

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.

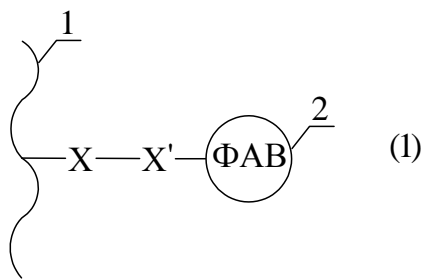
Ученый секретарь  
диссертационного совета  
Д 212.204.01

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 фенолятами 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:  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  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 нанокompозиты» (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.

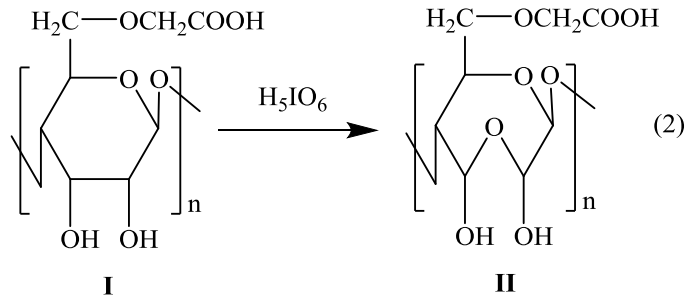
В экспериментальной части приведены физико-химические характеристики исходных веществ и способы их очистки. Описаны основные методики синтеза, методы физико-химического анализа и исследования синтезированных полимеров, продуктов их гидролиза и низкомолекулярных модельных соединений.

### **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.

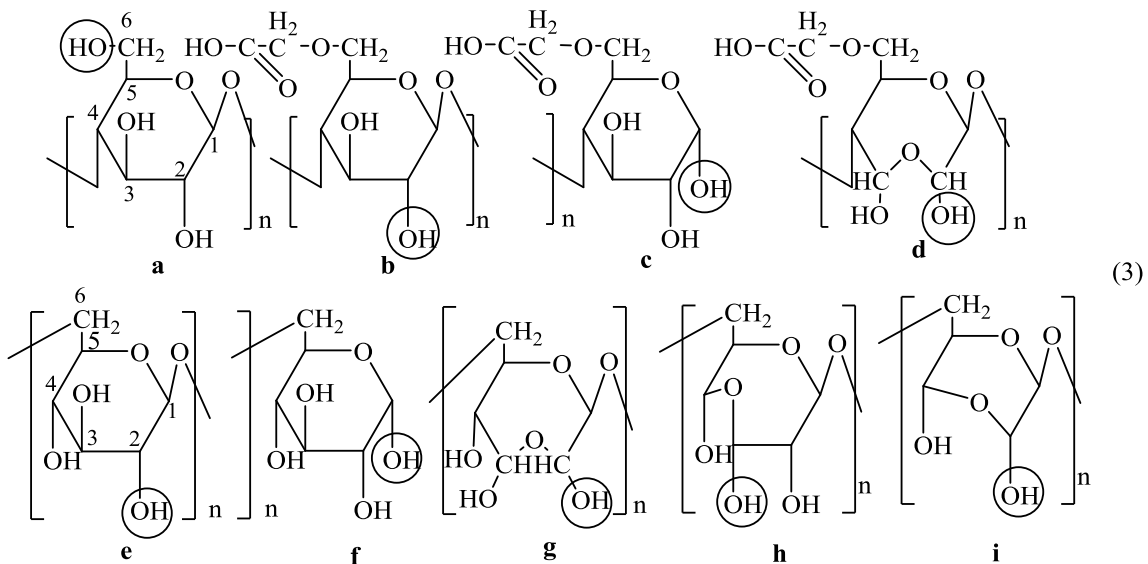
Известно, что полисахариды являются наиболее безопасными из известных носителей, что связано с их биологической инертностью и способностью к биоразложению внутри организма с выделением нетоксичных продуктов. Однако, ковалентное связывание ФАВ с носителями этого типа требует обязательной предварительной 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.



