

УДК 547.995.12:577.114.7

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА, РАСТВОРИМЫЕ В НЕЙТРАЛЬНЫХ СРЕДАХ — СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

© 2024 г. М. Ю. Горшкова¹, *, Э. С. Григорян¹, И. Ф. Волкова¹

¹Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: mgor@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 08.09.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принята к публикации 06.11.2023 г.

Предложен двухстадийный метод проведения модификации хитозана, обеспечивающий контролируемое присоединение кватернизованного блока. Структура полученных продуктов изучена методами ИК-Фурье- и ЯМР-спектроскопии; растворимость охарактеризована методом турбодиметрии; кислотно-основные свойства определены методом потенциометрии. Показано, что для получения растворимых продуктов необходимо наличие ~50% кватернизованных аминогрупп. Разница в рН-чувствительности модифицированных производных с разным типом присоединения кватернизованного блока выявлена на примере их комплексов с модельным полистиролсульфонатным анионом. Продемонстрирована возможность получения на основе синтезированных производных комплексов с ДНК — полиплексов, размеры которых определялись структурой производных, стабильных в условиях близких к физиологическим. Полученные результаты могут составить основу для разработки систем доставки лекарственных средств и генетического материала.

Ключевые слова: хитозан, растворимые производные хитозана, кватернизованные производные хитозана, системы доставки лекарственных веществ, полиплексы, трансфекция

DOI: 10.31857/S0555109924020028 EDN: GBFIMA

Комплекс уникальных свойств хитозана (ХТЗ), его биологическая активность, биосовместимость, биodeградируемость, а также низкая токсичность, обуславливают его широкое биомедицинское применение. На основе ХТЗ уже созданы многочисленные продукты разного типа: от покрытий на раны и ожоги до систем доставки лекарственных препаратов [1–5]. В настоящее время задачей является повышение эффективности действия и расширение области применения продуктов на основе ХТЗ за счет придания им чувствительности к действию внешних факторов, создания так называемых «смарт»-систем. Для успешного применения ХТЗ в подобных системах возникает необходимость введения в цепи полисахарида дополнительных функциональных групп, а поскольку необходимым условием использования подобных систем является совместимость с физиологическими средами, для их создания предпочтительны водорастворимые формы ХТЗ, среди которых наиболее перспективным представляется N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний) пропил] ХТЗ хлорид (N-мХТЗ). В отличие от кватернизованных производных ХТЗ, полученных прямым

метилированием аминогрупп, N-мХТЗ является не только высоко заряженным, но и структурно гомогенным поликатионом, сочетающим биосовместимость, биodeградируемость исходного полисахарида с растворимостью во всем диапазоне рН. Каждое модифицированное звено N-мХТЗ помимо кватернизованной аминогруппы содержит вторичную аминогруппу, заряд которой зависит от кислотности среды. Структура и свойства кватернизованного ХТЗ и закономерности его взаимодействия с синтетическими и нуклеиновыми кислотами изучены в цикле предыдущих работ [6–8]. Были получены комплексы N-мХТЗ с ДНК и малыми интерферирующими РНК (миРНК), которые обеспечивали большую эффективность трансфекции в экспериментах *in vitro*, чем известные системы на основе ХТЗ [9]. Однако следует отметить, что наряду со всеми преимуществами N-мХТЗ их получение сопровождается превращением первичных аминогрупп хитозана во вторичные. Между тем первичные аминогруппы необходимы для обеспечения возможности дальнейшей модификации полисахарида и повышения стабильности его комплексов с отрицательно заряженными

соединениями. Кроме того, первичные аминогруппы обуславливают проявление рН-чувствительности поликатиона: в кислых средах количество зарядов на его цепях увеличивается за счет ионизации этих групп. Это обстоятельство может стать решающим для осуществления трансфекции комплексами модифицированного ХТЗ (мХТЗ) с нуклеиновыми кислотами, обеспечивая выход нуклеиновой кислоты из эндосом и лизосом по механизму протонной губки. Известно так же, что первичные аминогруппы играют важную роль в обеспечении антиоксидантной активности ХТЗ [10]. Таким образом, задача получения растворимого во всем диапазоне рН полисахарида с сохранением первичных аминогрупп в его звеньях остается актуальной. Проведение модификации ХТЗ (2,3-эпоксипропил)триметиламмоний хлоридом (глицидилтриметиламмоний хлоридом, (ГТМАХ)) по гидроксильным группам полисахарида представляется одним из возможных способов решения задачи. Однако, несмотря на многочисленные попытки, не удалось получить растворимые в нейтральных средах производные ХТЗ. Степень модификации полисахарида при проведении реакции в щелочных средах была незначительна, около 10% [11–13], и не превышала 30% для производных, полученных в нейтральных средах с предварительной защитой аминогруппы органическими соединениями или ионными ПАВ [11, 14, 15], что не позволило получить растворимые в нейтральных средах продукты. Кроме того, получение О-кватернизованных производных с использованием в качестве прекурсоров бензилиден- или фталоил-хитозанов было сопряжено со сложностями снятия защиты аминогруппы в жестких условиях, что приводило к частичной деградации полисахарида. Таким образом, получение растворимых производных хитозана с сохранением первичных аминогрупп остается актуальной задачей, решение которой и является целью настоящей работы.

