

# Hidrofobik İlaç Taşıyıcısı olarak Akrilik Yıldız Blok Kopolimerler

## Acrylic Star Block Copolymers as Hydrophobic Drug Carriers

Gözde Genç<sup>1</sup>, Ayşegül Batıgün<sup>1</sup>, Oğuz Bayraktar<sup>1</sup>, Özcan Altıntaş<sup>2</sup>, Ümit Tunca<sup>2</sup>, Gürkan Hızal<sup>2</sup>

1. Kimya Mühendisliği Bölümü,  
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü  
gozdegenc@iyte.edu.tr

2. Kimya Bölümü, Fen Fak.  
İstanbul Teknik Üniversitesi  
tuncau@itu.edu.tr

### Özetçe

4 ve 6 kollu amfifilik poli(metil metakrilat)-b-poli(akrilik asit) (PMMA-b-PAA) kopolimerler Atomik Transfer Radikal Polimerizasyon (ATRP) yöntemi ile sentezlendi. Polimerlerin yapıları GPC, H-NMR ve FTIR analizleriyle incelendi. 18-50 kDa aralığında çeşitli molekül ağırlıklarında sentezlenen polimerlerin maksimum yüklenme kapasiteleri ve kritik misel konsantrasyonları floresans yöntemi ile belirlendi. 4 kollu PMMA-b-PAA (molekül ağırlığı 30kDa) hidrofobik model ilaç indometazin ile çok yüksek oranda (22.5 %) yüklendi. İlaç yüklü kompleksin suda biyolojik olarak parçalanabilen, kararlı bir çözelti oluşturduğu gözlemlendi.

### Abstract

Amphiphilic poly(methyl methacrylate)-b-poly(acrylic acid) (PMMA-b-PAA) copolymers with 4 and 6 arms were synthesized by Atomic Transfer Radical Polymerization (ATRP). The polymers were characterized by GPC, H-NMR and FTIR analysis. Polymer samples synthesized at various molecular weights between 18-80 kDa were investigated in terms of maximum loading capacity and critical micelle concentration by fluorescence spectroscopy. 4 arm PMMA-b-PAA (MW 30 kDa) was loaded with hydrophobic model drug indomethacin with an extremely high drug loading efficiency (22.5% drug content). Drug loaded polymer formed a stable and biodegradable complex in aqueous medium.

### 1. Giriş

Polimerik malzemelerin kontrollü ilaç salımı amacıyla taşıyıcı olarak kullanılması polimer araştırmaları ve teknolojisinde giderek genişleyen ve önem kazanan bir alandır. Özellikle polipeptitler ve antikanser ilaçlar gibi sindirim yoluyla alınması sakıncalı ilaç tedavilerinde bu tip taşıyıcı malzemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla hazırlanan fonksiyonel polimer karışımları, polimer kompleksleri, blok kopolimerler, ve polimerik misel adıyla anılan amfifilik polimer partikülleri, ilaç yükleme, ilaç salım profili, biyolojik parçalanma ve kararlılık özellikleri bakımından araştırılmaktadır [1].

İlaç taşıyıcı olarak kullanılan polimerlerin tasarımında partikül geometrisi önemli bir rol oynar. Polimerin molekül ağırlığı, hidrofilik-hidrofobik segmentlerin birbirine oranı ve çapraz bağ oranı, polimer molekülünün ilaçla etkileşimini, yüklenme kapasitesini ve salım kinetiğini belirleyen değişkenlerdir. Ayrıca ilaç ve polimer kompleksinin serum ortamındaki kararlılığı ve biyolojik parçalanma özellikleri de yine polimerin kimyasal ve geometrik yapısına bağlıdır.[2]

Blok kopolimerler hidrofilik ve hidrofobik polimer zincirlerinin birarada bulunmasıyla amfifilik yapı kazanırlar. Hidrofobik merkezi oluşturan polimer zincirleri hidrofobik malzemeyi hapseder ve hidrofilik dış yüzey su ortamında misel oluşturur, özellikle yıldız polimer tabir edilen çok kollu blok kopolimerler son derece kararlı miseller oluşturabilirler. Blok kopolimer sentezinde akrilik monomerlerin kullanılması hem yüzey kimyasının modifikasyona açık olması hem de kontrollü polimerizasyon sağlanabilmesi açısından avantajlıdır [3].

