

УДК 541.64

ВЛИЯНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛИ(ОЭГМА) И ПОЛИ(КБМА), ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ АТРП

Қаупбаева Б.Б.^{1*}, Цой А.К.¹, Мурата Х.², Касенова А.М.^{1,3}, Аскарова Ш.Н.¹¹ Лаборатория Биомедицинской Инженерии и Регенеративной Медицины, Национальная Лаборатория Астана, Назарбаев Университет, 010000, Астана, Казахстан² Департамент Химии, Университет Карнеги Меллона, 15213, Питтсбург, Соединенные Штаты Америки³ Кафедра Общей Биологии и Геномики Института Естественных Наук Евразийского Национального Университета имени Л.Н. Гумилева, 010008, Астана, Казахстан

*Автор для корреспонденции: bibifatima.kaupbayeva@nu.edu.kz

АННОТАЦИЯ

В настоящем исследовании разработаны оптимальные условия радикальной полимеризации с переносом атома (АТРП – atom-transfer radical polymerization) мономеров олиго(этиленгликоль)метакрилата (ОЭГМА) и карбоксибетаниметакрилата (КБМА) с использованием инициаторов различной функциональности для получения функциональных гидрофильных полимеров, перспективных для биоинженерной и модификации белков, ДНК, РНК и других биологических макромолекул. Основное внимание уделено влиянию типа лиганда, иницирующей системы и продолжительности полимеризации на кинетику процесса, молекулярно-массовые характеристики и гидродинамический размер получаемых полимеров. Для полимеризации ОЭГМА использовали 2,2'-бипиридин в качестве лиганда. При аналогичных условиях применение 2,2'-бипиридина для КБМА не приводило к образованию полимера, что указывает на различия в реакционной способности мономеров и их взаимодействии с каталитической системой. Для полимеризации КБМА в качестве альтернативного лиганда использовали 1,1,4,7,10,10-гексаметилтриэтилентетрамин (ГМТЭТА). В присутствии ГМТЭТА полимеризация КБМА протекала значительно быстрее, однако сопровождалась более высокой дисперсностью получаемых полимеров, что свидетельствует о меньшей степени контроля процесса. Для обоих мономеров исследовали влияние продолжительности полимеризации и функциональности инициатора на степень полимеризации, молекулярную массу, дисперсность ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) и гидродинамический диаметр (D_h). Установлено, что для ОЭГМА увеличение продолжительности реакции обеспечивает последовательный рост молекулярной массы и гидродинамического диаметра при сохранении относительно узкого молекулярно-массового распределения, тогда как для КБМА основные молекулярно-массовые характеристики формируются уже на ранних стадиях полимеризации. Полученные закономерности имеют значение для разработки воспроизводимых полимерных платформ для биоинженерии, поскольку контролируемая длина и архитектура полимерных цепей являются важными параметрами при создании белок-полимерных конъюгатов методом АТРП. Поли(ОЭГМА), содержащий олигоэтиленгликолевые фрагменты, и поли(КБМА), относящийся к классу цвиттерионных полимеров, представляют перспективные материалы для модификации белков, регулирования их стабильности и функциональных свойств, а также для потенциального применения в доставке лекарственных средств и биомедицинских технологиях. Таким образом, полученные результаты подчеркивают необходимость подбора каталитической системы, лиганда, функциональности инициатора и продолжительности реакции с учетом химической природы мономера для получения полимеров с контролируемыми характеристиками, пригодных для дальнейшего использования в биоинженерных системах.

Ключевые слова: радикальная полимеризация с переносом атома; олиго(этиленгликоль)метакрилата (ОЭГМА); карбоксибетаниметакрилата (КБМА); 2,2'-бипиридин; 1,1,4,7,10,10-гексаметилтриэтилентетрамин (ГМТЭТА); молекулярная масса; дисперсность; гидродинамический диаметр; кинетика полимеризации.

ВВЕДЕНИЕ

Контролируемая радикальная полимеризация является одним из наиболее эффективных подходов к синтезу функциональных полимеров с заданными молекулярно-массовыми характеристиками и архитектурой [1-6]. Среди методов контролируемой радикальной полимеризации радикальная полимеризация с переносом атома (АТРП – atom-transfer radical polymerization) получила широкое распространение благодаря возможности регулирования длины полимерных цепей, молекулярной массы и дисперсности полимеров за счет установления равновесия между активными и неактивными формами растущих цепей [1, 2, 7-12]. Существенное влияние на кинетику и степень контроля АТРП оказывают природа мономера, инициатора, катализатора и лиганда, а также соотношение компонентов реакционной системы и продолжитель-

ность полимеризации [7, 13-16].

Биомедицинский и биоинженерный интерес к контролируемой полимеризации водорастворимых функциональных мономеров связан, в частности, с возможностью использования АТРП для получения белок-полимерных конъюгатов методом «grafting-from», при котором полимерная цепь выращивается непосредственно с предварительно функционализированной поверхности белка. Такой подход позволяет контролировать длину и архитектуру полимерной цепи и тем самым целенаправленно изменять свойства белкового компонента. Ранее Матишевский и Рассел показали возможность проведения АТРП в водной среде при биологически релевантных условиях, также именуемую как био-АТРП, с ростом полимеров непосредственно с поверхности белков при сохранении их структуры [2, 8, 17, 18]. В последующих исследованиях

было показано, что полимерная модификация может использоваться как инструмент белковой инженерии для регулирования стабильности, активности и других функциональных характеристик ферментов, которые могут быть использованы в стабилизации биомолекул, доставке лекарственных средств и биомедицинских технологиях [3, 9-11, 13, 19-21].

Особый интерес в этом контексте представляют полимеры, содержащие гидрофильные и гидратационно-активные фрагменты. Олиго(этиленгликоль)метакрилат (ОЭГМА) является ПЭГ-подобным полимером, поскольку его боковые цепи содержат олигоэтиленгликолевые фрагменты [4, 16, 22, 23]. Было показано, что ОЭГМА может быть выращен непосредственно с поверхности белка методом АТРП с формированием сайт-специфических белок–полимерных конъюгатов, способных существенно изменять фармакокинетические свойства белковых молекул [2]. Это делает ОЭГМА особенно перспективным строительным блоком для разработки полимерных оболочек и конъюгатов белков, предназначенных для биомедицинского применения и доставки белковых лекарственных препаратов.

Карбоксибетаинметакрилат (КБМА), в свою очередь, представляет интерес как мономер для получения цвиттерионных полимеров [13, 19]. Цвиттерионные полимерные цепи характеризуются высокой гидрофильностью и способностью удерживать гидратационную оболочку, что может способствовать снижению нежелательных биологических взаимодействий с различными молекулами организма, в частности с компонентами иммунной системы [13]. Кроме того, было продемонстрировано, что конъюгаты полученные методом белок–поли(КБМА) АТРП отличаются длительным временем жизни в кровотоке, причем этот параметр зависел от структуры цвиттерионного полимера [24]. Таким образом, КБМА представляет перспективный класс полимеров для создания биосовместимых белок–полимерных конструкций.

Свойства белок–полимерных конъюгатов зависят от молекулярной массы, длины цепи, плотности полимерного покрытия и химической природы полимера. Исследования в области белковой инженерии показали, что характеристики полимерной цепи могут определять взаимодействие полимера с белком и, как следствие, влиять на его стабильность и функциональность [22, 24, 25]. Поэтому получение полимеров с воспроизводимыми молекулярно-массовыми характеристиками и контролируемой длиной цепи является необходимым этапом перед их использованием для модификации белков. В этом отношении изучение каталитической среды, природы лиганда и продолжительности АТРП имеет не только фундаментальное значение для контроля полимеризации, но и практическое значение для последующего создания воспроизводимых биоинженерных белок–полимерных систем.

Несмотря на общие особенности контролируемой полимеризации метакрилатных мономеров, ОЭГМА и КБМА могут существенно различаться по реакционной способности и взаимодействию с каталитической системой [2]. В частности, выбор лиганда является критически важным параметром при разработке эффективной АТРП-системы. 2,2'-Бипиридин широко применяется в

медь-катализируемой АТРП, однако его эффективность зависит от природы полимеризуемого мономера [13, 14, 23]. Альтернативные лиганды, такие как 1,1,4,7,10,10-гексаметилтриэтилентетрамин (ГМТЭТА), могут обеспечивать более высокую скорость полимеризации, но при этом изменение кинетического баланса системы может приводить к снижению степени контроля и увеличению дисперсности полимера [18, 26].