МЕТОДИКА

Материалы. ХТЗ производства ЗАО “Биопрогресс” (Россия) (степень деацетилирования исходного хитина 90%, массовая доля золя 5%) очищали осаждением раствором щелочи из кислых растворов, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения рН и лиофильно высушивали. N-кватернизованный хитозан получали по модифицированной методике, описанной в работе [16]. Значения молекулярной массы (Mw) образцов исходного ХТЗ и N-мХТЗ, определенное методом статического светорассеяния в 0.33 М уксусной кислоте, содержащей 0.2 моль/л ацетата натрия, составили соответственно 280×10^3 и 250×10^3 Да.

Полистиролсульфонат натрия (ПССNa) (“Du Pont”, Франция — США) с Mw = 74×10^3 Да, ГТМАХ, додецилсульфат натрия (ДДС), концентраты буферов PBS, TRIS, HEPES and MES

(“Sigma-Aldrich”, США), а также хлористый натрий, едкий натр, уксусную и соляную кислоту квалификации “х.ч.” (“ЛабТех”, Россия), ацетон и диметилсульфоксид (ДМСО) квалификации “х.ч.” (“Экос-1”, Россия), а также этиловый спирт (“Химмед”, Россия) применяли без дополнительной очистки. Для приготовления водных растворов использовали бидистиллированную воду.

Натриевую соль ДНК из тимуса телят (~10000 пар оснований) фирмы “Sigma” (США) применяли без дополнительной очистки. Концентрацию фосфатных групп [P] в растворах нуклеиновой кислоты определяли с помощью УФ-спектрофотометрии, используя закономерности работы [17].

Получение прекурсора ДДС/ХТЗ. Комплексы ДДС/ХТЗ различного состава (1/1; 3/2; 2/1) получали, смешивая кислые растворы ХТЗ и ДДС согласно методике, описанной в работе [18]. Состав комплексов выражали в мольных отношениях сульфонатных групп ДДС к первичным аминогруппам ХТЗ. Например, для приготовления комплекса ДДС/ХТЗ состава 1 : 1, раствор ДДС (2.5 г (8.67ммоль) в 35мл 2%-ной уксусной кислоты) медленно приливали к раствору ХТЗ (1.5 г (8.2 ммоль) в 100 мл 2%-ной уксусной кислоты) при непрерывном перемешивании. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч, продолжая перемешивать. Выпавший осадок собирали на фильтре Шотта, многократно промывали дистиллированной водой, сушили при 70°C до постоянного веса. Соотношение серы к азоту определяли методом спектроскопии ЯМР¹H.

Синтез О- и N, О-кватернизованных хитозанов. К раствору комплекса ДДС/ХТЗ (1.0 г) в 40 мл ДМСО добавляли ГТМАХ равными порциями по 0.7 мл 3 раза с интервалом 2 ч. Реакцию проводили в термостатируемом реакторе при температуре 70°C и непрерывном перемешивании в течение 14 ч; реакцию смесь выдерживали при 4°C 12 ч. Осадок собирали с помощью центрифугирования при 5000 об/мин, 15 мин. Продукт промывали этанолом, осаждали на центрифуге, декантировали жидкую фазу; промывку осадка этанолом повторяли 4–5 раз. После сушки продукт растворяли в 16 мл 0.7 н раствора NaOH и осаждали этанолом (70 мл), собирали осадок с помощью центрифугирования, подсушивали. Повторно переосаждали продукт из щелочного раствора этанолом и высушивали. Полученный осадок растворяли в воде (20 мл). Раствор помещали в диализный мешок “SERVA MWC0 10000” (“Spectra”, США) и проводили диализ против воды, которую многократно меняли. Отмывку проводили до достижения нейтральных значений рН промывных вод; отсутствию поглощения при длине волны 230 нм в их УФ-спектрах. Раствор мХТЗ высушивали лиофильно.

Для потенциометрических измерений использовали рН-метр “Beckman Ф-70”

с комбинированным электродом “Futura Plus” (США). Растворы навесок модифицированного хитозана (концентрация в пробе 1 мг/мл) в 0.007 н растворе соляной кислоты титровали 0.1 М раствором щелочи с интервалом 3 мин между добавлением порций титранта при постоянном перемешивании в токе аргона и при температуре 22°C.

Измерения ζ -потенциала и размеров частиц, образующихся в смесях полимеров, проводили при 25°C на приборе “Zetasizer NanoZD” (“Malvern Instruments”, Англия) в буферных растворах. Концентрация аминогрупп мХТЗ в образце до титрования раствором ПССNa ($[ПССNa] = 5 \times 10^{-3}$ моль/л) была одинаковой и равной 6.0×10^{-4} моль/л.

Комплексы модифицированных ХТЗ с ДНК готовили в 0.01 М растворах буферов TRIS, HEPES и MES при pH 9.0, 7.4 и 5.5 при разных мольных соотношениях компонентов, выраженных как [N] : [P], где [N] — концентрация аминогрупп мХТЗ, [P] — концентрация фосфатных групп ДНК.

ИК-спектры образцов исходного ХТЗ и мХТЗ регистрировали на приборе “Perkin Elmer Spectrum One” (США), оснащенный универсальной приставкой АТR с однократным отражением от поверхности кристалла Diamant Zn–Se.

