

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ПОЛИМЕРИ

Ерик Василев Димитров

Макромолекулен дизайн и синтетични стратегии за
получаване на полимери с приложения за пренос и
доставяне на биологично активни вещества и
олигонуклеотиди

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд, представен за присъждане на
образователната и научна степен „ДОКТОР“

Професионално направление 4.2 Химически науки
Научна специалност: Полимери и полимерни материали

Научни ръководители: проф. дхн Станислав Рангелов
доц. д-р Наталия Тончева-Мончева

София, 2026

Дисертационният труд е обсъден и допуснат до защита на заседание на Колоквиума на Института по полимери - БАН. Дисертационният труд е изложен на 174 страници, включва 130 фигури 52 схеми и 13 таблици. Използвани са 154 литературни източника. Резултатите са публикувани в 5 научни статии и са докладвани на 15 научни форума.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2026 г. от часа в заседателната зала на Института по полимери – БАН, на открито заседание на Научното жури.

Материалите по защитата са на разположение на интересующите се в канцеларията на Института по полимери – БАН с адрес гр. София, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 103, вх. В.

Автор: Ерик Василев Димитров

Заглавие: Макромолекулен дизайн и синтетични стратегии за получаване на полимери с приложения за пренос и доставяне на биологично активни вещества и олигонуклеотиди

Изследванията, обект на дисертационния труд, са проведени в лаборатория “Полимеризационни процеси”, Научно направление „Макромолекулно инженерство“, Институт по полимери – БАН.

Част от изследванията са проведени във връзка с изпълнението на договори, финансирани от Фонд “Научни изследвания” и договор ДО1-217/30.11.18 г., по Национална научна програма БиоАктивМед, Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина.

Част от резултатите са получени при използване на оборудване по договор Д01-322/2023 по проекта ИНФРАМАГ (част от Националната пътна карта за научна инфраструктура), подкрепен финансово от Министерството на образованието и науката на Република България.

Бих искал да изкажа своите искрени благодарности на моите научни ръководители – проф. д-н Станислав Рангелов и доц. д-р Наталия Тончева-Мончева за тяхното доверие, подкрепа и насоки, както по време на изготвянето на дисертацията ми, така през цялото останало време в института и извън него.

Благодаря на чл. кор. проф. Петър Петров за ценните научни, стратегически и кариерни съвети, които значително разшириха перспективата ми и ми помогнаха да вземам по-информирани решения относно развитието си.

Изразявам своята дълбока признателност към акад. Цветанов за неговата огромна подкрепа, ценни съвети, насоки и приятелско отношение.

Благодарности отправям и към гл. ас. Георги Гергов и д-р Павел Бакърджиев, които ме насочиха към института и ме запознаха с проф. Рангелов, като по този начин изиграха ключова роля в началото на моя професионален път.

Благодаря на Явор Христов, Крум Александров, Сибела Долева и Анна Пранчева за съвместната работа, положителната енергия и приятелство в и извън рамките на института.

Изразявам искрената си признателност и към целия колектив на ИП-БАН за приятелското отношение, подкрепата и средата, която превърна института в мой втори дом.

Благодаря на моето семейство за безусловната подкрепа, търпението и силата, която ми даваха във всеки труден момент. Тяхното присъствие беше неизменна опора по пътя ми.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

¹H ЯМР	протонен ядреномагнитен резонанс
AFM	атомно-силова микроскопия, Atomic Force Microscopy
AGE	алилглицидилов етер, Allyl Glycidyl Ether
AMS	4-(азидометил)стирен, 4-(azidomethyl)styrene
ATRP	радикалова полимеризация с пренос на атом, Atom Transfer Radical Polymerization
CAPA	търговско наименование на поли(ϵ -капролактон)
CBD	канабидиол
Chol	холестерол
CMS	4-(хлорометил)стирен, 4-(chloromethyl)styrene
COSY	хомоядрен корелационен ЯМР експеримент, Correlation Spectroscopy
Cryo-TEM	криогенна трансмисионна електронна микроскопия
D	дифузионен коефициент
\mathcal{D}	индекс на дисперсност
DBCO	добензоциклооктин, dibenzocyclooctyne
DDP	1,3-дидодецилоксипропан-2-ол, 1,3-didodecyloxypropan-2-ol
D_h	хидродинамичен диаметър
DHP	1,3-дихексадецилоксипропан-2-ол, 1,3-dihexadecyloxypropan-2-ol
DLs	динамично разсейване на светлина, Dynamic Light Scattering
DMAP	4-(диметиламино)пиридин, 4-(dimethylamino)pyridine
DMF	<i>N,N</i> -диметилформамид, <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	диметилсулфоксид, dimethylsulfoxide
DNA	дезоксирибонуклеинова киселина, Deoxyribonucleic acid
DOSY	дифузионно-ориентирана ЯМР спектроскопия, Diffusion-Ordered Spectroscopy
DPH	1,3-дифенилхекса-1,3,5-триен, 1,3-diphenylhexa-1,3,5-triene
DPPC	дипалмитоилфосфатидилхолин, dipalmitoylphosphatidylcholine
EDC	1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EEGE	етоксипетилглицидилов етер, Ethoxyethyl Glycidyl Ether
EO	етиленов оксид, Ethylene oxide
ETEGA	етокситриетиленгликолакрилат, Ethoxytriethyleneglycol acrylate
HMBC	хетероядрен корелационен ЯМР експеримент, Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	хетероядрен корелационен ЯМР експеримент, Heteronuclear Single Quantum Coherence
$h\nu$	фотонна енергия (светлина)
iPOx	2-изопропил-2-оксазолин, 2-isopropyl-2-oxazoline
kDa	килодалтон
LCST	долна критична температура на разтваряне, Lower Critical Solution Temperature
M_n	средна бройна молна маса
M_w	средна тегловна молна маса
MWCO	молекулно-масов праг на отсичане, Molecular Weight Cut-Off
N_{agg}	агрегационно число
PAA	поли(акрилова киселина), poly(acrylic acid)
PAMS	поли((4-азидометил)стирен), poly((4-azidomethyl)styrene)

PCL	поли(ϵ -капролактон), poly(ϵ -caprolactone)
PCMS	поли((4-хлорометил)стирен), poly((4-chloromethyl)styrene)
PEEGE	поли(етоксипентилглицидилов етер), poly(ethoxyethyl glycidyl ether)
PEG	полиетиленгликол, poly(ethylene glycol)
PEO	поли(етиленов оксид), poly(ethylene oxide)
PETEGA	поли(етокситриетиленгликолакрилат), poly(ethoxytriethyleneglycol acrylate)
PG	полиглицидол, polyglycidol
PiPOx	поли(2-изопропил-2-оксазолин), poly(2-isopropyl-2-oxazoline)
PMDETA	<i>N,N,N',N'',N'''</i> -пентаметилдиетиленетриамин, <i>N,N,N',N'',N'''</i> -pentamethyldiethylenetriamine
PPO	поли(пропиленов оксид), poly(propylene oxide)
PS	полистирен, polystyrene
PTBA	поли(трет-бутилакрилат), poly(tert-butyl acrylate)
R_g	инерционен радиус
R_h	хидродинамичен радиус
ssODN	едноверижен олигодезоксинуклеотид, Single-stranded Oligodeoxynucleotide
TEA	триетиламин, triethylamine
ТЕМ	трансмисионна електронна микроскопия
TFA	трифлуорооцетна киселина, Trifluoroacetic acid
THF	тетраhydroфуран, Tetrahydrofuran
UV-Vis	ултравиолетово-видима спектроскопия
ζ-потенциал	зета потенциал
ГПХ	геловопроникваща хроматография, Gel Permeation Chromatography
ЕДТА	етилендиаминтетраоцетна киселина
ИЧ	инфрачервена спектроскопия, Infrared Spectroscopy
CAC	критична концентрация на самоасоциране, Critical Assosiation Concentration
CMC	критична концентрация на мицелообразуване, Critical Micelle Concentration
СНК	сферична нуклеинова киселина, Spherical Nucleic Acid, SNA

УВОД

Полимерните наноносители са една от най-актуалните и най-бързо развиващите се области в химията и биомедицината през последните две десетилетия. Основна причина за това са широките им възможности за модификация на фармакокинетичния и фармакодинамичния профил на много лекарствени вещества, както и създаването на нови такива, особено за целите на генната терапия. При получаването на нови носители често са необходими полимери с точно дефинирана молна маса, топология и състав. Това налага разработване на синтетични стратегии, състоящи се от различни полимеризационни техники, реакции на функционализиране и конюгиране на отделни полимерни вериги, така че да може да се получи желаният продукт.

За получаването на такива наноносители най-често се използват амфифилни блокови съполимери със специфична архитектура. Различните видове полимеризации, както и постполимеризационните модификации позволяват получаването на „умни“ материали с предварително зададени свойства, които могат да реагират по различни начини, в зависимост от средата, в която се намират. Днес съществуват полимери, чието поведение се променя в резултат на промени в температурата, рН, светлина, магнитни полета, промяна в редокс потенциала и други. Комбинацията на два или повече такива полимера позволява създаването на макромолекули, които могат да изпълняват сложни функции в живи биологични системи. Една многообещаваща възможност за приложението на такива материали е за лечението на онкологични и генетични заболявания. Ето защо тяхното разработване е от ключово значение за развитието на полимерната и биомедицинската науки.

Два са основните подхода при синтеза на такива макромолекули – използване на макроинициатори и свързване на два или повече отделни блока. При първия начин се започва с полимеризация, изграждаща единия блок от полимера, последвана от подходящото функционализиране на краищата му, така че от тях да може да бъде инициирана полимеризация на друг мономер за получаване на следващия блок. При втория начин, двата блока се синтезират чрез две отделни различни реакции на полимеризация, след което краищата им се модифицират с такива функционални групи, които да встъпят във взаимодействие една с друга, при смесване на двата полимера, свързвайки ги здраво с ковалентни връзки. С популяризирането на *клик* химията, вторият подход стана особено често прилаган, тъй като позволява получаването на полимери, при които реакциите на получаване на единия блок не биха били възможни в присъствието на другия. Методът е особено предпочитан при конюгацията на полимери с биомолекули като белтъци и нуклеинови киселини, тъй като последните често са нестабилни в условия, различни от физиологичните. По този начин могат да бъдат проектирани синтетични нуклеолипиди, гликолипиди, гликопротеини и други макромолекули, които да бъдат използвани за повлияване на различни биологични процеси на клетъчно и биохимично ниво.

Доказателство за огромното значение на макромолекулния дизайн са многобройните фармацевтични препарати, съдържащи полимери, които се предлагат и

използват активно при лечението на големи групи заболявания. Пегаспаргаза (известна като търговския препарат Oncaspar®) представлява пегилиран ензим аспаргиназа и се използва широко при лечението на остра лимфобластна левкемия. Освен нея, на пазара се предлагат множество пегилирани препарати като инсулин (Peglispro), антихемолитичен фактор VII (Esperoct), интерферони (Pegintron) и др. Все повече препарати, на основата на мицели, натоварени с лекарствено вещество, позволяват венозно приложение на силно хидрофобни вещества във водни разтвори, значително подобрявайки тяхната бионаличност. Genexol® PM (paclitaxel натоварен в *PEG-PLA* мицели) и Nanoxel® M (Docetaxel, натоварен в *PEG-PLA* мицели) са примери за такива лекарства. Не на последно място, много съвременни ваксини разчитат на натоварване на полимерен наноносител със структури характерни за вируса или бактерията, против която се цели да се създаде имунитет. Най-скорошният пример за значението на полимерната нанонаука в тази област е ваксината на Pfizer против COVID-19, която представлява вирусна мРНК, енкапсулирана в липидна наночастица, модифицирана с PEG.

Всички тези предпоставки еднозначно подчертават значението на разработването на нови и по-ефективни стратегии за синтез на биосъвместими макромолекули, които да бъдат използвани при проектирането на наноносители с перспектива за нови и по-ефикасни терапии на социално значими заболявания.

ЦЕЛИ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА

Целта на настоящия дисертационен труд е разработване и прилагане на нови синтетични стратегии за получаване и модификация на различни типове макромолекули, намиращи приложения в областта на биомедицината като наноносители на биологично активни вещества и/или вектори за доставяне на нуклеинови киселини.

Основните задачи, произтичащи от поставената цел, са:

Дизайн, синтез и охарактеризиране на:

- полимер-липидни конюгати за повърхностна модификация на мембрани чрез комбинация на различни полимеризационни техники с азид-алкин *клик* химия.
- нуклеолипиди чрез използване на високоефективни *клик* химични реакции, използвани за получаване на нов тип липозомни сферични нуклеинови киселини.
- полистиренови полимери с присадени олигонуклеотидни вериги, използвани при получаването на нов тип сферични нуклеинови киселини с полимерно ядро.
- линейни и звездовидни съполимери на полиглицидол-поли(ϵ -капролактон) с различни състав и топология, намиращи приложение за получаването на мицелни и ниозомни наноносители на биологично активни вещества и лекарства.

Изследване на:

- Закономерностите и особеностите при самоасоциирането и способността на синтезираните амфифилни системи да формират наноразмерни носители
- Физикохимичните характеристики и колоидната стабилност на получените носители
- Способността на разработените системи да енкапсулират и доставят биологично активни вещества и нуклеинови киселини.

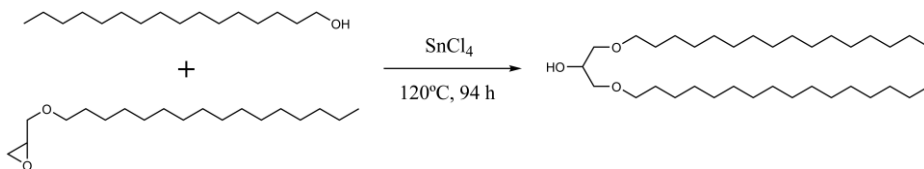
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Полимер-липидни конюгати

Фосфолипидите изпълняват изключително разнообразие от функции в живите организми, преди всичко на клетъчно и биохимично ниво. Освен че изграждат клетъчната мембрана, те участват в ключови процеси като регулация на нейната пропускливост и осигуряване процеса на клетъчно разпознаване [1, 2]. Развитието на синтетичната органична и полимерна химия предоставя възможност за получаване на фосфолипиди и техни аналози, които не се срещат в природата. Чрез подходящ подбор на функционални групи, молна маса и архитектура става възможно създаването на структури, изпълняващи роля без аналог в биологичните мембрани на живите организми. Един такъв пример е разработеният в лаборатория „Полимеризационни процеси“ 1,3-дидодецилосипропан-2-ол (*DDP*), чиято структура наподобява тази на липид, при който естерните връзки са заменени със значително по-стабилните в хидролитични условия етерни [3-9]. Когато *DDP* е ковалентно свързан към хидрофилен полимер (*PEG*, *PG*), получените макромолекули проявяват амфифилни свойства и са склонни към самоасоциране, давайки възможност за получаване и модификация на широк набор от наноструктури [10-15]. В настоящата работа бяха задълбочени изследванията върху този клас макромолекули, като вместо *DDP*, беше използван 1,3-дихексадецилосипропан-2-ол (*DHP*), при който двете хидрофобни вериги са по-дълги (16 вместо 12 въглеродни атома), с което наподобява в още по-голяма степен природните липиди. Беше разработен гъвкав модулен метод за получаването на *DHP*-полимерни конюгати чрез *клик* химия, позволяващ използването на полимери, синтезирани чрез различни полимеризационни техники, вместо само такива получени чрез анионна полимеризация, както в предходни работи. Получените макромолекули не само проявяват амфифилен характер и са склонни да образуват различни наноструктури във водни разтвори чрез самоасоциране, но и са подходящи агенти за повърхностна модификация на други структури (липозоми, ниезоми и др.) поради ефективното интеркалиране на *DHP* фрагмента в техните мембрани.

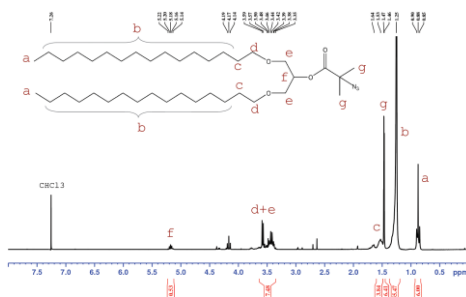
1.1. Получаване и функционализиране на 1,3-дихексадецилосипропан-2-ол (*DHP*)

DHP бе получен в една стъпка чрез адаптиране на процедура, описана в литературата за синтеза на *DDP* [3]. Реакцията включваше киселинно-катализирано отваряне на оксирановия пръстен на глицидилхексадецилов етер с 1-хексадеканол, в присъствие на люисовата киселина SnCl_4 (фиг. 1.1). Продуктът бе охарактеризиран чрез ^1H ЯМР и ИЧ спектроскопия. ^1H ЯМР спектър на продукта е показан на фиг. 1.2.

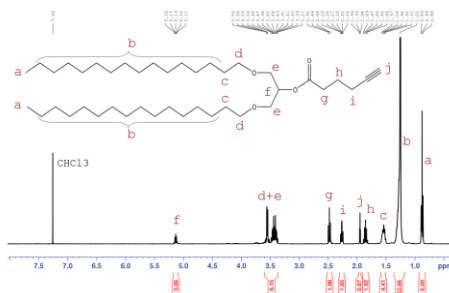


Фигура 1.1. Реакционна схема за получаване на *DHP*.

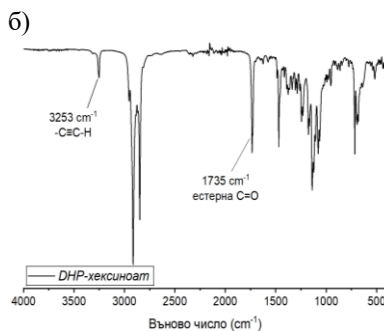
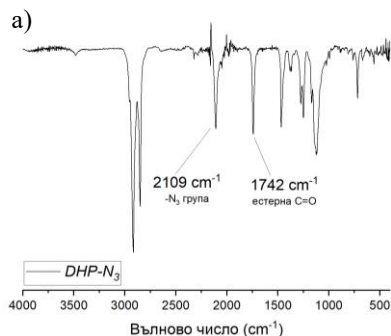
Вторичната хидроксилна група на *DHP* дава възможност за лесна модификация и получаване на негови производни чрез заместването ѝ с различни атоми или атомни групи. В хода на изследванията обаче бе установено, че директното ѝ заместване с нуклеофил, дори след нейното активиране (например чрез мезилиране) е невъзможно или протича с незадоволителни добиви. Възможно обяснение на наблюдаваните резултати може да бъде търсено в механизма на реакцията. Заместителната реакция следва да протича като нуклеофило заместване (S_n), което в повечето случаи се осъществява по мономолекулен ($\text{S}_\text{n}1$) или бимолекулен ($\text{S}_\text{n}2$) механизъм. Както е известно,



Фигура 1.4. ^1H ЯМР спектър на $DHP-N_3$ в $CDCl_3$ при 600 MHz.



Фигура 1.5. ^1H ЯМР спектър на DHP -хексиноат в $CDCl_3$ при 600 MHz.



Фигура 1.6. ИЧ спектри на $DHP-N_3$ (а) и DHP -хексиноат (б).

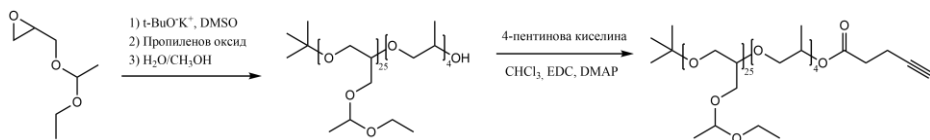
1.2. Получаване на функционализирани линейни полимери

Чрез различни видове полимеризации беше синтезиран набор от подходящо функционализирани линейни полимери, които да бъдат свързани с функционализирания DHP . Полимерите включваха PG , PEG , $PiPOx$, $PTBA$ и $PETEGA$.

