

На правах рукописи



ШИПИЛОВ ДМИТРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

**НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.
ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ**

Специальность 02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре органической химии Института биологии и химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский педагогический государственный университет»

Научный руководитель: **Грачев Михаил Константинович**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Белоглазкина Елена Кимовна**
доктор химических наук, профессор
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
профессор кафедры органической химии

Орлова Анна Витальевна
кандидат химических наук
ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского» Российской академии наук,
научный сотрудник лаборатории химии углеводов им. Н.К. Кочеткова

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Защита состоится 17 апреля 2018 года в 15 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 002.102.02 на базе Федерального государственного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, 1, зал Ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Института физиологически активных веществ Российской академии наук и на сайте организации: http://www.ipac.ac.ru/diss_sovet/

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

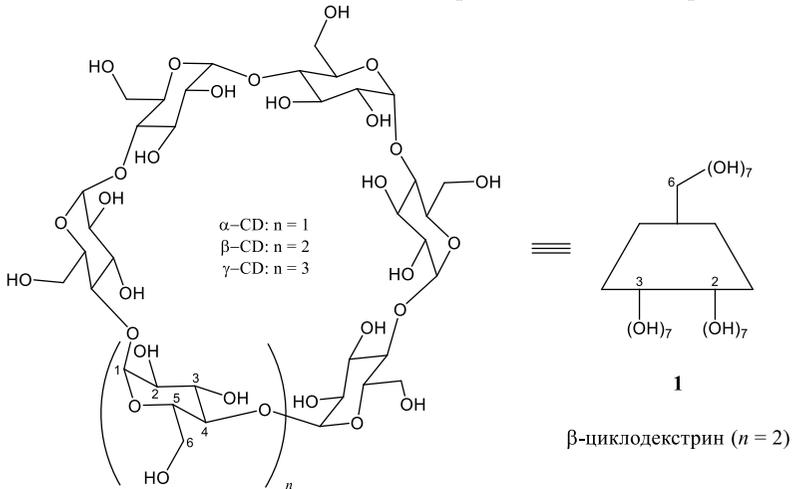
Учёный секретарь
диссертационного совета Д 002.102.02
кандидат химических наук



Афанасьева С. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Развивающиеся в последние годы исключительно быстрыми темпами нанотехнологии находят все более широкое применение, в частности при разработке способов векторной (направленной) доставки лекарственных веществ. В ряду наноразмерных частиц и материалов уже несколько десятилетий особое внимание исследователей привлекают циклодекстрины.



Циклодекстрины (CDs), представляющие собой сложные природные циклические олигосахариды, состоящие из остатков D-глюкопиранозы, соединенных α -1,4-гликозидной связью, и их некоторые производные нашли широкое применение как «контейнеры» лекарственных препаратов в фармакологии за счет инкапсулирования разных гидрофобных соединений (образование соединений включения типа «гость–хозяин»). Этим свойством циклодекстрины обладают благодаря своему строению: их молекулы имеют гидрофильную внешнюю поверхность и гидрофобную внутреннюю полость, по своим размерам сопоставимую с размером большого числа органических и неорганических соединений. Такое инкапсулирование защищает включенное лекарство от биоразложения, побочных эффектов, способствует повышению его водорастворимости и, в итоге, более эффективному фармакологическому действию. Кроме «включения» в последнее время известные успехи были достигнуты при ковалентном («химическом») «привязывании» (конъюгировании) лекарственных средств к циклодекстрину, что позволяет в ряде случаев создавать новые, более эффективные лекарственные формы за счет более пролонгированного и целенаправленного действия.

Цели работы. Исследование и разработка эффективных синтетических подходов к синтезу регионаправленно замещенных по первичным гидроксильным группам производных β -циклодекстрина (как наиболее дешевого, распространенного и коммерчески широко используемому представителю данного класса соединений) с целью создания новых форм лекарственных средств на его основе, представляющих собой конъюгаты ряда соединений

противовоспалительного, обезболивающего и жаропонижающего действия с β -циклодекстрином и его синтетическими производными. Другая цель работы заключалась в получении стабильных, то есть выделяемых и устойчивых при длительном хранении в нормальных условиях, комплексов включения β -циклодекстрина с некоторыми нестероидными противовоспалительными препаратами из группы производных пропионовой кислоты и представляющими фармакологический интерес дикарбоновыми кислотами.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- ✓ разработать эффективные пути синтеза наноразмерных катионных производных β -циклодекстрина как потенциальных носителей (соединения включения и конъюгаты) лекарственных средств для фармакологических исследований в разных направлениях;

- ✓ подобрать оптимальные условия для синтеза альдегида β -циклодекстрина как одного из наиболее подходящих интермедиатов для последующего синтеза на его основе новых функционально замещенных производных;

- ✓ выяснить особенности супрамолекулярного влияния циклодекстриновой полости на ход и направленность протекания классических реакций этерификации β -циклодекстрина и его некоторых синтетических производных с ароматическими моно- и дикарбоновыми кислотами, представляющими фармакологический интерес, а также с производными пропионовой кислоты из группы нестероидных противовоспалительных средств, обладающих болеутоляющим и жаропонижающим действием;

- ✓ разработать эффективные пути синтеза димерных производных β -циклодекстрина;

- ✓ исследовать возможность получения стабильных соединений включения циклодекстрина с «гостями» различной природы, представляющих фармакологический интерес;

- ✓ рассмотреть влияние пространственного строения молекулы некоторых «гостей» на возможность образования соединений включения с β -циклодекстрином;

- ✓ провести фармакологические исследования ряда вновь синтезированных конъюгатов и комплексов включения β -циклодекстрина и его производных.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- ✓ впервые проведено систематическое исследование в области синтеза новых лекарственных средств путем конъюгирования их к β -циклодекстрину и его некоторым синтетическим производным;

- ✓ подобраны условия для получения монозамещенных по первичным гидроксильным группам циклодекстринов, на основе которых возможен дальнейший синтез новых функционально замещенных циклодекстринов;

- ✓ исследована возможность получения стабильных соединений включения циклодекстрина с «гостями», представляющих фармакологический интерес и рассмотрено влияние пространственного строения молекулы «гостя» на возможность образования соединений включения с β -циклодекстрином;

- ✓ изучен антифлогистический эффект в моделях асептического воспаления конъюгатов β -циклодекстрина с кетопрофеном и напроксеном;

- ✓ изучена актопротекторная активность в моделях холодового стресса конъюгатов β -циклодекстрина, а также его катионного производного с *n*-аминобензойной, никотиновой и изоникотиновой кислотами;

✓ комплекс включения с янтарной кислотой значительно изменяет показатели когнитивной сферы, оказывая ноотропное воздействие: по степени воздействия на когнитивную сферу эффект комплекса включения близок к аналогичному эффекту препарата Mexidol, но потенциально активизирует механизмы декларативной памяти у лабораторных животных.

При этом на основе разработанных нами подходов к направленной функционализации циклодекстринов возможно получение лекарственных препаратов и другого фармакологического действия.