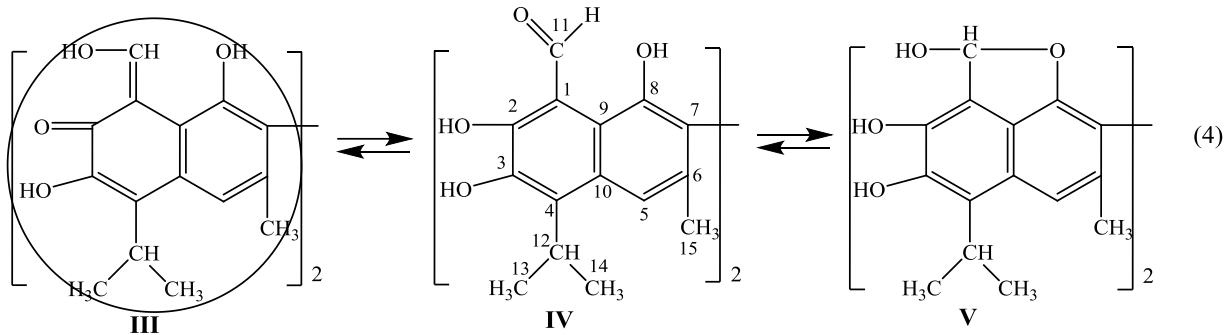
Обнаружено, что только одна из двух групп окисленного цикла способна вступать в реакцию с аминами с образованием Шиффовых оснований. Этим обусловлена разница в результатах определения доли окисленных звеньев оксимным методом и обратным йодометрическим титрованием: первый дает заниженный в два раза результат.

## 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-метилнафталин) 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 гидроксилы 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



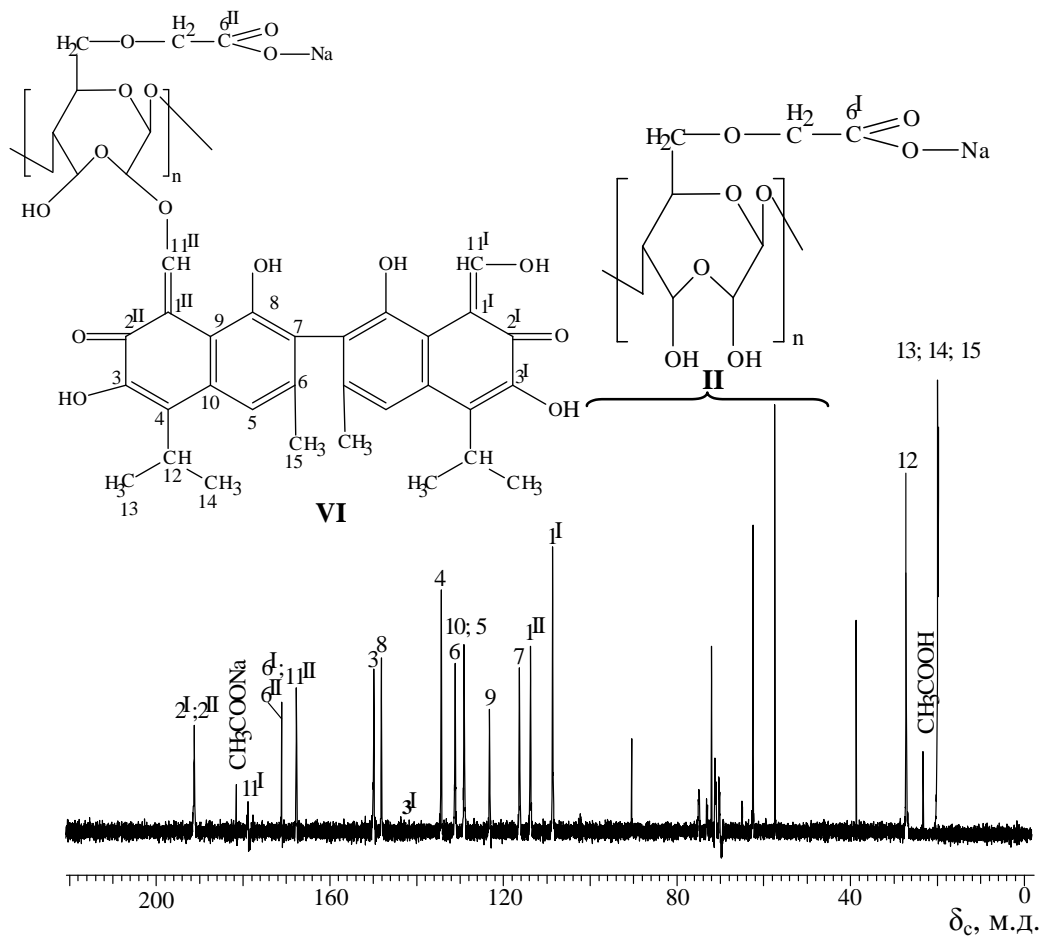
кДа, причем она уменьшается более чем вдвое в процессе синтеза из-за деструкции основной цепи полимера. Её уменьшение в щелочных условиях столь существенно, что конечное значение не зависит от количества добавленного бифункционального альдегида – госсипола (таблица 1).

