

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук  
(УФИЦ РАН)  
Институт нефтехимии и катализа – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук  
(ИНК УФИЦ РАН)

*На правах рукописи*

**Гильфанова Гузель Ураловна**

**ГИБРИДНЫЕ МОЛЕКУЛЫ НА ОСНОВЕ БИФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ И  
ОЛИГОПЕПТИДОВ – БИОСОВМЕСТИМЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ПОКРЫТИЯ  
ДЛЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ МАТЕРИАЛОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Направление 04.06.01 – Химические науки  
Профиль – Органическая химия

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД (АВТОРЕФЕРАТ)**

**Уфа-2023**

Работа выполнена в Институте нефтехимии и катализа – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Научный руководитель:

**Парфенова Людмила Вячеславовна**  
доктор химических наук, доцент

Рецензенты:

**Халилов Леонард Мухибович**  
доктор химических наук, доцент  
г.н.с., зав. лаборатории структурной химии  
ИНК УФИЦ РАН

**Латыпова Эльвира Разифовна**  
доктор химических наук, доцент,  
профессор кафедры органической и  
биоорганической химии Химического  
факультета ФГБОУ ВО «Уфимский  
университет науки и технологий»

Защита научно-квалификационной работы (диссертации) состоится «12» сентября 2022 года в 10<sup>00</sup> часов на заседании аттестационной комиссии в Уфимском Институте химии – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук по адресу: 450075, г. Уфа, проспект Октября, 71.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования.**

Разработка органических материалов в настоящее время является динамично развивающейся областью химии и медицины. Они служат основой для создания скаффолдов для инженерии тканей, средств доставки лекарственных средств, матриц для синтеза наночастиц, применяются для функционализации неорганических наночастиц как компонентов тераностических агентов, модификации поверхности постоянных и временных металлических имплантатов с целью улучшения их биосовместимости и коррозионных свойств.

Модификация поверхности неорганических материалов может происходить путем создания необрастающих покрытий, для которых могут быть использованы производные полиэтиленгликоля, полисахаридов, гидрофильные самоорганизующиеся монослои, синтетические полимеры или путем нанесения на поверхность биоактивных соединений, например, белков межклеточного матрикса, факторов роста или олигопептидов, эффективно взаимодействующих с рецепторами клеточной мембраны и влияющие на адгезию и пролиферацию клеток. Однако контролирование конформации и ориентации привитых и адсорбированных больших белков, а также получение достаточного их количества для эффективного покрытия является нетривиальной задачей. Кроме того, применение высокомолекулярных протеинов межклеточного матрикса ограничено из-за иммуногенности, сложностей в очистке и манипуляциях с ними, а также риска переноса патогенов. Поэтому использованию относительно коротких биоактивных пептидных последовательностей уделяется большое внимание в мировой практике. Кроме того, отмечается, что подход, при котором происходило бы сочетание необрастающих и биологически активных свойств, представляется наиболее перспективным.

Степень связывания органического матрикса с неорганической поверхностью может быть увеличена путем введения функциональных групп и фрагментов, например, катехолов, тиолов, силоксанов или фосфонатов. Среди них весьма привлекательна стратегия использования фосфонатных групп в составе органического покрытия, поскольку они обладают высоким сродством к ионам и оксидам металлов, в большей степени связываются с окисленной поверхностью металла и практически не склонны к гидролитическому расщеплению.

Таким образом, несмотря на прогресс в создании органических молекул для модификации неорганических материалов, существует необходимость в поиске и разработке новых гибридных структур, обладающих высоким сродством к поверхности неорганического материала, низкой токсичностью, содержащих функциональные фрагменты, улучшающих адгезию, пролиферацию и дифференциацию клеток, проявляющие противовоспалительные и антимикробные свойства.

### **Степень разработанности проблемы.**

Стратегия создания органических покрытий для управления биологическими свойствами неорганических материалов реализуется на протяжении многих лет. Интенсивность междисциплинарных исследований в этом направлении только возрастает, о чем свидетельствует рост количества публикаций. Происходит широкомасштабный поиск вариантов покрытий – неорганических, органических, комбинированных для обеспечения заданных биологических свойств поверхности. Наблюдается постепенная эволюция органических молекул по пути усложнения состава и структуры. В представленной работе синтезированы ранее неизвестные гибридные органические структуры, содержащие в своем

составе функциональные группы различных типов: интегрин-активные олигопептиды RGD, антимикробный пептид LL-37, полисахарид – гиалуроновую кислоту, обладающую необрастающими свойствами; бифосфонатные группы, придающие органическим молекулам высокие адгезивные свойства по отношению к неорганическому подслою.

#### **Цель исследования.**

Разработка новых биосовместимых гибридных молекул на основе производных бифосфоновых кислот, гиалуроновой кислоты и олигопептидов, обладающих высокой адгезией к поверхности и моделирующих биологическую активность материалов медицинского назначения.

#### **Задачи исследования.**

- 1) Синтез гибридных молекул путем конъюгации бифосфонатов аминокислот с линейным или циклическим интегрин-активным трипептидом RGD (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота).
- 2) Разработка необрастающих и антимикробных органических материалов на основе новых бифосфонатных производных полисахарида – гиалуроновой кислоты.
- 3) Синтез новых производных гиалуроновой кислоты, модифицированных олигопептидом LL-37, обладающих антимикробными свойствами.

#### **Научная новизна.**

Синтезированы новые производные бифосфоновых кислот, содержащие малеимидные линкеры, различающихся длиной и структурой. Впервые синтезированы конъюгаты бифосфонатов аминокислот с линейным и циклическим интегрин-активными олигопептидами RGDC. Показана зависимость биологической активности конъюгатов интегрин-активных пептидов в составе комбинированного органического-неорганического покрытия на титане от структуры молекулы. Впервые получены конъюгаты гиалуроновой кислоты с бифосфонатами аминокислот и конъюгат гиалуроновой кислоты с антимикробным пептидом LL-37 в качестве необрастающих антимикробных покрытий.

#### **Методология и методы исследования.**

Методология исследования заключается в постановке и проведении химических экспериментов с использованием современных методов органической химии. Выделение и очистка продуктов проводились методами диализа, экстракции, колоночной хроматографии, перекристаллизации. Полученные соединения охарактеризованы с привлечением современного исследовательского оборудования: спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ , масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии, рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) и других.

#### **Практическая значимость работы.**

Синтезированы новые гибридные молекулы на основе бифосфонатов аминокислот, олигопептидов, гиалуроновой кислоты, которые могут быть использованы для модификации поверхности неорганических материалов, в том числе металлических имплантатов, тераностических агентов, наночастиц металлов и т.д.

#### **Научные положения, выносимые на защиту.**

Получение новых биосовместимых гибридных молекул реакцией конъюгации бифосфоновых кислот с линейным или циклическим интегрин-активным трипептидом RGD или полисахарида гиалуроновой кислоты. Получение новых производных гиалуроновой кислоты, модифицированных олигопептидами.

**Личный вклад автора** заключается в поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме диссертационного исследования, проведении экспериментальных исследований, разработке и оптимизации синтетических методов синтеза новых соединений, подготовке полученных соединений к физико-химическим методам анализа и интерпретации полученных результатов. Основные публикации, посвященные разработке новых биосовместимых гибридных молекул на основе производных бифосфоновых кислот, гиалуриновой кислоты и олигопептидов подготавливались в сотрудничестве с соавторами и принадлежат автору.

**Достоверность результатов исследования.** Высокая достоверность полученных результатов обеспечена применением современных методов установления структуры веществ и воспроизводимостью полученных данных. Структурные исследования проведены с использования оборудования Регионального Центра коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН, отделение - Институт нефтехимии и катализа УФИЦ РАН.

#### **Апробация и внедрение результатов.**

Результаты диссертационной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, в том числе VI Международной молодежной научно-практической конференции (Уфа 2019), VI Международной молодежной научно-практической интернет-конференции «Актуальные вопросы современного материаловедения» (Уфа 2020), X Всероссийской научно-практической конференции студентов, магистрантов, аспирантов (Уфа 2020), Международной научной конференции «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии», (Екатеринбург 2020), VI Всероссийской молодежной конференции «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений» (Уфа 2022), XII Всероссийской научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Киров 2022).

#### **Публикации по теме диссертации.**

По материалам научно-квалификационной работы опубликовано 11 научных трудов, из них 1 статья в рецензируемых изданиях, цитируемых РИНЦ, 4 статьи в рецензируемых изданиях, цитируемых Scopus Web и of Science, и тезисы 6 докладов на конференциях. Получен 1 патент на изобретение Российской Федерации.

#### **Структура и объем диссертации.**

Научно-квалификационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 177 наименования. Материал научно квалификационной работы изложен на 120 страницах компьютерного набора (формат А4), включает 6 таблиц, 17 рисунков, 6 схем.

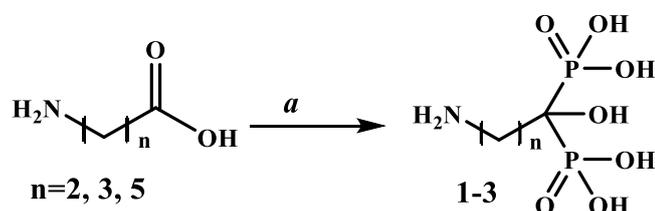
**Работа выполнена** в лаборатории органического синтеза Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук в соответствии с направлением Института по теме «Дизайн гибридных материалов и таргетных препаратов для медицины и сельского хозяйства, структура и механизмы реакций» (№ гос. регистрации FMRS-2022-0081).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1.1 Синтез бисфосфонатов аминокислот (1-3)

В качестве основы для формирования RGD-содержащих самоорганизующихся монослоев на поверхности оксидированного титана нами синтезированы бисфосфонаты аминокислот ( $\beta$ -аланина,  $\gamma$ -аминомасляной и  $\varepsilon$ -аминокапроновой кислоты) взаимодействием аминокарбоновых кислот **1–3** с  $\text{PCl}_3$  в метансульфоновой кислоте (схема 1). В результате были оптимизированы условия этой реакции и процедура выделения целевых продуктов. Установлено, что проведение синтеза при повышенной температуре (85–90 °C) сокращает время реакции до 4–5 ч и, наряду с выделением продуктов при pH = 6, увеличивает конечный выход аминокислотных бисфосфонатов до 85–89%.

