

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРЫ

УДК 541.64:547(39+77)

### СОПОЛИМЕРЫ МЕТИЛАКРИЛАТА С ВИНИЛАЗОЛАМИ: СИНТЕЗ, ТЕРМОЛАБИЛЬНЫЕ СВОЙСТВА, ПРИВИВКА ПОЛИАМИННЫХ ЦЕПЕЙ

© 2021 г. М. С. Стрелова<sup>а,\*</sup>, Е. Н. Даниловцева<sup>а</sup>, В. В. Анненков<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук,  
664033 Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, Россия

\*e-mail: mariya.strelova.96@mail.ru

Поступила в редакцию 22.04.2020 г.

После доработки 13.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Радикальной сополимеризацией получены новые сополимеры метилакрилата с 1-винилимидазол, 1-винил-1,2,4-триазолом и 4-винил-1,2,3-триазолом. Определены константы сополимеризации для метилакрилата и 1-винилимидазола  $0.83 \pm 0.09$  и  $0.25 \pm 0.02$ , для метилакрилата и 1-винил-1,2,4-триазола  $1.0 \pm 0.04$  и  $0.27 \pm 0.01$ , для метилакрилата и (4-винил-1Н-1,2,3-триазолил)-метилпи-валата  $0.56 \pm 0.03$  и  $2.90 \pm 0.20$  соответственно. Методами потенциометрического титрования и динамического рассеяния света изучено поведение сополимеров в водных средах и их термочувствительные свойства. Макромолекулы сополимеров в водных растворах находятся в виде крупных ассоциатов, доля которых увеличивается при нагревании, а в некоторых случаях наблюдается образование нерастворимой фазы. Показано, что сополимеры с привитыми олигопропиламинными фрагментами, содержащие звенья N-винилазолов, способны взаимодействовать с ДНК-олигонуклеотидом, стимулируя изучение их в качестве агентов доставки нуклеиновых кислот в живые клетки.

DOI: 10.31857/S230811392101006X

#### ВВЕДЕНИЕ

Стимул-чувствительные полимеры, способные значительно менять конформацию при небольших изменениях условий среды (рН, температура, свет, электромагнитное поле, присутствие солей и другое), привлекают внимание все большее число исследователей из различных областей. Так, их можно использовать для создания мембран, нанореакторов, нанотрубок [1–4], а также в качестве компонентов систем доставки лекарственных препаратов [5–7], включая генную терапию. Органы, ткани и клетки организма имеют отличные значения рН и температуры, в том числе различен водородный показатель здоровых и раковых клеток [8]. Это позволяет применять рН- и термочувствительные полимеры для направленной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных препаратов.

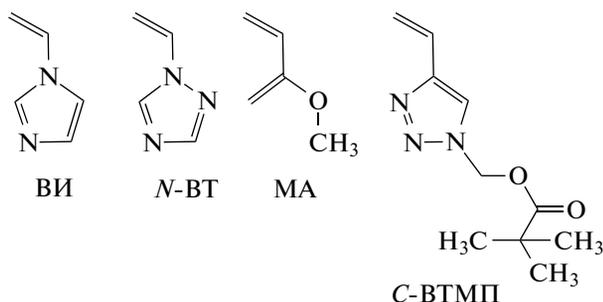
Синтетические полиамины обладают рН-чувствительностью благодаря основным свойствам аминогрупп и выглядят привлекательными объектами в качестве агентов доставки нуклеиновых кислот, поскольку способны с последними образовывать комплексы посредством электростатических взаимодействий. Полиэтиленмин и его аналоги нашли применение как агенты трансфекции [9–11]. Вместе с тем, высокая основность

аминогрупп (например, рК поливиниламина равна 9.6 [12]) придает весомый положительный заряд полимеру и может препятствовать высвобождению нуклеиновой кислоты в клетке. Кроме того, такие полимеры проявляют высокую цитотоксичность [13]. В связи с этим, вызывают интерес полимеры, содержащие группы с меньшей основностью, например азольные группы. Гомо- и сополимеры винилазолов являются гидрофильными, нетоксичными, способными к комплексообразованию и термически стабильными [14–17]. Меньшая чем у аминов основность азолов (рК поли-1-винилимидазола 5.6 [18]) позволяет регулировать заряд полимера в области физиологических значений рН. Полимеры, содержащие азольные группы (имидазол, триазолы), демонстрируют активность в захвате и высвобождении лекарственных препаратов [19–21]. Буферная емкость поли-1-винилимидазола превышает буферную емкость полиэтиленмина в кислой области, способствуя эндосомальному выходу в имидазолсодержащей системе [22].

Большинство исследований в области термочувствительных полимеров выполнено с использованием замещенных акриламидов [23], хотя термочувствительность полимеру можно придать также введением гидрофобных звеньев, например метилакрилата (МА). При сополимеризации метил-

акрилата с гидрофильными мономерами, такими как *N*-винилацетамид, *N*-винилпирролидон, метил-2-ацетидакрилат и гидроксиэтилакрилат [24–28], образуются продукты, растворимость которых в воде увеличивается при уменьшении доли МА в сополимере. Нижняя критическая температура растворения сополимеров также повышается при уменьшении содержания МА, и для некоторых сополимеров находится в области физиологических значений температуры [26–28]. Преимуществом сополимеров МА является возможность модификации путем замещения в сложноэфирной группе.

В данной работе изучена сополимеризация метилакрилата с 1-винилимидазолом (ВИ), 1-винил-1,2,4-триазолом (*N*-ВТ) и 4-винил-1,2,3-триазолом (*C*-ВТ) в защищенной форме (4-винил-1Н-1,2,3-триазол-1-ил)метилпивалата (*C*-ВТМП):

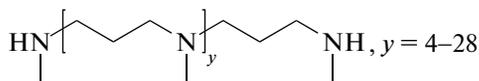


Такие мономеры, как ВИ и *N*-ВТ, можно назвать доступными, обычно используемыми для введения имидазольных и триазольных групп в полимеры. Звенья *C*-ВТ обладают свойствами очень слабой кислоты [29], ионизация которой происходит лишь в щелочной области.

