

УДК 546.681:541.6

**ВОДОРАСТВОРИМЫЕ МЕТАЛЛ-ПОЛИМЕРНЫЕ
КОМПЛЕКСЫ ГАЛЛИЯ И ТРОЙНОГО СОПОЛИМЕРА
N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА С N-ВИНИЛФОРМАМИДОМ И
N-ВИНИЛИМИНОДИУКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ****Н. И. Горшков*, А. Ю. Мурко, И. И. Гаврилова, И. И. Малахова,
В. Д. Красиков, член-корреспондент РАН Е. Ф. Панарин**

Поступило 02.07.2018 г.

Синтезировали сополимер с молекулярной массой 45 кДа, содержащий 7 мол.% звеньев виниламина, 80 мол.% винилпирролидона и 3 мол.% звеньев винилиминодиуксусной кислоты. Методом высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии исследовали его комплексообразование с ионом Ga^{3+} . Дана характеристика металл-полимерного комплекса методами эксклюзионной хроматографии и спектральными методами (ИК, 1H ЯМР). Комплекс имел мономолекулярную структуру, где ион металла играл роль анкерного фрагмента между звеньями винилиминодиуксусной кислоты и был стабилен в реакции интерлигандного обмена с гистидином.

Ключевые слова: сополимеры N-винил пирролидона, металл-полимерные комплексы, бифункциональные хелатные узлы, галлий.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524853306-310>

Ядерная медицина является современным неинвазивным методом диагностики и терапии заболеваний, в том числе онкологических. В её основе лежит использование радиоактивных изотопов, введённых в состав биологически активных молекул, имеющих сродство к определённым тканям и клеткам организма. В настоящее время в медицинской практике наряду с биогенными радиоактивными изотопами $^{11,14}C$, ^{15}N , ^{18}F широко используются изотопы металлов: технеций-99m, галлий-68 (диагностика), рений-186, 188; индий-111, иттрий-90 (терапия) и др. [1–3].

Для введения металлов в состав биологически активных макромолекул используют бифункциональные хелаторы (БФХ), содержащие донорные атомы (N, O, S), образующие прочную координационную связь с ионом металла, и группы для ковалентного присоединения БФХ к биомолекуле. Получение макромолекулярных радиофармацевтических препаратов с введением радионуклидов металлов в моноклональные антитела, белки [4], обладающие аффинностью к определённым рецепторам, является дорогостоящим и трудоёмким процессом. Альтернативой использованию моноклональных антител в качестве транспортных систем может являться применение водорастворимых

биологически активных синтетических полимеров (БАСП), в структуру которых включены аффинные векторы и БФХ. В литературе появились сведения о создании БАСП, меченных радиоактивными металлами, например металлоорганическим фрагментом $^{99m}Tc(CO)_3^+$ [5, 6], для визуализации опухолей.

Представляется перспективным использование для этой цели функциональных сополимеров N-виниламидов, поскольку они успешно используются в качестве носителей биологически активных веществ (БАВ) [7, 8].

Одним из радионуклидов, широко используемых в ядерной медицине для позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ), является галлий-68 ($T_{1/2} = 68$ мин, $E_{\beta_{max}}^+ = 2,92$ МэВ), базовая координационная химия которого хорошо изучена [9, 10].

Цель настоящего исследования — синтез водорастворимого тройного сополимера N-винилпирролидона, N-винилформамида и N-винилиминодиуксусной кислоты (ВП–ВФА–ВИДУК), изучение их комплексообразования с ионом галлия, получение металл-полимерных комплексов (МПК) ВП–ВФА–ВИДУК–Ga и их характеристика с помощью спектральных и хроматографических методов, оценка стабильности при разных pH и в условиях реакции интерлигандного обмена с биологически значимыми лигандами.

