

ISSN 0132-3423

Том 50, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2024



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



СОДЕРЖАНИЕ

Том 50, номер 6, 2024

Член международной редакционной коллегии журнала “Биоорганическая химия” академик Шавкат Исмаилович Салихов (к 80-летию со дня рождения)

705

Порфирины как полифункциональные лиганды при связывании с ДНК.

Перспективы применения (обзорная статья)

Н. Ш. Лебедева, Е. С. Юрина

707

Эритроциты крови – биологическая модель для оценки антиоксидантной активности химических соединений (обзорная статья)

О. Г. Шевченко

720

Ковалентные ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) в таргетной терапии лекарственно-устойчивого немелкоклеточного рака легкого (обзорная статья)

А. Б. Швецов, А. В. Семёнов

735

Витамин В₁₂ в системах доставки лекарственных препаратов (обзорная статья)

А. А. Скуредина, Д. Е. Ялама, И. М. Ле-Дейген

762

Синтез и оценка цитотоксической активности эфиров и амидов малеопимаровой и дигидрохинопимаровой кислот

Е. В. Третьякова, С. Р. Шарафутдинова

780

Адаптация протокола автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов для получения их N-незамещенных амидофосфатных аналогов (P-NH₂)

Е. А. Малова, И. А. Пышная, М. И. Мещанинова, Д. В. Пышный

789

Структурный анализ белка LZTFL1 методом главных компонент (PCA-seq)

И. И. Хегай, С. Юй, В. М. Ефимов

806

Ингибирование дипептидилпептидазы-IV 2-S-цианопирролидиновыми ингибиторами пролилэндопептидазы

Г. И. Макаров, Н. Н. Золотов, В. Ф. Позднев

813

Новые катионные углеводсодержащие амфифилы и липосомы на их основе для эффективной доставки коротких нуклеиновых кислот в эукариотические клетки

*Е. В. Шмендель, А. О. Буянова, О. В. Марков, Н. Г. Морозова,
М. А. Зенкова, М. А. Маслов*

826

Стимулирующее влияние бензо(*a*)пирена на продукцию специфического IgE связано с формированием герминальных центров в селезенке и экстрафолликулярной активацией В-лимфоцитов в ткани легких

*Д. Б. Чудаков, О. А. Шустова, М. А. Стрельцова, А. А. Генералов,
Р. А. Величинский, О. Д. Коцарева, Г. В. Фаттахова*

842

Оценка острой токсичности пиридиновых производных 3,4-дигидрохиноксалин-2-она и 3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-она

*С. А. Терновская, В. С. Власенко, А. Н. Новиков, Н. А. Денгис,
А. Л. Сталинская, И. В. Кулаков*

856

Неагломерированные олигонуклеотид-содержащие нанокомпозиты на основе наночастиц диоксида титана

*М. Н. Репкова, О. Ю. Мазурков, Е. И. Филиппова, Н. А. Мазуркова,
Ю. Е. Полетаева, Е. И. Рябчикова, В. Ф. Зарытова, А. С. Левина*

862

Экспрессия внеклеточного фрагмента PD-L1 мыши и получение антител к PD-L1

*М. С. Горюнова, Д. Ю. Рязанцев, Е. Э. Петрова, В. В. Костенко, А. О. Макарова,
Р. В. Холоденко, Е. В. Рябухина, Д. В. Калиновский, О. Д. Коцарева, Е. В. Свирищевская*

871

ЧЛЕН МЕЖДУНАРОДНОЙ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ ЖУРНАЛА “БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ”

академик Шавкат Исмаилович Салихов

(к 80-летию со дня рождения)



Академик Ш.И. Салихов широко известный ученый в области биоорганической химии и биотехнологии, академик Академии наук Узбекистана. Основатель научной школы белковой химии в Узбекистане. Научные интересы Шавката Исмаиловича направлены на проблемы, связанные со структурным и функциональным изучением биологически активных соединений. Совместно с Институтом биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН им были проведены фундаментальные исследования новых высокоспецифичных токсинов, выделенных из ядов членистоногих различных видов с целью изучения их структуры, механизма действия и применения в качестве “инструментов” для нейрофизиологических исследований. В результате данных исследований были созданы антисыворотки против ядов кобры, скорпиона, каракурта, где в качестве антител использованы выделенные нейротоксины.

В сотрудничестве с ведущими учеными Российской академии наук им был проведен цикл исследований по выделению и биоскринингу биологически активных соединений, проявляющих противовирусную активность. Раскрыты механизмы противовирусного, антихламидного, иммуномодулирующего, противоспидового действия биологически активных соединений полифенольной природы. Изучен химический состав полифенолов

свыше 70 растений, относящихся к семействам *Annacardeaceae*, *Geranaceae*, *Punicaceae*, *Euphorbeaceae*, *Malvaceae* и др. Из них было выделено свыше 150 веществ, более 20 из которых оказались новыми, ранее не описанными в литературе соединениями.

Впервые в Республике Узбекистан были разработаны и внедрены в медицинскую практику оригинальные противовирусные препараты: “Рагосин таблетки 0.05 г” № 12 – для лечения вирусных гепатитов В, С, D; “Гозалидон таблетки 0.05 г” – антихламидийный препарат; “Мазь мегосина 1%” – антигерпетическое средство; “Рутан таблетки 0.25 г” – препарат против вируса гриппа А и В.

Под руководством академика Ш.И. Салихова в Республике Узбекистан был разработан новый подход в синтезе феромонов хлопковой совки. В Институте на экспериментальной базе было организовано производство комплектов феромонных ловушек против хлопковой и озимой совок, где они ежегодно производятся в количестве более 1 млн. Институт с 1997 г. полностью обеспечивает хлопководческие хозяйства Республики Узбекистан комплектами феромонных ловушек хлопковой и озимой совок, тем самым освобождая Республику от их импорта и экономит ежегодно более 1.5 млн долларов США.

Под руководством Салихова Ш.И. впервые в Республике разработана технология производства семенного картофеля на основе элитных классов (на основе клеточных технологий). В настоящее время данная технология успешно внедряется в Республике Узбекистан.

В январе 2017 года академику Салихову Ш.И. присуждена премия “Международное сотрудничество в области науки и технологий–2017”, неофициально именуемая “китайской нобелевской премией” за вклад в развитие международного научно-технического сотрудничества с Академией наук КНР, подготовку талантливых ученых и за важную роль в повышении уровня научных исследований, инноваций и развития Китайской академии наук путем подготовки инновационных талантов и высококвалифицированных ученых.

В ноябре 2017 года Шавкат Исмаилович Салихов был избран членом Китайской академии наук (КАН). Он – первый ученый из Узбекистана, избранный в КАН, и второй из стран СНГ после российского ученого, лауреата Нобелевской премии по физике Жореса Алфёрова.

В период коронавирусной пандемии в 2020 г. по инициативе академика Ш.И. Салихова совместно с ведущими учеными научно-исследовательских учреждений РАН и КАН были проведены дополнительные исследования по определению эффективности против коронавируса SARS-CoV-2 ранее разработанного и внедренного в медицинскую практику в Республике Узбекистан противовирусного препарата Рутан против вирусов гриппа А и В. Было установлено, что препарат Рутан эффективно

ингибитирует две жизненно важные ферментные системы вируса SARS-CoV-2.

По результатам клинического исследования “Рутан таблетки 100 мг” рекомендован для взрослых, а “Рутан таблетки 25 мг” – для пациентов старше 6 лет разрешен к применению в качестве лекарственного средства против заболевания COVID-19 со средней степенью тяжести, а также против всех штаммов гриппа. Министерство здравоохранения Республики Узбекистан одобрило применение препарата Рутан по рекомендации врачей при лечении больных, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. Препарата приказом Министерства здравоохранения Республики Узбекистан от 2023 г. включен в перечень ЖВЛП.

Главный редактор журнала “Биоорганическая химия”, члены международного редакционного совета, редакционной коллегии и сотрудники редакции журнала поздравляют Шавката Исмаиловича Салихова с юбилеем и желают здоровья, новых научных побед и достижений в области науки.



