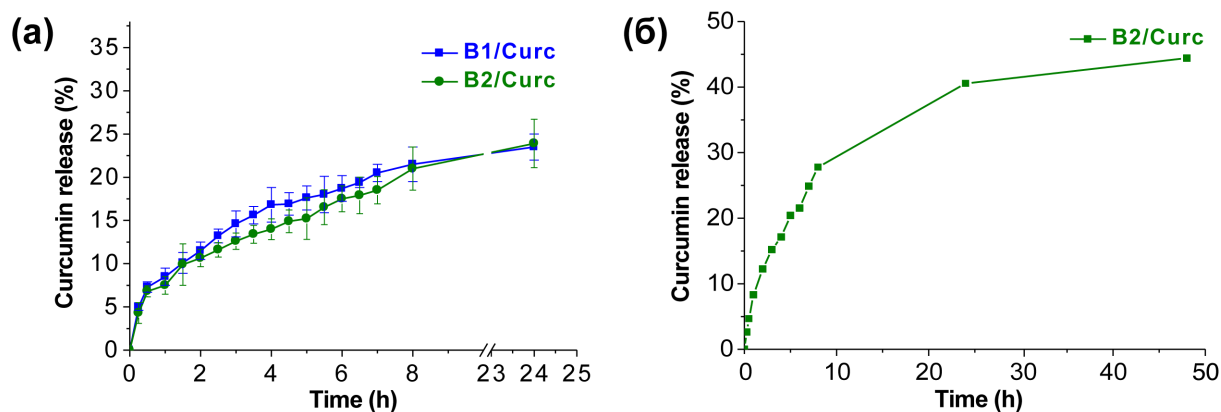
**Таблица 2.** Характеристики на функционални съполимерни (B1 и B2) мицели.

Код	$M_n^a$ (g mol <sup>-1</sup> )		$CMC^b$ (mg mL <sup>-1</sup> )	$d$ (nm)		$PdI^b$	$DLE^c$ (wt%)	$DLC^c$ (wt%)
	PLA-блок	PDMAEMA-блок		ДРС <sup>b</sup>	ТЕМ <sup>c</sup>			
B1	1 440	3 000	0.2	165	187	0.079	94	9.4
B2	2 800	4 100	0.1	76	84	0.270	98	9.8

<sup>a</sup> Средни бройни молекулни маси ( $M_n$ ), определени чрез <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопия. <sup>b</sup> Критична концентрация на мицелообразуване ( $CMC$ ), определена по багрилния метод чрез УВ-спектроскопия. <sup>c</sup> Средни диаметри ( $d$ ) и разпределения по размери ( $PdI$ ), определени чрез динамично разсейване на светлината. <sup>d</sup> Средни диаметри ( $d$ ), определени от TEM-анализи. <sup>e</sup> Ефективност и капацитет на натоварване на лекарственото вещество ( $DLE$  и  $DLC$ ), определени чрез УВ-спектроскопия.

Натоварването се осъществява на същия принцип както при формирането на мицели, като единствената разлика е, че в случая куркуминът се разтваря в ацетон заедно с диблоковия съполимер и така приготвения смесен разтвор се прикапва във вода за формиране на натоварени с ЛВ полимерни мицели чрез съасоциране. Ефективността на натоварване на ЛВ ( $DLE$ ) е близо 100 % и за двата съполимера (съответно 94 и 98 wt% за B1/Curc и B2/Curc), а капацитетът на натоварване ( $DLC$ ) е почти 10 wt% (съответно 9.4 и 9.8 wt% за B1/Curc и B2/Curc). При измерванията на натоварените с куркумин частици чрез динамично и електрофоретично разсейване на светлината не се наблюдават значителни разлики в средните размери, разпределението по размери и повърхностния товар в сравнение с ненаатоварените мицели. Приблизително еднаквите положителни стойности на зета-потенциалите за натоварените и ненаатоварените мицели са указание, че лекарственото вещество е включено главно в хидрофобните ядра на частиците, а не в близост и на повърхността им.

Освобождаването на куркумин от полимерните мицели B1/Curc и B2/Curc бе проследено *in vitro* чрез диализа във фосфатен буфер (PBS, pH 7) за 24 часа при 37°C. Допълнително се добавят 5 wt% етанол в средата за солубилизиране и детектиране на освободения куркумин чрез УВ-спектроскопия. Процентното освобождаване на куркумина, натоварен в полимерните наноносители (B1/Curc и B2/Curc) в зависимост от времето е представено на Фигура 15а.



**Фигура 15.** *In vitro* освобождаване на куркумин от: (а) A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (B1 и B2) полимерни мицели в PBS (pH 7) при 37°C; (б) A-PLA<sub>19</sub>-b-PDMAEMA<sub>26</sub>-TPP<sup>+</sup> (B2) полимерни мицели в двуфазна (вода/хлороформ) система при 37°C.

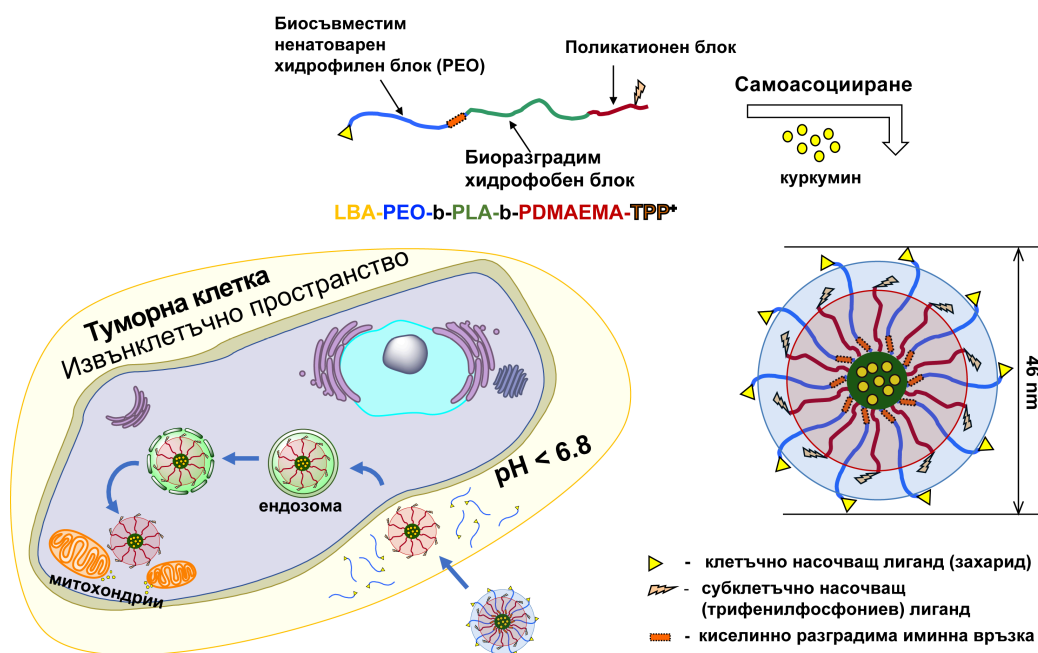
Профилът показва първоначално около 10%<sup>но</sup> ускорено освобождаване през първите 1-2 часа на изследването, следвано от значително по-бавно, равномерно освобождаване на по-малко от 25% от включения куркумин през следващите 24 часа и от двете полимерни системи. Това означава, че значителна част от ЛВ остава защитено в ядрата на мицелите, което е от особена важност за запазването на химичната му стабилност по време на циркулация в кръвния поток. Същевременно е проследено и *in vitro* освобождаването на куркумин от натоварени водни мицелни дисперсии в несмесваем хидрофобен органичен разтворител (хлороформ) като среда (Фигура 15б). Видно е, че дори и при тези условия (среда, която лесно и напълно разтваря куркумин), общото количество освободено ЛВ достига плато от около 43% след 24 часа. Получените резултати от профилите на освобождаване са показателни за способността на полимерната мицелна система да запазва “товарът” в ядрото си по време на транспортирането му до прицелните клетки.

## 2.2. Полимерни мицели от амфифилен мултифункционален триблоков съполимер LBA-PEO-b-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (F-Triblock) и от нефункционализирания му аналог MPEO-b-PLA-b-PDMAEMA (Triblock)

След успешното формиране, охарактеризиране и натоварване с ЛВ на функционални полимерни мицели от амфифилните диблокови съполимери изследванията продължават с цел усъвършенстване на системата чрез въвеждане на допълнителни функции, които биха подобрили отнасянията ѝ при потенциални *in vivo* приложения. На първо място, към диблоковата архитектура е свързан трети полимерен блок от полиоксиетилен, който е модифициран със специфична крайна функционалност за активно насочване към прицелни клетки. Полиетерната обвивка на мицелите ги прави „невидими“ за протеините в кръвния поток и това би удължило времето им на циркулация. От друга страна, наличието на PEO-обвивка води до понижена клетъчна интернализация и по-трудно ендозомно освобождаване на частиците. За решаването на т. нар. „ПЕГ-дилема“, в нашия случай, полиетерният блок е свързан за амфифилната

дблокова архитектура чрез киселинно лабилна ароматна иминна връзка. Очаква се, че при достигане на наноносителя в близост до туморна клетка, където рН е слабо понижено ще настъпи откъсване на PEO-веригите от повърхността му, последвано от клетъчната му интернализация. Концепцията за формиране на мултифункционални трислойни полимерни мицели от триблоковия съполимер LBA-PEO-b-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (F-Triblock), съдържащи биоразградимо хидрофобно ядро, междинен поликатионен слой, носещ субклетъчно насочващи лиганди и обвивка от отделящ се в слабо кисела среда полиетерен слой, модифициран с клетъчно насочващи лиганди е представена на Схема 7. Схематично са представени и етапите на очакваното преодоляване от наноносителя на различните бариери и достигането му до прицелните клетъчни органели (митохондриите) благодарение на неговата мултифункционалност.

За да се установят предимствата или недостатъците на мултифункционалния полимерен наноносител при проведените по-нататък *in vitro* изследвания е изследвано и самоасоцирането на специално синтезиран за целта амфифилен триблоков съполимер MPEO-b-PLA-b-PDMAEMA (Triblock) със същия състав, но несъдържащ насочващи лиганди и рН-чувствителна връзка между полиетерния и полилактидния блок.

