

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

Алибаева Элиза Ильгамитдиновна

**СИНТЕЗ ТРИТЕРПЕНОИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИАЛУРОНОВОЙ
КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ**

Направление 04.06.01 – Химические науки
Органическая химия

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД (АВТОРЕФЕРАТ)

Уфа-2025

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:

Махмудиярова Наталия Наилевна

доктор химических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории гетероатомных
соединений 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 «17» сентября 2025 года в 14⁰⁰ часов на заседании аттестационной комиссии в Институте нефтехимии и катализа – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук по адресу: 450075, г. Уфа, проспект Октября, 141.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

В XXI веке медицина и онкология в частности нуждаются в разработке новых средств диагностики и терапии рака. Несмотря на прогресс в области исследования и лечения онкологических заболеваний, существующие традиционные химиотерапевтические средства характеризуются высокой общей токсичностью. Кроме того, выявляются новые механизмы сопротивления лекарственным средствам, обуславливающие появление резистентности опухолей к применяемым препаратам. Мировым актуальным трендом является разработка лекарственных агентов, действующие целенаправленно на совокупность мишеней опухолевых клеток, не оказывая вредного воздействия на весь организм. В последнее десятилетие одним из успешно и активно развивающихся направлений таргетной медицины является нанохимия, благодаря которой биодоступность и направленность действия лекарственных средств увеличивается на порядки.

Среди перспективных векторных средств доставки противоопухолевых препаратов большой интерес представляет гиалуроновая кислота (ГК). Она представляет собой вязко-эластичный, линейный гетерополисахарид, который синтезируется хондро- и остеобластами и обнаруживается в межклеточном матриксе в комплексе с белками. ГК выполняет важные биологические функции в организме человека и животных. На ее основе создан ряд перспективных фармакологических средств для хирургии, лечения ожогов, трофических язв и артритов различной этиологии, также она используется в медицине в качестве основы для доставки лекарственных средств.

Тритерпеноиды – это природные вторичные метаболиты, обладающие широким спектром биологической и фармакологической активности, в частности противовирусным, антибактериальным и антипаразитарным действием и т.д. На сегодняшний день тритерпеноиды лупанового ряда, например, бетулиновая кислота, активно исследуются в качестве митохондриально-направленных агентов в противоопухолевой терапии.

Таким образом, несмотря на достижения в области создания средств доставки лекарственных препаратов, которые используются в исследованиях и лечении онкологических заболеваний, существует потребность в поиске и разработке новых таргетных гибридных молекул, обладающих высокой биосовместимостью, низкой токсичностью, и таргетностью в отношении опухолевых клеток.

В представленной работе синтезированы ранее неизвестные гибридные органические структуры, содержащие в своем составе лупановые тритерпеноиды (бетулоновая и бетулиновая кислоты), которые обеспечивают митохондриальную направленность гибридной молекулы, а также полисахарид – гиалуроновую кислоту, обладающую высокой биосовместимостью и таргетностью по отношению к CD44 сверхэкспрессирующим опухолевым клеткам.

Степень разработанности проблемы.

Разработка гибридных молекул активно ведется на протяжении последних 30-40 лет. Интенсивность междисциплинарных исследований в этом направлении с каждым годом только возрастает, о чем свидетельствует рост количества публикаций. Ведется масштабный поиск различных вариантов органических молекул с разным составом и структурой, направленный на достижение таких целей, как уничтожение раковых клеток за счет повышения биодоступности лекарственных средств и таргетности по отношению к опухолевым клеткам. В представленной работе синтезированы ранее неизвестные гибридные органические структуры, содержащие в своем составе лупановые тритерпеноиды (бетулоновая и бетулиновая кислоты), которые обеспечивают митохондриальную направленность гибридной молекулы, полисахарид – гиалуроновая кислота, которая обладает высокой биосовместимостью и таргетностью по отношению к опухолевым клеткам.

Цель исследования.

Создание новых перспективных средств противоопухолевого действия на основе гиалуроновой кислоты и тритерпеноидов лупанового ряда, характеризующихся высокой биосовместимостью и таргетностью.

Задачи исследования.

1. Синтез малеимидных производных бетулиновой и бетулоновой кислот, модифицированные по C-28 положению N-гидрокисукцинимидо-малеимидными линкерами (BMPS, EMCS и SMCC) через диаминовые спейсеры с алкановой цепью различной длины (1,2-диаминоэтан, 1,4-диаминобутан, 1,8-диаминооктан).
2. Получение новых амфифильных гибридных молекул на основе тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты и малеимидных производных лупановых тритерпеноидов через линкеры (BMPS, EMCS и SMCC) по реакции Михаэля.
3. Поиск условий получения и установление физико-химических параметров (спектральных характеристик, морфологии и распределение по размерам) самособирающихся частиц на основе амфифильных гибридных производных гиалуроновой кислоты.

Научная новизна.