УДК 577.113.7

ПОРФИРИНЫ КАК ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИГАНДЫ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ДНК. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2024 г. Н. Ш. Лебедева*, Е. С. Юрина*[#]

* Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Россия, 153045 Иваново, ул. Академическая, 1

Поступила в редакцию 05.04.2024 г.

После доработки 24.04.2024 г.

Принята к публикации 25.04.2024 г.

Исследование взаимодействия нуклеиновых кислот с лигандами не только актуально с научной точки зрения, но и имеет высокую потенциальную практическую значимость. Образование комплексов нуклеиновых кислот с лигандами влияет на биохимические функции важнейшего носителя генетической информации, что открывает возможности для лечения генетических заболеваний, управления старением как клетки, так и организма в целом. Среди огромного многообразия потенциальных лигандов особое место занимают порфирины и родственные им соединения, что обусловлено их способностью к генерации активных форм кислорода под действием света. Фотокаталитические свойства порфиринов в составе комплексов могут быть востребованы при создании молекулярных инструментов для генной инженерии, лечении вирусных и бактериальных инфекций. Модификация порфириновых соединений позволяет осуществить нацеливание лиганда на конкретную биологическую мишень. В обзоре обобщены литературные данные, описывающие процессы комплексообразования нуклеиновых кислот с ароматическими лигандами (преимущественно с порфиринами), проанализировано влияние структуры макрогетероциклических соединений на особенности взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, обозначены перспективные направления дальнейших исследований в данной области.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды, лиганды, порфирины, интеркаляты

DOI: 10.31857/S0132342324060015, EDN: NGMHIQ

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	707
2. КЛАССИЧЕСКАЯ ИНТЕРКАЛЯЦИЯ	708
3. ПОРФИРИНЫ КАК ИНТЕРКАЛЯТОРЫ	709
4. НЕКЛАССИЧЕСКАЯ ИНТЕРКАЛЯЦИЯ	712
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	716

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВВЕДЕНИЕ

ДНК – это “молекула жизни”, обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живого организма, в том числе восприимчивость к болезням [1]. Поэтому ДНК – одна из самых перспективных биологических мишеней при разработке лекарственных препаратов

для лечения онкологических и генетических заболеваний, вирусных, микробных и паразитарных инфекций, регуляции жизненного цикла, процессов старения или генетической модификации живого организма. С учетом строения двухцепочечной ДНК можно выделить три основных способа комплексообразования: 1) внешние комплексы образуются за счет электростатического при-

Сокращения: стДНК – ДНК тимуса теленка; ssДНК – ДНК спермы лосося; PIPES – пиперазиновый буфер.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (493) 233-62-72; эл. почта: yurina_elena77@mail.ru).

тяжения к отрицательно заряженному фосфатному оству ДНК катионов, поликатионов; 2) комплексы с лигандами в большой и малой бороздках ДНК; 3) комплексы интеркаляционного типа, формируемые при встраивании ароматического лиганда между парами азотистых оснований. Последний тип комплексообразования вызывает наибольшие структурные изменения в ДНК и существенно влияет на ее биологические функции. Поэтому данный мини-обзор будет посвящен вопросам, связанным именно с интеркаляцией.

2. КЛАССИЧЕСКАЯ ИНТЕРКАЛЯЦИЯ

Начиная с 1961 г., когда Лерман впервые [2] обосновал высокое сродство ДНК к гетероциклическим ароматическим красителям, при котором ароматическое соединение встраивается между азотистыми основаниями ДНК, образуя интеркаляционные комплексы, количество исследований в данном научном направлении растет в геометрической прогрессии. Появляется потенциальная возможность для создания лигандов, способных связываться со специфическими генами и выключать их экспрессию. Органические интеркаляты могут ингибировать синтез нуклеиновых кислот, в настоящее время они применяются в качестве противоопухолевых препаратов. Например, актиномицин D используется при сарките [3], опухоли Вильмса [4] и меланоме [5], даунорубицин – при лечении острого миелоидного лейкоза [6], нейробластомы и хронического миелогенного лейкоза [7], доксорубицин в основном применяется для лечения лимфомы Ходжкина [8]. Однако все известные интеркаляты характеризуются низкой селективностью.

Известные к настоящему времени интеркаляты состоят из плоских ароматических или гетероароматических групп, способных внедряться между соседними парами оснований. Эти комплексы стабилизируются за счет π – π -стекинговых взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий и/или переноса заряда [9].

Интеркаляция ДНК вызывает локальные структурные возмущения в спирали ДНК, в основном частичное раскручивание спирали, что приводит к удлинению ДНК [10]. Эти структурные модификации приводят к прерыванию репликации, транскрипции и репарации ДНК, препятствуя связыванию ДНК с ассоциированными белками, такими как полимеразы, транскрипционные факторы и топоизомеразы [11].

Подавляющее большинство работ, представленных в научной литературе, посвящено изучению моноинтеркалятов. Моноинтеркаляты – это малые ароматические молекулы, которые интеркалируют между парами оснований ДНК либо со стороны большой, либо со стороны малой бороздки, при этом может реализоваться параллельная или перпендикулярная интеркаляция (рис. 1). Чем меньше интеркалят, тем меньше селективность и аффинность связывания с ДНК. Например, дауномицин и профлавин – примеры моноинтеркалятов, профлавин содержит три анилированных ароматических кольца, дауномицин – четыре. Дауномицин, по причине большего размера молекулы по сравнению с профлавином, интеркалирует со стороны большой бороздки, т.е. в G-C-обогащенные области, в то время как профлавин может интеркалировать как в A-T-, так и в G-C-области. Несмотря на то что профлавин обладает противоопухолевым действием, он проявляет низкую селективность и поэтому не используется в лечебной практике. Для повышения его селективности предприняты попытки модификации структуры за счет введения объемных заместителей [13, 14] (рис. 2).

Другой путь повышения селективности взаимодействия – бисинтеркаляция. Бисинтеркаляты образованы из двух моноинтеркалятов, ковалентно связанных спейсером (рис. 3). Создание бисинтеркалятов – сложная задача. Во-первых, по причине необходимости выбора оптимальной длины спейсера, чтобы позволить двум интер-

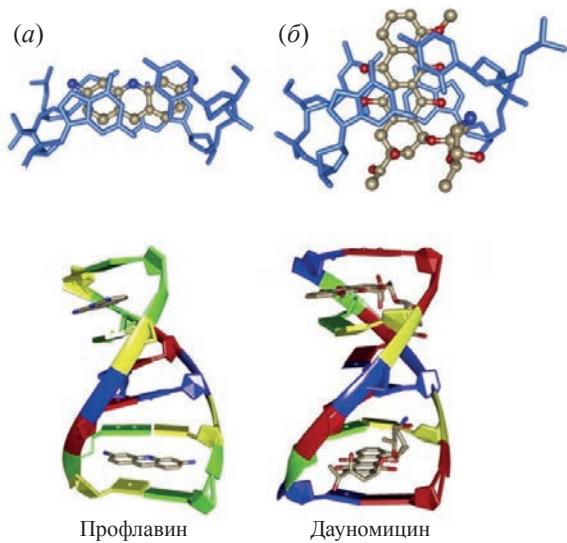


Рис. 1. Визуализация параллельной (а) или перпендикулярной (б) интеркаляции по отношению к парам азотистых оснований ДНК (голубой цвет) [12].

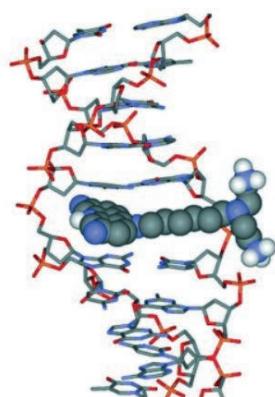


Рис. 2. Модификация профлавина для увеличения аффинности и селективности связывания с ДНК [14].

