

На правах рукописи

Круппа Инна Сергеевна

**Полисахаридные полимеры-носители
для физиологически активных
нафтальдегидов**

05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2017 год

Работа выполнена на кафедре химической технологии пластических масс
Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева

Научный руководитель:

Дятлов Валерий Александрович
доктор химических наук,
профессор кафедры химической технологии
пластических масс Российского химико-
технологического университета имени
Д.И. Менделеева

Официальные оппоненты:

Акопова Татьяна Анатольевна
доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник
Института синтетических полимерных
материалов имени Н.С. Ениколопова
Российской академии наук

Сидоров Олег Иванович
кандидат химических наук,
начальник лаборатории ФГУП
«Федеральный Центр Двойных Технологий
«СОЮЗ»

Ведущая организация:

Институт нефтехимического синтеза им.
А.В. Топчиева Российской академии наук

Защита состоится «21» сентября 2017 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета Д 212.204.01 при РХТУ им. Д. И. Менделеева (125047
г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре и
на сайте РХТУ им. Д.И. Менделеева. <http://diss.muctr.ru/author/188/>

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2017 г.

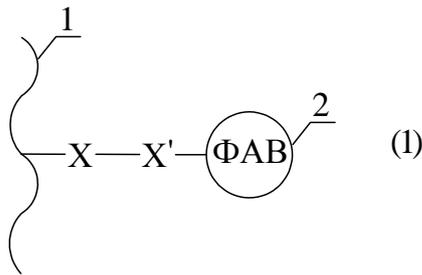
Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 212.204.01

Биличенко Ю. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Химия полимерных лекарственных препаратов, интенсивно развивающаяся область науки, позволившая осуществить прорыв в лечении наиболее опасных вирусных и онкологических заболеваний. В соответствии с классической теорией, предложенной Х. Рингсдорфом в середине 1980-х годов, физиологически активные полимеры (ФАП) прививочного типа синтезируют путем присоединения физиологически активного вещества (ФАВ) к инертному полимеру носителю гидролизуемой химической связью.



1 – полимер-носитель

2 - Физиологически активное вещество

X – Ковалентная связь между полимером-носителем и «спейсером»

X' – Ковалентная связь между «спейсером» и ФАВ

В условиях организма ФАВ выделяется в неизменном виде при гидролизе, а носитель, или продукты его деградации, выводится, в большинстве случаев через почки за счет клубочковой фильтрации. Этот подход помог решить множество задач в фармакологии включая значительное понижение токсичности ФАВ, позволил ввести в клиническую практику препараты на основе токсинов за счет медленного контролируемого выделения в организме и целевой доставки ФАВ в орган-мишень.

Диальдегидполисахариды - почти идеальные носители для создания ФАП прививочного типа. У них есть биodeградирующая основная цепь и альдегидные группы способные связывать ФАВ с образованием ковалентных связей, гидролизуемых в организме без участия ферментов. Диальдегидполисахариды успешно применяют во всем мире для присоединения аминов, пептидов и ферментов. Однако проблема понижения токсичности особенно остро стоит не только для ФАВ пептидной природы, но и веществ, содержащих реакционноспособные альдегидные группы. К ним относится токсин хлопчатника госсипол – нафталдегид с широким спектром физиологической активности. В последние годы на его основе созданы и введены в клиническую практику многочисленные ФАП с использованием диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы (ДАКМЦ) в качестве полимера-носителя. Однако, химическое строение ФАП и продуктов их биоразложения в физиологических условиях до сих пор остается предметом дискуссии. Главным остается вопрос – пригодны ли диальдегидполисахариды для использования в качестве носителей ФАВ нафталдегидной природы и выполняются ли принципы Х. Рингсдорфа в этом случае.

Степень разработанности темы. В научной литературе имеются данные по физиологической активности и токсичности полимерных производных госсипола, в которых он связан с носителем с образованием циклических фрагментов лактольного

типа, однако отсутствуют данные спектральных исследований, позволяющие надежно определить химическое строение синтезированных продуктов, а кроме того они принципиально отличаются по химическому строению от полимеров, полученных в ходе настоящего исследования. Описаны О-гликозиды, полученные классическим способом взаимодействия глюкозгалогенидов с фенолями госсипола в органических растворителях. В этих продуктах нафтохинон ковалентно связан с вовлечением в реакцию фенольных гидроксильных групп и они не могут рассматриваться в качестве соединений моделирующих взаимодействие нафталальдегидов с диальдегидполисахаридами.

Цели и задачи настоящей диссертации:

- изучение возможности использования диальдегидполисахаридных носителей для иммобилизации ФАВ альдегидной природы при синтезе ФАП прививочного типа;
- нахождение оптимальных условий синтеза диальдегидполисахаридов, позволяющих оптимизировать молекулярную массу и содержание альдегидных групп в полимере носителя;
- оптимизация условий синтеза и идентификация новых полимерных производных природного нафталальдегида госсипола ковалентно связанного с диальдегидполисахаридами: ДАКМЦ и диальдегиддекстраном (ДАД);
- выявление основных сайтов ковалентного связывания госсипола с основной цепью ДАКМЦ и ДАД, с учетом их разноразветвленности и с использованием низкомолекулярных моделей;
- идентификация основных продуктов гидролиза госсипол-содержащих ФАП прививочного типа в условиях моделирующих физиологические;
- определение типа ФАП, образующихся при ковалентном связывании нафталальдегидов с диальдегидполисахаридами, и их применимости в рамках модели ФАП прививочного типа Х. Рингсдорфа ;
- оценка токсичности синтезированных госсипол-содержащих ФАП прививочного типа в опытах *in vitro*.

Научная новизна. Синтезированы и охарактеризованы две группы неизвестных ранее госсипол-содержащих ФАП прививочного типа на основе ДАД и ДАКМЦ, отличающихся различной молекулярной массой, количеством окисленных звеньев и удельным содержанием госсипола.

Установлены основные сайты ковалентного связывания госсипола с макромолекулами диальдегидполисахаридов. Обнаружено, что присоединение с образованием полуацетальной связи протекает по окисленным звеньям и аномерному углеродному атому неокисленных гликозидных звеньев восстанавливающих концов макромолекул. При этом окисленные диальдегидные звенья ДАКМЦ и ДАД реагируют как монофункциональные. На квантово-механической модели показано, что взаимодействие одного окисленного звена с двумя фрагментами молекулы

госсипола не происходит по стерическим причинам, при этом в щелочной среде в боратном буфере альдегидная группа госсипола вступает в реакцию в кетольной форме.

Обнаружено, что при гидролизе полимерных производных в условиях, моделирующих физиологические, свободный госсипол не выделяется. В продуктах гидролиза обнаружены нафтохиноны с элиминированными альдегидной и изопропильной группами, а также продукты их дальнейшего окисления.

Гликозилированием госсипола в спиртовой и водной щелочной средах получены модельные соединения, позволившие определить основные сайты связывания ароматических альдегидов с макромолекулами диальдегидполисахаридов, а также строение продуктов гидролиза ФАП. Идентифицировано 22 неописанных ранее гликозидов нафтохинонов и продуктов их вторичных превращений.