Синтезированы новые производные бетулоновой и бетулиновой кислот, содержащие малеимидные линкеры и диаминоалканы, различающихся длиной и структурой. Впервые получены амфифильные гибридные молекулы на основе тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты с малеимидными производными бетулоновой и бетулиновой кислот, разработаны условия формирования самособирающихся мицелл, установлена их морфология и размеры.

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: одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии высокого разрешения и других.

Практическая значимость работы.

Синтезированы новые амфифильные гибридные молекулы на основе малеимидных производных лупановых тритерпеноидов и гиалуроновой кислоты, обладающих способностью образовывать самособирающиеся мицеллы, которые могут быть использованы в дальнейшем в качестве средств доставки противоопухолевых препаратов.

Научные положения, выносимые на защиту.

1. Получение новых малеимидных производных бетулоновой и бетулиновой кислот по С-28 положению.
2. Синтез амфифильных гибридных молекул на основе малеимидных производных лупановых тритерпеноидов и тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты.
3. Физико-химические параметры самособирающихся частиц на основе амфифильных гибридных производных гиалуроновой кислоты.

Личный вклад автора заключается в поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме диссертационного исследования, проведении экспериментальных исследований, разработке и оптимизации методов синтеза новых соединений, интерпретации полученных результатов. Основные публикации, посвященные разработке новых гибридных молекул на основе тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты и малеимидных производных бетулоновой и бетулиновой кислот, 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 использованием 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 XII Всероссийской научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Киров, 2022), I междисциплинарной всероссийской молодежной научной школе-конференции с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты», посвященной 120-летию со дня рождения академика Б. А. Арбузова (Казань, 2023), II Междисциплинарной всероссийской молодежной научной школе-конференции с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (Казань, 2024), Всероссийской научной конференции с международным участием «Биохимия человека 2024» (Москва, 2024).

Публикации по теме диссертации.

По материалам научно-квалификационной работы (диссертации) опубликовано 6 научных трудов, из них 1 статья опубликована в зарубежном журнале, индексируемом Web of Science и Scopus, 1 статья отправлена в печать, тезисы 4 докладов на российских и международных конференциях. Отправлена 1 заявка на изобретение РФ (№ 2025115230 от 03.06.2025).

Структура и объем диссертации.

Научно-квалификационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 104 наименования. Материал научно-квалификационной работы изложен на 98 страницах компьютерного набора (формат А4), включает 2 таблицы, 13 рисунков, 12 схем.

Работа выполнена в лаборатории органического синтеза Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения

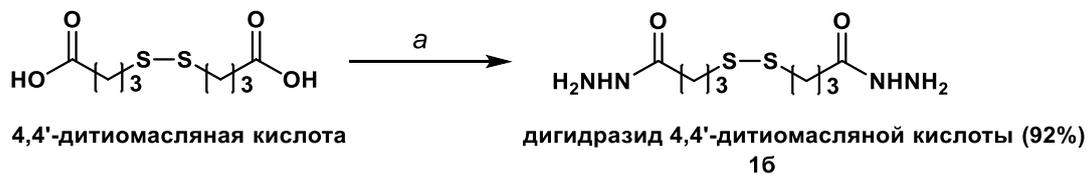
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук в соответствии с направлением Института по теме «Дизайн гибридных материалов и таргетных препаратов для медицины и сельского хозяйства, структура и механизмы реакций» (№ гос. регистрации FMRS-2022-0081), «Создание современных таргетных препаратов для медицины и сельского хозяйства на основе экистероидов, тритерпеноидов, олигопептидов и полисахаридов, механизмы каталитических реакций и структура соединений» (№ гос. регистрации FMRS-2025-0033).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.1 Синтез SH-модифицированной гиалуроновой кислоты

В качестве основы для создания новых гибридных молекул противоопухолевого действия нами получено SH-производное гиалуроновой кислоты. Для этого был синтезирован в две стадии дигидразид 4,4'-дителиомазляной кислоты **16**, который был использован для функционализации полисахарида. Выход продукта составил 92% (схема 1).