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  $^{13}\text{C}$  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.

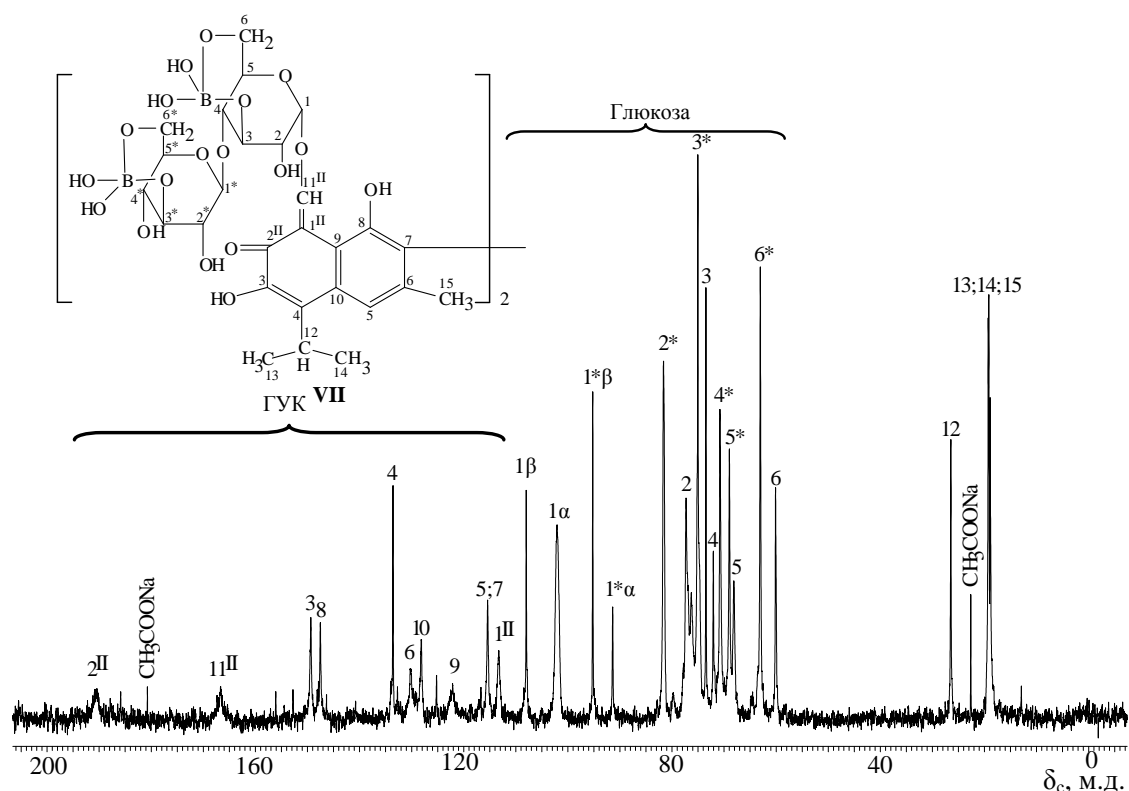
В условиях трехкратного мольного избытка ДАКМЦ, в реакцию вступают обе альдегидные группы нафтохинона в виде кетольного таутомера. При соотношении госсипола и окисленных звеньев носителя близком к эквимольному в реакцию вступает только одна альдегидная группа молекулы ФАВ. Фенольные группы не вступают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



**Рисунок 1** - Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  в  $\text{D}_2\text{O}$  ДАКМЦ ковалентно связанного с госсиполом, полученного в условиях избытка нафтохинона в гомогенных условиях