Спектры ЯМР растворов исходного ХТЗ и мХТЗ в дейтерированной соляной кислоте и D₂O соответственно регистрировали на спектрометре “VNMR400” (“Varian”, США) с рабочей частотой 400 МГц на ядрах ¹H и 100 МГц на ядрах ¹³C. Химические сдвиги измеряли относительно остаточных протонов растворителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения задачи получения растворимых производных хитозана с сохранением его первичных аминогрупп был выбран 2-стадийный способ модификации (рис. 1), предусматривающий предварительную защиту аминогрупп на 1 стадии, взаимодействие ГТМАХ с гидроксильными группами полисахарида на второй и последующее снятие защиты с аминогруппы [11]. В метод были внесены существенные изменения, касающиеся стадий кватернизации и очистки продуктов модификации, позволившие значительно повысить эффективность процесса. Для защиты аминогруппы использовали ДДС как реагент, обеспечивающий наиболее простой способ проведения защиты аминогрупп путем получения комплекса ДДС/ХТЗ, а также ее снятия разрушением комплекса. Получение комплекса ДДС/ХТЗ проводили в ДМСО при различных соотношениях компонентов. В табл. 1 приведены данные о влиянии состава исходной смеси на соотношение сульфо- и аминогрупп в комплексе, определенное по данным протонного магнитного резонанса (ПМР) как отношение интегральных интенсивностей сигналов с химическими сдвигами при 0.85 и 2.85 ppm, относящихся к группам CH₃ ДДС и группам H₂ ХТЗ соответственно.

Согласно полученным результатам для полного экранирования первичных аминогрупп ХТЗ необходим двойной избыток ДДС, что совпадает с данными, полученными ранее в работах [11, 18].

На второй стадии проводили реакцию полученных прекурсоров — комплексов ДДС/ХТЗ с ГТМАХ. Продукты реакции выделяли,

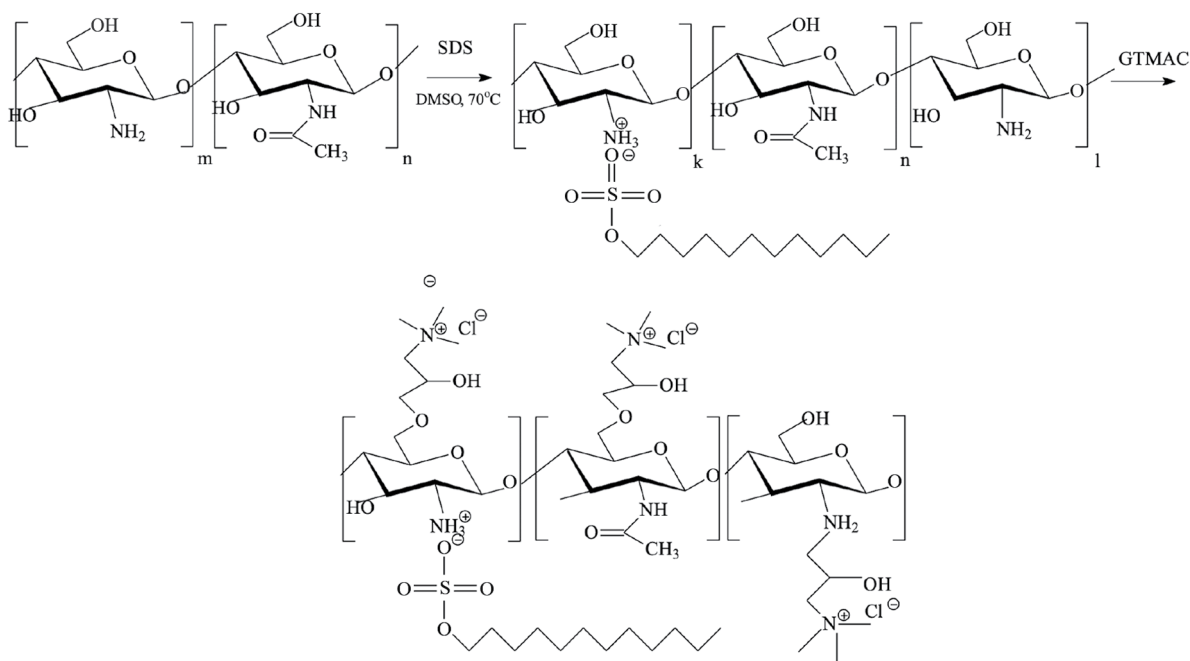


Рис. 1. Схема двухстадийного синтеза мХТЗ.

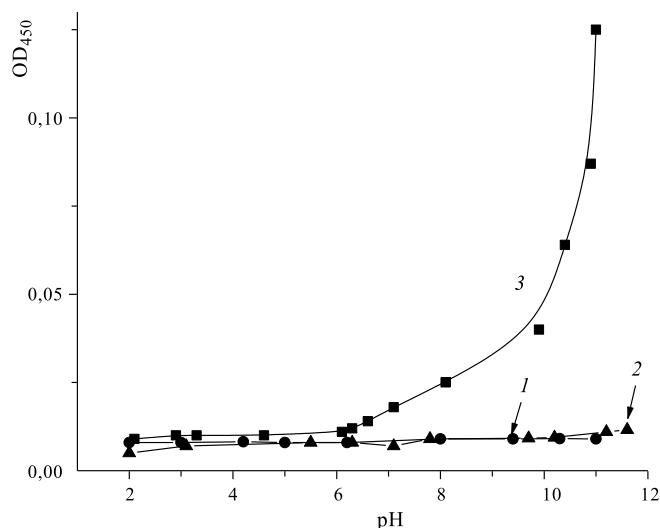


Рис. 2. Оптическая плотность при 450 нм водных растворов образцов N-мХТЗ (1), мХТЗ-1 (2), мХТЗ-3 (3) в средах с различными значениями pH.