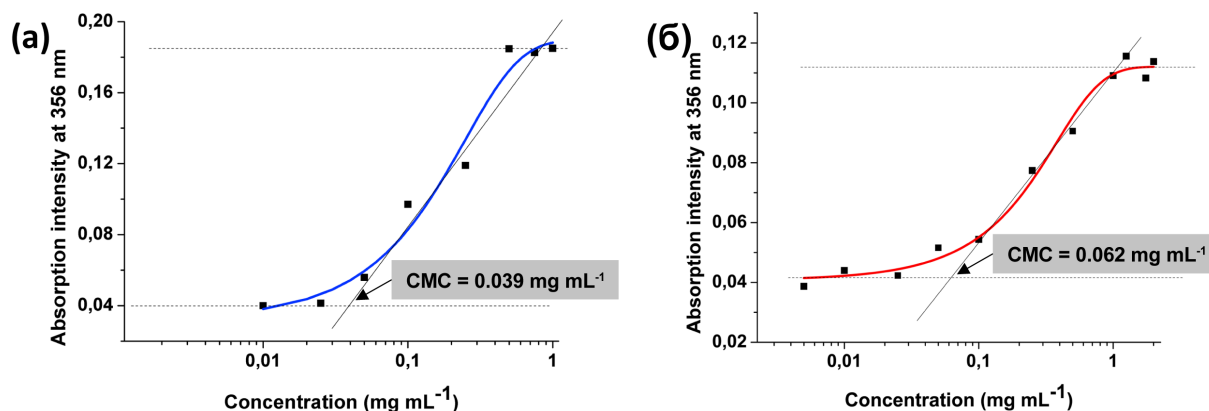


**Схема 7.** Формиране на мултифункционален полимерен наноносител за насочено доставяне на хидрофобни лекарствени вещества в прицелни клетки и клетъчни органели чрез самоасоциране на амфифилен триблоков съполимер LBA-PEO-b-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (F-Triblock) във водна среда.

### 2.2.1. Формиране и охарактеризиране на съполимерни мицели от амфифилените триблокови съполимери F-Triblock и Triblock

Аналогично на дблоковите съполимери и в този случай полимерните мицели са получени чрез техниката на наноутаяване. Определено количество от триблоковия съполимер (F-Triblock или Triblock) се разтваря в ацетон (добър разтворител и за трите съставни блокове) и се добавя на капки към PBS (pH 7.4) или дестилирана вода. Следва бързо отстраняване на органичния разтворител под вакуум и довеждане на концентрацията на дисперсията до 1 mg mL<sup>-1</sup>.

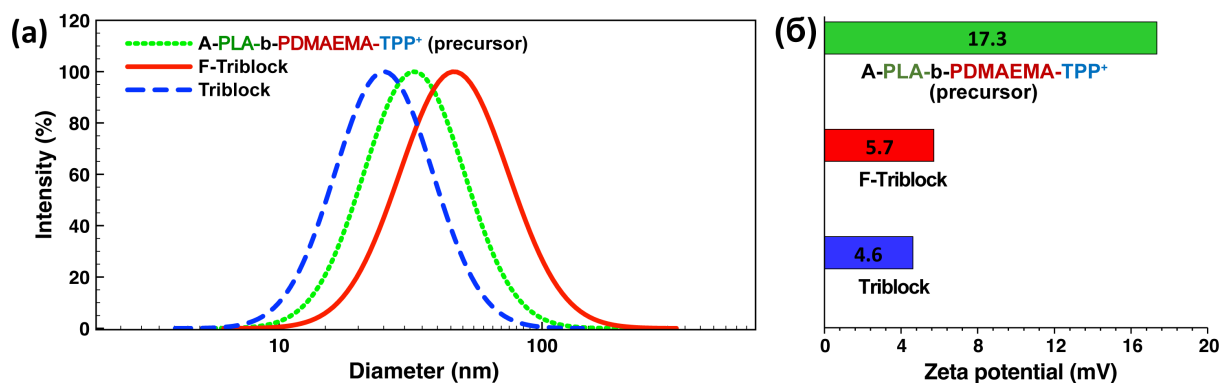
Следва определяне на СМС на триблоковите съполимери чрез багрилния метод, описан в предходните раздели. Получените стойности на СМС съответно 0.039 и 0.062  $\text{mg mL}^{-1}$  за съполимерите Triblock и F-Triblock са в съответствие с техния хидрофилно/хидрофобен баланс (Фигура 16).



**Фигура 16.** Ефект на концентрацията на амфифилни триблокови съполимери върху интензитета на поглъщане на DPH при 356 nm във водна среда за: (а) нефункционализиран съполимер Triblock; (б) мултифункционален съполимер F-Triblock.

По-ниската СМС-стойност на нефункционализирания триблоков съполимер, най-вероятно се дължи на неговата по-голяма хидрофобност. Тук, отново за последващите анализи на мицелните дисперсии са ползвани концентрации 1  $\text{mg mL}^{-1}$ , които са значително по-високи от определените СМС и за двата съполимера.

Дисперсии на мицели, формирани от амфифилния диблоков прекурсор (A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>), от съответния мултифункционален триблоков съполимер (F-Triblock) и от нефункционализирания му аналог (Triblock) са изследвани с динамично разсейване на светлината. Установено е наличието на наноразмерни частици със средни диаметри между 25 и 46 nm и мономодално разпределение по размери (Фигура 17а).

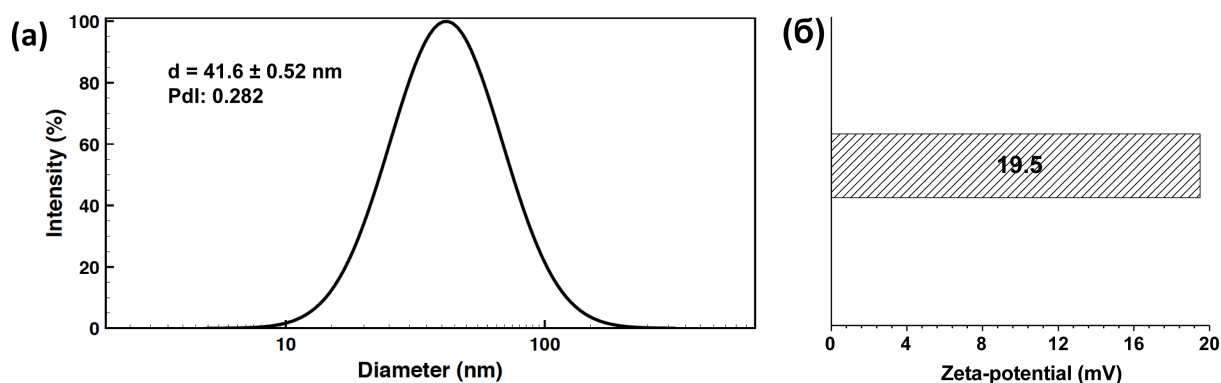


**Фигура 17.** Измервания чрез динамично и електрофоретично разсейване на светлината на 1  $\text{mg mL}^{-1}$  дисперсии в PBS (pH 7.4) на блокови съполимери: (а) криви на разпределение по размери за A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> ( $d = 32.6 \pm 0.61$  nm; PdI: 0.212), F-Triblock ( $d = 46.3 \pm 1.90$  nm; PdI: 0.253) и Triblock ( $d = 25.03 \pm 1.55$  nm; PdI: 0.201); (б) зета – потенциали ( $\zeta = 17.3$  mV за A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>,  $\zeta = 5.7$  mV за F-Triblock и  $\zeta = 4.6$  mV за Triblock).



Свързването на полиетерния блок, носещ обемиста крайна група към амфифилната диблокова архитектура води до нарастване на средните диаметри на мултифункционалните мицели, формирани от F-Triblock с около 10 nm. Нефункционализираният триблоков съполимер Triblock, от друга страна, формира компактни мицели със средни диаметри от 25 nm. Това, най-вероятно се дължи на липсата при него на обемистите странични трифенилфосфониеви и крайни лактобионни групи.

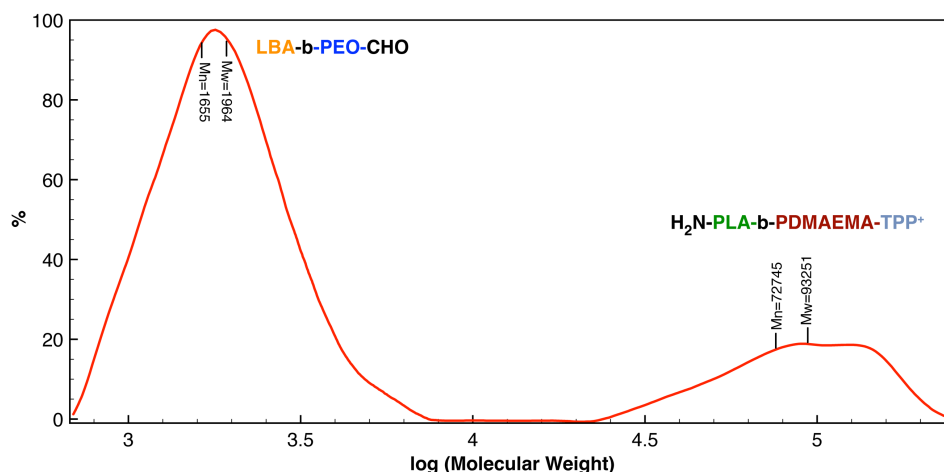
Ролята на полиетерния блок освен да носи клетъчно насочващи лиганди е и да осигури т. нар. „стелт“-ефект, формирайки повърхността на наноносителя. Това се установява от измерените зета-потенциали на полимерните мицели (Фигура 17б). Докато диблоковият прекурсор формира мицели с положително натоварена повърхност ( $\zeta = 17.3$  mV), то и двата триблокови съполимера формират мицели със значително понижени стойности на повърхностния товар ( $\zeta = 5.7$  mV за мицелите от F-Triblock и  $\zeta = 4.6$  mV за мицелите от Triblock). Това е доказателство за формирането на трислойни мицели от триблоковите съполимери с междинен поликатионен слой, който успешно е екраниран от биосъвместимата полиетерна обвивка. Друга важна функция на външния полиетерен слой от мултифункционалните мицели е способността му да се отделя от повърхността им при достигане в близост до туморните клетки, осигурявайки подобрена клетъчна интернализация на наноносителите. За да се докаже успешното отделяне на РЕО от мицелите, формирани от F-Triblock те се инкубират в киселинен буфер (pH 6) в продължение на 30 min при 37°C. Проведените след това ДРС-измервания показват наличието на колоидно стабилни частици със средни размери и положителни зета-потенциали, чиито стойности са леко завишени в сравнение с тези на мицелите от диблоковия прекурсор, измерени при pH 7.4 (Фигура 18). Резултатите са указание за успешното отделяне в слабо кисела среда на външния полиетерен слой от мицелите и са в съответствие с повишената степен на протониране на PDMAEMA-блоковете в кисела среда, водещо до увеличаване на размерите на обвивката.



**Фигура 18.** Измервания чрез динамично и електрофоретично разсейване на светлината на дисперсия ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) на триблоков съполимер F-Triblock след 30-минутно третиране в киселинен буфер (pH 6.0): (а) крива на разпределение по размери ( $d = 41.6 \pm 0.52$  nm; Pdl: 0.282); (б) зета – потенциал ( $\zeta = 19.5$  mV).