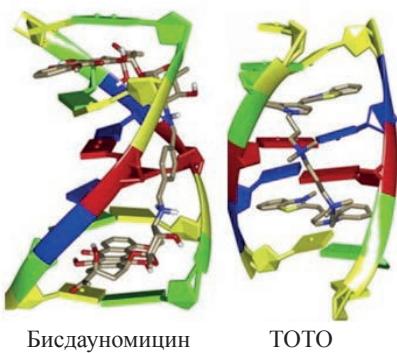


Рис. 3. 3D-изображение интеркаляционных комплексов ДНК с бисинтракалятами: бисдауномицином и TOTO [12].

калирующим частям лиганда встраиваться между азотистыми основаниями ДНК и образовывать π -связи с парами оснований ДНК. Поскольку при интеркаляции происходит частичное, локальное раскручивание ДНК, и расстояние между парами оснований может увеличиваться в 2 раза, то теоретически предсказать, какой длины требуется спейсер, очень сложно [15, 16]. Во-вторых, спейсер должен быть гидрофильным, иначе будут проблемы с растворимостью лиганда. Для обеспечения гидрофильности в составе спейсера должны быть гетероатомы (N, O). Однако их введение увеличивает жесткость спейсера, например, по сравнению с полиметиленовым спейсером. В-третьих, непосредственно для интеркаляции предпочтителен гидрофобный характер лиганда. Наличие в лиганде гидрофильных групп может привести к связыванию лиганда в малой бороздке, что сопровождается разрушением “хребта гидратации” и заменой упорядоченных H-связанных молекул воды в бороздке на лиганд [17]. Поэтому необходимо при дизайне соблюдать баланс между гидрофобным/гидрофильным характером спейсера, его длиной и средством к

разным областям ДНК. Именно по этой причине бисинтракаляты можно пересчитать буквально по пальцам – это бисдауномицин [16], эхиномицин [18], триостин [19], дитеркалиний [20], TOTO [21] и YOYO [22].

Другая стратегия повышения аффинности и селективности интеркалятов – получение интеркалятов с боковыми заместителями, которые находятся диаметрально противоположно от интеркалирующего фрагмента. Для формирования комплекса один из заместителей должен “проткнуть” ДНК, пройти через пары оснований и находиться на одной бороздке ДНК, а второй заместитель – на другой бороздке (рис. 4).



Ногаламицин

Рис. 4. 3D-изображение интеркаляционных комплексов ДНК с ногаламицином. Реализуется дополнительное связывание периферийных заместителей с фрагментами малой и большой бороздки [12].

3. ПОРФИРИНЫ КАК ИНТЕРКАЛЯТОРЫ

Среди традиционных лигандов ДНК – производных бисфеназина, хинолона, актидина, бипирролов, продигининов, индолохинолиновых алкалоидов, стероидных имидазопиридинов, бензо[*k,l*]ксантинов, антрацена, антрахинона – особое положение занимают порфирины. Несомненное преимущество порфиринов и их структурных аналогов состоит в способности под действием света генерировать активные формы кислорода, следовательно, возможно необратимое повреждение ДНК, что актуально для фотодинамической терапии онкозаболеваний и создания лекарственных препаратов вирулизидного или антибактериального профиля. Кроме того, практически не ограничена возможность химической модификации порфиринов, что позволяет тонко настраивать их фотохимические свойства и комплексообразующую способность по отношению к нуклеиновым кислотам. Порфириновые соединения являются хромофорами. Спектральное проявление связывания порфиринов

с ДНК очень яркое, и оно существенно отличается при связывании порфирина в большой/малой бороздке или его интеркаляции в ДНК. На примере тетракационных порфиринов показано [23–25], что их интеркаляция в ДНК вызывает изменения в электронных спектрах поглощения порфиринов, называемых “отпечатками пальцев”: значительный длинноволновый сдвиг полосы Соре от 10 нм и более, гипохромность полосы Соре до 30–50%. Существенный батохромный сдвиг и гипохромный эффект объясняется с точки зрения экситонных взаимодействий, возникающих благодаря сопряжению дипольного момента перехода оснований ДНК с соответствующими $\pi-\pi^*$ -переходами порфирина [26, 27]. В ряде работ сообщается, что при интеркаляции реализуется эффективный перенос энергии от азотистых оснований к фотовозбужденному порфирину [28, 29], что подтверждается уменьшением времени жизни флуоресценции порфиринов до 2–3 нс и отрицательным сигналом в области Соре спектра кругового дихроизма. В случае связывания порфиринов в бороздке ДНК гипохромность значительно меньше (табл. 1), время жизни флуоресценции порфирина увеличивается до 11–12 нс, т.к. нет контакта с тушителем флуоресценции (азотистыми основаниями), и, располагаясь в бороздке ДНК, порфирин частично изолирован от тушителя флуоресценции – молекул воды [30, 31]. В спектрах кругового дихроизма внешнее связывание порфирина с ДНК демонстрируют положительный сигнал в области Соре.

Как видно из представленных данных (табл. 1), не все системы “порфирин–нуклеиновая кислота” соответствуют интеркаляционным комплексам по признакам спектральных изменений в области полосы Соре, в ряде случаев фиксируется чуть меньшее батохромное смещение (<10 нм) или гипохромность несколько ниже порогового значения 30%. В табл. 1 значения, не соответствующие требованиям “отпечатков пальцев”, выделены полужирным шрифтом. В каждом конкретном случае можно предположить причины несоответствия полученных результатов с “отпечатками пальцев”. Например, введение периферийных заместителей, содержащих углеводородный мостик (порфирины H2TC3, MDTMPyP), приводит к увеличению гидрофобного характера порфирина, поэтому меньший батохромный сдвиг, при связывании с нуклеиновыми кислотами, может быть обусловлен самоассоциацией порфиринов. Другая, вполне очевидная причина несоответствия прослеживается при сравнении результатов, полученных для систем, содержащих порфири-

поли[d(GC)₂] и порфирин–ДНК. В случае систем “порфирин–поли[d(GC)₂]” батохромное смещение и гипохромизм всегда соответствует “отпечаткам пальцев”, а для систем “порфирин–ДНК” – нет (табл. 1). Как указывалось выше, порфирины – это достаточно крупные лиганды, и их интеркаляция осуществляется в GC-обогащенные регионы [42]. ДНК тимуса теленка содержит ~58% АТ- и 42% GC-оснований [43], т.е. вполне возможно бимодальное взаимодействие порфирина с ДНК, когда одновременно реализуется интеркаляционное взаимодействие в GC-обогащенные регионы и внешнее связывание порфирина с АТ-обогащенными участками нуклеиновой кислоты. Регистрируемые спектральные изменения будут являться суперпозицией электронного поглощения порфириновых хромофоров, интеркалирующих и локализованных в бороздках ДНК.

При определении типа комплексов на основании исключительно результатов электронной спектроскопии необходимо очень тщательно и скрупулезно подходить к анализу условий спектрального эксперимента. Хорошо известный факт, что, варьируя соотношение концентраций порфирина и пар азотистых оснований нуклеиновой кислоты, можно добиться доминирования в растворе разных типов комплексов (интеркалятов, внешних электростатических и др.) [37, 44]. Не менее значимо время регистрации конечных спектральных изменений, например, в работе [37] при регистрации гипохромный эффект в системе ТӨOPP–стДНК в растворе 10 мМ PIPES, 100 мМ NaCl при pH 7.0 составил 16% непосредственно после смешения компонентов и 25% по прошествии 24 ч. На начальном этапе интеркаляции важную роль играют электростатические взаимодействия катионных порфиринов с отрицательно заряженным оставом нуклеиновой кислоты, поэтому спектральное проявление комплексообразования порфиринов с нуклеиновыми кислотами существенно зависит от сольватирующей среды (буфера, ионной силы) [37]. Например, результаты, представленные в табл. 1 для системы H2T4–поли[d(GC)₂], полученные в разных буферах – фосфатном (pH 6.8), PIPES (pH 7.0) и TRIS (pH 7.4), – привели к разным величинам гипохромного эффекта – 34, 41 и 54% соответственно. Для системы ТӨOPP–стДНК замена буфера PIPES (pH 7.0) на воду (pH 7.0) с NaCl (10 мМ) приводит к смене механизма взаимодействия от интеркалята к внешнему комплексу [37].