Практическая значимость. Предложены практические пути получения разных по природе монокатионных аминиевых производных циклодекстринов, несущих положительный заряд на стороне первичных гидроксильных групп, представляющие интерес как потенциальные носители (соединения включения и конъюгаты) лекарственных средств для фармакологических исследований в разных направлениях. С использованием ароматических моно- и дикарбоновых кислот, а также производных пропионовой кислоты из группы нестероидных противовоспалительных средств, обладающих болеутоляющим и жаропонижающим действием, и β -циклодекстрина и его синтетических производных получены конъюгаты, которые могут служить для точечной доставки действующего средства к цели. Кроме того, разработанные методики позволяют получать стабильные комплексы включения циклодекстринов с некоторыми нестероидными противовоспалительными соединениями из группы производных пропионовой кислоты и представляющими фармакологический интерес дикарбоновыми кислотами. Таким образом, на основе разработанных методик возможно создание лекарственных препаратов нового поколения, обеспечивающих высокоэффективную и точечную доставку лекарственных средств.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается использованием различных вариантов спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C , в том числе двумерной спектроскопии ЯМР НОМОСОР $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ и НЕТСОР $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, регистрации спектра раствора образца в режиме ДЕРТ, а также элементного анализа.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждались на Всероссийской молодежной конференции-школе с международным участием «Достижения и проблемы современной химии» (Санкт-Петербург, 10–13 ноября 2014 г.), Круглом столе молодых ученых по приоритетным направлениям науки (Москва, 18 ноября 2015 г.), IV Всероссийской конференции по органической химии (Москва, 22–27 ноября 2015 г.), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 26–30 сентября 2016 г.), 16th International Seminar on Inclusion Compounds and 3rd Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry (Казань, 26–30 июня 2017 г.), 27th International Chugaev Conference on Coordination Chemistry and 4th Conference-School for Young Researchers «Physicochemical Methods in Coordination Chemistry» (Нижегород, 2–6 октября 2017 г.).

Диссертационное исследование выполнено на кафедре органической химии Института биологии и химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский педагогический государственный университет». С 2016 г. работа была непосредственно связана с выполнением гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-03-00444.

Публикации. Основное содержание работы отражено в 14 научных публикациях, в том числе 8 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций, и 6 тезисах докладов.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 166 страницах машинописного текста: состоит из введения, литературного обзора (глава 1), обсуждения результатов собственных исследований (глава 2), экспериментальной части (глава 3), заключения и приложения, где приведены результаты выполненных в ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» фармакологических испытаний, и содержит 14 схем, 30 рисунков и 13 таблиц. Список цитируемой литературы включает 329 наименований.

Автор считает приятным долгом выразить глубокую благодарность и признательность канд. хим. наук Г.И. Курочкиной и своему научному руководителю д-ру хим. наук, проф. М.К. Грачеву за постоянную поддержку и внимание, канд. хим. наук Л.К. Васяниной и научному сотруднику ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» Российской академии наук И.И. Левиной за регистрацию и помощь в интерпретации спектров ЯМР, а также д-ру биол. наук ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации Т.А. Баталовой (г. Благовещенск) и канд. биол. наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» А.А. Сергиевичу (г. Владивосток) за организацию и проведение фармакологических испытаний.

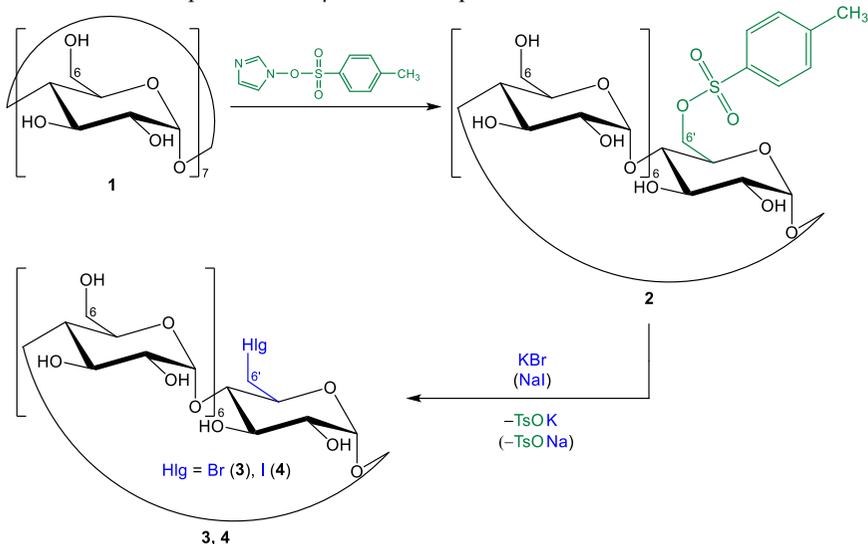
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.1 Синтез монокатионных производных β -циклодекстрина

В последние годы синтез новых производных циклодекстринов приобретает все большее значение из-за растущих потребностей фармацевтики в молекулах, способных образовывать комплексы включения с различными биоактивными молекулами для направленной доставки лекарственных средств. К сожалению, регионаправленная модификация циклодекстринов представляет собой трудную в экспериментальном отношении задачу из-за наличия, например, для β -циклодекстрина **1** разных по природе 7 первичных и 14 вторичных гидроксильных групп, находящихся соответственно на узкой и широкой стороне циклодекстринового каркаса. В синтетической практике для этого обычно применяется постановка защитных групп на соответствующие гидроксилы, функционализация оставшихся свободных гидроксогрупп и последующее снятие защит с получением соединения заданного строения. Для синтеза регионаправленно монозамещенных β -циклодекстринов по первичным гидроксилам, чаще всего, используют монотозилирование и дальнейшее замещение тозильной группы подходящим протондонорным нуклеофилом. Монотозилирование немодифицированных циклодекстринов по положению **6** представляет собой типичную исходную реакцию, приводящую к химически активному промежуточному соединению, которое может быть легко преобразовано в широкий набор полезных производных циклодекстрина.

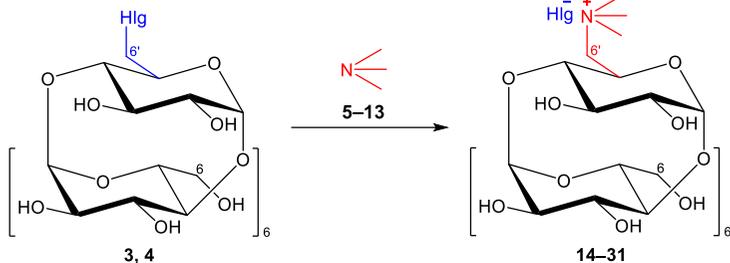
Катионные производные циклодекстринов представляют собой соединения, у которых один или несколько гидроксильных замещены на группу, несущую положительный заряд. С фармакологической точки зрения, конъюгированные циклодекстрины с молекулами лекарственного средства (пролекарства) могут использоваться для точечной доставки лекарств, тогда как наличие катионных групп может повышать их способность проникать через биологические барьеры, например, гематоэнцефалический барьер, встраиваться в биологические мембраны, а также служить в качестве переносчиков при доставке («векторизации») ДНК при генной терапии.

На данном этапе нашей работы мы рассмотрели возможность синтеза монокатионных производных исходя из моногалогенопроизводных β -циклодекстрина и соответствующих аминов. Для этой цели было выбрано селективное монотозилрование свободного циклодекстрина **1** тозилмидазолом. Синтез галогенопроизводных **3**, **4** осуществлен по общей методике на основе монотозилного производного β -циклодекстрина **2**.