Bu amaçla kullanılan ATRP (Atomik Transfer Radikal Polimerizasyon) yöntemiyle, bir ligand yardımıyla aktifleştirilen metal katalizör ile, yüksek sıcaklıklarda (60-100°C) hızlı ve kontrollü bir polimerizasyon sağlanabilir [4]. Bu çalışmada 3, 4 ve 6 kollu Poli(metil metakrilat)-blok-poli(akrilik asit) sentezlenmesinin nedeni poli metil metakrilat oligomerlerinin ve buna bağlı poliakrilik asit zincirlerinin amfifilik bir yapı oluşturması ve tıpta kullanımı olan bu akrilik polimerin biyolojik olarak parçalanabilir bir kompleksler oluşturabilmesidir [5].

İlaç aktarımında kullanılacak amfifilik bir polimer malzemenin, antitoksik ve kana karıştıktan sonra parçalanarak vücuttan atılabilir olması elzemdir. Bu nedenle sentezlenen molekülün 50 kDa'dan büyük olmaması gereklidir [6,7]. Sentezlenen polimerin hedeflenen ilaçla yüksek kapasitede yüklenebilmesi, ilaç yüklü polimerin su ortamında kolayca kararlı bir misel oluşturması ve vücuda girdikten sonra ilacı en az sekiz saat içinde, tercihen sabit hızda salması beklenir [8]. Bu beklentileri karşılayan ilaç taşıyıcıların sentezlenmesiyle örneğin kanser ve şeker hastalığı tedavisi gibi zahmetli ve ciddi yan etkileri olan tedavilerin kolaylaştırılması ve zararlı yan etkilerin azaltılması hedeflenmektedir.

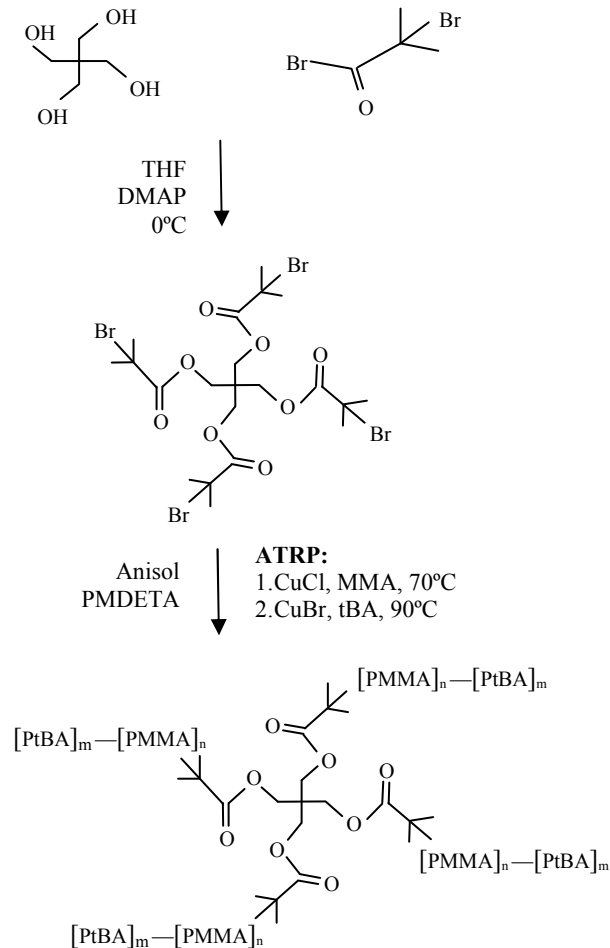
## 2. Malzeme ve Metodlar

### 2.1. Malzemeler

Pentaeritritol (Aldrich 98%), dipentaeritritol (Aldrich, tech.) ve 1,3,5 trihidroksi benzen (Aldrich, 97%) kurutulduktan sonra nitrojen altında 2-bromoisobutyryl bromide (Fluka, 97%) ile 0°C'de bromine edildi. tBA (Aldrich, 99%) ve MMA (Aldrich, 99%) monomerleri aktif alumina kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. *N,N,N',N',N'*-Pentamethyl diethylene triamine (PMDETA; Aldrich) kullanım öncesinde NaOH üzerinden distile edildi. Tetrahidrofuran, metanol, heksan, dietil eter, diklorometan solventleri distilasyonla saflaştırıldı. Katalizör olarak CuBr (Aldrich, 99.999%) ve reaksiyon ortamı olarak anisol (Aldrich, 99%), hidroliz için trifloroasetik asit (Sigma 99%), floresan boya pyrene (Fluka 99%), model ilaç olarak indometazin (Fluka, 99%) kullanıldı.