В настоящей работе методами потенциометрического титрования и динамического светорассеяния исследовано поведение новых сополимеров в водных растворах. Показана способность сополимеров, модифицированных олигопропиламиновыми фрагментами, взаимодействовать с олигонуклеотидами.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали ВИ, МА и ДАК фирмы “Sigma-Aldrich”; *N*-ВТ и *C*-ВТМП получали по известным методикам [29, 30]. Мономеры очищали перегонкой при пониженном давлении, кроме *C*-ВТМП, который перекристаллизовывали из диоксана, ДАК – из этанола. Смесь олигопропиламинов (среднее число атомов  $N = 15.5$ ) синтезировали по методике, описанной в работе [31]:



Растворители диоксан, ацетон, изопропанол, этанол и диэтиловый эфир очищали по стандарт-

ным методикам [32]. ДМФА встряхивали в течение 30 мин с безводным  $\text{CuSO}_4$ , затем фильтровали и перегоняли в вакууме. *N*-метилпирролидон очищали вакуумной перегонкой. Применяли деионизованную воду (деионизатор “Водолей”, “Химэлектроника”). Уксусную кислоту, NaOH квалификации “х. ч.”, 0.1 и 1.0 моль/л растворы HCl готовили из стандарт-титров. NaOH предварительно очищали от примесей карбонатов фильтрованием 50%-ных водных растворов. Метилимидазольный буферный раствор с pH 7.4 готовили смешением раствора метилимидазола с 1.0 моль/л HCl. Раствор уксуснокислого натрия 50 мМ и 1.0 моль/л HCl смешивали для приготовления ацетатного буферного раствора с pH 5.5. В работе использовали флуоресцентный 21-мерный ДНК-олигонуклеотид GATCTCATCAGGGTACTCCTT-6-FAM (“Eurogen”, Россия) и препараты для электрофореза в агарозном геле (ООО “Диаэм”, Россия).

Сополимеры синтезировали радикальной сополимеризацией, инициированной ДАК (0.5% от массы мономеров), в ДМФА или этаноле при 60°C (табл. 1). Полученные сополимеры МА с *N*-ВТ выделяли осаждением в смесь ацетона и воды (в исходной смеси МА < 50%) или этанола и эфира (в исходной смеси МА > 50%), после чего сушили в вакууме. Сополимеры МА с ВИ высаживали в смесь гексана и ацетона, переосаждали из диоксана в эфир, сушили в вакууме. Сополимеры МА с *C*-ВТМП выделяли в дистиллированную воду, затем переосаждали из ацетона в эфир и сушили в вакууме. Снятие защитной группы проводили двукратным избытком NaOH в водно-этанольной среде при 40°C в течение 2 ч [29]. Полученные сополимеры поли(*C*-ВТ-*co*-МА) очищали диализом и сушили лиофильно.

Для проведения модификации образцы сополимеров выдерживали со смесью синтетических олигопропиламинов в количестве 5 и 8% при 140°C в ампулах в атмосфере аргона в течение 10.5 ч в *N*-метилпирролидоне. Образцы выделяли осаждением в смесь эфира и этанола (для поли(*N*-ВТ-*co*-МА), поли(*C*-ВТ-*co*-МА)) или в эфир (поли(ВИ-*co*-МА)), промывали эфиром и сушили в вакууме до постоянной массы. Модифицированные сополимеры поли(*C*-ВТ-*co*-МА) и поли(ВИ-*co*-МА) дополнительно очищали диализом.

Состав сополимеров устанавливали методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  (ESM 1–3). Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  регистрировали на спектрометре DPX-400 фирмы “Bruker” (с рабочей частотой 400.13 МГц) в ацетоне- $d_6$  (поли(*C*-ВТМП-*co*-МА)), ДМСО- $d_6$  (поли(ВИ-*co*-МА) и поли(*N*-ВТ-*co*-МА)),  $\text{D}_2\text{O}$  или  $\text{CDCl}_3$  (поли(*N*-ВТ-*co*-МА)). Соотношение звеньев винилазолов и МА в сополимерах определяли по отношению сигналов азольных циклов

Таблица 1. Сополимеризация винилазолов с метилакрилатом

МА в мономерной смеси, мол. %	Выход, %	МА в сополимере, мол. %	$\sigma_{\text{отн}}^2 \times 10^3$	$M_n \times 10^{-3}$	$M_w \times 10^{-3}$
<i>N</i> -ВТ и МА					
4.9	29.8	15.6	3.30	66	130
9.9	35.7	19.2	4.40	74	135
14.6	38.5	34.3	3.80	67	126
29.7	36.4	51.3	1.40	50	100
50.0	32.6	66.8	0.60	—	—
69.9	32.1	79.0	0.50	—	—
90.3	18.6	90.5	0.01	—	—
<i>C</i> -ВТМП и МА					
10.3	33.0	5.6	0.3	—	—
28.8	26.6	14.0	20.0	—	—
69.1	36.6	48.6	4.2	40	60
72.2	39.7	52.6	4.8	—	—
76.5	43.4	63.5	4.8	75	100
81.4	44.2	67.0	3.6	60	80
90.2	64.4	83.8	2.7	70	90
ВИ и МА					
10.0	54.9	18.7	—	—	—
10.0	35.6	30.9	4.4	110	170
29.7	38.6	39.5	1.3	120	210
42.8	27.8	53.6	0.2	—	—
49.7	75.0	56.0	4.4	120	220
69.6	73.0	71.9	1.0	90	161
72.1	42.6	73.8	—*	—	—
87.8	49.5	87.3	—*	—	—
89.3	95.5	90.5	0.2	—	—

\*Расчет вблизи точки азеотропа оказался невозможен.

(7.0–8.5 м.д.) и метильной группы МА (3.4–3.7 м.д. [33]). При этом учитывали частичное перекрывание сигналов метильной группы с сигналами протонов СН основной цепи *N*-винилазолов в области 3–4 м.д. [29, 34, 35].

Степень прививки олигопропиламинных звеньев определяли по данным спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H (ESM 4) с добавлением к полимеру трифторуксусной кислоты для идентификации сигналов олигопропиламинной группы [36] (протоны при третичных атомах азота олигопропиламинной цепи 10.3–10.5 м.д.) (табл. 2).

ИК-спектры сополимеров записывали в таблетках с КВг на приборе “Infracum FT-801”.

Константы сополимеризации устанавливали при помощи интегрального метода [37, 38], модифицированного в работе [39]. Для каждой из систем расчет вели не менее чем по пяти точкам, ис-

пользуя данные при выходах сополимеров не более 60%. Композиционную неоднородность сополимеров характеризовали дисперсией  $\sigma_{\text{отн}}^2$  состава сополимера, отнесенной к ее максимальной величине, полученной в предположении о сополимере как смеси двух гомополимеров [40].

Молекулярные массы сополимеров определяли методом ГПХ с применением жидкостного хроматографа “Миличром-А02” (колонка 2 × 75 мм, сорбент SRT-SEC 100). В качестве стандартов для сополимеров поли(ВИ-*co*-МА) использовали узкие фракции поливинилимидазола в кислой среде (10:90 = СН<sub>3</sub>ОН:ТФУ в Н<sub>2</sub>О, рН 2.5), для пар сополимеров *C*-ВТ и МА, *N*-ВТ и МА – узкие фракции поливинилформамида в фосфатном буферном растворе (0.15 моль/л, рН 7.5).