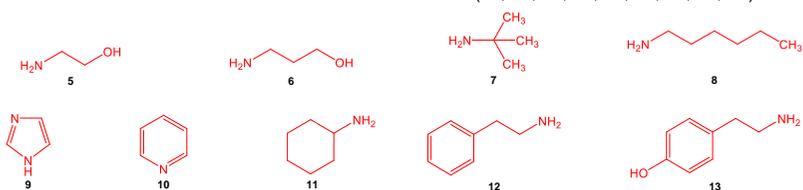
Моногалогенопроизводные **3**, **4** были получены с выходами 85 и 79 %, соответственно. Строение и регионаправленность монозамещения производных циклодекстринов **2–4** подтверждены данными спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C . Количество атомов галогена, введенных в молекулу β -циклодекстрина, подтверждали аргентометрическим титрованием.

Далее галогенопроизводные **3**, **4** алкилировали разные по природе амины **5–13** с образованием большого набора монокатионных аминиевых производных β -циклодекстрина **14–31**, соответственно. Синтез проводили в растворе ДМФА при температуре 120–130 °С в течение 40 часов (при 80 °С в случае использования пиридина **10**). Таким образом с выходами 62–86 % получены монозамещенные производные **14–31**, содержащие положительный заряд на стороне первичных гидроксильных групп циклодекстринового каркаса.

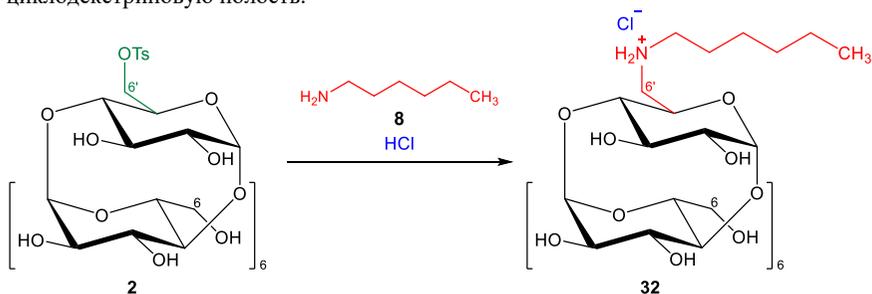


Br (14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30)

Hg = I (15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31)



Необходимо отметить, что для некоторых первичных аминов возможно получение аминиевых солей (например, соединение **32**) прямой обработкой тозилного производного **2** гексан-1-амином **8** с последующим подкислением (HCl, pH 2), однако в этом случае необходима тщательная очистка от *n*-толуолсульфокислоты, которая достаточно прочно включается в циклодекстриновую полость.



Строение полученных соединений **14–32** подтверждали данными спектроскопии ЯМР ^1H , а регионаправленность замещения по первичным гидроксильным группам – данными спектроскопии ЯМР ^{13}C (рисунок 1). Дополнительно, с целью интегрирования сигналов ядер углеродов, спектры ЯМР ^{13}C соединений **14–32** регистрировались с большой задержкой между импульсами (8 с). В спектрах ЯМР ^{13}C соединений **14–32** присутствуют сигналы ядер незамещенных атомов C-6 при δ 60.4 м. д. и характерные сильнополюсные минорные сигналы ядер углерода C-6 * , несущих заместитель N $^+$, при δ 42.9–54.6 м. д. Кроме того, интересно заметить появление характерных сильнополюсных минорных сигналов ядер атомов

* Здесь и далее штрихом отмечены атомы углерода углеводных фрагментов циклодекстрина, гидроксильные группы при которых замещены.

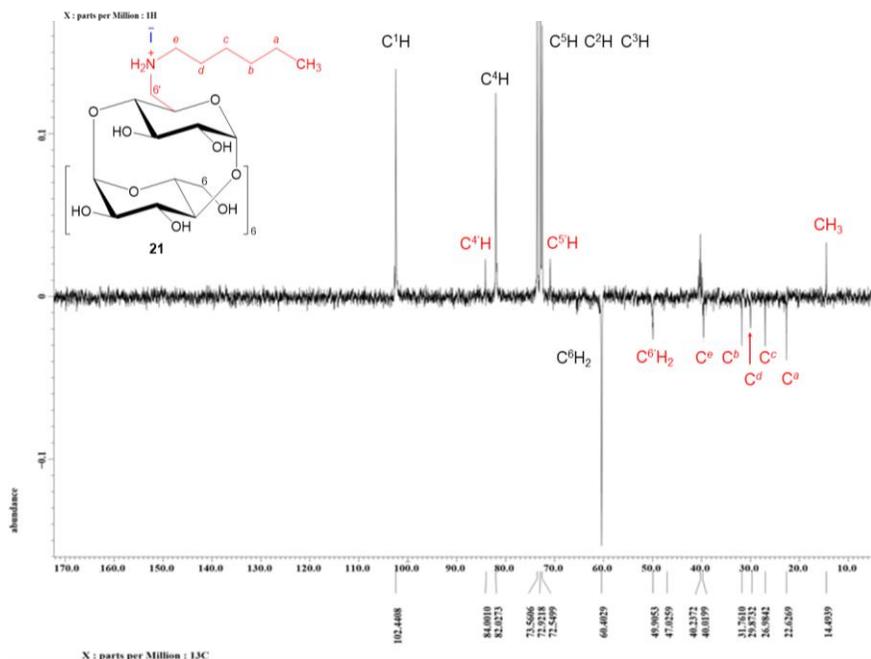
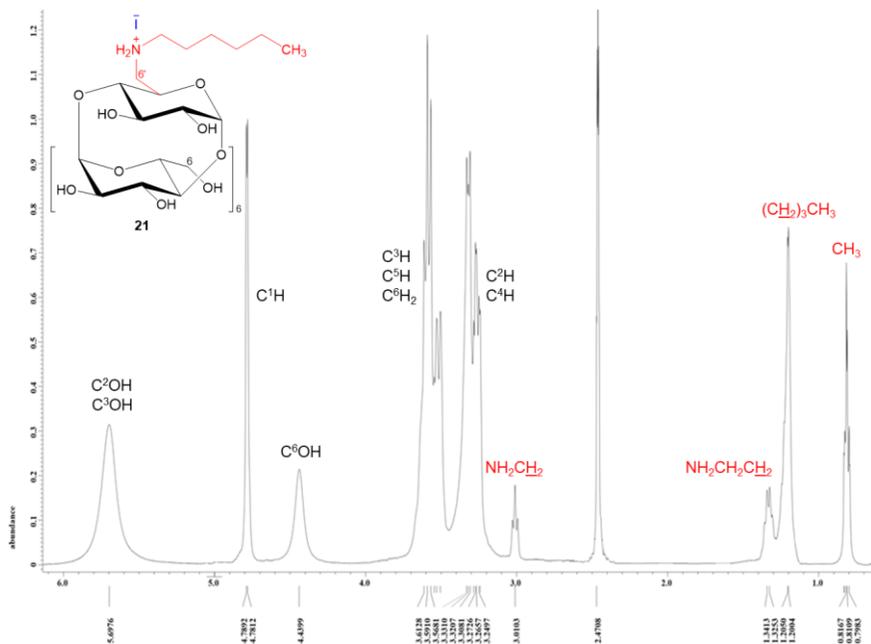
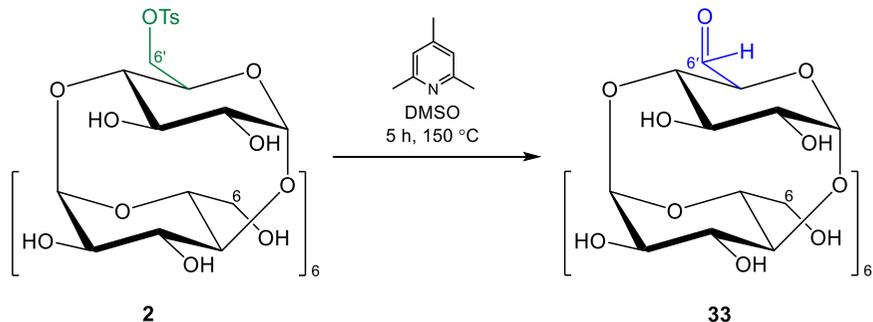


Рисунок 1 – Спектр ЯМР ¹H (вверху) и ¹³C DEPT 135 соединения **21** (DMSO-d₆)

углерода C-5' при δ 71.1 м. д., а также характерных слабopольных минорных сигналов ядер атомов углерода C-4' при δ 84.2 м. д., что дополнительно подтверждало регионаpвленность замещения по первичным гидроксильным группам.