### 2.2. Sentez

ATRP sentezi iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. İlk aşamada bromine edilmiş 3, 4 ve 6 kollarlı başlangıç moleküllerinden, Br×250 oranında MMA, monomerle eşit hacimde anisol, stokiometrik oranda CuCl ile, PMDETA ile, 70 °C'de PMMA merkez molekülü oluşturuldu.



Şekil 1. Pentaeritritolden başlayarak 4 kollarlı PMMA-b-PtBA sentezi.

Bu polimer saflaştırıldıktan sonra Br×550 oranında tBA, monomerle eşit hacimde anisol, stokiometrik oranın 10 % fazlasıyla CuBr ve fazla miktarda PMDETA ile Şekil 1'de görüldüğü gibi 90 °C'de reaksiyona sokularak 3, 4 ve 6 kollarlı PMMA-b-PtBA polimerler sentezlendi. Hidroliz reaksiyonuyla PtBA kollar PAA'ya dönüştürüldü. Polimer molekül ağırlıkları GPC, molekül yapıları ise H-NMR ve FTIR ile belirlendi.

### 2.3. Maksimum Yükleme Kapasitesi

200 mg/ml ve 500 mg/ml polimer çözeltileri,  $2.5 \times 10^{-7}$  M and  $30 \times 10^{-7}$  M aralığında değişen farklı pyrene konsantrasyonları içerecek şekilde hazırlandı. Her bir numune 16 saat 4°C'de karıştırılarak yükleme gerçekleştirildi. 1500 rpm hızda 10 dakika santrifüjle polimere yüklenmeyen pyrene çöktürüldü. Kararlı misel oluşturan polimere yüklenmiş maksimum pyrene oranı, floresans spektrofotometre ile 330 nm dalgaboyunda uyarılan numunelerin 393 nm dalgaboyunda ışımlarının ölçümüyle belirlendi.

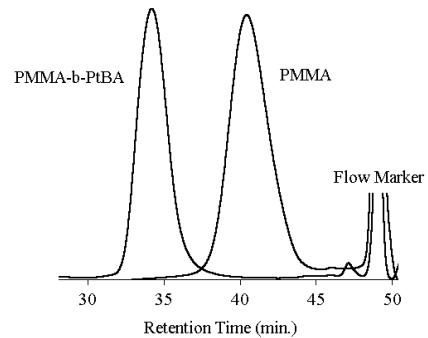
### 2.4. Kritik Misel Konsantrasyonu

0.015 mg/L ve 1500 mg/L konsantrasyonları aralığında hazırlanan polimer çözeltileri  $2 \times 10^{-7}$  M pyrene ile 16 saat 4°C'de yüklendi. Kritik misel konsantrasyonu, hangi pyrene konsantrasyonunda kararlı bir misel oluştuğunun floresans spektroskopisi ile gözlenmesi sayesinde belirlendi. Kararlı misel oluşumuyla, yüklenen pyrene'in I<sub>1</sub> ve I<sub>3</sub> bantlarında kayma gözlemlendi. I<sub>1</sub> / I<sub>3</sub> oranının polimer konsantrasyonuna karşı çizdirilmesiyle, misel oluşumunu gösteren eğri elde edildi, iyonik miseller için eğimin sonlandığı nokta kritik misel konsantrasyonu kabul edildi.

## 3. Bulgular

### 3.1. Karakterizasyon

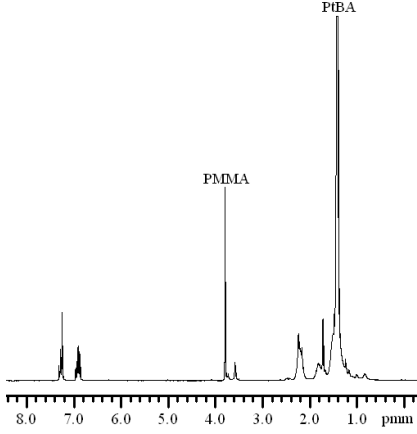
Polimerlerin molekül ağırlıkları ve polidispersite indisleri GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi) ile analiz edildi. Şekil 2'de 4 kollarlı PMMA (7 kDa) ile ondan sentezlenen PMMA-b-PtBA (30 kDa) numunesinin GPC analiz sonucu gösterilmektedir.