Схема 1

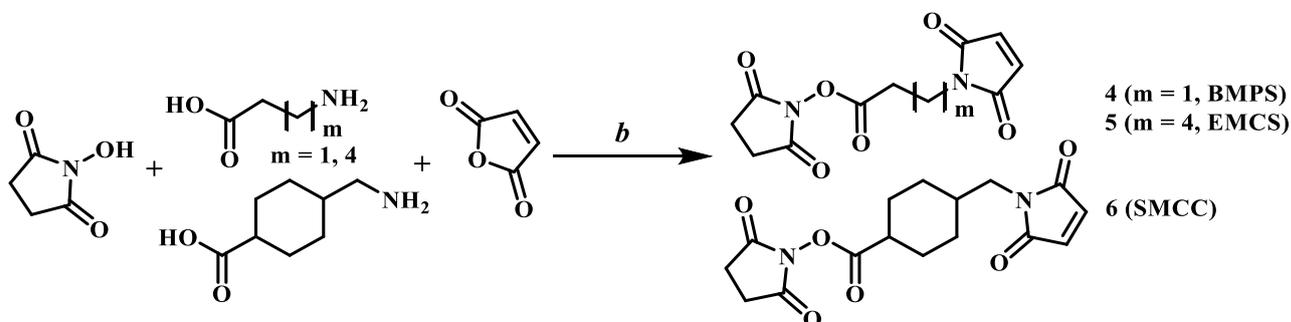


Реагенты и условия: *a*: 1)  $\text{MeSO}_3\text{H}$ ;  $\text{PCl}_3$ , 15 мин; 85°C, 6-8 ч; 2)  $\text{H}_2\text{O}$ ; 105°C, 4 ч; 3) 50%  $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$ , pH=6.

### 1.2 Синтез (N-малеимидаоалкил)сукцинимидных эфиров

С целью получения линкеров, связывающих аминокислотные бисфосфонаты с RGDC, осуществлены реакции малеинового ангидрида, N-гидроксисукцинимид и аминокарбоновых кислот в DMF при пониженных температурах (схема 2). Выход целевых продуктов составил не более 40–50%. Следует отметить нестабильность N-[ $\varepsilon$ -малеимидаокапроилокси]сукцинимидного эфира (EMCS), а также BMPS и SMCC на воздухе отработаны методики получения и выделения в чистом виде данных соединений N-малеимидосукцинимидов (BMPS, EMCS и SMCC).

Схема 2

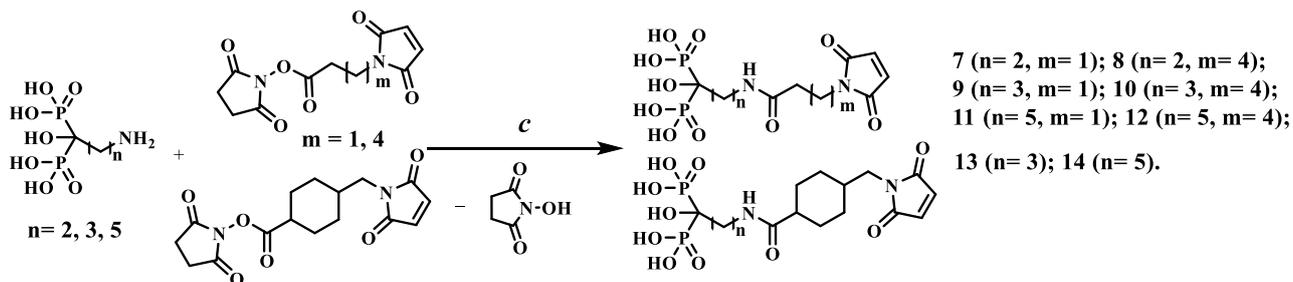


Реагенты и условия: *b*: 1) DMF, 1 ч; 2)  $t = 0^\circ\text{C}$ , 15 мин; 3)  $t = \text{rt}$ , 24 ч.

### 1.3 Синтез конъюгатов аминокислот с малеимидаалкилсукцинимидными линкерами

Взаимодействием аминокислот с N-гидрокисукцинимидо-малеимидами линкерами получены производные – акцепторы Михаэля, необходимые для дальнейшей модификации олигопептидом (схема 3). Использование ацетона вместо диоксана, применяемого в оригинальной методике<sup>1</sup>, позволяет избежать образование побочных полярных продуктов, появление которых связано с модификацией диоксанового цикла.

Схема 3

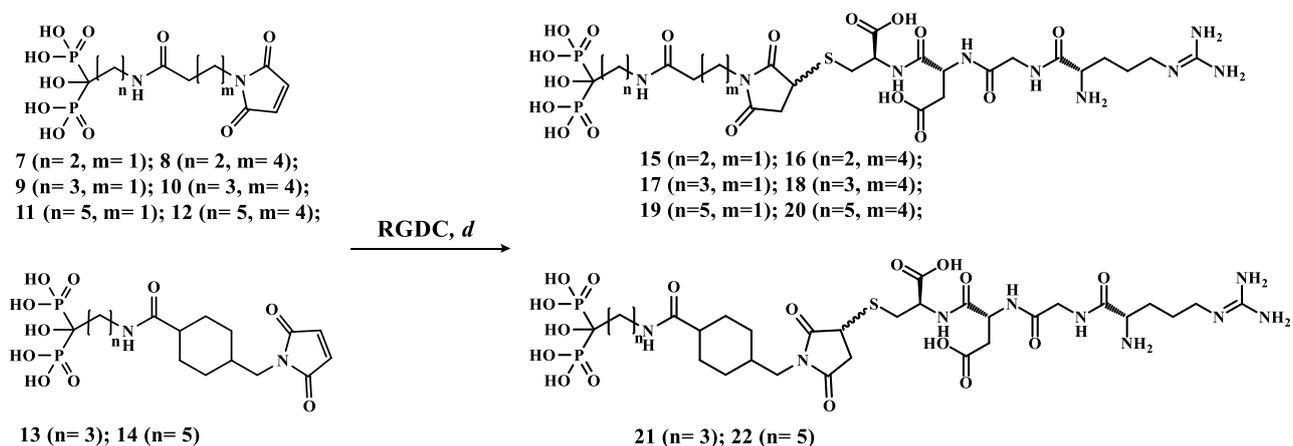


Реагенты и условия: *c*: H<sub>2</sub>O:C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O=1:1, pH=8-9, 1 ч, 38-40 °С.

### 1.4 Синтез производных аминокислот с линейным олигопептидом RGDC

Целевые RGD-модифицированные бифосфонаты аминокислот были получены взаимодействием соответствующих производных 7-14, содержащих на конце двойную связь, с RGDC в водной среде при pH=7 по реакции Михаэля (Схема 4).

Схема 4



Реагенты и условия: *d*: H<sub>2</sub>O, pH=7, 1-1,5 ч, 38-40 °С.

В качестве примера на рис. 1 представлены спектры ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P и MALDI-TOF/TOF RGDC-EMCS-производного β-аланина (16). Так, в спектрах ЯМР <sup>1</sup>H наблюдаются сигналы, соответствующие фрагментам аминокислоты, линкера и RGDC (Рис. 1а).

<sup>1</sup> US Patent No. 5,409,911. Prostaglandin Analog for Treating Osteoporosis.: опублик. 25.05.1995 / Tyler P.C., Young R.N., Rodan G.A. – 24 с.

Присоединение RGDC к фрагменту аминокислоты  $\beta$ -аланина с линкером EMCS подтверждается отсутствием в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  сигнала протонов двойной связи линкера EMCS при  $\delta_{\text{H}}$  6.75 м.д. и наличием мультиплетов, принадлежащих атомам  $\text{H}^{10}$  и  $\text{H}^9$  целевого продукта в областях  $\delta_{\text{H}}$  4.21–4.31 и  $\delta_{\text{H}}$  2.83–3.02 м.д., соответственно. В спектре в дополнение к основным сигналам RGDC-фрагмента наблюдаются минорные компоненты, которые, по-видимому, соответствуют конформерам олигопептида, отнесение которых требует дополнительных исследований.