С практической точки зрения для дальнейшего применения таких полимеров в биоинженерии необходимо обеспечить воспроизводимость их получения и возможность регулирования молекулярной архитектуры. Особенно важным является получение унифицированного подхода к АТРП, позволяющего получать полимеры с предсказуемыми молекулярно-массовыми характеристиками, узким распределением молекулярных масс и контролируемой длиной цепей. Такие характеристики имеют непосредственное значение при последующем использовании полимеров в белок–полимерных конъюгатах, поскольку длина и молекулярная масса полимерной цепи могут определять гидродинамический размер конъюгата, его взаимодействие с белковой поверхностью и биологические свойства. Поэтому оптимизация каталитической среды и времени полимеризации является необходимой основой для разработки воспроизводимой платформы получения функциональных полимеров для последующего применения в белковой инженерии, биотехнологии, доставке лекарственных средств и медицине.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось исследование влияния типа лиганда, иницирующей системы и продолжительности реакции на процесс АТРП ОЭГМА и КБМА. Для ОЭГМА использовали 2,2'-бипиридин, тогда как для КБМА применяли ГМТЭТА, поскольку использование 2,2'-бипиридина не приводило к образованию полимера. Полученные полимеры сравнивали по степени полимеризации мономера, молекулярно-массовым характеристикам, дисперсности и гидродинамическому диаметру. Особое внимание уделено сравнению полимеризации с использованием однофункциональной и двухфункциональных инициаторов и оценке взаимосвязи между скоростью полимеризации и степенью контроля над молекулярной архитектурой получаемых полимеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Олиго(этиленгликоль)метакрилат (ОЭГМА) (CAS 26915-72-0), 2,2'-бипиридин (CAS 366-18-7), 1,1,4,7,10,10-гексаметилтриэтилентетрамин (ГМТЭТА) (CAS 3083-10-1), медный катализатор (Cu(I) (CAS 7758-89-6), Cu(II) (CAS 7447-39-4)) (Sigma-Aldrich). 3-[[2-(метакрилоилокси)этил]диметиламмоний]-пропионат (КБМА) (CAS 24249-95-4) был приобретен у компании TCI America. Однофункциональный и двухфункциональный инициаторы АТРП были синтезированы по протоколу описанному ранее (Рисунок 1) [26]. Диализные трубки (Spectra/Por, Spectrum Laboratories Inc., Калифорния) (ThermoFisher, CAS 88244).

Синтез полимеров методом АТРП.

Синтез ОЭГМА полимеров с однофункциональным инициатором. Для синтеза был приготовлен раствор 5мМ

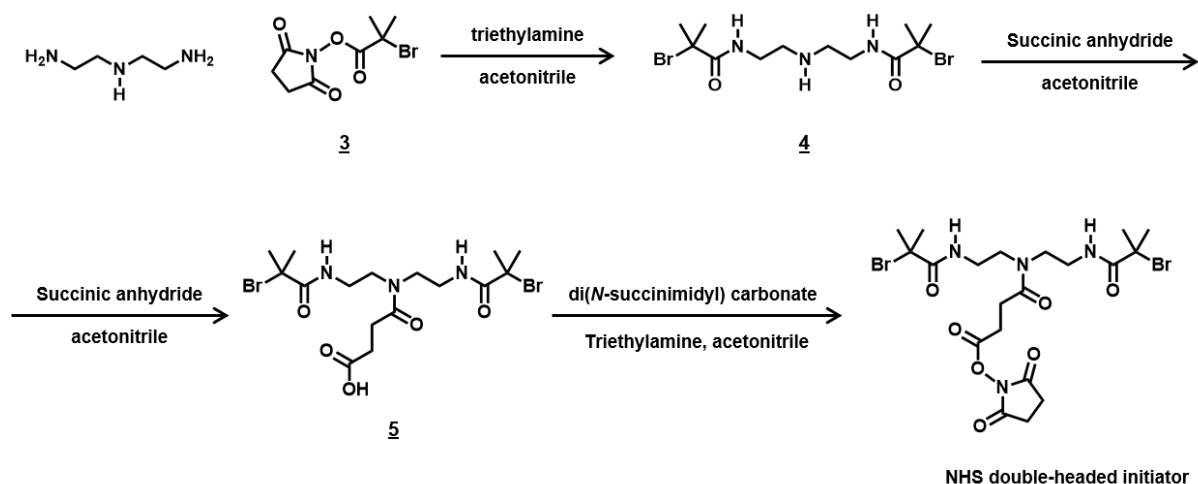


Рисунок 1. Синтез одно- и двухфункциональных АТРП инициаторов.

CuCl , 45 mM CuCl_2 , а также 110 mM бипиридина. В 10 мл деионизированной воды растворяли 60,5 мг CuCl_2 (0,45 ммоль, 45 mM) и 164,3 мг бипиридина (1,1 ммоль, 110 mM). Кислород вымещали из раствора методом продувания аргоном. В отдельной емкости растворяли 5 мг CuCl (0,05 ммоль, 5 mM) в 9 мл деионизированной воды, для деоксигенации полученный раствор продули аргоном. Затем к деоксигенированному раствору CuCl приливали 1 мл раствора CuCl_2 и бипиридина. Однофункциональный инициатор (1,2 мг, 0,005 ммоль) и ОЭГМА (478 мг, 0,5 ммоль для pOЭГМА_{200}) растворяли в фосфатном буфере (4 мл, 0,1 M, pH 8). Раствор состоящий из инициатора и мономера загерметизировали резиновой пробкой и продували аргоном в течение 30 мин. К раствору деоксигенированного инициатора и ОЭГМА приливали деоксигенированный медный катализатор (1 мл), после чего реакция протекала в течение 24 часов при комнатной температуре. Реакцию останавливали с помощью атмосферного кислорода, путем разгерметизации пробирки; полимеры очищали методом диализа (3,5 кДа MWCO) в деионизированной воде в течение 24 часов при 4°C, полученный раствор лиофилизировали для дальнейшего использования.

Синтез ОЭГМА полимеров с двухфункциональным инициатором. Для синтеза был приготовлен раствор 5 mM CuCl , 45 mM CuCl_2 , а также 110 mM бипиридина. В 10 мл деионизированной воды растворяли 60,5 мг CuCl_2 (0,45 ммоль, 45 mM) и 164,3 мг бипиридина (1,1 ммоль, 110 mM). Кислород из раствора вымещали продуванием аргоном. В отдельной пробирке растворяли 5 мг CuCl (0,05 ммоль, 5 mM) в 9 мл деионизированной воды и для деоксигенации продули аргоном. Затем к деоксигенированному раствору CuCl добавляли 1 мл раствора CuCl_2 . Двухфункциональный инициатор (2,5 мг, 0,005 ммоль) и ОЭГМА (956 мг, 0,5 ммоль для pOЭГМА_{200}) растворяли в фосфатном буфере (4 мл, 0,1 M, pH 8). Затем раствор, содержащий инициаторы и мономеры герметизировали резиновой пробкой и продували аргоном в течение 30 мин. К раствору деоксигенированного инициатора и ОЭГМА прилили деоксигенированный медный катализатор (1 мл), после чего реакция протекала в течение 24 часа при комнатной температуре. Реакцию останавливали атмосферным кислородом путем разгерметизации пробирки; полимеры очищали диализом (3,5 кДа MWCO) против де-

ионизированной воды в течение 24 часов при 4°C, а затем лиофилизировали.

Синтез КБМА полимеров с однофункциональным инициатором. Для выполнения процедуры синтеза однофункциональный инициатор (1,2 мг, 0,005 ммоль) и КБМА (232 мг, 0,5 ммоль для пКБМА_{200}) растворяли в фосфатном буфере (9 мл, 0,1 M, pH 8). Раствор состоящий из инициатора и мономера герметизировали резиновой пробкой и продували аргоном в течение 30 мин. К деоксигенированному CuCl_2 (1,2 мл, 50 mM) прилили аскорбат натрия (60 мкл, 20 мг/мл, 0,1 ммоль) и ГМТЭТА (20 мкл) и снова продули аргоном в течение 5 мин. К раствору деоксигенированного инициатора и КБМА добавляли деоксигенированный медный катализатор (1 мл), после чего реакция протекала в течение 24 часа при комнатной температуре. Реакцию останавливали атмосферным кислородом путем разгерметизации пробирки; полимеры очищали диализом (3,5 кДа MWCO) в деионизированной воде в течение 24 часов при 4°C, а затем лиофилизировали.

Синтез КБМА полимеров с двухфункциональным инициатором. Аналогично предыдущему протоколу двухфункциональный инициатор (2,5 мг, 0,005 ммоль) и КБМА (484 мг, 1 ммоль для пКБМА_{200}) растворяли в фосфатном буфере (9 мл, 0,1 M, pH 8). Раствор инициатора и мономера герметизировали резиновой пробкой и продували аргоном в течение 30 мин. В отдельной колбе раствор CuCl_2 (1,2 мл 50 mM) продули аргоном в течение 2 мин. К деоксигенированному CuCl_2 (1,2 мл 50 mM) добавили аскорбат натрия (60 мкл 20 мг/мл, 0,1 ммоль) и ГМТЭТА (20 мкл) и снова продували аргоном в течение 5 мин. К раствору инициатора и мономера добавляли деоксигенированный медный катализатор (1 мл) и давали реакции протекать в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакцию останавливали атмосферным кислородом путем разгерметизации пробирки. Полученный раствор полимеров очищали диализом (3,5 кДа MWCO) в деионизированной воде в течение 24 часов при 4°C, а затем лиофилизировали.

Для исследования кинетики процесса полимеризации для всех полимеров в ходе реакции отбирали алиquotы через 1, 2, 4, 8 и 24 ч после начала полимеризации, а также через 15, 30, 45, 60 и 120 мин для полимеров КБМА. Ка-

жду отобранную пробу подвергали воздействию воздуха для прекращения дальнейшей полимеризации и деактивации каталитической системы. После остановки реакции образцы очищали диализом в деионизированной воде для удаления свободных низкомолекулярных компонентов, остатков мономеров, лигандов и каталитических компонентов. После завершения диализа образцы использовали для последующей физико-химической охарактеризации.