Полученные монокатионные производные β -циклодекстрина представляют интерес как потенциальные носители (соединения включения и конъюгаты) лекарственных средств для фармакологических исследований в разных направлениях.

1.2 Синтез 6-моноальдегида β -циклодекстрина и иминопроизводных на его основе



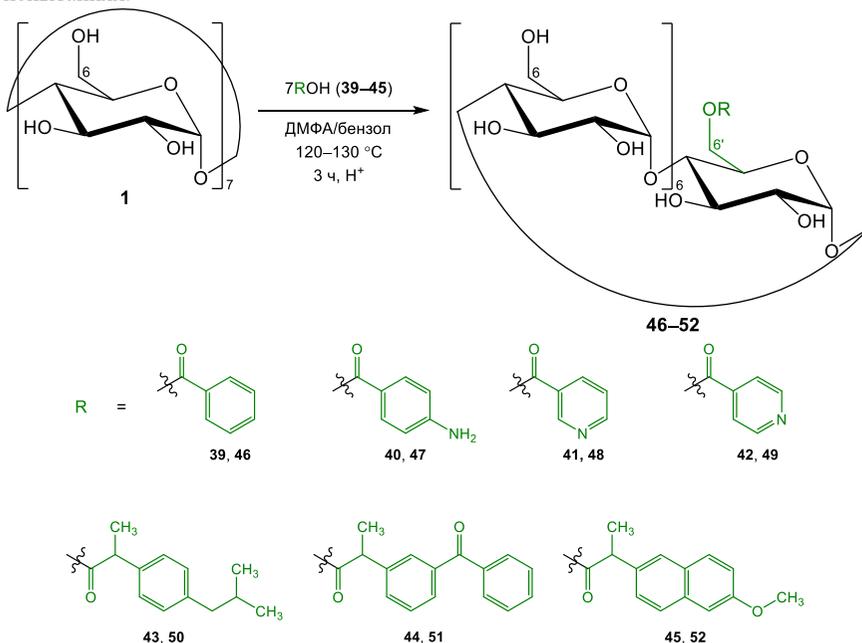
Альдегид β -циклодекстрина, наряду с его галоген- и тозилатными производными, рассматривается в литературе как наиболее подходящий интермедиат для последующего синтеза на его основе новых функционально замещенных производных β -циклодекстрина. Но в отличие от многих производных альдегид обладает высокой водорастворимостью и способностью реагировать в мягких условиях с широким набором подходящих соединений с образованием оснований Шиффа, гидразонов, вступать в реакцию Виттига, а также присоединяться к активным группам, например, первичным аминам многих биомолекул в водной среде.

В связи с этим после предложенного в 1994 г. удобного в практическом отношении синтеза альдегида β -циклодекстрина **33** путем окисления монотозильного производного **2** интерес к получению производных на его основе значительно возрос. Однако особенности его синтеза заключаются в том, что альдегидная группа соединения **33** при его выделении в присутствии воды находится преимущественно в гидратированной форме **34**, а внутренняя полость циклодекстрина включает и достаточно прочно удерживает отщепляющуюся *n*-толуолсульфокислоту. Все это создает неожиданные экспериментальные трудности при выделении и его последующих химических

1.3.1 Этерификация β -циклодекстрина некоторыми ароматическими монокарбоновыми кислотами

На данном этапе настоящей работы мы исследовали возможность прямой этерификации β -циклодекстрина **1** свободными ароматическими монокарбоновыми кислотами, представляющими фармакологический интерес: бензойной **39** (модельное соединение), *n*-аминобензойной **40** (витамин В10), никотиновой **41** (витамин РР, витамин В3) и изоникотиновой **42** (антивитамин РР) кислотами; а также производными пропионовой кислоты из группы нестероидных противовоспалительных средств, обладающих болеутоляющим и жаропонижающим действием: 2-(4-изобутилфенил)пропионовой **43** (лекарственное средство препарата Ибупрофен), 2-(3-бензоилфенил)пропионовой **44** (лекарственное средство препарата Кетопрофен) и 2-(6-метоксинафталин-2-ил)пропионовой **45** (лекарственное средство препарата Напроксен) кислотами.

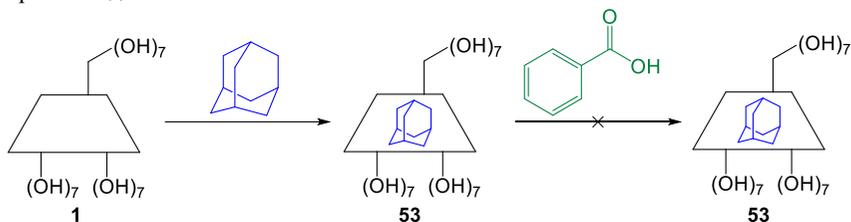
Известно, что лекарственные препараты, имеющие в своем составе кислоты **39–45**, обладают низкой растворимостью в воде, что осложняет их применение и, кроме этого, вызывает местное раздражение слизистой оболочки желудка. Получение конъюгатов с β -циклодекстрином может не только повысить их растворимость, но и улучшить фармакологические свойства при биологических испытаниях.



Этерификацию проводили в растворе ДМФА/бензол с насадкой Дина-Старка при температуре 120–130 °C в течение 3 часов в присутствии каталитических количеств серной кислоты. Оказалось, что в данных условиях даже при использовании 7 мольных эквивалентов указанных кислот образуются только монозамещенные по первичным гидроксильным группам продукты **46–52**, выделенные с выходами 66–89 %.

Монозамещение подтверждали результатами элементного анализа, спектроскопии ЯМР ^1H , а регионаправленность замещения по первичным гидроксильным группам – данными спектроскопии ЯМР ^{13}C . В спектрах ЯМР ^1H соединений **46–52** соотношение интегральных интенсивностей сигналов протонов циклодекстринового каркаса и протонов ароматической части кислоты подтверждает наличие только одного остатка кислоты. В спектрах ЯМР ^{13}C соединений **46–52** присутствуют сигналы ядер незамещенных атомов С-6 при δ 60.4 м. д. и характерные слабopольные минорные сигналы ядер атомов углерода С-6', несущих заместитель OR, при δ 65.3 м. д. При этом появления дополнительных сигналов от ядер С-2 и С-3 не наблюдалось, то есть вторичные гидроксильные группы не затрагивались при этерификации.