Введение ионов металлов в состав гибкоцепных полимерных носителей является достаточно трудной

*Институт высокомолекулярных соединений
Российской Академии наук, Санкт-Петербург
E-mail: ngorshkov@mail.ru

задачей из-за сложного гидролитического поведения ионов металлов в водных растворах. Координирующие свойства сополимеров зависят от параметров БФХ, молекулярно-массовых характеристик и структуры макромолекул, полиэлектролитных эффектов, которые влияют на их конформационное поведение в растворах, а также от доступности координирующих групп [11]. В качестве БФХ мы выбрали иминодиуксусную кислоту (ИДУК), которая образует прочные комплексы с ионами различных металлов, в частности с галлием ($\lg K_{\text{уст}} = 12,76$) [12]. Ион галлия в водных растворах имеет координационное число, равное 6. При его связывании с тремя донорными атомами ИДУК (O–N–O) остаются три координационные вакансии, которые заняты лабильными лигандами (молекулами воды). В биологически активных средах они могут замещаться донорными группами белков крови (в первую очередь трансферрином), что приводит к нарушению целевого транспорта макромолекулы. Гибкоцепная структура сополимера ВП–ВФА–ВИДУК за счёт внутримолекулярных контактов позволяет формировать фрагменты $\text{Ga}(\text{ИДУК})_2$, в которых заняты все координационные вакансии иона металла. При этом значение $K_{\text{уст}}$ должно превышать известные значения для наиболее значимых БФХ.

Синтез тройных сополимеров ВА–ВФА–ВИДУК осуществляли в три стадии. Сначала проводили радикальную сополимеризацию N-винилформамида с N-винилпирролидоном в запаянных ампулах в этаноле или изопропанол в атмосфере аргона при 60 °С с использованием динитрила азобисизомаляной кислоты (ДАК) в качестве инициатора в количестве 1–2 мас. % от суммы загруженных мономеров. Соплимеры выделяли осаждением в диэтиловый эфир и высушивали в вакууме при комнатной температуре до постоянного веса.

Частичное удаление формильной защитной группы сополимеров ВП–ВФА проводили в 1 Н НСl при температуре 90 °С в течение 7 ч. Затем сополимер очищали диализом против воды и выделяли лиофильной сушкой. Степень гидролиза определяли аргентометрическим методом по содержанию в сополимере иона Cl^- .

Полученный таким образом тройной сополимер ВП–ВФА–ВА переводили в ОН-форму на анионите ЭДЭ-10П, а затем алкилировали по известной методике [13] монохлоруксусной кислотой в водном растворе в присутствии КОН.

Для комплексного изучения мы синтезировали сополимер с ММ 45 кДа, содержащий 7 мол. % звеньев ВФА, 80 мол. % ВП и 3 мол. % звеньев ВИДУК.

Выбор сополимера такого состава был обусловлен, с одной стороны, относительно невысоким содержанием БФХ, что не должно было привести к заметному изменению гидродинамических свойств макромолекулы из-за внутримолекулярных связей при взаимодействии с ионом галлия. С другой стороны, сополимер имел молекулярную массу, которая обеспечивала реализацию эффекта EPR (enhanced permeation and retention) [14], способствующего проникновению и удерживанию макромолекулы в клетке.

Синтез металл-полимерных комплексов (МПК) с галлием проводили в водных растворах при рН 4,5–5, температуре 70 °С в течение 15–20 мин. В таких условиях ион галлия находится в моногидроксильной форме и не образует осадка $\text{Ga}(\text{OH})_3$. Контроль за ходом реакции осуществляли методом ВЭЖХ на ультракоротких монолитных колонках $\text{CIM}^{\text{®}}$ (Convective Interaction Media, “BIA Separations”, Словения) с использованием сильного катионообменника QA (quarterly ammonium) в градиенте рН от 5,5 до 2 (0,1 Н НСl). Применение монолитных сорбентов позволяет эффективно разделять с высокой скоростью в течение 5–10 мин высокомолекулярную составляющую и ион металла.