Определение молярной массы и дисперсности полимеров. Для определения числовой (M_n) и средневесовой (M_w) молекулярной массы, а также индекса полидисперсности (M_w/M_n) расщепленного полимера использовали метод гель-проникающей хроматографии (ГПХ). ГПХ выполняли на приборе Waters 2695 Series с процессором данных и детектором показателя преломления (RI). Все замеры молярной массы образцов выполнялись в трех повторностях.

В качестве рабочего буфера использовали 100 мМ фосфатный буфер (pH 7,0) и 0,01 об.% натрий азида. Концентрация вводимых образцов была 1 мг/мл и объем вводимой пробы составляла 100 мкл. Температура анализа составляла 24 °С. Разделение полимеров проводили с использованием колонок для водной эксклюзионной хроматографии, предназначенных для анализа водорастворимых полимеров. Колонки имели гидрофильную неподвижную фазу и обеспечивали фракционирование полимеров по гидродинамическому объёму в диапазоне молекулярных масс, соответствующем исследуемым образцам. Скорость потока рабочего буфера составляла 1 мл/мин. Для калибровки использовали узкие стандарты пуллулана.

Определение длины цепей полимеров, полученных с использованием двухинициаторной системы. Для полимеров, синтезированных с использованием двухинициаторной системы, дополнительно проводили кислотный гидролиз с целью разрушения соответствующего связующего фрагмента и разделения полимерной структуры на отдельные цепи. Для этого полимеры (20 мг/мл) растворяли в 6 N HCl и инкубировали при 110 °С под вакуумом в течение 24 ч. Расщепленные полимеры очищали диализом (MWCO 1 кДа) в течение 24 ч в деионизированной воде, затем лиофилизировали до получения порошка для дальнейшей охарактеризации при помощи ГПХ.

Определение степени полимеризации полимеров. Для определения степени полимеризации использовали среднечисловую молекулярную характеристику M_n , полученную методом ГПХ. Степень полимеризации рассчитывали как отношение M_n к молярной массе соответствующего мономера: степень полимеризации = M_n/M_0 , где M_0 — мо-

лярная масса мономера. Для ОЭГМА использовали молярную массу 475 г/моль, а для КБМА — 229,28 г/моль. Для двухцепочечных конструкций, перед анализом методом ГПХ проводили кислотный гидролиз, обеспечивающий разделение двух полимерных цепей. Поэтому при расчёте степени полимеризации учитывалась молярная масса одной полимерной цепи, а не всей двухцепочечной конструкции. Масса иницирующего или концевой фрагмента отдельно не учитывалась.

Определение гидродинамического диаметра полимеров. Гидродинамический диаметр полимерных частиц в водном растворе определяли методом динамического рассеяния света на Malvern Zetasizer nano-ZS. Измерения проводили для очищенных полимерных образцов, растворенных в 0.1 молярном фосфатном буфере в концентрации 1 мг/мл. Полученные значения гидродинамического диаметра (D_h) использовали для оценки размеров макромолекул в растворе и их изменения в зависимости от продолжительности полимеризации. Определение гидродинамического диаметра образцов выполняли в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетическое исследование АТР-полимеризации ОЭГМА с однофункциональным инициатором. Для оценки кинетических закономерностей АТР-полимеризации ОЭГМА с монофункциональным инициатором в присутствии 2,2'-бипиридина были исследованы образцы, полученные при различной продолжительности полимеризации — 1, 2, 4, 8 и 24 ч. Основные молекулярно-массовые характеристики полученных полимеров и значения гидродинамического диаметра представлены в таблице 1.

С увеличением продолжительности полимеризации наблюдается закономерное увеличение среднечисловой и среднечисловой молекулярных масс полимера (Рисунок 2). Так, при увеличении времени реакции с 1 до 24 ч значение возрастает с 11,1 до 32,4 кг/моль, тогда как увеличивается с 13,0 до 38,3 кг/моль. Наиболее выраженное увеличение молекулярной массы наблюдается в течение первых 8 ч полимеризации, после чего рост становится менее интенсивным.

При этом значения дисперсности молекулярно-массового распределения (M_w/M_n) во всем исследованном интервале времени остаются относительно низкими и находятся в диапазоне 1,15–1,18. Минимальное значение наблюдается для образцов, полученных через 2 и 4 ч, тогда как после 24 ч значение увеличивается лишь до 1,18. Сохранение низкой и практически постоянной дисперсности при увеличении молекулярной массы указывает на достаточно

Таблица 1. Определение физических свойств ОЭГМА полимеров с однофункциональным инициатором

Время полимеризации (час)	M_n (кг/моль)	M_w (кг/моль)	M_w/M_n (Е)	Степень полимеризации	D_h (нм)
1	11.1	13.0	1.17	23	3.78 ± 0.35
2	15.7	18.0	1.15	33	4.2 ± 0.18
4	22.0	25.2	1.15	46	4.63 ± 0.13
8	27.9	32.5	1.16	59	5.47 ± 0.17
24	32.4	38.3	1.18	68	5.95 ± 0.08

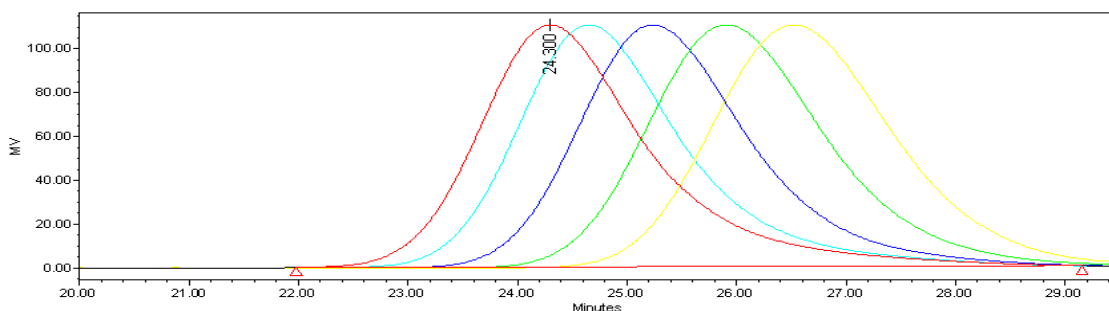


Рисунок 2. Определение параметров элюирования полимеров ОЭГМА с однофункциональным инициатором.

узкое молекулярно-массовое распределение полученных полимеров и согласуется с контролируемым характером АТР-полимеризации.

Степень полимеризации также увеличивается с продолжительностью реакции. За первый час значение степени полимеризации составляет 23, через 2 ч — 33, через 4 ч — 46, через 8 ч — 59, а после 24 ч достигает 68. Таким образом, увеличение времени реакции сопровождается последовательным ростом длины полимерных цепей. Наибольшее увеличение степени полимеризации наблюдается в интервале от 1 до 8 ч, тогда как при дальнейшем увеличении продолжительности реакции до 24 ч прирост становится менее выраженным.

Дополнительно было исследовано изменение гидродинамического диаметра ($\bar{M}_h$) полученных полимеров. Наблюдается постепенное увеличение от $3,78 \pm 0,35$ нм после 1 ч полимеризации до $5,95 \pm 0,08$ нм после 24 ч. При увеличении времени реакции с 1 до 2 ч возрастает с 3,78 до 4,20 нм, а при 4, 8 и 24 ч достигает 4,63, 5,47 и 5,95 нм соответственно.

В целом полученные результаты демонстрируют четкую зависимость молекулярно-массовых характеристик ОЭГМА от продолжительности АТР-полимеризации. Увеличение времени реакции приводит к росту $\bar{M}_n$, $\bar{M}_w$, степени полимеризации и гидродинамического диаметра при сохранении относительно низких значений дисперсности. Совокупность этих результатов свидетельствует о возможности регулирования молекулярной массы и размеров макромолекул ОЭГМА путем изменения продолжительности полимеризации при сохранении узкого молекулярно-массового распределения.

Кинетика АТР-полимеризации ОЭГМА с двухфункциональным инициатором. Для исследования влияния

функциональности инициатора на кинетику и молекулярно-массовые характеристики полимера была проведена АТР-полимеризация ОЭГМА с использованием двухфункционального инициатора в присутствии 2,2'-бипиридина. В отличие от монофункциональной системы, двухфункциональный инициатор содержит две иницирующие бромсодержащие группы, что обеспечивает одновременное формирование двух растущих полимерных цепей. Получение образцов проводили при продолжительности полимеризации 1, 2, 4, 8 и 24 ч.

Для более корректного определения молекулярно-массовых характеристик полученных полимеров после завершения полимеризации образцы подвергали кислотному гидролизу. Данная стадия была необходима для разделения цепей, растущих с двух функциональных центров инициатора, и последующей характеристики образовавшихся индивидуальных полимерных цепей. Такой подход позволяет исключить влияние исходной двухфункциональной архитектуры инициатора на результаты анализа и получить более точную информацию о характеристиках отдельных цепей.

Как видно из представленных данных (Таблица 2), с увеличением продолжительности полимеризации наблюдается последовательный рост молекулярной массы полимера. Значение увеличивается с 13,9 кг/моль после 1 ч реакции до 64,9 кг/моль после 24 ч, тогда как возрастает с 16,5 до 85,6 кг/моль соответственно. Наиболее выраженное увеличение молекулярной массы наблюдается в интервале от 1 до 8 ч: возрастает с 13,9 до 54,5 кг/моль. При дальнейшем увеличении времени реакции до 24 ч рост сохраняется и достигает 64,9 кг/моль.

