

На правах рукописи

КОЖИХОВА Ксения Вадимовна

**СИНТЕЗ НОВЫХ НОСИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ
НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И ФОСФОЛИПИДОВ**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2018

Работа выполнена на кафедре технологии органического синтеза Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

Научный руководитель – доктор химических наук,
Миронов Максим Анатольевич

Официальные оппоненты: **Красавин Михаил Юрьевич**,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», заведующий лабораторией химической фармакологии;

Федорова Ольга Васильевна,
кандидат химических наук, ФГБУН Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, старший научный сотрудник лаборатории гетероциклических соединений

Ведущая организация – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва

Защита состоится «03» декабря 2018 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.285.08 на базе ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», <http://lib.urfu.ru/mod/data/view.php?id=51&rid=285341>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Поспелова Татьяна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Полисахариды и фосфолипидные структуры активно исследуются в качестве потенциальных носителей лекарственных веществ, благодаря их природному средству к биологическим тканям и способности регулировать фармакокинетические показатели препарата. Современные подходы по стабилизации лекарственных носителей гидрофильными синтетическими полимерами и модификации моноклональными антителами приводят к значительной себестоимости препарата и вероятности развития иммунного ответа. Поэтому актуальность разработки новых способов модификации и нацеливания современных терапевтических систем, имеющих практический потенциал, непрерывно возрастает с ростом стандартов фармакотерапии. В решении обозначенной задачи инструменты органической химии приобретают новую значимость, позволяя приблизить реализацию идеального подхода к лечению заболеваний.

В настоящее время одно из основных направлений развития органической химии заключается в усложнении получаемых структур с использованием одностадийных стратегий. В этом контексте многокомпонентные реакции и методы динамической комбинаторной химии имеют огромный потенциал в синтезе новых биосовместимых биологически активных систем. Проведение таких реакций модификации в водной среде способствует самоорганизации процесса и сборке структур, похожих на природные объекты. Применение полимерных цепей в качестве основы для синтеза открывает еще более широкие возможности для получения носителей адресной доставки лекарственных средств. Реакция Уги позволяет синтезировать продукты с биоразрушаемыми пептидоподобными связями из неаминокислотных исходных реагентов, при этом ускорение данной реакции в водной среде делает выполнимой перекрестную шивку водорастворимых полимеров с высокой эффективностью. Возможность использования обширного набора исходных соединений многокомпонентной смеси обеспечивает значительную вариативность поверхности, определяя биологическое нацеливание.

Современная методология динамической комбинаторной химии представляет еще более комплексный подход к синтезу соединений, обладающих селективностью к биологическим мишеням. Основу данного направления составляют самоорганизующиеся системы, образующиеся в результате обратимого связывания разнообразных строительных блоков под термодинамическим контролем. Такие системы обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционным химическим синтезом, среди них: одновременный синтез целой библиотеки химических соединений различной уровневой организации и отбор наиболее эффективной структуры, в зависимости от целей скрининга.

В настоящем исследовании два развивающихся направления органической химии (многокомпонентные реакции и динамическая комбинаторная химия) использованы для решения современных задач медицинской химии и фармакологии, заключающихся в разработке стабильных, биосовместимых, обладающих тканевой селективностью терапевтических систем адресной доставки.

Степень разработанности темы исследования

Анализ современных литературных данных продемонстрировал, что носители лекарственных средств на основе полисахаридов и фосфолипидов представляют огромный интерес, но, несмотря на обилие работ, возможности химической модификации, настройки поверхности и синтеза комплексных систем с проведением реакций в гетерогенных системах не были раскрыты в полном объеме. При этом синтез нано- и микроразмерных лекарственных носителей с помощью многокомпонентных реакций и подходов динамической комбинаторной химии до данной работы известен не был. Вышеописанные положения определяют актуальность настоящего исследования, как с точки зрения развития новых подходов и областей применения органической химии, так и с позиции разработки лекарственных форм нового поколения.

Цель и задачи работы

Целью данной работы является синтез комплексных терапевтических систем на основе полисахаридов и фосфолипидов, обладающих настраиваемыми физико-химическими, поверхностными и биологическими свойствами, с использованием вариаций многокомпонентной реакции Уги и подходов динамической комбинаторной химии.

Для реализации поставленной цели были сформулированы ключевые **задачи исследования**:

- получить монодисперсную липосомальную основу с размерами менее 200 нм за счет синтеза стабилизирующих компонентов липосом, влияющих на заряд и реологические свойства фосфолипидного бислоя, и отработки оптимальных технологических параметров получения липосомальных суспензий;
- синтезировать амидные производные полисахаридов: полигалактуронилгидразидов и положительно-заряженных производных пектина с четвертичной аммониевой группой;
- отработать методологию синтеза водорастворимых и амфифильных производных хитозана с помощью реакции Уги;
- синтезировать сшитые полисахаридные микрогели на основе бифункционального полигалактуронилгидразида;
- синтезировать, разработать методы анализа и стабилизировать полисахаридные динамические комбинаторные библиотеки, обладающие повышенным сродством к низкомолекулярным биологическим мишеням;
- отработать методологии нагрузки терапевтических систем активными фармацевтическими ингредиентами;
- синтезировать комплексные системы адресной доставки с помощью двух способов: поверхностной постмодификации липосомального носителя путем встраивания гидрофобных радикалов производных полисахарида и ковалентной сшивки полисахаридной микрокапсулы на поверхности липосомальных частиц;
- изучить биосовместимость и биологические свойства носителей, включая анализ мукоадгезивных свойств, исследование цитотоксичности и изучение сродства к тканям в ходе биологического распределения.

Научная новизна

Разработан новый метод синтеза полисахаридных микрогелей с применением сшивки бифункционального полигалактуронилгидразида с помощью четырехкомпонентной реакции Уги.

Показано, что использование подхода динамической комбинаторной химии для синтеза динамических библиотек на основе полигалактуронилгидразонов позволяет получить полимеры, обладающие высокой селективностью связывания замещенных аминокислот.

Впервые осуществлена модификация липосомальных носителей производными хитозана и пектина, полученных с помощью реакции Уги.

Проведен синтез полимерных микрокапсул на поверхности сформированных липидных везикул, показана возможность получения композитных липосом с размерами 175-220 нм и низкой полидисперсностью.

Разработан метод получения липосом с хорошими мукоадгезивными свойствами с использованием производных полигалактуронилгидразида.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан общий подход к синтезу субмикронных носителей лекарственных средств на основе фосфолипидов, пектина и хитозана с использованием методологии многокомпонентной реакции Уги.

В результате исследования предложена мукоадгезивная лекарственная форма для интраназальной доставки противовирусного препарата Триазавирин.

Предложена лекарственная форма для трансбуккальной доставки модельного локального анестетика, обладающая биосовместимостью и мукоадгезивностью.

Разработан новый метод стабилизации липосом, получены образцы липосом стабильные в течение 9 мес.

Методология и методы исследования. В процессе работы использовались стандартные методы органического синтеза. Выделение и очистка продуктов проводилась переосаждением, диализом и гель-фильтрацией. Для подтверждения структуры полученных в результате синтеза соединений использовались современные методы физико-химического анализа: ИК- и ЯМР-спектроскопии. Контроль протекания реакции и определение чистоты полученных веществ осуществляли с помощью качественных реакций на исходные продукты и тонкослойной хроматографией. Анализ физико-химических параметров высокомолекулярных производных проводили методами динамического рассеивания, рН-метрии и измерения динамической вязкости. Безопасность и средство к тканям оценивалось рядом *in vitro* и *in vivo* методов, включающих МТТ-тест, оценку мукоадгезивных свойств и биораспределение.