Эксперименты по динамическому лазерному рассеянию света осуществляли на приборе

Таблица 2. Модификация сополимеров винилазолов с метилакрилатом

Винилазол	Олигопропиламин, %	Выход, %	МА в сополимере, мол. %	Олигопропиламин в сополимере, мол. %
ВИ	5	66.3	17.5	0.18
ВИ	8	47.6	20.7	0.48
С-ВТМП	8	66.3	5.6	1.53
N-ВТ	8	89.7	20.0	1.61
N-ВТ	8	86.5	19.2	0.58

“LAD-079”, сконструированном в Новосибирском Институте теплофизики (Россия). Растворы пропускали через фильтры с размером пор 0.45 мкм (Sartorius 16555-Q Minisart syringe filters). Измерения выполняли с использованием лазера с длиной волны 650 нм под углами 36°, 54°, 72° и 90°. (В работе также представлены данные, полученные при 54°, поскольку в этих условиях оказалось возможным получить качественную автокорреляционную функцию для растворов и дисперсий полимеров разной концентрации.)

Потенциометрическое титрование осуществляли на иономере “Мультитест ИПЛ-113”, концентрация полимеров составляла 1.5 мг/мл. Образцы поли(N-ВТ-co-МА) растворяли в 0.01 моль/л HCl, титровали 0.1 моль/л NaOH; поли(ВИ-co-МА) растворяли в воде с добавлением 0.1 моль/л HCl (1:1 по молям к звеньям винилимидазола), титровали 0.1 моль/л NaOH. Сополимеры поли(С-ВТ-co-МА) растворяли в воде с добавлением 0.1 моль/л NaOH (1.05:1.0 по молям к звеньям С-ВТ), титровали 0.1 моль/л HCl. При этом перед титрованием pH растворов образцов поли(С-ВТ-co-МА) доводили до 11.5, а растворов поли(N-ВТ-co-МА) и поли(ВИ-co-МА) до 2.5 добавлением 0.1 моль/л NaOH или HCl соответственно.

Взаимодействие между флуоресцентным 21-мерным ДНК-олигонуклеотидом GATCTCATCAGGGACTACTT-6-FAM и модифицированными сополимерами исследовали методом электрофореза в агарозном геле 1%, в *трис*-ацетатном ЭДТА-буфере с pH 7.4. Эксперименты выполняли с использованием электрофоретической ячейки “Mini-Sub” (7 × 10 см) “Cell GT System” (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”), источник питания ELF-4 (“DNA-Technology LLC”), трансиллюминатор TCP-20LC (“Vilber Lourmat”), рабочая длина волны 254 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Синтез сополимеров

При сополимеризации МА с ВИ образуются сополимеры светло-желтого цвета, растворимые в воде (при pH ниже 7) и ДМСО. Сополимеры

N-ВТ и МА белого цвета, растворимы в диоксане, хлороформе, ДМСО и воде (в последнем случае при содержании МА в исходной смеси ≤29.7%). Сополимеры С-ВТМП и МА белого цвета, нерастворимы в воде и диэтиловом эфире. После снятия защитной группы сополимеры С-ВТ и МА растворяются в воде при pH выше 5.

В ИК-спектрах сополимеров присутствуют полосы колебаний СН и СН<sub>2</sub> основной цепи (2950 см<sup>-1</sup>), область 2300–2900 см<sup>-1</sup> соотносится с колебаниями связей NH [41, 42]. Наблюдаются характерные для МА полосы валентных колебаний связей С=О (1727 см<sup>-1</sup>), С–О (1165 см<sup>-1</sup>) (ESM 5). В спектрах сополимеров ВИ и МА к ним добавляются полосы, соответствующие валентным колебаниям имидазольного цикла (1500, 1415, 1228 см<sup>-1</sup>) [42]. Характеристические полосы азольного цикла в сополимерах N-ВТ и МА прослеживаются при 1500, 1194, 1000, 954, 870 см<sup>-1</sup>. В случае сополимеров С-ВТМП и МА регистрируются колебания азольного цикла (1533, 1450, 1440, 1116, 980, 830 см<sup>-1</sup>). После снятия защитной группы в спектрах этих сополимеров отсутствует полоса колебаний связи С–О (1225 см<sup>-1</sup>) и появляется полоса 1650 см<sup>-1</sup>, которую можно отнести к колебаниям молекул воды, ассоциированных с NH-триазольным циклом [29].

Выход сополимеров поли(С-ВТМП-co-МА) и поли(ВИ-co-МА) повышается при увеличении содержания МА в исходной смеси, в случае с сополимерами N-ВТ и МА содержание последнего в мономерной смеси 29.7% и выше приводит к снижению выхода сополимера. Большинство сополимеров МА с N-винилазолами (ВИ, N-ВТ) обогащены звеньями метилакрилата по сравнению с мономерной смесью, сополимеры МА и С-ВТМП, напротив, обеднены ими.

Рассчитанные на основании экспериментальных данных значения констант сополимеризации приведены в табл. 3. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что в реакции с N-ВТ радикалы МА с одинаковой эффективностью реагируют как со своими радикалами, так и с радикалами N-ВТ, так как  $r_1 = 1$ . Сополимеры МА с N-винилазолами обогащаются более

активным мономером метилакрилата. В системе С-ВТМП и МА сополимеры обогащены звеньями С-ВТМП по сравнению с мономерной смесью, что характерно для случая  $r_1 < 1$ ,  $r_2 > 1$ . Различия в реакционной способности *N*- и *C*-винилазолов связаны, вероятно, с особенностями взаимодействия винильной группы с соответствующими гетероциклами [43].

Эти соображения согласуются с параметрами микроструктуры сополимеров, рассчитанными на основании констант сополимеризации и исходных соотношений мономеров (рис. 1) [44]. При повышении содержания метилакрилата в мономерной смеси возрастает вероятность образования блоков МА–МА наряду с увеличением их средней длины, и, как следствие, доля звеньев МА в сополимерах с *N*-винилазолами тоже растет. Сополимеры МА с *C*-ВТ обогащены звеньями *C*-ВТ; в этом случае возрастает вероятность образования диад *C*-ВТ–*C*-ВТ.

Параметр  $\sigma_{отн}^2$  (табл. 1), характеризующий композиционную неоднородность сополимеров [39], невысок, и только лишь в одном случае превышает 2% от максимально возможного.

#### Поведение сополимеров в водных растворах

Кислотно-основные свойства водорастворимых сополимеров изучены методом потенциометрического титрования в интервале рН 2.5–11.2. Титрование большинства сополимеров сопровождалось помутнением растворов и выпадением осадка (рис. 2).

Гомополимер *C*-ВТ нерастворим в воде до рН 9, что связано с образованием множественных водородных связей между триазольными звеньями [29]. Повышение рН приводит к частичной ионизации звеньев и растворимости полимера. При введении гидрофобных звеньев МА неожиданно увеличивается интервал растворимости полимера: сополимер растворяется при рН более 5.1 уже при наличии 5.6% звеньев метилакрилата. По-видимому, наличие звеньев МА препятствует образованию протяженных двутяжных участков, стабилизированных водородными связями. Исходя из расчетных данных (см. рис. 1), образец, содержащий 5.6% МА, имеет единичные звенья МА, что соответствует средней длине блоков *C*-ВТ, состоящих из восемнадцати звеньев. Вероятно, такая длина блока недостаточна для формирования прочной системы водородных связей, которая дополнительно ослабляется при приближении к нейтральной области рН за счет ионизации отдельных звеньев *C*-ВТ.