Теоретическая и практическая значимость работы. На примере полимерных производных госсипола ковалентно связанного с ДАД и ДАКМЦ показано, что модель Х. Рингсдорфа для ФАП прививочного типа не является универсальной и не работает в случае использования диальдегидполисахаридов в качестве носителей ароматических альдегидов.

Обнаружен эффект существенного понижения токсичности *in vitro* при ковалентном связывании госсипола с полимерами-носителями. Синтезированные полимеры могут быть рекомендованы для дальнейших исследований в качестве перспективных противовирусных лекарственных препаратов.

Методология и методы исследования. В настоящей работе использованы следующие методы исследований: ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопия, MASS-MALDI-спектрометрия, гельпроникающая хроматография, ИК и УФ спектроскопии, ВЭЖХ и хроматомасс-спектрометрия.

Положения, выносимые на защиту: разработка методов синтеза новых ФАП прививочного типа на основе ДАД, ДАКМЦ с ковалентно связанным госсиполом и новых гликозилированных производных госсипола в водных и неводных средах. Результаты исследований сайтов связывания диальдегидполисахаридов с ароматическим нафталальдегидом – госсиполом. Результаты исследования продуктов кислотного гидролиза госсипол содержащих полимеров в условиях, моделирующих физиологические. Результаты исследования химического состава продуктов превращения альдегидсодержащих полисахаридных полимеров носителей ДАД и ДАКМЦ в щелочной среде.

Личный вклад автора состоит в формулировке целей и задач исследования, постановке химического эксперимента, обработке и интерпретации полученных результатов, формулировке научных выводов.

Степень достоверности и апробация результатов. Отдельные результаты работы были доложены на VIII и X конференциях молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2012» и «МКХТ-2014» (Москва, Россия, 2012, 2014);

V Всероссийская с международным участием конференция и школа для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты» (Московская область, Истра, Россия, 2015); XII international research and practice conference «European Science and Technology» (Munich, Germany 2015).

По результатам работы опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и тезисы к 7 докладам на научных конференциях, получено положительное решение на выдачу патента РФ и подана заявка патента РСТ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 137 страницах, содержит 52 рисунка и 13 таблиц. Список использованной литературы включает 119 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования. В обзоре литературы проанализированы имеющиеся научные данные по принципам создания ФАП прививочного типа, химической структуре и биологической активности госсипола и его производных, по способам его гликозилирования, а также по способам получения и химическому строению диальдегидполисахаридов. Отмечены основные направления исследований в области полимерных носителей лекарственных средств, способам синтеза, свойствам и химическому строению диальдегидполисахаридов.

В обсуждении представлены основные результаты по теме диссертации.

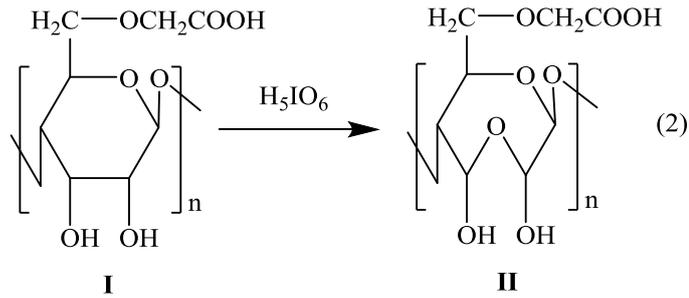
В экспериментальной части приведены физико-химические характеристики исходных веществ и способы их очистки. Описаны основные методики синтеза, методы физико-химического анализа и исследования синтезированных полимеров, продуктов их гидролиза и низкомолекулярных модельных соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Полисахаридные носители ФАВ

Изучение возможности использования диальдегидполисахаридов для ковалентного связывания ФАВ альдегидной природы проводили с использованием ДАД и ДАКМЦ в качестве полимеров-носителей пригодных для внутривенного и внутрижелудочного введения соответственно, а так же природного токсичного нафтаaldeгида - госсипола в качестве ФАВ.

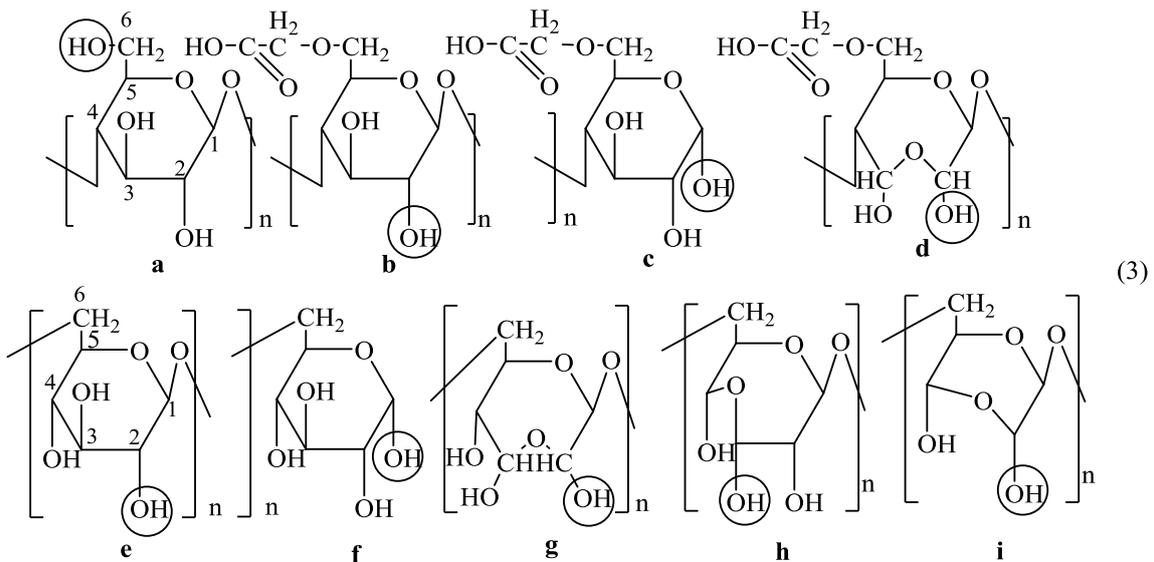
Известно, что полисахариды являются наиболее безопасными из известных носителей, что связано с их биологической инертностью и способностью к биоразложению внутри организма с выделением нетоксичных продуктов. Однако, ковалентное связывание ФАВ с носителями этого типа требует обязательной предварительной функционализации химически инертной основной цепи полисахарида. Для этого широко используют частичное периодатное окисление по реакции Малапрада с образованием окисленных звеньев. Как в твердом виде, так и в водном растворе они замкнуты в полуацетальные циклы, причем их реакционная способность существенно отличается от обычных алифатических альдегидов.