удаляли защиту с аминогрупп, растворяя полученные продукты в 1н NaOH с последующим переосаждением полученного раствора этанолом, процедуру повторяли несколько раз. Для полного удаления ДДС требовалось проведение дополнительной очистки продукта диализом. Следует отметить, что предложенный в работах [11, 18] способ выделения и очистки продукта с использованием только диализа против 15%-ного раствора TRIS не позволял полностью удалить защиту с аминогрупп.

Растворимость образцов модифицированного ХТЗ определяли методом турбидиметрического титрования. Согласно данным, приведенным на

Таблица 1. Состав реакционной смеси и прекурсоров ДДС/ХТЗ

Образец	[SO ₃] : [NH ₂]	
	в реакционной смеси	в прекурсоре
мХТЗ-1	1 : 1	1 : 1.6
мХТЗ-2	3 : 2	1 : 1.1
мХТЗ-3	2 : 1	1 : 1

рис. 2, образец мХТЗ-3, полученный с полной защитой аминогрупп, при соотношении [SO₃]/[NH₂], равном 2 : 1, ограниченно растворялся в водных средах, тогда как образец с частичной защитой аминогруппы мХТЗ-1 обладал растворимостью сопоставимой с растворимостью N-модифицированных продуктов. Это позволило предположить, что в этом случае реакция с ГТМАХ протекала также и по аминогруппам.

Структуру полученных продуктов анализировали спектральными методами. На рис. 3 приведены ИК-спектры исходного ХТЗ и продуктов его модификации, полученных прямой реакцией по аминогруппе и двухстадийным способом с частичной и полной защитой аминогрупп. О наличии четвертичной аминогруппы в продуктах модификации свидетельствовало появление интенсивной полосы при 1477 см⁻¹, относящейся к метильным группам при четвертичном атоме азота [16, 19–21]. Основное различие между спектрами производных ХТЗ, полученных разными способами, заключалось в интенсивности полосы 1590 см⁻¹, относящейся к первичной аминогруппе. В табл. 2 приведены данные об относительных интенсивностях характеристических полос в ИК-спектрах всех исследуемых образцов, определенные с использованием

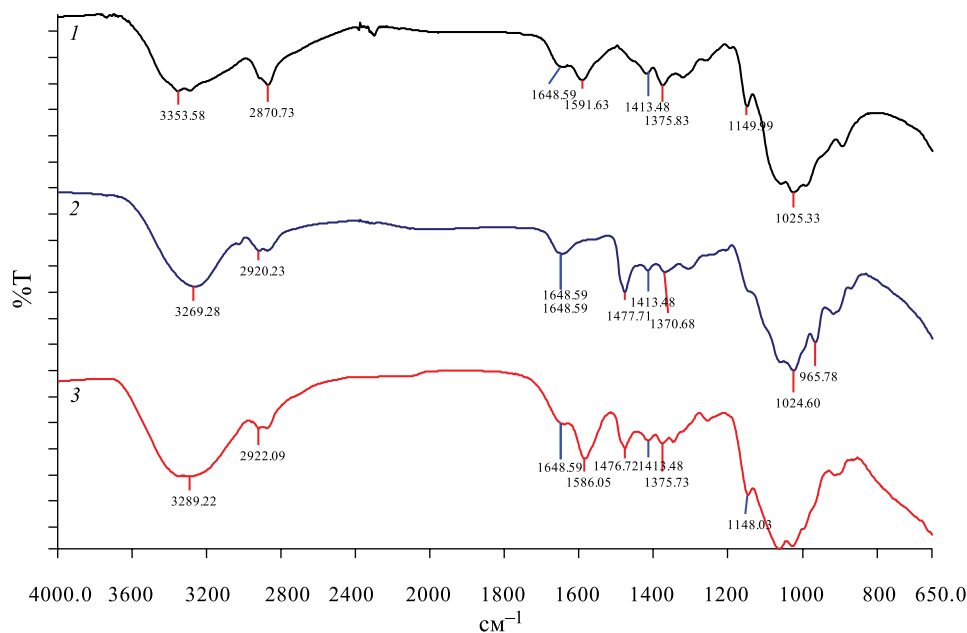


Рис. 3. ИК-Фурье-спектры образцов ХТЗ (1), N-мХТЗ (2), мХТЗ-1 (3).

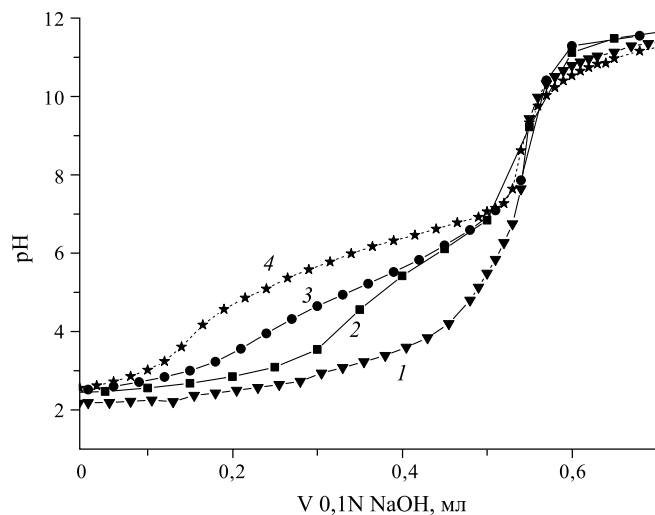


Рис. 4. Кривые потенциметрического титрования образцов N-мХТЗ (1), мХТЗ-1 (2), мХТЗ-3 (3), исходный ХТЗ (4).