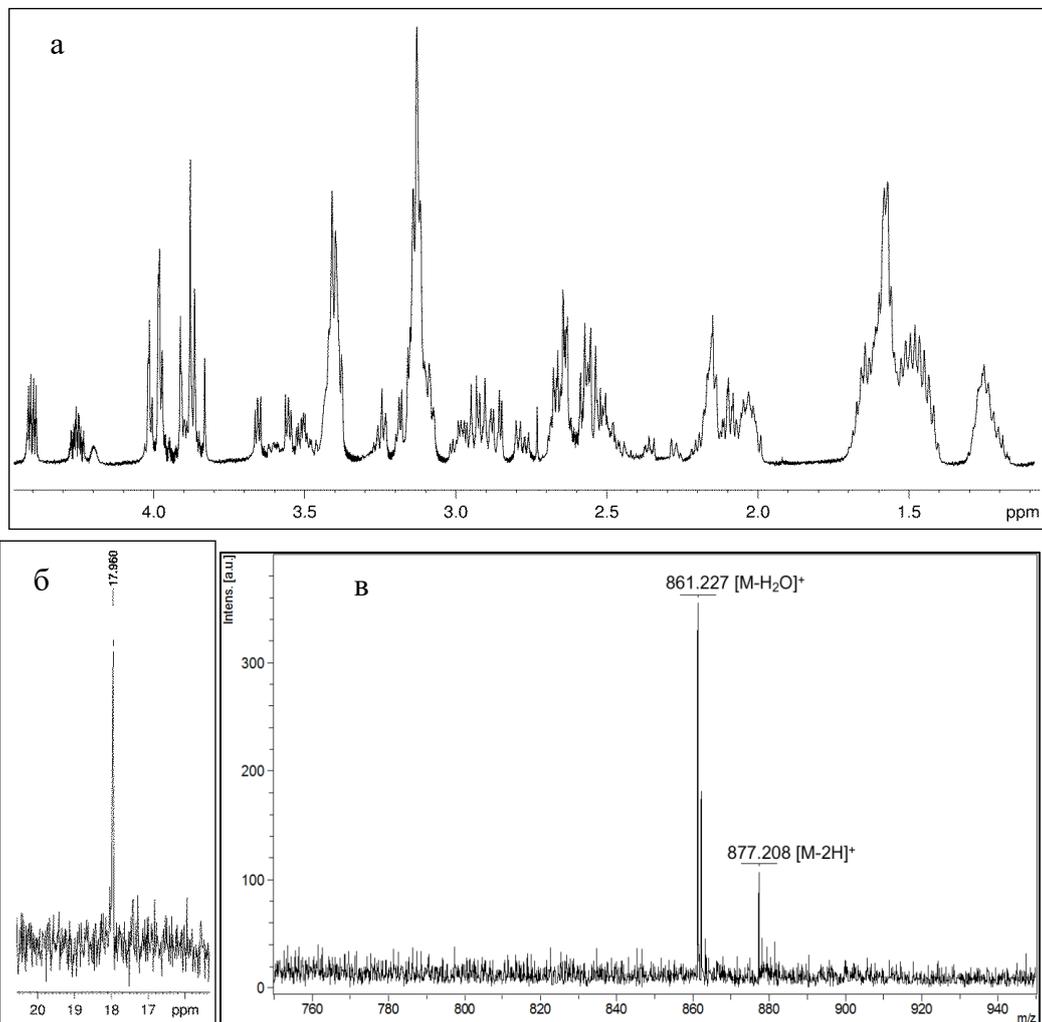
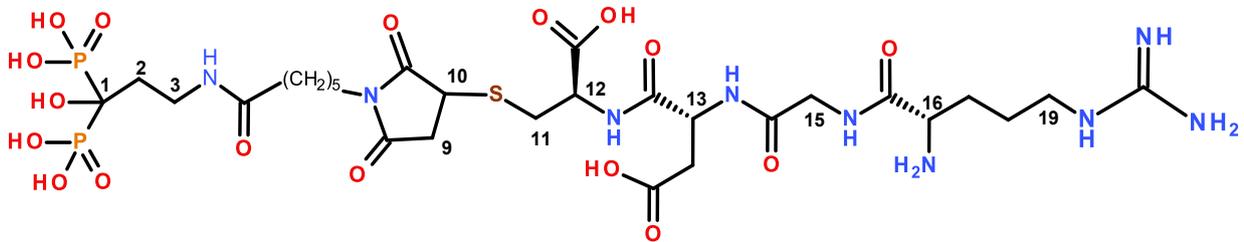


Рисунок 1. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  (а),  $^{31}\text{P}$  (б) и MALDI TOF/TOF (в) гибридной молекулы RGDC–EMCS–аминофосфат  $\beta$ -аланина.

Спектр  $^{31}\text{P}$  ЯМР (Рис. 1б) содержит единственный сигнал при  $\delta_{\text{P}}$  17.96 м.д., характерный для бифосфонатных групп. В масс-спектре MALDI TOF/TOF гибридной молекулы наблюдаются пики с  $m/z$  861 и 877, соответствующие фрагментам, образованным в результате отщепления молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  и двух протонов (Рис. 1в).

Метод РФЭС был использован для доказательства присутствия органических молекул в составе оксидного неорганического покрытия на титане, полученного с помощью плазменно-электролитического оксидирования (ПЭО). Органическое покрытие наносили на металлические образцы путем физико-химической адсорбции из растворов. Обзорные РФЭС-спектры, полученные на образцах титана с ПЭО-покрытием, содержат типичные ожепики Ti 2p, Ti 3s, O 1s, C 1s, P 2p, N 1s, O KLL и Ti LMM. Спектры RGD-модифицированных образцов подтверждают изменения в химическом составе поверхностного слоя по сравнению с немодифицированным образцом ПЭО.

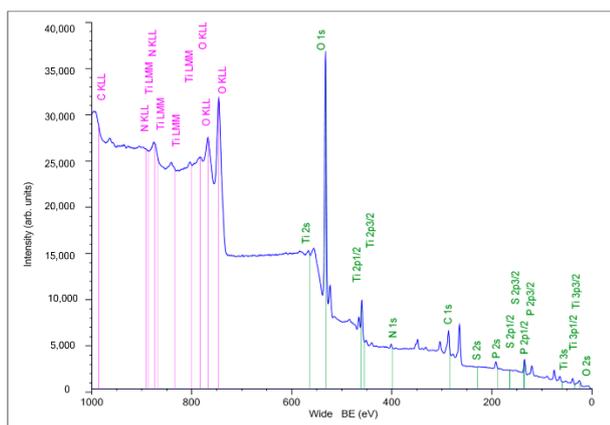


Рисунок 2. Обзорные РФЭС-спектры покрытия Ti-PEO-16.

Как следует из РФЭС-спектров высокого разрешения, прикрепленные к поверхности органические молекулы влияют на относительное содержание азота, фосфора, углерода, кислорода и серы (табл. 1). Наиболее заметные различия проявляются для пиков Ti2p, C1s и N1s. Сигнал Ti2p уменьшился после модификации RGD, а сигналы N1s и C1s увеличились. Также на поверхности, модифицированной RGD, наблюдается наличие сигналов S2p, тогда как на поверхности Ti-PEO этот сигнал не проявляется. Изменения атомного соотношения (Ti2p/C1s) и (Ti2p/P2p) показывают, что сигнал титана уменьшается для всех RGD-модифицированных типов поверхности.

Таблица 1. Атомный состав и атомное соотношение, полученные из спектров высокого разрешения РФЭС для образцов Ti-PEO, модифицированных RGD-производными.

Образец	Атомный состав XPS (в %)						Атомное соотношение	
	N1s	P2p	C1s	O1s	Ti2p	C2p	Ti2p/C1s	Ti2p/P2p
Ti-ПЭО	1.48	3.57	7.00	70.49	17.36	0.00	2.48	4.86
Ti -ПЭО-15- RGD	5.43	6.96	13.34	67.25	6.72	0.30	0.50	0.97
Ti -ПЭО-16- RGD	4.87	4.60	13.54	60.59	16.39	0.00	1.21	3.56
Ti -ПЭО-17- RGD	2.37	6.06	15.48	65.20	10.79	0.00	0.70	1.78
Ti -ПЭО-18- RGD	5.86	3.01	25.92	57.20	7.50	0.50	0.29	2.49
Ti -ПЭО-19- RGD	2.88	3.52	14.32	67.96	11.10	0.21	0.78	3.15
Ti -ПЭО-20- RGD	2.35	6.00	18.03	67.36	6.27	0.00	0.35	1.05

Органические бифункциональные молекулы **15-20** в составе ПЭО–покрытия проявили неоднозначную активность по отношению к различным типам клеточных линий (рисунок 3). Наименее чувствительными оказались фибробласты, тогда как наибольшие различия в активности по сравнению с ПЭО покрытием, не содержащим органического слоя, показали МСК и MG63. Важным фактом является различный биологический ответ клеток в зависимости от структуры RGDС–модифицированных бифосфонатных молекул, а именно типа исходного аминокислотного остатка и линкера (BMPS, EMCS, SMCC).

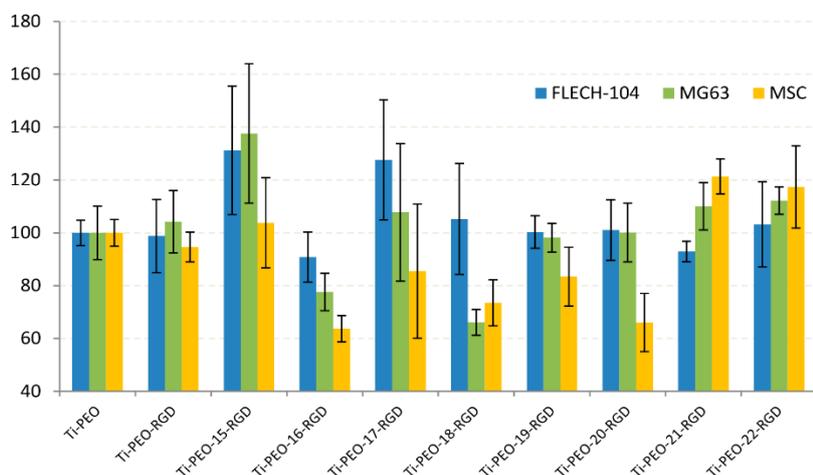


Рисунок 3. Жизнеспособность и пролиферация (в %) фибробластов (FLECH-104), остеобластоподобных клеток человека (MG-63) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК), культивируемых на поверхности Ti-PEO, функционализированной RGD-производными (**15–22**) через 7 суток относительно немодифицированной поверхности Ti-PEO.

Значительное (до 30–40%) увеличение пролиферации фибробластов наблюдалось при использовании органических молекул с относительно короткими линкерами и аминокислотными фрагментами BMPS-β (Ti-PEO-15-RGD) и BMPS-γ (Ti-PEO-17-RGD). Кроме того, образец Ti-PEO-15-RGD на основе бифосфоната β-аланина с коротким линкером BMPS и пептидом RGD показал лучшую адгезию и пролиферацию остеобластоподобных клеток MG-63 по сравнению с другими образцами.

Производные, содержащие линкер EMCS (Ti-PEO-16-RGD и Ti-PEO-18-RGD), приводили к снижению пролиферации MG-63 на ПЭО-модифицированной поверхности. Такая же тенденция была обнаружена в случае мезенхимальных стволовых клеток для длинноцепочечных молекул, содержащих линкер EMCS (Ti-PEO-16-RGD, Ti-PEO-18-RGD и Ti-PEO-20-RGD) или производное ε-аминокапроновой кислоты (Ti-PEO-19-RGD). Напротив, соединения, содержащие SMCC линкер (Ti-PEO-21-RGD и Ti-PEO-22-RGD), обеспечивали увеличение роста клеток на поверхности до 20%.