Интересно заметить, что попытки более глубокого ацилирования в данных условиях оказались неудачными и приводили лишь к накоплению побочных продуктов в реакционной смеси. Этот факт подтверждает ранее сделанные наблюдения о том, что акту ацилирования предшествует предварительная организация кислоты («гость») в гидрофобную полость циклодекстрина («хозяин»), как это отмечалось и в литературе. Для подтверждения данного явления мы «выключили» полость циклодекстрина, получив прочный комплекс включения с адамантаном **53**. Далее полученное соединение включения **53** вводили в реакцию этерификации с бензойной кислотой **39**. Оказалось, что в данных условиях реакция не протекает: анализируя данные спектроскопии ЯМР ^1H полученного соединения, мы обнаружили, что присутствуют только сигналы протонов циклодекстринового каркаса и адамантана.



Следует отметить, что в синтетической практике для прямой этерификации первичных гидроксильных групп обычно применяют катализаторы, например, дициклогексилкарбодиимид, толуолсульфокислоты и другие. В нашем случае, из-за включения таких катализаторов в полость циклодекстрина, более предпочтительной оказалась этерификация в присутствии каталитических количеств серной кислоты. Важно отметить, что если ранее, в случае использования хлорангидридов монокарбонowych ароматических кислот, мы получали *пер*- и *олиго*ацилированные производные, то этерификация этими же свободными кислотами приводит только к монозамещенным продуктам.

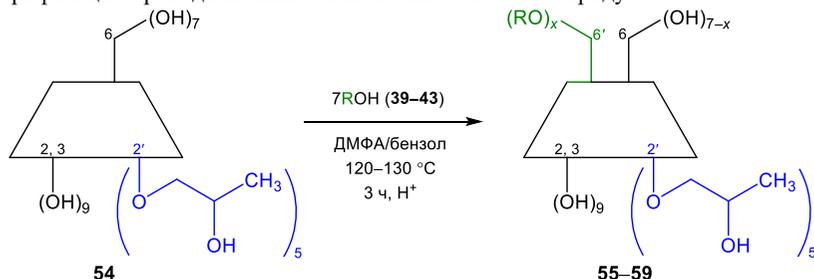
На базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» в моделях асептического воспаления апробировался антифлогистический эффект соединений **51** и **52**. В сравнении с препаратами контроля (кетопрофена и напроксена) у данных конъюгатов наблюдалась наибольшую активность, при этом необходимо учесть, что скорость наступления терапевтического эффекта у синтезированных соединений была выше, чем у препаратов сравнения, что связано, скорее всего, с более высокой биодоступностью изучаемых соединений.

Таким образом, с использованием некоторых фармакологически важных монокарбоновых кислот мы предложили простую методику регионаправленного синтеза производных β -циклодекстрина, содержащих заместители по первичным гидроксильным группам. Ожидается, что такие соединения представляют интерес как потенциальные носители лекарственных средств, в том числе и для точечной доставки действующего средства к цели.

1.3.2 Этерификация 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина рядом ароматических монокарбоновых кислот

Гидроксипропилированные производные β -циклодекстрина, благодаря своей повышенной водорастворимостью и меньшей токсичностью по сравнению с исходным β -циклодекстрином, также нашли широкое применение в фармацевтической практике как молекулы-носители для ряда лекарственных средств. Такие соединения включения типа «гость–хозяин» на основе гидроксипропилированных циклодекстринов позволяют улучшить биодоступность липофильных лекарственных соединений, повысить водорастворимость и защитить их от внешнего нежелательного воздействия.

В развитии этого направления мы исследовали возможность прямой этерификации производного β -циклодекстрина **54**, содержащего 2-гидроксипропильные остатки у вторичных гидроксильных групп (C^2OH) со средней степенью замещения 5, вышеупомянутыми свободными кислотами **39–43**. Этерификацию проводили по той же методике (раздел 1.3.1) в присутствии каталитических количеств серной кислоты. Оказалось, что при использовании 7 мольных эквивалентов указанных кислот образуются замещенные только по первичным гидроксильным группам продукты **55–59** с разной степенью этерификации (x), выделенные с выходами 54–86 %. Попытки более глубокой этерификации приводили лишь к накоплению побочных продуктов.



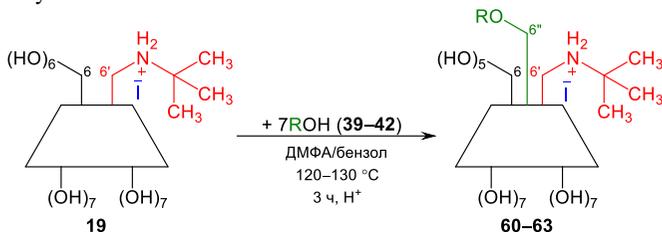
Следует отметить, что продукты **55–59** представляют собой не индивидуальные соединения, а смесь изомеров положения с различным расположением гидроксипропильных остатков (у производного **54**) и OR остатков (у производных **55–59**). Среднюю степень замещения (x) подтверждали данными спектроскопии ЯМР 1H и результатами элементного анализа, а регионаправленность замещения по первичным гидроксильным группам – данными спектроскопии ЯМР ^{13}C .

Таким образом, мы показали, что гидроксипропилированный β -циклодекстрин, обладающий повышенной растворимостью в воде и меньшей токсичностью по сравнению с исходным β -циклодекстрином, может служить основой для получения перспективных для фармакологии конъюгатов с рядом ароматических кислот.

1.3.3 Этерификация монокатионного производного β -циклодекстрина

Как упоминалось выше, конъюгаты циклодекстринов с молекулами лекарственного средства (пролекарства) могут использоваться для точечной доставки лекарств, тогда как катионные производные циклодекстринов могут повышать их способность проникать через биологические барьеры, встраиваться в биологические мембраны, а также служить в качестве переносчиков при доставке («векторизации») ДНК при генной терапии.

Поэтому следующим этапом нашей работы было исследование возможности прямой этерификации монокатионного производного β -циклодекстрина **19** рядом вышеупомянутых кислот **39–42**.



Этерификацию проводили по той же методике, что и для незамещенного β -циклодекстрина. Оказалось, что и в этом случае даже при использовании 7 мольных эквивалентов указанных кислот образуются только моноэтерифицированные по первичным гидроксильным группам продукты **60–63**, выделенные с выходами 43–88 %.

Моноэтерификацию подтверждали данными спектроскопии ЯМР ^1H , а региональность замещения по первичным гидроксильным группам – данными спектроскопии ЯМР ^{13}C . В спектрах ЯМР ^{13}C соединений **60–63** присутствуют сигналы ядер незамещенных атомов C-6 при δ 60.4 м. д., характерные сильнополюсные минорные сигналы ядер атомов углерода C-6', несущих заместитель N^+ , при δ 41.7 м. д. и характерные слабополюсные минорные сигналы ядер атомов углерода C-6'', несущих заместитель OR, при δ 65.3 м. д. При этом появления дополнительных сигналов от ядер атомов углеродов C-2 и C-3 не наблюдалось, то есть вторичные гидроксильные группы не затрагивались при этерификации. Кроме того, состав полученных соединений **60–63** был подтвержден результатами элементного анализа.

Таким образом, на примере бензойной, *n*-аминобензойной, никотиновой и изоникотиновой кислот мы предложили новые и простые методики регионарного синтеза наноразмерных катионных производных β -циклодекстрина, содержащих остатки фармакологически важных кислот по первичным гидроксильным группам. Ожидается, что такие соединения представляют интерес для медицинских и биологических исследований в разных направлениях.