в качестве внутреннего стандарта полосы 1415 см^{-1} . Там же приведены значения степеней модификации продуктов, определенные по данным ПМР, и значения содержания аминокрупп, рассчитанные по данным потенциметрического титрования.

Интенсивность полосы 1580 см^{-1} первичных аминокрупп в спектрах исходного ХТЗ и мХТЗ-3 была практически одинаковой, что подтверждало эффективность защиты аминокрупп выбранным способом. В спектре N-замещенных производных, полученных одностадийной реакцией, этой полосы нет. В то же время в спектре продуктов, полученных при частичном экранировании первичных аминокрупп мХТЗ-1, эта полоса присутствовала, и ее интенсивность была пропорциональна степени замещения первичных аминокрупп. Данные хорошо согласуются с результатами определения количества первичных аминокрупп методом потенциметрического титрования, представленными на рис. 4. Значения степени кватернизации, рассчитанные из данных потенциметрии, для продуктов, полученных одностадийным и двухстадийным синтезом при полном экранировании аминокрупп, составили 99.5 и 40% соответственно. Высоких

степеней замещения удалось достичь за счет дробного внесения ГТМАХ в реакционную среду, что позволило сократить его потери из-за частичного разрушения эпоксидных циклов в условиях реакции. Однако данные ИК-спектроскопии не позволяют однозначно определить положение кватернизованного фрагмента, поэтому структуру продуктов модификации, полученных разными способами, исследовали методом спектроскопии ЯМР.

На рис. 5 приведены спектры ЯМР ^{13}C модифицированных продуктов, полученных одностадийным способом и при различных степенях защиты первичной аминокруппы, а в табл. 3 — положение сигналов углерода, при отнесении которых пользовались литературными данными [22, 23]. В спектрах всех образцов присутствовали сигналы с химическим сдвигом 54.6 ppm , соответствующие углероду метильной группы при атоме азота. Вместе с тем сигналы αCH_2 , 2CH , 6CH_2 различались по положению в спектрах образцов N-мХТЗ и O-замещенных продуктов с полной защитой NH_2 -групп мХТЗ-3. В спектрах продуктов с частичной защитой аминокруппы мХТЗ-1 присутствовали сигналы двух типов, что подтверждало протекание реакции как по гидроксильной, так и по аминокруппе.

Таким образом, частичная защита аминокруппы до реакции с ГТМАХ приводила к получению продуктов с высокими степенями модификации, содержащих при этом первичные аминокруппы. Очевидно, что именно кватернизация части аминокрупп позволила получить продукты, обладающие растворимостью во всем диапазоне рН.

Смешанный тип замещения не только обеспечивал растворимость при разных рН, но и привел к получению поликатионов, несущих на цепях три типа аминокрупп: первичные, вторичные и четвертичные, наличие которых могло существенно влиять на характер образования и свойства их комплексов с отрицательно заряженными соединениями. Исследование поведения модифицированных продуктов в реакциях комплексообразования проводили на примере модельного полианиона — ПССНа, являющегося сильным полиэлектролитом, заряд которого не зависит от рН

Таблица 2. Относительные интенсивности характеристических полос в ИК-спектрах образцов ХТЗ и мХТЗ, значения степеней кватернизации и содержания NH_2 -групп

Образец	$A_{\text{отн}} 1580\text{ см}^{-1}$ NH_2	$A_{\text{отн}} 1477\text{ см}^{-1}$ $\text{N}(\text{CH}_3)_3$	Степень кватернизации, % масс.*	Содержание NH_2 , % масс.**
Хитозан	1.3	0	0	90
N-мХТЗ	0	1.27	99.5	0
мХТЗ-3	1.3	1.05	40.5	88
мХТЗ-1	1.04	1.24	90	54

*По данным ЯМР ^1H ; **по данным потенциметрического титрования.