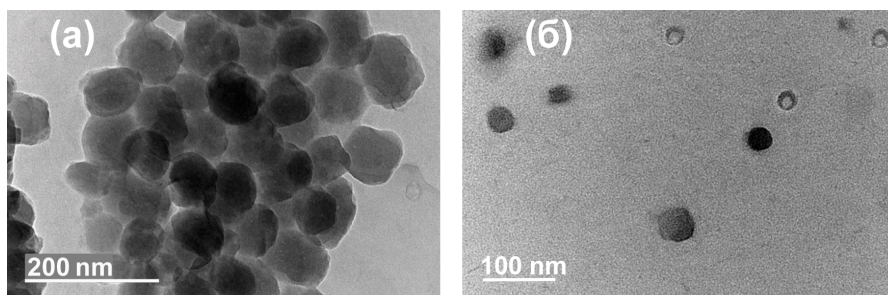
По-нататък, дисперсията на третираните в кисела среда функционални мицели се лиофилизира, остатъкът се разтваря в THF и се анализира с геловопроникваща хроматография. Хроматограмата ясно показва, че РЕО-блокът успешно се е отделил от мултифункционалната триблокова архитектура чрез разкъсване на ароматната иминна връзка в слабо кисела среда (Фигура 19). Необичайно високите стойности за молекулната маса и дисперсността на функционалния диблоков съполимер ( $\text{H}_2\text{N-PLA-b-PDMAEMA-TRP}^+$ ) се дължат на задържането му в пълнежа на колоните на апарата, докато отделеният

LBA-PEO-CHO е мономодален с молекулна маса, близка до тази изчислена от ЯМР-спектъра на продукта.



**Фигура 19.** Геловопроникваща хроматография (крива на разпределение по молекулни маси) в THF на разтворен сух остатък от функционални мицели от F-Triblock след инкубиране при рН 6.0 и последваща лиофилизация.

Морфологията на наносителите, получени от амфифилните триблокови съполимери е визуализирана с ТЕМ-анализи. Установено, че частиците, формирани и от двата триблокови съполимера са със сферична форма. Измерените средни диаметри са малко по-големи, но близки до тези, получени от ДРС-измервания на мицелни дисперсии във водна среда (Фигура 20).



**Фигура 20.** ТЕМ-изображения на мицели, получени от амфифилни триблокови съполимери: (а) мултифункционален F-Triblock (среден диаметър на частиците  $61 \pm 11$  nm); (б) нефункционализиран Triblock (среден диаметър на частиците  $28.5 \pm 8$  nm).

### 2.2.2. Натоварване и освобождаване на куркумин

Изследвана е възможността мицелите, получени от мултифункционалния (F-Triblock) и от нефункционализирания, предвиден за сравнителни изследвания (Triblock) съполимери да бъдат натоварени с куркумин. Натоварването отново се осъществява чрез техниката на наноутаяване, използвайки ацетон като общ за всички ингредиенти разтворител. След бързото му отстраняване от водната дисперсия под вакуум, концентрацията на частиците се довежда до  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Определените DLE за натоварените наносители с първоначално масово отношение мицели/ЛВ = 10:1 са съответно 74 и 98 wt% за F-Triblock/Curc и за Triblock/Curc, а стойностите за DLC са 6.7 и 9.3%. Натоварените с ЛВ носители са охарактеризирани с динамично и елкторфоретично разсейване на светлината. Резултатите не показват съществени разлики в средните диаметри, разпределението по размери и зета-потенциалите на частиците, сравнени с тези, измерени за ненаатоварените мицели. Това е указание, че и

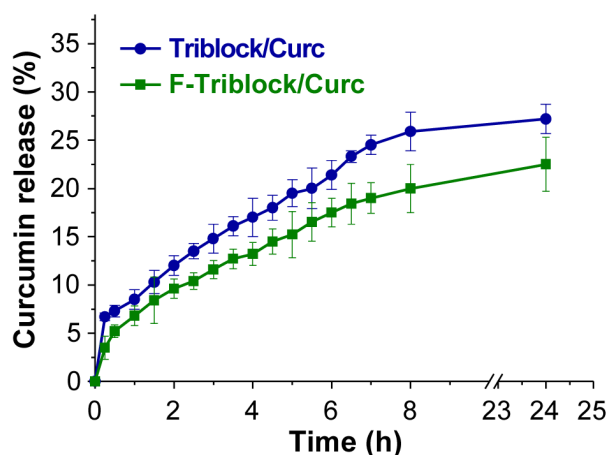
при двата типа мицели, получени от амфифилните триблокови съполимери ЛВ е локализирано главно в биоразградимите им хидрофобни ядра. Характеристиките на триблоковите съполимери и на мицелите, формирани от тях са представени в Таблица 3.

**Таблица 3.** Характеристики на триблокови съполимерни (F-Triblock и Triblock) мицели.

Код	$M_n^a$ (g mol <sup>-1</sup> )			$CMC^b$ (mg mL <sup>-1</sup> )	$d$ (nm)		$PdI^b$	$DLE^c$ (wt%)	$DLC^d$ (wt%)
	PEO-	PLA-	PDMAEMA-		ДРС <sup>b</sup>	ТЕМ <sup>c</sup>			
	блок	блок	блок						
F-Triblock	2 400	1 730	2 200	0.062	46.30	61.0	0.253	74	6.7
Triblock	2 000	1880	2 350	0.039	25.03	28.5	0.201	98	9.3

<sup>a</sup> Средни бройни молекулни маси ( $M_n$ ), определени чрез <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопия. <sup>b</sup> Критична концентрация на мицелообразуване ( $CMC$ ), определена по багрилния метод чрез УВ-спектроскопия. <sup>c</sup> Средни диаметри ( $d$ ) и разпределения по размери ( $PdI$ ), определени чрез динамично разсейване на светлината. <sup>d</sup> Средни диаметри ( $d$ ), определени от ТЕМ-анализи. <sup>e</sup> Ефективност и капацитет на натоварване на лекарственото вещество ( $DLE$  и  $DLC$ ), определени чрез УВ-спектроскопия.

*Ин vitro* проследяването на профилите на освобождаване на куркумина от мултифункционалните мицели и от техните нефункционализирани аналози се извършва в буферна среда от PBS (pH 7) с добавени 5 wt.% етанол за период от 24 h при 37°C. Процентите на освободен куркумин от натоварените наноносители (F-Triblock/Curc и Triblock/Curc) в зависимост от времето са представени на Фигура 21.



**Фигура 21.** *Ин vitro* освобождаване на куркумин от: мултифункционални (F-Triblock) и нефункционализирани (Triblock) триблокови съполимерни мицели в PBS (pH 7) при 37°C.

Първоначално, в рамките на първия час от изследването се наблюдава ускорено освобождаване на около 7-8 % от ЛВ последвано от значително по-забавено освобождаване в следващите часове. След 24 часа инкубиране резултатите от УВ-измерванията на средата показват по-малко от 25 % освободен куркумин от мултифункционалния наноносител и малко над тази стойност за нефункционализирания му аналог. Резултатите и тук потвърждават способността на наноносителите да защитават химичната стабилност и активност на ЛВ, задържайки ги в хидрофобните си ядра, което е от значение при циркулацията на натоварените частици в кръвния поток.

### 3. *Ин vitro* изследвания на полимерните наноносители

След успешното формиране и физикохимичното охарактеризиране на колоидно стабилни наноагрегати от синтезираните амфифилни ди- и триблокови съполимери, последвано от натоварването им с хидрофобно ЛВ се пристъпи към *ин vitro*

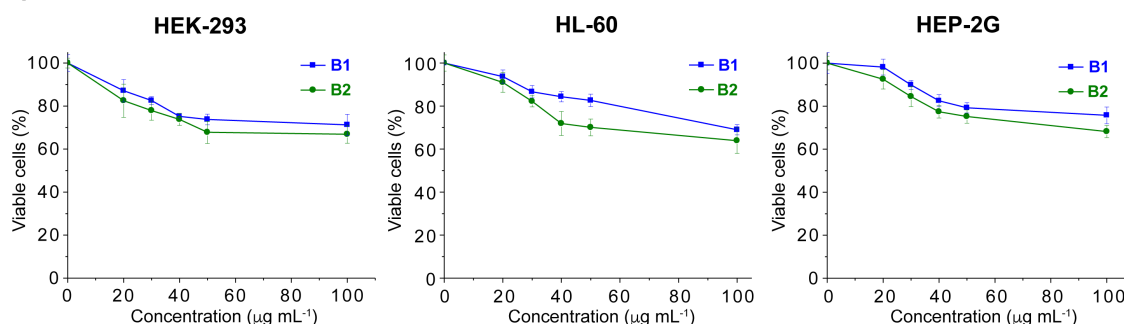
изследвания на двата типа ненатоварени и натоварени с ЛВ наноносители върху различни човешки клетъчни линии. Изследванията обхващат оценка на цитотоксичността, на проапоптотичната активност, на потискането на активната форма на ядрения фактор NF- $\kappa$ B (p65) както и проследяване на клетъчната интернализация и на субклетъчната насочваща ефективност на полимерните наноносители.

### 3.1. *Ин витро* изследвания на функционални мицели, получени от амфифилни диблокови съполимери (B1 и B2)

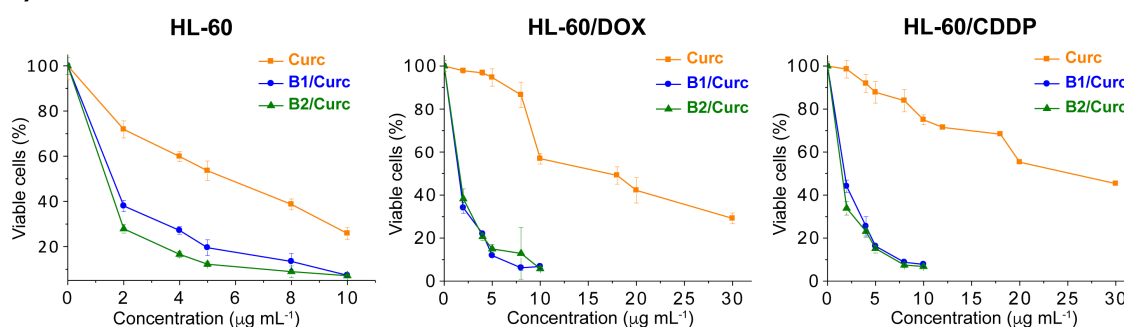
#### 3.1.1. Оценка на цитотоксичността на ненатоварени диблокови съполимерни мицели

Отсъствието на цитотоксичност е едно от основните изисквания при използването на полимерите като носители на ЛВ. В тази връзка, е проследен *ин витро* инхибиторния потенциал на ненатоварените мицели върху клетъчната пролиферация на човешки клетъчни линии от различен тип и произход. Мицелните системи се изследват върху немалигнени HEK-293 (ембрионални бъбречни клетки) и две малигнени клетъчни линии - HL-60 (остра миелоидна левкемия) и HEP-G2 (чернодробен карцином), които са подбрани като представители на основни популации клетки, с които полимерните мицели, приложени системно биха си взаимодействали. Клетъчните линии са изложени на действието на изследваните мицели, формирани от синтезираните амфифилни диблокови съполимери A-PLA<sub>10</sub>-b-PDMAEMA<sub>19</sub>-TPP<sup>+</sup> (B1), и APLA<sub>19</sub>-b-PDMAEMA<sub>26</sub>-TPP<sup>+</sup> (B2). Резултатите от проведеното изследване са представени на Фигура 22а.