На базе ДВФУ конъюгаты β -циклодекстрина с никотиновой **48** и изоникотиновой **49** кислотами, а также конъюгаты монокатионного производного β -циклодекстрина с *p*-аминобензойной **61**, никотиновой **62** и изоникотиновой **63** кислотами апробировались на предмет актопротекторной активности в модели холодового стресса у лабораторных крыс. Для оценивания стрессозащитных свойств используемых соединений проводился анализ антиоксидантной системы по

количественному содержанию таких показателей, как диеновые конъюгаты, гидроперекиси липидов и малоновый диальдегид. Стрессопротекторный эффект (в модели холодного стресса) в наибольшей степени проявили соединения **49**, **62** и **63**. Соединения **48** и **61** также проявляли данное свойство, но без достоверно значимой разницы.

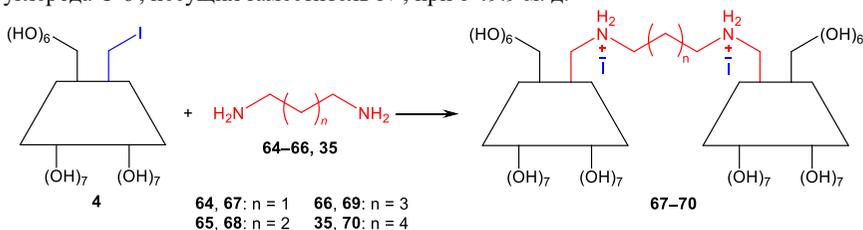
1.4 Синтез димерных производных β -циклодекстрина

По сравнению с природными и монозамещенными циклодекстринами, мостиковые бис-циклодекстрины в ряде случаев демонстрируют более высокую связывающую способность и молекулярную селективность из-за взаимного связывания двумя смежными близко расположенными циклодекстриновыми полостями. Благодаря этому свойству они могут использоваться в различных областях науки, например, как модель системы, имитирующей взаимодействие субстрат–фермент.

1.4.1 Синтез бис- β -циклодекстринов на основе алкилендиаминов

На данном этапе нашей работы мы исследовали возможность синтеза димерных производных β -циклодекстрина. Для этого, как и в случае с монокатионными производными, галогенпроизводное **4** алкилировало диамины **64–66** и **35** с разным числом метиленовых звеньев с образованием ряда катионных аминиевых димерных производных **67–70**, соответственно.

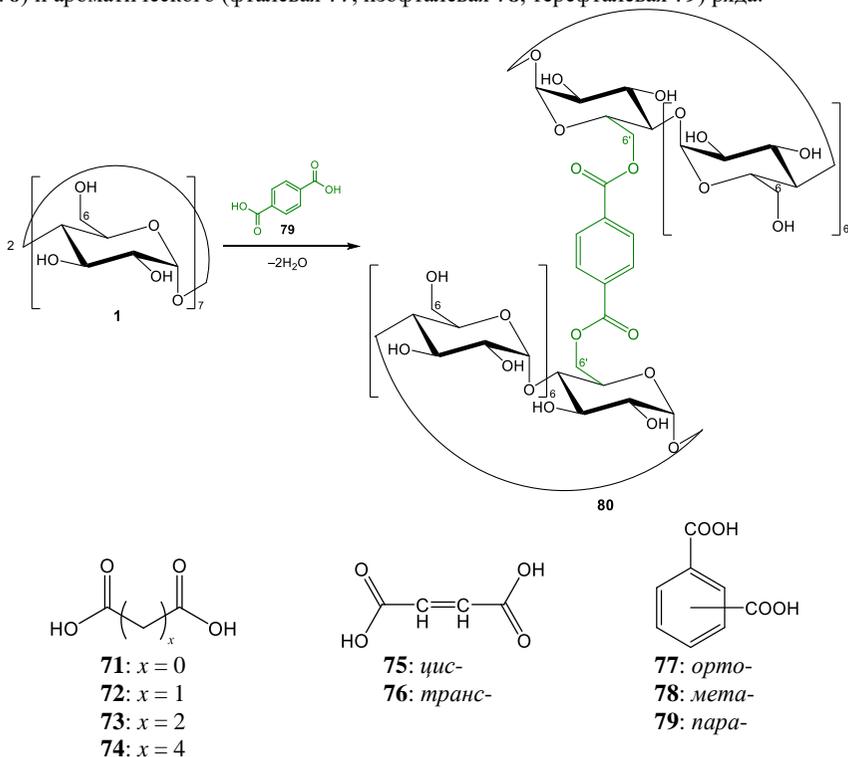
Синтез проводили в растворе ДМФА при температуре 120–130 °С в течение 40 часов. Таким образом с выходами 66–91 % получены димерные производные **67–70**, содержащие положительный заряд на стороне первичных гидроксильных групп циклодекстринового каркаса. Строение полученных соединений **67–70** подтверждали данными спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C и элементного анализа. В спектрах ЯМР ^{13}C соединений **67–70** присутствуют сигналы ядер незамещенных атомов С-6 при 60.4 м. д., характерные сильнополюсные минорные сигналы ядер углерода С-6', несущих заместитель N^+ , при δ 49.9 м. д.



Полученные димерные производные представляют интерес как потенциальные носители (соединения включения и конъюгаты) лекарственных средств для фармакологических исследований в разных направлениях. Ранее мы показали, что аналогичный димерный комплекс по сравнению с мономерным обладает повышенным синергическим эффектом в отношении включения «гостей» в свою циклодекстриновую полость, что, может способствовать более эффективной и точечной доставке лекарственного средства. Проведенное исследование открывает новые возможности для получения комплексов димерных β -циклодекстринов с важными фармацевтическими препаратами.

1.4.2 Получение димерных производных этерификацией β -циклодекстрина

С учетом наших данных по прямой этерификации β -циклодекстрина (см. раздел 1.3.1), мы рассмотрели возможности этой реакции для синтеза димерных производных. В качестве «мостиков» для связывания двух остатков β -циклодекстрина были выбраны дикарбоновые кислоты алифатического (щавелевая **71**, малоновая **72**, янтарная **73**, адипиновая **74**, малеиновая **75**, фумаровая **76**) и ароматического (фталевая **77**, изофталевая **78**, терефталевая **79**) ряда.



Этерификацию проводили по той же методике, что и в предыдущем случае (см. раздел 1.3.1). Оказалось, что в ходе проведенных исследований успешно синтез прошел только с терефталевой кислотой **79**. В результате было получено димерное производное **80** с выходом 78 %, где в качестве мостика выступает остаток терефталевой кислоты. Строение полученного соединения **80** подтверждали данными спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C и элементного анализа.

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C всех синтезированных конъюгатов дополнительно подтверждали анализом спектров двумерной спектроскопии ЯМР НОМОСОР $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ и НЕТСОР $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ и съемкой в режиме DEPT. Положения гидроксильных протонов уточняли по значительному смещению сигнала (на 0.3–0.8 м. д.) при регистрации спектра раствора того же образца при повышенной температуре (80 °С).