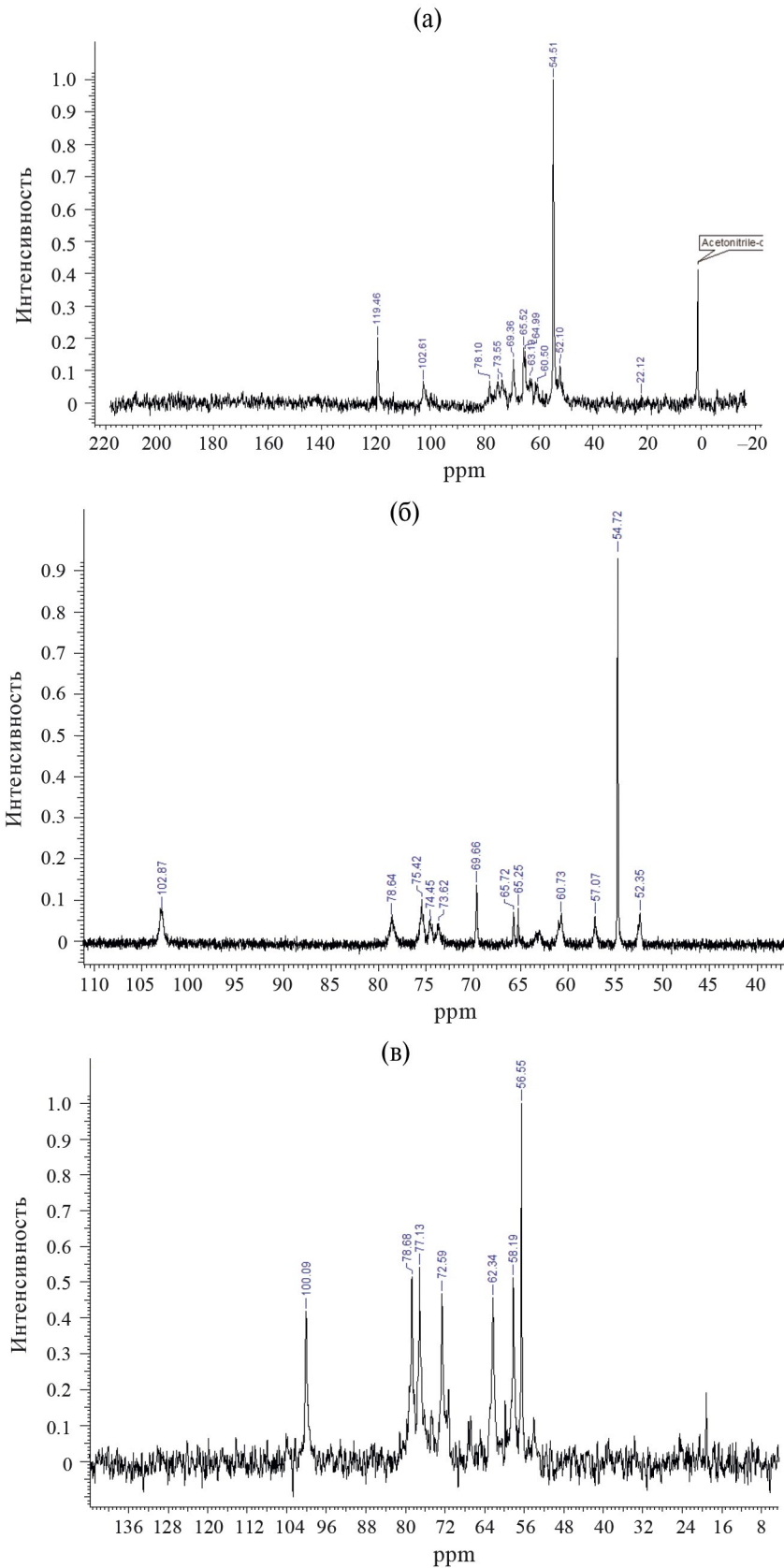


Рис. 5. Спектры ЯМР ¹³C модифицированных продуктов N-мХТЗ (а), мХТЗ-1 (б) и мХТЗ-3 (в) в D₂O.

Таблица 3. Положение сигналов углерода в спектрах ЯМР ^{13}C модифицированных продуктов

Образец	Группа/положение сигнала, ppm			
	αCH_2	2 CH	6 CH_2	$\text{CH}_3(\text{N})$
N-мХТЗ	52.3	62.9	61.7	54.6
мХТЗ-3	74.6	58.2	72.4	56.7
мХТЗ-1	52.2 и 75.3	57.1 и 62.9	60.9 и 69.6	54.6

среды, что значительно упростило интерпретацию полученных результатов. Готовили комплексы разного состава в средах с разными значениями pH (9.0, 7.4, 5.5) и измеряли χ -потенциал полученных частиц. Концентрация $[-\text{SO}_3^-]$ групп в полианионе была постоянной и составляла 6×10^{-4} моль/л; измерения проводили при 25°C. Выбор сред для исследования был обусловлен практическими соображениями. Для возможного применения систем на основе этих поликатионов в медицине важны среды с pH 7.4, отвечающие физиологическим условиям, и слабокислые среды с pH 5.5, характерным для некоторых клеточных органелл, например лизосом, а также для патологических клеток. Щелочные среды с pH 9.0 выбраны для выявления вклада четвертичных аминогрупп модифицированных ХТЗ, поскольку при таких значениях pH именно они определяют заряд поликатиона. В нейтральных и слабокислых средах заряжаются как первичные, так и вторичные аминогруппы, внося свой вклад в процесс образования комплексов.

Составы комплексов модифицированных ХТЗ и ПССNa, отвечающих точке нейтрализации, то есть равному количеству положительных и отрицательных зарядов в комплексах, представлены в табл. 4. При титровании поликатионов в слабощелочных средах, где заряжены только их четвертичные аминогруппы, для достижения точки эквивалентности как для N-мХТЗ, так и для мХТЗ-1 необходимо добавить эквивалентное количество групп $-\text{SO}_3^-$. При переходе в нейтральные среды для нейтрализации поликатионов требуется

избыточное количество полианиона: для N-мХТЗ, в молекулах которого присутствуют вторичные аминогруппы, необходимо добавить избыток в 0.17 моля, а для мХТЗ-1, который содержит и вторичные и первичные аминогруппы, необходим избыток в 0.6 моля. Еще значительнее эта разница становится в кислых средах, где степень ионизации первичных аминогрупп возрастает.

Полученные результаты показали зависимость состава комплексов, соответствующих точке нейтрализации, от pH среды и хорошо согласовывались с содержанием первичных аминогрупп, определенным по результатам потенциометрического титрования (табл. 2).