1.2.1. Получаване на алкин-функционализиран защитен полиглицидол (t - Bu - $PEEGE_{25}$ -блок- PPO - $OOC(CH_2)_2C\equiv CH$)

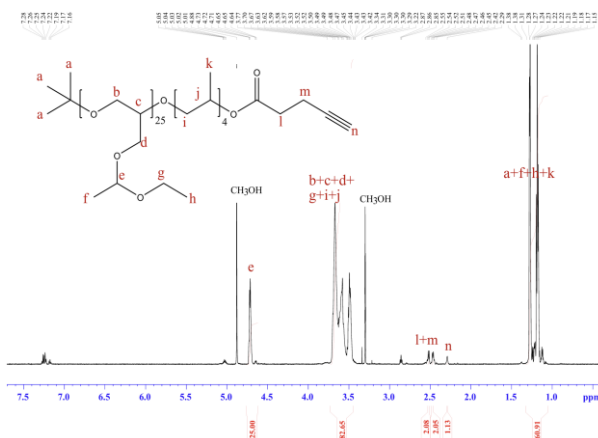
За получаването на полиглицидоловата част на конюгата бе използвана „жива“ анионна полимеризация на защитения глицидол – етоксietилглицидилов етер ($EEGE$). Добре известно от литературата е, че хидроксилната група в молекулата на глицидола реагира при опит за неговата полимеризация, в резултат на което се получават недобре дефинирани разклонени олигомерни продукти с широко молекулно-масово разпределение [17]. За получаването на линеен полиглицидол е необходимо, преди полимеризацията на мономера, неговата хидроксилна група да се защити чрез реакция с винил етилов етер, при което тя се превръща в ацетал. Ацеталите са стабилни при базични условия, каквито са тези на анионната полимеризация, което прави етоксietиловата група подходяща за защитаване на мономера.

Полимеризацията на етоксипетилглицидилов етер бе иницирана с калиев трет-бутоксид и проведена в DMSO при 60 °C в продължение на 14 дни. ¹H ЯМР анализ на проба от реакцията на 14 ден показва отсъствие на оксиранови протони в региона 2,5-3,2 ppm - индикация за количественото превръщане на мономера. След понижаване на температурата до 40 °C към реакционната смес бе добавено малко количество пропиленов оксид, за да се образува спейсър в края на веригата, който да улесни последващо функционализиране. След завършване на полимеризацията с вода, полимерът бе изолиран чрез екстракция с циклохексан и охарактеризиран чрез ¹H ЯМР, ИЧ и ГПХ. ГПХ показва мономодално разпределение с ниска дисперсност (на *фиг. 1.18 по-долу* е представена хроматограма на естерифицирания полимер). M_n и степента на полимеризация на продукта (**Таблица 1**) бяха определени чрез ¹H ЯМР след освобождаване на защитените групи на малко количество от продукта. Реакционната схема на извършените реакции е представена на *фиг. 1.7*.



Фигура 1.7. Реакционна схема, представяща получаването на *t*-Bu-PEEGE₂₅-блок-PP0₄-OOC(CH₂)₂C≡CH.

Получаването на алкин-функционализиран PEEGE полимер (*t*-Bu-PEEGE₂₅-блок-PP0₄-OOC(CH₂)₂C≡CH) бе осъществено чрез естерификация на -OH функционализиращия прекурсор с 4-пентинова киселина (*фиг. 1.7*). Реакцията бе извършена в хлороформ, като за кондензационен агент бе използвана системата EDC/DMAP. Наличието на спейсър от PPO е необходимо, защото иначе естерификация не протича количествено [18]. В конкретния случай беше получен полимер с напълно естерифицирани вериги, както става ясно от отношението между интегралите на пиковите при 2,5 и 2,3 ppm, съответстващи на протоните от 4-пентиновата киселина, и тези при 4,65 ppm, съответстващи на метиновите протони от мономерните звена (*фиг. 1.8*). ИЧ спектърът очаквано показва наличието на

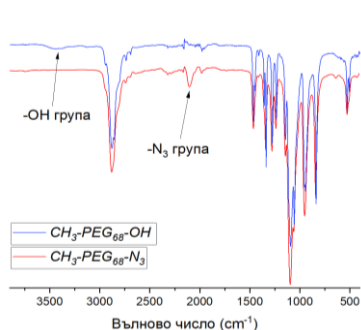


Фигура 1.8. ¹H ЯМР спектър на *t*-Bu-PEEGE₂₅-блок-PP0₄-OOC(CH₂)₂C≡CH в CDCl₃ при 600 MHz.

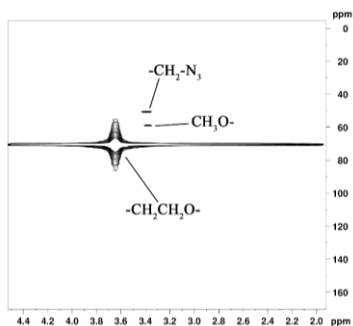
терминална тройна връзка, както и на естерна карбонилна група при 1730 cm^{-1} , което допълнително подкрепи резултатите от ^1H ЯМР анализа.

1.2.2. Получаване на $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-N}_3$

Търговски PEG 3000 монометил етер ($\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-OH}$) бе функционализиран с азидо-група в две стъпки. Първата се състоеше в естерификация на крайната му $-\text{OH}$ група с мезил хлорид, след което полученият мезилат бе заместен чрез реакция с натриев азид. ИЧ спектърът на крайния продукт показва очакваните за направените превръщания изменения, а именно изчезване на широкия абсорбционен пик, съответстващ на валентната вибрация на хидроксилната група при 3300 cm^{-1} и поява на абсорбционен пик при 2100 cm^{-1} , съответстващ на нововъведената азидо-група (**фиг. 1.9**). Поради припокриването на пиковите на крайната метилова група от инициатора и метиленовата група, съседна на азидната в протонния спектър (**фиг. 1.11**), бе проведено изследване и чрез HSQC (**фиг. 1.10**). HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) е двуизмерен ЯМР експеримент, който показва корелации между протони (^1H) и директно свързани хетероядра (най-често ^{13}C) чрез едновръзкови купелувания (^1J). Методът позволява разграничаване на функционалности, чиито отмествания се припокриват в протонния спектър. Както се вижда от **фиг. 1.10**, двете функционалности на $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-N}_3$ ($\text{CH}_3\text{O-}$ и $-\text{CH}_2\text{-N}_3$) са ясно разграничени, а сигнали на прекурсорните молекули ($-\text{CH}_2\text{-OH}$ и $-\text{CH}_2\text{-OSO}_2\text{CH}_3$) липсват, което доказва количественото превръщане на хидроксилната група в азидна.



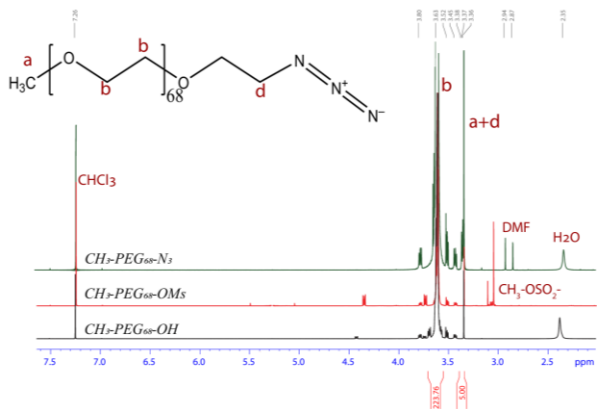
Фигура 1.9. ИЧ спектри на $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-OH}$ и $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-N}_3$.



Фигура 1.10 HSQC спектър на $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-N}_3$ в CDCl_3 при 400 MHz.

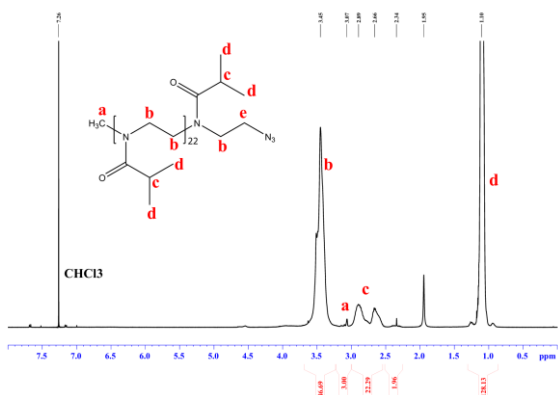
1.2.3. Получаване на $\text{CH}_3\text{-PiPOx}_{22}\text{-N}_3$

Азид-функционализиран поли(2-изопропил-2-оксазолин) ($\text{CH}_3\text{-PiPOx}_{22}\text{-N}_3$) бе синтезиран чрез катионна полимеризация с отваряне на пръстена на 2-изопропил-2-оксазолин. Мономерът бе получен чрез реакция между изобутанова киселина и етаноламин при $230\text{ }^\circ\text{C}$. Охарактеризирането му бе извършено чрез ИЧ и ^1H ЯМР спектроскопия, както и чрез газова хроматография.



Фигура 1.11. ^1H ЯМР спектри на $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-OH}$, $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-OMs}$ и $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-N}_3$ в CDCl_3 при 600 MHz. Посочените интегрални отношения са за $\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-N}_3$.

Полимеризацията на получения мономер бе извършена в ацетонитрил с инициатор метилтозилат при 80 °C в затворен съд. След изтичане на реакционното време завършването бе извършено чрез добавяне на излишък от твърд натриев азид и престояване при стайна температура за 24 h. По този начин бе получен директно полимер, носещ азидо група в края на веригата си. Премахването на нереагиралия натриев азид и мономер бе осъществено чрез ултрафилтрация във вода през 1 kDa MWCO мембрана. Крайният продукт показва мономодално разпределение по молна маса и ниска степен на дисперсност в ГПХ (*фиг. 1.23 по-долу*). Степента на полимеризация, възлизаща на 22 мономерни звена, бе изчислена въз основа на интегралното отношение между пика на метиловата група от инициатора при 3,07 ppm и останалите протони от мономерните звена в ^1H ЯМР спектъра (*фиг. 1.12*). Молекулно-масовите характеристики на полимера са посочени в *Таблица 1*.



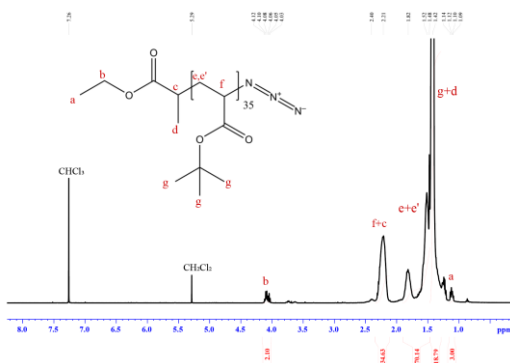
Фигура 1.12. ^1H ЯМР спектър на $\text{CH}_3\text{-PiPOx}_{22}\text{-N}_3$ в CDCl_3 при 600 MHz.

1.2.4. Получаване на азид-функционализиран поли(трет-бутилакрилат) ($\text{PTVA}_{35}\text{-N}_3$)

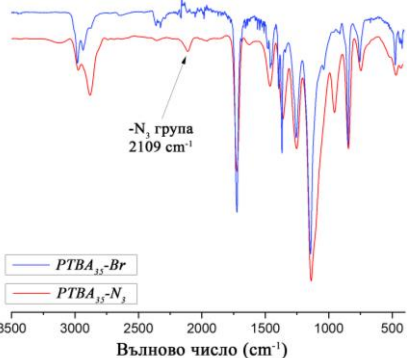
Поли(трет-бутилакрилат) ($\text{PTVA}_{35}\text{-Br}$) беше синтезиран чрез ATRP полимеризация на трет-бутилакрилат. В ролята на инициатор бе използван етил-2-бромпропионат, а реакцията бе

катализирана от CuBr и PMDETA. Полученият полимер показва мономодално разпределение по молна маса и ниска дисперсност след ГПХ анализ (вж. **фиг. 1.25** по-долу). Степента на полимеризация и молната маса на полимера (**Таблица 1**) бяха определени чрез интегралното отношение на метиловата група от инициатора при 1,10 ppm и метиновите протони от мономера при 2,21 ppm (**фиг. 1.13**).

Тъй като при условията на ATRP полимеризацията, полученият полимер съдържа бром в края на веригата си, функционализирането му с азид бе извършено лесно в една стъпка чрез реакция на полимера с излишък от натриев азид в DMF. За успешната функционализация може да се съди по появата на пик при 2109 cm^{-1} в ИЧ спектъра, съответстващ на азидо-група (**фиг. 1.14**).



Фигура 1.13. ^1H ЯМР спектър на $\text{PTBA}_{35}\text{-N}_3$ в CDCl_3 при 600 MHz.



Фигура 1.14. ИЧ спектри на $\text{PTBA}_{35}\text{-Br}$ и $\text{PTBA}_{35}\text{-N}_3$.

1.2.5. Получаване на азид-функционализиран поли(етокситриетиленгликолакрилат) ($\text{PETEGA}_{13}\text{-N}_3$)

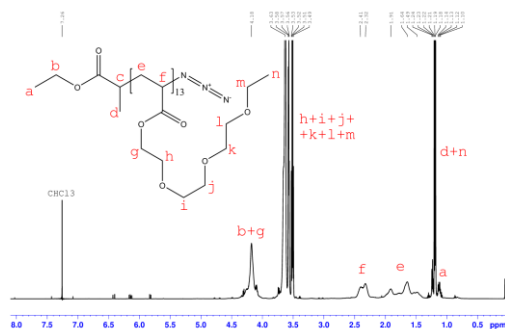
Мономерът етокситриетиленгликолакрилат (ETEGA) бе получен чрез естерификация на триетиленгликол моноетил етер с акрилоил хлорид. Полученият естер бе изолиран от реакционната смес чрез екстракция и пречистен чрез колонна хроматография.

ETEGA бе полимеризиран чрез контролирана радикалова полимеризация, в случая ATRP. Аналогично на полимеризацията на трет-бутилакрилата като инициатор бе използван етил-2-бромпропионат, а като катализатор системата CuBr/PMDETA. ГПХ анализът показва мономодално масово разпределение и ниска дисперсност на получения полимер, а чрез ^1H ЯМР спектроскопия бе определена степен на полимеризация, съответстваща на 13 мономерни звена (**фиг. 1.15**, **фиг. 1.27** по-долу, **Таблица 1**).

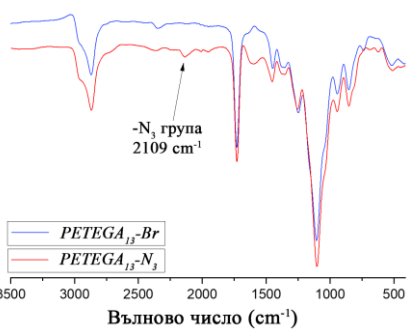
Получаването на $\text{PETEGA}_{13}\text{-N}_3$ беше осъществено чрез нуклеофилна заместителна реакция на крайния бром атом с излишък от натриев азид. ИЧ спектърът на получения продукт показва наличие на пик при 2108 cm^{-1} , съответстващ на валентната вибрация на азидо-група (**фиг. 1.16**).

От **Таблица 1** се вижда, че молните маси на полимерите, които не съдържат защитена функционални групи ($\text{CH}_3\text{-PEG}_{68}\text{-N}_3$, $\text{CH}_3\text{-PiPOx}_{22}\text{-N}_3$, и $\text{PETEGA}_{13}\text{-N}_3$) имат сходни молни маси в диапазона 2200-3200 g/mol. Молните маси на другите два полимера, които съдържат защитени групи ($t\text{-Bu-PEEGE}_{23}\text{-блок-PPOf-OOC(CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{CH}$ и $\text{PTBA}_{35}\text{-N}_3$), са по-високи, но след тяхното освобождаване масите им отново попадат в посочения диапазон (съответно 2250 и 2660 g/mol). Поради различната молна маса на изграждащите ги мономерни звена, петте полимера имат различни степени на полимеризация и съответно различна дължина на страничната верига. Това е и една от

предпоставките за различното поведение и свойства на получените от тях липид-полимерни конюгати при самоасоцииране (вж. по-долу).



Фигура 1.15. ^1H ЯМР спектър на $\text{PETEGA}_{13}\text{-N}_3$ в CDCl_3 при 600 MHz.



Фигура 1.16. ИЧ спектри на $\text{PETEGA}_{13}\text{-Br}$ и $\text{PETEGA}_{13}\text{-N}_3$.

Полимер	Степен на полимеризация (ЯМР)	M_n (ЯМР) (g/mol)	M_n (ГПХ) (g/mol)	M_w (ГПХ) (g/mol)	\bar{D}
<i>t</i> -Bu-PEEGE ₂₅ -блок-PPO ₄ -OOC(CH ₂) ₂ C≡CH	25	4050	3490	4050	1,16
CH ₃ -PEG ₆₈ -N ₃	68	3030	2980	3230	1,08
CH ₃ -PiPO _{x22} -N ₃	22	2540	2740	3530	1,29
PTVA ₃₅ -N ₃	35	4630	6340	7530	1,19
PETEGA ₁₃ -N ₃	13	3180	3800	4870	1,28

Таблица 1. Молекулно-масови характеристики на синтезираните полимери.

1.3. Получаване на полимер-липидни конюгати

Функционализираните полимери и *DHP* бяха използвани за получаването на амфифилни макромолекули, състоящи се от хидрофилен полимерен блок и хидрофобен липидоподобен остатък. Химичното свързване на прекурсорите бе осъществено чрез реакции на азид-алкин циклоприсъединяване, като в случаите на *DHP-PG* и *DHP-PAА* клик реакцията бе последвана от освобождаване на защитните функционални групи. Обща схема, изобразяваща описаните взаимодействия, е представена на *фиг. 1.17*.

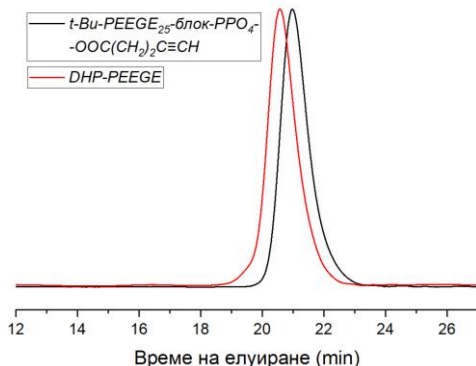


Фигура 1.17. Схематично представяне на *клик* реакцията между *DHP* и полимерите.