Положения и результаты, выносимые на защиту:

- синтез и оптимизация липосомальных носителей;
- синтез производных хитозана с помощью реакции Уги;
- синтез амидных производных пектина;
- синтез шитых микрогелей на основе полигалактуронилгидразида;

- синтез динамических комбинаторных библиотек на полисахаридном скелете;
- получение комплексных полисахарид-липосомальных систем;
- нагрузка лекарственных форм модельными АФИ и высвобождение;
- изучение биологических свойств полученных носителей.

Достоверность полученных результатов. Структура, чистота и физико-химические параметры были подтверждены с использованием современных валидированных методов анализа, испытания проводились не менее чем в трех параллелях с последующей статистической обработкой ($p = 0,05$).

Личный вклад автора состоит в сборе, анализе и обобщении имеющихся литературных данных по способам химической модификации и адресного нацеливания лекарственных носителей на основе фосфолипидов и полисахаридов, изучении возможностей получения биосовместимых продуктов с помощью многокомпонентных реакций и подходов динамической комбинаторной химии, в формулировании научных гипотез и их проверки в результате проведения химических и биологических экспериментов, обработке, анализе и обобщению полученных спектральных данных и результатов исследований. Автором была выполнена подготовка результатов научной работы к публикации и осуществлена презентация полученных данных на всероссийских и международных конференциях.

Публикации. Результаты работы опубликованы в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК; 3 тезисах докладов, входящих в международные базы цитирования; 1 главе монографии и 16 других сборниках тезисов докладов.

Структура и объем работы. Материал диссертации изложен на 153 страницах и включает 20 схем, 17 таблиц, 47 рисунков. Работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части и списка литературы из 159 наименований.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены в виде стендовых и устных докладов на 6-ой Международной конференции по наноматериалам «NANOCON 2014» (Брно, Чешская республика, 5-7 ноября 2014 г.), XXV Российской молодежной научной конференции, посвященной 95-летию основания Уральского университета (Екатеринбург, 22-24 апреля 2015 г.), III Международной конференции «Химия в Федеральных Университетах» (Екатеринбург, 1-4 ноября 2015 г.), I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 25-28 ноября 2015 г.), Зимней конференции молодых ученых по органической химии «WSOC2016» (Красновидово, 16-21 января 2016 г.), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 26-30 сентября 2016 г.), Первом Русско-Немецком междисциплинарном симпозиуме «Nanoscale interdisciplinary research: physics, chemistry, biology, mathematics» (Москва, 25-27 апреля 2017 г.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В литературном обзоре (Глава 1) рассмотрены методы поверхностной полимерной модификации липосомальных носителей как форм доставки лекарственных средств, в рамках темы рассмотрены способы синтеза моно- и гетерополимеров, химической модификации полисахаридов и современные синтетические подходы получения комплексных полимерно-липосомальных систем.

Глава 2. Обсуждение результатов

Во введении обсуждены основные преимущества и недостатки липосомальных и полисахаридных носителей, способы решения этих проблем и подходы модификации, обосновано дальнейшее исследование по разработке синтеза комплексных полисахарид-липосомальных систем, способных обеспечивать контролируемую доставку АФИ, обладающих стабильностью и возможностью настройки поверхности.

2.1. Синтез липосомальных носителей

2.1.1. Оптимизация состава липидной композиции и методики получения монодисперсных липосом

Для синтеза комплексных покрытых носителей необходимо было получить устойчивую универсальную липосомальную основу, обладающую мономодальным распределением по размерам и средним диаметром менее 200 нм. Так как характеристики получаемых частиц определяются составом липидной композиции и технологическими параметрами процесса экструзии, проведено исследование влияния указанных показателей на физико-химические характеристики липосомальных суспензий.

Сравнительное изучение технологических параметров экструзии при использовании ультрафильтрационных мембран из различных материалов (Anotop 200 нм из оксида алюминия, трековые поликарбонатные мембраны Nucleopore 200 нм и поливинилфторидные мембраны Whatman PVDF 220 нм), продемонстрировало преимущество неорганических мембран по показателям распределения частиц по размерам. Оптимальным процессом формирования липосом стала двукратная экструзия через неорганические мембраны с размером пор 200 нм и 100 нм последовательно. В ходе работы эмпирически был подобран раствор для процесса гидратации, а именно стандартный фосфатный буфер ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0,1 м, рН 6,86).

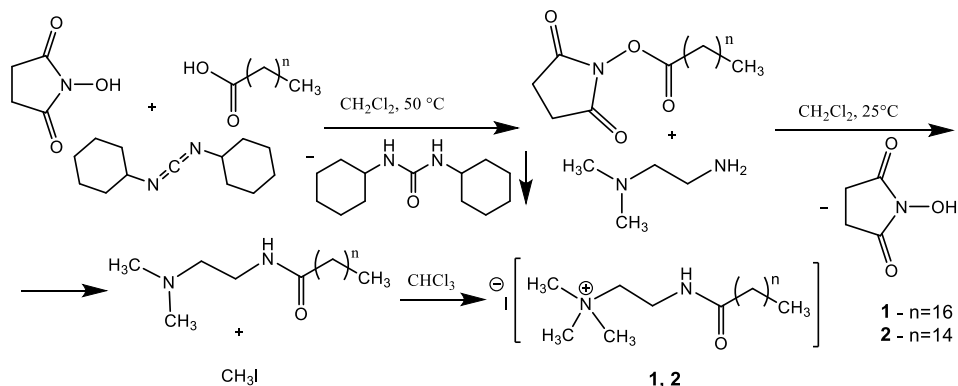
Типовая липидная композиция, состоящая из фосфатидилхолина, холестерина и цетилпиридиний хлорида (83:15:2), была усовершенствована для достижения необходимых характеристик частиц. Общие закономерности, полученные в результате испытаний различных химических составов, следующие. Уменьшение количества зарядобразующего цетилпиридиний хлорида с 5 до 1 % приводит к снижению среднего диаметра частиц с 260 до 200 нм при изменении характера распределения от бимодального к мономодальному (оптимальный заряд поверхности 35 мВ). Липиды, модифицированные полиэтиленгликолем, кроме стерической стабилизации липосомальных частиц могут изменять кривизну поверхности липидного бислоя за счет характеристик гидрофобных частей молекулы. Наиболее эффективным в снижении размера частиц оказался ПЭГ-7-глицерил кокоат (5 % от композиции), введение

данного компонента позволило получить липосомы размером 155-160 нм (PDI 0,18). Несмотря на хорошие показатели, полученная композиция требовала дальнейшей доработки.