Следующий фактор, который необходимо учитывать при проведении исследований или ана-

Таблица 1. Изменения в электронных спектрах поглощения тетра- и дикатионных порфиринов/металлопорфиринов при связывании с нуклеиновыми кислотами

Порфирин*	ДНК	Батохромный сдвиг Сопе, $\Delta\lambda$, нм	Гипохромность H, %	Тип комплекса	Ссылка
H2T4	[poly(dG-dC)] ₂	23	34	Интеркалят	[32]
Zn(T4)	[poly(dG-dC)] ₂	0	4	Внешнее связывание	[35]
H2D4	[poly(dG-dC)] ₂	27	42	Интеркалят	[33]
H2D3	[poly(dG-dC)] ₂	20	36	Интеркалят	[34]
Zn(D4)	[poly(dG-dC)] ₂	15	39	Интеркалят	[33, 34]
Zn(D3)	[poly(dG-dC)] ₂	12	26	Интеркалят (по CD)	[33, 34]
H2T4	[poly(dA-dT)] ₂	9	-4	Внешнее связывание	[32]
Zn(T4)	[poly(dA-dT)] ₂	2	-6	Внешнее связывание	[35]
H2D4	[poly(dA-dT)] ₂	22	28	Интеркалят	[33]
H2D3	[poly(dA-dT)] ₂	16	24	Интеркалят (по CD)	[34]
Zn(D4)	[poly(dA-dT)] ₂	12	26	Интеркалят	[33, 34]
Zn(D3)	[poly(dA-dT)] ₂	9	26	Интеркалят	[33, 34]
Cu(TC3)	ssДНК	10	35	Интеркалят	[36]
Zn(TC3)	ssДНК	1	32	Внешнее связывание	[36]
H2TC3	ssДНК	8	43	Внешнее связывание	[36]
Cu(TC3)	GACGAC	10	45	Интеркалят	[36]
Cu(TC3)	GATTAC	10	38	Интеркалят	[36]
Cu(TC3)	GCGCAC	10	43	Интеркалят	[36]
Zn(TC3)	GACGAC	4	45	Внешнее связывание	[36]
H ₂ TC3	GACGAC	9	54	Интеркалят	[36]
H ₂ TC3	GCGCAC	9	39	Интеркалят	[36]
H ₂ TC3	AGCGCA	8	43	Интеркалят	[36]
T Θ OPP	ctДНК	6	23	Внешнее связывание	[37]
T Θ OPP	ctДНК	18	54	Интеркалят	[37]
MDTMRPyP	ctДНК	10	46	Интеркалят	[38]
CuMDTMRPyP	ctДНК	4	41	Интеркалят	[38]
TPrpyP4	ctДНК	8	42	Интеркалят	[39]
TPrpyP4	[poly(dG-dC)] ₂	21	46	Интеркалят	[39]
TPrpyP4	[poly(dA-dT)] ₂	9	12	Внешнее связывание	[39]
TEtOHpyP(4)	ctДНК	6	37	Интеркалят	[39]
TEtOHpyP(4)	[poly(dG-dC)] ₂	20	50	Интеркалят	[39]
TEtOHpyP(4)	[poly(dA-dT)] ₂	9	12	Внешнее связывание	[39]
TMpyP(4)	ctДНК	7	40	Интеркалят	[39]
TMpyP(4)	[poly(dG-dC)] ₂	21	41	Интеркалят	[39]
TMpyP(4)	[poly(dA-dT)] ₂	7	7	Внешнее связывание	[40]
NiTPrpyP(4)	ctДНК	9	25	Интеркалят	[39]
NiTPrpyP(4)	[poly(dG-dC)] ₂	15	26	Интеркалят	[39]
NiTPrpyP(4)	[poly(dA-dT)] ₂	6	-22	Внешнее связывание	[39]
NiTEtOHpyP	ctДНК	8	9	Внешнее связывание	[39]
NiTEtOHpyP	[poly(dG-dC)] ₂	14	13	Внешнее связывание	[39]
NiTEtOHpyP	[poly(dA-dT)] ₂	4	-41	Внешнее связывание	[39]
TMPy4P	поли[d(GC) ₂]	20	54	Интеркалят	[41]
TMPy4P	поли[d(AT) ₂]	9	22	Внешнее связывание	[41]
TMPy3P	поли[d(GC) ₂]	14	59	Интеркаляция	[41]
TMPy3P	поли[d(AT) ₂]	5	38	Внешнее связывание	[41]

Примечание: полужирным шрифтом выделены значения, не соответствующие требованиям “отпечатков пальцев”. CD – кривой дихроизм.

* Структурные формулы порфиринов представлены на рис. 5.

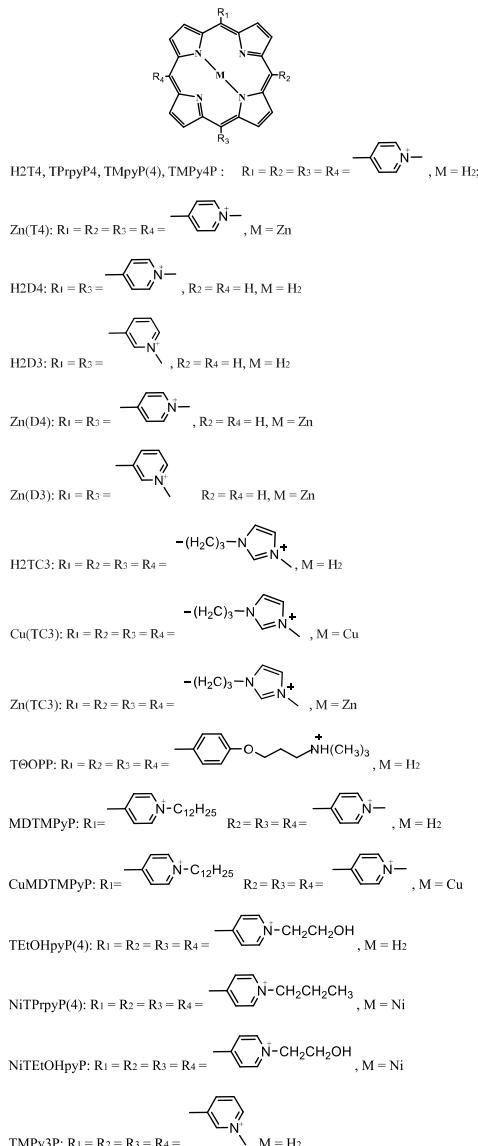


Рис. 5. Структурные формулы тетра- и дикатионных порфирина/металлопорфирина.

лизе данных, – это температура. В работе [38] на примере систем MDTMPyP–стДНК показано, что гипохромный эффект при 15°C составляет 56.25%, а при 30°C – 43.89%. Еще в большей степени температурный фактор скажется на системах, содержащих поли- или олигонуклеотиды. Известно, что при увеличении температуры двухнитевая нуклеиновая кислота расплетается. Как правило, температура плавления природных ДНК находится в интервале 50–80°C, с уменьшением длины биополимера интервал смещается в область более низких температур, а в случае короткоцепочечных олигонуклеотидов (20–30 п.н.) температура плавления находится в интервале 24–40°C. Данный факт

тор необходимо учитывать, т.к. характер взаимодействия порфиринов с дуплексом или расплывленной нуклеиновой кислотой будет отличаться.

Сложность и высокая чувствительность комплексов нуклеиновых кислот с порфиринаами приводит к тому, что, как правило, отнесение к интеркаляционным комплексам порфиринов с нуклеиновыми кислотами делается по совокупности результатов, например, с привлечением данных кругового дихроизма, анализа кинетики тушения флуоресценции порфиринов, температур плавления нуклеиновой кислоты, вискозиметрических исследований.