1.3.1. Получаване на полиглицидол-липиден конюгат (*DHP-PG*)

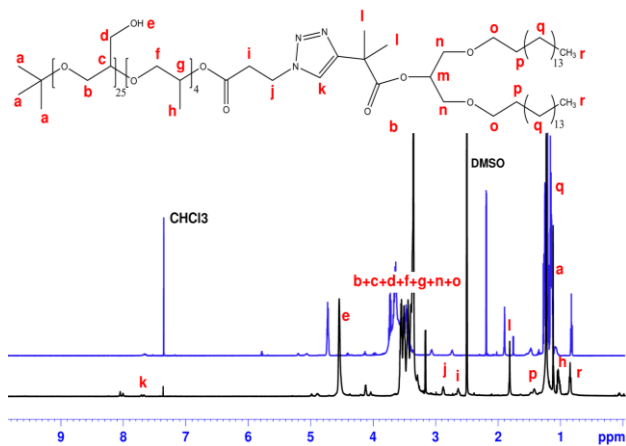
Свързването на *t*-Bu-PEEGE₂₅-блок-PPO₄-OOC(CH₂)₂C≡CH с *DHP-N*₃ бе извършено чрез медно-катализирана азид-алкин *клик* химична реакция. Взаимодействието бе проведено в излишък от *DHP*, в THF при 40 °C, а като лиганд бе използван PMDETA. След приключване на реакцията, медният комплекс бе отстранен чрез колонна хроматография (алуминиев оксид/THF), а излишъкът от *DHP* чрез

диализа през 1 kDa MWCO целуозна мембрана в смес метанол:вода (9:1). Крайният продукт бе охарактеризиран чрез ГПХ и ^1H ЯМР спектроскопия (*фиг. 1.18* и *1.19*). Както се вижда от *фиг. 1.18*, ГПХ анализът показва отчетливо изместване на кривата към по-ниски времена на елуиране, съответстващо на увеличаващ се хидродинамичен обем, тоест и молна маса. В ^1H ЯМР се забелязва нов пик при 7,6 ppm, съответстващ на протон от формираната се триазолен пръстен (*фиг. 1.19*).



Фигура 1.18. Гелово-проникващи хроматограми на *t*-Bu-PEEGE₂₅-блок-PPO₄-OOC(CH₂)₂C≡CH и DHP-PEEGE.

Последният етап от синтеза на конюгата се състоеше в премахване на защитните етоксигетилни групи на глицидоловите мономерни звена. Това бе осъществено чрез реакция с метанол в присъствие на каталитични количества $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Пълната премахване на защитните групи на съединението бе потвърдено чрез ^1H ЯМР спектроскопия. Както става ясно от *фиг. 1.19*, интегралните отношения на пиковите при 1,2 и 3,5 ppm спрямо останалите пикове в спектъра намалява значително, а също се появява и нов сигнал при 4,55 ppm (протони от -OH група) за сметка на изчезващия при 4,75

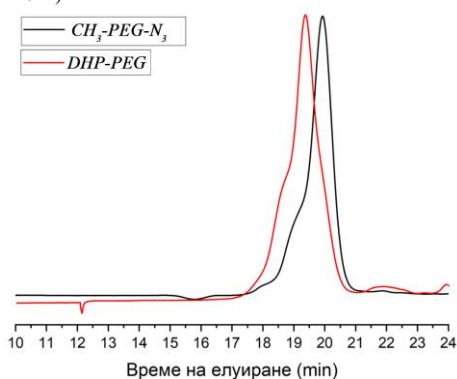


Фигура 1.19. ^1H ЯМР спектри на DHP-PEEGE в CDCl_3 (синьо) и DHP-PG в DMSO-d_6 (черно) при 600 MHz.

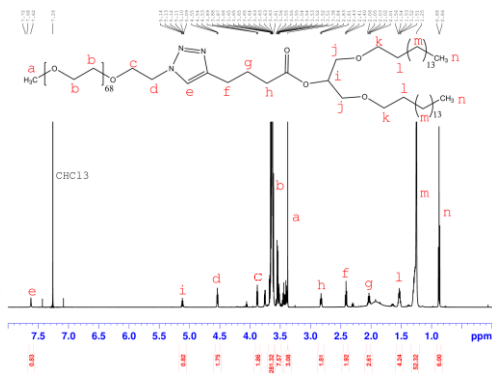
ppm (метинови протони от защитната група), което еднозначно показва успешната сваляне на защитните групи на полимера.

1.3.2. Получаване на полиетиленгликол-липиден конюгат (*DHP-PEG*)

Свързването на $CH_3-PEG_{68}-N_3$ с *DHP-хексинаот* бе осъществено чрез медно катализирана азид-алкин *клик* реакция. Реакцията бе проведена в THF при 40 °C. Отстраняването на катализатора бе осъществено чрез ултрафилтрация във вода през 1 kDa MWCO мембрана, в присъствието на динатриева сол на ЕДТА, която образува стабилен комплекс с медните йони. Отстраняването на нереагирал *DHP* бе осъществено чрез преутаяване на лиофилизата от ултрафилтрацията в студен диетилов етер. Успешното конюгиране бе доказано чрез намаляването на времето за елиране в ГПХ (*фиг. 1.20*) и появата на нови протонни сигнали при 7,73, 4,56 и 3,90 ppm в 1H ЯМР спектъра (*фиг. 1.21*).



Фигура 1.20. Гелово-проникващи хроматограми на $CH_3-PEG_{68}-N_3$ и *DHP-PEG*.

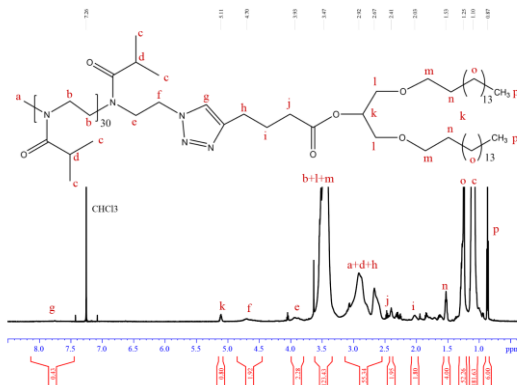


Фигура 1.21. 1H ЯМР спектър на *DHP-PEG* в $CDCl_3$ при 600 MHz.

1.3.3. Получаване на поли(2-изопропил-2-оксазолин)-липиден конюгат (*DHP-PiPOx*)

Конюгирането на $CH_3-PiPOx_{27}-N_3$ с *DHP-хексинаот* бе извършено аналогично на *DHP-PEG*, като тук за изолирането бяха използвани термочувствителните свойства на $PiPOx$, които се запазват и при неговия конюгат с *DHP*. При температура под 35 °C (*фиг. 1.22*) всички вещества от реакционната смес с изключение на излишъка от *DHP-хексинаот* бяха напълно разтворими във вода, което даде възможност за отстраняване на последния. При температура над 35 °C, *DHP-PiPOx* се отдели под формата на бяла утайка, което позволява неговото изолиране чрез центрофугиране при 40 °C.

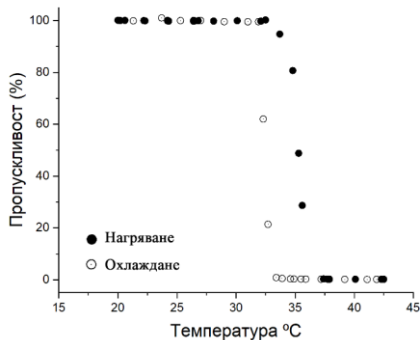
Крайният продукт бе охарактеризиран чрез 1H ЯМР спектроскопия и ГПХ. Аналогично на останалите конюгати, се забеляза ясно намаляване на времето на задържане в ГПХ (*фиг. 1.23*) и образуване на нови пикове при 7,61, 4,67 и 3,88 ppm в 1H ЯМР, съответстващи на протон от триазолен пръстен и крайните метиленови групи от полимера, съседни на триазоления пръстен (*фиг. 1.24*).



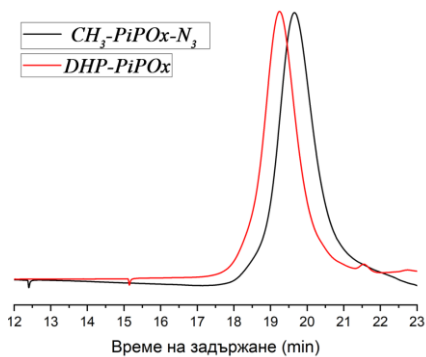
Фигура 1.24. ^1H ЯМР спектър на $DHP\text{-}PiPOx$ в $CDCl_3$ при 600 MHz.

1.3.4. Получаване на липиден конюгат ($DHP\text{-}PAA$) на поли(акрилова киселина)

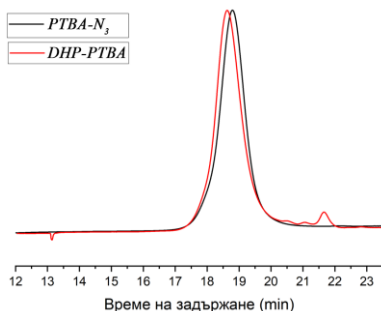
Получаването на DHP функционализирана поли(акрилова киселина) бе осъществено чрез *клик* реакция на $DHP\text{-}hex$ с $PTBA_{35}\text{-}N_3$, катализирана от $Cu(I)$, последвана от премахване на защитните трет-бутилови групи. Пречистването на продукта от *клик* реакцията $DHP\text{-}PTBA$ бе извършено чрез колонна хроматография (силикагел/THF), а доказването на неговата структура бе осъществено чрез ^1H ЯМР спектроскопия и ГПХ. В ГПХ се наблюдаваше намаляване на времето на задържане, съответстващо на увеличаване на молната маса (фиг. 1.25), докато в ^1H ЯМР спектъра се забелязва пик при 7,58 ppm, съответстващ на протона, свързан с азот от триазолен пръстен.



Фигура 1.22. LCST на $DHP\text{-}PiPOx$, определена чрез UV-Vis пропускливост при 500 nm и концентрация 1 mg/ml.

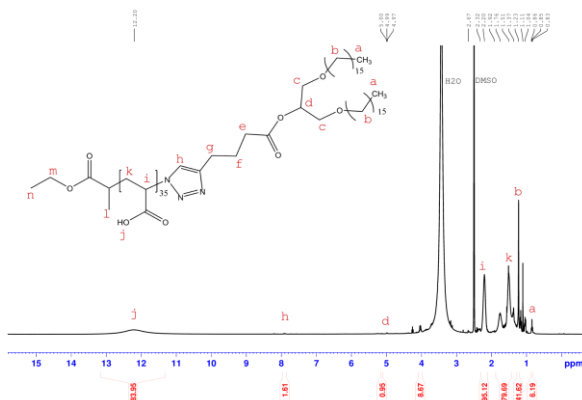


Фигура 1.23. Гелово-проникващи хроматограми на $CH_3\text{-}PiPOx_{22}\text{-}N_3$ и $DHP\text{-}PiPOx$.



Фигура 1.25. Гелово-проникващи хроматограми на $PTBA_{35}-N_3$ и $DHP-PTBA$.

За получаване на конюгат на DHP с полиакрилова киселина, третичните бутилови групи на $DHP-PTBA$ бяха хидролизирани чрез реакция с трифлуорооцетна киселина в дихлорометан. Продуктът бе изолиран чрез изпаряване до сух остатък под вакуум. 1H ЯМР спектърът показва изчезване на масивния пик при 1,4 ppm, съответстващ на трет-бутиловите естерни групи (**фиг. 1.26**). Това, заедно с променената разтворимост на съединението (вече беше разтворимо в полярни разтворители и вода) свидетелства за успешната хидролиза на естерните групи на поли(трет-бутилакрилат).



Фигура 1.26. 1H ЯМР спектър на $DHP-PAА$ в $DMSO-d_6$ при 600 MHz.

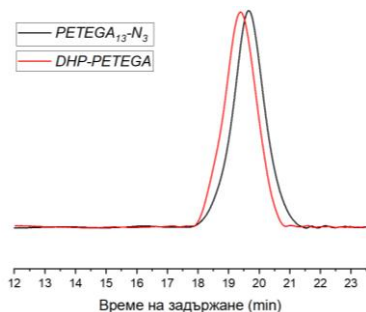
1.3.5. Получаване на поли(етокситриетиленгликолакрилат)-липиден конюгат ($DHP-PETEGA$)

Свързването на $PETEGA_{13}-N_3$ с DHP -хексинаот и в този случай бе извършено чрез медно-катализирано азид-алкин циклоприсъединяване. Успешното протичане на реакцията налагаше използването на голям излишък от DHP -хексинаот, който обаче се оказа особено труден за разделяне от продукта в края на реакцията. За постигането на тази цел бе синтезирана алкин-улавяща смола чрез радикалова съполимеризация на (4-хлорометил)стирен с дивинилбензен. Получената смола бе обработена с излишък от натриев азид в DMF, в резултат на което страничните хлорометилни групи на гела бяха превърнати в азидометилни.

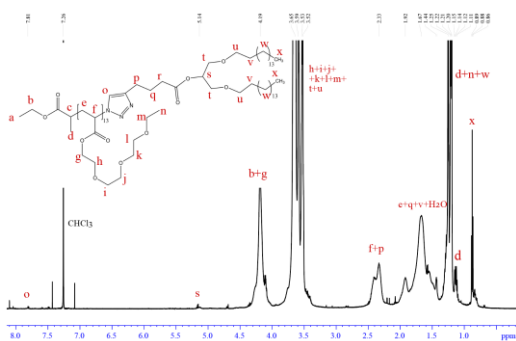
Така получената смола, е напълно неразтворима във всички разтворители, но същевременно съдържа голямо количество свободни азидо-групи по своята повърхност, които при подходящи условия биха могли да встъпват в реакция с терминални алкини. Веднъж реагирал, алкинът остава здраво прикрепен към повърхността на смолата и може лесно да бъде отделен от реакционната смес чрез филтруване.

Този подход позволи ефективното и селективно отстраняване на излишъка от *DHP-хексинаот* в рамките на *one-pot* реакция, като след изтичане на реакционното време на *клик* реакцията му с *PETEGA₁₃-N₃*, към сместа бе добавен излишък от азид-функционализираната смола и реакцията оставена още 24 h при същите условия. Впоследствие, уловеният *DHP-хексинаот* беше отстранен чрез филтруване заедно със смолата, а медният комплекс бе премахнат чрез колонна хроматография (силикагел/THF).

Крайният продукт показва отместване към по-кратко време на задържане в ГПХ, в сравнение с изходния полимер (*фиг. 1.27*) и очаквани интегрални отношения в ¹H ЯМР спектъра (*фиг. 1.28*).



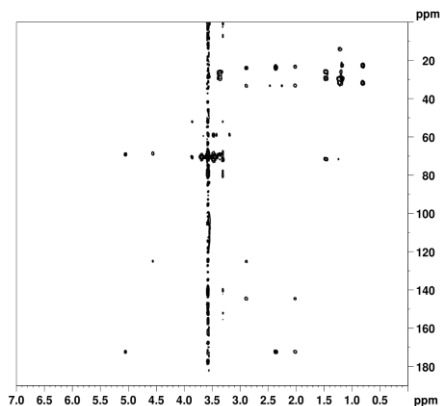
Фигура 1.27. Гелово-проникващи хроматограми на *PETEGA₁₃-N₃* и *DHP-PETEGA*.



Фигура 1.28. ¹H ЯМР спектър на *DHP-PETEGA* в $CDCl_3$ при 600 MHz.

1.4. Характеристики на полимер-липидни конюгати

Беше разработена ефективна модулна синтетична стратегия за получаване на полимер-липидни конюгати чрез азид-алкин *клик* химия с различна природа на полимерния блок. Методът позволява въвеждане на азидна група върху липидния миметик и терминален алкин в края на полимерната верига или обратно, което осигурява гъвкавост при прилагането му към полимери получени чрез различни видове полимеризация. Така например директното получаване на азид-функционализиран полиоксазолини е възможно чрез завършване на полимеризацията с натриев азид, докато, поради особеностите в реактивоспособността на терминалната -ОН група, при *PEEGE* е по-удачно да се предприеме естерификация с алкинова киселина. Стратегията е съвместима с богат набор от защитни групи в полимерната верига, поради меките условия на провеждане на *клик* реакцията и стабилността на ковалентни връзки, чрез които се свързват двете молекули. В настоящата работа в два от полимерните блокове бяха използвани съответно етоксигетилова ацетална защита и трет-бутилов естер, като наличието им не създаде каквито и да било затруднения в изпълнението на реакциите.

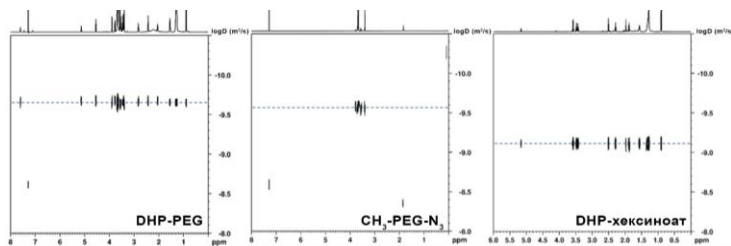


Фигура 1.29. HMBC спектър на DHP-

(DOSY). На фиг. 1.30 са представени двуизмерните DOSY спектри на DHP-хексинаот, CH₃-PEG₆₈-N₃, и DHP-PEG. Ясно се забелязва намаляване на дифузионния коефициент при конюгата DHP-PEG, сравнена с тази на прекурсорните молекули от които е получен, което може да се обясни с увеличаване на молната маса, съответно успешно протекла *клик* реакция. В Таблица 3 са представени стойностите на дифузионните коефициенти на останалите полимер-липидни конюгати.

Съединение	M _n ГПХ g/mol	M _w ГПХ g/mol	M _w ЯМР g/mol	Đ (ГПХ)
DHP-PEEGE	4260	5420	4410	1,27
DHP-PG	-	-	2600	-
DHP-PEG	4430	5470	3670	1,23
DHP-PiPOx	4300	5080	4090	1,18
DHP-PTBA	6140	7600	5270	1,24
DHP-PAА	-	-	3300	-
DHP-PETEGA	4220	5170	3810	1,22

Таблица 2. Молекулно-масови характеристики на получените полимер-липидни конюгати.



Фигура 1.30. DOSY спектри на DHP-PEG и прекурсорните молекули, от които е получен.

Получените макромолекулни продукти притежават ясно изразен амфифилен характер, като двете въглеродни вериги в хидрофобния им фрагмент структурно наподобяват тези при фосфолипидите. Това обуславя потенциала на разглежданите молекули за приложение при

получаването на наноструктури, както и за модификация на фосфолипидни и полимерни мембрани на различни наноносители, променяйки техните свойства или придавайки им нови такива.

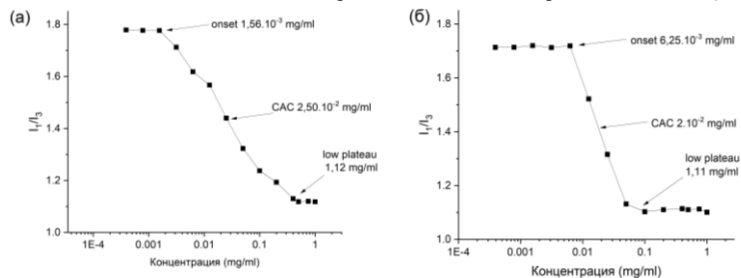
Съединение	D [m ² .s ⁻¹]	D ^{коногат} [m ² .s ⁻¹]	
		D ^{DHP}	D ^{полимер}
<i>DHP-хексинаот</i>	5,87.10 ⁻¹⁰		
<i>CH₃-PEG₆₈-N₃</i>	2,43.10 ⁻¹⁰		
<i>CH₃-PiPOx₂₂-N₃</i>	2,50.10 ⁻¹⁰		
<i>DHP-PEG</i>		1,99.10 ⁻¹⁰	1,99.10 ⁻¹⁰
<i>DHP-PG</i>		7,54.10 ⁻¹¹	7,48.10 ⁻¹¹
<i>DHP-PAA</i>		5,17.10 ⁻¹¹	4,73.10 ⁻¹¹
<i>DHP-PiPOx</i>		2,52.10 ⁻¹⁰	2,18.10 ⁻¹⁰
<i>DHP-PETEGA</i>		Моноекспоненциално апроксимиране: 4,56.10 ⁻¹⁰	Моноекспоненциално апроксимиране: 2,39.10 ⁻¹⁰
		Двоекспоненциално апроксимиране: 2,3.10 ⁻¹⁰ и 6,2.10 ⁻¹⁰	Двоекспоненциално апроксимиране: 1,96.10 ⁻¹⁰ и 3,64.10 ⁻¹⁰

Таблица 3. Транслационни дифузионни коефициенти (*D*) на *DHP-хексинаот*, някои полимери и получените коногати, определени чрез DOSY.