2.1.2. Синтез вспомогательных липидных компонентов

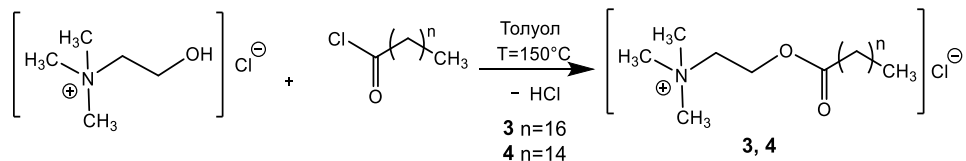
Известно, что цетилпиридиний хлорид обладает цитотоксическими свойствами, поэтому осуществлена его замена на биосовместимые амфифильные заряженные четвертичные аммониевые соединения. Сначала были синтезированы амидные производные: йодиды стеариламида *N,N,N*-тримилэтанаммония **1** и пальмитоиламида *N,N,N*-тримилэтанаммония **2** методом активации карбоксильной группы жирных кислот гидроксисулцинимидом в присутствии циклогексилкарбодимида в реакции с *N,N*-димилэтан-1,2-диамином с последующим избыточным метилированием йодистым метилом (схема 1). Эти компоненты были введены по стандартной методике в липосомы в качестве зарядобразующего компонента (1 %). В результате получились монодисперсные липосомы со средним диаметром 151,8 нм (PDI 0,17) и 136,5 нм (PDI 0,16).

Схема 1



Следующим шагом исследований была оптимизирована методика синтеза холиновых эфиров стеариновой **3** и пальмитиновой **4** кислот с использованием хлорида холина и хлорангидридов жирных кислот в качестве исходных компонентов (схема 2). Реакции проходили с хорошим выходом (82 - 85%). Несмотря на достаточно давние первые публикации по использованию таких компонентов в фармацевтических патентах, для стабилизации липосомальных форм они до настоящей работы не применялись.

Схема 2



Введение полученных соединений в качестве зарядобразующих компонентов в липидный состав привело к липосомам с еще меньшим средним диаметром по сравнению с

условии создания целевого препарата, данной концентрации должно быть достаточно для фармакологического эффекта, имея в виду действующие концентрации в проведенных ранее исследованиях. Разработанный метод обеспечил высокую эффективность загрузки Триазавирина (76-79 %), анализ которой проводили с помощью методов гель-фильтрации и ВЭЖХ. Для полученных липосом с комплексами Триазавирина была проведена оценка размера частиц и индекса полидисперсности. Лучшими значениями обладали липосомы **9** с пальмитоилхолиновым комплексом **8** (154 нм, PDI 0,13). Как и ожидалось, стабильность данных образцов не позволяет рассматривать непокрытые липосомы в качестве окончательной лекарственной формы, что определяет необходимость дальнейшей полимерной модификации.

Таким образом, в ходе данного этапа была отработана технология получения монодисперсных липосом, обладающих необходимыми характеристиками, синтезированы компоненты липидной композиции, позволяющие регулировать стабильность, заряд, кривизну фосфолипидного бислоя, выявлены основные закономерности влияния химического состава липосом на показатели распределения получаемых частиц по размерам и заряду. Результатом этапа стала оптимальная липосомальная композиция **10** (фосфатидилхолин, токоферола ацетат, пальмитоилхолин хлорид **4**, метилпальмитат **5** (89:5:1:5)), для которой средний диаметр частиц, полученных в ходе последовательной двукратной экструзии через неорганические мембраны Anotop 200 и 100 нм, составил 123,4 нм с мономодальным распределением по размеру (PDI 0.16). Подобранный состав обеспечивает возможность поверхностной модификации липосом. Кроме того, был разработан способ загрузки липосомальных носителей с помощью холиновых эфиров жирных кислот, позволяющий включать действующие вещества с высокой эффективностью, что может быть использовано в дальнейшем для разработки лекарственных носителей многих других БАВ.

2.2. Синтез модифицированных полисахаридов

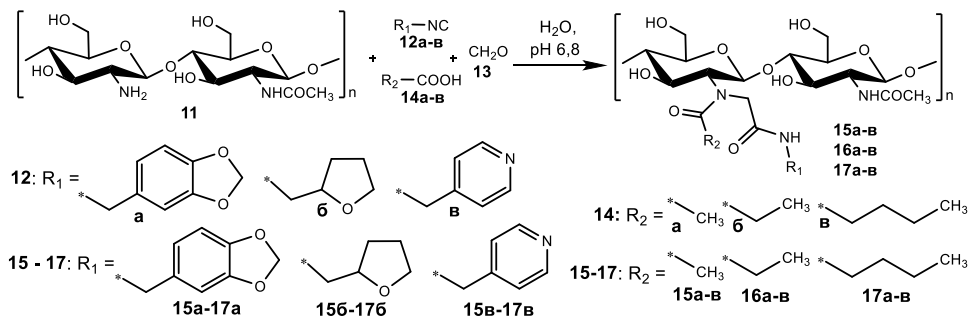
2.2.1. Синтез производных хитозана с помощью реакции Уги

Для стабилизирующего покрытия липосом были синтезированы образцы модифицированного хитозана. Поскольку исходный полимер растворим только в кислых средах, что затрудняет его биофармацевтическое применение, было решено разработать его производные, растворимые в широком диапазоне pH. Хитозан – катионный полисахарид, состоящий из мономеров свободного и N-ацетилированного D-глюкозамина, связанных β -(1-4)-гликозидными связями. Аминогруппы глюкозамина доступны для химических превращений, в том числе и для реакции Уги, что делает полимер удобным объектом модификации. Нами был использован хитозан **11** с молекулярной массой 190 кДа и низкой степенью ацетилирования (5%).

В ходе ряда экспериментов по подбору оптимальных условий, был найден компромисс между растворимостью и реакционной способностью всех компонентов. Наилучшие выходы в результате реакций Уги (схема 4) были получены при pH 6.8-6.9. В этих условиях удалось синтезировать 9 производных хитозана **15a-в**, **16a-в**, **17a-в** с размером частиц 200–600 нм, при этом выходы реакции составляли до 70 % в пересчете на свободные аминогруппы исходного полимера. Эти показатели превышали на порядок выходы, получаемые в геле-

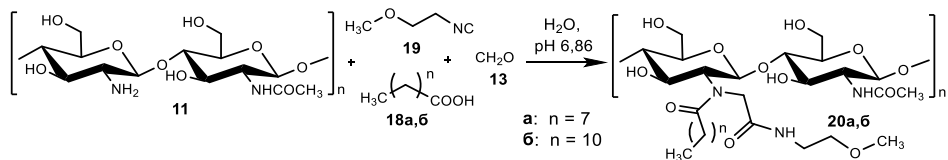
вой фазе и истинном растворе. В качестве исходных реагентов были выбраны три водорастворимых изоцианида **12а-в**, наиболее активный альдегид – формальдегид **13** и низкомолекулярные (С2-С4) карбоновые кислоты **14а-в**: уксусная, пропионовая и валериановая. Реакцию Уги проводили в разбавленном коллоидном растворе хитозана (0,25 масс. %) при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Полученные в результате производные **15-17** были растворимы в широком диапазоне рН (1-10), даже после очистки и переосаждения ацетоном продукты хорошо перерастворялись в водных растворах. Все структуры были доказаны с помощью методов ¹Н ЯМР и ИК спектроскопии. В ИК-спектрах наблюдался рост интенсивности амидных полос поглощения (1668 и 1542 см⁻¹), что подтверждает образование новых амидных связей. Спектры ¹Н ЯМР позволяют рассчитать процент замещения аминогрупп хитозана, благодаря тому, что сигналы протонов полисахарида (3,30–4,85 м.д.) не пересекаются с сигналами протонов ароматического кольца изоцианидов (6,35 – 8,55 м.д.) и алифатических радикалов кислот (2.10 – 2.15 м.д.).