Молекулярно-массовые характеристики (ММХ) определяли методом высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ) в 0,2 М растворе NaCl (табл. 1). При расчёте средневесовой массы (M_w) и среднечисловой массы (M_n) и индекса полидисперсности M_w/M_n использовали константы уравнения Марка–Куна–Хаувинка ($[\eta] = K_n M^a$) для поли-N-винилпирролидона ($K = 10,50 \cdot 10^{-3}$ дл/г, $a = 0,68$) [15]. Сравнительный анализ ММ и ММХ исходного сополимера-носителя и МПК с галлием

Таблица 1. Молекулярно-массовые характеристики сополимера ВП–ВФА–ВИДУК и ВП–ВФА–ВИДУК– Ga^{3+} , определённые методом ЭЖХ и вискозиметрии

МПК	Характеристическая вязкость, $[\eta]$, дл/г, 0,2 М NaCl	Удерживаемый объём, мин	M_p , кДа	M_n , кДа	M_w , кДа	M_w/M_n (PDI)
ВП–ВФА–ВИДУК	0,35	10,27	42,8	24,7	62,3	2,5
ВП–ВФА–ВИДУК– Ga^{3+}	0,36	10,43	44,2	25,3	53,3	2,1

Примечание. M_p – ММ при максимуме пика, M_n – среднечисленная ММ, M_w – средневесовая ММ, M_w/M_n – индекс полидисперсности.

показал близость значений ММ. Это свидетельствовало об отсутствии межмолекулярного связывания макромолекул ионами Ga^{3+} и формирования межмолекулярных структур. Это подтвердили и измеренные величины значения характеристической вязкости.

Мы также установили, что при 60–70 °С и отношении Ga^{3+} : ВП–ВФА–ВИДУК = 1 : 1 ион металла полностью связывался с сополимером в течение 15–30 мин. Целевой МПК далее очищали диализом против воды и выделяли с помощью лиофилизации.

Для подтверждения связывания иона металла хелатным узлом сополимера МПК ВП–ВФА–

ВИДУК– Ga^{3+} исследовали методами 1H ЯМР- и ИК-спектроскопии.

На спектре 1H ЯМР сополимера ВП–ВФА–ВИДУК (рис. 1а) видно, что синглетный сигнал CH_2 протонов лиганда ИДУК перекрывается с более интенсивными сигналами 2, 2', 2'' протонов полимерной цепи. При образовании МПК эти протоны становятся неэквивалентными и проявляются в спектре в виде группы сигналов дублет дублетов в области 3,8 и 3,2 м.д. (рис. 1б, в). Этот эффект хорошо виден в спектре модельного комплекса $Ga(ИДУК)_2Na$ (рис. 1г).