Следует отметить, что наиболее изучены процессы комплексообразования нуклеиновых кислот с симметричными катионными мезозамещенными порфиринаами [42, 45, 46]. Хотя большинство результатов в литературе относится к взаимодействию ДНК с тетракатионным водорастворимым 5,10,15,20-тетракис(4-метилпиридин)порфирином (TMPy4P), есть также сообщения о других типах катионных мезозамещенных симметричных порфиринах, таких как порфирины с диазолиевыми [47], имидазолиевыми [48], пиразолиевыми кольцами [49], производными фенола [50], пирена [51], аминогруппами [52], а также положительно заряженными мезо-тетраарилзамещенными порфиринаами [53] и другими катионными порфиринаами (табл. 1). Вызывает интерес теоретическая работа [54], в которой изучалось взаимодействие монокатионного порфирина с парами нуклеотидов А–Т и Г–С, а также с аденин-тиминовыми полинуклеотидами или с гуанин-цитозиновыми полинуклеотидами. Авторы пришли к заключению, что при формировании комплексов на начальном этапе в электростатическом притяжении к фосфатным группам участвует только один катионный заместитель порфирина. Кроме того, авторам удалось обосновать экспериментально наблюдаемый сдвиг полосы Соре порфирина при интеркаляции TMPy4P с аденин-тиминовыми полинуклеотидами (437 нм) или с гуанин-цитозиновыми полинуклеотидами (445 нм).

На примере симметричных тетразамещенных порфиринов [55–57] установлено, что введение объемных заместителей не позволяет осуществить интеркаляцию порфиринов в ДНК, в этих случаях порфирин локализован в области большой бороздки.

4. НЕКЛАССИЧЕСКАЯ ИНТЕРКАЛЯЦИЯ

В работе [58] был проведен рентгеноструктурный анализ комплексов Cu(II)-мезо-тетра-(N-метил-4-пиридин)порфирина] с ДНК. Указан-

ный катионный порфирин при интеркаляции вызывает искажение одной из спиралей ДНК, при этом одно из азотистых оснований – цитозин – выворачивается из спирального стека (наружу ДНК). В этом случае интеркаляция происходит только с одной цепью ДНК, а связанный таким образом порфирин вызывает при этом искажение второй цепи ДНК (рис. 6).

Авторы данной работы [58] предложили для подобных комплексов термин “полуинтеркаляция”. Полуинтеркаляционное взаимодействие ДНК с моногетерил-замещенными трикатионными порфиринами, с пиридиновыми группами, введенными в мезоположение фенильного заместителя, было обнаружено в работе [44].

Авторы работы [59] доказали полуинтеркаляционное взаимодействие $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrys})]^{3+}$ с ДНК. Комплекс родия встраивается в стопку оснований через малую бороздку и выворачивает азотистые основания наружу. Выброс основания приводит к большому поражению ДНК, которое можно легко распознать *in vivo*.

В работе по изучению механизма интеркаляции этидий бромида в ДНК с последовательностью d(GCATGAAACGAAACGC) методами молекулярной динамики было установлено, что полноценному встраиванию лиганда в ДНК предшествует стадия выворачивания азотистого основания наружу из спирального стекинга. При полной интеркаляции этидий бромида в нуклеиновую кислоту вывернутое основание возвращается внутрь молекулы [60].

Подобное нарушение одной из спиралей дуплекса, где одно из оснований оказывается вы-

вернутым, наблюдалось и в работах [61, 62]. Согласно рентгеноструктурным данным, интеркаляция порфиринов и $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (bpy = 2,2'-бипиридин и dppz = дипиридофеназин) также может вызывать выворачивание азотистого основания нуклеиновой кислоты из стекинга.

Эти работы стали основой гипотезы о возможности повышения селективности связывания нуклеиновых кислот с лигандами за счет полуинтеркаляционного взаимодействия с ДНК. Стабилизация полученной структуры с “перевернутым” основанием в среду раствора предлагалась за счет образования дополнительных связей между данным основанием и периферийным заместителем порфирина [63, 64]. Очевидно, что для подобного механизма взаимодействия необходимо, чтобы катионный порфирин был несимметричным, и в нем периферийный заместитель обеспечивал бы комплементарное взаимодействие с вывернутым из стекинга азотистым основанием.

Анализ литературных сведений показал, что число работ, посвященных изучению связывания ДНК с несимметричными порфиринами, очень мало, и, как правило, эти исследования выполнены в последние 5–7 лет. Например, в работе [65] были синтезированы порфирины, содержащие в *транс*-положениях макрокольца две катионные пиридиневые группы и две группы – производные карбазола. В условиях фотооблучения синтезированный порфирин оказывает большее деструктивное действие на ДНК по сравнению с тетракатионным TMPyP. Следует отметить, что убедительных доказательств интеркаляционного взаимодействия в статье не представлено. Кроме того,

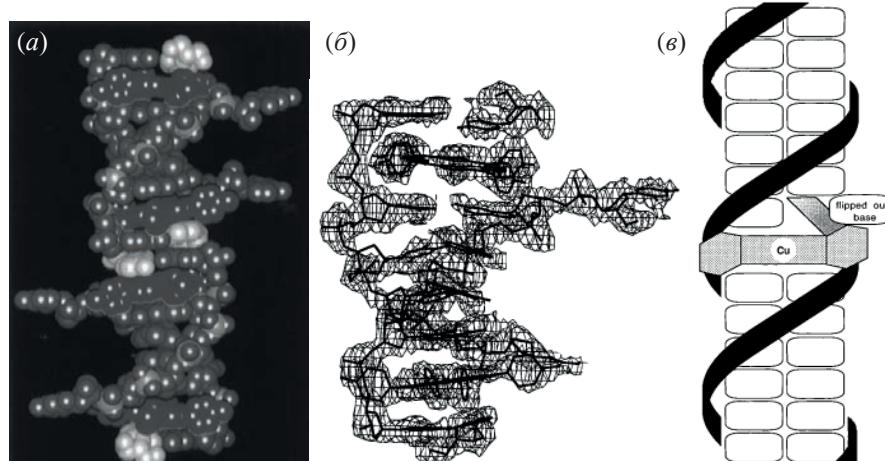


Рис. 6. (a) – Изображение непрерывной спирали, наблюдаемое в кристалле d(CGATCG)-CuTMPyP4; (б) – суммарная электронная плотность комплекса d(CGATCG)-CuTMPyP4; (в) – модель комплекса d(CGATCG)-CuTMPyP4 [58].

очевидно, что карбазолил-содержащий порфирин с двумя периферийными группами, обеспечивающими растворимость, будет очень склонен к агрегации. К сожалению, этот аспект в статье не учитывался.

Рядом исследователей были предприняты попытки изучения взаимодействия ДНК с водонерастворимыми асимметричными порфиринами, например, с порфирин-кумариновыми диадами [66]. Порфирины растворяли в смешанном растворителе 5% ДМФА–TRIS-буфер. Данная публикация интересна с точки зрения проведенных в работе квантово-химических расчетов; результаты экспериментальных исследований сомнительны, в основном по причине использования смешанно-органического растворителя, который существенно влияет на состояние ДНК.

Был синтезирован ряд трикатионных порфиринов, содержащих в четвертом фенильном заместителе порфирина гидрофобные группы: $-\text{C}(\text{O})\text{C}_7\text{F}_{15}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_7\text{H}_{15}$ и $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{15}\text{H}_{31}$, изучено их взаимодействие с ДНК [67]. В работе убедительно показано, что порфирины интеркалируют в ДНК тимуса теленка, увеличение гидрофобности заместителей обеспечивает более высокую аффинность и фотобиологическую активность в отношении плазмидной ДНК pRT15.