Схема 4



Благодаря известным мукоадгезивным свойствам хитозан был выбран в роли стабилизатора липосом для интраназальной доставки Триазавирина. После отработки методологии реакции Уги, для комплексных систем были синтезированы более гидрофобные производные хитозана **20а,б** с использованием пеларгоновой **18а** и лауриновой **18б** кислот в качестве карбоксильного компонента реакции (схема 5), в качестве изоцианидной составляющей был использован 1-изоциано-2-метокситан **19** с низкой молекулярной массой, чтобы избежать влияния радикалов на нагрузку Триазавирина. По спектрам ЯМР синтезированных продуктов была рассчитана итоговая степень замещения, которая составила 7 мол. % для **20а** и 8,5 мол. % для **20б**.

Схема 5



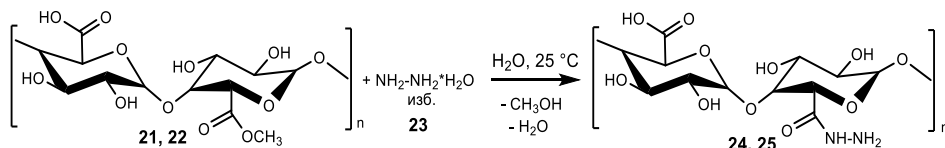
Производные **20** обладали нейтральным зарядом при физиологических pH, хорошей растворимостью в воде в виде коллоидных частиц и превосходными поверхностно-активными свойствами. Разработанный тип производных хитозана может быть использован для стабилизации как отрицательных, так и положительных липидных частиц, потому что длинные гидрофобные цепи способны встраиваться в фосфолипидный бислой вне зависимости от его заряда.

2.2.2. Синтез амидных производных пектина

Пектин представляет собой водорастворимый биodeградируемый анионный полисахарид, содержащий линейную α -(1-4)-D-галактуроновую цепь, частично этерифицированную метоксигруппами. В отличие от хитозана, пектин обладает лучшей биodeградируемостью, растворимостью и противоположным зарядом. В качестве основы для проведения дальнейшей модификации пектина был синтезирован ряд амидных производных полисахарида.

На первом этапе работы была отработана методика синтеза бифункциональных полигалактуронилгидразидов на основе низкоэтерифицированного (39 мол. % метоксигрупп) **21** и высокоэтерифицированного (62 мол. % метоксигрупп) **22** яблочного пектина. После оптимизации реакцию проводили при комнатной температуре с использованием двух типов исходного полисахарида и 1,5-кратным избытком гидразин гидрата **23** из расчета на все мономерные звенья (схема 6). В результате были получены полигалактуронилгидразиды со средней степенью замещения 23 мол. % **24** и 33 мол. % **25**, соответственно.

Схема 6



Полученные полигалактуронилгидразиды были в дальнейшем использованы для синтеза производных, включая микрогели, покрытые липосомальные системы, индивидуальные ацилгидразоны и динамические комбинаторные библиотеки.

Кроме гидразидов на основе пектина были синтезированы и другие амидные производные этого полисахарида. С точки зрения разработки покрытых природными полимерами липосом необходимо было синтезировать положительно заряженные производные пектина. Был проведен синтез *N,N*-диметиламиноэтиленамида полигалактуронової кислоты с дальнейшим метилированием йодистым метилом до *N,N,N*-триметиламмонияэтиленамида полигалактуронової кислоты. Также было проведено избыточное метилирование полигалактуронилгидразидов разной степени замещения йодистым метилом.

Таким образом, продемонстрирована возможность получения различных амидных производных пектина, способных выступать в роли исходных реагентов для синтеза с помощью реакции Уги модифицированной полисахаридной оболочки на поверхности липосом или самостоятельно стабилизировать липосомальные суспензии за счет физического покрытия частиц. Благодаря своей бифункциональности гидразидные производные пектина пред-

ставляют интересный объект для проведения внутри- и межмолекулярной сшивки с целью разработки лекарственных носителей пролонгированного действия.

2.2.3. Синтез производных на основе полигалактуронилгидразида с помощью реакции Уги

Для получения микрогелей на основе полигалактуронилгидразида была использована реакция Уги. Однако в отличие от хитозана, данный модифицированный полисахарид, обладает как карбоксильными, так и гидразидными группами. Это свойство делает возможным проведение ковалентной сшивки между молекулами полимера без применения бифункциональных производных изоцианидов или аминов. Чтобы изучить потенциал, зависимость и ограничения предлагаемой концепции сшивки, в работе варьировались такие параметры, как степень замещения полигалактуронилгидразида **24** и **25**, концентрация исходных реагентов (избыток альдегида), альдегидная и изоцианидная составляющие, расчетная степень сшивки (5-20 мол. %), и проводился анализ физико-химических свойств получаемых продуктов (размера частиц, индекса полидисперсности, итоговой степени замещения).

В результате первых экспериментов вместо образования коллоидного раствора выпал нерастворимый макрогель. Было предположено, что данную систему необходимо структурировать перед перекрестной сшивкой полимерных цепей. Поэтому вместо формальдегида были выбраны алифатические альдегиды с различной длиной цепи (C3-C7), благодаря которым должна происходить предорганизация молекулы полимера с образованием гидрофобного ядра для последующей сшивки. В реакции были использованы изоцианиды, обладающие отличающимися боковыми радикалами для исследования их влияния на свойства носителя. Последовательность реакций и используемые исходные реагенты (альдегиды **26**, изоцианиды **27**) представлены на схеме 7. Синтезированные микрогели **28** и **29** были стабильны в широком диапазоне pH среды (3-9). Структуры полученных соединений были доказаны с помощью ^1H ЯМР и ИК спектроскопии. Для всех сшитых микрогелей после прохождения реакции Уги возрастала интенсивность амидной полосы поглощения при 1642 см^{-1} . Анализ спектров ^1H ЯМР показал, что все основные структурные элементы исходных реагентов были включены в конечный продукт. Так как сигналы протонов остатков галактуроновой кислоты находятся в диапазоне от 3.6 до 5.2 м.д., диапазоны сильного поля и слабого поля позволяют легко идентифицировать сигналы протонов алифатических и ароматических остатков альдегидов и изоцианидов. Итоговые степени замещения (расчетная для всех 15 мол. %) в синтезированных микрогелях отличались в зависимости от используемого изоцианида и альдегида, полученные данные обобщены в табл. 1. Размер частиц продукта реакции фиксировали с помощью спектрометра динамического рассеяния света Photocor compact.

В ходе синтеза первой серии микрогелей **28а-д** был осуществлен выбор оптимальной длины гидрофобной части альдегида. Альдегид **26г** позволяет наилучшим образом свернуть полимер за счет гидрофобных взаимодействий, при этом не препятствуя растворимости и сшивке, поэтому для дальнейших экспериментов данный компонент был выбран в качестве базовой альдегидной составляющей. Чтобы обеспечить химическое разнообразие поверхности, микрогели **29а-з** были получены с использованием различных изоцианидов. Для модификации липосом были отобраны производные со степенью замещения не менее 9

Особенности синтезированных микрогелей существенно зависели от степени замещения, которая определялась расчетным соотношением реагирующих компонентов и их реакционной способностью, был проведен анализ влияния степени сшивки (5-20 мол.%) микрогелей на средний размер и индекс полидисперсности на примере выбранной модельной реакции. Полученные результаты показали, что минимальный размер частиц (около 210 нм) наблюдался для микрогелей со степенью замещения 10-15 мол %, при этом в случае 15 мол % микрогель **29з** имел узкое распределение по размерам ($PDI < 0,25$). Таким образом, коллоидные частицы микрогеля на основе полигалактуронил гидразида **25** обладают оптимальными характеристиками именно при данной степени замещения.