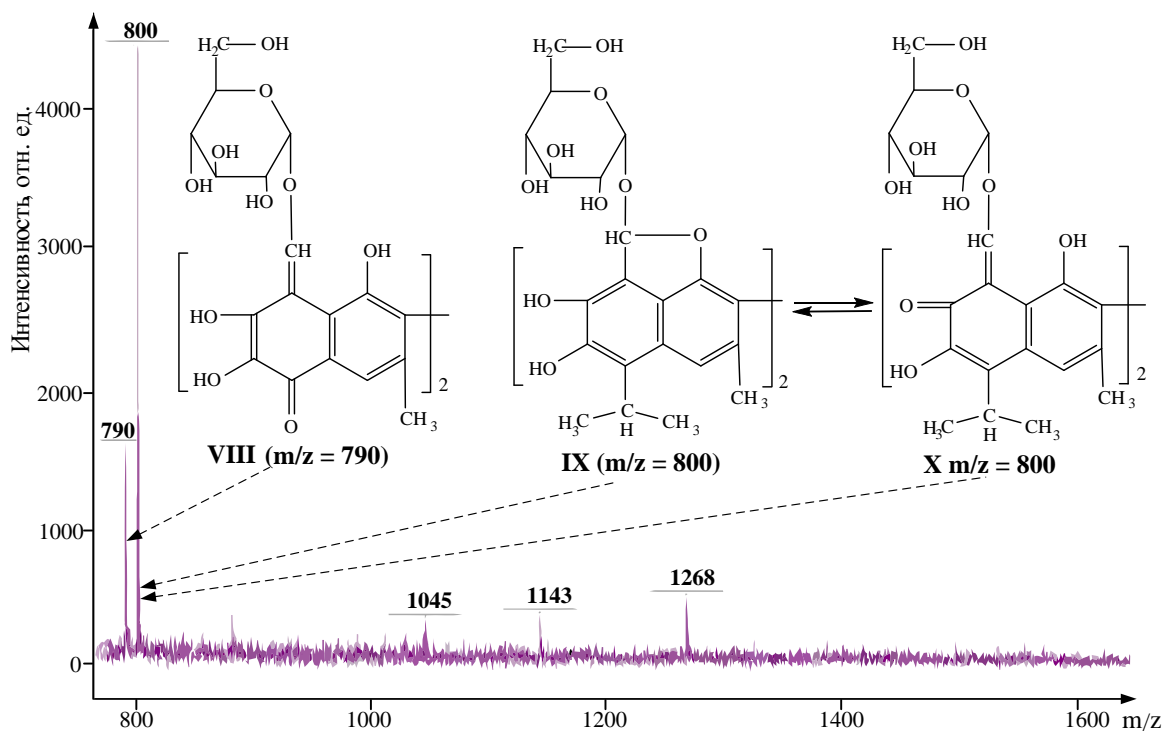
#### 4. Синтез низкомолекулярных модельных продуктов гликозилирования нафталальдегида

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 ориганта гликозилирования. Состав продуктов реакции анализировали методом  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии.