(а)



(б)



**Фигура 22.** Цитотоксичност на: (а) ненатоварени A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (B1 и B2) полимерни мицели след 72 часа третиране при 37°C. Всяка точка представлява средноаритметична стойност  $\pm$  SD от 6 независими експеримента; (б) свободен куркумин (Curc) и натоварени A-PLA-b-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> полимерни мицели (B1/Curc и B2/Curc) след 72 часа третиране при 37°C. Всяка точка представлява средноаритметична стойност  $\pm$  SD от 8 независими експеримента.

На представените криви „концентрация-ефект“ се наблюдава известна дозозависима цитотоксичност на мицелите, като в изследваният концентрационен

интервал от 20-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  потискането на клетъчната пролиферация е по-малко от 50% в сравнение с нетретираната контрола. Сравнявайки резултатите, получени за двата блокови съполимера (B1 и B2) се установява, че при мицелите от блоковите съполимери B2 по-голямата дължина на поликатионния блок от PDMAEMA води до леко повишаване на цитотоксичността, но дори при най-високата концентрация от 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  се наблюдава не повече от 40% потискане на клетъчната преживяемост. Установените ниски стойности на цитотоксичност за изследваните върху панел от човешки клетъчни линии с различен произход ненатоварени мицели, представляват благоприятна характеристика за потенциалното им приложение като носители на ЛВ.

3.1.2. *Сравнително in vitro изследване на антипролиферативния ефект на свободен и натоварен в диблокови съполимерни мицели куркумин върху човешки туморни клетъчни линии.*

Проведени са *in vitro* изследвания на антитуморната активност на свободен куркумин (въведен под формата на етанолен разтвор) и включен в полимерни мицели куркумин (B1/Curc and B2/Curc). Използвани са три туморни клетъчни линии: химиочувствителната HL-60 и резистентните ѝ варианти HL-60/DOX (множествена лекарствена резистентност) и HL-60/CDDP (цисплатин резистентна). Резултатите са представени на Фигура 22б. Еквиефективните инхибиторни концентрации ( $IC_{50}$ ), индексите на модулация (MI) и на резистентност (RI) са дадени в Таблица 4.

**Таблица 4.** Еквиефективни концентрации ( $IC_{50}$ ), индекси на модулация (MI) и индекси на резистентност (RI) на натоварени с куркумин функционални полимерни мицели (B1/Curc and B2/Curc) и на свободното лекарствено вещество (Curc).

Клетъчна линия	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			MI*		RI**		
	Curc	B1/Curc	B2/Curc	B1/Curc	B2/Curc	Curc	B1/Curc	B2/Curc
HL-60	8.02	1.62	1.57	4.95	5.1	-	-	-
HL-60/DOX	11.8	1.42	1.33	8.3	8.87	1.47	0.88	0.85
HL-60/CDDP	25.4	1.51	1.46	16.82	17.4	3.16	0.93	0.94

\*MI =  $IC_{50}$  (свободен куркумин) /  $IC_{50}$  (включен в мицели куркумин); \*\*RI =  $IC_{50}$  (резистентен HL-60 вариант) /  $IC_{50}$  (химиочувствителна HL-60)

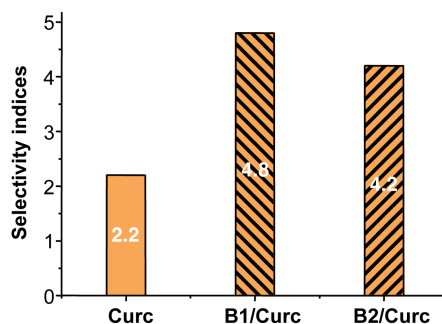
Вижда, че включването на куркумин в мицелите е съпроводено със значително нарастване на цитотоксичния му ефект, като  $IC_{50}$ -стойностите на натоварения в мицелите куркумин са няколко пъти по-ниски в сравнение с тези на свободното лекарствено вещество.

$IC_{50}$ -стойностите се използват за изчисляване на индексите на модулация и индексите на резистентност. Индексът на модулация дава количествена информация за отношението между антипролиферативната активност на свободен куркумин и куркумин, включен в мицели. Оценката на индексите на модулация показва, че антипролиферативната активност на куркумина в мицели от диблоковите съполимери спрямо химиочувствителната HL-60 линия е над 5 пъти по-висока в сравнение с тази на свободния куркумин, докато в резистентните клетъчни линии HL-60/DOX и HL-60/CDDP е съответно с около 9 и 17 пъти по-висока.

Индексите на резистентност (RI) отразяват отношението между  $IC_{50}$ -стойностите на резистентните варианти към  $IC_{50}$ -стойностите на химиочувствителната клетъчна линия. От получените резултати се вижда, че докато свободния куркумин е по-малко ефективен при HL-60/DOX и HL-60/CDDP, спрямо химиочувствителната HL-60, с индекси на резистентност от 1.47 и 3.17, то мицелните му дисперсии (B1/Curc и B2/Curc) показват по-ниски индекси на резистентност в интервала 0.85 - 0.94. Отчетените по-малки от единица индекси на резистентност при полимерните мицели, натоварени с куркумин, показват напълно заобикаляне на фенотипа на резистентност, доказващо

коллатерална сензитивност (повишен отговор в резистентните спрямо химиочувствителната клетъчни линии).

Друго много важно наблюдение от проведените експерименти е, че мицелите на основата на диблокови съполимери A-PLA-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup>, натоварени с куркумин се характеризират с висока селективност спрямо туморните клетъчни линии в сравнение с немалигнените НЕК-293 клетки. Цитотоксичната селективност (SI) е определена като отношение на IC<sub>50</sub> за немалигнени НЕК-293 клетки към средноаритметичната стойност от IC<sub>50</sub> за туморните клетъчни линии. Резултатите, представени на Фигура 23 показват, че IC<sub>50</sub> на свободен и натоварен в мицелите куркумин, отчетени за немалигнените клетки са по-високи от тези за малигнените клетъчни линии, което означава по-ниска цитотоксичност в нормалните клетъчни линии. От друга страна обаче, свързаният в мицелите куркумин се характеризира с по-слабо потискане на клетъчната пролиферация на нормалните клетки в сравнение със свободното лекарство вещество. Отчетените индекси на селективност от 4.8 (за B1/Curc) и 4.2 (за B2/Curc) са два пъти по-високи в сравнение тези на свободния куркумин. Това показва, че натоварените с куркумин мицелни дисперсии са много по-ефективни по отношение на селективно инхибиране на клетъчната пролиферация на малигнените клетки в сравнение със свободния куркумин.



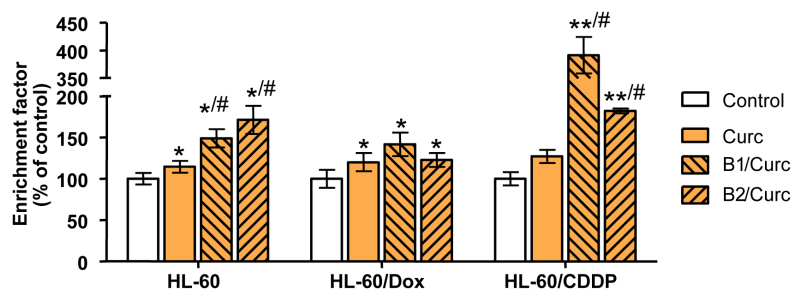
**Фигура 23.** Цитотоксична селективност на свободен (Curc) и натоварен в мицели от A-PLA<sub>10</sub>-PDMAEMA<sub>19</sub>-TPP<sup>+</sup> (B1/Curc) и A-PLA<sub>19</sub>-PDMAEMA<sub>26</sub>-TPP<sup>+</sup> (B2/Curc) куркумин.

### 3.1.3. Способност на свободен или включен в диблокови съполимерни мицели куркумин да предизвиква апоптоза в човешки туморни клетъчни линии

Способността на свободен или включен в полимерни мицели куркумин да предизвиква апоптоза е проследена, използвайки търговски ELISA (ензим-свързан имуносорбентен метод) комплект за количествено определяне на хистон-асоциирана ДНК фрагментация, която е ключов признак на програмираната клетъчна смърт. Апоптозата се характеризира с активиране на ендогенни ендонуклеази, по-специално капсаза-3 активирана ДНК-аза (CAD) и последващо разцепване на ядрената ДНК в интернуклеозомните фрагменти с приблизително 180 базови двойки (bp) или кратни на тях (360, 540 и т.н.). Апоптотичната ДНК фрагментация се използва като маркер за апоптоза и за идентифициране на апоптотични клетки.

След 24-часово третиране на химиочувствителната клетъчна линия HL-60 и нейните резистентни варианти (HL-60/DOX и HL-60/CDDP) с еквивалентни концентрации на изпитваните системи (Curc, B1/Curc и B2/Curc) се наблюдава статистически значимо увеличение на съдържанието на моно- и олигонуклеозомни ДНК-фрагменти. Апоптотичните ефекти на натоварените с куркумин мицелни дисперсии и особено на B1/Curc, са по-изразени в сравнение с ефекта на свободното ЛВ (Фигура 24). Най-значим апоптотичен отговор е установен с B1/Curc в резистентната HL-60/CDDP клетъчна линия. Получените резултати потвърждават, че включването на лекарственото вещество в мицели значително подобрява ефекта му, позволявайки използване на по-

ниски концентрации при третиране в сравнение с тези на свободния Curc, определени въз основа на IC<sub>50</sub> стойностите.

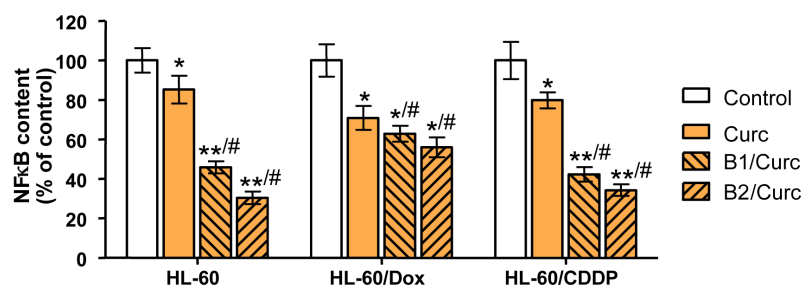


**Фигура 24.** Апоптотична ДНК-фрагментация, определена чрез ELISA-тест след 24 часа третиране в еквивалентни концентрации на свободен (Curc) и на включен в мицелни дисперсии на диблокови функционални съполимери (B1/Curc и B2/Curc) куркумин. Време за третиране 24 h при 37°C. Средните отклонения ( $\pm$ SD) са изчислени от 4 независими експеримента. Статистически значимите разлики са представени, както следва: \* - значителна разлика спрямо контролата при  $p \leq 0.05$ ; \*\* - значителна разлика спрямо контролата при  $p \leq 0.01$ ; # - значителна разлика спрямо свободния куркумин при  $p \leq 0.05$ .