Сополимеры ВИ и МА, напротив, растворяются в кислой области рН, что может быть обусловлено свойствами ВИ как слабого основания. При повышении рН вследствие депротонирования

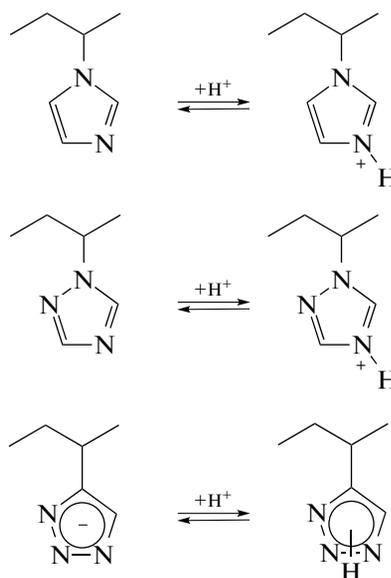
**Таблица 3.** Константы сополимеризации винилазолов с метилакрилатом

$M_1-M_2$	$r_1$	$r_2$
МА–С-ВТМП	$0.56 \pm 0.03$	$2.90 \pm 0.20$
МА– <i>N</i> -ВТ	$1.0 \pm 0.04$	$0.27 \pm 0.01$
МА–ВИ	$0.83 \pm 0.09$	$0.25 \pm 0.02$

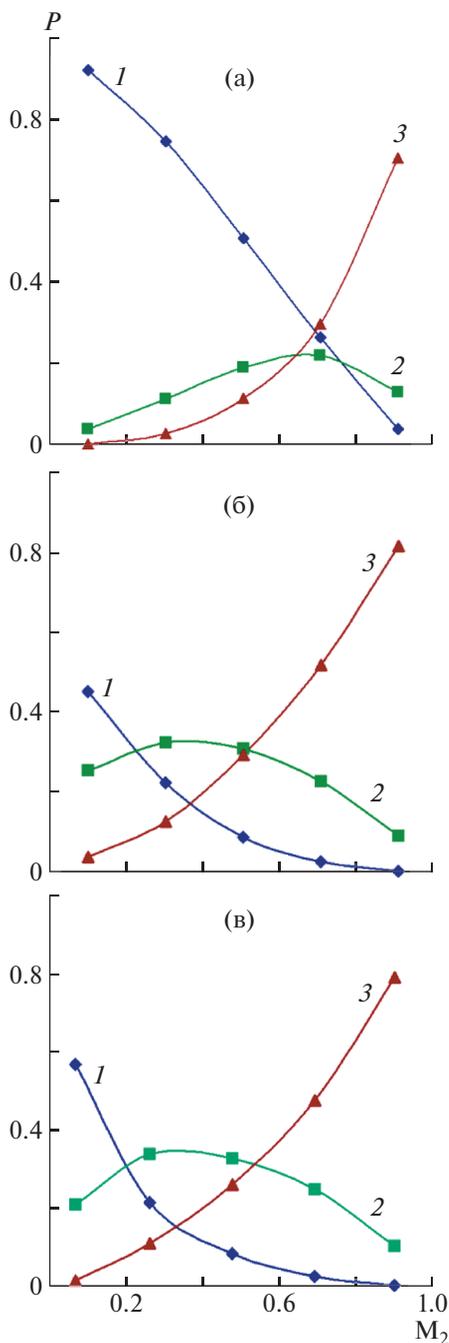
звеньев ВИ уменьшается заряд макромолекул, что наряду с гидрофобным взаимодействием между звеньями МА приводит к осаждению полимера из раствора.

Сополимер *N*-ВТ и МА с содержанием последнего 51.3% растворим при рН < 2.7 и рН > 11.1. При низких значениях рН агрегация преодолевается положительным зарядом цепи. Растворение полимера при высоких значениях рН является следствием донорно-акцепторного взаимодействия  $\pi$ -системы азольного цикла с гидроксид-анионами, как описано в работе [18]. Сополимеры *N*-ВТ и МА с содержанием последнего менее 34.3% растворимы во всем исследованном интервале рН.

В растворах сополимеров возможны следующие кислотно-основные реакции:



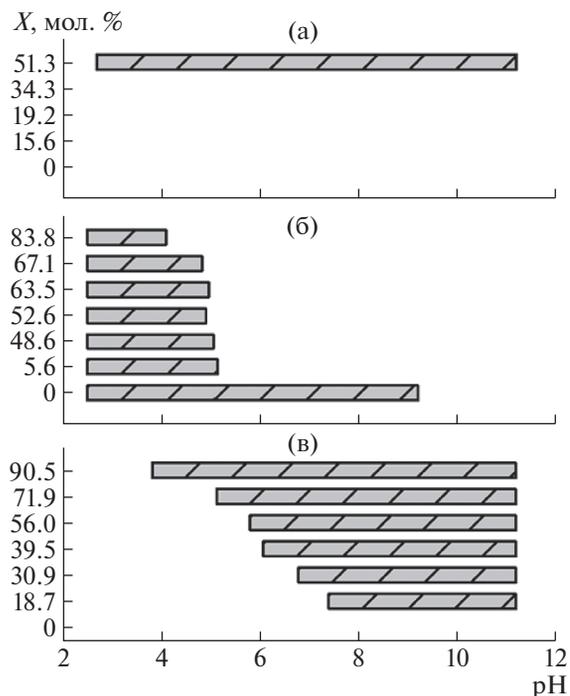
Перегиб в щелочной области при титровании сополимеров, содержащих звенья *C*-ВТ, относят к полному исчерпанию натриевой формы триазольных звеньев [29]. В случае сополимеров ВИ точка перегиба соответствует полной нейтрализации сопряженной кислоты для звеньев ВИ. Таким образом, точка, соответствующая полной нейтрализации звеньев, была вычислена, исходя из состава сополимера. С использованием этих данных определена степень ионизации  $\alpha$  [45], после чего значения рК были получены по уравнению Хассельбаха–Гендерсона [46]. Кривые по-



**Рис. 1.** Зависимости вероятности  $P = 11$  (1), 12 (2) и 22 (3) образования диад звеньев винилазола ( $M_1$ ) С-ВТМП (а), *N*-ВТ (б), ВИ (в) с МА ( $M_2$ ) от мольного содержания метилакрилата в исходной мономерной смеси. Расчет проведен для конверсии мономеров 20%.

тенциометрического титрования сополимеров *N*-ВТ мало отличались от кривых титрования воды из-за очень низкой основности триазольных звеньев (ESM 6).