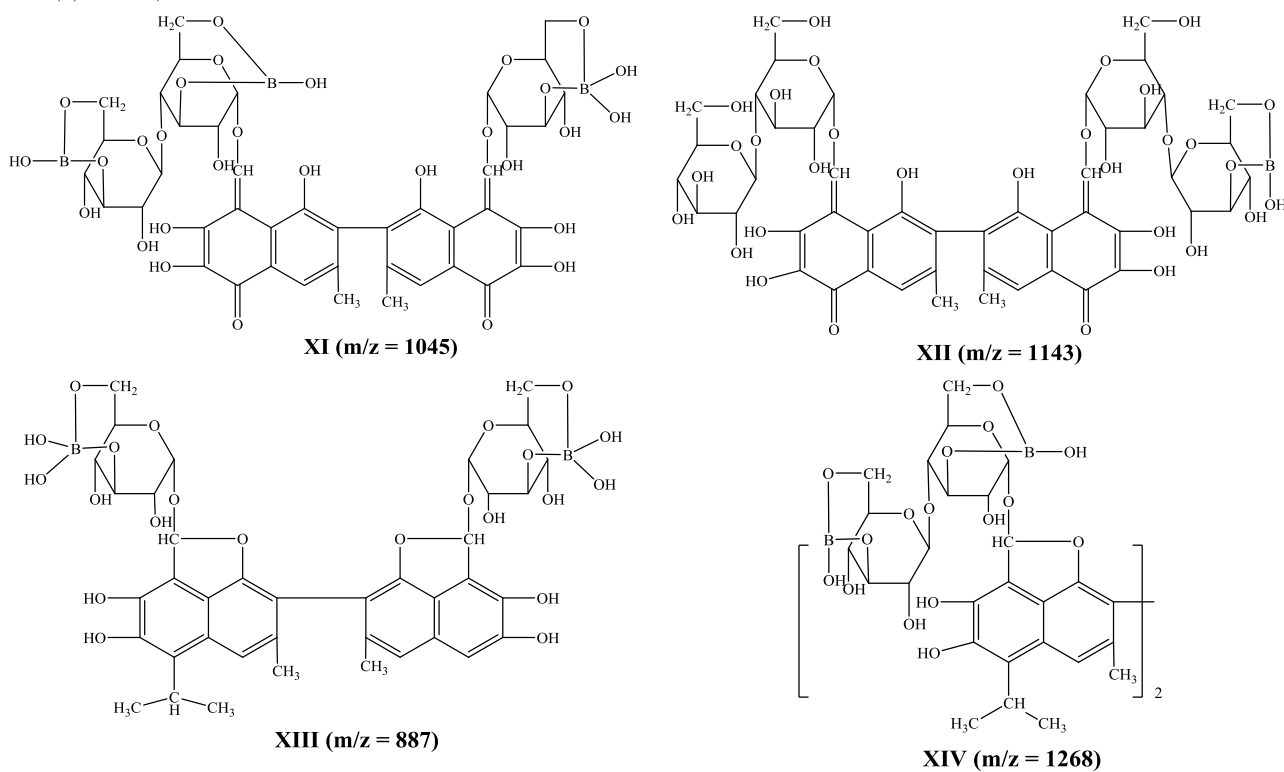


**Рисунок 2** - ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектр продукта гликозилирования госсипола боратным комплексом глюкозы

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.



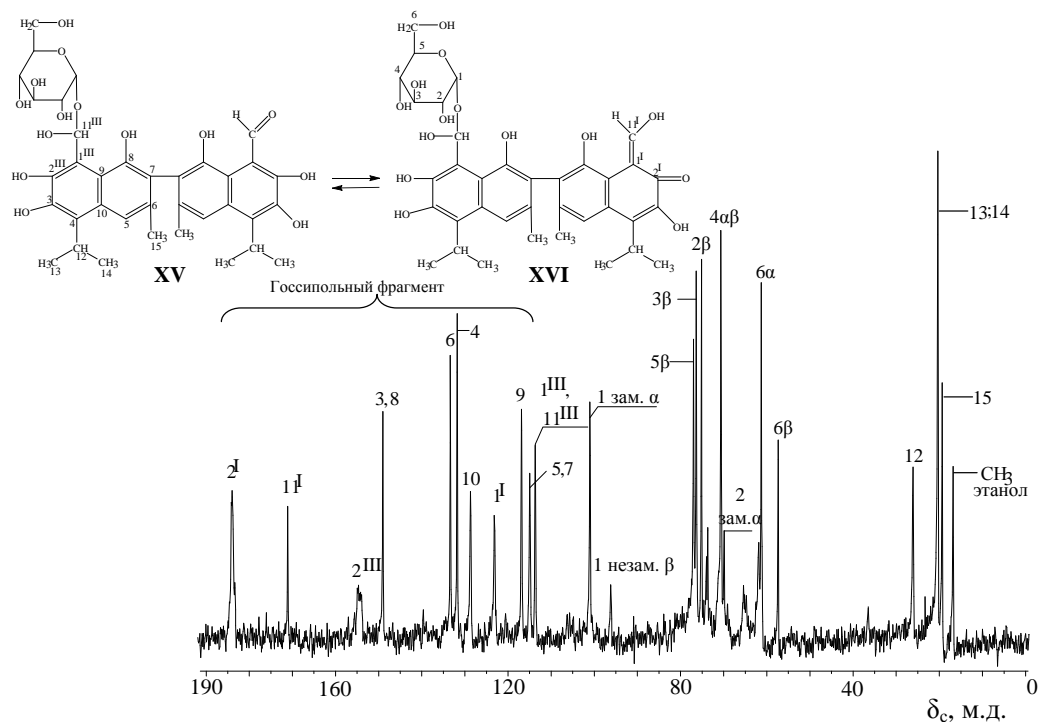
**Рисунок 3** – MASS-MALDI спектр продуктов присоединения, образовавшихся при конденсации глюкозы с госсиполом



**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  $\alpha$ - так и  $\beta$ -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 ( $\beta$ - дигликозидов) к одной молекуле нафтохинона стерически невозможно, что подтверждается данными квантово-химическими расчетами. Только  $\alpha$ -изомер глюкозы вступает в реакцию, что подтверждается данными ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектроскопии.