Эксперименты по влиянию pH на физико-химические характеристики частиц показали, что в условиях кислой среды, полученный микрогель сильно сжимался до размеров менее 125 нм, в то время как при нейтральном и щелочном pH наблюдалось относительное плато, что говорит об устойчивости микрогеля при щелочных значениях. Это свойство может играть роль при нагрузке и высвобождении АФИ из полимерной структуры.

2.2.4. Нагрузка микрогелей модельным АФИ

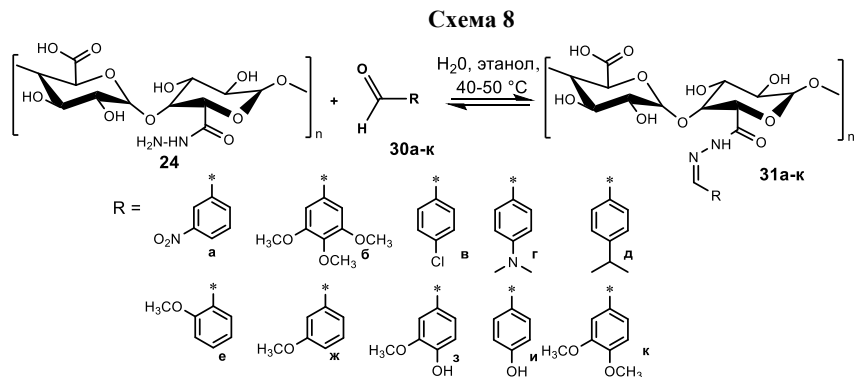
Полисахаридные микрогели имеют перспективы использования в качестве мукоадгезивных лекарственных форм, что актуально для разработки средств доставки локальных анестетиков в стоматологии. Для оценки потенциала микрогелей как самостоятельной терапевтической системы, была проведена нагрузка носителей **29в**, **29д** и **29з** прокаинном. Благодаря своей структуре прокаин может взаимодействовать с производным пектина за счет гидрофобных взаимодействий с алифатическими радикалами и ионных связей со свободными карбоксильными группами. Для всех носителей наблюдалась высокая степень включения субстанции (81-92 %), что позволяет рассматривать синтезированные микрогели как возможную систему доставки АФИ.

Для нагруженных микрогелей изучен профиль высвобождения модельного лекарства в условиях близких к физиологическим. Профиль высвобождения характерен для уравнений первого порядка с преобладанием диффузии как основного механизма процесса. С целью доставки локальных анестетиков такой профиль высвобождения является подходящим: быстрое начало способствует своевременному фармакологическому эффекту, а дальнейшее высвобождение (до 90 % за 3 ч) пролонгирует действие.

Таким образом, в ходе этапа работы, посвященного синтезу микрогелей, значительно расширены возможности модификации молекул полисахаридов с помощью реакции Уги, разработаны две принципиальные схемы получения микрогелей, отличающихся варьируемыми исходными реагентами реакции. Для хитозана настройка амфифильности поверхности обеспечивается в основном за счет карбоксильного компонента, для полигалактуронилгидразида, благодаря его бифункциональности, возможна поперечная сшивка молекул полисахарида с доступностью разнообразных альдегидов и изоцианидов. Кроме того, сшитые полимерные частицы могут выступать самостоятельными терапевтическими системами, что показано на примере нагрузки модельным анестетиком.

2.2.5. Синтез комбинаторных динамических библиотек на полисахаридном скелете

При синтезе полимерных терапевтических систем большое значение имеет обеспечение адресного нацеливания и узнавания молекул-мишеней. Целью этого этапа исследования стал синтез стабилизированных динамических комбинаторных библиотек (ДКБ) на основе ацилгидразонов пектина с повышенным сродством к аминокислотам. Сначала был осуществлен синтез индивидуальных ацилгидразонов **31а-к** пектина с использованием 10 производных бензальдегида **30а-к** (схема 8). Для синтеза ДКБ были отобраны 5 альдегидов **30а-д**, имеющие неперекрывающиеся сигналы ароматических протонов и обладающие различными заместителями, что позволило обеспечить идентификацию производных и разнообразие поверхности полисахарида.



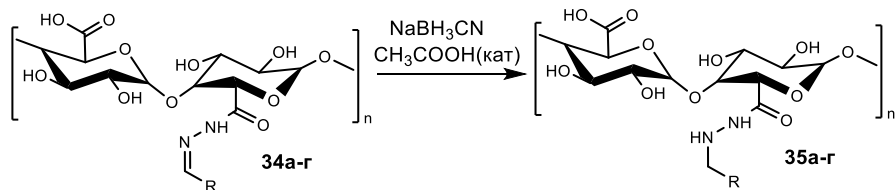
Далее была синтезирована предуравновешенная ДКБ **32**. Реакция проводилась в 2 % водном растворе полигалактурилгидразида **24** одновременно с 5 выбранными альдегидами **30а-д**, каждый из которых добавлялся в эквимольном соотношении к гидразидным группам (24 мол. %) полимера. В качестве темплат были использованы *N*-замещенные аминокислоты: α -*N*-ацетил-*L*-гистидин **33а**, α -*N*-бензоил-*L*-глутаминовая кислота **33б**, α -*N*-*t*-Вос-*L*-валин **33в** и аминокислота без свободной аминогруппы *L*-пролин **33г** для получения селективных ДКБ **34а-г**, где заместители предотвращали их ковалентное участие в процессе. В ходе темплатного синтеза происходило динамическое перераспределение строительных блоков с амплификацией оптимальной структуры благодаря тому, что при нековалентном связывании с молекулой-мишенью участок полимера выводится из общего равновесия. Полученные мономерные соотношения для исходной **32** и селективных **34а-г** ДКБ представлены в табл. 2.

Таблица 2. Соотношения мономеров галактурилгидразонов в ДКБ

ДКБ	Темплата	Мономеры				
		31а	31б	31в	31г	31д
32	-	41 %	24 %	16 %	12 %	7 %
34а	33а	31 % ↓	26 %	15 %	20 % ↑	8 %
34б	33б	50 % ↑	21 % ↓	13 % ↓	10 % ↓	5 % ↓
34в	33в	48 % ↑	24 %	14 % ↓	6 % ↓	7 %
34г	33г	37 %	26 %	15 %	11 %	11 % ↑

Чтобы предотвратить равновесное изменение в ДКБ в условиях отсутствия темплаты, был использован пост-модификационный подход. В ходе разработки способа стабилизации ДКБ была оптимизирована методика восстановления динамических иминных связей ацилгидразонов с помощью NaBH_3CN (схема 9) в водной среде. При реакции восстановления изменение соотношений заместителей в полученных производных (**35a-г**) по сравнению с приведенными значениями в табл. 2 не превышало 1 %, что говорит о полном восстановлении, а незначительные колебания могут быть связаны со стандартной ошибкой (1 %) метода внутримолекулярного количественного анализа протонных спектров ЯМР.

Схема 9



Для восстановленной ДКБ (**51a**) была отработана методика определения степени связывания молекулы-мишени. Восстановление селективной ДКБ позволило достичь константы связывания $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ в сравнении с $1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ для нестабилизированного продукта.