Зависимость рК от  $\alpha$  (рис. 3) для сополимеров ВИ и МА при содержании последнего 18.7 и



**Рис. 2.** Области помутнения растворов сополимеров поли(*N*-ВТ-*co*-МА) (а), поли(С-ВТМП-*co*-МА) (б) и поли(ВИ-*co*-МА) (в);  $X$  – содержание МА в сополимере. Заштрихованные области соответствуют рН, при котором наблюдается выделение осадка.

39.5% подобны поливинилазолу. При увеличении степени протонирования звеньев рК понижается, что обусловлено трудностью присоединения каждого последующего протона к положительно заряженной цепи. При увеличении доли МА в сополимерах *N*-винилазолов уменьшается наклон кривых, вследствие снижения электростатического эффекта между звеньями ВИ. При содержании МА до 56% кривые в области высоких значений  $\alpha$  близки, что указывает на близкую основность имидазольных звеньев на начальной стадии протонирования. При низких степенях ионизации введение гидрофобных звеньев МА сначала понижает основность имидазольных звеньев, вероятно, за счет компактизации полимерных цепей и усиления электростатических эффектов. При содержании звеньев МА более 50% основность сополимеров при низких значениях  $\alpha$  превышает величины для поливинилазола, что может быть связано с подавлением электростатических эффектов за счет разбавления звеньев ВИ неионными звеньями МА. В случае сополимеров С-ВТ и МА (рис. 4) вид кривых также свидетельствует о проявлении электростатических эффектов по мере ионизации полимера, причем повышение доли неионных звеньев МА также приводит к уменьшению наклона кривых за счет разбавления ионных звеньев С-ВТ. Вве-

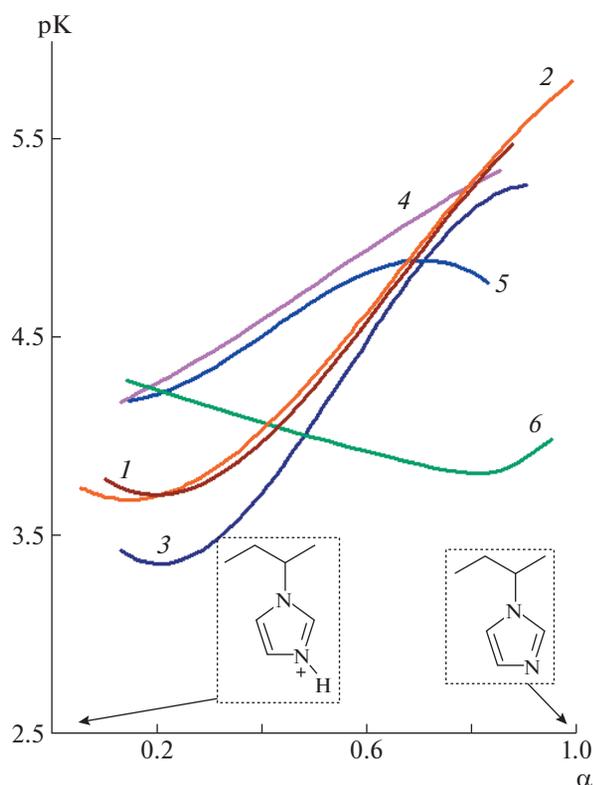


Рис. 3. Зависимость рК от  $\alpha$  сополимеров поли(ВИ–со–МА); содержание МА в сополимере 0 (1), 18.7 (2), 39.5 (3), 56.0 (4), 71.9 (5) и 90.5 мол. % (6).

дение 5.6% звеньев МА увеличивает кислотность триазольных звеньев при начале ионизации, возможно, из-за описанного выше нарушения системы водородных связей между звеньями С-ВТ.

#### Термочувствительные свойства сополимеров

При введении гидрофобных звеньев МА в цепи поливинилазолов ожидается появление у водных растворов сополимеров термочувствительных свойств. Относительно быстрое (1–2 град/мин) нагревание водных растворов при концентрации сополимеров 2 и 4 мг/мл до 90°C не приводило к их помутнению даже в тех случаях, когда рН раствора отстояла от области помутнения (см. рис. 2) не более чем на 0.5 единицы. Размер частиц сополимеров в воде был изучен методом динамического рассеяния света при изменении температуры от 10 до 70°C и средней скорости нагревания 0.3 град/мин, что являлось достаточным для довольно медленной перестройки макромолекулярных цепей и ассоциатов в растворах исследуемых сополимеров (рис. 5). При этом в ряде случаев наблюдалось обратимое помутнение растворов.

Для большинства исследованных систем характерно бимодальное распределение частиц по размерам при комнатной температуре с наличием

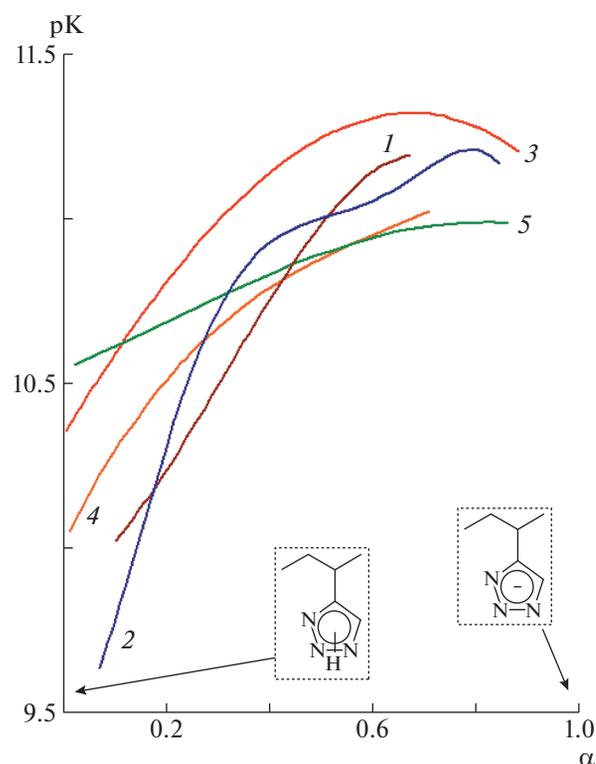


Рис. 4. Зависимость рК от  $\alpha$  сополимеров поли(С-ВТМП–со–МА); содержание МА в сополимере 0 (1), 5.6 (2), 48.6 (3), 67.1 (4) и 83.8 мол. % (5).

фракции размером 10–20 нм, которую можно отнести к индивидуальным макромолекулам. Также наблюдаются крупные частицы со средним гидродинамическим радиусом более 500 нм, представляющие собой ассоциаты макромолекул. При интерпретации результатов следует учитывать, что экспериментальные данные соответствуют интенсивности рассеяния, резко увеличивающейся с ростом радиуса частиц. Таким образом, в случае бимодального распределения частиц по размерам доля крупной фракции оказывается всегда завышенной.