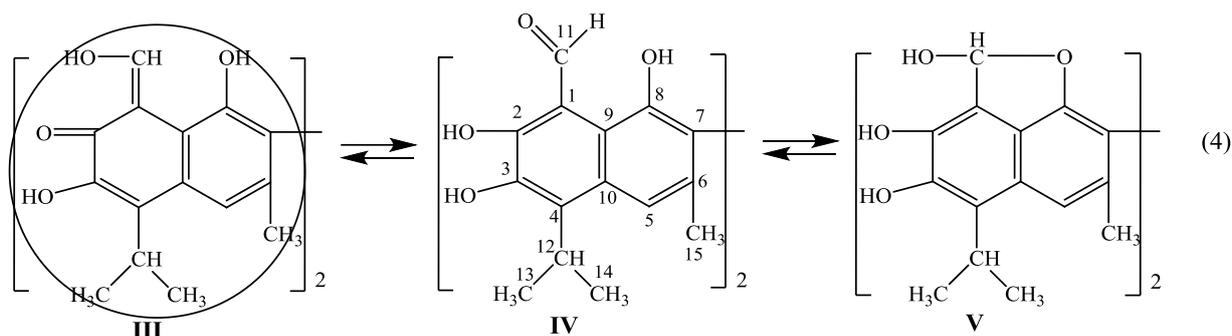
Обнаружено, что только одна из двух групп окисленного цикла способна вступать в реакцию с аминами с образованием Шиффовых оснований. Этим обусловлена разница в результатах определения доли окисленных звеньев оксимным методом и обратным йодометрическим титрованием: первый дает заниженный в два раза результат.

2. Сайты связывания ароматических альдегидов

В макромолекулах ДАКМЦ и ДАД, с учетом разноразветвленности, имеется несколько потенциальных сайтов, способных связываться с ФАВ альдегидной природы.



Госсипол – 7,7'-бис (1-формил-2,3,8-тригидрокси-4-изопропил-6-метил-нафталин) существует в трех таутомерных формах: кетольной (III), альдегидной (IV) и лактольной (V). В водных щелочных условиях преобладает кетольная форма, которая в свою очередь так же имеет два потенциальных сайта связывания с полимером-носителем – гидратированную карбонильную группу и фенольные гидроксильные группы нафталиновых колец. Госсипол выделяют из хлопчатника в виде устойчивого клатрата с уксусной кислотой – госсиполуксусной кислоты (ГУК).



3. Синтез госсипола ковалентно связанного с диальдегидполисахаридами

Взаимодействием ДАД и ДАКМЦ с госсиполом в боратном буферном растворе синтезированы ФАП прививочного типа, содержащие от 0,1 до 10 мол.% ковалентно-связанного госсипола.

Таблица 1 - Синтез ДАКМЦ ковалентно связанного с госсиполом

Соотношение госсипол: ДАКМЦ моль: осново-моль	ДАКМЦ			ДАКМЦ ковалентно связанный с госсиполом	
	$\gamma_{ок}$, %	$[\eta]$, дл/г	M_n , кДа	M_w , кДа	Содержание связанного госсипола, ч./млн.
1	2	3	4	5	6
Синтез в условиях избытка госсипола					
2.4:1	40	-	-	-	750000
1.2:1	40	0,121	32	11,3	102200
Синтез в условиях равномольного соотношения госсипол: осново-моль ДАКМЦ					
1:1	74	0,086	18	-	-
1:1	27	0,278	98	-	-
Синтез в условиях избытка ДАКМЦ					
1:1.34	1:1.34	1:1.34	1:1.34	1:1.34	1:1.34
1:1.34	1:1.34	1:1.34	1:1.34	1:1.34	1:1.34
0.5:1	0.5:1	0.5:1	0.5:1	0.5:1	0.5:1
0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1
0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1
0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1	0.1:1
0.01:1	0.01:1	0.01:1	0.01:1	0.01:1	0.01:1

Изменение молекулярной массы полимеров в процессе синтеза контролировали методом ГПХ с двойным детектированием при помощи мультиволнового УФ детектора и рефрактометра, соединенными последовательно. УФ детектор чувствителен только к наличию нафтохиноновых групп в полимере. Рефрактометр способен регистрировать все фракции независимо от содержания хромофорных групп. Молекулярная масса синтезированных ФАП находится в интервале от 11 до 67

кДа, причем она уменьшается более чем вдвое в процессе синтеза из-за деструкции основной цепи полимера. Её уменьшение в щелочных условиях столь существенно, что конечное значение не зависит от количества добавленного бифункционального альдегида – госсипола (таблица 1).

В образцах имеется незначительное количество трех олигомерных производных имеющих нафтохиноновые хромофорные группы с максимумом поглощения при $\lambda=235$ нм. Их объем элюции и длина волны поглощения совпадают с продуктами гликозилирования госсипола, точная молекулярная масса была определена методом MASS-MALDI-спектрометрии. Синтезированные полимеры не содержат остатков исходного низкомолекулярного госсипола.

Исходная ДАКМЦ не имеет ароматических хромофорных групп и не поглощает в УФ области спектра при длине волны более $\lambda=250$ нм, однако имеет отчетливый сигнал при детектировании рефрактометрическим детектором. Хроматография с двойным детектированием УФ и РФ детекторами, соединенными последовательно, позволило регистрировать фракционную неоднородность продуктов ковалентного связывания госсипола с диальдегидполисахаридами, то есть изучить распределение ароматических хромофорных групп по фракциям полимера с различной молекулярной массой. В полученных соединениях такая зависимость не обнаружена.

По данным ^{13}C ЯМР спектроскопии, также как и в реакции с аминами, окисленные звенья основной цепи ДАКМЦ реагируют с госсиполом как монофункциональные соединения, с образованием полуацетальной связи, стабилизированной за счет изомеризации нафтохинона.

В условиях трехкратного мольного избытка ДАКМЦ, в реакцию вступают обе альдегидные группы нафтохинона в виде кетольного таутомера. При соотношении госсипола и окисленных звеньев носителя близком к эквимольному в реакцию вступает только одна альдегидная группа молекулы ФАВ. Фенольные группы не вступают в реакцию, независимо от мольного соотношения полимер:госсипол. Аналогичным образом происходит взаимодействие госсипола с ДАД.