**Рисунок 5** – Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  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 нафтаальдегид присоединяется как к окисленным звеньям, так и к гидроксильным группам анамерных углеродных атомов восстанавливающих концов макромолекул, содержание которых зависит от молекулярной массы полимеров.

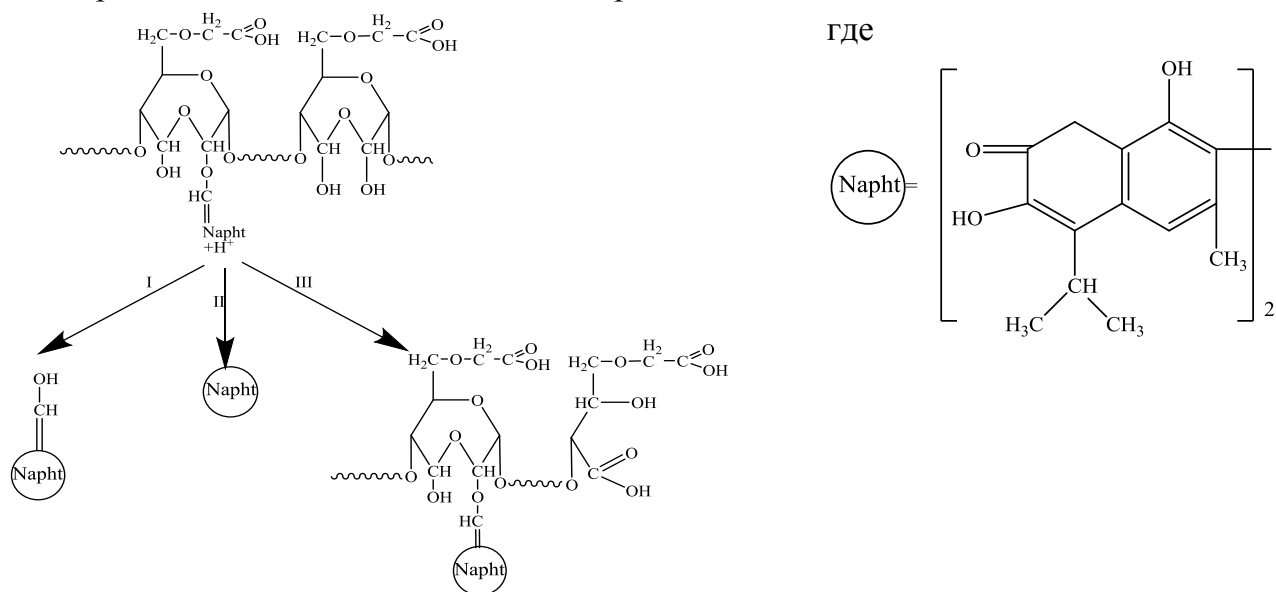
### 5. Определение типа ФАП. Гидролиз полимерных производных госсипола в условиях моделирующих физиологические

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.