Нам не удалось обнаружить публикаций, в которых бы реализовалась схема полуинтеркаляционного взаимодействия между несимметрично замещенными порфиринами и нуклеиновой кислотой с выворачиванием азотистого основания. Поэтому были предложены несколько порфириновых структур (рис. 7), которые впоследствии были синтезированы, и начаты исследования их взаимодействия с репрезентативными олигонуклеотидами и природными ДНК.

В табл. 2 представлены результаты спектрального проявления комплексообразования трикатионных порфиринов с нуклеиновыми кислотами. Обращают на себя внимание большие гипохромные эффекты при связывании несимметричных порфиринов с поли[d(GC)₂], а также аномально большие гипохромные эффекты при связывании с поли[d(AT)₂]. Если опираться на критерий “отпечатков пальцев”, то практически все изученные системы (табл. 2) должны быть отнесены к интеркаляционным комплексам, однако это утверждение неверно. При классической интеркаляции ДНК должна раскрутиться и создать полость для размещения лиганда. При этом сохраняется спаривание

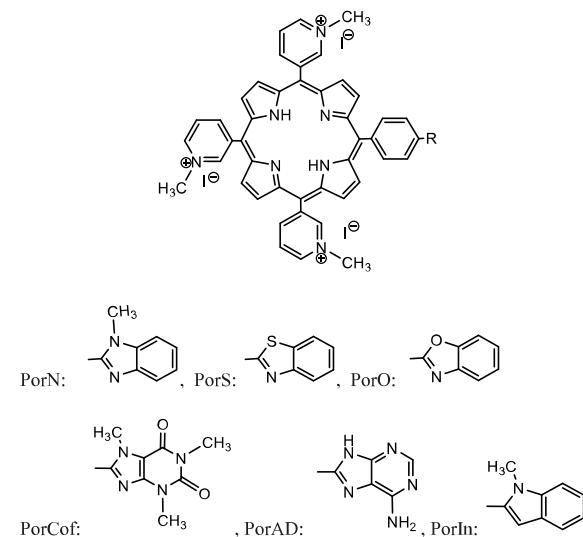


Рис. 7. Несимметричные катионные порфирины, содержащие остатки гетероароматических молекул.

азотистых оснований, а сама нуклеиновая кислота сохраняет свою двойную спиральную структуру. При полуинтеркаляции встраивание объемного порфирина, содержащего гетероароматический фрагмент, может привести к различным последствиям: нарушению спаривания оснований Уотсона–Крика, нарушению спирализации ДНК, нарушению конформации одной из спиралей ДНК, выворачиванию азотистого основания в среду раствора. В каждом конкретном случае микроокружение порфирина будет отличаться, может изменяться поляризация π -системы макрольца и происходить нарушение его планарности, степень π – π -взаимодействия порфиринового макроцикла с азотистыми основаниями также может быть различной. Приведенное в табл. 2 отнесение к типам комплексов сделано по совокупности результатов электронной и флуоресцентной спектроскопии, термохимических методов и ИК-спектроскопических исследований. Несмотря на определенное сходство порфиринов, их взаимодействие с нуклеиновыми кислотами поражает своим разнообразием, например, порфирин с остатком кофеина, единственный из изученных трикатионных гетерил-замещенных порфиринов, образует полуинтеркаляты с полид(AT)₂. Порфирин с остатком индола образует с олигонуклеотидами и природными ДНК интеркаляционные комплексы, в которых интеркалирующий фрагмент представлен гетерильным заместителем, а порфириновый макрогетероцикл образует электростатический комплекс с

Таблица 2. Изменения в электронных спектрах поглощения несимметричных порфиринов при связывании с нуклеиновыми кислотами

Порфирин	ДНК	Батохромный сдвиг Соре, $\Delta\lambda$, нм	Гипохромность H, %	Тип комплекса	Ссылка
PorN	поли[d(GC) ₂]	16	65	Интеркаляция порфиринового макрокольца или интеркаляция моногетерильного заместителя с нарушением спирального π -стекинга	[63, 64]
	поли[d(AT) ₂]	12	42	Внешнее связывание	[63, 64]
	ssДНК	13	62	Внешнее связывание	[64]
	стДНК	12	56	Интеркаляционные комплексы с различной геометрией	[64]
PorS	поли[d(GC) ₂]	15	63	Интеркаляция порфиринового макрокольца или интеркаляция моногетерильного заместителя с нарушением спирального π -стекинга	[63]
	поли[d(AT) ₂]	12	42	Внешнее связывание	[63]
PorO	поли[d(GC) ₂]	15	61	Интеркаляция порфиринового макрокольца или интеркаляция моногетерильного заместителя с нарушением спирального π -стекинга	[63]
	поли[d(AT) ₂]	9	40	Внешнее связывание	[63]
PorCof	поли[d(GC) ₂]	15	52	Интеркаляция порфиринового макрокольца или интеркаляция порфиринового макрокольца с нарушением спирального π -стекинга	[68]
	поли[d(AT) ₂]	9	40	Интеркаляция порфиринового макрокольца или интеркаляция моногетерильного заместителя с нарушением спирального π -стекинга	[68]
	стДНК	11	55	Интеркаляция	[68]
PorAD	поли[d(GC) ₂]	3	40	Интеркаляция порфиринового макрокольца или интеркаляция порфиринового макрокольца с нарушением спирального π -стекинга	–
	поли[d(AT) ₂]	5	23	Интеркаляция порфирина в poly[d(AT) ₂] приводит к нарушению одной из цепей нуклеиновой кислоты, с выворачиванием азотистого основания из спирального стекинга и фиксацией данной конформации за счет дополнительного связывания этого азотистого основания с адениновым заместителем порфирина	–
PorIn	поли[d(GC) ₂]	16	44	Интеркаляция моногетерильного заместителя порфирина, самоассоциация или агрегация комплексов при охлаждении растворов	69
	поли[d(AT) ₂]	6	36	Интеркаляция моногетерильного заместителя порфирина, самоассоциация или агрегация комплексов при охлаждении растворов	69
	стДНК	–	–	Выпадение осадка	69

другой молекулой нуклеиновой кислоты. В результате подобного взаимодействия происходит осаждение нуклеиновых кислот, что может быть использовано в лабораторно-клинической и исследовательской практике для выделения нуклеиновых кислот для сложных анализов, таких как секвенирование, генотипирование, где необходим максимально сохранный образец нуклеиновой кислоты. Исследования взаимодействия несимметричных трикетионных порфиринов с нуклеиновыми кислотами находятся в начальной стадии. На основании имеющихся сведений пока невозможно подтвердить или опровергнуть гипотезу о новом способе повышения селективности за счет многостороннего взаимодействия, но полученные к настоящему времени сведения [63, 64, 68, 69] говорят о высокой перспективности этих соединений. В дальнейшем планируется расширить ряд исследуемых порфиринов, в том числе содержащих остатки азотистых оснований (гуанина, цитозина, ароматических соединений с гибкой и жесткой привязкой в порфириновому макролольду), изучить изменение конформации нуклеиновых кислот при связывании с трикетионными порфиринами, содержащими гетероароматические фрагменты.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный обзор литературы позволяет заключить, что наряду с завораживающей перспективностью применения порфиринов как интеркаляторов ДНК существует огромное количество нерешенных вопросов, среди которых низкая селективность/аффинность связывания интеркаляторов с ДНК, необходимость разработки новых подходов к повышению селективности, малая изученность процессов взаимодействия ДНК с асимметричными порфиринами. Трикетионные порфирины, содержащие гетероароматические остатки молекул, демонстрируют, что характер их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами более сложный и многогранный, систематические исследования подобных систем приведут к новым открытиям, а понимание молекулярного механизма интеркаляции несимметричных порфиринов поможет в дальнейшем улучшить и повысить эффективность разработки лекарств для лечения генетических, онкологических, вирусных и бактериальных заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-13-00235).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных авторами данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равный вклад в написание этой статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hannon M.J.* // Chem. Soc. Rev. 2007. V. 36. P. 280–295. <https://doi.org/10.1039/B606046N>
2. *Lerman L.S.* // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 18–30. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80004-1)
3. *Olweny C.L.M., Toya T., Katongole-Mbidde E., Lwanga S.K., Owor R., Kyawazi S., Vogel C.L.* // Int. J. Cancer. 1974. V. 14. P. 649–656. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910140512>
4. *Malogolowkin M., Cotton C.A., Green D.M., Breslow N.E., Perlman E., Miser J., Ritchey M.L., Thomas P.R.M., Grundy P.E., D'Angio G.J., Beckwith J.B., Shamberger R.C., Haase G.M., Donaldson M., Weetman R., Coppes M.J., Shearer P., Coccia P., Kletzel M., Macklis R., Tomlinson G., Huff V., Newbury R., Weeks D.* // Pediatr. Blood Cancer. 2008. V. 50. P. 236–241. <https://doi.org/10.1002/pbc.21267>
5. *Giermasz A., Makowski M., Nowis D., Jalili A., Małgorzata M.A.J., Dabrowska A., Czajka A., Jakobisiak M., Golab J.* // Oncol. Rep. 2002. V. 9. P. 199–203. <https://doi.org/10.3892/or.9.1.199>
6. *Brunnberg U., Mohr M., Noppeney R., Dürk H.A., Sauerland M.C., Müller-Tidow C., Krug U., Koschmieder S., Kessler T., Mesters R.M., Schulz C., Kosch M., Büchner T., Ehninger G., Dührsen U., Serve H., Berdel W.E.* // Ann. Oncol. 2012. V. 23. P. 990–996. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr346>
7. *Kantarjian H.M., Talpaz M., Kontoyiannis D., Guterman J., Keating M.J., Estey E.H., O'Brien S., Rios M.B., Beran M., Deissroth A.* // J. Clin. Oncol. 1992. V. 10. P. 398–405. <https://doi.org/10.1200/JCO.1992.10.3.398>