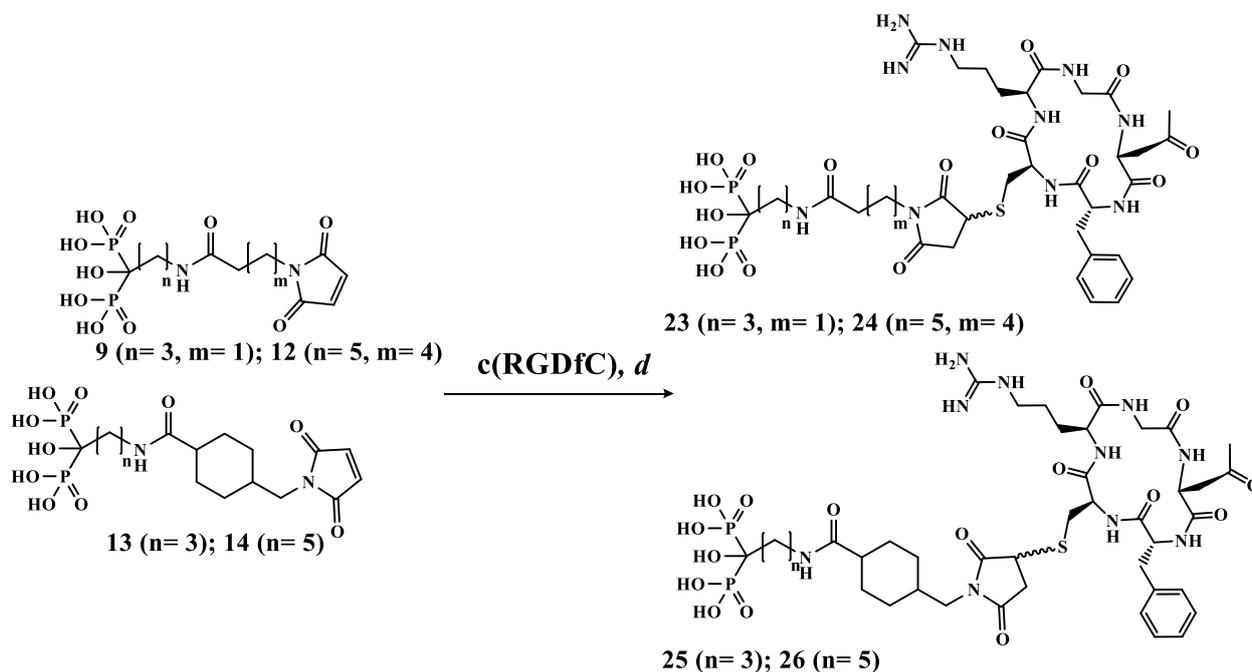
Подводя итог *in vitro* исследованиям, можно заключить, что RGD-функционализированные гибридные молекулы **15, 17, 21, 22** представляются перспективными органическими покрытиями для моделирования биологической активности ПЭО-модифицированной поверхности титановых имплантатов.

### 1.5 Синтез производных бифосфоновых кислот с циклическим олигопептидом с(RGDfC)

Нами синтезирован набор производных с(RGDfC) (цикло(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys)), в которых пептидный фрагмент конъюгирован с бифосфонатами γ-аминомасляной и ε-

аминокапроновой кислот посредством BMPS, EMSC, и SMCC линкеров (схема 5). Конъюгацию соединений **9**, **12-14** с *c*(RGDfC) проводили по реакции Михаэля в водной среде при 38–40 °С, в результате получали соединения **23-26** (схема 5).

Схема 5.



Реагенты и условия: *d*:H<sub>2</sub>O, pH=7, 1-1,5 ч, 38-40 °С.

Строение соединений **23-26** подтверждено методами одно- (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P) и двумерной (COSY HH, HSQC и HMBC) ЯМР-спектроскопии. Спектры <sup>1</sup>H ЯМР содержали сигналы, соответствующие *c*(RGDfC), линкеру и аминокислотным фрагментам. Резонансные линии при  $\delta_p$  17–18 м.д. в спектрах ЯМР <sup>31</sup>P указывали на наличие в молекулах бисфосфонатной группы. Присоединение *c*(RGDfC) к **9**, **12-14** приводило к исчезновению сигнала при  $\delta_n$  6–7 м.д., соответствующего фрагменту двойной связи N-малеимида.

Присутствие органических молекул в пористом подслое ПЭО установлено методом РФЭС. Пики Ti2p, Ti3s, O1s, C1s, P2p, N1s и S2s наблюдались в спектрах РФЭС (рис. 5). РФЭС-анализ *c*(RGDfC)-модифицированных образцов показал изменения в химическом составе поверхности по сравнению с образцом без органического покрытия. Наибольшие различия обнаружены для пиков Ti2p, C1s, O1s и N1s. Появление органических соединений привело к уменьшению интенсивности линий Ti2p и увеличению интенсивности линий C1s, O1s и N1s, что соответствовало уменьшению соотношений Ti2p/C1s, Ti2p/O1s и Ti2p/N1s по сравнению с контролем (табл. 2).

Рисунок 5. Обзорные РФЭС-спектры покрытия CG-Ti-PEO-26.

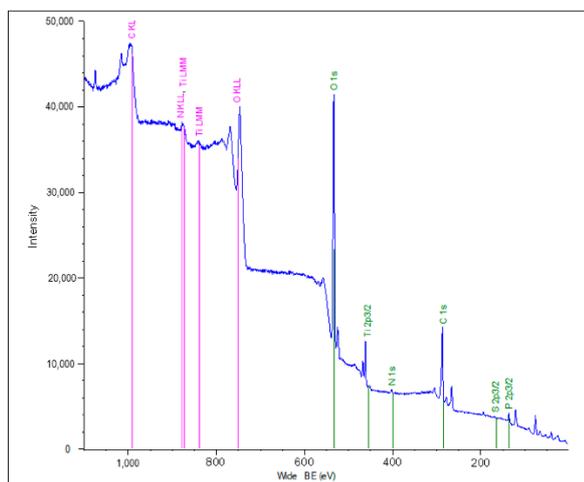


Таблица 2. Атомный состав и соотношение образцов Ti-PEO, полученных с использованием РФЭС высокого разрешения.

Образец		Атомный состав (%)						Атомное соотношение		
Тип органического покрытия	Тип металлической поверхности	Ti2p	O1s	C1s	H1s	P2p	S2s	Ti2p/O1c	Ti2p/C1s	Ti2p/H1s
нет	CG-Ti-PEO	11.70	60,70	20.45	0,79	2,47	0,00	0,19	0,57	14.81
	nano-Ti-PEO	9,78	58,38	25.36	0,95	2,45	0,00	0,17	0,39	10.29
с(RGDfC)	CG-Ti-PEO	5.50	67,42	22,78	0,54	1,63	0,00	0,08	0,24	10.19
	nano-Ti-PEO	4.07	76,25	17.19	0,40	0,57	0,00	0,05	0,24	10.18
23	CG-Ti-PEO	0,89	76.00	21.90	0,26	0,78	0,00	0,01	0,04	3.42
	nano-Ti-PEO	5,59	70,58	20.16	0,65	1,28	0,00	0,08	0,28	8.60
24	CG-Ti-PEO	4,65	69,48	22.66	0,68	0,82	0,20	0,07	0,21	6,84
	nano-Ti-PEO	3,46	68.09	23.27	0,55	0,47	0,31	0,05	0,14	6.29
25	CG-Ti-PEO	9.08	70,59	14.44	0,71	2.01	0,11	0,13	0,63	12,79
	nano-Ti-PEO	3.10	68,35	25.95	0,56	0,31	0,22	0,05	0,12	5.54
26	CG-Ti-PEO	6.28	68,19	19.52	2.28	1.15	0,24	0,09	0,32	2,75
	nano-Ti-PEO	6.39	68,66	20.26	0,65	1.32	0,00	0,09	0,32	9,83

Оценка жизнеспособности клеток в присутствии с(RGDfC) в культуральной среде показала снижение их количества до 40% (рис. 5), при этом появление линкера и бисфосфонатной группы в составе молекул **23-26** снижало токсичность производных олигопептида. Исследования *in vitro* жизнеспособности и пролиферации МСК, фибробластов и MG-63 продемонстрировали зависимость биологической активности от структуры молекул, введенных в ПЭО-модифицированную поверхность наноструктурированных и крупнозернистых титановых образцов (рис. 5 и рис. ба–в).

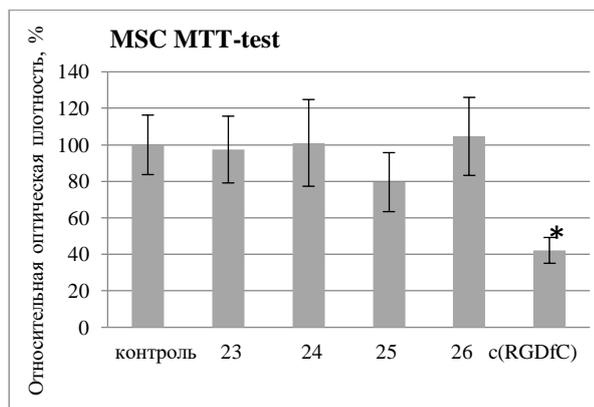


Рисунок 5. Жизнеспособность клеток, установленная тестом МТТ, в присутствии соединений с(RGDfC), **23-26**. Значительные различия с контролем ( $p < 0,05$ ) показаны звездочками.

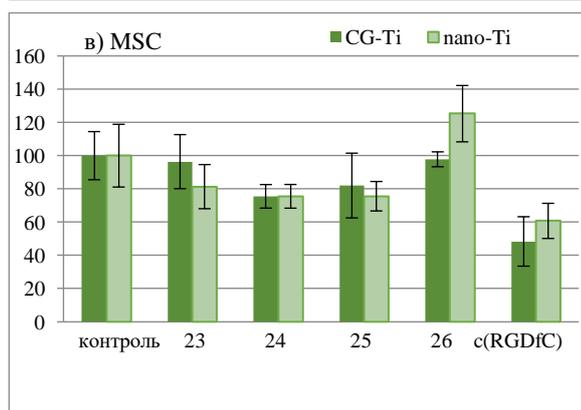
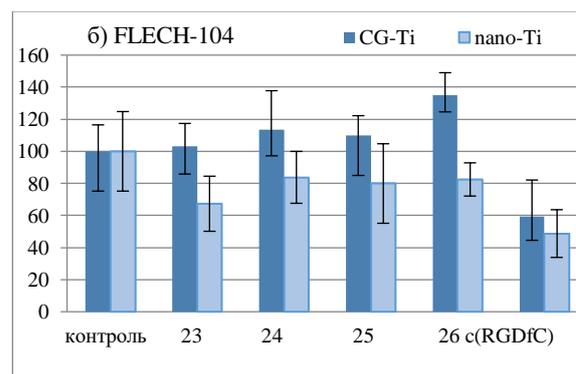
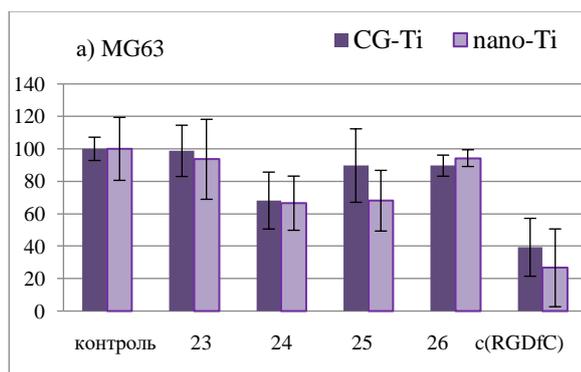


Рисунок 6. Анализ *in vitro* роста остеобластов MG-63 (а), фибробластов FLECH-104 (б) и МСК (в), культивируемых в течение 7 дней на образцах с нанесенными соединениями **23-26** и с(RGDfC) Ti-PEO.