Таким образом, результаты демонстрируют эффективность используемой концепции для синтеза полимеров, обладающих высокой степенью связывания определенных мишеней. Предлагаемый способ применения динамической комбинаторной химии открывает возможности синтеза новых чувствительных материалов в области лекарственной доставки и биосенсоров.

2.3. Получение комплексных полисахарид-липосомальных систем и изучение их возможностей

2.3.1. Полисахарид –липосомальные системы на основе производных хитозана

Синтезированные с помощью реакции Уги производные хитозана **15-17** и **20** были использованы в качестве стабилизаторов липосомальных форм. Наилучший результат стабилизации липосомальной суспензии достигается при соотношении 1:5 производного хитозана к массе липидов, что, скорее всего, связано с покрытием всей поверхности липидных частиц. Как показали последующие эксперименты, дальнейшее повышение доли полисахарида в комплексной системе не приводило к улучшению хранения и даже повышало индекс полидисперсности, что может быть обусловлено свободными молекулами полисахарида в растворе. Лучшими результатами в данном контексте обладали именно гидрофобные производные **20a** и **20б**, поэтому они были выбраны для стабилизации интраназальной липосомальной формы Триазавирина.

Липосомы **9**, нагруженные комплексом Триазавирина с пальмитоилхолином, были покрыты модифицированным хитозаном **20a,б** в выбранном соотношении (1:5). Средний диаметр липосом **36a,б** увеличился в результате осаждения полисахарида на поверхности на 30–40 нм, размер частиц составил 185 – 195 нм (PDI < 0,2). При этом исходный поверхност-

ный заряд положительно-заряженных липосом ($+30 \pm 2$ мВ) снизился до $+20 \pm 4$ мВ, что еще раз подтверждает наличие модифицированной оболочки. Для непокрытых и покрытых липосом была исследована стабильность при комнатной температуре. В результате производные хитозана, имеющие в своем составе неполярные остатки жирных кислот, продемонстрировали способность значительно удлинять срок хранения липосомальных суспензий. Кроме того наличие модифицированной полисахаридной оболочки оказывает влияние на скорость высвобождения лекарственной субстанции из частиц. Покрытие модифицированным хитозаном липосом, нагруженных Триазавирином, пролонгирует действие лекарственной формы, приближая профиль высвобождения лекарства к линейному с постоянной скоростью.

Разработанная лекарственная форма обладает перспективами для местного применения на слизистых оболочках для лечения вирусных заболеваний. Поэтому, чтобы оценить способность к адгезии липосомальных частиц в очаге инфекции, проведена оценка мукоадгезивных свойств носителей в экспериментах с муцином. В результате для образца липосом **36a**, покрытого модифицированным хитозаном **20a**, достигались высокие значения адсорбции муцина в 80 ± 5 %, сравнимые с литературными данными для мукоадгезивных форм. Учитывая стабильность и пролонгированное устойчивое высвобождение, можно позиционировать такие липосомы как перспективную форму для интраназального введения Триазавирина. Однако этот подход в дальнейшем может быть применен и при разработке других комплексных полисахарид-липосомальных терапевтических систем.

2.3.2. Полисахарид-липосомальные системы на основе производных пектина

Для получения липосомальных носителей, покрытых производными полигалактуронилгидразида, был исследован другой подход. Поскольку в данном случае модификация проходит с перекрестной сшивкой полисахаридных молекул, реакция Уги проводилась непосредственно на сформированных липосомальных частицах с образованием ковалентно-сшитых субмикроскапул на поверхности носителя. Для этих испытаний были взяты ненагруженные катионные липосомы **10**, обладающие минимальными размерами (120-125 нм, PDI 0.18), на основе фосфатидилхолина с добавками пальмитилохолина для заряда, токоферол ацетата для снижения окисления липидов и метилпальмитата для уменьшения диаметра. Поверхность таких липосом сначала была покрыта гидразидом пектина **25** в соотношении 1:10 (полисахарид:липид), а затем проведена химическая сшивка с помощью реакции Уги. В качестве исходных компонентов для покрытия липосом были выбраны 3-метилбутаналь **26г** и 6 изоцианидов **27в-з**, реакции проводились в соответствии со схемой 8.

Полученные в результате липосомы **37a-e** с полисахаридной капсулой обладали характеристиками, представленными в табл. 3. Анализируя данные, хорошо видно, что средний диаметр частиц 200 ± 20 нм с индексом полидисперсности меньше 0,2, с небольшим исключением для носителя **37б**. Эти показатели синтезированных систем удовлетворяют даже требованиям для парентеральных лекарственных форм. Из разницы значений гидродинамических диаметров исходных липосом и капсулированных частиц следует, что толщина полисахаридного покрытия в среднем составила 35-45 нм. При этом ковалентная сшивка полисахарида на поверхности для большинства образцов способствовала снижению разброса частиц по разме-

рам. Данный метод модификации может быть в дальнейшем использован для достаточно широкого набора лекарственных носителей, включая наночастицы, углеродные наноматериалы, микрокапсулы, микроэмульсии и др.

Таблица 3. Основные характеристики покрытых липосом **37а-е**

Покрытые липосомы	Изоцианид	Размер частиц, нм	PDI
37а	27в	205,0±3	0,077
37б	27г	188,6±2	0,240
37в	27д	191,8±2	0,112
37г	27е	212,8±2	0,160
37д	27ж	219,4±3	0,171
37е	27з	175,8±2	0,176

Для дальнейшего фармацевтического применения исследуемых систем, огромное значение имеет стабильность формы при хранении. В ходе ускоренного теста был рассчитан предполагаемый срок хранения разработанной формы в условиях холодильника, который близок к девяти месяцам. Таким образом, нам удалось получить стабильную полисахарид-липосомальную систему, имеющую потенциал в качестве формы лекарственной доставки.

2.4. Изучение биологических свойств полученных носителей

2.4.1. Цитотоксичность

Для проверки биосовместимости синтезированных производных гидразида пектина и микрокапсулированных с их помощью липосом была проведена оценка острой цитотоксичности с помощью МТТ-теста на клеточной линии HeLa. Непокрытые липосомы (**10**) не обладали токсичностью и даже увеличивали пролиферативную активность клеток. Полигалактуронилгидразид и производное **29з** достоверной токсичности не продемонстрировали, два других микрогеля **29в** и **29д** можно охарактеризовать как малотоксичные соединения. При этом выживаемость клеток в присутствии модифицированных данными полисахаридами липосом практически не отличалась от контроля, что свидетельствует об отсутствии острой цитотоксичности разработанных комплексных носителей **37а**, **37в** и **37е**.

2.4.2. Мукоадгезивные свойства носителей на основе полигалактуронилгидразида

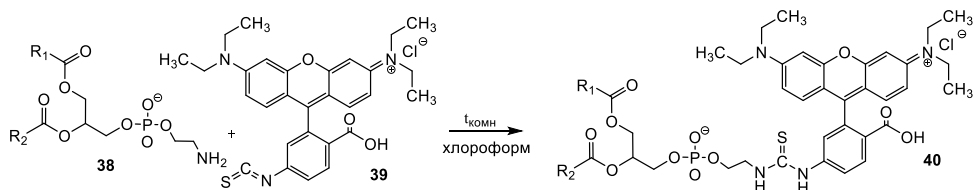
В настоящем исследовании для оценки мукоадгезивных свойств синтезированных производных пектина было использовано 3 метода, включающих количественное определение связанного муцина, влияние взаимодействия с мукопротеином на дзета-потенциал и реологические свойства. Все модифицированные микрогели обладали большей мукоадгезивностью, чем исходный полисахарид. В результате экспериментов продемонстрировано, что сшивка и поверхностная модификация полисахаридов может способствовать значительному улучшению мукоадгезивных свойств, за счет вовлечения всех типов нековалентных взаимодействий и структурной организации молекул полимера.