Как уже упоминалось выше, одним из возможных применений модифицированных ХТЗ является создание на их основе систем трансфекции — полиплексов, при этом ключевым параметром для достижения эффективности действия являются размеры полиплексов. Влияние структуры поликатионов на образование и свойства их комплексов с ДНК изучали на примере ДНК тимуса теленка. Были приготовлены растворы комплексов с образцами N-мХТЗ и мХТЗ-1 в фосфатном буфере и методом динамического светорассеяния определены их размеры. На рис. 6 приведены размеры комплексов, полученных при разном мольном соотношении компонентов. Как видно из рис. 6, размеры комплексов с образцом мХТЗ-1 были меньше, чем с N-мХТЗ при всех соотношениях компонентов. Поскольку содержание четвертичных аминогрупп в образцах имеет близкие значения, можно

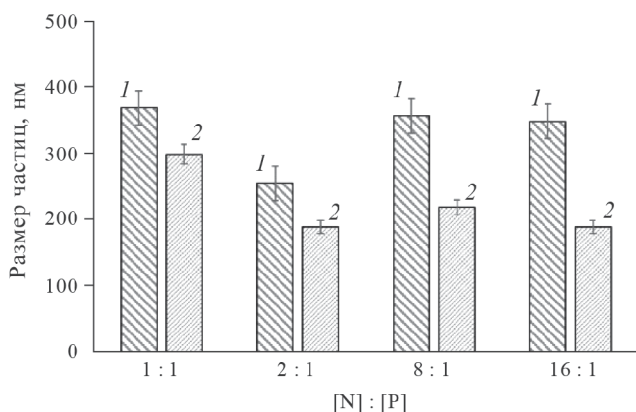


Рис. 6. Размеры частиц полиплексов, полученных при разном соотношении компонентов мХТЗ/ДНК (фосфатный буфер, pH 7.4): 1 — N-мХТЗ; 2 — мХТЗ-1.

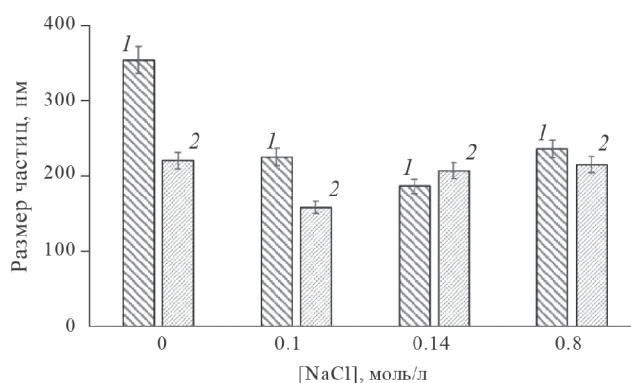


Рис. 7. Размеры частиц полиплексов состава мХТЗ/ДНК = 8 : 1 в растворах фосфатного буфера с pH 7.4 при различной концентрации соли NaCl: 1 — N-мХТЗ/ДНК, 2 — мХТЗ-1/ДНК.

Таблица 4. Состав комплексов ПССNa/мХТЗ в точке нейтрализации в средах с различными значениями рН

Образец	Соотношение –/+ в точке нейтрализации*		
	9.0	7.4	5.5
мХТЗ-1	1.0	1.6	2.2
N-мХТЗ	1.0	1.17	2.0

*(-/+) — мольное отношение сульфонатных групп ПССNa к аминогруппам мХТЗ.

предположить, что уменьшение размеров обусловлено вкладом первичных аминогрупп в связывание и, вероятно, более компактной конформацией макромолекулы мХТЗ-1.

Стабильность полиплексов в физиологических условиях является параметром, определяющим возможность их практического использования. Была исследована стабильность комплексов мХТЗ-ДНК в фосфатном буфере. На рис. 7 приведены размеры комплексов, определенные при различных концентрациях соли в буферном растворе. Увеличение концентрации соли до ее значений в физиологических условиях (0.14 М) не приводило к увеличению размеров частиц или появлению мультимодальности, то есть к разрушению полиплексов. Более того, размеры комплексов практически не изменялись и при высоких концентрациях соли — вплоть до 0.8 моль/л. Полученные данные позволяют сделать вывод, что полиплексы обладают стабильностью в условиях близких к физиологическим.

Таким образом, разработан метод получения производных ХТЗ, содержащих три типа аминогрупп (первичные, вторичные и четвертичные) и обладающих растворимостью во всем диапазоне рН. Структура полученных продуктов изучена спектральными методами. Показано, что для получения растворимых продуктов необходимо наличие 50% кватернизованных аминогрупп. Разница в рН-чувствительности N- и N-, O-модифицированных продуктов выявлена на примере их комплексов с модельным полианионом — ПССNa. Продемонстрирована возможность получения на основе мХТЗ комплексов с ДНК — полиплексов, обладающих стабильностью в условиях близким к физиологическим. Показано, что наличие первичных аминогрупп на цепях поликатионов приводит к уменьшению размеров полиплексов. Полученные результаты могут составить основу для разработки систем доставки лекарственных средств и генетического материала.