### 3.1.4. Способност на свободен или включен в диблокови съполимерни мицели куркумин да инхибира NF- $\kappa$ B(p-65) транскрипционен фактор в човешки туморни клетъчни линии

Ядреният транскрипционен фактор NF- $\kappa$ B е протеинов комплекс, който контролира транскрипцията на ДНК, производството на цитокини и оцеляването на клетките. Този транскрипционен фактор се смята за основната фармакологична мишена на куркумина при антитуморното му действие. Той е свръхрегулиран в различни тумори и спомага за експресията на серия от гени, отговорни за малигнената трансформация, както и медира хиперпролиферацията и инхибирането на апоптозата.

Сравнителното изследване на ефектите на свободен и включен в полимерни мицели куркумин върху клетъчните нива на p65 – активната форма на ядрения транскрипционен фактор NF- $\kappa$ B се извършва с помощта на ELISA – комплект (Фигура 25).



**Фигура 25.** Инхибиране на NF- $\kappa$ B (p65), определено чрез ELISA-тест след 24 h третиране в еквивалентни концентрации на свободен (Curc) и на включен в мицелни дисперсии на диблокови функционални съполимери (B1/Curc и B2/Curc). Средните отклонения ( $\pm$ SD) са изчислени от 4 независими експеримента. Статистически значимите разлики са представени, както следва: \* - значителна разлика спрямо контролата при  $p \leq 0.05$ ; \*\* - значителна разлика спрямо контролата при  $p \leq 0.01$ ; # - значителна разлика спрямо свободния куркумин при  $p \leq 0.05$ .

Използваната при анализите система следи нивата на активната форма на NF- $\kappa$ B (p65), която е способна на ядрена транслокация и притежава транскрипционно-активиращи свойства. В съответствие с резултатите от изследванията за цитотоксичност и индуциране на апоптоза, включеният в полимерни мицели куркумин проявява по-ясно изразено инхибиране на активността на NF- $\kappa$ B, в сравнение със свободното лекарствено вещество като най-значителен инхибиторен ефект се наблюдава при HL-60 клетъчна линия от B2/Curs.

Изследванията на апоптотичния ефект и модулирането на активността на NF- $\kappa$ B показват, че повишената активност и преодоляването на резистентните механизми в HL-60/DOX и HL-60/CDDP клетъчните линии на натоварените с куркумин полимерни мицели са най-малкото частично медиирани от повишената куркумин-индуцирана модулация на апоптотичното и p65-зависимото клетъчно сигнализиране.

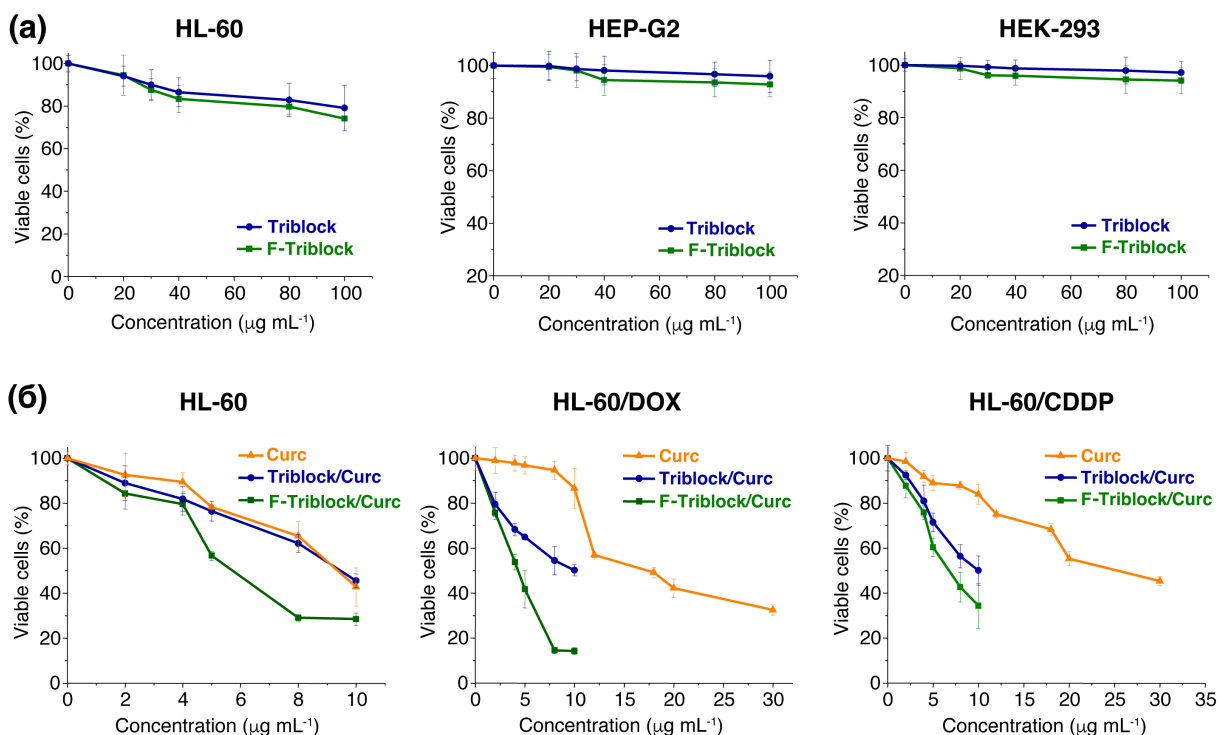
### **3.2. *Ин vitro* изследвания на мицели, получени от амфифилни триблокови съполимери (F-Triblock и Triblock)**

За да се проследи влиянието на въведения трети полимерен блок в съполимерите, формиращи наноносителите на ЛВ се провеждат аналогични *in vitro* изследвания на ненатоварени и натоварени мицели от функционалният триблоков съполимер (F-Triblock). За да бъде отличен ефектът от въведените в мицелната система допълнителни функционалности (клетъчно насочващ лиганд и отделяща се чрез разкъсване на рН-чувствителни връзки полиетерна обвивка) се провеждат сравнителни *in vitro* изследвания с мицели от нефункционализирания амфифилен триблоков съполимер (Triblock).

#### **3.2.1. *Оценка на цитотоксичността на ненатоварени триблокови съполимерни мицели***

Проследява се влиянието на мицелните колоидни дисперсии, получени при самоасоциирането на мултифункционалния LBA-PEO-PLA-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (F-Triblock) и сравнителния MPEO-PLA-PDMAEMA (Triblock) триблокови съполимери върху клетъчната пролиферация на същия панел от клетъчни линии (HL-60, HEP-G2 и HEK-293), които са използвани за оценка на цитотоксичността на мицелите, получени от диблоковите съполимери (Фигура 26а). Наблюдава се съвсем слаба дозозависима цитотоксичност на мицелите, като в изследвания концентрационен интервал от 20-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  потискането на клетъчната пролиферация е около 25% при HL-60 и под 10% при HEP-G2 и HEK-293 линии в сравнение с нетретираната контрола. В сравнение с мицелите от диблоковите функционални съполимери A-PLA-PDMAEMA-TPP<sup>+</sup> (B1 и B2), мицелите от двата триблокови съполимера показват по-ниска цитотоксичност в изследвания интервал. Това, най-вероятно се дължи на присъствието на полиетерния блок на повърхността на им, който “скрива” поликатионния PDMAEMA-блок. При сравняване на двата триблокови съполимера полифункционалният (F-Triblock) проявява в минимална степен по-висока цитотоксичност и при трите изследвани клетъчни линии. Въпреки това, от представените резултати може да се заключи, че мицелите, получени от триблоковите съполимери са практически лишени от цитотоксичност върху трите изследвани клетъчни линии.





**Фигура 26.** Цитотоксичност на: (а) ненатоварени мицелни дисперсии от полифункционален триблоков съполимер (F-Triblock) и нефункционализирания му триблоков аналог (Triblock) след 72 часа третиране при 37°C. Всяка точка представлява средноаритметична стойност  $\pm$  SD от 6 независими експеримента; (б) свободен куркумин (Curc) и натоварени триблокови съполимерни полимерни мицели (F-Triblock /Curc и Triblock/Curc) след 72 часа третиране при 37°C. Всяка точка представлява средноаритметична стойност  $\pm$  SD от 8 независими експеримента.

### 3.2.2. Сравнително *in vitro* изследване на антипролиферативния ефект на свободен и натоварен в триблокови съполимерни мицели куркумин върху човешки туморни клетъчни линии

Антипролиферативният ефект на свободен куркумин (Curc), въведен под формата на етанолен разтвор и на натоварен в ядрата на мицелите на триблоковите съполимери F-Triblock/Curc и Triblock/Curc куркумин бе проследен върху химиочувствителната клетъчна линия HL-60 и резистентните ѝ варианти HL-60/DOX и HL-60/CDDP (Фигура 26б). Включването на куркумин в мицелите на триблоковите съполимери в повечето случаи е съпроводено с нарастване на цитотоксичния му ефект, като кривите „концентрация-ефект“ са изместени към по-ниските стойности. Изключение прави само профилът на сравнителния триблоков съполимер (Triblock/Curc) при изследванията върху HL-60 клетки, който е почти идентичен с този на свободния куркумин. IC<sub>50</sub>-стойностите на натоварения в мицелите куркумин при другите клетъчни линии са по-ниски в сравнение с тези на свободното лекарствено вещество (Таблица 5). Оценката на изчислените от получените данни индекси на модулация показва, че антипролиферативната активност на куркумина в мицелите от триблоковите съполимери спрямо различните клетъчни линии е по-висока в сравнение с тази на свободния куркумин, с изключение на мицелите от сравнителния триблоков съполимер в клетъчната линия HL-60 (Таблица 5). Трябва да се отбележи, че в резистентните клетъчни линии HL-60/DOX и HL-60/CDDP антипролиферативната активност на куркумина, включен в мицели от мултифункционалния триблоков съполимер (F-Triblock/Curc) е над четири пъти по-висока от тази на свободния куркумин. По този начин, докато свободният куркумин е по-малко ефективен при HL-60/DOX и HL-

60/CDDP, спрямо чувствителната HL-60, с индекси на резистентност от 1.88 и 2.70, то мицелните дисперсии на триблоковите съполимери (F-Triblock/Curc и Triblock/Curc), в които е включен показват по-ниски индекси на резистентност в интервала 0.75-1.08 (Таблица 5). Сравнявайки активността на натоварените с куркумин мицели от триблоковите съполимери ясно се очертава предимството на частиците от мултифункционалния триблоков съполимер пред нефункционализирания му аналог с 1.4, 2.4 и 1.8 пъти по-високи индекси на модулация съответно при HL-60, HL-60/DOX, HL-60/CDDP клетъчни линии. Същото се отнася и за индексите на резистентност, които са под единица (0.75 и 0.85) за натоварените мицели от F-Triblock, докато за тези от нефункционализирания му аналог (Triblock) стойностите на RI са около единица. Проследен е и антипролиферативния ефект на Curc, F-Triblock/Curc и Triblock/Curc в H1299 клетъчна линия, използвана по-нататък за проследяване на клетъчната интернализация и вътреклетъчната локализация на мицелите. Установено е, че IC<sub>50</sub>-стойността на свободния куркумин е повече от два пъти по-висока от тази на включения в мицели от F-Triblock куркумин (Таблица 5). Системата Triblock/Curc също проявява, макар и не в такава степен, повишена цитотоксичност спрямо свободното ЛВ.