Сополимер N-ВТ и МА, содержащий 51.3% последнего и растворимый только в кислой среде, проявляет термочувствительные свойства при рН 2, причем за 10–20°C до достижения температуры помутнения макромолекулы полностью переходят в состав крупных ассоциатов. Понижение концентрации полимера с 4.0 до 0.4 мг/мл повышает температуру помутнения с 43 до 60°C при аналогичном изменении размеров частиц. При рН 11, а также при меньшем содержании МА в сополимерах осаждение полимера из раствора при нагревании не происходит, но размер ассоциатов увеличивается.

Растворы сополимера С-ВТ и МА, содержащего 48.6% МА, не мутнеют при нагревании, но при

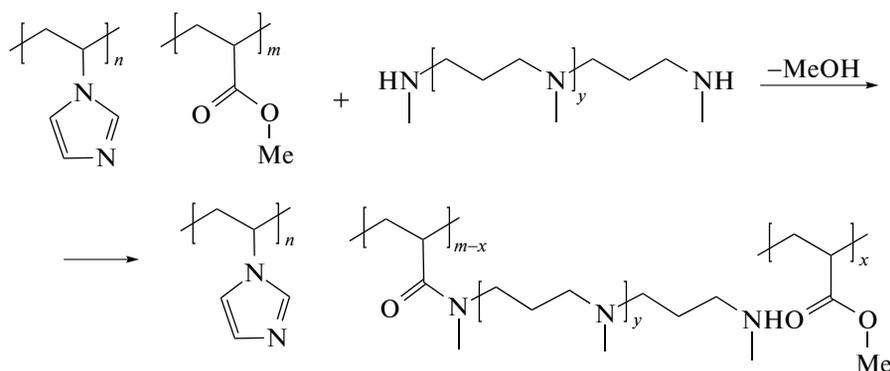
40–50°C четко определяются крупные ассоциаты со средним гидродинамическим радиусом выше 1000 нм и более мелкие ассоциаты размером 100–200 нм.

Сополимеры ВИ и МА были изучены при pH, близких к границе растворимости. При концентрации 4 мг/мл и 50°C прослеживалось образование осадка сополимеров с 30.9 и 39.5% МА; понижение концентрации до 0.4 мг/мл приводило к повышению температуры помутнения до 65°C для сополимера с 39.5% МА и отсутствию помутнения для сополимера с 30.9% МА. По данным светорассеяния происходит компактизация ассоциатов при нагревании. Сополимеры ВИ и МА в

широком диапазоне составов были исследованы при pH 1, так как предполагалось возможное разрушение ассоциатов за счет протонирования звеньев ВИ. Ассоциаты радиусом ~1000 нм прослеживались при всех значениях температуры, а при 50°C и выше их размер увеличивался.

#### Модификация сополимеров реакцией с олигопропиламинами

Модификация проведена путем реакции сложноефирных звеньев с синтетической смесью олигопропиламинов. Представлена схема реакции модификации на примере сополимера ВИ и МА:



где  $y_{\text{сред}} = 13.5$ .

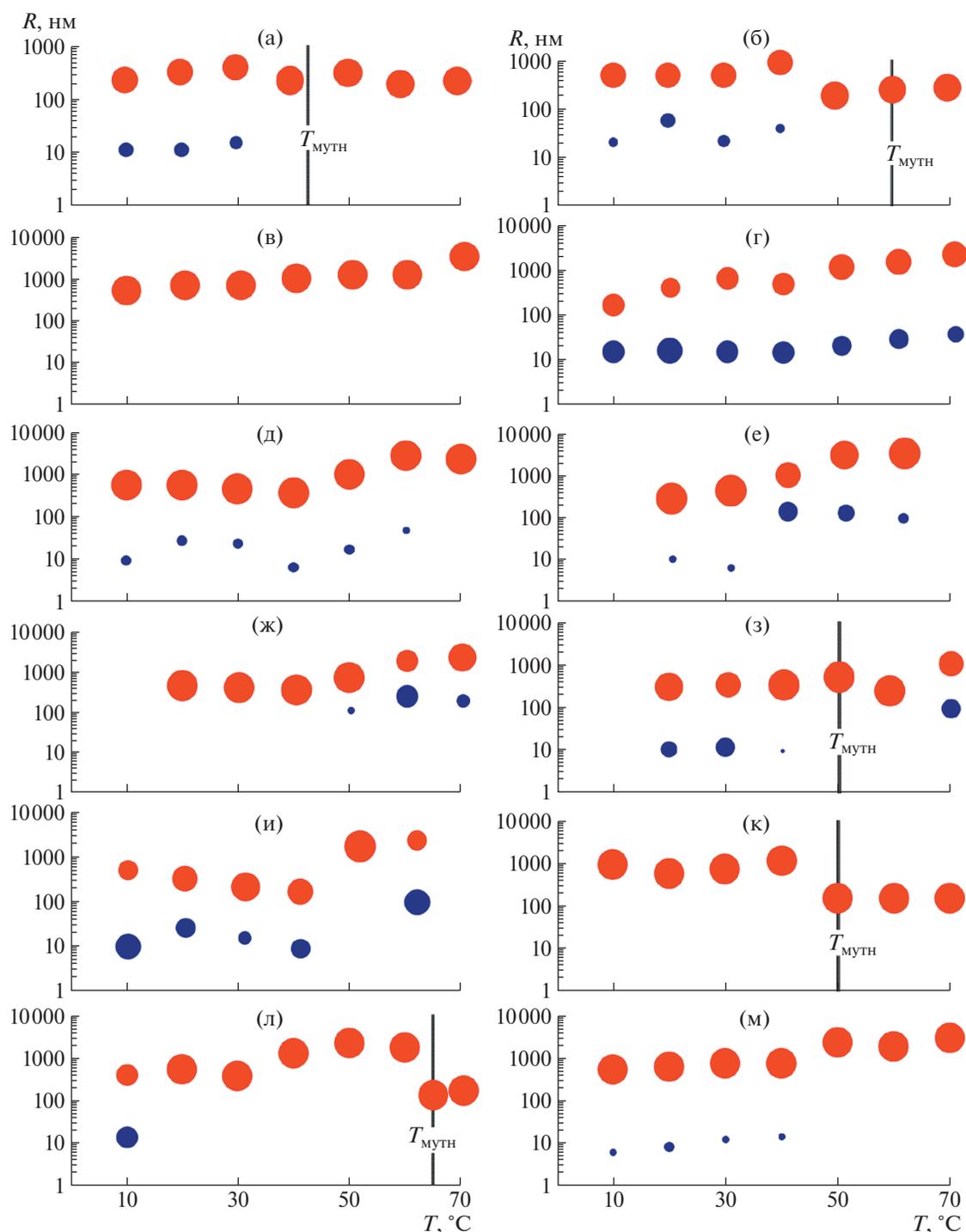
Степень прививки, оцененная по спектрам ЯМР модифицированных сополимеров в присутствии трифторуксусной кислоты, составила от 0.18 до 1.61%. Кривая потенциометрического титрования модифицированного сополимера N-ВТ–МА (рис. 6) располагается существенно выше кривой исходного образца, не содержащего групп, протонируемых в нейтральной и слабокислой области. Помимо перегиба в кислой области, соответствующего нейтрализации всех аминогрупп цепей олигопропиламинов, наблюдается перегиб при нейтрализации 35% аминогрупп. Ранее было показано [47, 48], что электростатические эффекты при титровании полимерных электролитов целесообразно рассматривать в рамках пентад, когда на кислотно-основные свойства данного звена влияет состояние двух соседних звеньев с обеих сторон. Протонирование центральных звеньев пентад в цепях олигопропиламинов соответствует 33% аминогрупп, что совпадает с наблюдаемым перегибом, после которого происходит протонирование групп с более низкой основностью.