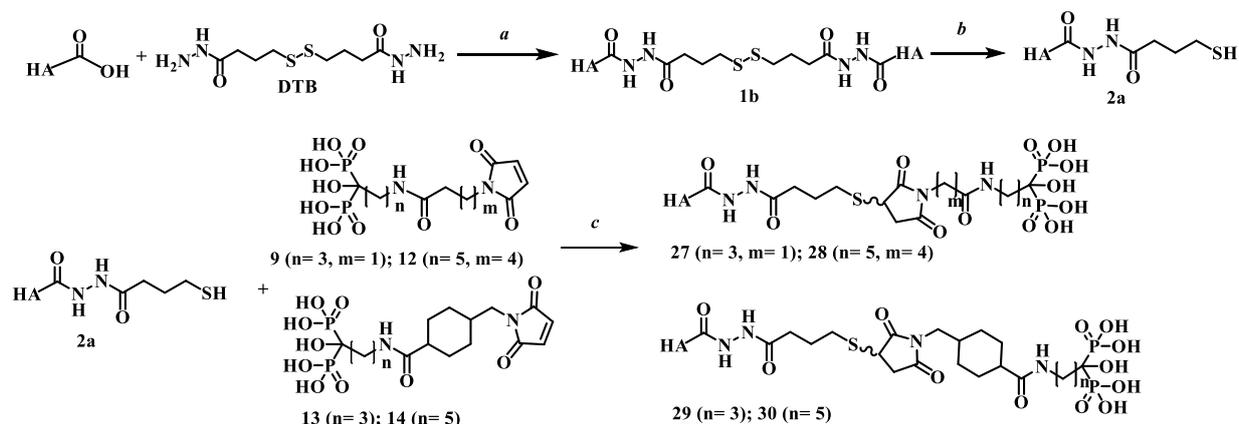
Эффект снижения степени жизнеспособности всех изученных типов клеток наблюдается на поверхности Ti-PEO, содержащей пептид с(RGDfC) (рис. ба–в). Появление в составе поверхности молекул **24** и **25** также снижало пролиферацию остеобластоподобных клеток MG-63 и МСК. Этот эффект, вероятно, обусловлен токсичностью циклической формы RGD и некоторых его производных и может быть связан с известным эффектом гибели клеток по апоптотическому пути в результате воздействия этих молекул.

Использование органической молекулы **26**, содержащей линкер SMCC и бисфосфонатный фрагмент  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты (Ti-PEO-**26**) в сочетании с ПЭО-модифицированным крупнозернистым Ti (рис. 6б) обеспечило значительное (до 30–40%) увеличение пролиферации фибробластов. Эта же молекула вызвала 20% рост МСК на поверхности наноструктурированного титана (рис. 6в).

## 1.6 Синтез конъюгатов бифосфоновых кислот с SH-производным гиалуроновой кислоты

В качестве основы для введения аминобифосфонатов в молекулу гиалуроновой кислоты (MW = 100 kDa) было получено соответствующее SH-производное (**2a**) со степенью функционализации ~30% (Схема 6). Для синтеза бифосфонатов ГК (**27-30**) предварительно получали гибридные молекулы на основе N-малеимидов аминобифосфонатов  $\gamma$ -бутановой и  $\varepsilon$ -капроновой кислот (**9, 12-14**). Дальнейшее присоединение бифосфонатов с получением конъюгатов (**27-30**) происходило через малеимидный фрагмент линкеров и SH-группу производного гиалуроновой кислоты (**2a**) по реакции Михаэля. Реакцию проводили в различных средах. Было установлено, что в кислой среде (pH~3.5) происходит сшивание макромолекул ГК по SH-группам с образованием дисульфидных связей. В щелочной среде (pH~9) наблюдалось раскрытие малеимидного фрагмента линкера, что не привело к образованию целевого конъюгата. Желаемого результата удалось добиться при проведении реакции конъюгации в нейтральной среде (pH=7). В данных условиях присоединение аминобисфосфонатов (**9, 12-14**) к SH-группе производного ГК (**2a**) происходило со степенью замещения SD=16.0-28.2%. Дополнительная очистка полученных конъюгатов (**27-30**) с целью удаления низкомолекулярных компонентов происходила при помощи диализа в течение 5 суток.

Схема 6.



Реагенты и условия: (а) EDC, pH 4.75; (б) DDT, pH 8,5; (с) H<sub>2</sub>O, pH=7, 1-1.5 ч, t=38-40°C.

Структуры полученных новых соединений **27-30** доказаны с помощью одно- и двумерной спектроскопии ЯМР (рис. 7). В спектрах ЯМР <sup>1</sup>H наблюдались сигналы, соответствующие фрагментам аминобисфосфоната, линкера и ГК-SH. Присоединение аминобисфосфонатов к ГК-SH сопровождалось исчезновением в спектре ЯМР <sup>1</sup>H сигнала протонов двойной связи малеимидного фрагмента при  $\delta_H$  6-7 м.д., а также смещением характерных сигналов протонов H<sup>3</sup> концевой тиольной группы ГК-SH из области  $\delta_H$  2.50–2.59 м.д. в слабое поле до  $\delta_H$  2.68–2.79 м.д. В спектрах COSY HH отчетливо наблюдались кросс-пики между сигналами трех протонов с  $\delta_H$  2.59–2.73, 3.16–3.30, 3.91–3.99 м.д., принадлежащих восстановленному малеимидному фрагменту линкера. Степень замещения (DS) определяли из соотношения интегральных интенсивностей сигналов аномерных протонов ГК в области  $\delta_H$  4.35–4.52 м.д. и метиленовых протонов

аминобисфосфонатных фрагментов в области  $\delta_{\text{H}}$  1.0-1.7 м.д. В спектре ЯМР  $^{31}\text{P}$  регистрировался уширенный сигнал при  $\delta_{\text{P}}$  17-18 м.д., характерный для аминобисфосфонатов.

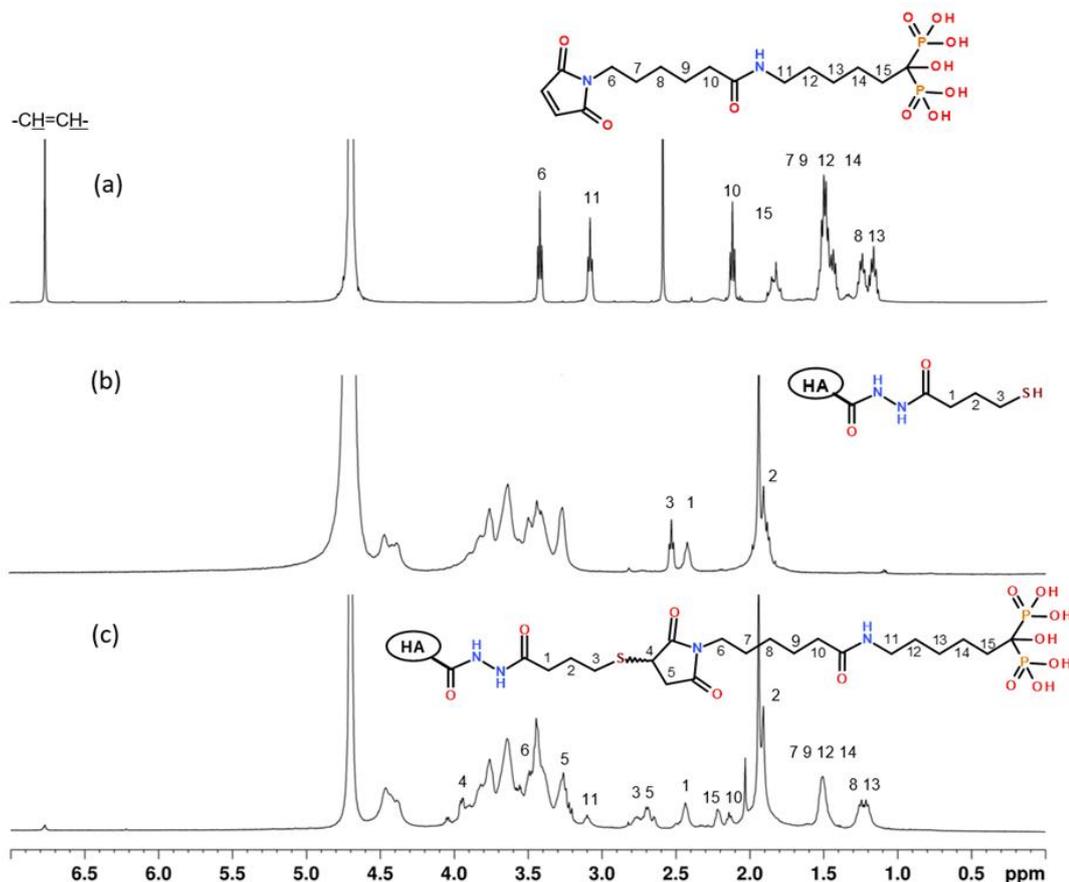


Рисунок 7. Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР в  $\text{D}_2\text{O}$ : (а) аминобисфосфонат EMCS- $\epsilon$  (**12**); (б) производное ГК с SH-группой **2a** (DS=30%); (с) целевой конъюгат ГК-EMCS- $\epsilon$  (**28**).