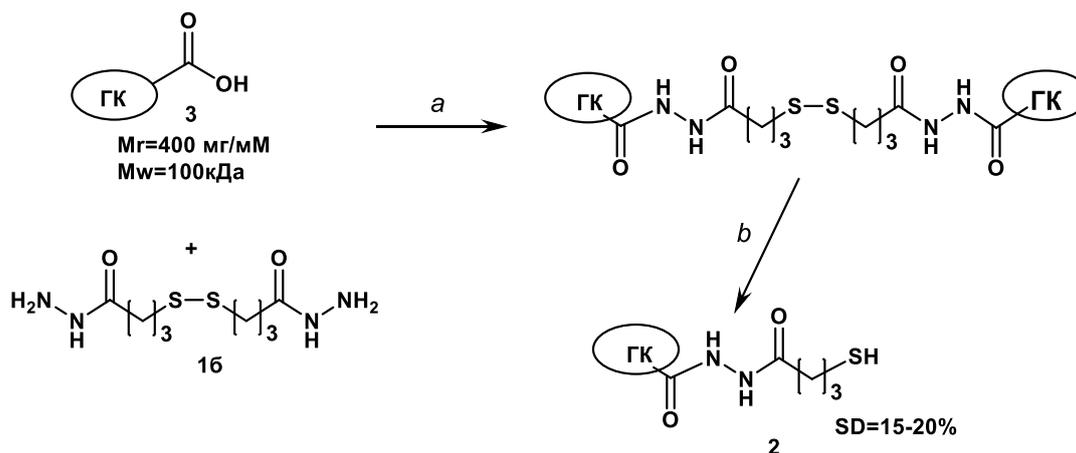
Схема 1



Реагенты и условия: *a*: 1) CH₃OH/H₂SO₄, 2 ч, *t*= комн.темп.; 2) NH₂NH₂·H₂O, абс. MeOH, 4 ч.

Далее дигидразид **16** вовлекали в реакцию с гиалуроновой кислотой в присутствии водоотнимающего реагента EDC (1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодиимид). На втором этапе под действием восстанавливающего агента DTT (дителиотреитола) получена SH-модифицированная ГК (**2**) со степенью функционализации 15-20% (Схема 2.2).

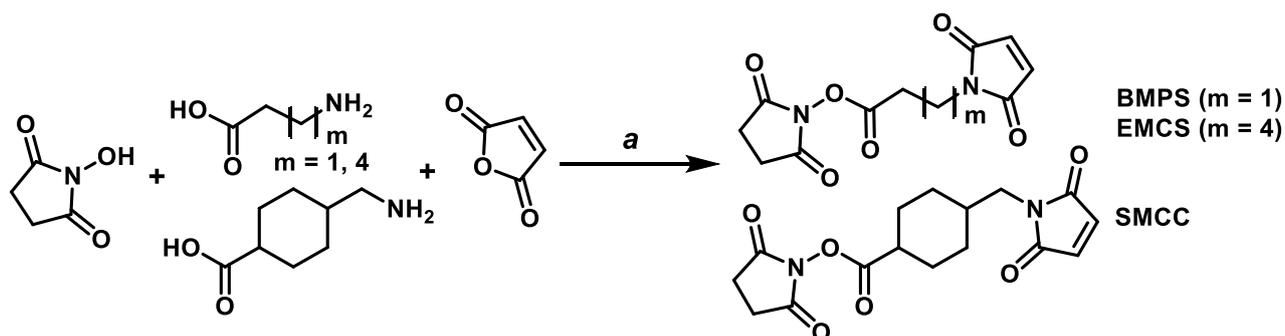
Спектр ЯМР ¹H соединения **2** содержал основные сигналы в области 3 – 5 м.д., которые соответствовали полисахаридному остову (Рис. 2 А). Также в области 2.53 м.д. присутствовал триплетный сигнал, относящийся к метиленовой группе -CH₂SH.



Реагенты и условия: *a*: EDC, pH=4.75, 2 ч; *b*: DTT, pH=8.5, 19 ч.

1.2 Синтез (N-малеимидаоалкил)сукцинимидных эфиров

Проблема высокой стоимости и низкого качества коммерчески доступных линкеров показала необходимость самостоятельного получения соответствующих N-малеимидосукцинимидов (BMPS, EMCS и SMCC). Нами были отработаны методики получения и выделения в чистом виде данных соединений. Соединения синтезировали с помощью реакции малеинового ангидрида, N-гидроксисукцинимида и аминокарбоновых кислот в DMF при пониженных температурах (Схема 3). Выход целевых продуктов составил не более 40–50%. Следует отметить нестабильность N-[ε-малеимидаокапроилокси]сукцинимидного эфира (EMCS), а также BMPS и SMCC на воздухе.