Поведението на получените *DHP*-полимерни коногати във воден разтвор бе изследвано с цел оценяване на техния потенциал за самоорганизация и формиране на наноструктури. Критичните концентрации на самоасоцииране (CAC) бяха определени чрез метода на солибилизация на пирен. Бе установено, че при ниски концентрации молекулите присъстват в разтвора под формата на унимери, докато при повишаване на концентрацията се наблюдава постепенно формиране на хидрофобни домени, което свидетелства за самоасоцииране в наноструктури. За разлика от класическите нискомолекулни повърхностноактивни вещества, преходът от умерено към агрегирано състояние при *DHP*-полимерните коногати протича в широк концентрационен интервал, което отразява пониската кооперативност на процеса на самоасоцииране (**Фигура 1.31**). Характерът и ширината на този преход зависят от природата, дължината и архитектурата на полимерната верига, свързана с липидомиметичния фрагмент. Критичните концентрации на самоасоцииране имат сравнително ниски стойности (**Таблица 4**), което показва, че асоциатите остават стабилни при разреждане.

За охарактеризиране на получените агрегати бяха използвани динамично, статично и електрофоретично светлоразсейване. Беше установено, че размерът, молната маса и агрегационното число на частиците силно зависят от структурата на полимерната компонента, като при различните коногати се наблюдава формиране на агрегати с хидродинамични размери от порядъка на десетки до стотици нанометри. Агрегационното число N_{agg} , съответно и M_w варираше силно при различните агрегати, което се дължи на различната природа на полимерните блокове. ζ -потенциала беше с ниски стойности при всички частици с изключение на получените от *DHP-PAA*, при които голямата отрицателна стойност на ζ -потенциала се дължи на отрицателно заредените карбоксилни групи в мономерните звена на полиакриловата киселина (**Таблица 5**). Морфологичното разнообразие на агрегатите директно беше потвърдено чрез криогенна трансмисионна електронна микроскопия (Cryo-TEM), която разкри наличие на сферични и нерегулярни везикули (*irregular vesicles*), червевидни (*worm-like micelles*) и пръчковидни структури, както и съвместно съществуване на различни типове

наночастици в зависимост от конкретния *DHP*-полимерен конюгат (Фигура 1.32).



Фигура 1.31. Зависимост на отношението I_1/I_3 във флуоресцентния спектър на пирен във водни разтвори на (а) *DHP-PG* и (б) *DHP-PAА* при 25 °C.

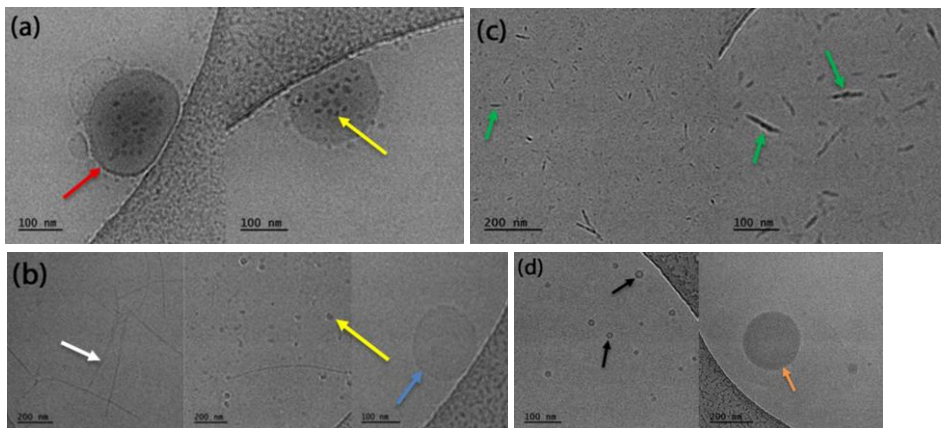
<i>DHP</i> -полимер	Температура	Onset (mg/ml)	Low plateau (mg/ml)	CAC (mg/ml)
<i>DHP-PEG</i>	25 °C	$1,56 \cdot 10^{-3}$	0,2	0,025
	37 °C	$6,25 \cdot 10^{-3}$	0,1	0,030
<i>DHP-PG</i>	25 °C	$2,10 \cdot 10^{-3}$	0,5	0,025
	37 °C	$3,13 \cdot 10^{-3}$	0,5	0,025
<i>DHP-PiPOx</i>	25 °C	$3,13 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,0125
	37 °C	$3,50 \cdot 10^{-3}$	0,2	0,025
<i>DHP-PETEGA</i>	25 °C	$6,20 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,05
	37 °C	$8,50 \cdot 10^{-3}$	0,4	0,06
<i>DHP-PAА</i>	25 °C	$6,40 \cdot 10^{-3}$	0,05	0,02
	37 °C	$1,50 \cdot 10^{-2}$	0,1	0,03

Таблица 4. Характеристики на агрегационното поведение на *DHP*-полимерните конюгати, измерени при 25 °C и 37 °C. Onset – концентрация при която отношението I_1/I_3 започва да намалява. Low plateau – най-ниската концентрация, при която отношението I_1/I_3 запазва стойността си. CAC – критична концентрация на агрегиране.

<i>DHP</i> -полимер	R_h (nm)	R_g (nm)	R_g/R_h	M_w ($10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	N_{agg}	ζ -пот. (mV)
<i>DHP-PEG</i>	10,0	17,0	1,70	0,471	128	3,99
<i>DHP-PG</i>	145,0	127,0	0,88	81,0	30566	-7,78
<i>DHP-PiPOx</i>	15,0/95,0	84,5	-	6,09	1489	-7,57
<i>DHP-PETEGA</i>	160,0	165,0	1,03	130,0	34120	2,42
<i>DHP-PAА</i>	80,0	113,0	1,41	14,5	4394	-39,0

Таблица 5. Характеристики на агрегатите, получени от *DHP*-полимерните конюгати във воден разтвор, определени чрез статично и динамично светлоразсейване. R_h -хидродинамичен радиус, R_g – инерционен радиус, N_{agg} – агрегационно число, ζ – зета потенциал.

Получените резултати са в добро съответствие с резултатите от статичното и динамично светлоразсейване и подчертават чувствителността на процеса на самоасоцииране към архитектурата на макромолекулите.



Фигура 1.32. Cryo-TEM снимки на агрегатите получени от *DHP-PG* (a), *DHP-PiPOx* (b), *DHP-PAA* (c) и *DHP-PETEGA* (d) във вода. Наблюдават се сферични везикули (червена стрелка), малки сферични мицели (жълти стрелки), червеевидни мицели (бяла стрелка), пръчковидни мицели (зелени стрелки), малки везикули (черни стрелки) и частици без мембрана (оранжева стрелка).

2. *DHP*-функционализирани олигонуклеотиди

Генната терапия е една от най-бързоразвиващите се области в съвременната медицина. Тя представлява подход, при който в клетките на организма се въвежда, заменя или модулира генетичен материал с цел лечение или предотвратяване на заболяване. Терапевтичният ефект се постига чрез коригиране на дефектни гени, добавяне на липсващи функционални копия или контролиране на експресията на определени гени, като за доставянето се използват вирусни или синтетични вектори. Този подход е насочен към самия молекулен „източник“ на болестта и има потенциал за дългосрочно или дори трайно възстановяване на нарушени биологични функции [19,20].

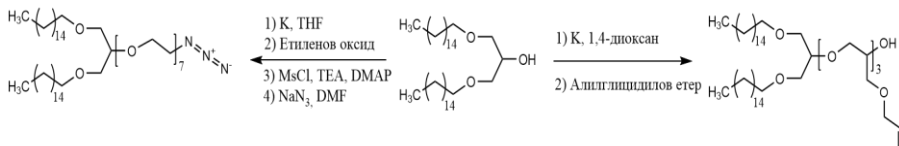
Традиционните вирусни носители остават изключително ефективни вектори за генна терапия, но са съпроводени от ограничения като имуногенност, ограничено натоварване и риск от интеграция на вируса в генома на гостоприемника. Поради това интересът към невирусните платформи нараства значително през последните две десетилетия. Синтетичните полимери, липидните наночастици и хибридният материал позволяват по-голям контрол върху структурата, товара, стабилността и освобождаването на нуклеиновите киселини [21].

В този контекст, сферичните нуклеинови киселини (СНК) се открояват като напълно нов клас архитектури, при които нуклеинови вериги са плътно разположени и радиално ориентирани върху повърхността на компактно ядро. Тази триизмерна конфигурация им придава уникални свойства, каквито линейните ДНК и РНК не притежават: повишена клетъчна проникваемост без нужда от допълнителни трансфекционни агенти, висока структурна стабилност, възможност за модулен дизайн, както и много добра колоидна и ензимна стабилност. Всички тези характеристики правят СНК обещаващи платформи за генна терапия, геномно редактиране, ваксини и диагностични системи [22-24].

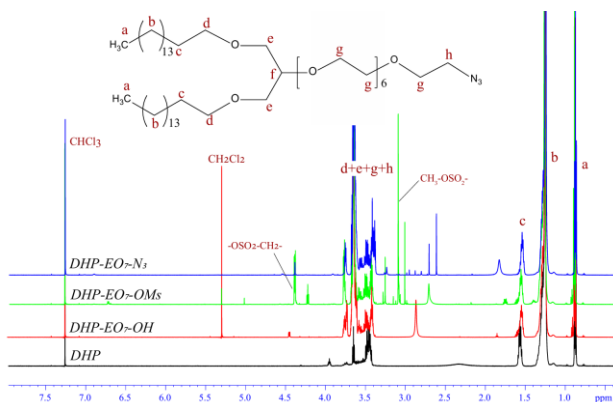
В настоящата работа беше разработен нов тип липозомно базирани СНК, чрез интеркалация на синтетични нуклеолипиди, получени чрез *клик* химични реакции между подходящо функционализирани едноверижни ДНК олигонуклеотиди и *DHP*. Бяха демонстрирани два различни подхода при получаването на нуклеолипидите, като и двата включваха директно ковалентно свързване на двете молекули в отсъствие на катализатори и метали, което прави методите особено атрактивни за биологични приложения.

2.1. Получаване на азид- и алкен-функционализиран *DHP*

Както бе споменато в *1.1.*, директното заместване на хидроксилната група в молекулата на *DHP* не даде удовлетворителни резултати поради механистичните особености на реакцията. Поради това бе предприет подход за „изнасяне“ на хидроксилната група, далеч от екраниращото действие на въглеродородните остатъци, чрез въвеждане на спейсър от поли(етиленов оксид) (*фиг. 1.33*). Първоначално, хидроксилната група бе депротонирана чрез реакция с метален калий в THF, след което, при охлаждане под 0 °С, бе добавено предварително измерено количество течен етиленов оксид. Поради физичните особености на етиленовия оксид (Тк = 10,7 °С), реакцията бе проведена в запоеа ампула при стайна температура. В ¹H ЯМР спектъра на продукта (*фиг. 1.34*) се наблюдава поява на нови сигнали при 3,64 ppm, които съответстват на метиленовите групи на PEG, а от отношението на техния интеграл спрямо крайните метилови групи от алкановите вериги на *DHP* при 0,88 ppm, бе изчислена средната степен на полимеризация, съответстваща на 7 оксиетиленови звена. С въвеждането на този спейсър, проблемът с ниската реактивоспособност на съединението спрямо нуклеофили беше решен и азидирането на крайната хидроксилна група протече гладко. ЯМР спектри на междинните и крайния продукт са показани на *фиг. 1.34*.

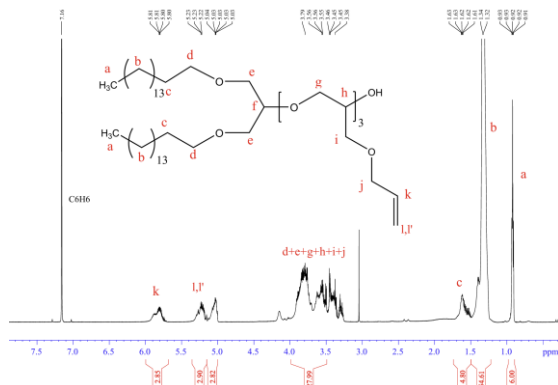


Фигура 1.33. Реакционна схема за получаване на *DHP-EO7-N3* и *DHP-AGE3*.



Фигура 1.34. ¹H ЯМР спектри на *DHP-EO7-N3* и неговите прекурсорни съединения в CDCl₃ при 600 MHz.

Получаването на алкен функционализиран *DHP* беше извършено по аналогичен начин чрез анионна полимеризация, като в случая за мономер бе използван алилглицидилов етер. Бяха въведени средно 3 мономерни звена на молекула *DHP* с цел допълнително да се увеличи ефективността на взаимодействието с тиолови групи. Това е от значение, защото в литературата са описани случаи на трудно протичане на тиол-ен *клик* реакции, когато и двата реагента са с висока молна маса [25]. В ^1H ЯМР спектъра на продукта (фиг. 1.35) ясно се виждат пиковите при 5,8, 5,23 и 5,03 ppm, съответстващи на алилова група. Интегралното им отношение спрямо метиловите групи от *DHP* при 0,92 ppm показва наличието на средно 3 мономерни звена за молекула *DHP*.



Фигура 1.35. ^1H ЯМР спектър на *DHP-AGE*₃ в C_6D_6 при 600 MHz.

2.2. Получаване на нуклеолипиди

Получаването на *DHP*-функционализирани нуклеинови киселини бе осъществено чрез *клик* реакции между на *DHP-EO*_{7-N}₃ или *DHP-AGE*₃ с подходящо функционализирани едноверижни ДНК с неспецифична секвенция на базите (Таблица 6). В зависимост от функционалните групи бяха проведени два типа *клик* реакции – азид-алкин циклоприсъединяване в отсъствие на катализатор и фотоиндуцирана тиол-ен *клик* реакция.

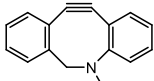
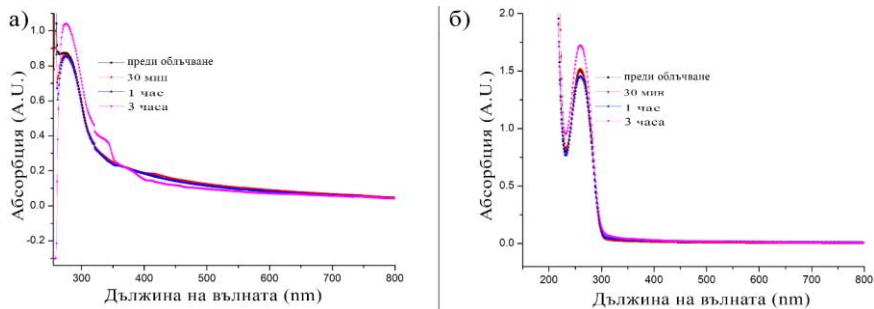
Код на олигонуклеотида	Секвенция на базите 5' → 3'	M _w (g/mol)	Функционална група за <i>клик</i> реакция
<i>ThiolC6-oligo</i>	Thiol-C6-spacer 18-ta ata cga ctc act ata gg	6670	-SH
<i>DBC0-Oligo</i>	DBC0-(EO) ₄ -spacer 18-ta ata cga ctc act ata gg	6950	

Таблица 6. Характеристики на използваните олигонуклеотиди.

2.2.1. Коногиране чрез тиол-ен *клик*

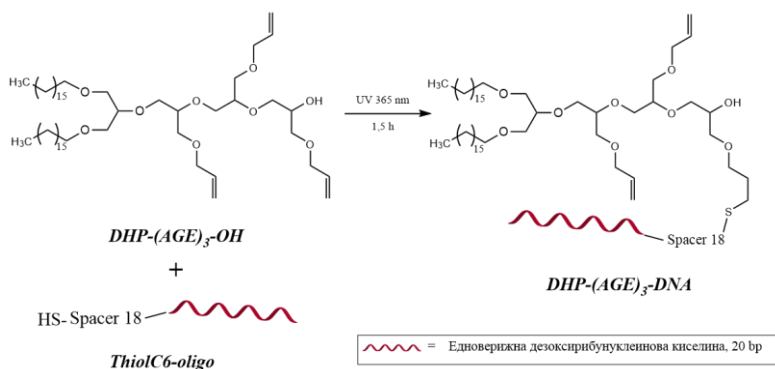
Свързването на *DHP-AGE*₃ с тиол-функционализиран олигонуклеотид бе извършено чрез УВ-индуцирана тиол-ен *клик* реакция. За да бъде осигурено пълното свързване на олигонуклеотида, реакцията бе проведена в излишък от *DHP-AGE*₃. Като източник на монохроматична УВ-светлина бе използвана специално конструирана диодна лампа с възможност за монтиране върху колба и регулация на мощността. Използваната светлина беше с дължина на вълната 365 nm, а всички фотореакции бяха проведени при 30°C.

Реакционното време и мощността на лампата бяха специално подбрани така, че да не причинят деструкция на олигонуклеотидите. Известно е, че под действието на УВ светлина с ниска дължина на вълната, в нуклеиновите киселини могат да настъпят химични изменения, най-честите сред които са образуване на тимидинови димери и фотоиндуцирано окисление [27]. С цел определяне на допустимата доза облъчване, при която не настъпват структурни изменения при олигонуклеотидите, бяха проведени контролни експерименти с „жертвен“, нефункционализиран олигонуклеотид, който бе поставен при условия, сходни на тези при реакцията и бяха проследени измененията настъпващи в УВ спектъра му с времето (*фиг. 1.36*).

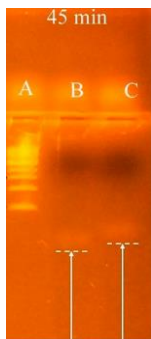


Фигура 1.36. УВ спектър на изходния жертвен олигонуклеотид и проби от него след облъчване в различни разтворители а) DMF:DMSO 1:1, б) вода.

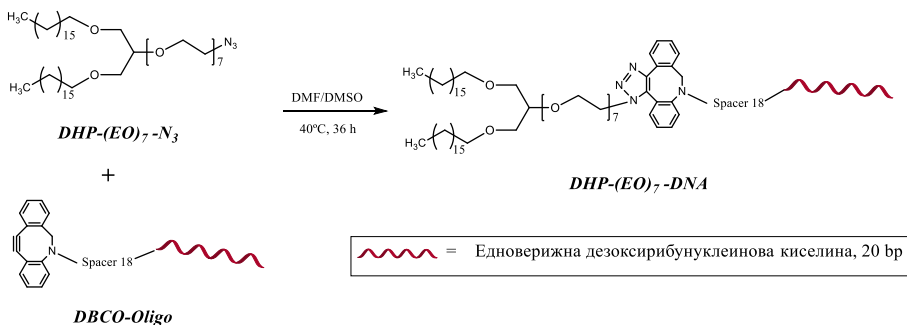
Както се вижда от *фиг. 1.36*, промяна в абсорбционния максимум, настъпва едва след третия час облъчване при мощност на лампата 4 W, което налага използването на по-кратки реакционни времена. В това отношение, фотоиндуцираните тиол-ен *клик*-реакции протичат сравнително по-бързо, като често на 10-тата минута реакциите са напълно завършени [27]. Това беше потвърдено чрез направената серия предварителни опити за *клик* на *DHP-AGE₃* с нискомолекулярния тиол цистеамин и сравним по молна маса с олигонуклеотида тиол-функционализиран PEG. С тази серия експерименти бяха прецизирани продължителността и условията за успешното провеждане фотоиндуциран тиол-ен *клик* реакцията между тиол функционализирания олигонуклеотид (*ThiolC6-oligo*) и *DHP-AGE₃* (*фиг. 1.37*).