**Таблица 5.** Еквивалентни концентрации (IC<sub>50</sub>), индекси на модулация (MI) и индекси на резистентност (RI) на натоварени с куркумин триблокови съполимерни мицели (F-Triblock/Curc and Triblock/Curc) и на свободното лекарство вещество (Curc).

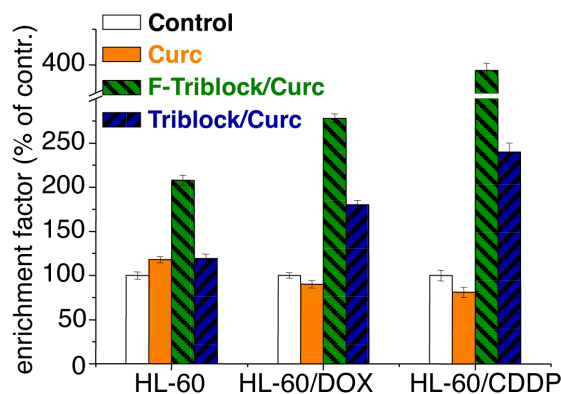
Клетъчна линия	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )			MI <sup>a</sup>		RI <sup>b</sup>		
	Curc	F-Triblock/ Curc	Triblock/ Curc	F-Triblock/ Curc	Triblock/ Curc	Curc	F-Triblock/ Curc	Triblock/ Curc
HL-60	9.33	6.69*/#	9.42	1.39	0.99	-	-	-
HL-60/ DOX	17.58	4.28*/#	10.10*	4.10	1.74	1.88	0.75	1.07
HL-60/ CDDP	25.23	5.70*/#	10.20*	4.42	2.47	2.70	0.85	1.08
H1299	21.71	9.14*/#	16.33*	2.38	1.33	-	-	-

<sup>a</sup> MI = IC<sub>50</sub> (свободен куркумин) / IC<sub>50</sub> (включен в мицели куркумин); <sup>b</sup> RI = IC<sub>50</sub> (резистентен HL-60 вариант) / IC<sub>50</sub> (химичночувствителна HL-60)

\* Статистически значима разлика спрямо свободния куркумин. # Статистически значима разлика спрямо Triblock/Curc (p≤0.05).

### 3.2.3. Способност на свободен или включен в триблокови съполимерни мицели куркумин да предизвиква апоптоза в човешки туморни клетъчни линии

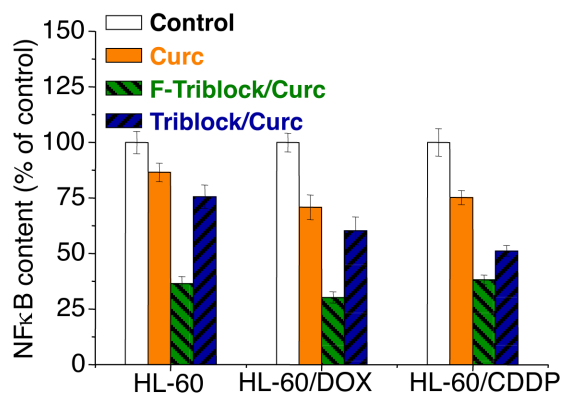
Проапоптотичната активност на триблоковите съполимерни мицелни дисперсии с включен куркумин (F-Triblock/Curc и Triblock/Curc) е по-добре изразена в сравнение с тази на свободното лекарство вещество (Curc) в изследваните химичночувствителна HL-60 клетъчна линия и резистентните ѝ варианти (HL-60/DOX и HL-60/CDDP) (Фигура 27). При сравнителното изследване на натоварените с куркумин мицелни дисперсии от триблокови съполимери (F-Triblock/Curc и Triblock/Curc) бе установена значително по-голяма проапоптотична активност при мултифункционалния F-Triblock/Curc в сравнение с нефункционализирания му аналог. Сравнявайки данните от изследванията за натоварените с куркумин мицели от функционалните диблокови съполимери (Фигура 24) с тези от мултифункционалния триблоков съполимер се вижда, че добавянето на функционализиран и отделящ се в слабо кисела среда полиоксиетиленов блок към полимерната архитектура не само, че не води до намаляване на проапоптотичната активност на частиците, а напротив – увеличава я значително. Изследванията потвърждават ясно изразените ефекти на мицелните дисперсии с включен куркумин и най-вече на мицелите от мултифункционалния триблоков съполимер (F-Triblock/Curc), особено като се вземе предвид, че третирането на клетките е с по-ниски концентрации (IC<sub>50</sub>) отколкото тези на свободния куркумин.



**Фигура 27.** Апоптотична ДНК-фрагментация, определена чрез ELISA-тест след 24 часа третиране в еквиефективни концентрации на свободен (Curc) и на включен в мицелни дисперсии на триблокови съполимери (F-Triblock/Curc и Triblock/Curc) куркумин. Време за третиране 24 h при 37°C. Средните отклонения ( $\pm$ SD) са изчислени от 4 независими експеримента.

### 3.2.4. Способност на свободен или включен в триблокови съполимерни мицели куркумин да инхибира NF- $\kappa$ B(p-65) транскрипционен фактор в човешки туморни клетъчни линии

Установяването на ефектите на свободен и включен в мицели от триблокови съполимери куркумин върху клетъчните нива на активната форма на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B (p65) се извършва върху HL-60 клетъчна линия и резистентните ѝ варианти (HL-60/DOX и HL-60/CDDP) при същите условия както за мицелите от диблокови съполимери (Фигура 28).



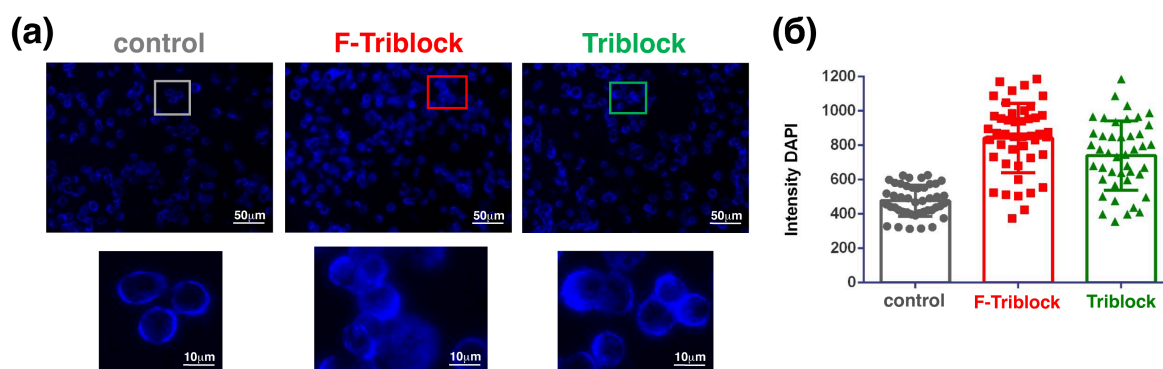
**Фигура 28.** Инхибиране на NF- $\kappa$ B (p65), определено чрез ELISA-тест след 24 h третиране в еквиефективни концентрации на свободен (Curc) и на включен в мицелни дисперсии на триблокови съполимери (F-Triblock/Curc и Triblock/Curc). Средните отклонения ( $\pm$ SD) са изчислени от 4 независими експеримента.

Тук отново в съответствие с резултатите от изследванията за цитотоксичност и индуциране на апоптоза, включеният в полимерни мицели куркумин проявява по-ясно изразено инхибиране на активността на NF- $\kappa$ B, в сравнение със свободното лекарствено вещество, особено в резистентните клетъчни линии. Резултатите от изследванията също така показват значителното преимущество на мицелите от мултифункционалния триблоков съполимер пред нефункционализирания му аналог. Същевременно след свързването на функционален и отделящ се в слабо кисела среда PEO-блок към

дблоковия амфифилен съполимер не се наблюдава влошаване на ефекта на инхибиране на NF-κB за натоварените с куркумин функционални трислойни полимерни мицели (вижте и Фигура 25).

### 3.2.5. Изследване на клетъчната интернализация и на субклетъчната насочваща ефективност на натоварени и натоварени с куркумин мултифункционални и нефункционализирани трислойни полимерни наноносители

Основната задача на разработените мултифункционални полимерни мицелни системи е от една страна да разрешат проблемите, свързани с неблагоприятните физикохимични и фармакокинетични свойства на лекарственото вещество (куркумин), осигурявайки безопасна циркулация в кръвния поток чрез отделяща се PEO-обвивка, и от друга да осигурят подобрена клетъчна интернализация, последвана от насоченото му доставяне в клетъчни органели (митохондриите). За да се докаже способността на разработените мицелни системи (F-Triblock/Curc) за насочено доставяне на ЛВ в митохондриите, те се натоварват с флуоресцентното багрило 4',6-диамидино-2-фенилиндолил дихидрохлорид (DAPI). Последното е мембранно полупропускливо багрило, тъй като проникването му през мембраните на живи клетки зависи от концентрацията му. При ниски концентрации DAPI не преминава през клетъчните мембрани, тъй като не е достатъчно липофилен за да премине самостоятелно през плазмената мембрана. За да се намерят оптималните условия за провеждане на експериментите са тествани различни концентрации на DAPI ( $0.1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) и различни времена на инкубиране (5-30 min) преди микроскопското наблюдение. В резултат на проведените предварителни изследвания като най-добри условия на оцветяване са подбрани концентрация на DAPI от  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  и инкубиране в продължение на 5 min. При тази концентрация свободното багрило се интернализира в много ниска степен (Фигура 29a, control).