Şekil 2. 4 kollarlı PMMA (7 kDa) ve PMMA-b-PtBA (30 kDa) kromatogramları.

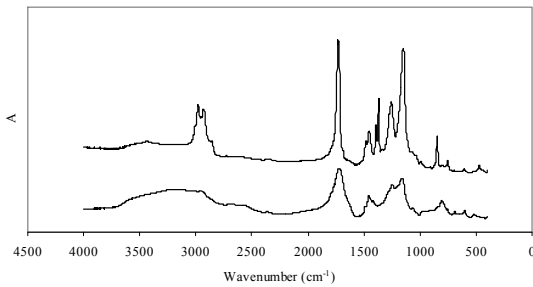
Bu çalışmada incelenen polimerler Tablo 1’de molekül ağırlıklarıyla ve ağırlık bazında hidrofobik PMMA oranlarıyla gösterilmiştir. Hazırlanan tüm polimerlerin polidispersite indisleri 1.05-1.20 aralığındadır.

Saflaştırılan polimerlerin H-NMR analizlerinde monomer kalıntısı gözlenmemiştir (Şekil 3). (H-NMR  $\delta$ ; PMMA: 0,5-1,0 ppm CH<sub>3</sub>, 1,56 ppm CH<sub>2</sub>, 3,6 ppm OCH<sub>3</sub> ve PtBA: 1,7 ppm CH<sub>2</sub>, 2,4 ppm CH, 1.42 ppm (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)



Şekil 3. 4 kollu PMMA-b-PtBA’nın H-NMRspektrumu.

Hidroлиз öncesinde ve sonrasında PMMA-b-PtBA ve PMMA-b-PAA terimleriyle ifade edilen polimer numunelerinin kimyasal yapıları FTIR ile analiz edildi. Şekil 4’te, PMMA-b-PtBA’ye ait FTIR spektrumunda 2925 cm<sup>-1</sup>’de gözlenen karakteristik tBA piki hidroлиз işlemiyle kaybolmuş, 1730 cm<sup>-1</sup>’de gözlenen diğer tBA pikinin yerini ise 1712 cm<sup>-1</sup>’de gözlenen karboksil piki almıştır. 1200-1400 cm<sup>-1</sup>’de ise karakteristik PMMA pikleri gözlenmiştir.



Şekil 4. 4 kollu PMMA-b-PtBA (üstte) ve PMMA-b-PAA (altta) polimerlerinin FTIR spektrumları.

### 3.2. Yüklenme Kapasitesi

Polimerlerin yüklenme kapasiteleri, artan pyrene konsantrasyonuna göre değişen maksimum RFU (Relatif Floresans Birimi) değerleriyle karşılaştırıldı. Edinilen bilgiye göre, 3 kollu polimerlerin yüklenme kapasiteleri 4 ve 6 kollu PMMA-b-PAA polimerlerinden daha küçüktür. 4 ve 6 kollu polimerlerin yüklenme kapasiteleri ise hidrofobik polimer oranı arttıkça artış göstermiştir. Tablo 1’de gözlemlendiği gibi,

yüksek (500 mg/L) polimer konsantrasyonlarında en yüksek yüklenme kapasitesi en küçük molekül ağırlığına (20 kDa) ve en yüksek hidrofobik PMMA oranına (0.45) sahip olan 6 kollu PMMA-b-PAA numunesi ile elde edildiği halde, daha düşük polimer konsantrasyonunda (200 mg/L) 4 kollu polimerlerin performansının daha iyi olduğu gözlemlendi. Düşük polimer konsantrasyonunda, 4 kollu PMMA-b-PAA (merkez PMMA 7 kDa, toplam molekül ağırlığı 30 kDa), aynı PMMA başlatıcıdan (7 kDa) toplam molekül ağırlığı 20 kDa olacak şekilde sentezlenen ve hidrofobik merkez oranı çok daha yüksek olan (0,41) 4 kollu numuneden daha yüksek bir yüklenme performansı sergiledi. Bu da hidrofobik merkez oranının sadece yüklenme kapasitesini değil, polimer konsantrasyonuna göre değişen kararlı misel oluşumunu etkileyen bir parametre olduğunu sergilemektedir. Bu sonuçların ışığında, ilaç yüklemesi için 4 kollu, 7 kDa hidrofobik PMMA merkezli, 30 kDa PMMA-b-PAA yıldız polimerin ideal bir polimerik taşıyıcı olduğu düşünülmektedir. Kapasite ve kararlılık açısından optimum hidrofobik merkez oranı ise 0,25 olarak belirlenmiştir. İlaç taşıyıcı olarak denemesi kararlaştırılan polimerin partikül büyüklüğünün atomik kuvvet mikroskobu ve dinamik ışık saçılımı prensibiyle çalışan Zetasizer ölçümleriyle belirlenen parçacık boyutu 30 nm’dir.