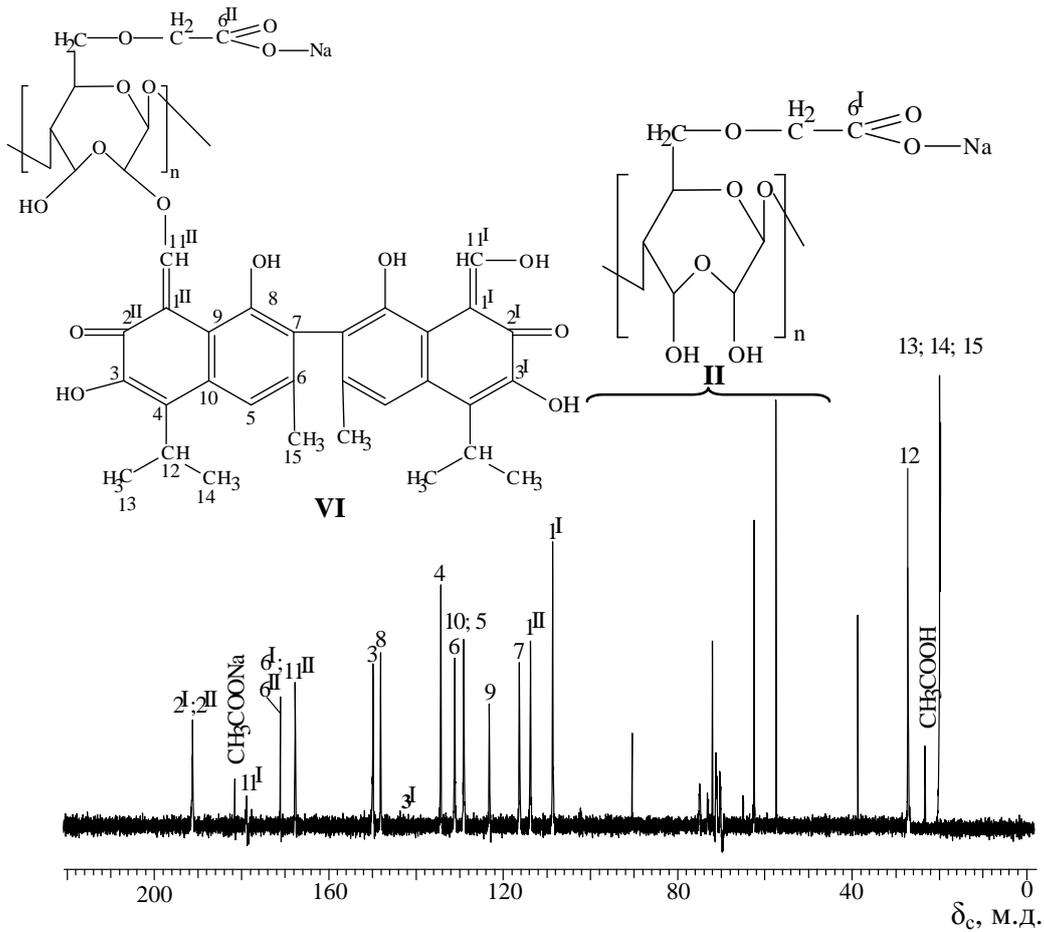


Рисунок 1 - Спектр ЯМР ^{13}C в D_2O ДАКМЦ ковалентно связанного с госсиполом, полученного в условиях избытка нафтохинона в гомогенных условиях

4. Синтез низкомолекулярных модельных продуктов гликозилирования нафталальдегида

Для определения конкретных сайтов ковалентного связывания ФАВ с макромолекулами носителей синтезированы модельные соединения – продукты взаимодействия госсипола с глюкозой в условиях, аналогичных синтезу полимерных производных. Борат-анионы, использующиеся в синтезе, которые обратимо присоединяются к глюкозе являются временными защитными группами по методу Безекена, предотвращающими присоединение ароматического альдегида по спиртовым группам глюкозы в экваториальном положении. Поэтому дополнительно синтезировали модельные соединения в среде этилового спирта, который не обладает свойствами ориентанта гликозилирования. Состав продуктов реакции анализировали методом ^{13}C ЯМР спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии.

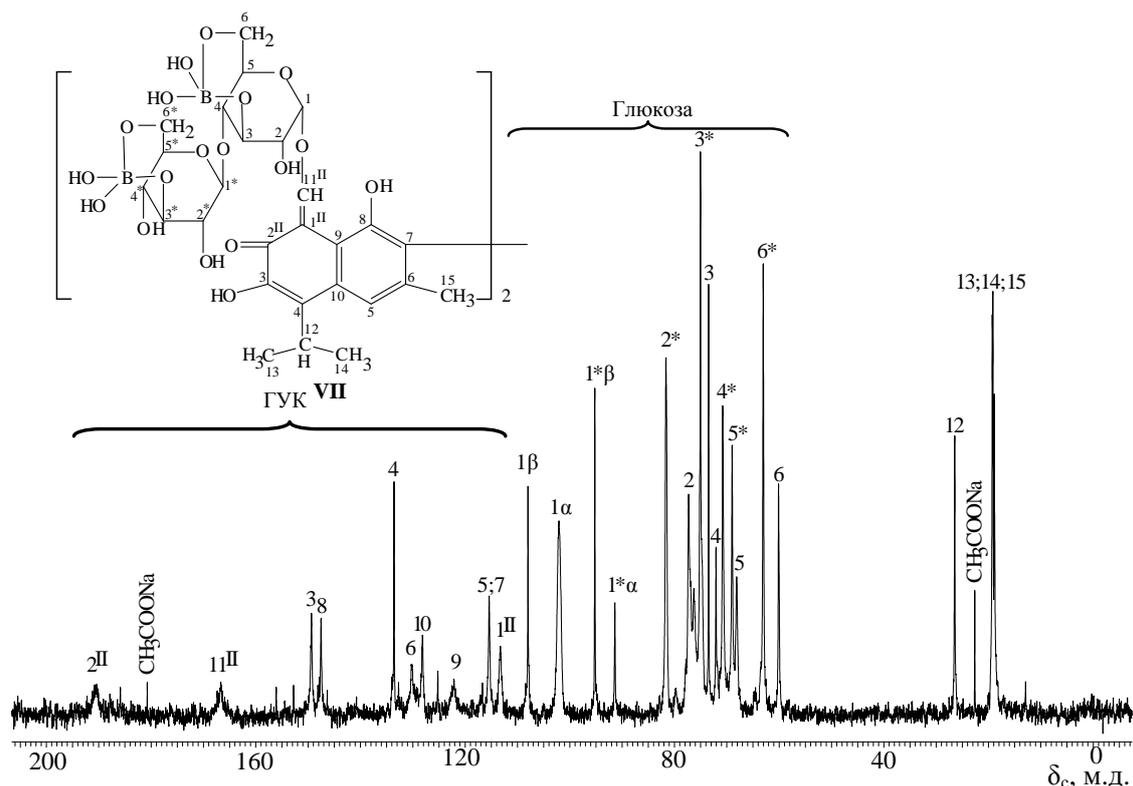


Рисунок 2 - ЯМР ^{13}C спектр продукта гликозилирования госсипола боратным комплексом глюкозы

На MASS-MALDI спектрах продуктов гликозилирования госсипола, снятых в режиме моноизотопной массы, наблюдаются интенсивные сигналы молекулярных ионов гликозидов нафтохинона, их боратных комплексов с последующей фрагментацией. Соединения XI и X не имеют молекулярного иона, однако в спектре имеется сигнал продукта частичного деалкилирования гликозида без одной изопропильной группы $m/z=800$, они находятся в равновесии и представляют собой ацетальную и лактольную формы одного и того же вещества. Кроме того, к продуктам дериватизации гликозидов относится группа сигналов комплексов с борной кислотой. Сигнал комплекса с двумя молекулами борной кислоты XIII, имеет $m/z=887$. При этом сигналу с $m/z=791$ соответствует дигликозид VIII, у которого элиминированы обе изопропильные группы с последующим окислением с образованием госсиполонна, а сигналу $m/z=1268$ - комплекс тетрагликозида с четырьмя атомами бора XIV. В спектре имеются сигналы продуктов конденсации госсипола с димерами глюкозы и их комплекса с борной кислотой $m/z=1045$ и $m/z=1143$ структуры XI и XII соответственно.