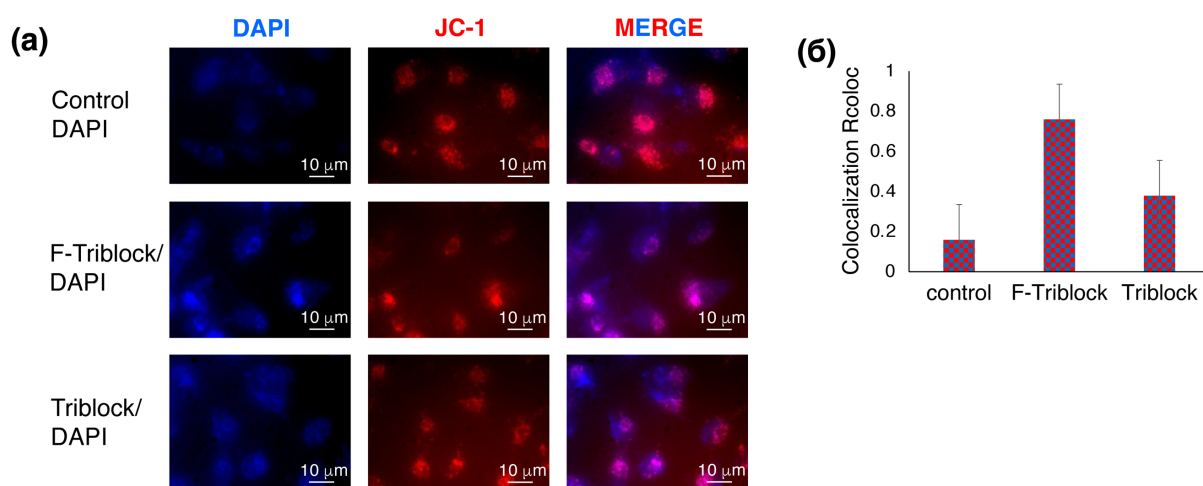


**Фигура 29.** Интензитет на флуоресцентната емисия от H1229-клетки, инкубирани с DAPI - свободен (control) или натоварен в мултифункционални (F-Triblock) и нефункционализирани (Triblock) съполимерни наноносители: а) микроскопски снимки; б) количествено определяне на интензитета на флуоресценция.

Натовареното в съполимерните мицели багрило показва много по-добра клетъчна интернализация (Фигура 29a, F-Triblock и Triblock). Количественото определяне на интензитета на флуоресценцията от най-малко 350 маркирани клетки за всяко експериментално състояние е представено на Фигура 29б. Резултатите показват, че мултифункционалните (F-Triblock) и нефункционализираните (Triblock) мицелни

системи водят съответно до 92% и 64% увеличение на интензитета на DAPI, което доказва подобрена интернализация (особено за мицелите от F-Triblock).

За по-нататъшно изследване на вътреклетъчната локализация на мицелите и способността им за натрупване в прицелните органели (митохондриите), H1229-клетките се оцветяват допълнително с катионното клетъчно-проникващо багрило *JC-1*, което може да се използва като индикатор на митохондриалния мембранен потенциал. Натрупването му в митохондриите се установява чрез отместване на флуоресцентната емисия от зелена (~529 nm) към червена (~590 nm). Точното вътреклетъчно доставяне на мицелните системи се доказва чрез съпоставяне на изображения на клетки, третирани със свободен или натоварен в мицелите DAPI и наслаждане на изображенията с тези, получени след маркиране с *JC-1* (Фигура 30а).

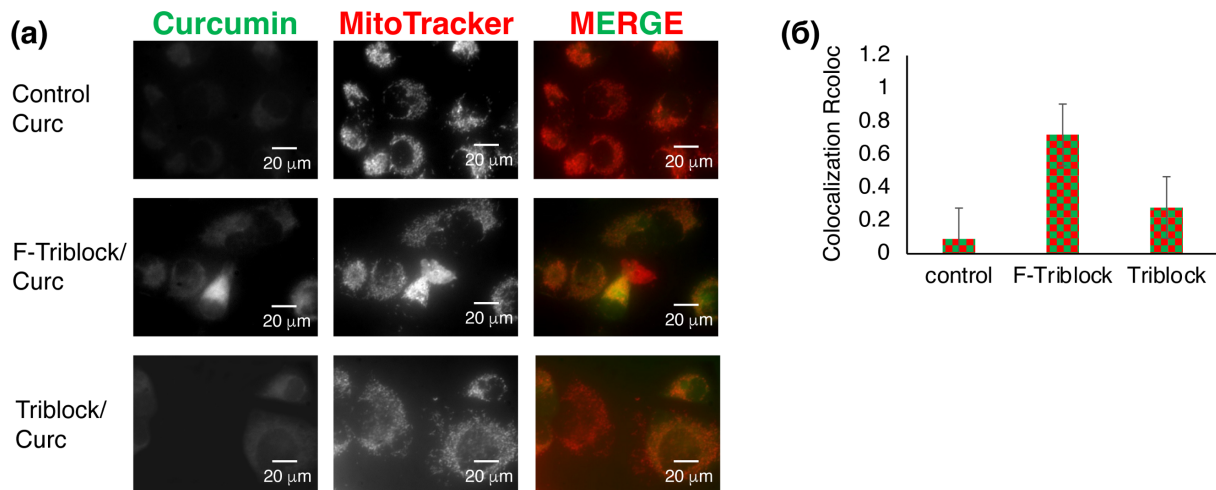


**Фигура 30.** Вътреклетъчна колокализация на маркирани с багрилото *JC-1* митохондрии и DAPI – свободен (Control DAPI) или натоварен в съполимерни мицели (F-Triblock/DAPI и Triblock/DAPI): а) микроскопски снимки – DAPI (ляв панел, в синьо), *JC-1* (среден панел, в червено) и насложени изображения (MERGE, десен панел); б) количествено колокализиране – графично представяне на изчисления коефициент на Пиърсън ( $R_{coloc}$ ) за колокализацията на DAPI и *JC-1*.

Резултатите показват, че изследваните съполимерни мицели не само увеличават клетъчната интернализация на DAPI, но също така предизвикват и натрупване вътре в митохондриите, както се вижда от количествената колокализация на двете багрила (Фигура 30б). По отношение, както на интернализацията, така и на митохондриалното насочване, мултифункционалните трислойни мицели от F-Triblock значително превъзхождат мицелите без насочващи лиганди, получени от нефункционализирания триблоков аналог (Triblock). Това доказва недвусмислено приложимостта на функционалните мицелни системи, като перспективни наноразмерни носители за активно насочено доставяне на лекарствени вещества до прицелни клетки и до клетъчни органели (митохондриите).

Същият експеримент се повтаря и с натоварени с куркумин вместо с DAPI мицели (F-Triblock/Curc и Triblock/Curc), тъй като куркуминът е известен със своята автофлуоресценция. Целта е да се получи още по-директно доказателство за клетъчната интернализация и за натрупването в митохондриите на натоварените с ЛВ полимерни наноносители. За да се избегне припокриване на флуоресценцията на куркумина с тази

на маркираните с *JC-1* митохондрии за този експеримент се използва багрилото *MitoTracker*<sup>®</sup>, съдържащо тиол-реактивна хлорометилна част за маркиране на митохондриите. Резултатите, получени за натоварените с куркумин наноносители са много сходни с тези, получени с DAPI, потвърждавайки предимствата на мултифункционалния наноносител (Фигура 31).



**Фигура 31.** Вътреклетъчна колокализация на маркирани с багрилото *MitoTracker*<sup>®</sup> митохондрии и куркумин – свободен (Control Curc) или натоварен в съполимерни мицели (F-Triblock/Curc и Triblock/Curc): а) микроскопски снимки – Curcumin (ляв панел), MitoTracker (среден панел) и насложени изображения (MERGE, десен панел); б) количествено колокализиране – графично представяне на изчисления коефициент на Пиърсън ( $R_{coloc}$ ) за колокализацията на куркумин и *MitoTracker*<sup>®</sup>.

Резултатите от проведените изследвания, представени в този раздел от дисертационната работа убедително показват перспективността на предложената концепция за дизайн и получаване на функционални полимерни наноносители за пренос и насочено доставяне на лекарствени вещества в прицелни клетки и клетъчни органели, основаваща се на прецизен синтез и модификация на нови амфифилни блокови съполимери. Получените резултати дават и стабилна основа за по-нататъшни *in vitro* и *in vivo* изследвания на новите мултифункционални носители на лекарствени вещества.

## ИЗВОДИ

1. Прилагайки контролирани полимеризационни процеси, последвани от реакции на модификация са синтезирани и охарактеризирани нови функционални амфифилни диблокови съполимери на основата на поли(D,L-лактид)-блок-(N,N-диметиламиноетил метакрилат), съдържащи крайна алкинова и странични субклетъчно насочващи (трифенилфосфониеви) лиганди (A-PLA-b-PDMAEMA-TRP<sup>+</sup>).

2. Синтезиран е мултифункционален амфифилен триблоков съполимер, състоящ се от модифициран с крайна клетъчно насочваща (лактобионова) група полиоксиетиленов блок, който е свързан чрез разградима в слабо кисела среда връзка за хидрофобния блок на A-PLA-b-PDMAEMA-TRP<sup>+</sup>.

- Получен е хетеробифункционален полиоксиетилен с крайни лактобионова и ароматна алдехидна групи (LBA-PEO-CHO).
- Крайната алкинова група на A-PLA-b-PDMAEMA-TRP<sup>+</sup> е превърната в първична аминогрупа чрез „клик“-реакция с азидопропиламин, получавайки H<sub>2</sub>N-PLA-b-PDMAEMA-TRP<sup>+</sup>.
- Мултифункционалната триблокова архитектура е получена чрез сдвояване на LBA-PEO-CHO и H<sub>2</sub>N-PLA-b-PDMAEMA-TRP<sup>+</sup>, формирйки лабилната ароматна иминна връзка между полиетерния и полилактидния блокове.

3. Синтезиран и охарактеризиран е нефункционализиран (без лиганди и разградима връзка между блоковете) амфифилен триблоков съполимер полиоксиетилен-блок-поли(D,L-лактид)-блок-(N,N-диметиламиноетил метакрилат) за сравнителни изследвания.

4. Изследвано е самоасоциирането на получените амфифилни съполимери във водна среда.

- Установено е, че както функционалните ди- и триблокови съполимери, така и сравнителния нефункционализиран триблоков съполимер формират колоидно стабилни наноразмерни агрегати във водна среда.
- Съполимерните мицели са физикохимично охарактеризирани.
- Киселинно-обусловеното отделяне на полиетерния слой от повърхността на мицелите, получени от мултифункционалния триблоков съполимер е доказано с помощта на геловопроникаща хроматография и динамично разсейване на светлината.

5. Съполимерните мицели успешно са натоварени с хидрофобното лекарствено вещество куркумин. Определени са ефективността и капацитета на натоварване за трите типа мицели. Проследени са и профилите на освобождаване на ЛВ от наноносителите във фосфатен буфер. Установено е, че по-голямата част от ЛВ се задържа в ядрата на мицелите, което е предимство при циркулацията им в кръвния поток.

6. Проведени са сравнителни *in vitro* изследвания на съполимерните наноносители върху човешки клетъчни линии.

- Установено е, че ненатоварените мицели проявяват незначителна или практически липса на цитотоксичност върху панел от немалигнени и малигнени клетъчни линии.