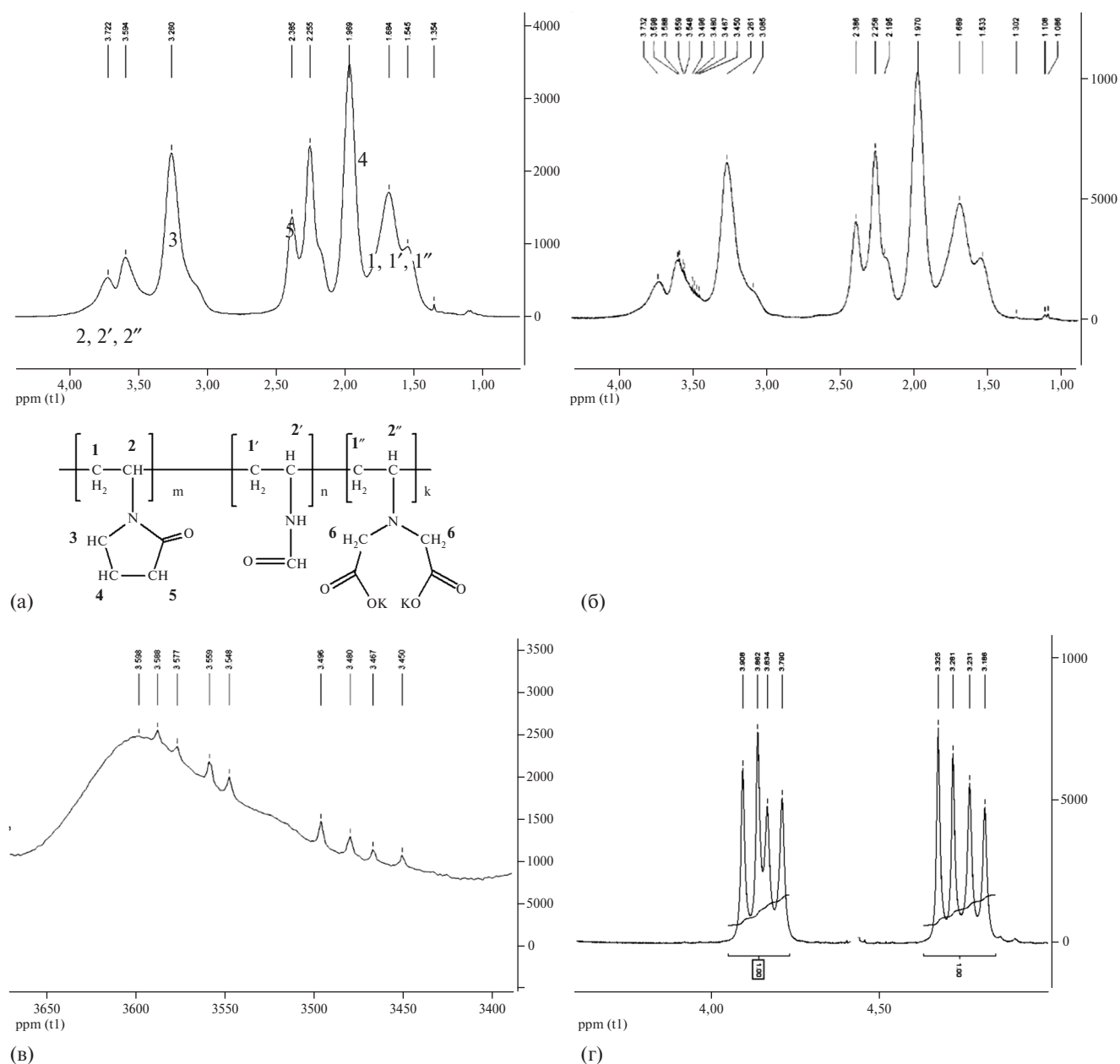


Рис. 1. Спектры 1H ЯМР (D_2O). а — исходный полимер ВП–ВФА–ИДУК; б — ВП–ВФА–ИДУК– Ga^{3+} ; в — сигналы протонов 2, 2'', 6, 6'; г — спектр модельного комплекса $Na[Ga(ИДУК)_2]$.

В ИК-спектрах МПК наиболее интенсивной была полоса колебаний карбонильных групп $\nu_{\text{as(C=O)}}$ в районе 1650 см^{-1} , перекрывавшаяся с колебаниями связей С=О лактамного кольца звеньев сополимеров ВФА (N(H)C=O) и ВП и деформационными колебаниями воды. Однако при вычитании спектра исходного сополимера из спектра МПК нам удалось выявить характеристическую полосу колебаний COO^- (1590 см^{-1}) со сдвигом в область низких частот, что свидетельствовало об образовании связи металл–лиганд.

Итак, методом ЭЖХ мы оценили стабильность МПК ВП–ВФА–ВИДУК–Ga при pH 1–8 и констатировали его высокую устойчивость к гидролизу. Кроме того, мы исследовали стабильность ВП–ВФА–ВИДУК–Ga в присутствии гистидина — одной из наиболее значимых аминокислот, входящих в состав белков, являющейся мощным хелатором для большинства ионов металлов. Мы обнаружили, что МПК ВП–ВФА–ВИДУК–Ga стабилен в присутствии гистидина при pH 7 в течение 3–4 ч, что вполне удовлетворяло условиям проведения биологических испытаний.