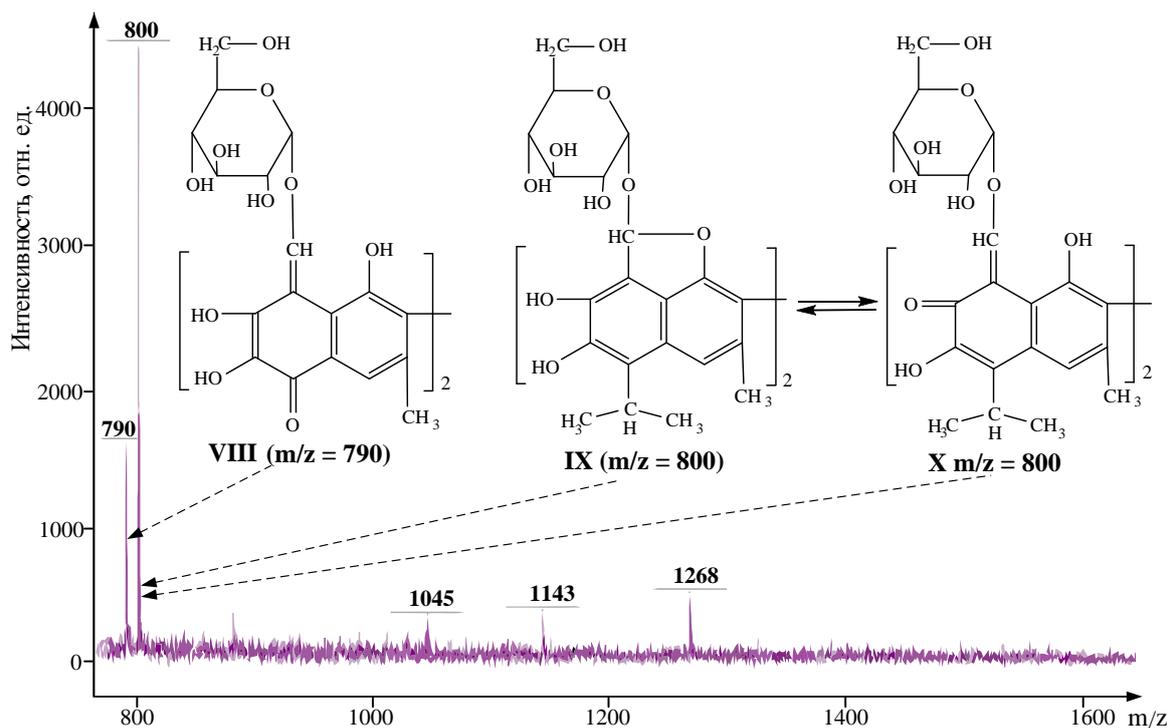


Рисунок 3 – MASS-MALDI спектр продуктов присоединения, образовавшихся при конденсации глюкозы с госсиполом

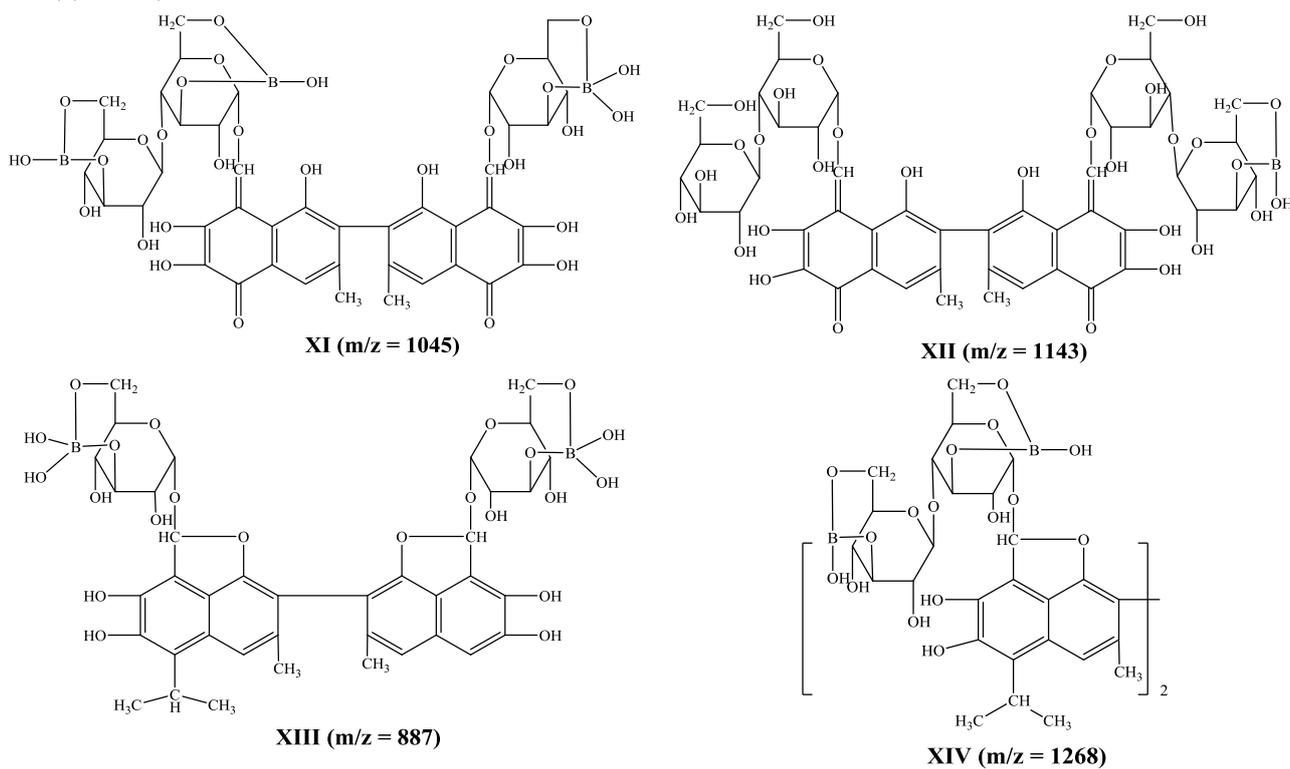


Рисунок 4 - Продукты фрагментации боратных комплексов, образовавшихся при конденсации глюкозы (XI, XIII) и ее димеров с госсиполом (XII, XIV)

В условиях избытка госсипола и отсутствия ориентанта (борат-анионов) в спиртовой среде гликозилирование протекает по анамерному углеродному атому глюкозы с образованием как α - так и β -моноголикозидов с участием только одной

альдегидной группы нафтохинона. В условиях недостатка госсипола образуется дигликозид, причем присоединение двух гликозидных остатков имеющих гидроксильные группы в экваториальном положении (β - дигликозидов) к одной молекуле нафтохинона стерически невозможно, что подтверждается данными квантово-химическими расчетами. Только α -изомер глюкозы вступает в реакцию, что подтверждается данными ЯМР ^{13}C спектроскопии.