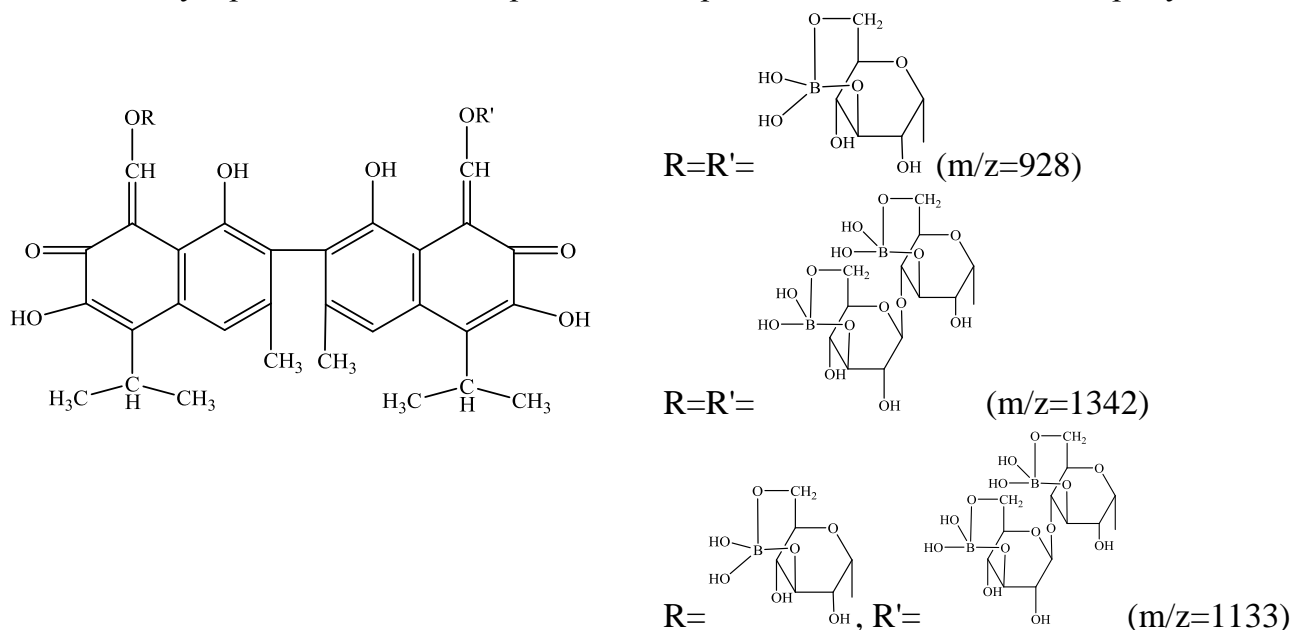
**Схема 1** - Возможные направления кислотного гидролиза госсипола ковалентно связанного с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой

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

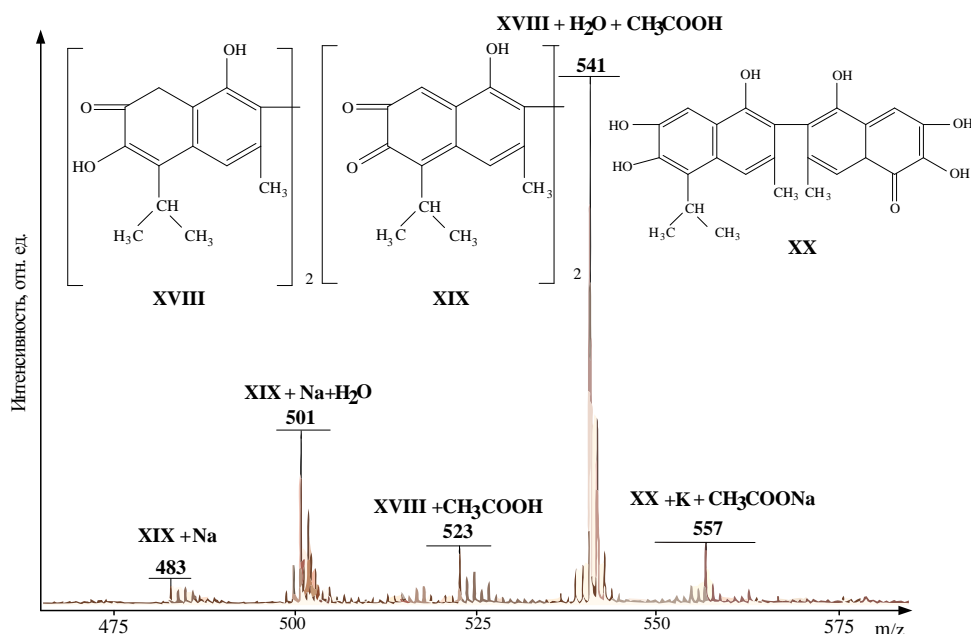
конденсации госсипола с боратными комплексами глюкозы. Они представляют собой смесь ди-, три- и тетра-гликозидов с  $m/z=928$ ; 1133; 1342 соответственно.

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  $^{13}\text{C}$  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.