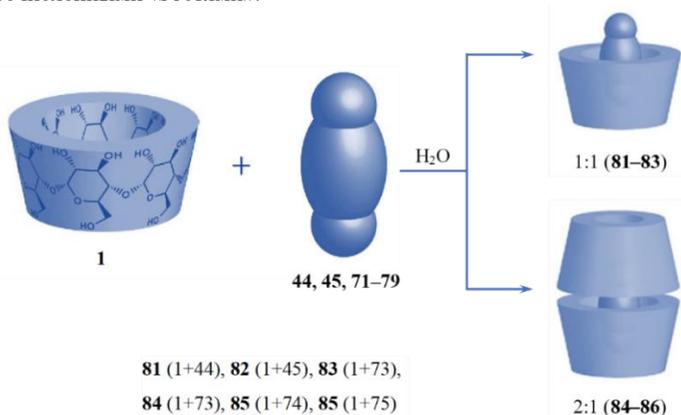
1.5 Соединения включения β -циклодекстрина с некоторыми моно- и дикарбоновыми кислотами

Благодаря способности к инкапсулированию гидрофобных веществ β -циклодекстрин нашел важное применение в фармакологии как «контейнер» лекарственных соединений, что, помимо защиты включенного «гостя» от биоразложения и повышения водорастворимости, в ряде случаев способствует эффективной и избирательной доставке лекарства в нужное место (targeting site delivery). Устойчивость комплексов включения зависит от размера и гидрофобности «гостя», природы среды, температуры и других факторов.

Ранее мы предложили практические пути получения стабильных при хранении и последующем использовании соединений включения циклодекстринов с некоторыми ароматическими монокарбоновыми кислотами, дигидроксифенолами различного строения, содержащими как конденсированные ароматические ядра с разной ориентацией гидроксильных групп, так и бисфенолы, связанные мостиковой связью разной длины и природы, и определили влияние размера полости, природы растворителя, характера и количества заместителей на циклодекстриновом каркасе на возможность выделения из раствора комплексов в индивидуальном виде.

В связи со сказанным, мы рассмотрели возможность образования *стабильных* (выделяемых и устойчивых при длительном хранении в нормальных условиях) комплексов включения β -циклодекстрина **1** с вышеупомянутыми лекарственными соединениями **44**, **45** а также представляющими фармакологический интерес дикарбоновыми кислотами **71–79**.

Особенностью выбранных соединений является их гидрофобная (алифатическая или ароматическая) центральная часть, содержащая на краях молекулы гидрофильные карбоксильные группы. Известно, что по своей природе циклодекстрины гидрофобны внутри и гидрофильны по «краям», что должно способствовать образованию прочных комплексов включения с вышеперечисленными «гостями».



Соединения включения получали путем совместного растворения β -циклодекстрина **1** и соответствующего стехиометрического количества «гостя» **44**, **45**, **71–79** в воде при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующим медленным охлаждением до $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Следует иметь в виду, что в растворе возможно существование и лабильных комплексов включения, то есть находящихся в равновесии с исходными

соединениями. Однако, нас интересовала возможность образования стабильных в индивидуальном виде соединений включения.

Оказалось, β -циклодекстрин **1** в данных условиях образует, соответственно, комплексы включения **81**, **82** состава 1:1 как с кетопрофеном **44**, так и с напроксеном **45**, независимо от исходного стехиометрического соотношения реагентов.

С предельными дикарбоновыми кислотами β -циклодекстрин **1** в данных условиях ведет себя по-разному. Так, щавелевая **71** и малоновая **72** кислоты не образуют в данных условиях стабильные соединения включения. Янтарная кислота **73**, имеющая более длинную углеводородную цепочку между карбоксильными группами, вступает в реакцию комплексообразования с циклодекстрином: при соотношении реагентов 1:1 образуется комплекс **83** состава 1:1, а при соотношении реагентов 2:1 выпадает комплекс **84** состава 2:1. С адипиновой кислотой **74** в данных условиях, независимо от стехиометрического соотношения реагентов, образуется комплекс включения **85** состава 2:1.

Для рассмотрения влияния пространственной организации молекулы «гостя» на возможность образования соединений включения с β -циклодекстрином мы выбрали два изомера: малеиновую кислоту **75**, имеющую *цис*-строение, и фумаровую кислоту **76**, имеющую *транс*-строение. Оказалось, что только малеиновая кислота **75** образует комплекс включения **86** состава 2:1. Таким образом, пространственное строение «гостя» оказывает существенное влияние на возможность образования выделяемого комплекса.

Ароматические дикарбоновые кислоты **77–79** в данных условиях независимо от стехиометрического соотношения реагентов не образуют устойчивые комплексы включения, которые можно выделить в индивидуальном виде, хотя в растворе они, возможно, и существуют.

Индивидуальность и состав предполагаемых комплексов проверяли методом ТСХ (таблица 1) и на основе данных спектроскопии ЯМР ^1H , сопоставляя интегральные интенсивности сигналов протонов циклодекстринового остова в области 3.10–3.75 м. д. и включенного соединения.

Таблица 1 – Выход, температура плавления (разложения) и хроматографическая подвижность полученных комплексов включений **81–86** в сравнении с индивидуальными «гостями» **44**, **45**, **73–75**

Номер соединения	Номер гостя	Тип комплекса (CD : гость)	Выход, %	Температура плавления (разложения), °С		R_f^*	
				кислоты	комплекса	кислоты	комплекса
81	44	1:1	35	95	254–256	0.86	0.63
82	45	1:1	40	154	252–254	0.87	0.64
83	73	1:1	52	184	235–237	0.82	0.58
84	73	2:1	54	184	240–242	0.82	0.41
85	74	2:1	45	152	228–230	0.80	0.61
86	75	2:1	49	135	230–232	0.78	0.60

*элюент: хлороформ–метанол, 3:2 (Silufol UV-254)

Проведенное исследование открывает пути практического получения стабильных комплексов включения β -циклодекстрина с «гостями» различной природы.

На базе ДВФУ проводились фармакологические испытания комплексов включений циклодекстрина с кетопрофеном **81** и янтарной кислотой **84**. В моделях асептического воспаления апробировался антифлогистический эффект комплекса включения **81**, пояду с конъюгатами **51** и **52**. И в данном случае в сравнении с препаратом – кетопрофена – у комплекса **81** наблюдалась наибольшая активность, при этом необходимо учесть, что скорость наступления терапевтического эффекта у этого соединения была также выше, чем у препарата сравнения, что связано, скорее всего, с наиболее высокой биодоступностью изучаемых соединений. Комплекс включения **84** оказывает влияние преимущественно на когнитивную сферу поведенческой активности и в меньшей степени влияет на мотивационно-энергетические показатели, в дозе 10 мг/кг достоверно изменяет показатели когнитивной сферы (преимущественно) в универсальной проблемной камере у лабораторных животных, оказывая ноотропное воздействие; в ряду веществ сравнения по степени влияния на когнитивную сферу эффект комплекс включения **84** приближен к аналогичному у вещества Mexidol, но потенциально активизирует механизмы декларативной памяти у лабораторных животных в эксперименте.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны эффективные синтетические подходы для получения регионаправленно замещенных по первичным гидроксильным группам производных β -циклодекстринов (конъюгатов) как потенциальных носителей ряда лекарственных средств и предложены практические пути синтеза комплексов включения типа «гость–хозяин» с «гостями» различной природы, представляющих фармакологический интерес.

2. Разработаны эффективные пути синтеза наноразмерных катионных производных β -циклодекстрина, представляющих интерес как потенциальные носители (соединения включения и конъюгаты) лекарственных средств для фармакологических исследований в разных направлениях.

3. Подобраны оптимальные условия для синтеза альдегида β -циклодекстрина как одного из наиболее подходящих интермедиатов для последующего синтеза на его основе новых функционально замещенных производных.

4. Найдено, что моноэтерификация β -циклодекстрина определяется влиянием циклодекстриновой полости, то есть акту ацилирования предшествует предварительная организация кислоты («гостя») в гидрофобную полость циклодекстрина («хозяин»).