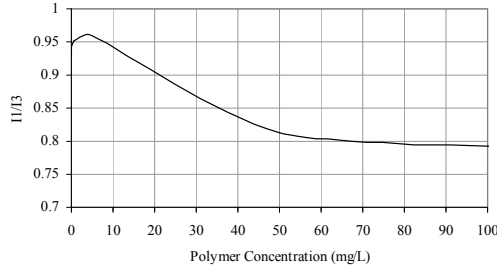
Tablo 1. PMMA-b-PAA yıldız blok kopolimerlerinin pyrene ile maksimum yüklenme kapasitelerinin kol sayısına (n), molekül ağırlığına (MW) ve hidrofobik merkezin ağırlık oranına (f<sub>c</sub>) göre değişimi.

n	MW (kDa)	f <sub>c</sub>	Maksimum Yüklenme Kapasitesi 200 mg/L (RFU)	Maksimum Yüklenme Kapasitesi 500 mg/L (RFU)
3	20	0,25	60,5	154,1
4	20	0,41	132,1	301,8
4	30	0,23	139,5	217,0
4	35	0,19	59,0	150,4
6	20	0,45	117,3	344,4
6	45	0,18	53,1	198,5

### 3.3. Kritik Misel Konsantrasyonu

Polimer misellerin su ve sulu çözelti ortamlarındaki kararlılığının bir ölçütü olan kritik misel konsantrasyonunun özellikle yıldız polimerlerde çok düşük olması beklenir.

Floresans yöntemiyle belirlenen birinci ve üçüncü karakteristik pyrene bantlarının (I<sub>1</sub> 372 nm ve I<sub>2</sub> 385 nm) oranının polimer konsantrasyonuna karşılık çizimiyle elde edilen eğrinin düzleşme noktası, iyonik miseller için kritik misel konsantrasyonu kabul edilir. Buna göre, 7 kDa PMMA ve 30 kDa toplam molekül ağırlığına sahip 4 kollu PMMA-b-PAA’nın kritik misel konsantrasyonu Şekil 5’te görüldüğü gibi 50 mg/L olarak belirlenmiştir. Bir başka deyişle polimer, 50 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonlarda kararlı misel oluşturma, dolayısıyla hidrofobik merkezinde depolayacağı hidrofobik bir maddeyi su ve sulu ortamlarda homojen bir çözelti oluşturacak şekilde taşıyacak kapasiteye sahiptir.

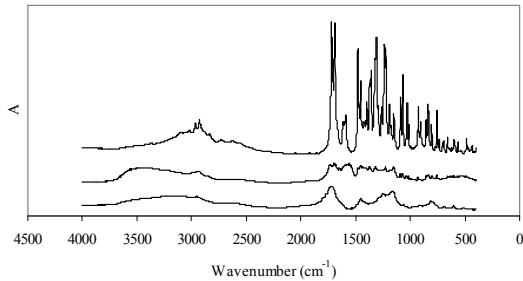


**Şekil 5.** 4 kollu PMMA-b-PAA (7 kDa/30kDa) numunesinin floresans ışına spektrumunda gözlenen kayma oranının ( $I_1/I_3$ ) polimer konsantrasyonuna göre değişim grafiği.

Bu özellik, özellikle kemoterapi gibi hidrofobik ve toksik ilaçların dozlarının ve çözünürlüklerinin hayati önem taşıdığı tedavilerde aranan bir özelliktir.