8. Minuk L.A., Monkman K., Chin-Yee I.H., Lazo-Langner A., Bhagirath V., Chin-Yee B.H., Mangel J.E. // Leukemia & Lymphoma. 2012. V. 53. P. 57–63.
<https://doi.org/10.3109/10428194.2011.602771>
9. Martinez R., Chacon-Garcia L. // Curr. Med. Chem. 2005. V. 12. P. 127–151.
<https://doi.org/10.2174/0929867053363414>
10. Bhaduri S., Ranjan N., Arya D.P. // Beilstein J. Org. Chem. 2018. V. 14. P. 1051–1086.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.14.93>
11. Mišković K., Bujak M., Baus Lončar M., Glavaš-Obrovac L. // Arh. Hig. Rada Toksikol. 2013. V. 64. P. 593–601.
<https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2371>
12. Mukherjee A., Sasikala W.D. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2013. V. 92. P. 1–62.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411636-8.00001-8>
13. Baruah H., Bierbach U. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 4138–4146.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg465>
14. Bazzicalupi C., Bencini A., Bianchi A., Biver T., Boggioni A., Bonacchi S., Danesi A., Giorgi C., Gratteri P., Ingráin A.M. // Chem. Eur. J. 2008. V. 14. P. 184–196.
<https://doi.org/10.1002/chem.200601855>
15. Berman H.M., Young P.R. // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1981. V. 10. P. 87–114.
16. Hu G.G., Shui X., Leng F., Priebe W., Chaires J.B., Williams L.D. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 5940–5946.
<https://doi.org/10.1021/bi9705218>
17. Dickerson R.E., Drew H.R. // J. Mol. Biol. 1981. V. 149. P. 761–786.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90357-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90357-0)
18. Pföh R., Cuesta-Seijo J.A., Sheldrick G.M. // Acta Crystallog. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun. 2009. V. 65. P. 660–664.
<https://doi.org/10.1107/S1744309109019654>
19. Wang A.H.-J., Ughetto G., Quigley G.J., Hakoshima T., Van der Marel G.A., Van Boom J.H., Rich A. // Science. 1984. V. 225. P. 1115–1121.
<https://doi.org/10.1126/science.6474168>
20. Gao Q., Williams L.D., Egli M., Rabinovich D., Chen S.-L., Quigley G.J., Rich A. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1991. V. 88. P. 2422–2426.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2422>
21. Petersen M., Jacobsen J.P. // Bioconjug. Chem. 1998. V. 9. P. 331–340.
<https://doi.org/10.1021/bc970133i>
22. Günther K., Mertig M., Seidel R. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. P. 6526–6532.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq434>
23. Lee S., Lee Y.-A., Lee H.M., Lee J.Y., Kim D.H., Kim S.K. // Biophys. J. 2002. V. 83. P. 371–381.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75176-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75176-X)
24. Dixon I.M., Lopez F., Estève J.P., Tejera A.M., Blasco M.A., Pratviel G., Meunier B. // Chem. Bio. Chem. 2005. V. 6. P. 123–132.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200400113>
25. Pasternack R.F., Garrity P., Ehrlich B., Davis C.B., Gibbs E.J., Orloff G., Giartosio A., Turano C. // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. C. 5919–5931.
<https://doi.org/10.1093/nar/14.14.5919>
26. Biver T. // Appl. Spectrosc. Rev. 2012. V. 47. P. 272–325.
<https://doi.org/10.1080/05704928.2011.641044>
27. Von Holde K.E., Johnson W.C., Pui S.H. // Principles of Physical Biochemistry, 2nd ed. Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 2006.
28. Kelly J.M., Murphy M.J., McConnell D.J., OhUigin C. // Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. P. 167–184.
<https://doi.org/10.1093/nar/13.1.167>
29. Chirvony V.S., Galievsy V.A., Kruk N.N., Dzhagarov B.M., Turpin P.-Y. // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 1997. V. 40. P. 154–162.
[https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(97\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(97)00043-2)
30. Shen Y., Myslinski P., Treszczanowicz T., Liu Y., Konigstein J. // J. Phys. Chem. C. 1992. V. 96. P. 7782–7787.
31. Keane P.M., Kelly J.M. // Coord. Chem. Rev. 2018. V. 364. P. 137–154.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.02.018>
32. Chirvony V.S., Galievsy V.A., Terekhov S.N., Dzhagarov B.M., Ermolenko V.V., Turpin P.Y. // Biospectroscopy. 1999. V. 5. P. 302–312.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1999\)5:5<302::AID-BSPY5>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1999)5:5<302::AID-BSPY5>3.0.CO;2-N)
33. Bejune S.A., Shelton A.H., McMillin D.R. // Inorg. Chem. 2003. V. 42. P. 8465–8475.
<https://doi.org/10.1021/ic035092i>
34. Wall R.K., Shelton A.H., Bonaccorsi L.C., Bejune S.A., Dube D., McMillin D.R. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 11480–11481.
<https://doi.org/10.1021/ja010005b>
35. Collins D.M., Hoard J.L. // J. Am. Chem. Soc. 1970. V. 92. P. 3761–3771.
36. Ghimire S., Fanwick P.E., McMillin D.R. // Inorg. Chem. 2014. V. 53. C. 11108–11118.
<https://doi.org/10.1021/ic501683t>
37. Mukundan N.E., Petho G., Dixon D.W., Kim M.S., Marzilli L.G. // Inorg. Chem. 1994. V. 33. P. 4676–4687.
38. Aleeshah R., Samakoosh S.Z., Eslami A. // J. Iran. Chem. Soc. 2019. V. 16. P. 1327–1343.
<https://doi.org/10.1007/s13738-019-01609-2>
39. Gray T.A., Marzilli L.G., Yue K.T. // J. Inorg. Biochem. 1991. V. 41. P. 205–219.
[https://doi.org/10.1016/0162-0134\(91\)80013-8](https://doi.org/10.1016/0162-0134(91)80013-8)
40. Pasternack R.F., Gibbs E.J., Villafranca J.J. // Biochemistry. 1983. V. 22. P. 5409–5417.
41. Lebedeva N.S., Yurina E.S., Guseinov S.S., Gubarev Y.A. // Dyes and Pigments. 2023. V. 220. P. 111723.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111723>
42. Mathew D., Sujatha S. // J. Inorg. Biochem. 2021. V. 219. P. 111434.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111434>
43. Hamilton L.D., Barclay R.K., Wilkins M.H.F., Brown G.L., Wilson H.R., Marvin D.A., Ephrussi-Taylor H., Simmons N.S. // J. Cell Biol. 1959. V. 5. P. 397–404.
<https://doi.org/10.1083/jcb.5.3.397>