Формирование комбинированного покрытия на поверхности ПЭО- модифицированного титана осуществляли путем нанесения органических слоев за счет физико-химической адсорбции из растворов с концентрацией 1 мг/мл.

Присутствие органического покрытия в порах ПЭО-подслоя было подтверждено с помощью РФЭС. Так, в спектрах РФЭС фиксировались пики Ti2p, Ti3s, O1s, C1s, P2p, N1s. XPS-анализ HA-модифицированных образцов показал изменения в химическом составе поверхности по сравнению с образцом без органического покрытия. Наибольшие различия наблюдались в спектрах Ti2p, C1s, O1s и P2p. После добавления органической составляющей интенсивность линии Ti2p уменьшилась и увеличилась интенсивность P2p и C1s. С появлением на поверхности органических соединений наблюдалось существенное уменьшение соотношения Ti2p/C1s и Ti2p/P2p.

Проведена оценка *in vitro* токсичности полученных соединений с использованием МТТ-теста (МСК), а также степени пролиферации различных типов клеток (остеобластоподобных клеток, фибробластов и МСК) на поверхности CG-Ti-ПЭО и nano-Ti-ПЭО. МТТ-тест показал, что ГК и все производные ГК не только нетоксичны, но и способствуют росту клеток в объеме раствора. Наибольший ростстимулирующий потенциал отмечен для производного ГК-EMCS- $\epsilon$  (**28**) ( $p < 0.0001$ ) (рис. 8).

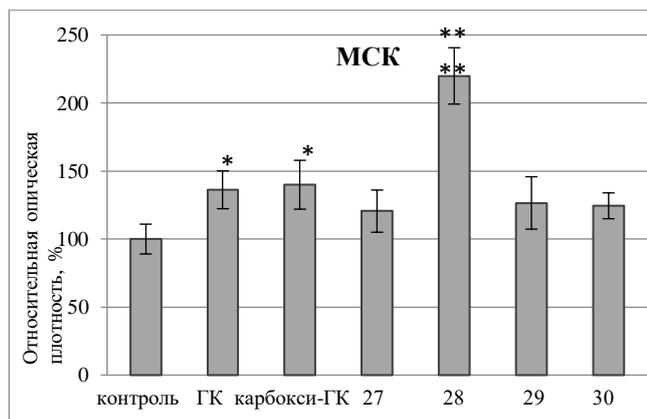
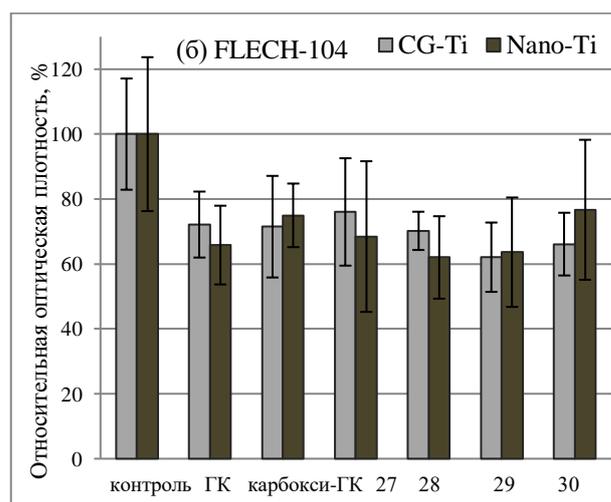
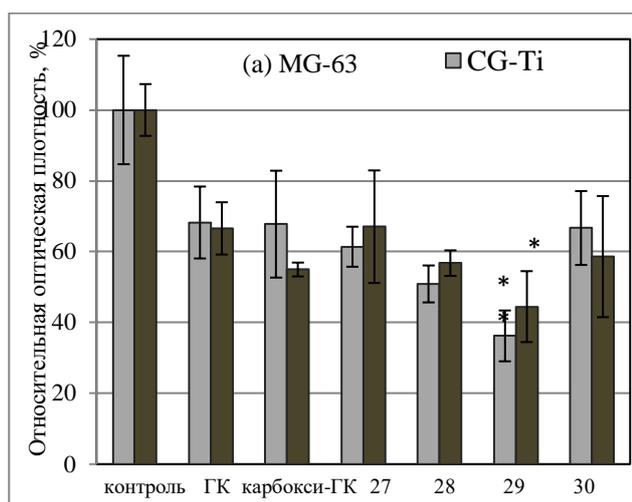


Рисунок 8. Цитотоксичность соединений на основе гиалуроновой кислоты в МТТ-тесте. Звездочками отмечены значительные различия с контролем ( $p < 0,05$ ).

В результате проведения метаболического теста EZ4U было показано, что покрытия на основе бифосфонатов ГК и карбокси-ГК через 7 дней приводят к снижению степени пролиферации остеобластоподобных клеток MG-63 (на уровне 30-60%) и фибробластов (на уровне 20-40%) по сравнению с контрольными Ti-поверхностями (рис. 9 а, б). В случае MG-63 наблюдалась зависимость степени пролиферации от структуры органического покрытия: наименьшая статистически значимая пролиферация наблюдалась при использовании CG- и папо-Ti с ГК-SMCC- $\gamma$  (**29**) на поверхности ( $p=0.004$  и  $p=0.014$ , соответственно), что может быть связано с изменением ее морфологии. Снижение пролиферации мезенхимальных стволовых клеток на Ti-ПЭО до 55% наблюдалось также при использовании ГК-SMCC- $\gamma$  (**29**), однако статистической значимости различия достигли только для поверхности CG-Ti ( $p=0.023$ ). Кроме того, покрытие ГК-EMCS- $\epsilon$  (**28**) на папо-Ti также существенно снижало пролиферацию MCK клеток ( $p=0.034$ ) (рис. 9), при этом обладая способностью стимулировать их рост, находясь в растворе (рис. 8). Таким образом, бифосфонаты ГК можно рассматривать в качестве перспективных вариантов необрастающих покрытий для имплантатов.



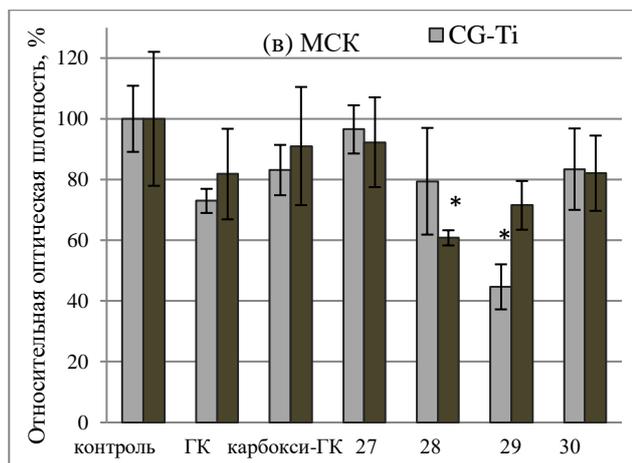


Рисунок 9. Оценка пролиферации клеток в течение 7 дней с использованием анализа EZ4U для клеточных линий остеобластов MG-63 (а), фибробластов FLECH-104 (б) и клеток МСК (в), культивированных на Ti-ПЭО, покрытом ГК, карбокси-ГК, соединений **27-30**. Звездочки показывают значительные различия с контрольными образцами Ti-ПЭО ( $p < 0,05$ ).

Результаты исследований антибактериального действия покрытий на основе ГК, представленные в таблице 3, показали, что наилучший эффект достигается для фосфорилированного полисахарида (соединений **27–30**). Снижение степени адгезии микроорганизмов зависело как от структуры органической молекулы, так и от типа подложки (CG-Ti-ПЭО или nano-Ti-ПЭО).

Таблица 3. Результаты оценки влияния органических покрытий ГК, карбокси-ГК, **27-30** на адгезию микроорганизмов на поверхности CG-Ti-ПЭО и nano-Ti-ПЭО (приведены значения оптической плотности и процент изменения оптической плотности относительно контрольного образца без органического покрытия).

Образцы	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)		<i>S. aureus</i> (P 209)		<i>E. faecium</i> (Ef790SAU)	
	CG-Ti-ПЭО	nano-Ti-ПЭО	CG-Ti-ПЭО	nano-Ti-ПЭО	CG-Ti-ПЭО	nano-Ti-ПЭО
Контроль	6.6±0.1	5.1±0.0	6.5±0.2	5.3±0.2	5.6±0.2	5.3±0.1
ГК	6.8±0.0 +3.0%	5.9±0.1 +15.7%	3.0±0.1 -53.8%	5.8±0.0 +9.4%	4.2±0.1 -25.0%	4.7±0.1 -11.3%
Карбокси-ГК	4.6±0.1 -56.1%	3.2±0.0 -37.2%	3.6±0.1 -44.6%	4.6±0.0 -13.2%	2.4±0.1 -57.1%	1.1±0.0 -79.2%
ГК-ВМПС-γ ( <b>27</b> )	2.9±0.2 -56.1%	0.9±0.0 -82.3%	3.8±0.1 -41.5%	2.5±0.0 -52.8%	4.5±0.0 -19.6%	1.7±0.1 -67.9%
ГК-ЕМС-ε ( <b>28</b> )	4.7±0.0 -28.7%	0.9±0.2 -82.3%	2.3±0.2 -64.6%	2.9±0.0 -45.3%	3.3±0.2 -41.1%	7.5±0.0 +41.5%
ГК-СМСС-γ ( <b>29</b> )	3.0±0.1 -54.5%	4.4±0.2 -13.7%	2.6±0.2 -60.0%	3.5±0.0 -33.9%	2.4±0.2 -57.1%	2.7±0.1 -49.1%
ГК-СМСС-ε ( <b>30</b> )	4.9±0.0 -25.7%	0.8±0.1 -84.3%	3.8±0.0 -41.5%	1.9±0.1 -64.1%	3.7±0.0 -33.9%	2.1±0.1 -60.3%