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

1.3 Синтез С-28 малеимидных производных бетулоновой и бетулиновой кислот

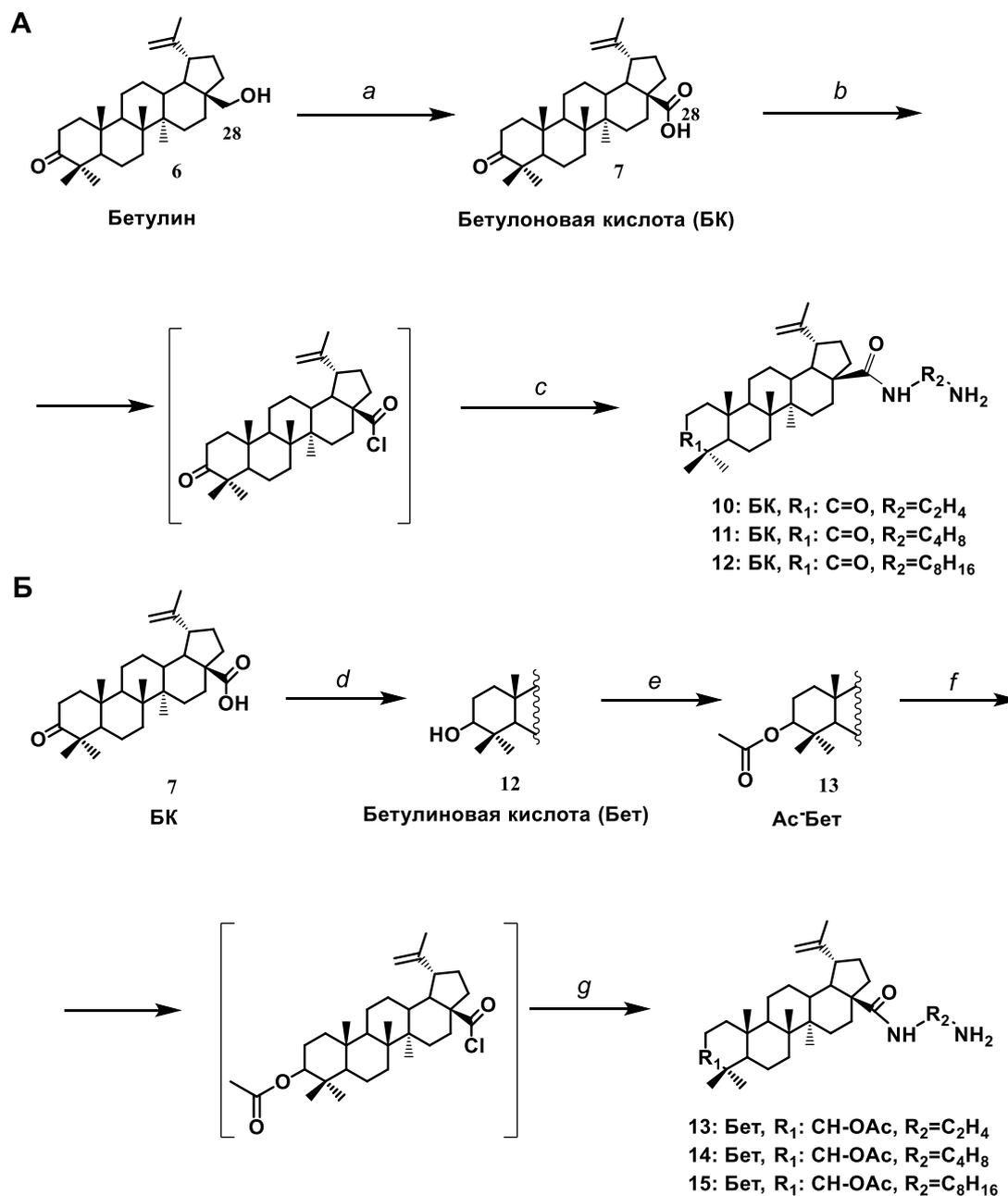
На первом этапе нами были получены С-28 амидные производные тритерпеноидов реакцией бетулоновой и бетулиновой кислот с 1,2-диаминоэтаном, 1,4-диаминобутаном и 1,8-диаминооктаном. Реакцию проводили с предварительно полученным хлорангидридом тритерпеноидов в присутствии Et_3N . (Схема 4. А: получение амидных производных бетулоновой кислоты; Б: получение амидных производных бетулиновой кислоты).

На втором этапе полученные соединения **10-15** вовлекали в реакцию с N-малеимидсукцинимидными линкерами **3-5** (Схема 5. А: получение малеимидных производных бетулоновой кислоты; Б: получение малеимидных производных бетулиновой кислоты). В результате впервые были получены малеимидные производные бетулоновой и бетулиновой кислот по С-28 положению в тритерпеноиде.