2.4.3. Синтез флуоресцентной метки для липидного бислоя

Чтобы сделать возможным дальнейшие биологические испытания необходимо было ковалентно связать флуоресцентный краситель с компонентом липидной мембраны. Для это-

го мы выбрали фосфатидилэтаноламин **38** в качестве заякоривающего компонента и родамин В изотиоцианат **39** ($\lambda_{abs} = 554$ нм, $\lambda_{em} = 576$ нм) в роли флуорохрома. Метку **40** синтезировали в хлороформе при комнатной температуре без доступа света (схема 10). Меченный липид вводят в состав липосом на стадии формирования липидной пленки. Для полученных меченых липосомальных частиц отработана методика флуоресцентной микроскопии с оптимизацией условий пробоподготовки и снижения выгорания метки.

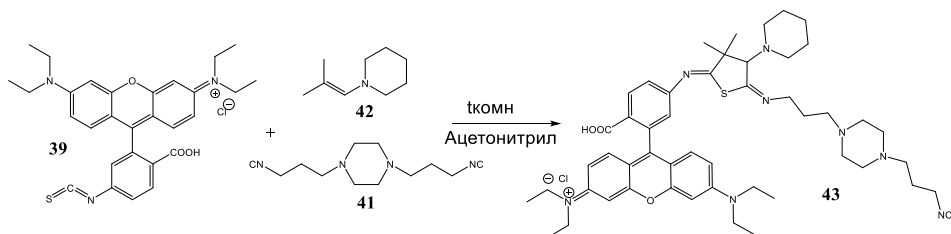
Схема 10



2.4.4. Синтез флуоресцентной метки для полисахаридных покрытий

Для дополнительного доказательства прохождения реакции Уги на поверхности липосом был разработан способ введения флуоресцентной метки в полисахаридное покрытие в процессе шивки. С этой целью был синтезирован изоцианид **43**, меченый флуоресцентным красителем, с помощью трехкомпонентной реакции с 1,4-бис(3-изоцианопропил) пиперазином **41**, родамином В изотиоцианатом **39** и 1-(2-метилпроп-1-ен-1-ил)пиперидином **42** (схема 11).

Схема 11



Флуоресцентная микроскопия подтверждает включение метки в состав микрогелей и полисахаридной оболочки липосом, следовательно, свидетельствует в пользу прохождения ковалентной реакции модификации на поверхности частиц.

2.4.5. Биологическое распределение

Для исследования биологического распределения на крысах линии Вистар был приготовлен препарат стерильных модифицированных липосом с использованием флуоресцентной метки **40** для липидного бислоя. Синтез полисахаридной микрокапсулы на поверхности липосом проводился по стандартной методике для производного полигалактуронилгидразида **29з**. Оценка содержания метки в отобранных органах проводилась флуориметрическим способом после гомогенизации и экстракции флуорохрома изопропанолом. В качестве гистологических образцов были подготовлены фиксированные срезы (толщиной 1-5 мкм) более ши-

рокого набора органов: поджелудочной железы, селезенки, печени, сердца, легких, а также желудка, тонкого кишечника, тимуса и мозга.

Анализируя количественное биораспределение образца, можно сделать вывод о значительном нацеливании полисахарид-липосомального препарата в ткани легких. Заметен эффект экранизации носителя от клеток макрофагально-моноцитарной системы, о чем можно судить из соотношения концентраций родамина В в легких и органах МФС. Преимущественное распределение системы в тканях легких связано с повышенным сродством полисахаридной оболочки и фосфолипидов к мукоидным секретам, в этом случае к сурфактанту, секретлируемому альвеолоцитами II типа. Выявленные свойства носителя можно в дальнейшем применить при разработке лекарственных форм для местного применения на слизистые оболочки или для целенаправленной доставки в соответствующие органы-мишени, наибольшую актуальность в данном случае представляют заболевания легких.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам выполненной исследовательской работы можно сделать следующие выводы.

1. Синтезированы новые производные холина, стабилизирующие липидный бислой, показано их влияние на размеры и повышение дзета-потенциала полученных липосом.

2. Отработана лабораторная технология формирования липосомальных суспензий методом экструзии через неорганические мембраны.

3. Осуществлен синтез новых полисахаридных микрогелей на основе хитозана и полигалактуронилгидразида с помощью реакция Уги, показано влияние исходных реагентов на распределение частиц по размерам и плотность шивки.

4. Показано, что полученные микрогели на основе полигалактуронилгидразида являются удобными носителями для доставки модельного анестетика через слизистые оболочки.

5. Разработан новый способ синтеза динамических комбинаторных библиотек на основе полигалактуронилгидразонов, обладающих высоким сродством к замещенным аминокислотам.

6. Продемонстрирована высокая эффективность нагрузки липосом гидрофильными лекарственными веществами, на примере препарата Триазавирин, разработана его новая лекарственная форма для интраназальной доставки.

7. Впервые предложена методология получения ковалентно сшитой полисахаридной оболочки на поверхности липосомальных частиц с помощью реакции Уги.

8. Разработан новый метод получения флуоресцентных меток с помощью трехкомпонентной реакции между изоцианидами, енаминами и изотиоцианатом родамина В.

9. Для разработанных систем лекарственной доставки (микрогелей и композитных липосом) изучены мукоадгезивность, цитотоксичность и биораспределение. Показано, что полученные носители относятся к нетоксичным и малотоксичным системам, обладают повышенными мукоадгезивными свойствами в экспериментах *in vitro* и сродством к слизистым тканям и мукоидным секретам *in vivo*.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в расширении используемых полисахаридов для синтеза производных с помощью реакции Уги, изучении их физических и химических закономерностей, синтезе динамических комбинаторных библиотек на основе полигалактуронилгидразонов, обладающих селективностью к высокомолекулярным биологическим мишеням. В дальнейшем возможно проведение доклинических испытаний разработанных липосомальных лекарственных форм и разработка новых препаратов, используя подходы и принципы настоящего исследования.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

Статьи и тезисы в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. **Кожихова К.В.** Синтез водорастворимых производных хитозана и их использование для стабилизации липосомальных суспензий / В.С. Пономарев, К.В. Кожихова, И.Д. Шулепов, М.И. Токарева, М.А. Миронов // Известия академии наук. Серия химическая. – 2014. – №7. – С. 1619-1623. (0.60 п.л./0.30 п.л.). (Scopus и WoS)

2. **Kozhikhova K.V.** Preparation of chitosan-coated liposomes as a novel carrier system for the antiviral drug Triazavirin / K.V. Kozhikhova, M.N. Ivantsova, M.I. Tokareva, I.D. Shulepov, A.V. Tretiyakov, L.V. Shaidarov, V.L. Rusinov, M.A. Mironov // Pharmaceutical Development and Technology. – 2018. – V.23. – №4. – P. 334-342. (1.20 п.л./0.60 п.л.). (Scopus и WoS)

3. **Кожихова К.В.** Химически сшитые микрогели, полученные на основе пектина, как новый способ доставки локальных анестетиков / К.В. Кожихова, Д.А. Толстых, И.Д. Шулепов, Д.О. Кузнецова, М.А. Миронов // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т.10. – №3. – P. 41-50. (1.10 п.л./0.55 п.л.). (Scopus)