### 1.7 Синтез гибридной молекулы на основе гиалуроновой кислоты и LL-37

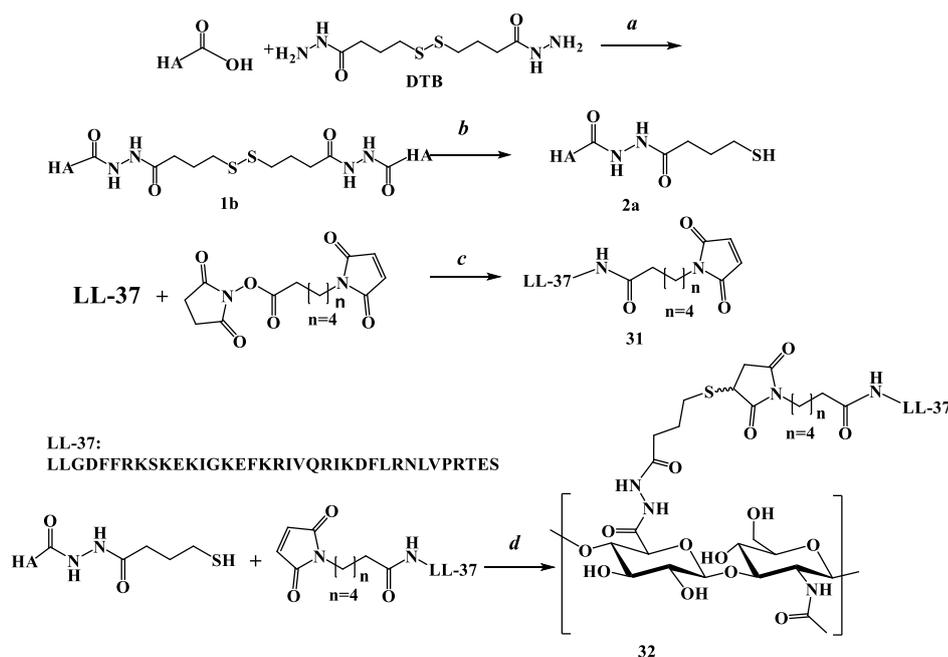
В работе синтезирован новая гибридная молекула, содержащая в своем составе антимикробный олигопептид LL-37 и низкомолекулярную гиалуроновую кислоту (<0.1 MDa). Для функционализации природного полисахарида использовали дигидразид 4,4'-дителиодимасляной кислоты, который был предварительно получен из 4,4'-дителиодимасляной кислоты в две стадии с высоким выходом (92%). При добавлении 2 экв. EDC к смеси ГК и дигидразида, взятых в мольных соотношениях 1:2 (ГК:дигидразид), в воде и поддержании

pH среды в пределах 4,75 образуется кросс-сшитый полисахарид, в котором степень превращения COOH-групп ГК в амидные достигает значения  $\sim 16-18\%$ . Для получения производных ГК с концевыми SH-группами (**2a**) к реакционной массе добавляли восстанавливающий реагент DTT – дитиотреитол (реагент Келланда).

Для получения гибридной молекулы ГК-LL-37 предварительно был синтезирован малеимидсодержащий конъюгат (**31**) реакцией LL-37 с N-ε-малеимидокапроилоксисуксинимидным эфиром (EMCS) в соотношении 1:1 в смеси вода-ацетон (4:1), образование конъюгата проходило в течение 2 часов (схема 7). Полученный конъюгат **31** был вовлечен в дальнейший синтез без очистки. Как известно, LL-37 содержит в структуре 37 аминокислотных остатков, среди которых присутствует 6 лизиновых фрагментов, несущих в C-6 положении первичные  $-NH_2$  группы, которые, по видимому, вступали в реакцию с EMCS, давая амид **31**.

Гибридная молекула на основе ГК и АМП LL-37 (**32**) получена по реакции Михаэля, где ГК-SH (**2a**) и N-малеимидное производное LL-37 (**31**) были взяты в соотношении 9:1, соответственно. Реакция проходила при температуре 36-38°C в течение 2 часов, очистка полученного продукта проводилась с помощью диализа в течение 5 суток.

Схема 7



Реактивы и условия: (a) EDCI, pH 4,75; (б) DDT, pH 8,5; (c) ацетон:H<sub>2</sub>O=1:1, pH 7, t=18-20°C, 2 ч; (d) H<sub>2</sub>O, pH 4.75-7, t=36-38°C, 2 ч.

Структура синтезированных новых производных установлена при помощи ЯМР <sup>1</sup>H спектроскопии (рис. 10). В спектре ЯМР <sup>1</sup>H соединения EMCS-LL-37 (**32**), кроме сигналов олигопептида, наблюдались сигналы протонов двойной связи малеимидного фрагмента в области 6,75 м.д., а также характерные триплетные сигналы протонов алкандиильной части линкера C<sup>1</sup>H<sub>2</sub> и C<sup>5</sup>H<sub>2</sub> при 2,28 и 3,45 м.д., соответственно.

В спектре ЯМР <sup>1</sup>H гибридной молекулы присутствовали уширенные сигналы, принадлежащие как полисахаридной части, так и олигопептидного фрагмента. При этом в спектре отсутствовал сигнал малеимидной группы при 6,75 м.д., что свидетельствует о полноте протекания реакции между соединениями **2a** и **31** (рис. 10).

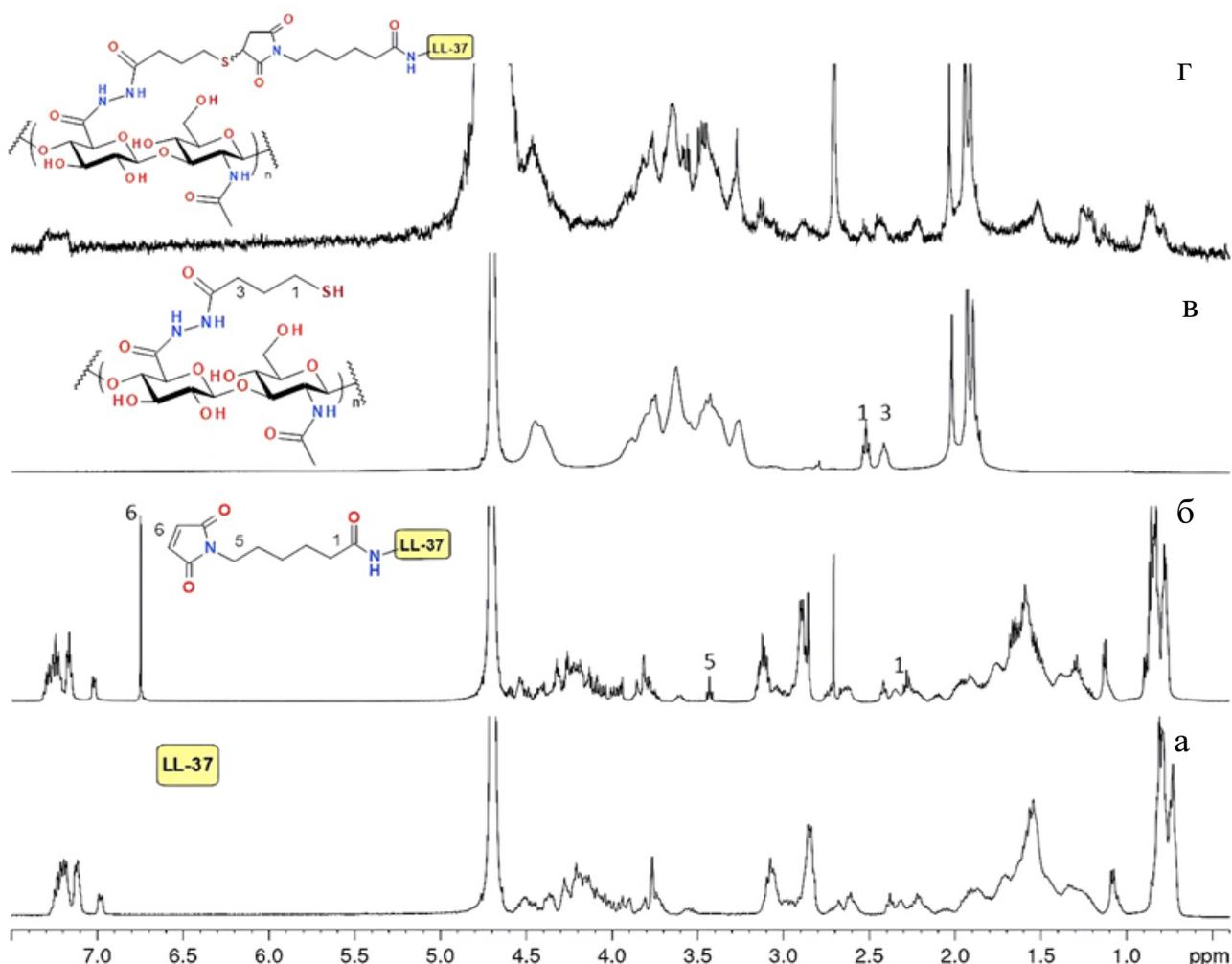


Рисунок 10. ЯМР  $^1\text{H}$  соединений **2a**, **31**, **32** и АМП LL-37 в  $\text{D}_2\text{O}$ : (а) АМП LL-37; (б) конъюгат EMCS-LL-37 (**31**); (в) ГК-SH (**2a**) ( $\text{DS} = 15\%$ ); (г) гибридная молекула ГК-EMCS-LL-37 **32**

Органический слой формировали на ПЭО-модифицированной поверхности крупнозернистого и наноструктурированного титана путем физико-химической адсорбции ГК-LL-37 из растворов.

Исследование антибактериального действия покрытий и их влияние на способность бактерий формировать биопленки проводили с использованием тест-культур *S. aureus* P 209, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *E. faecium* Ef79OSAU, *E. coli*.

Эксперименты *in vitro* показали, что ПЭО-покрытие не оказывает на тест-штаммы прямого бактерицидного действия. Исходные ГК и LL-37 снижают адгезию грамположительных и грамотрицательных бактерий на поверхности КЗ-Тi-ПЭО и нано-Тi-ПЭО на 17-45%. Исключения составили тест-штаммы *E. faecium* и *P. aeruginosa*, степень их адгезии на модифицированном ГК и LL-37 наноструктурированном титане практически не отличалась от образцов без органического покрытия, а в случае ГК на нано-Тi-ПЭО количество адгезированных клеток тест-штаммов увеличивалось на 15 %.

Таблица 4. Результаты оценки влияния органических покрытий ГК, LL-37, ГК-EMCS-LL-37 (**32**) на адгезию микроорганизмов на поверхности ПЭО-модифицированных КЗ-Тi-ПЭО (крупнозернистого) и нано-Тi-ПЭО (приведены значения оптической плотности и

процент изменения оптической плотности относительно контрольного образца без органического покрытия).