Наряду с увеличением молекулярной массы наблюдается постепенное увеличение степени полимеризации. При продолжительности реакции 1 ч степень полимери-

Таблица 2. Определение физических свойств ОЭГМА полимеров с двухфункциональным инициатором

Время полимеризации (час)	$\bar{M}_n$ (кг/моль)	$\bar{M}_w$ (кг/моль)	$\bar{M}_w / \bar{M}_n$ (Д)	Степень полимеризации	D_h (нм)
1	13.9	16.5	1.19	15	4.00 ± 0.12
2	22.5	26.5	1.18	24	5.41 ± 0.25
4	36.9	43.5	1.18	39	6.43 ± 0.1
8	54.5	65.2	1.2	57	7.42 ± 0.3
24	64.9	85.6	1.3	68	8.03 ± 0.36

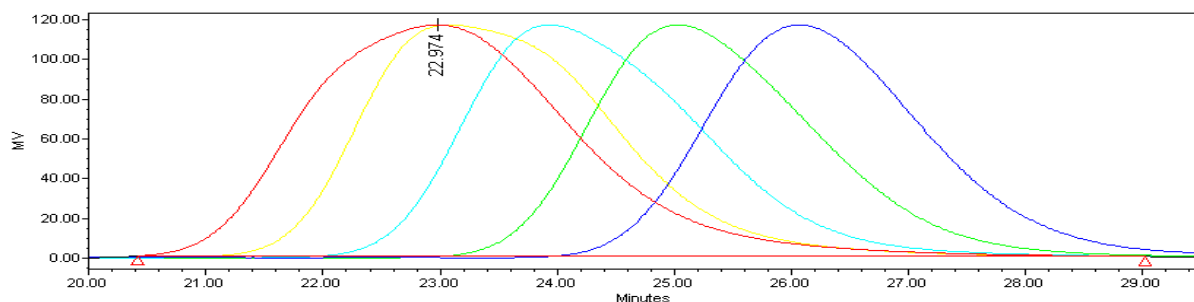


Рисунок 3. Определение параметров элюирования полимеров ОЭГМА с двухфункциональным инициатором.

зации составляет 15, после 2 ч — 24, после 4 ч — 39, после 8 ч — 57, а после 24 ч достигает 68. Таким образом, увеличение времени реакции сопровождается последовательным увеличением длины образующихся полимерных цепей (Рисунок 3).

Значения дисперсности молекулярно-массового распределения в первые 8 ч остаются практически постоянными и находятся в диапазоне 1,18–1,20. Для образцов, полученных через 1, 2 и 4 ч, составляет 1,19, 1,18 и 1,18 соответственно, а после 8 ч увеличивается до 1,20. После 24 ч наблюдается увеличение дисперсности до 1,30. Несмотря на некоторое расширение молекулярно-массового распределения при длительной полимеризации, в течение первых 8 ч сохраняются относительно узкие распределения молекулярных масс.

Изменение молекулярно-массовых характеристик сопровождается увеличением гидродинамического диаметра полимерных цепей. Значение возрастает с $4,00 \pm 0,12$ нм после 1 ч полимеризации до $5,41 \pm 0,25$ нм после 2 ч и $6,43 \pm 0,10$ нм после 4 ч. После 8 ч значение составляет $7,42 \pm 0,30$ нм, а после 24 ч достигает $8,03 \pm 0,36$ нм. Таким образом, увеличение продолжительности полимеризации и, соответственно, молекулярной массы приводит к увеличению гидродинамического размера макромолекул в растворе.

Полученные результаты показывают закономерное увеличение M_w степени полимеризации и гидродинамического диаметра при увеличении продолжительности реакции. При этом относительно узкое молекулярно-массовое распределение сохраняется до 8 ч полимеризации. Полученные данные подтверждают возможность регулирования длины полимерных цепей ОЭГМА путем изменения продолжительности АТР-полимеризации с исполь-

зованием двухфункционального инициатора. Проведение последующего кислотного гидролиза позволило разделить цепи, сформированные с двух иницирующих центров, и провести их индивидуальную характеристику.

Кинетические особенности АТР-полимеризации КБМА с использованием ГМТЭТА в качестве лиганда. Для исследования возможности АТР-полимеризации нового функционального мономера — КБМА — была использована каталитическая система на основе однофункционального инициатора и ГМТЭТА в качестве лиганда. Выбор ГМТЭТА был обусловлен необходимостью изменения координационного окружения каталитического центра по сравнению с системой, содержащей 2,2'-бипиридин. В предыдущей системе с бипиридином образование полимера для данного мономера не наблюдалось, что указывало на необходимость оптимизации состава каталитической системы.

Для оценки влияния продолжительности реакции были исследованы образцы, полученные после 1, 2, 4, 8 и 24 ч полимеризации. Полученные молекулярно-массовые характеристики, степень полимеризации и гидродинамический диаметр представлены в таблице 3.

В отличие от ранее исследованной системы на основе ОЭГМА, для КБМА увеличение продолжительности полимеризации не сопровождается существенным ростом молекулярной массы. Значение после 1 ч полимеризации составляет 9,2 кг/моль и сохраняется на том же уровне после 2 и 4 ч. После 8 ч значение незначительно увеличивается до 9,4 кг/моль, а после 24 ч достигает 9,9 кг/моль. Аналогичная тенденция наблюдается для M_w , которое увеличивается с 11,6 кг/моль после 1 ч до 12,7 кг/моль после 24 ч (Рисунок 4).

Таблица 3. Определение физических свойств полимеров КБМА с однофункциональным инициатором

Время полимеризации (час)	M_n (кг/моль)	M_w (кг/моль)	M_w/M_n (Д)	Степень полимеризации	D_h (нм)
1	9.2	11.6	1.26	40	5.89 ± 0.31
2	9.2	11.9	1.3	40	5.86 ± 0.23
4	9.2	12.9	1.4	40	5.97 ± 0.17
8	9.4	12.4	1.31	41	6.05 ± 0.14
24	9.9	12.7	1.28	43	6.06 ± 0.11

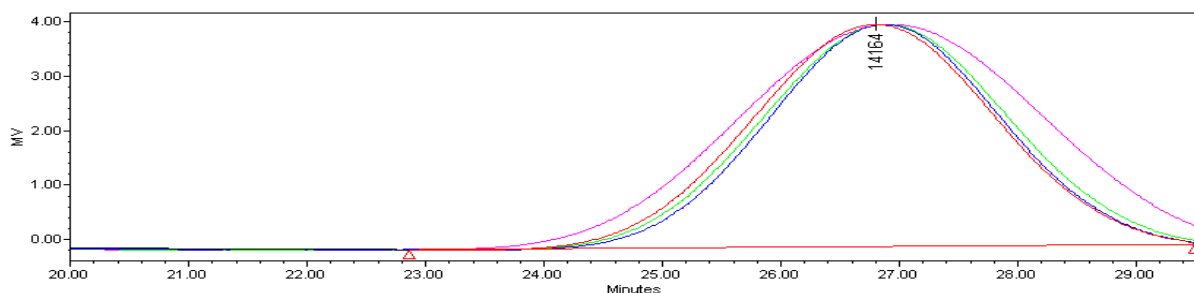


Рисунок 4. Определение параметров элюирования полимеров КБМА с однофункциональным инициатором.

Таблица 4. Определение физических свойств полимеров КБМА с двухфункциональным инициатором

Время полимеризации (час)	M_n (кг/моль)	M_w (кг/моль)	M_w/M_n (Đ)	Степень полимеризации	D_h (нм)
1	12.8	17.7	1.38	28	7.12 ± 0.13
2	13.2	17.5	1.32	29	7.15 ± 0.18
4	13.2	17.9	1.36	29	7.14 ± 0.15
8	13.6	20.0	1.47	30	7.42 ± 0.23
24	14.0	19.5	1.39	30	7.41 ± 0.29

Степень полимеризации также демонстрирует минимальное изменение во времени. В течение первых 4 ч её значение составляет 40, после 8 ч увеличивается до 41, а после 24 ч достигает 43. Таким образом, в исследованном диапазоне времени основная часть прироста длины полимерных цепей происходит на начальной стадии реакции, после чего дальнейшее увеличение продолжительности полимеризации приводит лишь к незначительному увеличению степени полимеризации.

Дисперсность молекулярно-массового распределения находится в диапазоне 1,26–1,40. После 1 ч полимеризации значение составляет 1,26, после 2 ч — 1,30, а максимальное значение 1,40 наблюдается после 4 ч.

Особый интерес представляет изменение гидродинамического диаметра полимеров. В отличие от молекулярной массы, на протяжении всего исследованного периода изменяется незначительно. После 1 ч полимеризации гидродинамический диаметр составляет $5,89 \pm 0,31$ нм, после 2 ч — $5,86 \pm 0,23$ нм, после 4 ч — $5,97 \pm 0,17$ нм. После 8 и 24 ч значения составляют $6,05 \pm 0,14$ и $6,06 \pm 0,11$ нм соответственно. Таким образом, несмотря на небольшое увеличение с 9,2 до 9,9 кг/моль, средний гидродинамический размер макромолекул остаётся практически постоянным.