4. **Kozhikhova K.V.** Preparation of Composite Liposomes for Targeted Drug Delivery / K.V. Kozhikhova, M.A. Mironov, V.S. Ponomarev, I.D. Shulepov, M.N. Ivantsova // 6th International Conference proceedings Nanocon 2014. – Brno, 2014. – P. 518-524. (0.6 п.л./0.4 п.л.). (Scopus и WoS)

5. **Kozhikhova K.V.** Synthesis of polyampholyte microgels from pectin or cellulose and their application as pH-responsive emulsifiers / M.A. Mironov, K.V. Kozhikhova, I.D. Shulepov, V.S. Ponomarev, V.A. Bakulev // Chemicke Listy. – Prague, 2014. – P. 913. (0.04 п.л./0.02 п.л.). (WoS)

6. **Kozhikhova K.V.** Mucoadhesive Pectin-Based Cross-Linked Microgels / D.A. Tolstych, K.V. Kozhikhova, M.A. Mironov // RAN'17 Congress Proceedings. – Barcelona: Avestia Publishing, 2017. – № 113. (0.12 п.л./0.06 п.л.). (Scopus и WoS)

Глава в монографии:

7. **Кожихова К.В.** Создание липосомальной лекарственной формы на основе субстанции Триазавирин // Триазавирин – противовирусный препарат нового поколения / К.В. Кожихова, М.А. Миронов, М.Н. Иванцова, М.И. Токарева, В.Л. Русинов, В.Н. Чарушин, О.Н. Чуахин. – Екатеринбург: Изд-во Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 2016. – Гл. 6.1. – С. 222-240. УДК: 615.038 + 315.281.8 (1.20 п.л./0.60 п.л.)

Другие публикации:

8. **Кожихова К.В.** Разработка липосомальной лекарственной формы противовирусного препарата Триазавирин / **К.В. Кожихова**, М.А. Миронов // Проблемы теоретической и экспериментальной химии. Тезисы докладов XXIII Российской молодежной научной конференции. – Екатеринбург, 2013. – С. 66. (0.04 п.л./0.02 п.л.)

9. **Кожихова К.В.** Оптимизация липидной композиции липосомальной лекарственной формы противовирусного препарата Триазавирин / **К.В. Кожихова**, М.А. Миронов

// Материалы Евразийского Конгресса «Медицина, фармация и общественное здоровье-2013» с международным участием. – Екатеринбург, 2013. – С. 53-58. (0.16 п.л./0.08 п.л.)

10. **Kozhikhova K.V.** Preparation of pH-responsive microcapsules on the basis of polysaccharide microgels / M. A. Mironov, I. D. Shulepov, **K.V. Kozhikhova**, V. S. Ponomarev, M. N. Ivantsova // Bioengineering conference proceeding «Bio Eng '14». – Istanbul, 2014. – P. 43-49. (0.12 п.л./0.04 п.л.).

11. **Кожихова К.В.** Новый синтез композитных липосом для доставки лекарственных веществ / **К.В. Кожихова**, М.А. Миронов // Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни». – Москва, 2014. – С. 51-53. (0.08 п.л./0.04 п.л.).

12. **Кожихова К.В.** Получение гидразонов пектина и их динамических смесей / **К.В. Кожихова**, Д.А. Толстых, М.А. Миронов // Тезисы докладов XXV Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург: УрФУ, 2015. – С. 64-65. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

13. **Kozhikhova K.V.** Interaction of dynamic combinatorial libraries of pectin acylhydrazone derivatives with low molecular weight organic templates / **K.V. Kozhikhova**, D.A. Tolstykh, M.A.Mironov // The Proceedings Papers of the III International Conference of Promising and Upcoming Young Scientists "Chemistry in the Federal Universities". – Екатеринбург: УрФУ, 2015. – С. 143-145. (0.08 п.л./0.04 п.л.).

14. **Кожихова К.В.** Динамические комбинаторные библиотеки на основе ацилгидразонов пектина, обладающие повышенным сродством к биогенным аминокислотам / Д.А. Толстых, **К.В. Кожихова**, М.А. Миронов, И.Д. Шулепов // Сборник тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – Казань: КФУ, 2015. – С. 568. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

15. **Кожихова К.В.** Комплексные носители для адресной доставки лекарственных средств на основе липосом, покрытых модифицированной полисахаридной оболочкой / **К.В. Кожихова**, Д.А. Толстых, М.А. Миронов // Сборник тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – Казань: КФУ, 2015. – С. 441. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

16. **Кожихова К.В.** Синтез комбинаторных динамических библиотек на основе ацилгидразонов пектина с использованием производных аминокислот в качестве темплат / **К.В. Кожихова**, Д.А. Толстых, И.Д. Шулепов, М.А. Миронов // Сборник тезисов зимней конференции молодых ученых по органической химии WSOС 2016. – Красновидово, 2016. – С. 132. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

17. **Kozhikhova K.V.** Preparation of novel derivatives of pectinic acid for microencapsulation / S. Ntakirutimana, **K.V. Kozhikhova**, D.A. Tolstykh, M.A. Mironov // Сборник научных трудов XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Том 4. Биомедицина. – Томск, 2016. – С. 84-86. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

18. **Кожихова К.В.** Получение микрогелей на основе гидразида пектина / **К.В. Кожихова**, Д.А. Толстых, И.Д. Шулепов, М.А. Миронов // Тезисы докладов XXVI Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2016. – С. 441. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

19. **Kozhikhova K.V.** Preparation of mucoadhesive liposomes for antiviral drug delivery / **K.V. Kozhikhova**, D.A. Tolstykh, M.A. Mironov // MENDELEEV CONGRESS on general and applied chemistry. Medicinal Chemistry. ABSTRACT BOOK in 5 volumes. – Ekaterinburg, 2016. – Vol. 4. – P. 486. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

20. **Kozhikhova K.V.** Late stage modification of amino acids binding pectin-scaffolded receptors / D.A. Tolstykh, **K.V. Kozhikhova**, M.A. Mironov // 12th International Saint-Petersburg

Conference of Young Scientists "Modern problems of polymer science". – Sankt-Peterburg, 2016. – P. 82. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

21. **Кожихова К.В.** Мукоадгезивные липосомы для интраназальной доставки интерферона α / Д.А. Толстых, **К.В. Кожихова**, И.Д. Шулепов, М.А. Миронов // Сборник тезисов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века». – Казань: КФУ, 2016. – С. 331. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

22. **Kozhikhova K.V.** Late stage modification of amino-acids binding pectin-scaffolded receptors / D.A. Tolstych, **K.V. Kozhikhova**, M.A. Mironov // Program and Abstract Book of 12th International Saint-Petersburg Conference of Young Scientist. – Saint-Petersburg: Icing, 2016. – С. 82. (0.04 п.л./0.02 п.л.).

23. **Kozhikhova K.V.** Synthesis of nanosized mucoadhesive pectinic hydrogel for local anesthesia / **K.V. Kozhikhova**, D.A. Tolstykh, I.D. Schulepov, M.A. Mironov // The book of abstracts of the First German-Russian Interdisciplinary Student Workshop: "Nanoscale interdisciplinary research: physics, chemistry, biology, mathematics". – Moscow, RUDN, 2017. – P. 17. (0.04 п.л./0.02 п.л.).