Образец	<i>S. aureus</i> (P 209)		<i>E. faecium</i> (Ef790SAU)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)		<i>E. coli</i>	
	КЗ-Тi- ПЭО	нано-Тi- ПЭО	КЗ-Тi- ПЭО	нано-Тi- ПЭО	КЗ-Тi- ПЭО	нано-Тi- ПЭО	КЗ-Тi- ПЭО	нано-Тi- ПЭО
Без органического покрытия	4.6±0.06	4.2±0.11	3.14±0.12	2.66±0.08	3.6±0.15	3.9±0.09	3.9±0.23	3.8±0.19
ГК	3.8±0.08 (-17.4%)	3.2±0.23 (-23.8%)	2.56±0.14 (-18.5%)	2.4±0.05 (-0.1%)	2.4±0.09 (-33.3%)	4.5±0.12 (+15.4%)	2.85±0.23 (-26.9%)	2.07±0.12 (-45.5%)
LL-37	3.3±0.13 (-28.3%)	3.4±0.13 (-19.0%)	2.45±0.23 (-21.9%)	2.45±0.15 (-0.03%)	2.6±0.04 (-27.8%)	3.4±0.34 (-0.03%)	2.16±0.04 (-44.6%)	2.4±0.03 (-36.8%)
ГК-LL-37 (5)	2.3±0.08 (-50.0%)	3.1±0.11 (-26.2%)	1.9±0.12 (-39.5%)	2.2±0.13 (-17.3%)	2.4±0.07 (-33.3%)	3.3±0.08 (-15.4%)	2.32±0.07 (-40.5%)	1.94±0.06 (-48.9%)

Влияние ГК на поверхности ПЭО-модифицированного титана на способность микроорганизмов формировать биопленки может быть связано с увеличением гидрофильности поверхности за счет создания гидратной оболочки в результате адгезии полисахарида. Эффект LL-37 может заключаться как в мембранной активности, так и его способности действовать непосредственно на внутриклеточные мишени, в первую очередь на нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК).

Покрытие ГК-LL-37 подавляло адгезию всех изученных тест-штаммов как на поверхности КЗ-Тi-ПЭО, так и нано-Тi-ПЭО. Наибольший ингибирующий эффект был показан образцами КЗ-Тi-ПЭО и нано-Тi-ПЭО в отношении *S. aureus* и *E. coli* (подавление признака на 48-50%).

Синергетический эффект, достигаемый от химического связывания LL-37 с ГК следует отметить для обоих типов металлических образцов в отношении биопленкообразования (адгезии) *S. aureus*, *E. faecium*, а также *P. aeruginosa* и *E. coli* на наноструктурированном титане.

Таким образом, ингибирующее действие ГК-LL-37 на способность микроорганизмов формировать биопленки может быть обусловлено как барьерным эффектом полисахарида, так и ингибирующими свойствами АМП, активность которого не снижается при связывании с полисахаридной основой.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ВЫВОДЫ

1. Получены бифосфонаты аминокислот ( $\beta$ -аланина,  $\gamma$ -аминомасляной и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислот) с выходом 85–89% путем реакции соответствующих аминокарбоновых кислот с  $\text{PCl}_3$  в среде метансульфоновой кислоты при температуре 85–90°C и выделения продуктов при  $\text{pH}=6$ .

2. Взаимодействием аминокислот с N-гидроксисукцинимидо-малеимидными линкерами (BMPS, EMCS и SMCC), отличающимися длиной и структурой, в системе растворителей вода/ацетон (1:1) при  $\text{pH}$  8-9 получены малеимидные производные – акцепторы Михаэля, с выходом 60–93%.

3. Синтезирован ряд новых производных бифосфонатов аминокислот, конъюгированных с линейным RGDC и циклическим c(RGDfC) пептидами через линкеры (BMPS, EMCS и SMCC) по реакции Михаэля, в качестве перспективных органических покрытий для металлических имплантатов и тераностических агентов. В результате исследований *in vitro* на модельных линиях фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток и остеобластоподобных клеток MG-63 найдены конъюгаты, увеличивающие пролиферацию и жизнеспособность клеток на неорганической поверхности.

4. С целью моделирования необрастающих и антимикробных свойств неорганической поверхности впервые получены конъюгаты SH-модифицированной гиалуроновой кислоты и бифосфонатов аминокислот ( $\gamma$ -аминомасляной и  $\epsilon$ -аминокапроновой кислот), связанных через малеимидные линкеры EMCS и SMCC, со степенью замещения  $\text{DS}=16,0\text{--}28,2\%$ . Исследование биологической активности показало, что полученные соединения нетоксичны, а введение их в состав неорганического покрытия снижает пролиферацию фибробластов, остеобластоподобных клеток и МСК, а также адгезию патогенов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecium* (до 84%) и образование биопленок на поверхности Ti.

5. Реакцией антимикробного пептида LL-37 с N- $\epsilon$ -малеимидокапроил-оксисукцинимидным эфиром (EMCS) синтезирован малеимидсодержащий конъюгат, на основе которого получена новая гибридная молекула LL-37-гиалуроновая кислота. На основе исследования *in vitro* установлен антибактериальный эффект гибридной молекулы в составе неорганического покрытия на титане (до 48-50%) в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecium* и *E. coli*, являющихся возбудителями инфекционно-воспалительных заболеваний.

**ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОПУБЛИКОВАНО В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:**

1. Parfenova, L.V., Lukina, E.S., Galimshina, Z.R., **Gil'fanova, G.U.**, Mukaeva, V.R., Farrakhov, R.G., Danilko, K.V., Dyakonov, G.S., Parfenov, E.V. Biocompatible Organic Coatings Based on Bisphosphonic Acid RGD-Derivatives for PEO-Modified Titanium Implants // *Molecules*. – 2020. V.25, 229, P. 1-21.
2. Parfenova, L.V., Galimshina, Z.R., **Gil'fanova, G.U.**, Alibaeva, E.I., Danilko, K.V., Pashkova, T.M., Kartashova, O.L., Farrakhov, R.G., Mukaeva, V.R., Parfenov, E.V., Rameshbabu Nagumothu, Valiev R.Z. Hyaluronic acid bisphosphonates as antifouling antimicrobial coatings for PEO-modified titanium implants // *Surfaces and Interfaces*. – 2022. – V.28. – P. 101678, Q1.
3. Parfenova, L.V., Galimshina, Z.R., **Gil'fanova, G.U.**, Alibaeva, E.I., Danilko, K.V., Aubakirova, V.R., Farrakhov, R.G., Parfenov, E.V., Valiev, R.Z. Modeling of Biological Activity of PEO-Coated Titanium Implants with Conjugates of Cyclic RGD Peptide with Amino Acid Bisphosphonates // *Materials*. – 2022. – V.15. – P. 8120.
4. Parfenova, L.V., Galimshina, Z.R., **Gil'fanova, G.U.**, Alibaeva, E.I., Parfenov, E.V., Valiev R.Z. Hybrid organic materials for modeling the biocompatibility of metal implants // *Materials. Technologies. Design*. – 2021. – V.3. №3. – P. 13-25.
5. Galimshina, Z.R., **Gil'fanova, G.U.**, Alibaeva, E.I., Pashkova, T.M., Kartashova, O.L., Parfenova L.V. Synthesis of conjugates of hyaluronic acid with amino acid bisphosphonates antimicrobial organic coatings for PEO-modified titanium implants // *AIP Conference Proceedings*. – 2021. – V.2390. – P.020018-1-020018-4.
6. Галимшина З.Р., **Гильфанова Г.У.**, Парфенова Л.В. Получение конъюгатов гиалуроновой кислоты с производными бифосфонатов аминокислот по реакции Михаэля. // VI Международную молодежную научно-практическую интернет-конференцию «Актуальные вопросы современного материаловедения». – Уфа (БГУ) 30 октября 2020.
7. Алибаева, Э.И., Галимшина З.Р., **Гильфанова Г.У.** Биосовместимые покрытия для металлических имплантатов на основе аминокислот бифосфонатов гиалуроновой кислоты // Иностранный язык в профессиональной коммуникации-10: Материалы X Всероссийской научно-практической конференции студентов, магистрантов, аспирантов, Уфа, 12–26 мая 2020 года / Ответственный редактор Пешкова Н.П. – Уфа: Башкирский государственный университет, 2020. – С. 174-175.
8. Парфенова Л.В., Галимшина З.Р., **Гильфанова Г.У.** [и др.] Получение конъюгатов гиалуроновой кислоты с производными бифосфонатов аминокислот по реакции Михаэля // Актуальные вопросы современного материаловедения: материалы VI Международной молодежной научно-практической конференции, Уфа, 30 октября 2019 года / Отв. ред. Куковинец О.С. – Уфа: Башкирский государственный университет, 2020. – С. 268-271.
9. Галимшина З.Р., **Гильфанова Г.У.**, Алибаева Э.И. [и др.] Синтез конъюгатов гиалуроновой кислоты с бифосфонатами аминокислот в качестве антимикробных органических покрытий для ПЭО-модифицированных титановых имплантатов // Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии: Материалы заочных докладов Международной научной конференции, Екатеринбург, 18–21 ноября 2020 года / Под редакцией Т.В. Глухаревой, Ю.И. Нейн, Т.А. Поспеловой, В.А. Бакулева. – Екатеринбург: Общество с ограниченной ответственностью "ИЗДАТЕЛЬСТВО АМБ", 2020. – С. 97-99.
10. Галимшина, З.Р. Конъюгат гиалуроновой кислоты и пептида LL-37 в качестве антимикробного покрытия для металлических имплантатов / З.Р. Галимшина, Э.И. Алибаева, **Г.У. Гильфанова**, Л.В. Парфенова // VI Всероссийская молодежная конференция

«Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений» (заочная). – Уфа, 2022. – С. 19.

11. Алибаева Э.И. **Гильфанова Г.У.**, Галимшина З.Р., Парфенова Л.В. Потенциальные противоопухолевые агенты на основе гиалуроновой и бетулоновой кислот, // XII Всероссийская научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Химия и технология растительных веществ». – Киров, 2022. – С. 7.