### 3.4. İlaç Yükleme

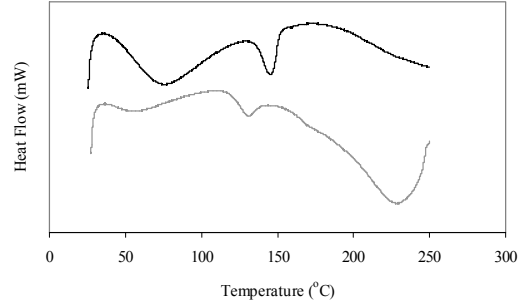
Yüklenme kapasitesi ve kritik misel konsantrasyonuna göre umut vadeden, 4 kollu PMMA-b-PAA (30 kDa) numunesinin ilaç yüklenme kapasitesi araştırıldı. Hidrofobik model ilaç olarak, bir anti-enflamatuar olan indometazin kullanıldı. Ağırlıkça eşit miktarda ilaç çözeltisiyle yarım saat oda sıcaklığında karıştırılan polimer, ilaçla yükleme işleminden sonra diyalizle saflaştırıldı ve dondurucu kurutucuda kurutuldu. Elde edilen polimer/ilâç kompleksi dimetil formamid içinde çözülerek yüklenen ilaç miktarı UV-spektrofotometre ile 22.5 % olarak belirlendi. Şekil 6'da verilen FTIR spektrumlarında, indometazinin karakteristik piklerinin yükleme sonrasında baskılandığı gözlemlendi. Bu bulgu indometazinin büyük ölçüde hidrofobik merkezde toplandığına işaret etmektedir.



**Şekil 6.** Model ilaç indometazin (en üstte), ilaç yüklü 4 kollu PMMA-b-PAA (30 kDa) ve yüklenmemiş polimerin FTIR spektrumları.

İlaç yüklü polimer ile yüklenmemiş polimerlerin DSC analizleri yükleme sonrasında polimerin camı geçiş sıcaklığının ( $T_g$ )  $55^\circ\text{C}$ 'den  $75^\circ\text{C}$ 'ye, erime sıcaklığının ( $T_m$ ) ise  $130^\circ\text{C}$ 'den  $145^\circ\text{C}$ 'ye yükseldiğini göstermektedir (Şekil 7).

Akrilik polimerlerle hidrofobik, asidik ilaçlar arasında gözlenebilecek kimyasal veya elektrostatik bağların neden olduğu bu profil değişimi, ilaçla polimer arasında bir afinite olduğunu gösterir. Bu afinite polimerin yüklenme kapasitesinin artmasına ve salım işleminin yavaşlamasına neden olmaktadır.



**Şekil 6.** İlaç yüklenmiş (üstte) ve yüklenmemiş (altta) 4 kollu PMMA-b-PAA (30 kDa) numunelerinin DSC termogramları.

## 4. Sonuçlar

ATRP yöntemiyle 20kDa ve 50kDa molekül ağırlığı arasında 3, 4 ve 6 kollu amfifilik PMMA-b-PAA kopolimerler sentezlendi ve maksimum yüklenme kapasiteleri karşılaştırıldı. Hidrofobik ilaçların taşınması ve kontrollü salımı için kritik misel konsantrasyonu 50 mg/L, molekül ağırlığı 30 kDa ve hidrofobik merkezin ağırlık oranı 0,23 olan 4 kollu PMMA-b-PAA önerildi. Önerilen polimer, model ilaç indometazin ile 22.5% gibi yüksek bir oranda yüklendi ve suda kararlı çözelti oluşturdu.

## 5. Kaynakça

- [1] A.K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu and S. Kankane, "Responsive polymers in controlled drug delivery," *Progress in Polymer Science*, vol. 33, pp. 1088–1118, Sep.2008
- [2] L. Y. Qiu and Y. H. Bae, "Polymer Architecture and Drug Delivery," *Pharmaceutical Research*, vol. 23, no. 1, pp.1-30, Jan.2006
- [3] Kilian, L., "Synthesis and Characterization of Responsive Poly(Alkyl Methacrylate) Topologies" *Ph. Thesis*, Department of Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University, 2004.
- [4] V. Coessens, T. Pintauer and K. Matyjaszewski, "Functional polymers by atom transfer radical polymerization," *Progress in Polymer Science*, vol. 26, pp. 337-377, Nov.2000.
- [5] G. Gaucher, M. H. Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger and J.C. Leroux, "Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol.109, pp. 169–188, Dec.2005.
- [6] C. Allen, D. Maysinger and A. Eisenberg, "Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 16, no.1, pp. 3–27, Nov.1999.
- [7] N. Nishiyama and K. Kataoka, "Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 112, no.3, pp. 630–648, Jul.2006.
- [8] S. Bontha, A. V. Kabanov and T. K. Bronich, "Polymer micelles with cross-linked ionic cores for delivery of anticancer drugs," *Journal of Controlled Release*, vol. 114, iss.2, pp.163–174, Aug. 2006.