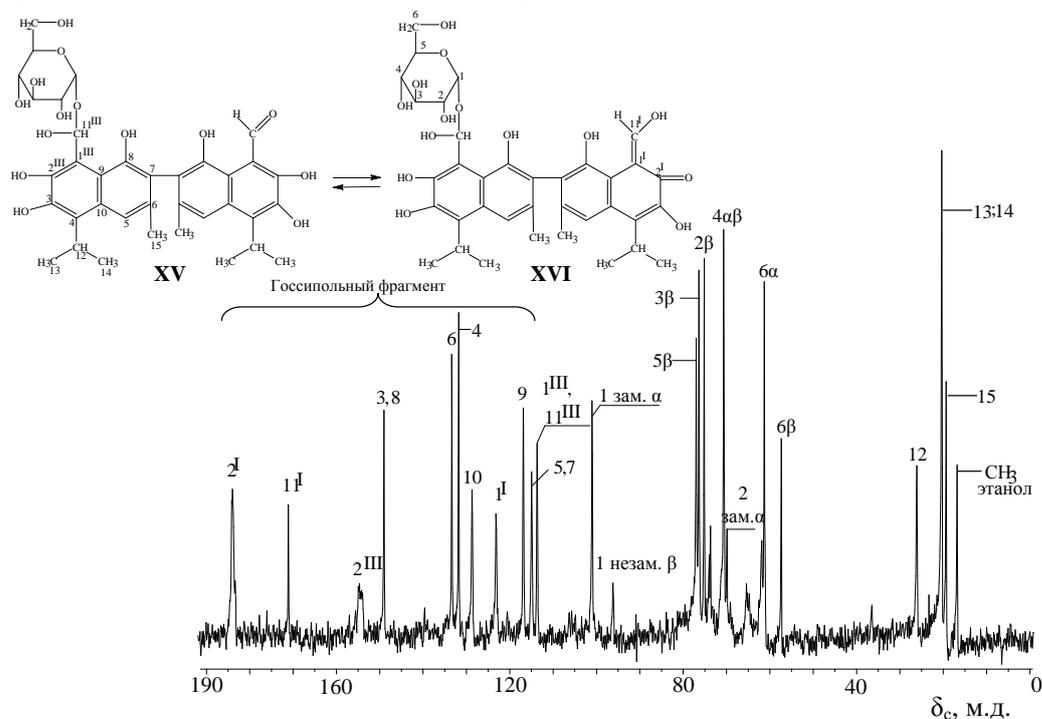


Рисунок 5 – Спектр ЯМР ^{13}C продукта присоединения госсипола к глюкозе в спиртовых условиях

В MASS-MALDI-спектре продукта реакции, полученного в условиях избытка нафтохинона, снятом в режиме моноизотопной массы, имеется сигнал молекулярного иона моногликозида госсипола с отношением массы к заряду $m/z=680$, а так же сигнал продукта его фрагментации с отщеплением изопропильной группы с $m/z=637$, в спектре также имеются сигналы молекулярных ионов продуктов фрагментации молекулы госсипола.

Таким образом, при синтезе госсипол-содержащего ФАП прививочного типа нафтальдегид присоединяется как к окисленным звеньям, так и к гидроксильным группам анамерных углеродных атомов восстанавливающих концов макромолекул, содержание которых зависит от молекулярной массы полимеров.

5. Определение типа ФАП. Гидролиз полимерных производных госсипола в условиях моделирующих физиологические

Тип физиологически активного полимера определяется химической структурой низкомолекулярного вещества выделяющегося в процессе гидролиза. Кроме того, он может обладать собственной активностью и всасываться в кровь из кишечника в неизменном виде без предварительного гидролиза. Во всех случаях именно

устойчивость к кислотному гидролизу соответствующих химических связей определяет какой процесс является преобладающим.

Полуацетальная связь нафтохинона с диальдегидполисахаридами устойчива в щелочной среде в условиях конденсации ФАВ с полимерами-носителями. Их гидролиз в кислой среде желудка может протекать с образованием продуктов трех типов, что и определяет тип физиологически активного полимера:

- Гидролиз может приводить к выделению нафталальдегида с сохранением обеих альдегидных функциональных групп. В этом случае ФАП является временным депо, выделяющим физиологически активное вещество в кровь в неизменном виде.
- Выделение активного вещества может сопровождаться декарбонилированием нафталальдегида. В этом случае полимерный препарат прививочного типа является пролекарством, выделяющим при гидролизе низкомолекулярное действующее начало в химически измененном виде.
- В случае если первой гидролизуется основная цепь полимера, реакция сопровождается выделением смеси химически модифицированных нафталальдегидов содержащих гликозидные заместители различной длины.