Фигура 1.37. Схема на реакцията за получаване на *DHP-(AGE)₃-DNA* чрез тиол-ен *клик*.



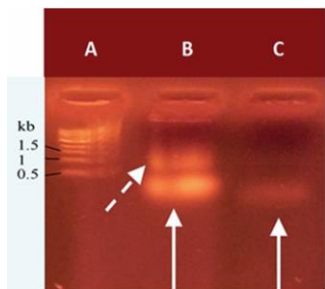
Фигура 1.38. Агарозна гел-електрофореза на олигонуклеотида преди и след конюгирането му с DHP A) Маркер B) ThiolC6-oligo C) DHP-(AGE)₃-DNA.



Фигура 1.39. Схемата на реакцията за получаване на $\text{DHP-(EO)}_7\text{-DNA}$ чрез азид-алкин *клик*.

Аналогично на предходния *клик*, успешното протичане на реакцията бе потвърдено чрез агарозна гел-електрофореза, която отново показва забавяне на конюгата в агарозния гел (**фиг. 1.40**).

Нуклеолипидите бяха използвани за получаване на липозомно-базирани СНК чрез съасоциирането им с фосфолипида 1,2-дипалмитоилфосфатидилхолин (DPPC) и холестерол (Chol) чрез хидратиране на тънък филм. След екструзия се получиха везикуларни частици, в чиято липидна мембрана нуклеолипидите се интеркалират посредством липид-миметичния си фрагмент (DHP), докато олигонуклетидните вериги се ориентират радиално към водната фаза, формирайки характерната за СНК обвивка от ДНК олигонуклеотидни вериги.



Фигура 1.40. Гел-електрофореза на олигонуклеотида преди и след конюгирането му с DHP.

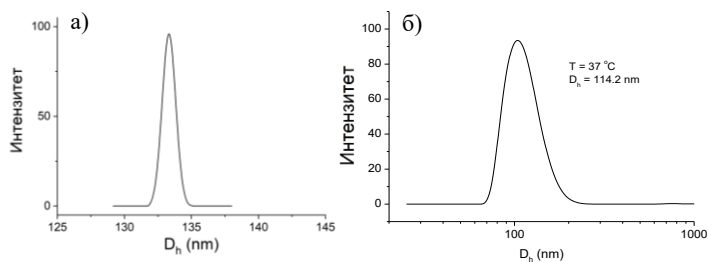
- А) Маркер
 В) *DHP-(EO)₇-DNA* (пунктираната стрелка показва фракция от асоциирани молекули)
 С) *DBCO-Oligo*

При *DHP-(EO)₇-DNA* бяха изследвани и охарактеризирани и друг вид СНК, получавани при спонтанно самоасоцииране на нуклеолипида във воден разтвор (**Таблица 7**).

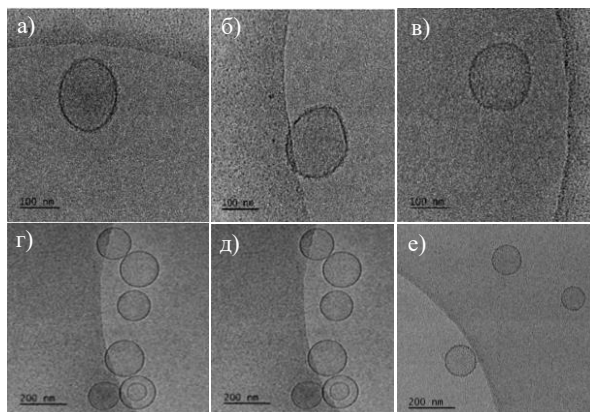
Частица	R_h (nm)	R_g (nm)	Олигонуклеотидни вериги върху 1 частица	ζ -потенциал (mV)
<i>DHP-(AGE)₃-DNA</i> (липозоми)	$57,1 \pm 2,9$	-	3880 ± 194	$-9,11 \pm 0,36$
<i>DHP-(EO)₇-DNA</i> (самоасоцианти)	115,1	$112,0 \pm 2,8$	88 000	-31,9
<i>DHP-(EO)₇-DNA</i> (липозоми)	$66,6 \pm 0,9$	$78,0 \pm 0,3$	3430 ± 92	$-17,8 \pm 0,5$

Таблица 7. Характеристики на получените СНК въз основа на данните от статично, динамично и електрофоретично светлоразсейване.

Охарактеризирането на получените СНК беше извършено чрез комбинация от статично, динамично и електрофоретично светлоразсейване, а тяхната морфология бе визуализирана чрез Cryo-TEM. Чрез динамично и статично светлоразсейване бяха определени хидродинамичните и инерционни радиуси на наноструктурите във воден разтвор, а електрофоретичното светлоразсейване предостави информация за техния ζ -потенциал (**фиг. 1.41**). Хидродинамичните радиуси на липозомните СНК бяха в диапазона 55-70 nm, докато везикуларните СНК, получени чрез самоасоциирането на *DHP-(EO)₇-DNA*, показаха значително по-голям размер, с хидродинамичен радиус около 115 nm (**Таблица 7**). И двата типа структури са със ζ -потенциал с по-голяма отрицателна стойност в сравнение с контролни липозоми, приготвени по същия протокол в отсъствие на нуклеолипида, което потвърждава



Фигура 1.41. Разпределение по размер на липозомни СНК въз основа на DLS. а) *DHP-(EO)₇-DNA*, б) *DHP-(AGE)₃-DNA*.

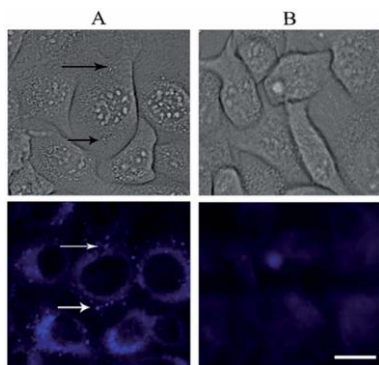


Фигура 1.42. Крио-ТЕМ изображения. а,б,в) везикули получени при самоасоциране на *DHP-(EO)₇-DNA*; г,д) липозомно базирани СНК, получени от *DHP-(EO)₇-DNA*; е) СНК, получени от *DHP-(AGE)₃-DNA*.

експонирането на олигонуклеотидната корона към водната фаза. Данните от статичното светлоразсейване, отнасящи се за молната маса на агрегатите позволиха изчисляване на броя нуклеолипиди в една частица. При самоасоцираните везикули това бе направено чрез директно отношение между молната маса на агрегата и молната маса на нуклеолипида. При липозомно-базирани СНК, повърхността на частици бе изчислена от данните за R_d от DLS, след което бе определено N_{agg} , като се приема, че площта на една молекула DPPC/нуклеолипид е $0,65 \text{ nm}^2$. Броят олигонуклеотиди бе изчислен, като се вземе предвид, че нуклеолипидите представляват два молни % от изходната смес, от която са приготвени липозомите.

Морфологията на частиците беше директно визуализирана чрез Cryo-ТЕМ, която позволи еднозначно идентифициране на униламеларни везикуларни структури и потвърди липозомната им природа (фиг. 1.42).

Биологичните свойства на получените СНК бяха оценени чрез изследване на тяхната клетъчна интернализация, устойчивост към ензимно разграждане и колоидна стабилност в биологично релевантни среди. Клетъчните експерименти, проведени с човешки епителни клетки, показаха, че



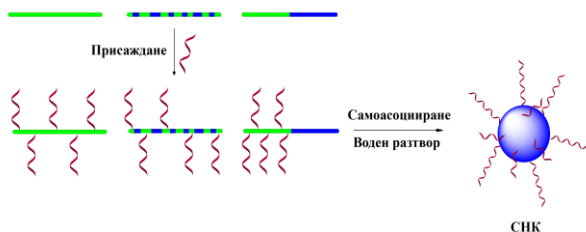
Фигура 1.43. Микроскопски изображения на A549 клетки, А) 30 min след третиране с липозоми, съдържащи *DHP-(EO)₇-DNA*; В) контрола, която не е третирана със СНК. Мащабната линия (15 nm) е приложена за всички изображения. Стрелките показват везикулите, интернализирани в клетките.

липозомно-базирани СНК се интернализират ефективно от клетките без необходимост от използване на трансфекционни агенти, което е характерно поведение при СНК архитектури. Флуоресцентната визуализация позволи директно проследяване на разпределението на наноструктурите в клетъчната среда и потвърди тяхното вътреклетъчно интернализиране (*фиг. 1.43*). Подробно описание на извършените изследвания се намира в [29,30].

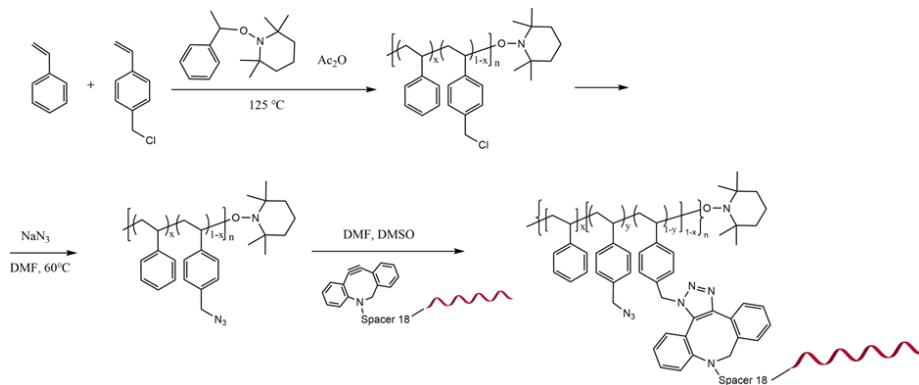
Така разработените нуклеолипиди и получените от тях липозомни СНК представляват нов клас функционални наноструктури, които комбинират свойствата на липидни и нуклеинови системи. Този подход отваря перспективи при създаването на ново поколение биосъвместими и програмируеми наноматериали с приложения в наномедицината и молекулната диагностика.

3. Получаване на линейни полистирени с присадени нуклеинови киселини

Както бе споменато в *m.2*, сферичните нуклеинови киселини са една многообещаваща платформа със значителен потенциал в генната терапия. В настоящата работа, наред с нуклеолипидите за получаване на липозомни СНК, бяха разработени и амфифилни полимер-олигонуклеотидни конюгати, способни да самоасоциират във воден разтвор, формирайки СНК с полимерно ядро. Получаването на конюгатите бе осъществено чрез присаждане на подходящо функционализирани нуклеотиди върху полистиренови съполимери с различна топология (*фиг. 1.44*).



Фигура 1.44. Обща схема на получаване на полимерите с присадени олигонуклеотиди и последващото им самоасоциациране във воден разтвор до СНК.



Фигура 1.45. Синтетична схема представяща получаването на полимер-олигонуклеотидните конюгати.

Чрез нитроксид-медирана полимеризация бяха получени три полимера, базирани на стирен и неговото производно – (4-хлорометил)стирен. Полимерите включваха хомополимер на (4-хлорометил)стирен, *PCMS*, статистически съполимер на (4-хлорометил)стирен със стирен, *P(S-стат-*

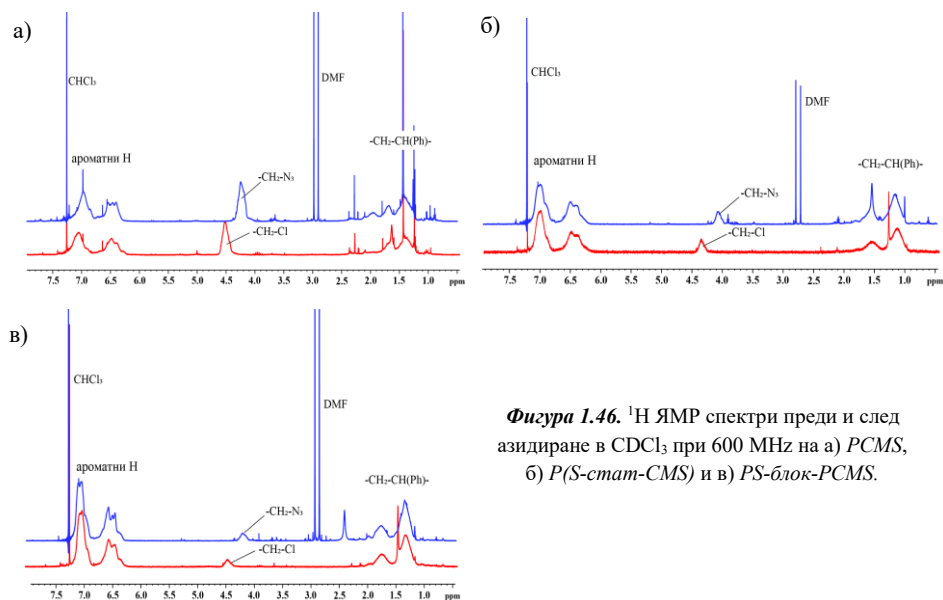
CMS) и блоков съполимер на (4-хлорометил)стирен и стирен, *PS-блок-PCMS*. В последствие, полимерите бяха функционализирани със азидо-групи чрез заместителна реакция с натриев азид, а получената функционалност беше използвана за присаждане на *DBCO*-функционализирани олигонуклеотиди (*DBCO-Oligo*) чрез азид-алкин циклоприсъединяване в отсъствие на катализатор (*фиг. 1.45*).

Полимеризациите бяха проведени при 125 °С, в запоени ампули под вакуум, като за инициатор бе използван 1-фенил-1-(2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси)етан, в присъствие на каталитично количество оцетен анхидрид в ролята на активатор. Хомополимерът, както и статистическият съполимер бяха получени чрез директно смесване на мономерите, инициатора и катализатора, последвано от провеждане на полимеризацията за няколко часа, докато блоковият съполимер бе синтезиран чрез първоначална хомополимеризация на стирен, изолиране на продукта и използването му като макроинициатор за полимеризация на (4-хлорометил)стирен.

Полимер	M_w (ГПХ) g/mol	\bar{D} (ГПХ)	wt% (PCMS)	wt% (PS)
<i>PCMS</i>	11 000	1,45	100 (72 мономерни звена)	0 (0 мономерни звена)
<i>P(S-стат- CMS)</i>	10 000	1,28	30 (20 мономерни звена)	70 (68 мономерни звена)
<i>PS-блок-PCMS</i>	16 500	1,14	11 (12 мономерни звена)	89 (142 мономерни звена)

Таблица 8. Молекулно-масови характеристики на получените полистирени.

По този начин бяха получени три полимера, съдържащи хлорни атоми в страничната си верига (*Таблица 8*). В последваща реакция, тези хлорни атоми бяха заместени с азидо групи чрез нуклеофилна заместителна реакция с натриев азид. На *фиг. 1.46* са показани ^1H ЯМР спектри на хлор- и азидфункционализираните полимери. Количественото заместване на хлорните атоми се



Фигура 1.46. ^1H ЯМР спектри преди и след азидиране в CDCl_3 при 600 MHz на а) *PCMS*, б) *P(S-стат-CMS)* и в) *PS-блок-PCMS*.

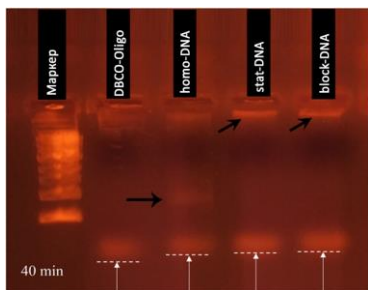
потвърждава от изместването на пика при 4,5 ppm, съответстващ на бензилова метилова група, свързана с хлорен атом към 4,2 ppm, характерен за бензилова метилова група свързана с азидна функционалност.

Проведеното функционализиране позволи присаждането на олигонуклеотидни вериги към полистиреновите полимери. За целта бяха използвани DBCO-функционализиран олигонуклеотид с неспецифична секвенция на базите. С цел прецизен контрол върху степента на присаждане и намаляване на пространственото пречене между отделните олигонуклеотидни вериги, беше присаден по един олигонуклеотид приблизително за всеки 2000 g/mol от полимерите, тоест по пет присадени олигонуклеотидни вериги на *PAMS* и *полу(AMS-стат-стирен)* и седем присадени олигонуклеотида на *PAMS-блок-PS*. Поради полифункционалността на полистиреновите вериги, азидо групите при реакцията се явяват в излишък спрямо тройните връзки, намиращи се в олигонуклеотидите. Това осигури практически количествено конюгиране на олигонуклеотидните вериги върху полимерните вериги, като средната степен на присаждане и добивите бяха изчислени чрез УВ-спектроскопия.

Получените конюгати бяха напълно водоразтворими (*фиг. 1.47*), за разлика от изходните полистирени, и тяхната маса бе значително по-висока от тази на изходните вещества, което се потвърди чрез по-голямото забавяне на тяхното движение при агарозна гел-електрофореза (*фиг. 1.48*). Доказателство за успешната реакция бе и фактът, че пречистването им се осъществи чрез диализа през 15 kDa MWCO целулозна мембрана, през която биха преминали както изходните полистирени, така и олигонуклеотидите. И в трите случая продуктите останаха в диализната торбичка с почти количествени добиви.



Фигура 1.47. Снимки от диализата на конюгатите. Разтворите са прозрачни и не се наблюдава образуване на утайки.



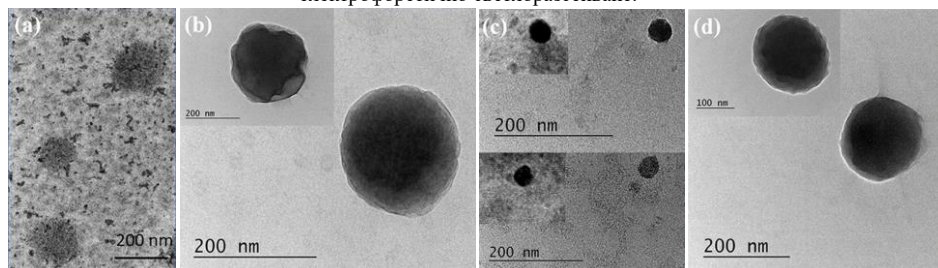
Фигура 1.48. Агарозна гел електрофореза на получените конюгати. DBCO-Oligo – изходен олигонуклеотид.
homo-DNA – $P((AMS-npuc-Oligo)-cmam-AMS)$;
stat-DNA – $P(S-cmam-(AMS-npuc-Oligo)-cmam-AMS)$;
block-DNA – $PS-блок-P((AMS-npuc-Oligo)-cmam-AMS)$.

Във воден разтвор конюгатите проявяват склонност към самоасоциране, при което формират частици, изградени от плътно полимерно ядро с корона от радиално ориентирани олигонуклеотидни вериги, което ги определя като СНК. Охарактеризирането на получените агрегати

бе осъществено чрез комбинация от статично, динамично и електрофоретично светлоразсейване (Таблица 9). Техните диаметри са в диапазона 80-100 nm като агрегационното число варира между 350 и 600 при различните конюгати. Както може да се очаква предвид морфологичните особености на СНК, и трите вида частици демонстрират отрицателен ζ -потенциал в диапазона -16 и -18 mV. Морфологията на частиците бе доказана чрез ТЕМ, който показва сферични частици с размери, съответстващи на данните, получени от светлоразсейването (фиг. 1.49).