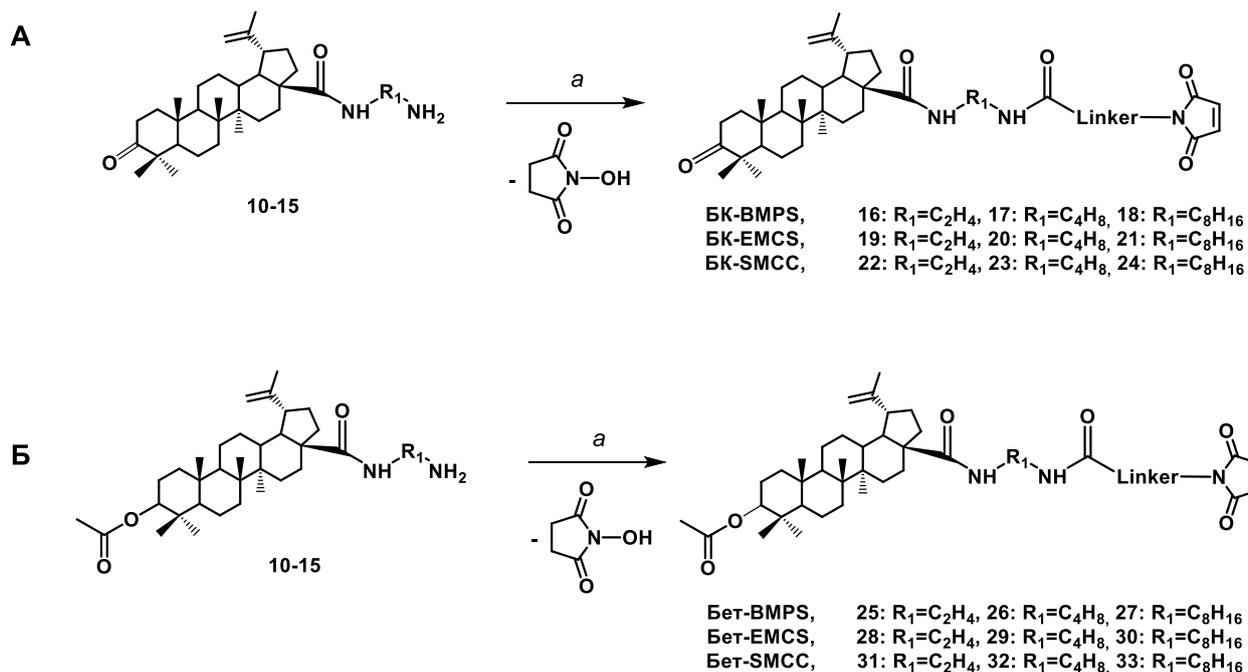
Структура всех полученных соединений подтверждена с помощью одно- (^1H , ^{13}C) и двумерной (COSY, HMBC, HSQC) ЯМР-спектроскопии. В качестве примера представлен спектр ЯМР ^1H соединения **23** (Рис. 2 Б). Так, в спектрах ЯМР ^1H наблюдаются сигналы, соответствующие фрагментам бетулоновой кислоты, линкера и диаминоалкана. Присоединение SMCC линкера к С-28 амидному производному бетулоновой кислоты подтверждается присутствием в

спектре ЯМР ^1H сигнала протонов двойной связи линкера SMCC при δ_{H} 6.75 м.д. и наличием сигналов NH-групп диаминобутана.

Схема 4



Реагенты и условия: А) *a*: CrO₃, H₂SO₄, (CH₃)₂CO, ацетон, $t=0^\circ\text{C}$, 5 ч; *b*: C₂O₂Cl₂, CH₂Cl₂, $t=0^\circ\text{C}$, 2 ч; *c*: диаминоалкан (1,2-диаминоэтан, 1,4-диаминобутан, 1,8-диаминооктан), (C₂H₅)₃N, CH₂Cl₂, $t=$ комн. темп., 19 ч; Б) *d*: NaBH₄, CHCl₃, CH₃OH, $t=0^\circ\text{C}$, 2 ч; *e*: DMAP, (CH₃CO)₂O, пиридин, $t=0^\circ\text{C}$, 3 ч; *f*: C₂O₂Cl₂, CH₂Cl₂, $t=0^\circ\text{C}$, 2 ч; *g*: диаминоалкан (1,2-диаминоэтан, 1,4-диаминобутан, 1,8-диаминооктан), (C₂H₅)₃N, CH₂Cl₂, $t=$ комн. темп., 19 ч.



Реагенты и условия: а: N-малеимидсукцинимидные линкеры **3-5**, CHCl₃,
 t= комн. темп., 3 ч.

Структура соединения **23** также была подтверждена при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения, где пики при 744.5280 и 766.5103 соответствовали молекулярным массам [M+H]⁺ и [M+Na]⁺, соответственно (Рис. 1).