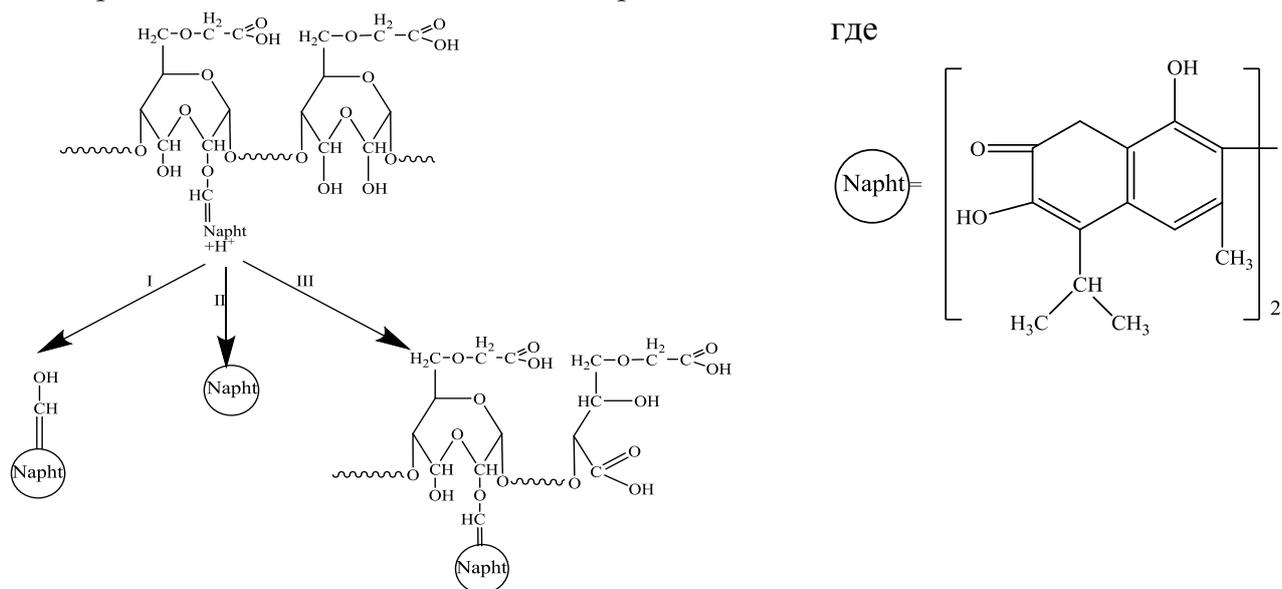


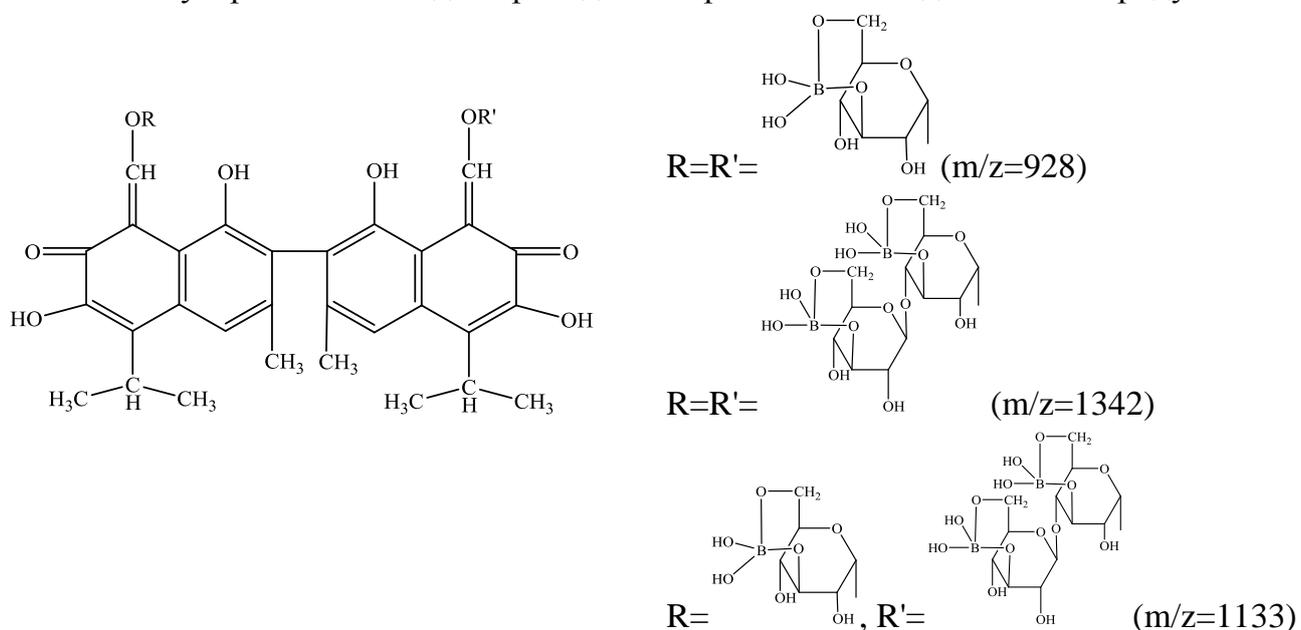
Схема 1 - Возможные направления кислотного гидролиза госсипола ковалентно связанного с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой

До настоящего исследования диальдегидполисахариды относили к классу носителей образующих ФАП прививочного типа, выделяющие ФАВ в неизменном виде (временное депо). Однако оказалось что, в случае их использования в качестве носителей ароматических альдегидов, диальдегидполисахариды позволяют создавать полимерные «про-лекарства».

Кислотный гидролиз полимеров и модельных гликозидов проводили при 36°C в буферных растворах, содержащих соляную и уксусную кислоты при pH=1,0 и pH=3,2. Состав образующихся низкомолекулярных продуктов не зависит от условий гидролиза. В качестве модельных соединений при анализе использовали продукты

конденсации госсипола с боратными комплексами глюкозы. Они представляют собой смесь ди-, три- и тетра-гликозидов с $m/z=928$; 1133; 1342 соответственно.

Гидролиз полимеров независимо от M_w приводит к полному исчезновению высокомолекулярного пика и появлению на хроматограммах интенсивных сигналов низкомолекулярных веществ с массой менее 1 кДа. Гидролиз модельных низкомолекулярных гликозидов приводит к образованию сходной смеси продуктов.



Анализ ЯМР ^{13}C спектров показал, что смесь содержит только апогоссипол (XVII) и продукты его окисления (XVIII). В MASS MALDI спектрах (рисунок 6) также присутствуют сигналы молекулярных ионов продуктов полного декарбонилирования нафталальдегида и окисленных соединений XVIII, XIX. В условиях спектрометрии эти вещества претерпевают частичную фрагментацию, отщепляя один или оба изопропильных радикала (XIX).

Таким образом, при кислотном гидролизе полимерных производных госсипола полученных его взаимодействием с диальдегидполисахаридами происходит отщепление от полимера-носителя производных с элиминированной альдегидной группой, а так же продуктов их последующих превращений. В результате вторичных реакций деалкилирования и окисления из них образуются нафтохиноны (XVIII, XIX, XX), при этом не наблюдается выделения свободного исходного госсипола. Гидролиз полимера сопровождается резким понижением молекулярной массы и деструкцией основной цепи. Однако не обнаружены продукты, в которых фрагменты молекулы носителя ковалентно связаны с нафталальдегидом, и которые можно было бы рассматривать в качестве самостоятельных физиологически активных соединений.

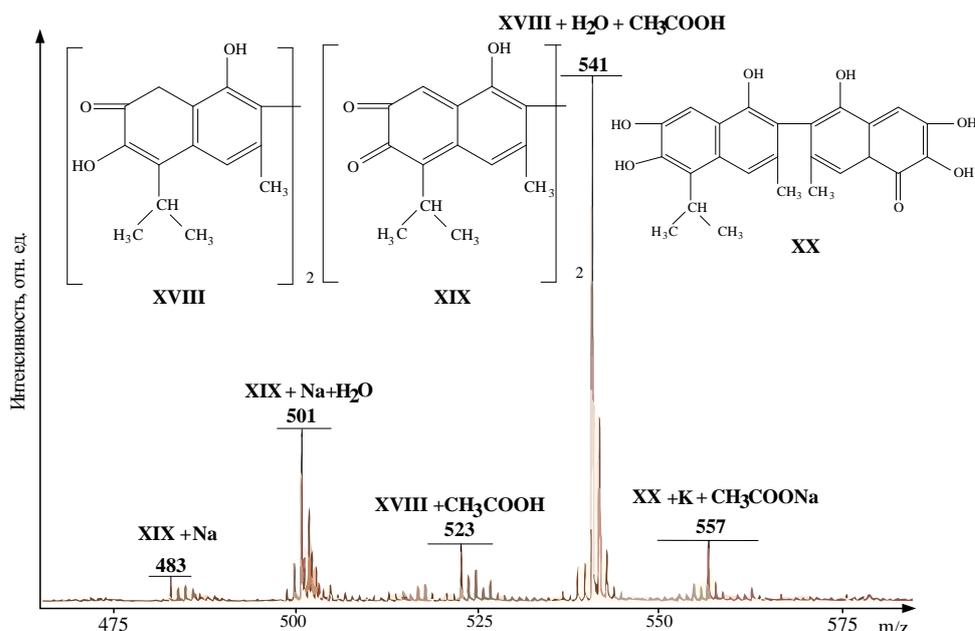


Рисунок 6 – MASS-MALDI спектр продуктов гидролиза гликозилированного госсипола

5. Биологическая активность синтезированных ФАП

Ковалентное связывание токсина госсипола с диальдегидполисахаридами позволяет существенно снизить его общую токсичность с сохранением противовирусной активности против различных штаммов вируса А. В зависимости от соотношения госсипол – окисленное звено в ДАКМЦ и типе связи нафталальдегида с носителем (двумя или одной альдегидными группами) можно изменять штамм-специфичность и контролировать уровень противовирусной активности полимеров.