Таким образом, применение ГМТЭТА в качестве лиганда позволило реализовать АТР-полимеризацию КБМА, тогда как при использовании 2,2'-бипиридина образование полимера не наблюдалось. Полученные результаты показывают, что полимеризация КБМА в исследуемых условиях фактически завершается уже в течение первого часа реакции, о чём свидетельствуют практически неизменные значения M_n , M_w , степени полимеризации и при дальнейшем увеличении продолжительности процесса до 24

ч. После первого часа значение изменяется лишь с 9,2 до 9,9 кг/моль, а степень полимеризации — с 40 до 43. Аналогично, гидродинамический диаметр сохраняется практически на одном уровне — около 6 нм. Таким образом, увеличение продолжительности реакции после первого часа не приводит к существенному росту полимерных цепей, что указывает на завершение полимеризации на ранней стадии процесса.

Кинетические особенности АТР-полимеризации КБМА с двухфункциональным инициатором. Для дальнейшего исследования влияния функциональности инициатора на протекание АТР-полимеризации КБМА была использована система с двухфункциональным инициатором в присутствии ГМТЭТА в качестве лиганда. В отличие от однофункциональной системы, применение двухфункционального инициатора обеспечивает формирование двух растущих полимерных цепей с одного иницирующего фрагмента. Полимеризацию также проводили при различной продолжительности реакции — 1, 2, 4, 8 и 24 ч.

Для оценки изменения молекулярно-массовых характеристик в зависимости от продолжительности реакции были исследованы полученные полимеры после кислотного гидролиза. Результаты представлены в таблице 4. Уже после 1 ч полимеризации значение составляет 12,8 кг/моль, а — 17,7 кг/моль. При дальнейшем увеличении продолжительности реакции наблюдается лишь незначительное изменение молекулярной массы: после 2 и 4 ч составляет 13,2 кг/моль, после 8 ч — 13,6 кг/моль, а после 24 ч достигает 14,0 кг/моль. Аналогичная тенденция наблюдается для M_w , значения которого находятся в диапазоне 17,5–20,0 кг/моль.

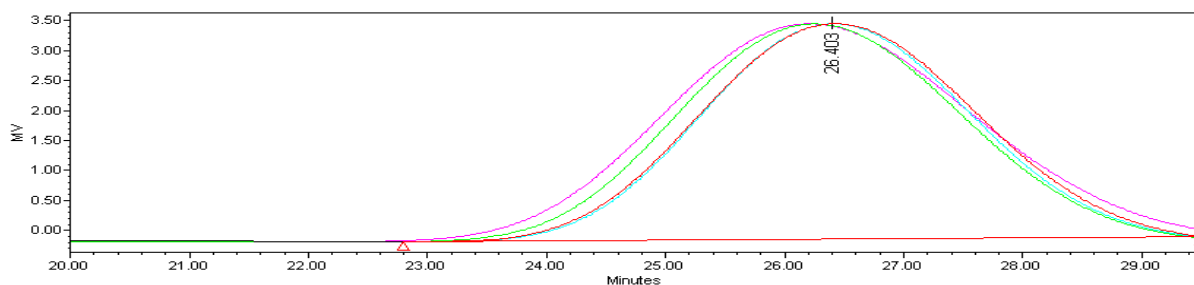


Рисунок 5. Определение параметров элюирования полимеров КБМА с двухфункциональным инициатором.

Таблица 5. Определение физических свойств полимеров СБМА с однофункциональным инициатором

Время полимеризации (мин)	M_n (кг/моль)	M_w (кг/моль)	M_w/M_n (Д)	Степень полимеризации	D_h (нм)
15	10.2	13.4	1.31	44	6.13 ± 0.21
30	10.8	14.2	1.31	47	6.31 ± 0.33
45	10.7	14.5	1.36	47	6.43 ± 0.22
60	10.9	14.8	1.36	48	6.42 ± 0.27
120	10.3	14.1	1.37	45	6.38 ± 0.26

Дисперсность молекулярно-массового распределения в исследованном диапазоне времени изменяется от 1,32 до 1,47. После 1 ч значение составляет 1,38, после 2 ч снижается до 1,32, после 4 ч увеличивается до 1,36, а после 8 ч достигает максимального значения 1,47 (Рисунок 5).

Аналогичная тенденция наблюдается при анализе степени полимеризации. Уже после 1 ч её значение составляет 28. После 2 и 4 ч степень полимеризации увеличивается до 29, а после 8 и 24 ч достигает 30. Таким образом, после первого часа реакции дальнейшее увеличение продолжительности полимеризации практически не приводит к увеличению длины полимерных цепей.

Изменение гидродинамического диаметра также характеризуется незначительной динамикой. После 1 ч полимеризации составляет $7,12 \pm 0,13$ нм, после 2 ч — $7,15 \pm 0,18$ нм, а после 4 ч — $7,14 \pm 0,15$ нм. После 8 ч значение увеличивается до $7,42 \pm 0,23$ нм и практически сохраняется после 24 ч — $7,41 \pm 0,29$ нм. Таким образом, гидродинамический размер полимеров остаётся практически постоянным на протяжении всего исследованного периода.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что полимеризация КБМА в присутствии двухфункционального инициатора протекает преимущественно в течение первого часа реакции. Уже после 1 ч достигаются значения 12,8 кг/моль и степени полимеризации 28, тогда как дальнейшее увеличение продолжительности реакции до 24 ч приводит лишь к незначительному увеличению до 14,0 кг/моль и степени полимеризации до 30. Практически постоянные значения гидродинамического диаметра дополнительно подтверждают отсутствие существенного роста полимерных цепей после первого часа.

Таким образом, для исследуемой системы с двухфунк-

циональным инициатором основная стадия роста полимерных цепей завершается уже в течение первого часа полимеризации. Отсутствие выраженного дальнейшего увеличения молекулярной массы, степени полимеризации и гидродинамического диаметра при увеличении времени реакции указывает на достижение практически постоянных характеристик полимера на ранней стадии процесса. При этом использование двухфункционального инициатора позволяет формировать макромолекулярную структуру с двумя растущими цепями, что отличает данную систему от полимеризации КБМА с однофункциональным инициатором.

Кинетика быстрой АТР-полимеризации КБМА с одно- и двухфункциональными инициаторами. С целью более детального изучения начальной стадии АТР-полимеризации КБМА были проведены дополнительные кинетические исследования с использованием более коротких интервалов времени. Такой подход был выбран с учётом результатов предыдущих экспериментов, которые показали, что полимеризация КБМА в исследуемых условиях протекает достаточно быстро и основные изменения молекулярно-массовых характеристик происходят уже на ранней стадии процесса. Исследования проводили с использованием как однофункционального, так и двухфункционального инициатора при продолжительности полимеризации 15, 30, 45, 60 и 120 мин (Таблицы 5-6).

При использовании однофункционального инициатора уже через 15 мин формируются полимерные цепи со значением 10,2 кг/моль и степенью полимеризации 44. В последующие 30–60 мин наблюдается лишь незначительный рост молекулярной массы: максимальное значение

Таблица 6. Определение физических свойств полимеров СБМА с двухфункциональным инициатором

Время полимеризации (мин)	M_n (кг/моль)	M_w (кг/моль)	M_w/M_n (Đ)	Степень полимеризации	D_h (нм)
15	11.5	15.3	1.33	25	7.00 ± 0.09
30	11.2	15.0	1.34	25	7.01 ± 0.13
45	11.5	15.2	1.32	25	7.1 ± 0.17
60	11.3	15.0	1.33	25	7.17 ± 0.21
120	11.1	14.7	1.32	24	7.13 ± 0.16

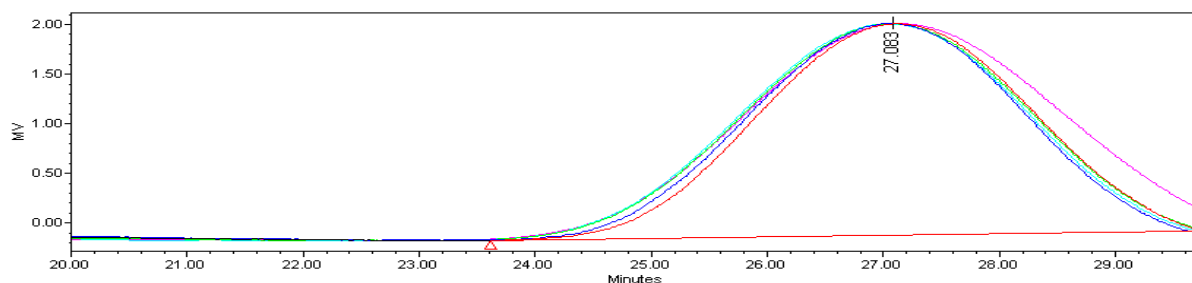


Рисунок 6. Определение параметров элюирования полимеров КБМА с однофункциональным инициатором.

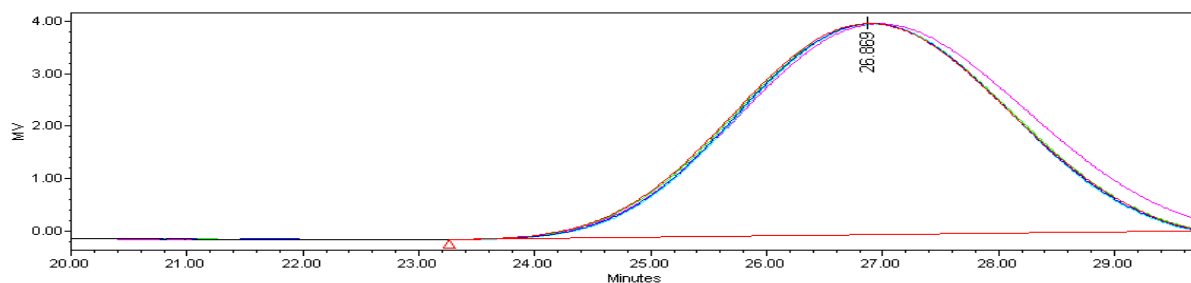


Рисунок 7. Определение параметров элюирования полимеров КБМА с двухфункциональным инициатором.