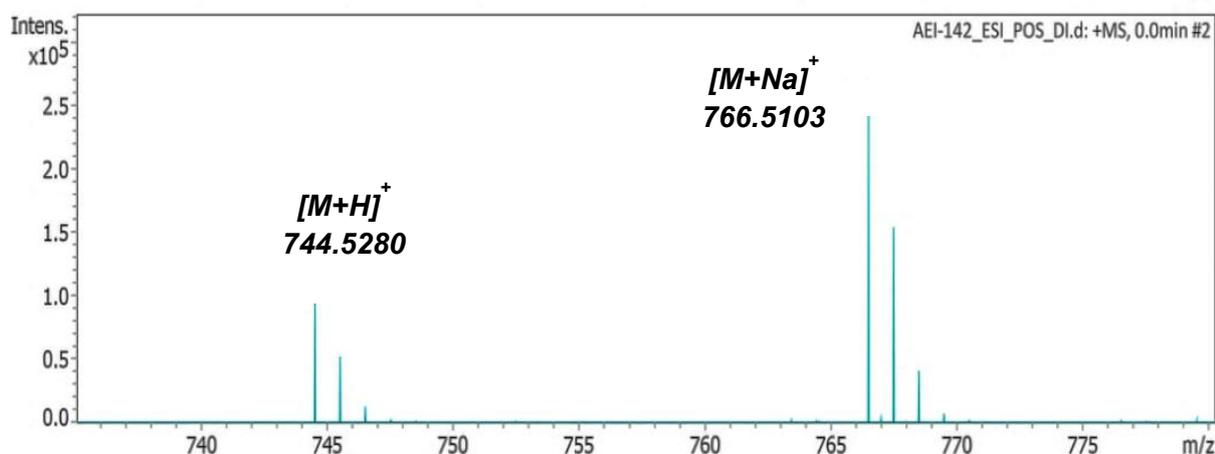
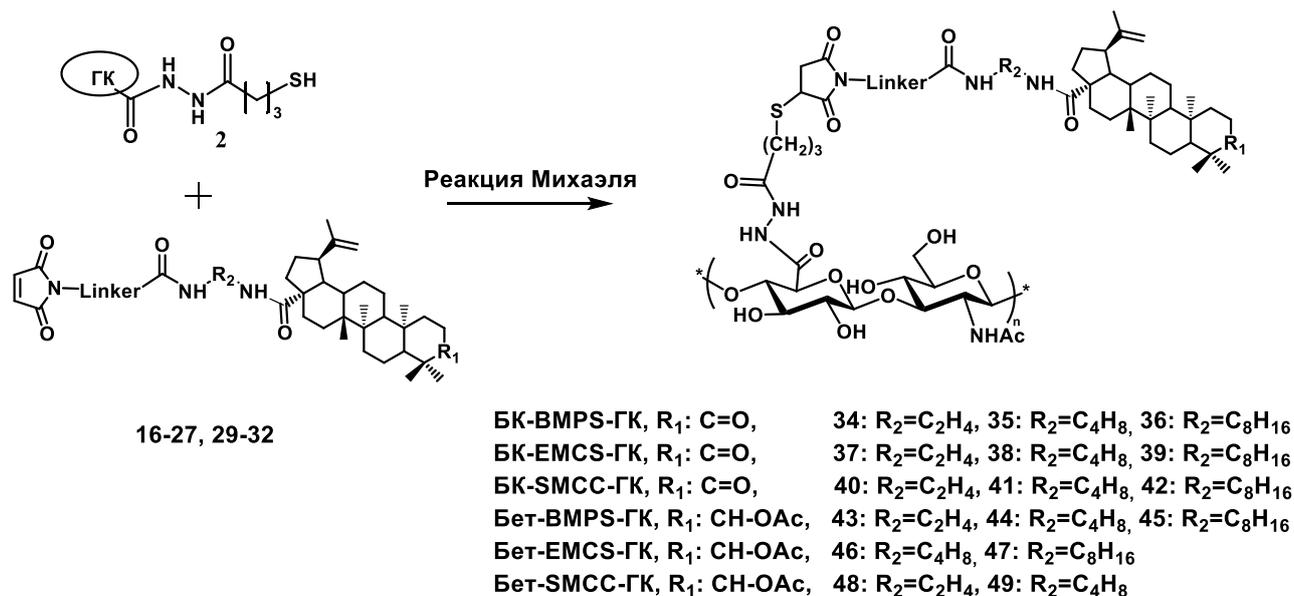


Рисунок 1. Масс-спектр малеимидного производного бетулоновой кислоты с SMCC линкером (**23**).

1.4 Синтез амфифильных производных ГК с малеимидными производными бетулоновой и бетулиновой кислот

Для получения амфифильной гибридной молекулы малеимидные производные бетулоновой и бетулиновой кислот (16-27, 29-32) вовлекали в реакцию с тиол-модифицированной гиалуроновой кислотой 2. Присоединение тритерпеноидов с получением конъюгатов (34-49) происходило через малеимидный фрагмент линкеров и SH-группу производного гиалуроновой кислоты по реакции Михаэля. В результате впервые были получены амфифильные гибридные молекулы на основе SH-модифицированной гиалуроновой кислоты и малеимидного производного бетулоновой кислоты (Схема 6).

Схема 6



Реагенты и условия: H₂O, ацетон, t= 40°C, 2 ч.

На рис. 2В в качестве примера представлен спектр ЯМР ¹H гибридной молекулы гиалуроновая кислота - SMCC линкер - бетулоновая кислота (41). В спектре ¹H отсутствовал сигнал протонов двойной связи линкера SMCC при δ_H 6.75 м.д, относящийся к малеимидному фрагменту исходного соединения 23. Вместе с тем наблюдались сигналы в области от 0.75 до 1.7 м.д., характерные для

тритерпеноидного остова, а также сигналы в области 3-5 м.д., соответствующие полисахариду (Рис. 2 В).