Цитотоксичность синтезированных препаратов уменьшается с уменьшением удельного содержания связанного госсипола. Полимеры, содержащие нафтохинон с двумя замещенными альдегидными группами практически не токсичны.

Таблица 2 - Определение цитотоксичности (CC50) препаратов с различным содержанием госсипола на клеточной линии A549*

№ п/п	Содержание госсипола в препарате в пересчете на госсипол уксусную кислоту, вес. %	Доля незамещенных альдегидных групп, %	Цитотоксическая концентрация CC50, мг/мл
1	100,0	100	0,01
2	10,22	25-50	0,25
3	0,06	0	>50,00

Полученные результаты позволяют рекомендовать диальдегидполисахариды в качестве носителей ФАВ нафтохинонового типа, позволяющих существенно снизить их токсичность и расширить спектр противовирусного действия с использованием принципа создания полимерных «про-лекарств».

ВЫВОДЫ

1. Взаимодействием нафталальдегида госсипола с диальдегидполисахаридами: диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой и диальдегиддекстраном синтезированы и охарактеризованы ряд новых физиологически активных полимеров прививочного типа, проявляющие противовирусную активность против различных штаммов вируса гриппа А в опытах *in vitro*.

2. Обнаружено, что в условиях реакции нафтахинон присоединяется как к окисленным звеньям, так и к гидроксильным группам восстанавливающих концов полисахаридов с образованием полуацетальных связей.

3. Установлено, что полимерные производные не являются физиологически активными полимерами с собственной активностью, также не представляют собой систему контролируемого выделения низкомолекулярного госсипола и они противоречат модели Х. Рингсдорфа. Их следует классифицировать как полимерное «про-лекарство», выделяющее при гидролизе нафтохиноны с удаленной альдегидной группой, чем и обусловлен эффект снижения токсичности при присоединении нафталальдегида к полимеру-носителю.

4. С использованием синтезированных низкомолекулярных моделей, представляющих собой гликозилированный госсипол, определено химическое строение продуктов, образующихся при кислотном гидролизе госсипол-содержащих физиологически активных полимеров в условиях грубо моделирующих физиологические. Образующиеся соединения относятся к классу окисленных нафтохинонов.

5. Найдены условия региоселективного гликозилирования госсипола с использованием борат-анионов в качестве ориентантов.

6. Выявлена возможность использования диальдегидполисахаридов диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и диальдегиддекстрана в качестве полимеров-носителей для создания полимерных «про-лекарств» на основе нафталальдегидов.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Гумникова В. И., Дятлов В. А., Т. А. Гребенева В. А., Круппа И. С., Киреев В. В., Бахмутов В. И. Изучение химического строения диальдегиддекстранов, полученных периодатным окислением в различных условиях // Пластические массы. 2013. № 6. С. 44-50.
2. Дятлов В. А., Гумникова В. И., Гребенева Т. А., Круппа И. С., Рустамов И. Р., Киреев В. В., Малеев В. И. Изучение химического строения диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, полученной периодатным окислением в различных условиях // Пластические массы. 2013. № 8. С. 6-13.
3. Dyatlov V.A., Kruppa I. S., Mamaeva S. A., Kutergina I. Yu., Gumnikova V. I., Grebeneva T. A., Kireev V. V. Change of polysaccharide molecular – weight distribution and fraction homogeneity after periodate oxydation // Chemistry of Natural Compounds. 2014. V. 50. №. 6. P. 973-977.

4. Dyatlov V.A., Kruppa I. S., Grebeneva T. A., Kireev V. V., Sokol'skaya I.B. Covalent linkage of gossypol and dialdehyde dextran // Chemistry of Natural Compounds. 2016. V. 52. № 4. P. 628-633.
5. Долгова А. А., Чапала П. П., Круппа И.С., Гумникова В. И., Дятлов В. А. Химическое строение диальдегиддекстранов – полимеров-носителей в медицинских композициях для замещения костной ткани // Успехи в химии и химической технологии. Том 26, № 3, Сборник научных трудов. Москва. 2012. С. 91-95.
6. Чапала П. П., Долгова А. А., Круппа И. С., Гумникова В. И., Дятлов В. А. Особенности химического строения продуктов гомогенного периодатного окисления карбоксиметилцеллюлозы // Успехи в химии и химической технологии. Том 26, № 4, Сборник научных трудов. Москва. 2012. С. 123-126.
7. Круппа И.С., Мамаева С.А., Дятлов В.А., Рустамов И.Р. Химическая структура продуктов конденсации госсипола с глюкозой в водных и неводных средах // Успехи в химии и химической технологии. Том 28, № 3, Сборник научных трудов. Москва. 2014. С. 38-42.
8. Мамаева С.А., Круппа И.С., Дятлов В.А., Кутергина И.Ю., Рустамов И.Р., Гумникова В.И. Влияние периодатного окисления на молекулярно-массовые характеристики и фракционную неоднородность полисахаридов // Успехи в химии и химической технологии. Том 28, № 3, Сборник научных трудов. Москва. 2014. С. 45-49.
9. Круппа И.С., Маскалец Я.С., Горбатова Т.Э., Дятлов В.А. Функционализированные полисахаридные покрытия нанокорпускулярных носителей генов // Тез. докл. V Всероссийская с международным участием конференция и школа для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты». Московская область, 2015. С. 84.
10. Маскалец Я.С., Круппа И.С., Горбатова Т.Э., Дятлов В.А. Синтез полицианакрилатных нанокорпускулярных носителей ДНК // Тез. докл. V Всероссийская с международным участием конференция и школа для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты». Московская область, 2015. С. 90.
11. Kruppa I. S., Dyatlov V.A. Acidic hydrolysis's products of glycosylated gossypol // Тез. докл. Materials of the XII international research and practice conference «European Science and Technology». Munich, Germany, 2015. P. 21-25.

Патенты

12. Нестренко В.Г., Суслов А.П., Дятлов В.А., Круппа И.С. Полимерные производные госсипола, способ их получения и фармацевтическая композиция на их основе: патент РФ 4124783; заявл. 17.06.2014; положительное решение о выдаче патента от 18.12.2015.
13. Nesterenko V. G., Suslov A. P., Dyatlov V. A., Kruppa I. S. Gossypol polymer derivatives, process for preparing and pharmaceutical composition thereof: PCT/RU2015/000273.