- Натоварените с куркумин съполимерни мицели проявяват способност да оптимизират токсичността на ЛВ върху туморни клетъчни линии и резистентните им варианти.
- Натоварените с ЛВ функционални полимерни наноносители демонстрират изявена способност да индуцират апоптоза и притежават по-изразено инхибиране на NF-κB транскрипционния фактор в туморни клетъчни линии и техните резистентни варианти в сравнение със свободния куркумин и натоварени с него нефункционализирани полимерни мицели.
- Резултатите от проведените изследвания върху ефективността на клетъчната интернализация и субклетъчното насочване показват преимущественото натрупване в митохондриите на функционалните полимерни наноносители в сравнение на нефункционализираните им аналози.



## ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- ⇒ Разработени са нови амфифилни блокови съполимерни архитектури с предварително зададен състав и функционалност.
- ⇒ За първи път са получени мултифункционални трислойни наноразмерни носители на хидрофобното лекарствено вещество куркумин, носещи клетъчно и субклетъчно насочващи лиганди, отделящ се в слабо кисела среда външен полиетерен слой, както и ендозомно дестабилизиращ междинен слой.
- ⇒ Демонстриран е потенциалът на новите мултифункционални системи да преодоляват биологични бариери при преноса, да се насочват към прицелни клетки, успешно да се интернализират и да доставят активното вещество в специфични клетъчни органели.

## СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И ЗАБЕЛЯЗАНИТЕ ЦИТАТИ

- ◆ Dimitrina Babikova, Radostina Kalinova, Ivelina Zhelezova, Denitsa Momekova, Spiro Konstantinov, Georgi Momekov, Ivaylo Dimitrov, “Functional block copolymer nanocarriers for anticancer drug delivery”. *RSC Adv* **2016**, 6(88), 84634-84644. (IF<sub>2016</sub> 3.108, Q1 – SCOPUS) – 5 цитирания

*Забелязани цитати:*

1. Dutta B, Barick K, Verma G, Aswal V, Freilich I, Danino D, Singh B, Priyadarsini K, Hassan P, PEG coated vesicles from mixtures of Pluronic P123 and L- $\alpha$ -phosphatidylcholine: Structure, rheology and curcumin encapsulation. *Physical Chemistry Chemical Physics* 19 (39), 26821-26832, 2017
2. Yang X, Xiong J, Qiu P, Chen M, He D, He X, Wang K, Tang J, Synthesis of a core/satellite-like multifunctional nanocarrier for pH-and NIR-triggered intracellular chemothermal therapy and tumor imaging. *RSC Advances* 7 (13), 7742-7752, 2017
3. Butterworth E, PhD Thesis: “Nanofabrication and engineering of gene delivery vectors”. Queen Mary University of London, UK, 2019
4. Lombardo D, Caccamo MT, Calandra, P, Self-assembly of amphiphilic molecules. In: Sattler, KD, ed., 21st Century nanoscience - A handbook: Design strategies for synthesis and fabrication. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, vol. 2, ch. 11, pp 11-1 – 11-14, 2019
5. Kaur J, Gulati M, Zacconi F, Dureja H, Loebenberg R, Ansari Md S, AlOmeir O, Alam A, Chellappan D. K, Gupta G, Jha N. K, Pinto T.de J.A, Morris A, Choonara Y. E, Adams J, Dua K, Singh S. K, Biomedical Applications of polymeric micelles in the treatment of diabetes mellitus: Current success and future approaches, *Expert Opinion on Drug Delivery* 19 (7), 771-793, 2022

- ◆ Dimitrina Babikova, Radostina Kalinova, Denitsa Momekova, Iva Ugrinova, Georgi Momekov, Ivaylo Dimitrov, “Multifunctional polymer nanocarrier for efficient targeted cellular and subcellular anticancer drug delivery”. *ACS Biomater Sci Eng* **2019**, 5(5), 2271-2283. (IF<sub>2019</sub> 4.152, Q1 – SCOPUS) – 14 цитирания

*Забелязани цитати:*

6. Liu Z, Wu Q, He J, Vriesekoop F, Liang H, Crystal seeded growth of pH-responsive metalorganic framework for enhancing encapsulation, stability and bioactivity of hydrophobicity compounds. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5 (12), 6581-6589, 2019
7. Tao Y, Cai K, Liu S, Zhang Y, Chi Z, Xu J, Pseudo target release behavior of simvastatin through pH-responsive polymer based on dynamic imine bonds: Promotes rapid proliferation of osteoblasts. *Materials Science & Engineering C* 113, 110979, 2020
8. Jazani A, Oh J, Development and disassembly of single and multiple acid-cleavable block copolymer nanoassemblies for drug delivery. *Polymer Chemistry* 11 (17), 2934-2954, 2020
9. Kumar A, Ahmad A, Vyawahare A, Khan R, Membrane trafficking and subcellular drug targeting pathways. *Frontiers in Pharmacology* 11, 629, 2020

10. Jiang Y-Y, Yuan F-L, Li J-W, Wu H-E, Wei M-Y, Shao C-L, Liu M, Wang G-H, Targeting delivery nanocarriers for (+)-terrein to enhance its anticancer effects. ACS Omega. 5 (44), 28889-28896, 2020
11. Pontes-Quero G, Benito-Garzón L, Cano J, Aguilar M, Vázquez-Lasa B, Amphiphilic polymeric nanoparticles encapsulating curcumin: Antioxidant, anti-inflammatory and biocompatibility studies. Materials Science & Engineering C 121, 111793, 2021
12. Zohreh N, Rastegaran Z, Hosseini S, Akhlaghi M, Istrate C, Busuioc C, pH-triggered intracellular release of doxorubicin by a poly(glycidyl methacrylate)-based double-shell magnetic nanocarrier. Materials Science & Engineering C 118, 111498, 2021
13. Hu X, Jazani A, Oh J, Recent advances in development of imine-based acid-degradable polymeric nanoassemblies for intracellular drug delivery. Polymer 230 124024, 2021
14. Corsaro C, Neri G, Mezzasalma A, Fazio E, Weibull modeling of controlled drug release from Ag-PMA nanosystems. Polymers 13 (17), 2897, 2021
15. Ren D, Xiao T, Lou J, Ren R, Ye Y, Zhu L-M, Construction of nano-carriers coated with platelet membrane and its application in targeted therapy of inflammation. Nano 16 (11), 2150128, 2021
16. Kuday H, Süer N, Bayır A, Aksu B, Hatipoğlu A, Güncü M, Degitz V, Gallei M, Eren T, Design of aromatic ring-based polyphosphonium salts synthesized via ROMP and the investigation into their antibacterial and hemolytic activities. ACS Applied Polymer Materials 3 (12), 6524–6538, 2021
17. Li N, Chen L, Luo Z, Nie G, Zhang P, He S, Peng J, Dual-targeting of doxorubicin and chlorine e6 co-delivery based on small-size nanocomposite for the synergetic imaging and therapy. Journal of Cluster Science 33 (4), 1793-1807, 2022
18. Guo W, Liu W, Wan P, Wang H, Xiao C, Chen L, Chen X, Cationic amphiphilic dendrons with anticancer activity. ACS Biomaterials Science & Engineering 8 (5), 2121-2130, 2022
19. Pedroza G, Macêdo L, de Oliveira R, Silveira N, Orenha R, Parreira R, dos Santos R, Molard Y, Amela-Cortes A, Molina E, Cost-efficient polyurea carrier for precise control of an anti-inflammatory drug loading and release. Journal of Drug Delivery Science and Technology 76, 103744, 2022

#### СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Димитрина Бабикова, “Синтез и охарактеризиране на функционални блокови съполимери с потенциално приложение за насочено доставяне на лекарствени вещества”, Интердисциплинарен докторантски форум, организиран от Център за обучение-БАН, София, 6-7 април 2016 г. – *доклад*.
2. Dimitrina Babikova, Radostina Kalinova, Ivaylo Dimitrov, “Synthesis and micellization of multifunctional triblock copolymer for targeted drug delivery”, VII<sup>-ма</sup> Международна научна конференция на младите учени - Пловдив, България, 15-16 юни 2017 г. – *доклад*.
3. Dimitrina Babikova, Ivaylo Dimitrov, “Clickable” polymers for potential biomedical applications”, Пета постерна сесия “Младите учени в света на полимерите”, София, 05 юни 2014 г. – *постер*.

4. Dimitrina Babikova, Ivaylo Dimitrov, “Synthesis and characterization of multifunctional block copolymer for targeted drug delivery”. Шеста постерна сесия “Младите учени в света на полимерите”, София, 04 юни 2015 г. – *постер*.
5. Dimitrina Babikova, Ivaylo Dimitrov, “Amphiphilic block copolymer bearing various functions intended for targeted drug delivery”, 3<sup>rd</sup> P2M Meeting on Precision Polymer Materials, Lacanau Ocean, France, 26-29.05.2015. – *постер*.
6. Dimitrina Babikova, Ivaylo Dimitrov, “Synthesis and characterization of multifunctional block copolymer for targeted drug delivery”, International conference „Challenges in science and technology of polymer materials“, Bansko, Bulgaria, 19-23.05 2015. – *постер*.
7. Dimitrina Babikova, Radostina Kalinova, Ivelina Zhelezova, Denitsa Momekova, Spiro Konstantinov, Georgi Momekov, Ivaylo Dimitrov, “Functional diblock copolymers for targeted drug delivery”, Седма постерна сесия “Младите учени в света на полимерите”, София, 09 юни 2016 г. – *постер*.
8. Dimitrina Babikova, Radostina Kalinova, Ivaylo Dimitrov, “Synthesis and micellization of multifunctional triblock copolymer for targeted drug delivery”, Осма постерна сесия “Младите учени в света на полимерите”, София, 01 юни 2017 г. – *постер*.

#### СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ

1. BG051PO001-3.3.06-0017 "Изграждане на научния потенциал за устойчиво кариерно развитие на младите учени, докторанти и постдокторанти в приоритетни области на полимерната наука", 2013 – 2016 г.
2. ДФНИ Т02/21 „Функционални полимерни наноносители на лекарствени вещества със специфично насочване към клетки и клетъчни органели“, 2014 – 2017 г.
3. ДФНИ Т02/07 „Нови полимери, полимерни наночастици и нанокапсули за пренос на биологични молекули“, 2014 – 2017 г.
4. ДН 19/8 „Дизайн на нови супрамолекулни наночастици: сферични нуклеинови киселини с полимерни и липозомни ядра“, 2017 – 2020 г.
5. КП-06-Н 23/7 „Асоциация на бестрофин-1 с мембранни домени в моделни монослоеве и епителни клетки - предпоставка за иновативни терапии за дегенерации на ретината“, 2018 г. – текущ.

#### НАГРАДИ

1. Награда за най-добър постер в Шеста постерна сесия “Младите учени в света на полимерите”, Институт по полимери – БАН, 2015 г.
2. Награда за отлично представена устна презентация на Интердисциплинарния докторантски форум организиран от Центъра за обучение – БАН, Кариерния център към ЦО-БАН, Единния център за иновации – БАН и Фондация „Еврика“, с подкрепата на Фондация „Заедно в час“, 2016 г.