Таким образом, полученная совокупность данных свидетельствует о получении нами стабильного МПК ВП–ВФА–ВИДУК–Ga, который представлял собой мономолекулярную структуру, где ион металла выполнял роль анкерного фрагмента между звеньями ВИДУК. При этом образования межмолекулярных ассоциатов с высокой молекулярной массой мы не наблюдали.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФИ 18–03–00640.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vicent M.J., Duncan R.* // Trends Biothenol. 2006. V. 24. № 1. P. 39–45.
2. *Yan Y., Zhang J., Ren R., Tang C.* // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. № 19. P. 5137–5434.
3. *Carroll V., Demoin D.W., Hoffman T.J., Jurisson S.S.* // Radiochim. Acta. 2012. V. 100. № 8/9. P. 653–667.
4. *Welch M.J., Redvanly C.S.* Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications. L.: Wiley, 2004.
5. *Maurício M., Suresh S., Usha P., Samuel S., Venkatesh M., Martins M., Pereira P., Correia J.D.J., Santos I.* // Mol. Pharm. 2011. V. 8. № 2. P. 609–614.
6. *Pirmettis I., Arano Y., Tsoakos T., Okada K., Yamaguchi A., Uehara T., Morais M., Correia J.D.G., Santos I., Martins M., Pereira S., Triantis C., Kyprianidou P., Pelecanou M., Papadopoulos M.* // Mol. Pharm. 2012. V. 9. № 6. P. 1681–1692.
7. *Панарин Е.Ф., Лавров Н.А., Соловский М.В., Шальнова Л.И.* Полимеры–носители биологически активных веществ. СПб.: Профессия, 2014.
8. *Кирш Ю.Е.* Поли-N-винилпирролидон и другие N-виниламиды. М.: Наука, 1998.
9. *Ларенков А.А., Кодина Г.Е., Брускин А.Б.* // Мед. радиология и радиационная безопасность. 2011. Т. 5. № 5. С. 56–73.
10. *Maecke H.R., André J.P.* // Ernst Schering Res. Foundat. Workshop. 2007. V. 62. P. 215–242.
11. *Stoichiometry and Research — the Importance of Quantity in Biomedicine. Stoichiometry of Polymer Complexes / A. Innocenti, A.Z. El-Sonbati, M.A. Diab, A.A. El-Bindar.* Eds. Rijeka: InTech, 2012. Ch. 7.
12. *Harris W.R., Martell A.E.* // Inorg. Chem. 1976. V. 15. № 3. P. 713–720.
13. *Тихонова Л.И., Самойлова О.И., Панарин Е.Ф., Яцунский В.Г.* // Высокомолекуляр. соединения. 1974. Т. 16Б. № 12. С. 2646–2650.
14. *Fang J., Nakamura H., Maeda H.* // Adv. Drug Delivery Rev. 2010. V. 63. № 3. P. 136–151.
15. *Павлов Г.М., Панарин Е.Ф., Корнеева Е.В., Курочкин К.В., Байков В.Е., Ушакова В.Н.* // Высокомолекуляр. соединения. А. 1990. Т. 32. № 6. С. 1190–1196.

**WATER SOLUBLE METAL-POLYMERIC COMPLEXES
OF GALLIUM AND TRIPLE CO-POLYMER
OF N-VINYLPYRROLIDONE WITH N-VINYLFORMAMIDE
AND N-VINYLMINODIACETIC ACID**

**N. I. Gorshkov, A. Yu. Murko, I. I. Gavrilova, I. I. Malakhova,
V. D. Krasikov, Corresponding Member of the RAS E. F. Panarin**

Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences,
Saint-Petersburg, Russian Federation

Received July 2, 2018

A terpolymer with a molecular weight of 45 kDa containing 7 mol.% of vinylamine units, 80 mol.% of vinylpyrrolidone, and 3 mol.% of vinyliminodiacetic acid units has been synthesized. Its complexation with Ga^{3+} ion has been studied by HPLC. The resulting metal–polymer complex has been characterized by exclusion chromatography and spectral (IR, ^1H NMR) data. The complex has a monomolecular structure where the metal ion acts as an anchor fragment between vinyliminodiacetic acid units and is stable in the reaction of interligand exchange with histidine.

Keywords: copolymers of N-vinylpyrrolidone, metal-polymeric complexes, bifunctional chelators, gallium.