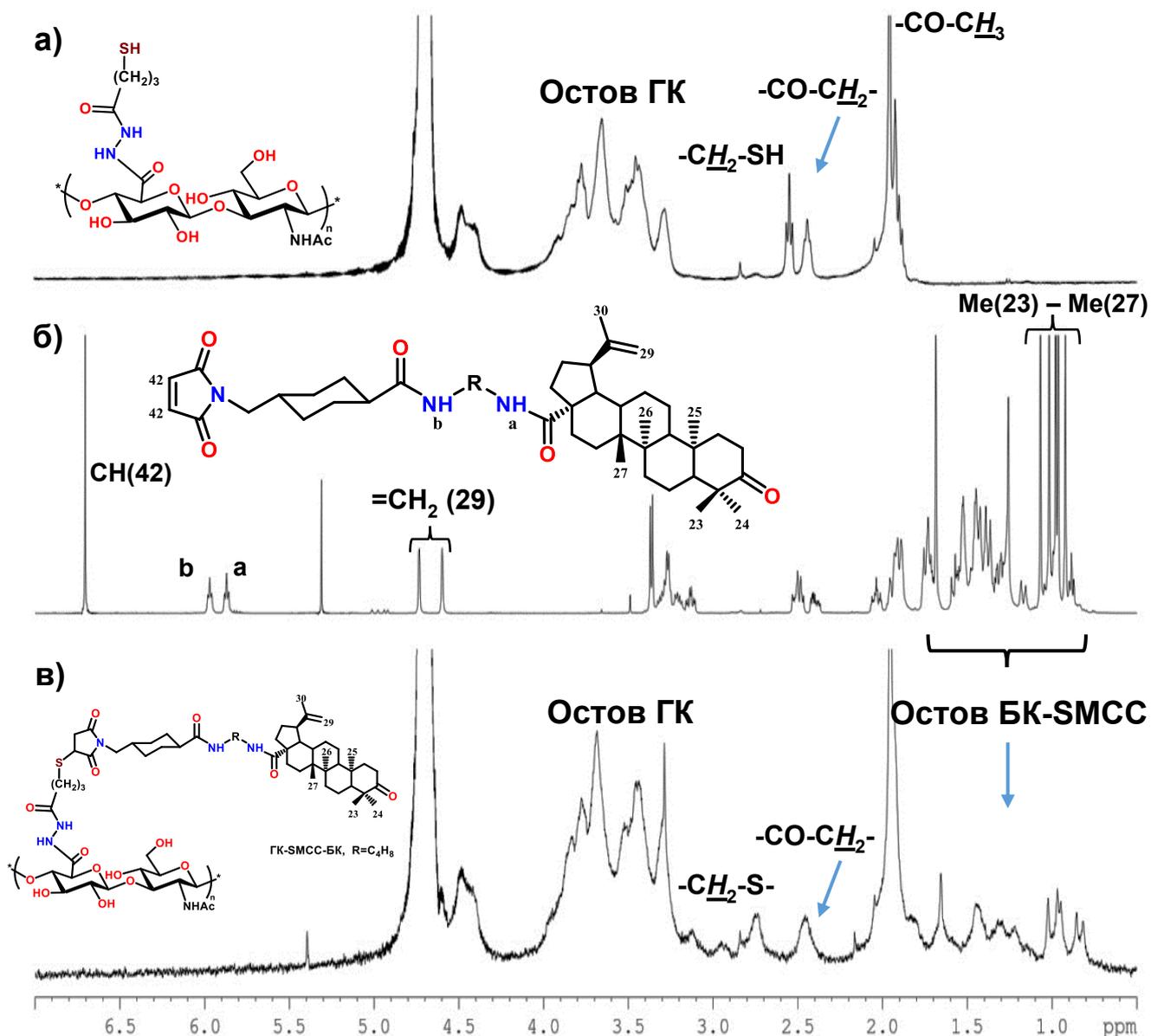


Рисунок 2. Спектры полученных соединений: а) тиол-модифицированная гиалуроновая кислота (2); б) малеимидное производное бетулоновой кислоты (23); в) гибридная молекула ГК-SMCC-бетулоновая кислота (41).

Как правило, амфифильные гибридные молекулы могут самопроизвольно образовывать частицы типа «ядро-оболочка» в водной среде (самособирающиеся частицы). Поскольку гиалуроновая кислота является

гидрофильной, она образует внешнюю оболочку частиц, а бетулоновая кислота — ядро частиц (Рис. 3).

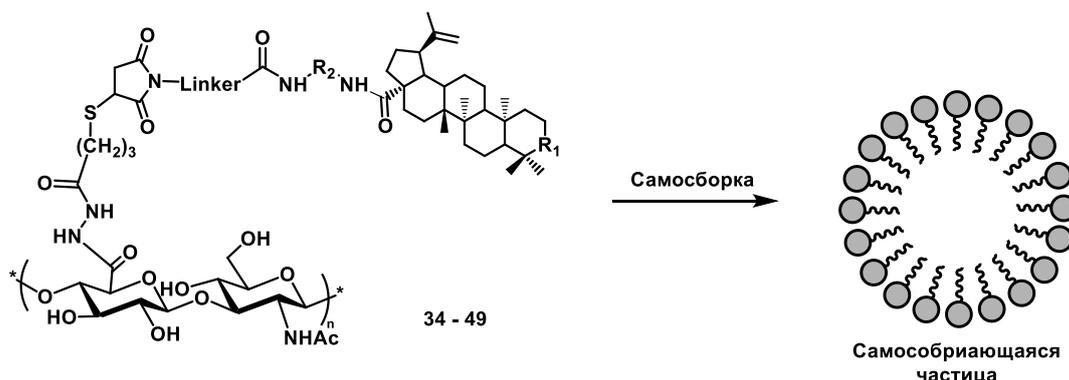


Рисунок 3. Схематичное изображение образования самособирающихся частиц.