Авторы выражают благодарность сотрудникам АО “Институт пластмасс” И.М. Шелониной и С.Г. Алексеевой за выполнение спектральных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках государственного задания Института нефтехимического синтеза РАН за счет средств бюджета института. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Harugade A., Sherje A. P., Pethe A.* // *React. Func. Polym.* 2023. V. 191. P. 105634. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105634>
2. *Verma D., Okhawilai M., Goh K. L., Thakur K. V., Senthilkumar N., Sharma M., Uyama H.* // *Environ. Res.* 2023. V. 235. P. 116580. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116580>
3. *Горшенин Д. С., Жернов Ю. В., Кривцов Г. Г., Хатмов М. Р.* // *Иммунология.* 2020. Т. 41. № 5. С. 470–478. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-5-470-478>
4. *Iqbal Y., Ahmed I., Irfan M. F., Chatha S. A. S., Zubair M., Ullah A.* // *Carbohydr. Polym.* 2023. P. 121318. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121318>
5. *Tang W., Wang J., Hou H., Li Y., Wang J., Fu J. et al.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2023. V. 240. P. 124398. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124398>
6. *Горшкова М. Ю., Волкова И. Ф., Алексеева С. Г., Молоткова Н. Н., Скорикова Е. Е., Изумрудов В. А.* // *Высокомолекулярные соединения. Сер. А.* 2011. Т. 53. № 1. С. 60–69.
7. *Yevlampieva N. P., Gubarev A. S., Gorshkova M. Yu., Okrugin B. M., Ryumtsev E. I.* // *J. Polym. Res.* 2015. V. 22. P. 166. <https://doi.org/10.1007/s10965-015-0802-7>
8. *Izumrudov V. A., Volkova I. F., Gorshkova M. Yu.* // *Eur. Polym. J.* 2013. V. 49. P. 3302–3308. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.07.003>
9. *Faizuloev E., Marova A., Nikonova A., Volkova I., Gorshkova M., Izumrudov V.* // *Carbohydr. Polym.* 2012. V. 89. № 4. P. 1088–1094
10. *Wan A., Xu Q., Yan Sun Y., Li H.* // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 6921–6928. <https://doi.org/10.1021/jf402242e>
11. *Gruškienė R., Deveikytė R., Makuška R.* // *Chemija.* 2013. V. 24. № 4. P. 325–334.
12. *Belalia R., Grelie S., Benaissa M., Coma V.* // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 1582. <https://doi.org/10.1021/jf071717>
13. *Dormard A., Rinaudo M., Terrassin C.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 1986. V. 8. P. 105–107.

14. *Makuska R., Gorochovceva N.* // Carbohydr. Polym. 2006. V. 64. № 2. P. 319–327.
15. *Holappa J., Nevalainen T., Savolainen J., Soininen P., Elomaa M., Safin R., Suvanto S., Pakkanen T., Masson M., Loftsson T., Järvinen T.* // Macromolecules. 2004. V. 37. № 4. P. 2784–2789.
16. *Lim S. H., Hudson S. M.* // Carbohydr. Res. 2004. V. 339. № 2. P. 313–319.
17. *Olins D. E., Olins F. L., von Hippel P. H.* // J. Mol. Biol. 1967. V. 24. № 2. P. 157–176.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90324-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90324-5)
18. *Cai G., Jiang H., Tu K., Wang L., Zhu K.* // Macromol. Biosci. 2009. V. 9. P. 256–261.
<https://doi.org/10.1002/mabi.200800153>
19. *Loubaki E., Sicsic S., Le Goffic F.* // Eur. Polym. J. 1989. V. 25. P. 379–384.
20. *Беллами И.* Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул. М: Мир, 1971. 318 с.
21. *Nakanishi Von K.* Infrared Absorption Spectroscopy. Tokio: Verlag Holden-Day, Inc., San Francisco und Nankodo Co. 1962.
22. *Леви Г., Нельсон Г.* Руководство по ЯМР ¹³C для химиков-органиков. М.: Мир, 1975.
23. *Le Roy F., Jolnson, Jankowski W. G.* Carbon ¹³C-NMR Spectra. New York; London; Sidney, Toronto: Wiley, 1972.

Functional Derivatives of Chitosan, Soluble in Neutral Medium as Drugs and Genetic Material Carrier: Preparation and Properties

M. Yu. Gorshkova^{a, *}, E. S. Gigoryan^a, and I. F. Volkova^a

A. V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis RAS, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: mgor@ps.ac.ru*

Method of chitosan modification, providing controlled addition of the quaternized block has been proposed. The structure of the products obtained were studied by FT-IR and NMR spectroscopy; their solubility and acid-base properties was characterized by turbodimetry and potentiometry, respectively. Presence about 50% of quaternized amino groups was shown to be necessary to obtain soluble products. The difference in pH-sensitivity of modified derivatives with different types of quaternized block attachment was revealed by studying their interaction with a model polystyrene sulfonate anion. The possibility of preparing complexes based on the obtained derivatives with DNA — polyplexes, stable under conditions close to physiological ones has been demonstrated. It was shown the presence of primary amino groups on the polycation chains leads to a decrease in the polyplex size. The data obtained can form the basis for development of drug and genetic material delivery system.

The 2-stage method of chitosan modification providing controlled addition of the quaternized block has been proposed. The structure of the products obtained were studied by FT-IR and NMR spectroscopy; their solubility and acid-base properties was characterized by turbodimetry and potentiometry, respectively. The presence about 50% of quaternized amino groups was shown to be necessary to obtain soluble products. The difference in pH-sensitivity of modified derivatives with different types of quaternized block attachment was revealed by studying their interaction with a model polystyrene sulfonate anion. The possibility of preparing complexes based on the obtained derivatives with DNA, polyplexes stable under conditions close to physiological ones has been demonstrated. It is shown that the presence of primary amino groups on the polycation chains leads to a decrease in the polyplex size. The data obtained can form the basis for development of drug and genetic material delivery systems.

Keywords: chitosan, soluble chitosan derivatives, quaternized chitosan derivatives, drug delivery systems, polyplexes, transfection