СНК	R_g (nm)	R_h (nm)	R_g/R_h	N_{agg}	M_w (g/mol)	ζ -пот. (mV)
<i>P((AMS-<i>npuc-Oligo</i>)-<i>ctam</i>-AMS)</i>	40,6	45,5	0,89	367	$16,8 \cdot 10^6$	-17,9
<i>P(S-ctam-(AMS-<i>npuc-Oligo</i>)-<i>ctam</i>-AMS)</i>	41,1	48,1	0,85	577	$25,8 \cdot 10^6$	-16,8
<i>PS-блок-P((AMS-<i>npuc-Oligo</i>)-<i>ctam</i>-AMS)</i>	51,2	49,7	1,03	524	$37,8 \cdot 10^6$	-15,6

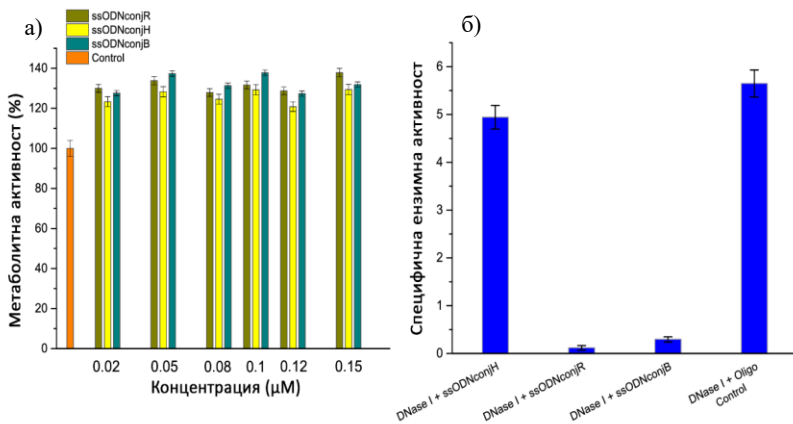
Таблица 9. Характеристики на получените СНК, определени чрез динамично, статично и електрофоретично светлоразсейване.



Фигура 1.49. ТЕМ изображения на полимер-олигонуклеотидните конюгати във воден разтвор. а) и б) *P((AMS-*npuc-Oligo*)-*ctam*-AMS)*, в) *P(S-ctam-(AMS-*npuc-Oligo*)-*ctam*-AMS)*, д) *PS-блок-P((AMS-*npuc-Oligo*)-*ctam*-AMS)*

Биологичните свойства на получените СНК бяха тествани върху клетъчни линии A549. При всички тествани концентрации, частиците не проявяват цитотоксичен ефект. И при трите вида СНК се наблюдава увеличаване на базовата метаболитна активност на клетките, което показва наличие на клетъчен отговор спрямо въведените структури. Наблюдава се ефективно проникване през плазмената мембрана, 30 мин след третирането на клетките със СНК, в отсъствие на катионен трансфектиращ агент. Освен това два от трите вида СНК демонстрират и значително повишена устойчивост спрямо ензимно разграждане от ДНази (фиг. 1.50 и 1.51). Детайлно описание на резултатите от изследванията се съдържат в [30].

Получените резултати демонстрират нов подход за изграждане на триизмерни наноструктури, носещи нуклеинови киселини чрез самоасоцииране на полимер-олигонуклеотидни конюгати. Установените зависимости между молекулната архитектура, плътността на олигонуклеотидните вериги и свойствата на получените агрегати създават основа за проектиране на нови СНК-подобни системи с потенциални биомедицински приложения.

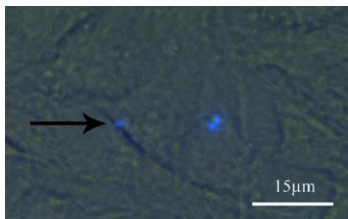


Фигура 1.50. а) Метаболитна активност на клетки от линията A549 6 h след инкубиране със CHK. Стойностите са сравнени с контролни клетки (Control), които са нетретирани. б) Специфична ензимна активност на ДНаса спрямо агрегатите на трите олигонуклеотидни конюгата. DNase + Oligo е контролен тест спрямо изходния DBCO-Oligo.

ssODNconjH - *P((AMS-npuc-Oligo)-ctam-AMS)*;

ssODNconjR - *P(S-ctam-(AMS-npuc-Oligo)-ctam-AMS)*;

ssODNconjB - *PS-блок-P((AMS-npuc-Oligo)-ctam-AMS)*.



Фигура 1.51. Клетки от линията A549, 30 min след третиране с *P((AMS-npuc-Oligo)-ctam-AMS)*, наблюдавани под флуоресцентна светлина.

Интернализираните частици са показани със стрелка.

4. Получаване на линейни и звездовидни съполимери на полиглицидол (PG) и поли(ε-капролактон) (PCL)

Едно от най-важните биомедицински приложения на полимерите е свързано с разработването на наносители на лекарствени вещества. На пазара вече се предлагат някои фармацевтични препарати, при които активното вещество е енкапсулирано в хидрофобното мицелно ядро, а още значителен брой към момента са в последен етап на клинични изпитания.

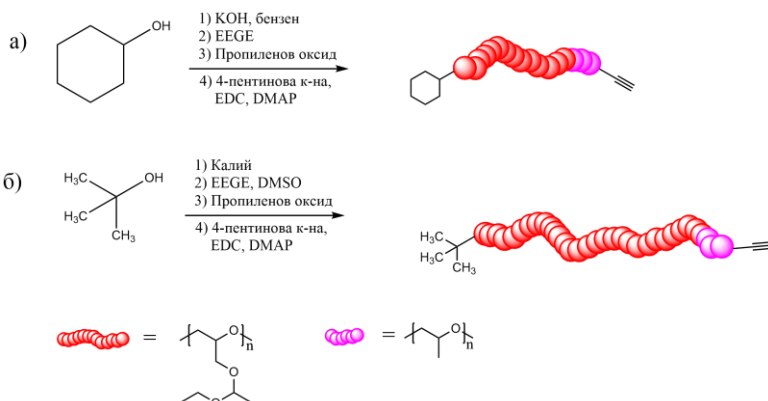
Важно условие при проектирането на мицелни наносители е полимерните материали, от които са изградени, да бъдат биосъвместими и/или биоразградими. Към момента основните полимери, стигнали до пазара и изпълняващи тази роля са PEG и PLA. Въпреки това, огромен брой други полимери показват подобни или дори по-добри свойства да солибилизируют хидрофобни вещества съпроводени с намалена токсичност, по-ниска имуногенност и подобрена стабилност.

Един от полимерите, чийто свойства са разглеждани в много изследвания като алтернатива на PEG е PG. Сходен по свойства, природа и начин на получаване на PLA е PCL, който също като PLA

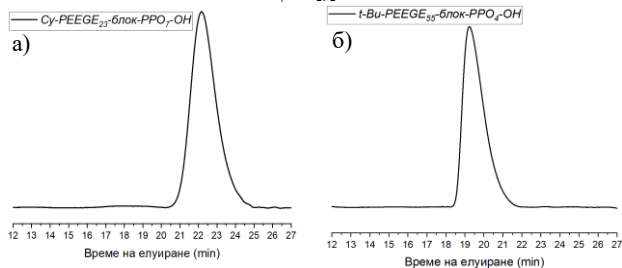
е биоразградим полиестер. С цел да бъдат изследвани възможностите на тези два полимера за получаване на мицелни наноносители, бяха синтезирани серия от техни съполимери с различна топология, състав и молни маси. Синтезите бяха базирани на схема от конвергентен тип, при който двата блока се изготвят и функционализират отделно един от друг и едва накрая се свързват помежду си, поради нестабилността на *PCL* в условията на анионна полимеризация.

4.1. Получаване на алкин-функционализирани поли(етоксипетилглицидилови) етери (PEEGE)

За синтеза на полиглицидоловия блок от съполимерите бе използвана „жива“ анионна полимеризация на неговия защитен аналог – етоксипетилглицидилов етер. Бяха получени два полимера с молна маса съответно 3000 и 8000 g/mol. За синтеза на по-нискомолекулярния полимер като инициатор бе използвана калиева сол на циклохексанол, а реакцията бе проведена в маса. Калиев трет-бутоксид бе използван като катализатор за получаване на по-високомолекулярния полимер, а полимеризацията проведена в разтворител DMSO. И в двата случая след изчерпване на мономера, в края на полимерната верига бе въведен къс спейсър от *PPO*, чрез добавяне на пропилен оксид преди завършване на полимеризацията. Общи синтетични схеми на проведените реакции са представени на **фиг. 1.52**. Получените полимери бяха охарактеризирани чрез ГПХ (**фиг. 1.53**), ИЧ и ¹H ЯМР спектроскопия.



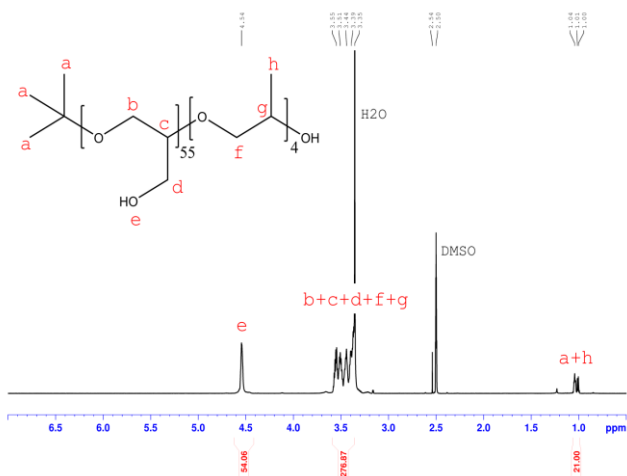
Фигура 1.52. Схематично представяне на получаването и функционализирането на алкин-завършен PEEGE. (а) *Cy*-PEEGE₂₃-блок-*PPO*₇-OOC(CH₂)₂C≡CH; (б) *t*-Bu-PEEGE₅₅-блок-*PPO*₄-OOC(CH₂)₂C≡CH



Фигура 1.53. Гелово-проникващи хроматограми на *Cy*-PEEGE₂₃-блок-*PPO*₇-OH (а) и *t*-Bu-PEEGE₅₅-блок-*PPO*₄-OH (б).

Степента на полимеризация (**Таблица 10**) бе определена чрез ^1H ЯМР след освобождаване на защитните групи на малко количество от полимерите (**фиг. 1.54**).

В последствие двата полимера бяха функционализирани чрез естерификация с 4-пентинова киселина с цел въвеждане на тройна връзка в края на полимерната верига. Реакцията бе осъществена в хлороформ, като за кондензационен агент бе използвана системата EDC/DMAP. И в този случай наличието на спейсър от PPO играе ключова роля, защото, в случай на неговата липса, споменатата естерификация не протича напълно [4]. Получените полимери бяха с напълно естерифицирани крайни групи, определено чрез интегралното отношение на пиковите при 2,5 и 2,3 ppm, съответстващи на протоните от 4-пентиновата киселина, и тези при 4,65 ppm, съответстващи на метиновите протони от PEEGE в ^1H ЯМР спектъра (**вжс. 1.2.1.**).



Фигура 1.54. ^1H ЯМР спектър на *t*-Bu-PG₅₅-блок-PPO₄-OH. След премахване на защитните групи, степента на полимеризация бе определена чрез интегралното отношение на сигналите от метиловите протони (1,01 ppm) към това на останалите протони от полимерната верига.

Полимер	Степен на полимеризация на PEEGE (ЯМР)	M_n (ЯМР) (g/mol)	M_n (ГПХ) (g/mol)	M_w (ГПХ) (g/mol)	\bar{D}
<i>Су</i> -PEEGE ₂₃ -блок-PPO ₇ -OOC(CH ₂) ₂ C≡CH	23	4880	2670	2980	1,12
<i>t</i> -Bu-PEEGE ₅₅ -блок-PPO ₄ -OOC(CH ₂) ₂ C≡CH	55	8430	6470	7750	1,20

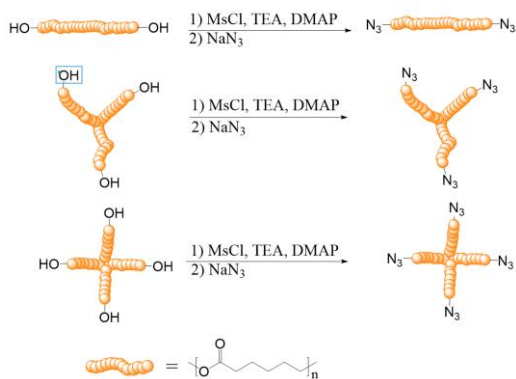
Таблица 10. Молекулно-масови характеристики на *Су*-PEEGE₂₃-блок-PPO₇-OH и *t*-Bu-PEEGE₅₅-блок-PPO₄-OH.

4.2. Получаване на линейни и звездовидни азид-функционализирани поли(ε-капролактон)и

За изграждането на хидрофобния блок на съполимерите бяха получени азид-функционализирани PCL с линейна и звездовидна архитектура. С оглед на постсинтетичните

изследвания, свързани с поведението на съполимерите във воден разтвор, бе необходимо използването на *PCL* да бъдат с еднаква молна маса (2000 g/mol). Бяха използвани хидрокси-функционализирани би- (*HO-PCL₁₆-OH*), три- (*3-звезда-PCL₆-OH*) и тетрафункционални полимери (*4-звезда-PCL₄-OH*). Първите два представляват търговски продукти (САРА2225 и САРА3201, съответно), докато *4-звезда-PCL₄-OH* бе получен чрез удължаване на веригите на *4-звезда-PCL₂-OH*, (САРА4101). Полимеризацията бе проведена в маса, в присъствието на калаен (II) октоат. ГПХ анализът показва ясно намаляване на времето на елуиране, доказващо увеличението в хидродинамичния размер на полимера, съответно и на неговата молна маса, а степента на полимеризация бе изчислена чрез ¹H ЯМР спектроскопия по интегралното отношение между метиленовите групи от инициатора (4,10 ppm) и тези на протоните от мономерните звена (**Таблица 11, фиг. 1.57** по-долу).

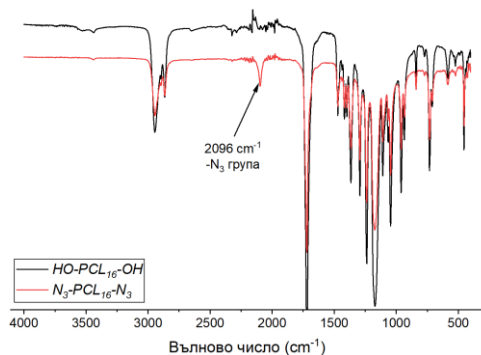
Превръщането на крайните хидроксилни групи на *PCL* в азидни бе извършено в два етапа, които се състояха в активирането им чрез естерификация с мезил хлорид и последващо заместване на мезилатните групи чрез реакция с натриев азид. Обща схема на описаните превръщания е представена на **фиг. 1.55**. Пълно охарактеризиране на междинните и крайни продукти бе осъществено чрез ИЧ и ¹H ЯМР спектроскопия (**фиг. 1.56, 1.57**).



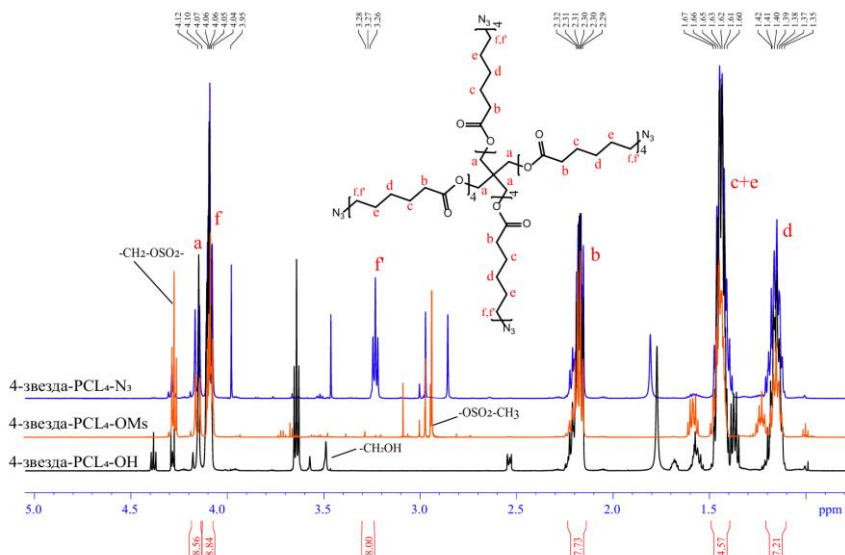
Фигура 1.55. Схематично представяне на азид функционализирането на линейни и звездовидни -OH функционализирани *PCL*.

Полимер	Степен на полимеризация (ЯМР)	M _n (ЯМР) (g/mol)	M _n (ГПХ) (g/mol)	M _w (ГПХ) (g/mol)	Đ
<i>N₃-PCL₁₆-N₃</i>	16	1980	3380	4370	1,29
<i>3-звезда-PCL₆-N₃</i>	18	2260	1760	1950	1,11
<i>4-звезда-PCL₄-N₃</i>	16	2060	1730	1870	1,08

Таблица 11. Молекулно-масови характеристики на линейен и звездовидни азид-функционализирани *PCL*.



Фигура 1.56. ИЧ спектри на $HO-PCL_{16}-OH$ и $N_3-PCL_{16}-N_3$.

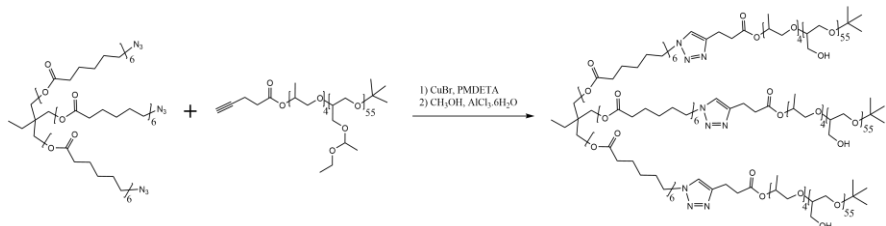


Фигура 1.57. 1H ЯМР спектри на 4-звезда- PCL_4-N_3 и неговите прекурсори 4-звезда- PCL_4-OH и 4-звезда- PCL_4-OMs в $CDCl_3$ при 600 MHz. Посочените интегрални отношения се отнасят за 4-звезда- PCL_4-N_3 .