Для подтверждения образования самособирающихся частиц нами была проанализирована морфология и проведена оценка размера частиц с помощью сканирующей электронной микроскопии и спектроскопии кросс-корреляции фотонов, соответственно. В ходе проведения оценки обоими методами были получены величины на уровне 400-500 нм (Рис. 4).

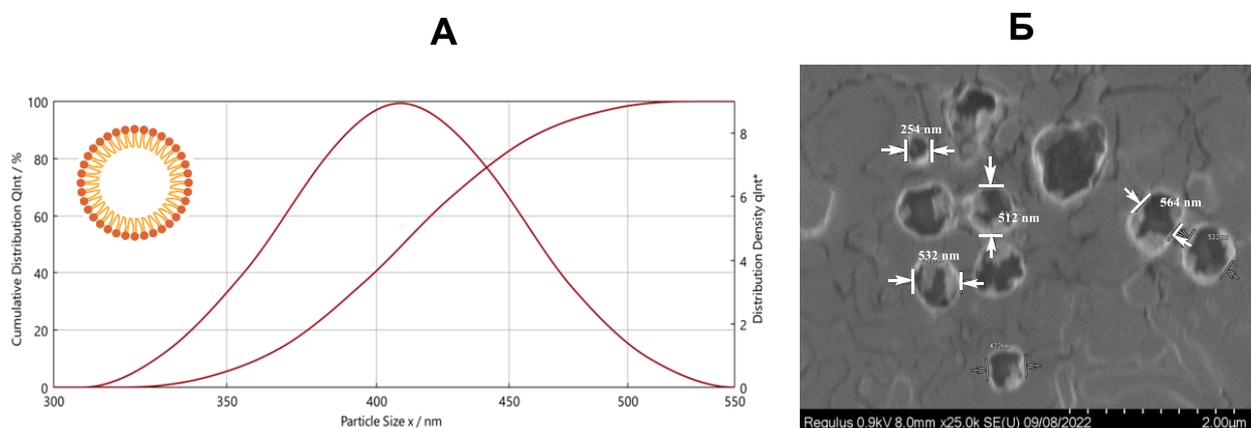


Рисунок 4. График распределения частиц по размерам, полученный методом кросс-корреляции фотонов на анализаторе размера частиц SYMPATEC NANOPHOX (A) и SEM-изображение частиц, полученное с помощью электронной микроскопии на сканирующем электронном микроскопе Regulus 8220 (Б).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ВЫВОДЫ

1. Получены аминопроизводные бетулиновой и бетулоновой кислот с выходами 59-95% путем их модификации по С-28 положению различными диаминоалканами (1,2-диаминоэтан, 1,4-диаминобутан, 1,8-диаминооктан).
2. Взаимодействием амидных производных тритерпеноидов с N-гидрокисукцинимидо-малеимидными линкерами (BMPS, EMCS и SMCC), отличающихся длиной и структурой, получен ряд новых малеимидных производных лупановых тритерпеноидов с выходом 47–93%.
3. Впервые получены амфифильные гибридные молекулы на основе SH-модифицированной гиалуроновой кислоты и малеимидных производных бетулоновой кислоты со степенью замещения ГК 15-20%.
4. Исследование физико-химических свойств показало, что амфифильные производные ГК способны самособираться в мицеллы благодаря разнице в гидрофильных и гидрофобных свойствах их компонентов. Структура гибридных молекул доказана с помощью ЯМР спектроскопии; методами кросс-корреляции фотонов и электронной микроскопии установлены размеры (400-500 нм) и морфология самоорганизующихся частиц.

**ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОПУБЛИКОВАНО В СЛЕДУЮЩИХ
РАБОТАХ:**

1. Парфенова Л.В., Галимшина З.Р., **Алибаева Э.И.**, Габдуллина К.Ф., Гильфанова Г.У. Малеимидные производные тритерпеновых кислот в качестве перспективной платформы для создания лекарственных средств // Химия природных соединений – 2025. (отправлена в печать)
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, 101678, <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101678>.
3. **Алибаева, Э.И.**, Галимшина З.Р., Габдуллина К.Ф., Парфенова Л.В. Перспективные противоопухолевые агенты на основе гиалуроновой кислоты и тритерпеноидов // Всероссийская научная конференция с международным участием «Биохимия человека 2024». – Москва, 2024. – С. 201.
4. **Алибаева, Э.И.**, Галимшина З.Р., Габдуллина К.Ф., Парфенова Л.В. Амфифильные производные гиалуроновой кислоты и лупановых тритерпеноидов для таргетной медицины // II Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты». – Казань, 2024. – С. 90.
5. **Алибаева, Э.И.**, Гильфанова Г.У., Галимшина З.Р., Парфенова Л.В. Гибридные молекулы на основе гиалуроновой кислоты и тритерпеноидов для таргетной медицины // I междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты», посвященная 120-летию со дня рождения академика Б. А. Арбузова. – Казань, 2023. – С. 48.

6. **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.