5. Получены мостиковые производные β -циклодекстрина различной природы для изучения синтеза конъюгатов и соединений включения на их основе.

6. Рассмотрено влияние длины углеводородного радикала, а также пространственного строения молекулы «гостя» на возможность образования соединений включения с β -циклодекстрином.

7. Результаты фармакологических испытаний ряда синтезированных соединений (комплексов включения и конъюгатов) показали перспективность дальнейшего развития этого направления.

Основное содержание работы отражено в следующих публикациях:

Статьи:

1. Г.И. Курочкина, Д.А. Шипилов, Т.Н. Попкова, Т.А. Баталова, М.К. Грачев. Комплексы включения β -циклодекстрина с некоторыми дикарбоновыми кислотами // Журнал органической химии. — 2015. — Т. 51. — Вып. 7. — С. 939–941. [G.I. Kurochkina, D.A. Shipilov, T.N. Popkova, T.A. Batalova, M.K. Grachev. Inclusion complexes of β -cyclodextrin with some dicarboxylic acids // Russian Journal of Organic Chemistry. — 2015. — Vol. 51. — No. 7. — P. 918–919. — DOI: 10.1134/S1070428015070040].
2. Д.А. Шипилов, Г.И. Курочкина, И.И. Левина, М.К. Грачев. Этерификация 2-гидроксипропильного производного β -циклодекстрина некоторыми ароматическими монокарбоновыми кислотами // Журнал органической химии. — 2015. — Т. 51. — Вып. 10. — С. 1426–1429. [D.A. Shipilov, G.I. Kurochkina, I.I. Levina, M.K. Grachev. Esterification of 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin derivative with some aromatic monocarboxylic acids // Russian Journal of Organic Chemistry. — 2015. — Vol. 51. — No. 10. — P. 1395–1397. — DOI: 10.1134/S1070428015100061].
3. Д.А. Шипилов, Г.И. Курочкина, Е.Н. Расадкина, Л.К. Васянина, Н.О. Соболева, М.К. Грачев. Прямая этерификация первичных гидроксильных групп β -циклодекстрина некоторыми ароматическими монокарбоновыми кислотами // Журнал общей химии. — 2015. — Т. 85. — Вып. 11. — С. 1864–1867. [D.A. Shipilov, G.I. Kurochkina, E.N. Rasadkina, L.K. Vasyanina, N.O. Soboleva, M.K. Grachev. The direct esterification of β -cyclodextrin primary hydroxyl groups with some aromatic monocarboxylic acids // Russian Journal of General Chemistry. — 2015. — Vol. 85. — No. 11. — P. 2605–2608. — DOI: 10.1134/S107036321511016X].
4. А.А. Сергиевич, В.Ю. Анан'ев, Д.А. Шипилов, Г.И. Курочкина, М.К. Грачев, Т.А. Баталова, Р.Р. Хорoshikh, У.С. Гафуров, К.С. Голхваст. Нootropic effect peculiarities of β -cyclodextrin clathrate with succinic acid in experiment // Der Pharmacia Lettre. — 2016. — Vol. 8. — No. 7. — P. 40–45.
5. В.В. Кодинцев, И.Е. Памирsky, А.А. Сергиевич, Т.А. Баталова, М.К. Грачев, Г.И. Курочкина, Д.А. Шипилов, Р.Р. Хорoshikh, К.С. Голхваст. The antioxidant effect of β -cyclodextrin nano-sized inclusion compound (clathrate) with benzoic acid in vitro // Der Pharmacia Lettre. — 2016. — Vol. 8. — No. 19. — P. 400–403.
6. М.А. Маленковская, Д.А. Шипилов, Л.К. Васянина, М.К. Грачев. Синтез 6-моноальдегида β -циклодекстрина и иминопроизводных на его основе // Журнал общей химии. — 2016. — Т. 86. — Вып. 12. — С. 2093–2095. [M.A. Malenkovskaya, D.A. Shipilov, L.K. Vasyanina, M.K. Grachev. Synthesis of 6-monoaldehyde of β -cyclodextrin and imino derivatives on its basis // Russian Journal of General Chemistry. — 2016. — Vol. 86. — No. 12. — P. 2725–2727. — DOI: 10.1134/S107036321511016X].
7. Д.А. Шипилов, Г.И. Курочкина, И.И. Левина, М.А. Маленковская, М.К. Грачев. Синтез монокатионных производных β -циклодекстрина // Журнал органической химии. — 2017. — Т. 53. — Вып. 2. — С. 290–294. [D.A. Shipilov, G.I. Kurochkina, I.I. Levina, M.A. Malenkovskaya, M.K. Grachev. Synthesis of monocationic β -cyclodextrin derivatives // Russian Journal of Organic Chemistry. — 2017. — Vol. 53. — No. 2. — P. 290–295. — DOI: 10.1134/S1070428017020257].
8. Д.А. Шипилов, Г.И. Курочкина, А.А. Сергиевич, М.К. Грачев. Synthesis of nanosized monocationic β -cyclodextrin conjugates containing residues of pharmacologically important acids // Macroheterocycles. — 2017. — Vol. 10. — No. 2. — P. 238–242. — DOI: 10.6060/mhc170510s.

Тезисы докладов конференций:

1. Д.А. Шипилов, Г.И. Курочкина, Т.Н. Попкова, М.К. Грачев. Прямая этерификация β -циклодекстрина некоторыми фармакологически важными кислотами. // Всероссийская молодежная конференция-школа с международным участием «Достижения и проблемы современной химии»: тезисы докладов конференции. — Санкт-Петербург, 10–13 ноября 2014 г.

2. Д.А. Шипилов, Г.И. Курочкина, И.И. Левина, М.К. Грачев. Новые типы конъюгатов оксипропилированного β -циклодекстрина с некоторыми фармакологически важными кислотами // Сборник тезисов IV Всероссийской конференции по органической химии и XVII молодежной школы-конференции по органической химии. — Москва, 22–27 ноября 2015 г. — С. 290

3. Д.А. Шипилов, Г.И. Курочкина, А.А. Сергиевич, М.К. Грачев. Катионные производные бета-циклодекстрина // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тезисы докладов в 5 томах. — Уральское отделение Российской академии наук, 26–30 сентября 2016 г. — С. 576.

4. D.A. Shipilov, G.A. Tarverdyan, G.I. Kurochkina, M.K. Grachev. Esterification of monocationic β -cyclodextrin derivatives // XVIth International Seminar of Inclusion Compounds and IIIrd Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry: abstracts of paper. — Kazan, June 26–30, 2017. — P. 86.

5. D.A. Shipilov, I.A. Goryainova, G.I. Kurochkina, M.K. Grachev. Synthesis of β -cyclodextrin dimer derivatives // XVIth International Seminar of Inclusion Compounds and IIIrd Youth School on Supramolecular and Coordination Chemistry: abstracts of paper. — Kazan, June 26–30, 2017. — P. 159.

6. E. Chibunova, R. Kumeev, I. Terekhova, D.A. Shipilov, G.I. Kurochkina, M.K. Grachev. Complex formation of methotrexate with monomeric and dimeric β -cyclodextrins: 1H NMR study // 27th International Chugaev Conference on Coordination Chemistry 4th Conference-School for Young Researchers “Physicochemical Methods in Coordination Chemistry”: abstracts of paper. — N. Novgorod, October 2–6, 2017. – P223.