4.3. Получаване на блокови съполимери $PCL-PG$ с различна архитектура

Получаването на блокови съполимери на PCL с $PEEGE$ с различна архитектура бе извършено чрез медно катализирана азид-алкин *клик* реакция между терминалната тройната връзка на $PEEGE$ и азидо-групите в краищата на PCL . Реакциите бяха катализирани от меден (I) бромид, координиран с PMDETA (фиг. 1.58). След изтичане на реакционните времена, катализаторът бе премахнат чрез колонна хроматография с неутрален алуминиев оксид като стационарна фаза и THF в ролята на елуент. Допълнително пречистване на нереагирани полимерни вериги бе извършено чрез

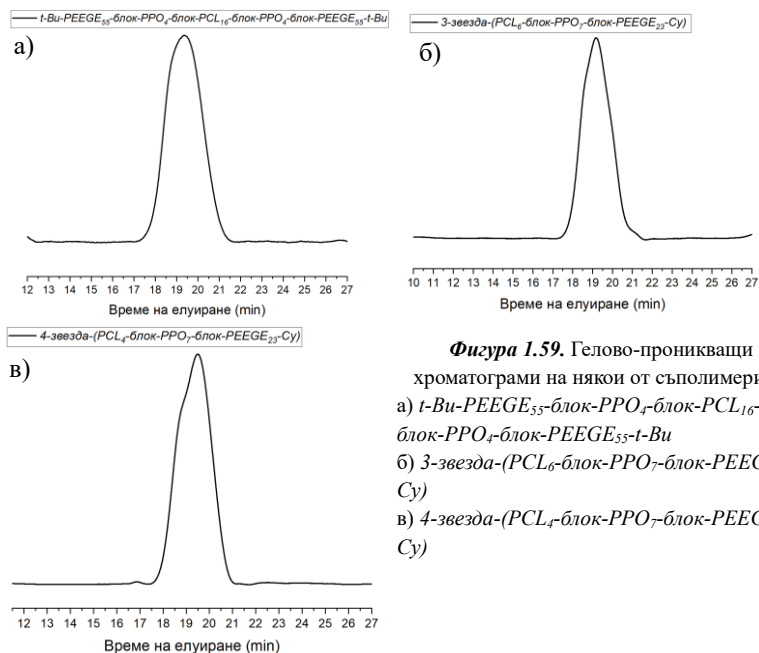
диализа в смес метанол:вода 9:1. Продуктите бяха охарактеризирани чрез ГПХ и ^1H ЯМР спектроскопия. Доказателство за успешно проведените реакции беше значителното намаляване на времето за елуиране в ГПХ, спрямо това на прекурсорните съединения (**фиг. 1.59**), както и появата на пик при 7,6 ppm в протонния спектър, съответстващ на триазолен пръстен. (**фиг. 1.60, 1.61**).



Фигура 1.58. Реакционна схема за получаването на 3-звезда-(PCL₆-блок-PPO₇-блок-PG₅₅-*t*-Bu)

В последния етап от синтезите, защитните етоксипетилни групи бяха премахнати, чрез реакция с метанол, в присъствие на каталитично количество AlCl₃·6H₂O (**вж. 1.3.1.**). За пълното сваляне на защитните групи свидетелства силното намаляване на интегралното отношение на пиковите в областта 1,10-1,30 ppm в ^1H ЯМР спектъра, което съответства на метиловите протони от етоксипетилната група (**фиг. 1.61**). В **Таблица 13** са обобщени молекулно-масовите характеристики и архитектурата на получените съполимери.

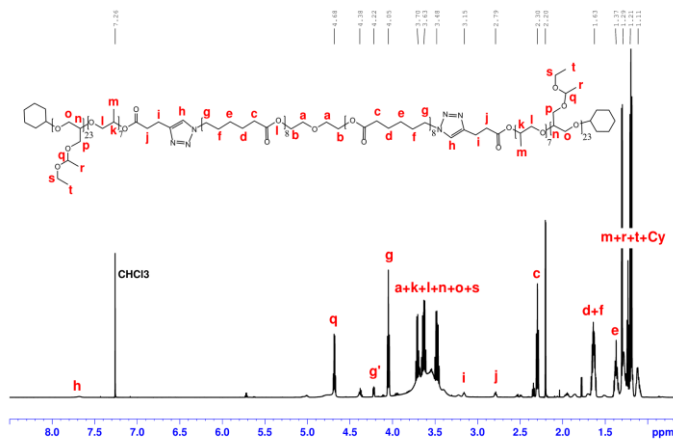
Предвид хидрофилния характер на PG и хидрофобната природа на PCL, получените блокови съполимери проявяват ясно изразени амфибилни свойства. В съчетание с добрата



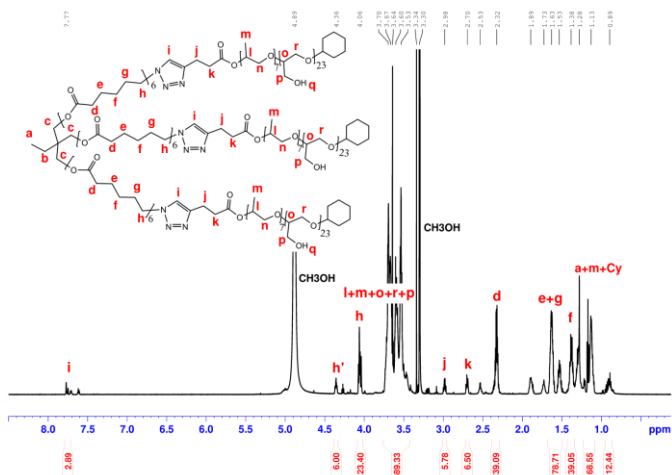
Фигура 1.59. Гелово-проникващи хроматограми на някои от съполимерите.

- а) *t*-Bu-PEEGE₅₅-блок-PPO₇-блок-PCL₁₆-блок-PPO₇-блок-PEEGE₅₅-*t*-Bu
- б) 3-звезда-(PCL₆-блок-PPO₇-блок-PEEGE₂₃-Cy)
- в) 4-звезда-(PCL₄-блок-PPO₇-блок-PEEGE₂₃-Cy)

биосъвместимост на съставлящите ги полимерни блокове, получените продукти предоставят възможност за приложение при разработването на наносители на лекарствени и биологично активни вещества. Различната архитектура и отношение хидрофилен/хидрофобен блок на съполимерите позволяват детайлно изследване на поведението на този тип съполимери в зависимост от техния състав и топология. Едно от вече изследваните приложения на част от тези полимери бе тяхната възможност за модификация на ниозомни мембрани [31].



Фигура 1.60. ^1H ЯМР спектър на Cu-PEEGE_{23} -блок- PPO_7 -блок- PCL_{16} -блок- PPO_7 -блок- PEEGE_{23} - Cu в CDCl_3 при 600 MHz.



Фигура 1.61. ^1H ЯМР спектър на 3-звезда- $(\text{PCL}_6\text{-блок- PPO}_7\text{-блок-PG}_{23}\text{-Cu})$ в CDCl_3 при 600 MHz.



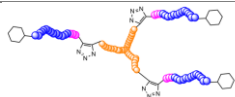
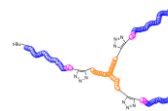
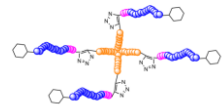
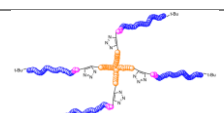
№	Полимер	$M_{n(\text{ЯМР})}$	f_A/f_B	Архитектура
1	<i>Су-PG_{23}-блок-PPO_7-блок-PCL_{16}-блок-PPO_7-блок-PG_{23}-$Су$</i>	6 160	1,21	
2	<i>t-Bu-PG_{55}-блок-PPO_4-блок-PCL_{16}-блок-PPO_4-блок-PG_{55}-$t-Bu$</i>	10 560	3,30	
3	<i>3-звезда-(PCL_6-блок-PPO_7-блок-PG_{23}-$Су$)</i>	8 240	1,59	
4	<i>3-звезда-(PCL_6-блок-PPO_4-блок-PG_{55}-$t-Bu$)</i>	14 910	4,53	
5	<i>4-звезда-(PCL_4-блок-PPO_7-блок-PG_{23}-$Су$)</i>	10 320	1,88	
6	<i>4-звезда-(PCL_4-блок-PPO_4-блок-PG_{55}-$t-Bu$)</i>	19 140	5,56	

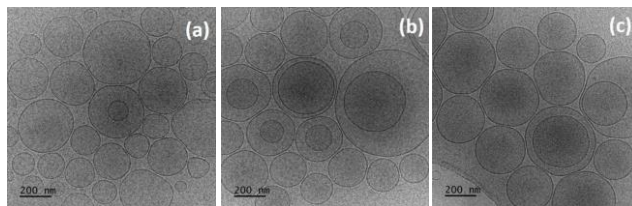
Таблица 12. Молекулно масови характеристики и архитектура на получените съполимери. $M_{n(\text{ЯМР})}$ – средна бройна молна маса определена чрез ^1H ЯМР, f_A/f_B – отношение на хидрофилната към хидрофобната масова част на полимерите.

Ниозомите представляват везикуларни наноструктури, с двуслойна мембрана, изградена от не-йонни повърхностноактивни вещества, обикновено в комбинация с холестерол. Те могат да енкапсулират както хидрофилни, така и липофилни вещества и намират приложение като носители за контролирано доставяне на лекарства, гени и биологично активни молекули. За модификация на ниозомните мембрани бяха избрани трите съполимера с по-къси полиглицидолови блокове (номера 1,3,5 от **Таблица 13**) поради по-ниската им склонност към самоасоципате в условията на формиране на ниозомите, както и по-ефективното им интеркалиране в ниозомните мембрани. Получаването на ниозомите бе осъществено по метода на хидратиране на тънък филм, формиран от сърфактантите и съответния полимер.

Получените модифицирани ниозоми се характеризират с по-голям хидродинамичен радиус спрямо контролните немодифицирани системи. Причината за това може да бъде обяснена с ригидната структура на *PCL*, и увеличаване на кривината на мембраната, съответно водейки до по-голям диаметър на частицата. Интактността на мембраната, както и везикуларната морфология на ниозомите бяха потвърдени чрез *Суо*-ТЕМ (**фиг. 1.62**). Наблюдаваните частици са предимно униламеларни като бе установена и малка фракция диламеларни везикули. Не са наблюдавани открити отвори или структурни дефекти в мембраните, което е важно условие за използването на частиците за контролирано доставяне на лекарствени вещества.

Бяха изследвани възможностите за натоварване и профилите на освобождаване на хидрофобни вещества от ниозомите, като за моделно съединение бе използван канабидиол (CBD) [32]. Профилите на освобождаването му от ниозоми модифицирани с полимер **3** (**Таблица 12**) са

представени на **фиг. 1.63**. Наблюдавано е отчетливо забавяне на освобождаването на CBD при модифицираните ниозоми, което демонстрира възможността за промяна на фармакокинетичния профил на системите чрез инкорпориране на получените съполимери в мембраната.

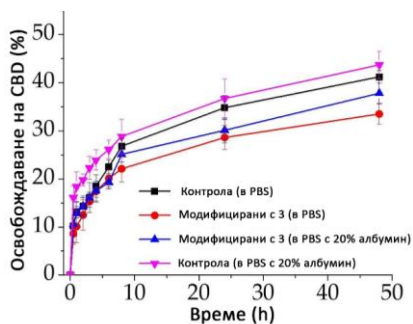


Фигура 1.62. Сгую-ТЕМ изображения на (а) немодифицирани ниозоми (b) ниозоми, модифицирани с 3-звезда-(PCL_6 -блок- PPO_7 -блок- PG_{23} -Cu) и (c) ниозоми, модифицирани с 4-звезда-(PCL_4 -блок- PPO_7 -блок- PG_{23} -Cu).

Стабилността на получените везикуларни системи в рамките на един месец бе изследвана чрез проследяване на промените в размера, полидисперсност и ζ -потенциала (**Таблица 13**). Сравнение с контролната група, модифицираните ниозоми показаха по-висока колоидна стабилност, което може да се свърже с инкорпорираните в мембраната съполимери.

Проба	Време	D_h (nm)	PDI	ζ -пот. (mV)
Контрола (немодифицирани ниозоми)	0 h	150±1,1	0,35±0,07	-10,3±1,6
	След 1 месец	132±2,8	0,41±0,09	-10,6±21
Ниозоми, модифицирани с 3-звезда-(PCL_6 -блок- PPO_7 -блок- PG_{23} -Cu)	0 h	235±5,6	0,36±0,02	-11,1±1,7
	След 1 месец	228±2,2	0,39±0,05	-11,8±1,2

Таблица 13. Стабилност на немодифицирани ниозоми и такива модифицирани с полимер 3 (3-звезда-(PCL_6 -блок- PPO_7 -блок- PG_{23} -Cu) след 1 месец.



Фигура 1.63. Профили на освобождаване на CBD от немодифицирани ниозоми и такива модифицирани с полимер 3 (3-звезда-(PCL_6 -блок- PPO_7 -блок- PG_{23} -Cu)) при различни условия.

Така получените резултати ясно демонстрират, че амфифилни блокови съполимери PCL - PG позволяват целенасочено регулиране на ключови параметри на наноструктурните системи — размер, колоидна стабилност и профил на освобождаване на енкапсулираните хидрофобни вещества. Комбинацията от структурна стабилност, запазена мембранна интактност и модифицируема фармакокинетика позиционира полимер-модифицираните ниозоми като перспективна платформа за разработване на интелигентни наносистеми с регулируеми свойства, подходящи за приложения в насоченото доставяне, контролирано освобождаване и персонализирани терапевтични системи.

ОБОБЩЕНИЕ И ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати могат да бъдат формулирани следните изводи:

1. Разработена е нова синтетична стратегия за получаване на полимер-липидни конюгати, базирана на получаване на алкин/азид монофункционализирани линейни полимери и алкин/азид функционализиран липиден аналог – *DHP*, с последващото им свързване чрез азид-алкин *клик* химия. **Полученият подход разширява приложенията на *клик* химичните реакции и позволява получаването на добре дефинирани хибридни амфифилни системи, подходящи за повърхностна модификация на биологични мембрани.**
2. Установени са два надеждни синтетични подхода за получаване на нов тип нуклеолипиди, базирани на високоефективни *клик* химични реакции за ковалентно свързване на олигонуклеотидни фрагменти с липидни аналози. Получените амфифилни молекули представляват **ефективна платформа за конструиране на СНК** както чрез самоасоцииране, така и в комбинация с фосфолипиди, което разширява възможностите за получаване на нови типове СНК.
3. Получените амфифилни молекули **показаха потенциал като ефективна платформа за конструиране на СНК** както чрез самоасоцииране, така и в комбинация с фосфолипиди, което разширява възможностите за получаване на нови типове СНК.
4. Разработена е синтетична стратегия за получаване на полистиренови полимери с ковалентно присадени олигонуклеотидни вериги, базирана на контролирани полимеризационни техники и последваща високоефективна функционализация чрез *клик* химия. Получените хибридни полимер-олигонуклеотидни конюгати **позволяват формиране на СНК с полимерно ядро, които се характеризират с добре дефинирана структура и контролируема архитектура**, което определя потенциала им за приложение в генната трансфекция и биомедицинските нанотехнологии.
5. Получени са линейни и звездовидни съполимери на полиглицидол-поли(ϵ -капролактон) с различен състав, молекулна маса и топология, чрез комбиниране на контролирани полимеризационни техники и *клик* химия. Системите демонстрират високо структурно разнообразие и представляват **перспективни платформи за създаване на наносителни системи за доставка на биологично активни вещества и лекарствени молекули**. Разработената синтетична стратегия позволява целенасочено получаване на блокови съполимери *PG-PCL* с различни архитектури и контролируеми свойства.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Разработени са оригинални синтетични стратегии** за получаване на биосъвместими и/или биоразградими макромолекули чрез комбиниране на анионна, катионна и контролирана радикалова полимеризации, позволяващи прецизен контрол върху молекулната маса, архитектурата и функционалността на полимерите.
2. **Синтезиран е нов фосфолипидомиметиращ вторичен алкохол (*DHP*)** и са разработени подходи за неговата ефективна функционализация и последващо конюгиране с полимери и нуклеинови киселини.
3. **Разработени са ефективни методи за конюгиране чрез *клик* реакции** (азид–алкин и тиол–ен) в условия без катализатор, приложими за получаване на полимер–нуклеинова киселина и липид–нуклеинова киселина конюгати.
4. **Получени са нов клас нуклеолипиди и полимер-олигонуклеотидни конюгати**, способни да формират супрамолекулни структури тип сферични нуклеинови киселини (СНК) с различна архитектура (липозомни и полимерни ядра).
5. **Синтезирани са амфифилни блокови съполимери (*PG-PCL* с линейни и звездовидни архитектури)** с контролируем състав, молекулна маса и топология.
6. **Установена е връзка между молекулната архитектура и физикохимичните свойства** (самоасоцииране, стабилност, морфология) на получените системи, позволяваща целенасочено регулиране на техните характеристики.
7. **Демонстрирана е възможност за фино настройване на функционалните свойства** (вкл. профили на освобождаване и колоидна стабилност) чрез молекулен дизайн и структурна модификация.
8. **Показан е потенциалът на разработените системи за приложение като наносители** за доставка на нуклеинови киселини, химиотерапевтици и биологично активни вещества.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ И НА НАУЧНИТЕ СЪОБЩЕНИЯ НА ДОКТОРАНТА

Списък на научните съобщения, включени в дисертационния труд

1. Dimitrov, E.; Toncheva-Moncheva, N.; Bakardzhiev, P.; Forsys, A.; Doumanov, J.; Mladenova, K.; Petrova, S.; Trzebicka, B.; Rangelov, S. *Nucleic Acid-Based Supramolecular Structures: Vesicular Spherical Nucleic Acids from a Non-Phospholipid Nucleolipid*. **Nanoscale Advances** 2022, 4, 3793–3803, JIF 4.7, Q1, DOI: 10.1039/d2na00527a
2. Dimitrov, E.; Toncheva-Moncheva, N.; Bakardzhiev, P.; Forsys, A.; Doumanov, J.; Mladenova, K.; Petrova, S.; Trzebicka, B.; Rangelov, S. *Original Synthesis of a Nucleolipid for Preparation of Vesicular Spherical Nucleic Acids*. **Nanomaterials** 2022, 12, 3645, JIF 5.3, Q1, <https://doi.org/10.3390/nano12203645>
3. Dimitrov, E.; Toncheva-Moncheva, N.; Doumanov, J. A.; Mladenova, K.; Petrova, S.; Pispas, S.; Rangelov, S. *Three-Dimensional Nucleic Acid Nanostructures Based on Self-Assembled Polymer–Oligonucleotide Conjugates of Comblike and Coil-Comb Chain Architectures*. **Biomacromolecules** 2023, 24 (5), 2213–2224. JIF 5.5, Q1, <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00126>
4. Gugleva, V.; Ahchiyska, K.; Georgieva, D.; Mihaylova, R.; Konstantinov, S.; Dimitrov, E.; Toncheva-Moncheva, N.; Rangelov, S.; Forsys, A.; Trzebicka, B.; Momekova, D. *Development, Characterization and Pharmacological Evaluation of Cannabidiol-Loaded Long Circulating Niosomes*. **Pharmaceutics** 2023, 15, 2414, JIF 4.9, Q1, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102414>
5. Dimitrov, E.; Aleksandrov, K.; Toncheva-Moncheva, N.; Shestakova, P.; Forsys, A.; Trzebicka, B.; Rangelov, S. *Self-Assembly and Structural Polymorphism of Polymer–Lipid Mimetics Prepared by Azide–Alkyne Cycloaddition*. **Macromolecules** 2026, ASAP, JIF 5.2, Q1, <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5c02775>

НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ

1. XVI научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, София Тех Парк, гр. София, 04.03.2025 г.
Water-Soluble Polyglycidol-Grafted Ladder Calix Resorcinarene Oligomers with Open Chain and Cyclic Topologies: Synthesis and Characterization, **постер**
Ерик Димитров, Христо Пенчев, Христо Новakov, Еми Халаджова, Сибела Долева, Станислав Рангелов
2. Международна научна конференция „Silesian Meetings on Polymer Materials“ POLYMAT 2025, Zabrze, Poland, 29.05.2025 г.
Design and synthesis of novel polymer-lipid conjugates with potential applications in drug delivery
Ерик Димитров, Крум Александров, Наталия Тончева-Мончева, Павлетта Шестакова, Станислав Рангелов
3. XV научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, Институт по полимери-БАН, гр. София, 06.06.2024 г.
Синтез на съполимери на поли(2-изопропил-2-оксазолин) и полиетиленимин с потенциални приложения за генна терапия, доклад, награда за най-добър доклад
Ерик Димитров, Сибела Долева, Наталия Тончева-Мончева, Станислав Рангелов
4. Годишна научна сесия, посветена на 155 години Българска академия на науките, Институт по органична химия с център по фитохимия, гр. София, 24-25.04.2024 г.
Preparation of polymer amphiphiles for surface modification of niosomes, **постер, награда за най-добър постер**