Наличие в модифицированных сополимерах боковых полиаминных цепей, содержащих свыше десяти аминогрупп, позволяет ожидать их взаимодействия с полимерными анионами, например нуклеиновыми кислотами. Для проверки

этого предположения было исследовано взаимодействие сополимеров с 21-мерным меченным ДНК-олигонуклеотидом GATCTCATCAGGGAC-TACTT-6-FAM методом электрофореза в агарозном геле (рис. 7). В качестве стандарта (дорожка 1) использован олигонуклеотид без добавления полимера. В процессе электрофореза он передвигается к положительному заряженному электроду. Полимеры на основе N-ВТ (дорожки 2, 3) и ВИ (дорожки 5, 6) демонстрируют хорошее связывание олигонуклеотида. Полимер на основе С-ВТ (дорожка 4) плохо связывается с олигонуклеотидом, вероятно, из-за слабой кислотности звеньев С-ВТ, которая блокирует аминогруппы в полимере и препятствует их взаимодействию с олигонуклеотидом.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

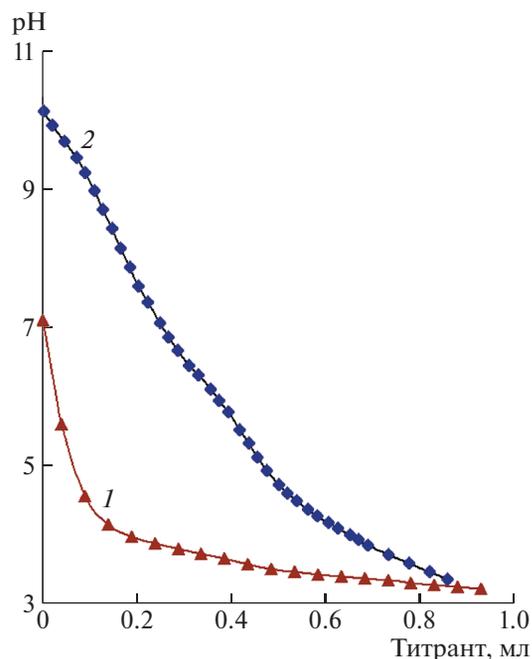
В работе изучена сополимеризация метилакрилата с винилазолами: 1-винилмидазолом, 1-винил-1,2,4-триазолом и 4-винил-1,2,3-триазолом в защищенной форме. Определены константы сополимеризации для каждой из трех систем. Показано, что увеличение содержания метилакрилата в сополимерах с N-винилазолами уменьшает интервал растворимости сополимеров в воде, а в сополимерах с С-винилтриазолом, напротив,



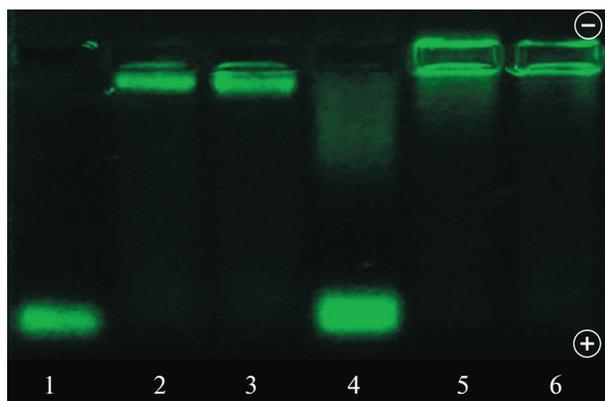
**Рис. 5.** Зависимости среднего гидродинамического радиуса частиц сополимеров в водной среде от температуры: а, б –  $N$ -VT-51.3% МА, рН 2, 4.0 и 0.4 мг/мл соответственно; в –  $N$ -VT-51.3% МА, рН 11, 4 мг/мл; г –  $N$ -VT-34.3% МА, рН 7, 4 мг/мл; д –  $N$ -VT-34.3% МА, рН 11, 4 мг/мл; е –  $C$ -VT-48.6% МА, рН 7, 4 мг/мл; ж –  $C$ -VT-48.6% МА, рН 11, 4 мг/мл; з, и –  $VI$ -30.9% МА, рН 6.6, 4.0 и 0.4 мг/мл соответственно; к, л –  $VI$ -39.5% МА, рН 5.5, 4.0 и 0.4 мг/мл соответственно; м –  $VI$ -39.5% МА, рН 1.0. Площадь точек пропорциональна доле частиц (по интенсивности рассеяния).

увеличивает. Поведение сополимеров в водных растворах исследовано методами потенциометрического титрования и динамического рассея-

ния света. Модифицированные путем прививки олигопропиламинных фрагментов сополимеры демонстрируют способность к взаимодействию с



**Рис. 6.** Титрование раствора сополимера *N*-ВТ–19.2% МА (1) и продукта его модификации (2) реакцией с олигопропиламином. Масса сополимера 0.1 г, объем раствора 50 мл, содержание титранта 0.1 моль/л HCl.



**Рис. 7.** Результаты гель-электрофореза комплексов модифицированных сополимеров с 21-мерным ДНК-олигонуклеотидом. Дорожки: 1 – стандарт (без сополимера); 2, 3 – *N*-ВТ–МА с содержанием МА 20.0 и 19.2% соответственно; 4 – *C*-ВТ–МА с содержанием МА 5.6%; 5, 6 – *VI*–МА с содержанием МА 17.5 и 20.7%. Концентрация ДНК 10 мкм, сополимеров 4 мг/мл; соотношение объема растворов ДНК : сополимера = 1 : 4.

ДНК-олигонуклеотидом. Все это вызывает огромный интерес для дальнейшего изучения возможностей применения данных сополимеров в области генной инженерии для доставки нуклеиновых кислот в живые клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России и Российской академии наук (код проекта АААА-А19-119100490016-4).