составляет 10,9 кг/моль после 60 мин, а степень полимеризации достигает 48. При увеличении продолжительности реакции до 120 мин дальнейшего роста не происходит — напротив, и степень полимеризации несколько снижаются до 10,3 кг/моль и 45 соответственно. Это указывает на то, что основное формирование полимерных цепей происходит в течение первых десятков минут реакции (Рисунок 6).

Молекулярно-массовое распределение при этом остаётся относительно узким: изменяется от 1,31 до 1,37. Гидродинамический диаметр также практически стабилен и находится в пределах 6,13–6,43 нм. Таким образом, после первоначального увеличения длины цепей существенных изменений конформационных и молекулярно-массовых характеристик полимера не наблюдается.

Для двухфункционального инициатора установление постоянных характеристик происходит ещё более отчётливо. Уже после 15 мин значение составляет 11,5 кг/моль,

а степень полимеризации — 25. В дальнейшем изменяется в пределах 11,1–11,5 кг/моль, а степень полимеризации сохраняется на уровне 24–25. Дисперсность практически не изменяется (), тогда как находится в диапазоне 7,00–7,17 нм (Рисунок 7).

Сопоставление полученных данных показывает, что в обеих системах полимеризация КБМА протекает преимущественно на начальной стадии. При однофункциональном инициаторе некоторое увеличение молекулярной массы сохраняется до 60 мин, тогда как для двухфункционального инициатора практически постоянные характеристики достигаются уже через 15 мин. При этом двухфункциональная система характеризуется меньшей степенью полимеризации отдельных цепей, что связано с одновременным ростом двух цепей с одного иницирующего фрагмента.

Таким образом, сокращение временного интервала до 15–30 мин позволило установить высокую скорость поли-

меризации КБМА и определить раннюю стадию процесса как область формирования основных молекулярно-массовых характеристик. Дальнейшее увеличение времени реакции практически не влияет на длину цепей и гидродинамический размер получаемых макромолекул.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследована АТР-полимеризация ОЭГМА и КБМА с использованием одно- и двухфункциональных инициаторов. Для ОЭГМА в присутствии 2,2'-бипиридина увеличение времени реакции сопровождалось ростом молекулярной массы и степени полимеризации при сохранении низкой дисперсности. Двухфункциональный инициатор обеспечивал формирование двух полимерных цепей, которые после кислотного гидролиза могли быть охарактеризованы индивидуально.

Для КБМА установлено существенное влияние природы лиганда на протекание полимеризации: образование полимера наблюдалось при использовании ГМТЭТА, тогда как система с 2,2'-бипиридином не приводила к полимеризации. В отличие от ОЭГМА, КБМА характеризовался высокой скоростью процесса — основные молекулярно-массовые характеристики формировались уже в течение первых 15–30 мин и практически не изменялись при дальнейшем увеличении времени реакции.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют возможность управления характеристиками и архитектурой полимеров за счёт выбора мономера, лиганда, функциональности инициатора и продолжительности реакции.

Полученные результаты найдут широкое применение в сфере биоинженерных разработок. Метод АТРП может использоваться не только для синтеза свободных полимеров, но и для выращивания полимерных цепей непосредственно с поверхности белков, что позволяет создавать белок-полимерные конъюгаты с регулируемыми физико-химическими и биологическими свойствами. В этом контексте ОЭГМА представляет интерес как ПЭГ-подобный гидрофильный полимер, а КБМА — как цвиттер-ионный полимер с выраженной гидратационной способностью, перспективный для создания биосовместимых полимерных интерфейсов. Контролируемое изменение молекулярной массы, длины цепи и архитектуры, продемонстрированное в настоящей работе, создает основу для дальнейшего применения данных полимеров в белковой инженерии, стабилизации биомолекул, доставке лекарственных средств и биомедицинских технологиях. Таким образом, разработка унифицированного и воспроизводимого подхода к синтезу ОЭГМА и КБМА, основанного на оптимальном выборе каталитической системы и времени полимеризации, является важным этапом для последующего создания функциональных белок-полимерных конструкций.

ВКЛАД АВТОРОВ

К.Б. — концепция и руководство работой; К.Б., Ц.А., Х.М., А.К. — проведение экспериментов; А.Ш., К.Б. — обсуждение результатов исследования; А.К., Х.М. и Ц.А. — написание текста; К.Б., А.Ш. — редактирование текста статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта AP26197583 «Биоинженерная модификация протеаз деградирующих β -амилоид для терапии болезни Альцгеймера», финансируемого Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matyjaszewski K., Xia J. Atom Transfer Radical Polymerization // *Chem. Rev.* -2001. -Vol. 101, № 9. - P. 2921-2990.
2. Averick S., Simakova A., Park S., Konkolewicz D., Magenau A., A. Mehl R., Matyjaszewski K. ATRP under Biologically Relevant Conditions: Grafting from a Protein // *ACS Macro Lett.* -2012. -Vol. 1, № 1. - P. 6–10.
3. Baker S.L., Murata H., Kaupbayeva B., Tasbolat A., Matyjaszewski K., Russell A.J. Charge-Preserving Atom Transfer Radical Polymerization Initiator Rescues the Lost Function of Negatively Charged Protein-Polymer Conjugates // *Biomacromolecules.* -2019. -Vol. 20, № 6. - P. 2392-2405.
4. Bortolamei N., Isse A.A., Magenau A.J.D., Gennaro A., Matyjaszewski K. Controlled Aqueous Atom Transfer Radical Polymerization with Electrochemical Generation of the Active Catalyst // *Angew. Chem., Int. Ed.* -2011. -Vol. 50, № 48. - P. 11391-11394. <https://doi.org/10.1002/anie.201105317>
5. Braunecker W.A., Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives // *Prog. Polym. Sci.* -2007. -Vol. 32, № 1. - P. 93-146.
6. Chiefari J., Chong Y.K., Ercole F., Krstina J., Jeffery J., Le T.P.T., Mayadunne R.T.A., Meijs G.F., Moad C.L., Moad G., Rizzardo E., Thang S.H. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process // *Macromolecules.* -1998. -Vol. 31, № 16. - P. 5559-5562.
7. Baker S.L., Kaupbayeva B., Lathwal S., Das S.R., Russell A.J., Matyjaszewski K. Atom Transfer Radical Polymerization for Biorelated Hybrid Materials // *Biomacromolecules.* -2019. -Vol. 20, № 12. - P. 4272-4298. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01271>
8. Lele B.S., Murata H., Matyjaszewski K., Russell A.J. Synthesis of Uniform Protein-Polymer Conjugates // *Biomacromolecules.* -2005. -Vol. 6, № 6. - P. 3380-3387.
9. Cummings C., Murata H., Koepsel R., Russell A.J. Tailoring enzyme activity and stability using polymer-based protein engineering // *Biomaterials.* -2013. -Vol. 34, № 30. - P. 7437-7443.
10. Cummings C., Murata H., Koepsel R., Russell A.J. Dramatically Increased pH and Temperature Stability of Chymotrypsin using Dual Block Polymer-Based Protein Engineering // *Biomacromolecules.* -2014. -Vol. 15, № 3. - P. 763-771.
11. Cummings C.S., Fein K., Murata H., Ball R.L., Russell A.J., Whitehead K.A. ATRP-grown protein-polymer conjugates containing phenylpiperazine selectively enhance transepithelial protein transport // *J. Cont. Release.* -2017. -Vol. 255. - P. 270-278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.035>