- Erik Dimitrov, Krum Alexandrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavleta Shestakova, Denitsa Momekova, Stanislav Rangelov**
5. XXI научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти в ХТМУ в секция „Химични технологии“, ХТМУ, гр. София, 20.07.2024 г.
Synthesis of Amphiphilic Polymers for Surface Modification of Niosomes, **постер**
Erik Dimitrov, Krum Alexandrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavleta Shestakova, Denitsa Momekova, Stanislav Rangelov
6. XIII научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, Институт по полимери-БАН, гр. София, 02.07.2022 г.
Synthesis of polymer nonphospholipid conjugates for surface modification of niosomes, **доклад, награда за най-добър доклад**
Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Rumena Stancheva, Denitsa Momekova, Aleksander Forys, Barbara Trzebicka, Stanislav Rangelov
Non-phospholipid conjugate of poly(2-isopropyl-2-oxazoline) for design of surfactant vesicles, **постер**
Enis Hasan, Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Stanislav Rangelov
7. Международна научна конференция „Silesian Meetings on Polymer Materials” POLYMAT 2022, Zabrze, Poland, 17.03.2022 г.
Nucleolipid Vesicles: Supramolecular Structures Resembling Spherical Nucleic Acids **постер, награда за най-добър постер**
Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Aleksander Forys, Jordan Dumanov, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Barbara Trzebicka, Stanislav Rangelov
Novel amphiphilic polyglycidol/poly(ϵ -caprolactone) and polyglycidol/poly(α -cinnamyl- ϵ -caprolactone) copolymers as highly effective nanocarriers, **постер**
Natalia Toncheva-Moncheva, Erik Dimitrov, Denitsa Momekova, Petar Petrov, Georgi Grancharov, Stanislav Rangelov
Synthesis of novel polycaprolactone/polyglycidol based block and star copolymers for development niosomes, **постер**
Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Rumena Stancheva, Denitsa Momekova, Aleksander Forys, Barbara Trzebicka, Stanislav Rangelov
8. XX национален симпозиум POLYMERS 2022, Велинград, България, 05-08.07.2022 г.
Preparation of polymer amphiphiles for surface modification of niosomes, **постер, награда за най-добър постер**
Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Rumena Stancheva, Denitsa Momekova, Aleksander Forys, Barbara Trzebicka, Stanislav Rangelov
9. Трета научна конференция „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина БиоАктивМед“, Кюстендил, 13-15.06.2022 г.
Нови амфифилни съполимери на основата на полиглицидол/поли(ϵ -капролактон) и полиглицидол/поли(α -цианамил- ϵ -капролактон) за получаване на високоефективни наноносители на лекарствени вещества, **доклад**
Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Denitsa Momekova, Stanislav Rangelov, Petar Petrov, Georgi Grancharov
10. Научна конференция ИНФРАМАТ 2022, хотел Империял, гр. Пловдив, 12-14.09.2022 г.
Development of polymer amphiphiles for surface modification of niosomes, **постер**
Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Rumena Stancheva, Denitsa Momekova, Aleksander Forys, Barbara Trzebicka, Stanislav Rangelov

11. XVIII научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти в ХТМУ в секция „Химични технологии“, ХТМУ, гр. София, 25.06.2021 г.
Initiator-free conjugation of oligonucleotides via UV light-induced thiol-ene click reaction for liposomal spherical nucleic acid preparation, **постер, награда за най-добър постер в секция „Химични технологии“**
E. Dimitrov, N. Toncheva-Moncheva, P. Bakardzhiev, K. Mladenova, Jordan Doumanov, Stanislav Rangelov
Синтез на нови поликапролактон/полиглицидол блокови и звездовидни съполимери за разработване на наноразмерни лекарствени носители – ниозоми, **постер**
Д. Йорданова, Е. Димитров, Н. Тончева-Мончева, С. Рангелов
12. Трета младежка научна конференция „Biomedicine and Quality of Life 2021“, проведена онлайн, 02-03.12.2021 г.
Synthesis and characterization of liposomal spherical nucleic acids via incorporation of a nucleolipids synthesized by different approaches, **доклад, награда за най-добър доклад**
E. Dimitrov, N. Toncheva-Moncheva, P. Bakardzhiev, K. Mladenova, S. Petrova, P. Videv, V. Moskova-Doumanova, J. A. Doumanov, B. Trzebicka, A. Forsy and S. Rangelov
13. XII научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, Институт по полимери-БАН, гр. София, 03.06.2021 г.
Synthesis and characterization of liposomal spherical nucleic acids via incorporation of an original nucleolipid, **постер, награда за най-добър постер**
Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Pavel Videv, Veselina Moskova-Doumanova, Jordan A. Doumanov, Barbara Trzebicka, Aleksander Forsy, Stanislav Rangelov
Development of spherical nucleic acids from novel polystyrene/poly(chloromethylstyrene)/oligonucleotide conjugates via initiator-free click chemistry, **постер**
Erik Dimitrov, Eleni Vlasi, Natalia Toncheva-Moncheva, Kirilka Mladenova, Jordan A. Doumanov, Stergios Pispas, Stanislav Rangelov
Novel amphiphilic polyglycidol/poly(ϵ -caprolactone) and polyglycidol/poly(α -cinnamyl- ϵ -caprolactone) copolymers as highly effective cannabidiol-loaded nanocarriers, **постер**
Diana Yordanova, Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Denitsa Momekova, Petar Petrov, Georgi Grancharov, Stanislav Rangelov
14. Националната конференция на ИНФРАМАТ 2021, Правец, България, 08-10.09.2021 г.
Initiator-free conjugation of oligonucleotides via different click reactions for liposomal spherical nucleic acid preparation, **постер**
E. Dimitrov, N. Toncheva-Moncheva, P. Bakardzhiev, K. Mladenova, S. Petrova, P. Videv, V. Moskova-Doumanova, J. A. Doumanov, B. Trzebicka, A. Forsy and S. Rangelov
Synthesis of novel polycaprolactone/polyglycidol based block and star copolymers for design of nanosized drug delivery systems - niosomes, **постер**
Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Denitsa Momekova, Stanislav Rangelov
15. XI научна сесия „Младите учени в света на полимерите“, Институт по полимери-БАН, гр. София, 10.09.2020 г.
Нови поликапролактон/полиглицидол блокови и звездовидни съполимери чрез използване на „click“ химични реакции: синтез и охарактеризиране, **постер, награда за най-добър постер**
Е. Димитров, Н. Тончева-Мончева, С. Рангелов

Rapid and initiator-free conjugation of oligonucleotides via UV light-induced thiol-ene click reaction, постер

P. Denkova, K. Kostova, E. Dimitrov, N. Toncheva-Moncheva, P. Bakardzhiev, S. Rangelov

НАГРАДИ

- Награда на БАН „Иван Евстратиев Гешов“ за най-млади учени до 30 години, в научно направление „Нанонауки, нови материали и технологии“ за 2025 г.
- Награда „Проф. Иван Шопов“ на Съюза на химиците в България „Изявен млад учен в областта на полимерите“ за 2024
- Награда на акад. Иван Юхновски „Изявен млад учен в областта на органичната химия“ за 2024
- Грамота от президента Румен Радев за „Върхови постижения в образованието, принос в развитието на националните отбори по природни науки и издигане на международния престиж на България“
- Награда за най-добър постер на международна научна конференция „Silesian Meetings on Polymer Materials“ POLYMAT 2022, Zabrze, Poland
- Награда за най-добър постер на XX национален симпозиум с международно участие POLYMERS 2022
- Награда за най-добър постер на XI научна сесия „Младите учени в света на полимерите“
- Награда за най-добър постер на XII научна сесия „Младите учени в света на полимерите“
- Награда за най-добър доклад на XIII научна сесия „Младите учени в света на полимерите“
- Награда за най-добър доклад на XV научна сесия „Младите учени в света на полимерите“
- Първа награда от XVII научна постерна сесия за млади учени, докторанти и студенти в ХТМУ в секция „Химични технологии“
- Награда за най-добър доклад на трета младежка научна конференция „Biomedicine and Quality of Life 2021“
- Награда за най-добър постер на годишна научна сесия, посветена на 155 години Българска академия на науките в Институт по Органична химия с Център по фитохимия
- Първа и втора награда за научно ръководство на проект на „Десета ученическа научна сесия на БАН“

УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ

1. **КП-06-ПМ-69/4 (ФНИ)** – Получаване на нови полимерни наноносители за имобилизиране и контролирано доставяне на протеолитичен ензим серотиопептидаза 2023-2025
2. **КП-06-НХ43/3 (ФНИ)** - Дизайн и охарактеризиране на конвенционални и модифицирани ниозоми и на хибридни, стимул-чувствителни in situ гел формиращи лекарствени форми на тяхната основа за ефективно лекарствено доставяне 2020-2023
3. **КП-06-Н23/7 (ФНИ)** – Асоциация на бестрофин-1 с мембранни домени в моделни монослоеве и епителни клетки – предпоставка за иновативни терапии за дегенерации на ретината 2018-2024
4. **ДО1-217/30.11.18 г.**, БиоАктивМед, Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (Национална научна програма)
5. **ДО1-382/18.12.2020**, **ИНФРАМАТ**, Разпределителна инфраструктура от центрове за производство и изследване на нови материали и техните приложения, в промишлеността, както и за консервация, достъп и съхранение на , на артефакти (археологически и фолклорни)
6. **КП-06-ПМ59/2 (ФНИ)** – Синтез и изследване на полидопаминови наноантиоксиданти като нов терапевтичен подход за лечение на болестта на Алцхаймер 2021-2023
7. **ИС-PL/08/2022-2023 (ЕБР)**, Споразумения за двустранно сътрудничество на БАН, Център по полимерни и въглеродни материали - ПАН, Морфологично изследване на полимерни и полимер-хибридни наноструктури 2022-2023
8. **№ 17/19.08.2021 г.** Метод за производство на полимерни частици чрез MIP технология
9. **ДН 19/8 (ФНИ)** - Дизайн на нови супрамолекулни наночастици: сферични нуклеинови киселини с полимерни и липозомни ядра
10. **Бюджетна субсидия** - Водоразтворими и амфифилни съполимери и наночастици на тяхна основа. Контролирани полимеризационни процеси
11. **ИС-PL/11/2024-2025 (ЕБР)**, "Структурно охарактеризиране на полимерни наносистеми чрез микроскопия и методи, използващи разсейване на лъчения".
12. **КП-06-Н89/2 (ФНИ)**, Циклични полимерни "четки" – иновативни платформи за синтез на сферични нуклеинови киселини и доставяне на лекарства и полинуклеотиди, 2024-2027

БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] Dowhan, W. Role of Phospholipids in Cell Function. In *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics*; Op den Kamp, J. A. F., Ed.; NATO ASI Series H, Vol. 82; Springer: Berlin, Heidelberg, 1994; pp 1–21.
- [2] Lingwood, D.; Simons, K. Lipid Rafts as a Membrane-Organizing Principle. *Science* **2010**, *327* (5961), 46–50.
- [3] Rangelov, S.; Petrova, E.; Berlinova, I.; Tsvetanov, C. Synthesis and Polymerization of Novel Oxirane Bearing an Aliphatic Double Chain Moiety. *Polymer* **2001**, *42* (10), 4483–4491.
- [4] Rangelov, S.; Almgren, M.; Tsvetanov, Ch.; Edwards, K. Synthesis, Characterization, and Aggregation Behavior of Block Copolymers Bearing Blocks of Lipid-Mimetic Aliphatic Double Chain Units. *Macromolecules* **2002**, *35*, 4770–4778.
- [5] Rangelov, S.; Almgren, M.; Tsvetanov, Ch.; Edwards, K. Shear-Induced Rearrangement of Self-Assembled PEG-Lipid Structures in Water. *Macromolecules* **2002**, *35*, 7074–7081.
- [6] Rangelov, S.; Edwards, K.; Almgren, M.; Karlsson, G. Steric Stabilization of Egg-Phosphatidylcholine Liposomes by Copolymers Bearing Short Blocks of Lipid-Mimetic Units. *Langmuir* **2003**, *19*, 172–181.
- [7] Rangelov, S.; Almgren, M.; Edwards, K.; Tsvetanov, C. Formation of Normal and Reverse Bilayer Structures by Self-Assembly of Nonionic Block Copolymers Bearing Lipid-Mimetic Units. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7542–7552.
- [8] Rangelov, S.; Almgren, M. Particulate and Bulk Bicontinuous Cubic Phases Obtained from Mixtures of Glycerol Monooleate and Copolymers Bearing Blocks of Lipid-Mimetic Anchors in Water. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3921–3929.
- [9] Rangelov, S. Light Scattering and Cryogenic Transmission Electron Microscopy of Vesicles and Other Structures Formed in Water by Mixtures of Copolymers Bearing Lipid-Mimetic Units. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 4256–4262.
- [10] Rangelov, S.; Bakardzhiev, I.; Momekova, D.; Ivanova, N.; Marinov, T.; Dimitrov, D. Synthesis and self-assembly of didodecyl ether glycerol-based amphiphilic block copolymers. *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* **2006**, *43* (9), 861–870.
- [11] Momekova, D.; Rangelov, S.; Yanev, S.; Nikolova, E.; Konstantinov, S.; Romberg, B.; Storm, G.; Lambov, N. Long-Circulating, pH-Sensitive Liposomes Sterically Stabilized by Copolymers Bearing Short Blocks of Lipid-Mimetic Units. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *32* (4–5), 308–317.
- [12] Momekova, D.; Momekov, G.; Rangelov, S.; Storm, G.; Lambov, N. Physicochemical and biopharmaceutical characterization of dipalmitoyl phosphatidylcholine liposomes sterically stabilized by copolymers bearing short blocks of lipid-mimetic units. *Soft Matter* **2010**, *6*, 591–601.
- [13] Bakardzhiev, P.; Rangelov, S.; Trzebicka, B.; Momekova, D.; Lalev, G.; Garamus, V.M. Nanostructures by self-assembly of polyglycidol-derivatized lipids. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 37208–37219.
- [14] Bakardzhiev, P.; Forsy, A.; Trzebicka, B.; Andreeva, T.; Rangelov, S. Unprecedented formation of sterically stabilized phospholipid liposomes of cuboidal morphology. *Nanoscale* **2021**, *13*, 15210–15214.
- [15] Momekova, D.; Rangelov, S.; Momekov, G.; Storm, G.; Lambov, N. In vitro biocompatibility study of free and liposome-grafted block copolymers bearing short lipid-mimetic units. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2007**, *17* (6), 393–397.
- [16] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*, 1st ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2001
- [17] Tokar, R.; Kubisa, P.; Penczek, S.; Dworak, A. Cationic Polymerization of Glycidol: Coexistence of the Activated Monomer and Active Chain End Mechanism. *Macromolecules* **1994**, *27* (2), 320–322.
- [18] Toncheva-Moncheva, N.; Bakardzhiev, P.; Rangelov, S.; Trzebicka, B.; Forsy, A.; Petrov, P. D. Linear Amphiphilic Polyglycidol/Poly(ϵ -caprolactone) Block Copolymers Prepared via “Click” Chemistry-Based Concept. *Macromolecules* **2019**, *52* (9), 3435–3447

- [19] Mahajan, A. S.; Stegh, A. H. Spherical Nucleic Acids as Precision Therapeutics for the Treatment of Cancer—From Bench to Bedside. *Cancers* **2022**, *14* (7), 1615.
- [20] Barnaby, S. N.; Sita, T. L.; Petrosko, S. H.; Stegh, A. H.; Mirkin, C. A. Therapeutic Applications of Spherical Nucleic Acids. In *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*; Mirkin, C. A., Meade, T. J., Petrosko, S. H., Stegh, A. H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, **2015**; pp 23–50.
- [21] Wahane, A.; Waghmode, A.; Kapphahn, A.; Dhuri, K.; Gupta, A.; Bahal, R. Role of Lipid-Based and Polymer-Based Non-Viral Vectors in Nucleic Acid Delivery for Next-Generation Gene Therapy. *Molecules* **2020**, *25* (12), 2866.
- [22] Mendes, B. B.; Conriot, J.; Avital, A.; Yao, D.; Jiang, X.; Zhou, X.; Sharf-Pauker, N.; Xiao, Y.; Adir, O.; Liang, H.; Shi, J.; Schroeder, A.; Conde, J. Nanodelivery of Nucleic Acids. *Nat. Rev. Methods Primers* **2022**, *2* (1), 24.
- [23] Valatabar, N.; Oroojalian, F.; Kazemzadeh, M.; Mokhtarzadeh, A. A.; Safaralizadeh, R.; Sahebkar, A. Recent Advances in Gene Delivery Nanoplatfroms Based on Spherical Nucleic Acids. *J. Nanobiotechnol.* **2024**, *22* (1), 386.
- [24] Kapadia, C. H.; Melamed, J. R.; Day, E. S. Spherical Nucleic Acid Nanoparticles: Therapeutic Potential. *BioDrugs* **2018**, *32* (4), 297–309.
- [25] Fairbanks, B. D.; Love, D. M.; Bowman, C. N. *Efficient Polymer-Polymer Conjugation via Thiol-ene Click Reaction*. *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, *218*, 1700073.
- [26] Ravanat, J.-L.; Douki, T.; Cadet, J. Direct and Indirect Effects of UV Radiation on DNA and Its Components. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2001**, *63* (1–3), 88–102.
- [27] Lowe, A. B. Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36.
- [28] Dimitrov, E.; Toncheva-Moncheva, N.; Bakardzhiev, P.; Forys, A.; Doumanov, J.; Mladenova, K.; Petrova, S.; Trzebicka, B.; Rangelov, S. Nucleic Acid-Based Supramolecular Structures: Vesicular Spherical Nucleic Acids from a Non-Phospholipid Nucleolipid. *Nanoscale Adv.* **2022**, *4*, 3793–3803.
- [29] Dimitrov, E.; Toncheva-Moncheva, N.; Bakardzhiev, P.; Forys, A.; Doumanov, J.; Mladenova, K.; Petrova, S.; Trzebicka, B.; Rangelov, S. Original Synthesis of a Nucleolipid for Preparation of Vesicular Spherical Nucleic Acids. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3645.
- [30] Dimitrov, E.; Toncheva-Moncheva, N.; Doumanov, J. A.; Mladenova, K.; Petrova, S.; Pispas, S.; Rangelov, S. Three-Dimensional Nucleic Acid Nanostructures Based on Self-Assembled Polymer–Oligonucleotide Conjugates of Comblike and Coil-Comb Chain Architectures. *Biomacromolecules* **2023**, *24* (5), 2213–2224.
- [31] Gugleva, V.; Ahchiyska, K.; Georgieva, D.; Mihaylova, R.; Konstantinov, S.; Dimitrov, E.; Toncheva-Moncheva, N.; Rangelov, S.; Forys, A.; Trzebicka, B.; Momekova, D. Development, Characterization and Pharmacological Evaluation of Cannabidiol-Loaded Long Circulating Niosomes. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2414.
- [32] Toncheva-Moncheva, N.; Dimitrov, E.; Grancharov, G.; Momekova, D.; Petrov, P.; Rangelov, S.; Forys, A.; Trzebicka, B.; Momekova, D. Cinnamyl-Modified Polyglycidol/Poly(ϵ -Caprolactone) Block Copolymer Nanocarriers for Enhanced Encapsulation and Prolonged Release of Cannabidiol. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2128.