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования “Ультрамикрoанализ” за предоставленное оборудование.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tan S., Saito K., Hearn M.T. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. V. 53. P. 209.
2. Lu C., Urban M.W. // *Prog. Polym. Sci.* 2018. V. 78. P. 24.
3. Xu J., Zhu P., Wang Y., Zhang K.-L. // *Inorg. Chim. Acta* 2019. V. 503. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119376>
4. Xian Y., Shui Y., Li M., Pei C., Zhang Q., Yao Y. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2020. V. 137. № 35. <https://doi.org/10.1002/app.49032>
5. Fu X., Hosta-Rigau L., Chandrawati R., Cui J. // *Chem: Cell Press.* 2018. V. 4. № 9. P. 2084.
6. Sponchioni M., Palmiero U.C., Moscatelli D. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. V. 102. P. 589.
7. Koochaki A., Moghbeli M.R., Nikkha S.J., Ianiro A., Tuinier R. // *RSC Adv.* 2020. V. 10. № 6. P. 3233.
8. Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Matlashov M.E., Belousov V.V., Snopova L.B., Prodanetz N., Dudenkova V.V., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1850. № 9. P. 1905.
9. Boussif O., Lezoualc F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.-P. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. V. 92. P. 7297.
10. Chen M., Tang Y., Wang T., Long Q., Zeng Z., Chen H., Feng X. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2016. V. 69. P. 1367.
11. Wang X., Niu D., Hu C., Li P. // *Curr. Pharm. Des.* 2015. V. 21. P. 6140.
12. Katchalsky A., Mazur J., Spitnik P. // *J. Polym. Sci.* 1957. V. 23. № 104. P. 513.
13. Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Kriegelstein J., Kissel T. // *Biomaterials.* 2003. V. 24. № 7. P. 1121.
14. Ermakova T.G., Kuznetsova N.P., Maksimov K.A. // *Russ. J. Appl. Chem.* 2003. V. 76. № 12. P. 1971.
15. Kizhnyayev V.N., Pokatilov F.A., Vereshchagin L.I. // *Polymer Science C.* 2008. V. 50. № 7. P. 1.
16. Kurik M.V., Myachina G.F., Ermakova T.G. // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 2007. V. 468. P. 669.
17. Kizhnyayev V.N., Petrova T.L., Pokatilov F.A., Zhitov R.G., Edel'shtein O.A. // *Polymer Science B.* 2014. V. 56. № 5. P. 490.
18. Mazyar N.L., Annenkov V.V., Kruglova V.A., Ananiev S.M., Danilovtseva E.N., Rokhin A.V., Zinchenko S.V. // *Russ. Chem. Bull.* 2000. V. 49. № 12. P. 2013.
19. Bayramgil N.P. // *Colloids Surf. B.* 2012. V. 97. P. 182.
20. Kandasamy G., Danilovtseva E.N., Annenkov V.V., Krishnan U.M. // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2020. V. 11. P. 354.
21. Annenkov V.V., Krishnan U.M., Pal'shin V.A., Zelinskiy S.N., Kandasamy G., Danilovtseva E.N. // *Chinese J. Polym. Sci.* 2018. V. 36. № 10. P. 1114.
22. Danilovtseva E.N., Krishnan U.M., Pal'shin V.A., Annenkov V.V. // *Chinese J. Polym. Sci.* 2019. V. 37. P. 637.
23. Aseyev V., Tenhu H., Winnik F.M. // *Adv. Polym. Sci.* 2011. V. 242. P. 29.

24. *Mori T., Fukuda Y., Okamura H., Minagawa K., Masuda S., Tanaka M.* // J. Polym. Sci. Polym. Chem. 2004. V. 42. P. 2651.
25. *Peng X., Zhang Y., Fehg W., Ai L.-M., Zhang F.* // J. Mol. Struct. 2013. V. 1041. P. 139.
26. *Мун Г.А., Уркимбаева П.И., Примбетова М.Б., Бакытбеков Р.Б., Шайхутдинова А., Елигбаева Г.Ж.* // Изв. науч.-технич. об-ва "КАХАК". 2012. № 2. С. 36.
27. *Okamura H., Masuda S., Minagawa K., Mori T., Tanaka M.* // Eur. Polym. J. 2008. V. 38. P. 639.
28. *Мун Г.А.* Пат. 19953 Казахстан. 2008.
29. *Danilovtseva E.N., Chafeev M.A., Annenkov V.V.* // J. Polym. Sci. Polym. Chem. 2012. V. 50. P. 1539.
30. *Hopff H., Lippay M.* // Macromol. Chem. 1963. V. 66. P. 157.
31. *Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., Perry C.C.* // Arkivoc. 2009. V. 13. P. 116.
32. *Keil B.* Лабораторная техника органической химии / Пер. с чешск. В.А. Вавера под ред. Л.Д. Бергельсона. М.: Мир, 1966.
33. *Kubotera A., Saito R.* // Polym. J. 2016. V. 48. № 5. P. 611.
34. *Mori H., Ishikawa K., Abiko Y., Nakabayashi K., Onuma A., Morishima M.* // Polymer. 2013. V. 54. № 8. P. 2001.
35. *Talu M., Demiroglu E.U., Yurdakul Ş., Badoğlu S.* // Spectrochim. Acta. A. 2015. V. 134. P. 267.
36. *Liu Q., Zhu M.* // Polym. Test. 2016. V. 56. P. 174.
37. *Annenkov V.V., Lebedeva O.V., Danilovtseva E.N., Mikhaleva A.I.* // Polymer Science B. 2001. V. 43. № 9–10. P. 247.
38. *Kuo J.-F., Chen C.-Y.* // J. Appl. Polym. Sci. 1980. V. 26. P. 1117.
39. *Езриелев А.И., Брохина Э.Л., Роскин Е.С.* // Высокомолек. соед. А. 1969. Т. 11. № 8. С. 1670.
40. *Лачинов М.Б., Черникова Е.В.* Методические разработки к практическим работам по синтезу полимеров / Под ред. В.П. Шибаева. М.: МГУ, 2002.
41. *Круглова В.А., Кижняев В.Н., Иванова Н.А., Верещанин Л.И.* // Высокомолек. соед. Б. 1987. Т. 29. № 6. С. 416.
42. *Lippert J.L., Robertson J.A., Havens J.R., Tan J.S.* // Macromolecules. 1985. V. 18. P. 63.
43. *Круглова В.А., Анненков В.В., Ратовский Г.В., Шиверновская О.А.* // Высокомолек. соед. Б. 1988. Т. 30. № 3. С. 233.
44. *Зильберман Е.Н.* // Высокомолек. соед. Б. 1979. Т. 21. № 1. С. 33.
45. *Strauss U.P., Barbieri U.P., Wong G.* // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. P. 2840.
46. *Hasselbalch K.A.* // Biochemische Z. 1917. V. 78. P. 112.
47. *Вайнштейн Э.Ф., Берлин А.А., Энтелис С.Г.* // Высокомолек. соед. Б. 1975. Т. 17. № 11. С. 835.
48. *Annenkov V.V., Kруглова V.A., Mazyar N.L.* // J. Polym. Sci. Polym. Phys. 1998. V. 36. P. 931.