12. Enciso A.E., Fu L., Russell A.J., Matyjaszewski K. A Breathing Atom-Transfer Radical Polymerization: Fully Oxygen-Tolerant Polymerization Inspired by Aerobic Respiration of Cells // *Angew. Chem., Int. Ed.* -2018. -Vol. 57, № 4. - P. 933-936. <https://doi.org/10.1002/anie.201711105>
13. Baker S.L., Munasinghe A., Murata H., Lin P., Matyjaszewski K., Colina C.M., Russell A.J. Intramolecular Interactions of Conjugated Polymers Mimic Molecular Chaperones to Stabilize Protein–Polymer Conjugates // *Biomacromolecules.* -2018. -Vol. 19, № 9. - P. 3798-3813.
14. Fantin M., Isse A.A., Gennaro A., Matyjaszewski K. Understanding the Fundamentals of Aqueous ATRP and Defining Conditions for Better Control // *Macromolecules.* -2015. -Vol. 48, № 19. - P. 6862-6875. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01454>
15. Enciso A.E., Fu L., Lathwal S., Olszewski M., Wang Z., Das S.R., Russell A.J., Matyjaszewski K. Biocatalytic “Oxygen-Fueled” Atom Transfer Radical Polymerization // *Angew. Chem., Int. Ed.* -2018. -Vol. 57, № 49. - P. 16157-16161. <https://doi.org/10.1002/anie.201809018>
16. Fantin M., Isse A.A., Matyjaszewski K., Gennaro A. ATRP in Water: Kinetic Analysis of Active and Super-Active Catalysts for Enhanced Polymerization Control // *Macromolecules.* -2017. -Vol. 50, № 7. - P. 2696-2705. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b00246>
17. Matyjaszewski K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives // *Macromolecules.* -2012. -Vol. 45, № 10. - P. 4015-4039. <https://doi.org/10.1021/ma3001719>
18. Simakova A., Averick S.E., Konkolewicz D., Matyjaszewski K. AqueousARGET ATRP // *Macromolecules.* -2012. -Vol. 45, № 16. - P. 6371-6379.
19. Baker S.L., Munasinghe A., Kaupbayeva B., Rebecca Kang N., Certiat M., Murata H., Matyjaszewski K., Lin P., Colina C.M., Russell A.J. Transforming protein-polymer conjugate purification by tuning protein solubility // *Nat. Comm.* -2019. -Vol. 10, № 1. - P. 4718.
20. Cummings C.S., Campbell A.S., Baker S.L., Carmali S., Murata H., Russell A.J. Design of Stomach Acid-Stable and Mucin-Binding Enzyme Polymer Conjugates // *Biomacromolecules.* -2017. -Vol. 18, № 2. - P. 576-586.
21. Ji W., Koepsel R.R., Murata H., Zadan S., Campbell A.S., Russell A.J. Bactericidal Specificity and Resistance Profile of Poly(Quaternary Ammonium) Polymers and Protein–Poly(Quaternary Ammonium) Conjugates // *Biomacromolecules.* -2017. -Vol. 18, № 8. - P. 2583-2593. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00705>
22. Bhattacharjee S., Liu W., Wang W.-H., Weitzhandler I., Li X., Qi Y., Liu J., Pang Y., Hunt D.F., Chilkoti A. Site-Specific Zwitterionic Polymer Conjugates of a Protein Have Long Plasma Circulation // *ChemBioChem.* -2015. -Vol. 16, № 17. - P. 2451-2455. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500439>
23. Cho H.Y., Kryszewski P., Szcześniak K., Schroeder H., Park S., Jurga S., Buback M., Matyjaszewski K. Synthesis of Poly(OEOMA) Using Macromonomers via «grafting-Through» ATRP // *Macromolecules.* -2015. -Vol. 48, № 18. - P. 6385-6395. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01592>
24. Keefe A.J., Jiang S. Poly(zwitterionic)protein conjugates offer increased stability without sacrificing binding affinity or bioactivity // *Nat. Chem.* -2012. -Vol. 4, № 1. - P. 59-63.
25. Wu C., Zhou Y., Wang H., Hu J., Wang X. Formation of antifouling functional coating from deposition of a zwitterionic-co-nonionic polymer via “grafting to” approach // *J. Saudi Chem. Soc.* -2019. -Vol. X, № X. - P. X. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2019.05.011>
26. Kaupbayeva B., Murata H., Lucas A., Matyjaszewski K., Minden J.S., Russell A.J. Molecular Sieving on the Surface of a Nano-Armored Protein // *Biomacromolecules.* -2019. -Vol. 20, № 3. - P. 1235-1245. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01651>

REFERENCES

1. Matyjaszewski K., Xia J. Atom Transfer Radical Polymerization // *Chem. Rev.* -2001. -Vol. 101, № 9. - P. 2921-2990.
2. Averick S., Simakova A., Park S., Konkolewicz D., Magenau A., A. Mehl R., Matyjaszewski K. ATRP under Biologically Relevant Conditions: Grafting from a Protein // *ACS Macro Lett.* -2012. -Vol. 1, № 1. - P. 6–10.
3. Baker S.L., Murata H., Kaupbayeva B., Tasbolat A., Matyjaszewski K., Russell A.J. Charge-Preserving Atom Transfer Radical Polymerization Initiator Rescues the Lost Function of Negatively Charged Protein–Polymer Conjugates // *Biomacromolecules.* -2019. -Vol. 20, № 6. - P. 2392-2405.
4. Bortolamei N., Isse A.A., Magenau A.J.D., Gennaro A., Matyjaszewski K. Controlled Aqueous Atom Transfer Radical Polymerization with Electrochemical Generation of the Active Catalyst // *Angew. Chem., Int. Ed.* -2011. -Vol. 50, № 48. - P. 11391-11394. <https://doi.org/10.1002/anie.201105317>
5. Braunecker W.A., Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives // *Prog. Polym. Sci.* -2007. -Vol. 32, № 1. - P. 93-146.
6. Chiefari J., Chong Y.K., Ercole F., Krstina J., Jeffery J., Le T.P.T., Mayadunne R.T.A., Meijs G.F., Moad C.L., Moad G., Rizzardo E., Thang S.H. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process // *Macromolecules.* -1998. -Vol. 31, № 16. - P. 5559-5562.
7. Baker S.L., Kaupbayeva B., Lathwal S., Das S.R., Russell A.J., Matyjaszewski K. Atom Transfer Radical Polymerization for Biorelated Hybrid Materials // *Biomacromolecules.* -2019. -Vol. 20, № 12. - P. 4272-4298. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01271>
8. Lele B.S., Murata H., Matyjaszewski K., Russell A.J. Synthesis of Uniform Protein–Polymer Conjugates // *Biomacromolecules.* -2005. -Vol. 6, № 6. - P. 3380-3387.
9. Cummings C., Murata H., Koepsel R., Russell A.J. Tailoring enzyme activity and stability using polymer-based protein engineering // *Biomaterials.* -2013. -Vol. 34, № 30. - P. 7437-7443.
10. Cummings C., Murata H., Koepsel R., Russell A.J. Dramatically Increased pH and Temperature Stability of

Chymotrypsin using Dual Block Polymer-Based Protein Engineering // *Biomacromolecules*. -2014. -Vol. 15, № 3. - P. 763-771.

11. Cummings C.S., Fein K., Murata H., Ball R.L., Russell A.J., Whitehead K.A. ATRP-grown protein-polymer conjugates containing phenylpiperazine selectively enhance transepithelial protein transport // *J. Cont. Release*. -2017. -Vol. 255. - P. 270-278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.035>

12. Enciso A.E., Fu L., Russell A.J., Matyjaszewski K. A Breathing Atom-Transfer Radical Polymerization: Fully Oxygen-Tolerant Polymerization Inspired by Aerobic Respiration of Cells // *Angew. Chem., Int. Ed.* -2018. -Vol. 57, № 4. - P. 933-936. <https://doi.org/10.1002/anie.201711105>

13. Baker S.L., Munasinghe A., Murata H., Lin P., Matyjaszewski K., Colina C.M., Russell A.J. Intramolecular Interactions of Conjugated Polymers Mimic Molecular Chaperones to Stabilize Protein-Polymer Conjugates // *Biomacromolecules*. -2018. -Vol. 19, № 9. - P. 3798-3813.

14. Fantin M., Isse A.A., Gennaro A., Matyjaszewski K. Understanding the Fundamentals of Aqueous ATRP and Defining Conditions for Better Control // *Macromolecules*. -2015. -Vol. 48, № 19. - P. 6862-6875. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01454>

15. Enciso A.E., Fu L., Lathwal S., Olszewski M., Wang Z., Das S.R., Russell A.J., Matyjaszewski K. Biocatalytic “Oxygen-Fueled” Atom Transfer Radical Polymerization // *Angew. Chem., Int. Ed.* -2018. -Vol. 57, № 49. - P. 16157-16161. <https://doi.org/10.1002/anie.201809018>

16. Fantin M., Isse A.A., Matyjaszewski K., Gennaro A. ATRP in Water: Kinetic Analysis of Active and Super-Active Catalysts for Enhanced Polymerization Control // *Macromolecules*. -2017. -Vol. 50, № 7. - P. 2696-2705. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b00246>

17. Matyjaszewski K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives // *Macromolecules*. -2012. -Vol. 45, № 10. - P. 4015-4039. <https://doi.org/10.1021/ma3001719>

18. Simakova A., Averick S.E., Konkolewicz D., Matyjaszewski K. AqueousARGET ATRP // *Macromolecules*.

-2012. -Vol. 45, № 16. - P. 6371-6379.

19. Baker S.L., Munasinghe A., Kaupbayeva B., Rebecca Kang N., Certiat M., Murata H., Matyjaszewski K., Lin P., Colina C.M., Russell A.J. Transforming protein-polymer conjugate purification by tuning protein solubility // *Nat. Comm.* -2019. -Vol. 10, № 1. - P. 4718.

20. Cummings C.S., Campbell A.S., Baker S.L., Carmali S., Murata H., Russell A.J. Design of Stomach Acid-Stable and Mucin-Binding Enzyme Polymer Conjugates // *Biomacromolecules*. -2017. -Vol. 18, № 2. - P. 576-586.

21. Ji W., Koepsel R.R., Murata H., Zadan S., Campbell A.S., Russell A.J. Bactericidal Specificity and Resistance Profile of Poly(Quaternary Ammonium) Polymers and Protein-Poly(Quaternary Ammonium) Conjugates // *Biomacromolecules*. -2017. -Vol. 18, № 8. - P. 2583-2593. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00705>

22. Bhattacharjee S., Liu W., Wang W.-H., Weitzhandler I., Li X., Qi Y., Liu J., Pang Y., Hunt D.F., Chilkoti A. Site-Specific Zwitterionic Polymer Conjugates of a Protein Have Long Plasma Circulation // *ChemBioChem*. -2015. -Vol. 16, № 17. - P. 2451-2455. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500439>

23. Cho H.Y., Krys P., Szcześniak K., Schroeder H., Park S., Jurga S., Buback M., Matyjaszewski K. Synthesis of Poly(OEOMA) Using Macromonomers via «grafting-Through» ATRP // *Macromolecules*. -2015. -Vol. 48, № 18. - P. 6385-6395. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01592>

24. Keefe A.J., Jiang S. Poly(zwitterionic)protein conjugates offer increased stability without sacrificing binding affinity or bioactivity // *Nat. Chem.* -2012. -Vol. 4, № 1. - P. 59-63.

25. Wu C., Zhou Y., Wang H., Hu J., Wang X. Formation of antifouling functional coating from deposition of a zwitterionic-co-nonionic polymer via “grafting to” approach // *J. Saudi Chem. Soc.* -2019. -Vol. X, № X. - P. X. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2019.05.011>

26. Kaupbayeva B., Murata H., Lucas A., Matyjaszewski K., Minden J.S., Russell A.J. Molecular Sieving on the Surface of a Nano-Armored Protein // *Biomacromolecules*. -2019. -Vol. 20, № 3. - P. 1235-1245. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01651>

UDC 541.64

EFFECT OF THE CATALYTIC SYSTEM AND POLYMERIZATION TIME ON THE CHARACTERISTICS OF POLY(OEGMA) AND POLY(CBMA) SYNTHESIZED BY ATRP**Kaupbayeva B. ^{1*}, Tsoy A. ¹, Murata H. ², Kassenova A. ^{1,3}, Askarova Sh. ¹**¹ Laboratory of Biomedical Engineering and Regenerative Medicine, National Laboratory Astana, Nazarbayev University, 010000, Astana, Kazakhstan² Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, 15213, Pittsburgh, United States of America³ Department of General Biology and Genomics, Institute of Natural Sciences, L. N. Gumilyov Eurasian National University, 010008, Astana, Kazakhstan*Correspondence author: bibifatima.kaupbayeva@nu.edu.kz**ABSTRACT**

In this study, optimal conditions for atom-transfer radical polymerization (ATRP) of oligo(ethylene glycol) methacrylate (OEGMA) and carboxybetaine methacrylate (CBMA) monomers were developed using initiators with different functionalities to obtain functional hydrophilic polymers that are promising for bioengineering and modification of proteins, DNA, RNA and other biological macromolecules. The study focuses on the influence of the ligand type, initiating system, and polymerization duration on the process kinetics, molecular weight characteristics, and hydrodynamic size of the resulting polymers. 2,2'-bipyridine was used as a ligand for OEGMA polymerization. Under similar conditions, the use of 2,2'-bipyridine for CBMA did not result in polymer formation, indicating differences in the reactivity of the monomers and their interaction with the catalytic system. For the polymerization of CBMA, 1,1,4,7,10,10-hexamethyltriethylenetetramine (HMTETA) was used as an alternative ligand. In the presence of HMTETA, CBMA polymerization proceeded significantly faster but was accompanied by higher dispersion of the resulting polymers, indicating a lower degree of process control. The effects of polymerization duration and initiator functionality on the degree of polymerization, molecular weight, dispersion ($\bar{D}$), and hydrodynamic diameter (D_h) were studied for both monomers. It was found that for OEGMA, increasing the reaction duration ensures a consistent increase in molecular weight and hydrodynamic diameter while maintaining a relatively narrow molecular weight distribution, whereas for CBMA, the main molecular weight characteristics are formed already in the early stages of polymerization. The obtained patterns are important for the development of reproducible polymer platforms for bioengineering, as controlled length and architecture of polymer chains are crucial parameters in the creation of protein-polymer conjugates using ATRP. Poly(OEGMA), containing oligoethylene glycol fragments, and poly(CBMA), a zwitterionic polymer, represent promising materials for modifying proteins, regulating their stability and functional properties, and for potential use in drug delivery and biomedical technologies. Thus, the obtained results highlight the need to select the catalytic system, ligand, initiator functionality, and reaction duration taking into account the chemical nature of the monomer to obtain polymers with controlled characteristics suitable for further use in bioengineering systems.

Keywords: atom transfer radical polymerization (ATRP); oligo(ethylene glycol) methacrylate (OEGMA); carboxybetaine methacrylate (CBMA); 2,2'-bipyridine (bpy); 1,1,4,7,10,10-hexamethyltriethylenetetramine (HMTETA); molecular weight; dispersion; hydrodynamic diameter; polymerization kinetics.

УДК 541.64

АТРП ӘДІСІМЕН АЛАНҒАН ПОЛИ(ОЭГМА) ЖӘНЕ ПОЛИ(КБМА) МИПАТТАМАЛАРЫНА КАТАЛИТИКАЛЫҚ ЖҮЙЕ МЕН ПОЛИМЕРЛЕНУ ҰЗАҚТЫҒЫНЫҢ ӘСЕРІ**Қаупбаева Б.Б. ^{1*}, Цой А.К. ¹, Мурата Х. ², Касенова А.М. ^{1,3}, Аскарова Ш.Н. ¹**¹ Биомедициналық Инженерия және Регенеративті Медицина зертханасы, Астана Ұлттық Зертханасы, Назарбаев Университеті, 010000, Астана, Қазақстан² Химия Департаменті, Карнеги Меллон Университеті, 15213, Питтсбург, Америка Құрама Штаттары³ Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия Ұлттық Университетінің Жаратылыстану Ғылымдарының Институті Жалпы Биология және Геномика Кафедрасы, 010008, Астана, Қазақстан*Байланыс үшін автор: bibifatima.kaupbayeva@nu.edu.kz**АНДАТПА**

Бұл зерттеуде олиго(этиленгликоль) метакрилат (ОЭГМА) және карбоксибетаин метакрилат (КБМА) мономерлерінің атом-трансферлік радикалды полимерленуі (АТРП) үшін оңтайлы жағдайлар әртүрлі функционалды инициаторларды пайдаланып жасалды, бұл ақуыздардың, ДНҚ-ның, РНҚ-ның және басқа да биологиялық макромолекулалардың биоинженериясы мен модификациясы үшін перспективалы функционалды гидрофилді полимерлерді алу үшін жасалды. Зерттеу лиганд түрінің, инициациялық жүйенің және полимерлену ұзақтығының процестің кинетикасына, молекулалық салмақ сипаттамаларына және алынған полимерлердің гидродинамикалық өлшеміне әсеріне бағытталған. ОЭГМА полимерленуі үшін лиганд ретінде 2,2'-бипиридин қолданылды. Ұқсас жағдайларда КБМА үшін 2,2'-бипиридинді қолдану полимердің түзілуіне әкелмеді, бұл мономерлердің реактивтілігіндегі және олардың каталитикалық

жүйемен өзара әрекеттесуіндегі айырмашылықтарды көрсетеді. КБМА полимерленуі үшін балама лиганд ретінде 1,1,4,7,10,10-гексамэтилтриэтилентетрамин (ГМТЭТА) қолданылды. ГМТЭТА қатысуымен КБМА полимерленуі айтарлықтай жылдам жүрді, бірақ алынған полимерлердің дисперсиясының жоғарылауымен қатар жүрді, бұл процесті басқарудың төмен дәрежесін көрсетеді. Полимерлену ұзақтығы мен инициатор функционалдығының полимерлену дәрежесіне, молекулалық салмаққа, дисперсияға ($\bar{M}$) және гидродинамикалық диаметрға (D_h) әсері екі мономерлер үшін де зерттелді. ОЭГМА үшін реакция ұзақтығын арттыру салыстырмалы түрде тар молекулалық салмақ үлестірімін сақтай отырып, молекулалық салмақ пен гидродинамикалық диаметрдің тұрақты өсуін қамтамасыз ететіні, ал КБМА үшін негізгі молекулалық салмақ сипаттамалары полимерленудің алғашқы кезеңдерінде қалыптасатыны анықталды. Алынған заңдылықтар бионженерия үшін қайталанатын полимер платформаларын әзірлеу үшін маңызды, себебі полимер тізбектерінің бақыланатын ұзындығы мен архитектурасы АТРП көмегімен ақуыз-полимер конъюгаттарын жасауда маңызды параметрлер болып табылады. Олигоэтиленгликоль фрагменттері бар поли(ОЭГМА) және цвиттеринді полимер поли(КБМА) ақуыздарды модификациялау, олардың тұрақтылығы мен функционалдық қасиеттерін реттеу және дәрілік заттарды жеткізу мен биомедициналық технологияларда әлеуетті пайдалану үшін перспективалы материалдарды білдіреді. Осылайша, алынған нәтижелер бионженерия жүйелерінде әрі қарай қолдануға жарамды бақыланатын сипаттамалары бар полимерлерді алу үшін мономердің химиялық табиғатын ескере отырып, каталитикалық жүйені, лигандты, инициатордың функционалдығын және реакция ұзақтығын таңдау қажеттілігін көрсетеді.

Түйінді сөздер: атомдық тасымалдау радикалды полимерленуі (АТРП); олиго(этиленгликоль) метакрилаты (ОЭГМА); карбоксибетаин метакрилаты (КБМА); 2,2'-бипиридин; 1,1,4,7,10,10-гексамэтилтриэтилентетрамин (ГМТЭТА); молекулалық салмақ; дисперсия; гидродинамикалық диаметр; полимерлену кинетикасы.