44. *Lebedeva N.S., Yurina E., Lebedev M., Kiselev A., Syrbu S., Gubareva Y.A.* // *Macroheterocycles*. 2021. V. 14. P. 342–347.
<https://doi.org/10.6060/mhc214031g>
45. *Cenklová V.* // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2017. V. 173. P. 522–537.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.029>
46. *Wang L.-L., Wang H.-H., Wang H., Liu H.-Y.* // *J. Phys. Chem. B*. 2021. V. 125. P. 5683–5693.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c09335>
47. *Tjahjono D. H., Akutsu T., Yoshioka N., Inoue H.* // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1999. V. 1472. P. 333–343.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00139-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00139-7)
48. *Yamamoto T., Tjahjono D.H., Yoshioka N., Inoue H.* // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2003. V. 76. P. 1947–1955.
<https://doi.org/10.1246/bcsj.76.1947>
49. *Tjahjono D.H., Mima S., Akutsu T., Yoshioka N., Inoue H.* // *J. Inorg. Biochem.* 2001. V. 85. P. 219–228.
[https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(01\)00186-6](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00186-6)
50. *Wang P., Ren L., He H., Liang F., Zhou X., Tan Z.* // *ChemBioChem*. 2006. V. 7. P. 1155–1159.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200600036>
51. *Hirakawa K., Harada M., Okazaki S., Nosaka Y.* // *ChemComm*. 2012. V. 48. P. 4770–4772.
<https://doi.org/10.1039/C2CC30880K>
52. *Caminos D.A., Duranini E.N.* // *J. Porphyr. Phthalocyan.* 2005. V. 9. P. 334–342.
<https://doi.org/10.1142/S1088424605000423>
53. *Reddi E., Ceccon M., Valduga G., Jori G., Bommer J. C., Elisei F., Latterini L., Mazzucato U.* // *Photochem. Photobiol.* 2002. V. 75. P. 462–470.
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750462PPAACO2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750462PPAACO2.0.CO2)
54. *Cárdenas-Jirón G.I., Cortez L.* // *J. Mol. Model.* 2013. V. 19. P. 2913–2924.
<https://doi.org/10.1007/s00894-013-1822-z>
55. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Guseinov S.S., Gubarev Y.A., Syrbu S.A.* // *Dyes and Pigments*. 2019. V. 162. P. 266–271.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.10.034>
56. *Oliveira V.A., Terenzi H., Menezes L.B., Chaves O.A., Iglesias B.A.* // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2020. V. 211. P. 111991.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111991>
57. *Vizzotto B.S., Dias R.S., Iglesias B.A., Krause L.F., Viana A.R., Schuch A.P.* // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2020. V. 209. P. 111922.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111922>
58. *Lipscomb L.A., Zhou F.X., Presnell S.R., Woo R.J., Peek M.E., Plaskon R.R., Williams L.D.* // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 2818–2823.
<https://doi.org/10.1021/bi952443z>
59. *Komor A.C., Barton J.K.* // *ChemComm*. 2013. V. 49. P. 3617–3630.
<https://doi.org/10.1039/C3CC00177F>
60. *Galindo-Murillo R., Cheatham T.E.* // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. P. 3735–3747.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab143>
61. *García-Ramos J.C., Galindo-Murillo R., Cortés-Guzmán F., Ruiz-Azúara L.* // *J. Mex. Chem. Soc.* 2013. V. 57. P. 245–259.
62. *Song H., Kaiser J.T., Barton J.K.* // *Nat. Chem.* 2012. V. 4. P. 615–620.
<https://doi.org/10.1038/nchem.1375>
63. *Lebedeva N.Sh., Yurina E.S., Guseinov S.S., Koifman O.I.* // *Macroheterocycles*. 2023. V. 16. P. 211–217.
<https://doi.org/10.6060/mhc2352871>
64. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Guseinov S.S., Syrbu S.A.* // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2023. V. 103. P. 429–440.
<https://doi.org/10.1007/s10847-023-01207-z>
65. *Das A., Mohammed T.P., Kumar R., Bhunia S., Sankaralingam M.* // *Dalton Trans.* 2022. V. 51. P. 12453–12466.
<https://doi.org/10.1039/D2DT00555G>
66. *Cheng F., Wang H.-H., Kandhadi J., Zhao F., Zhang L., Ali A., Wang H., Liu H.-Y.* // *J. Phys. Chem. B*. 2018. V. 122. P. 7797–7810.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b02292>
67. *Li H., Fedorova O.S., Grachev A.N., Trumble W.R., Bohach G.A., Czuchajowski L.* // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Struc. Express.* 1997. V. 1354. P. 252–260.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00118-8)
68. *Syrbu S.A., Kiselev A.N., Lebedev M.A., Yurina E.S., Lebedeva N.Sh.* // *Russ. J. Gen. Chem.* 2023. V. 93. P. S562–S571.
<https://doi.org/10.1134/S1070363223150197>
69. *Lebedeva N.Sh., Yurina E.S., Kiselev A.N., Lebedev M.A., Syrbu S.A.* // *Mendeleev Commun.* 2024. V. 34. P. 525–527.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2024.06.018>

Porphyrins as Polyfunctional Ligands for Binding to DNA. Prospects for Application

N. Sh. Lebedeva* and E. S. Yurina*,[#]

[#] Phone: +7 (493) 233-62-72; e-mail: yurina_elena77@mail.ru

** Institute of Chemistry of Solutions named after G.A. Krestov, Russian Academy of Sciences,
ul. Akademicheskaya 1, Ivanovo, 153045 Russia*

The study of the interaction of nucleic acids with ligands is relevant not only from a scientific point of view, but also has high potential practical significance. Complexes of nucleic acids with ligands affect the biochemical functions of the most important carrier of genetic information, which opens up opportunities for treating genetic diseases and controlling the aging of both cells and the organism as a whole. Among the huge variety of potential ligands, porphyrins and related compounds occupy a special place, due to their ability to generate reactive oxygen species under irradiation with light. The photocatalytic properties of porphyrins can be used in the creation of molecular tools for genetic engineering and the treatment of viral and bacterial infections at the genetic level. Modification of porphyrin compounds allows targeting of the ligand to a specific biological target. The review summarizes the literature data describing the processes of complexation of nucleic acids with aromatic ligands, mainly with porphyrins. The influence of the structure of macroheterocyclic compounds on the features of interaction with nucleic acids is analyzed. Promising directions for further research are outlined.

Keywords: nucleic acids, oligonucleotides, ligands, porphyrins, intercalates



УДК 612.111:612.118.221.3:577.352.38

ЭРИТРОЦИТЫ КРОВИ – БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2024 г. О. Г. Шевченко*, #

* Институт биологии Коми научного центра УрО РАН,
Россия, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28

Поступила в редакцию 07.03.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 19.03.2024 г.

В обзоре представлен анализ собственных и литературных данных, касающихся различных аспектов использования эритроцитов в качестве модели *in vitro* в комплексной оценке антиоксидантной активности широкого спектра природных и синтетических соединений, их смесей и растительных экстрактов. Обсуждены особенности воздействия на эритроцит наиболее часто применяемых в подобных исследованиях инициаторов окислительного стресса – 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида (АAPH) и H_2O_2 , механизмы, лежащие в основе развития гемолитического процесса. Дан критический анализ методологических подходов к оценке уровня гемолиза, характеризующего выживаемость эритроцитов в условиях окислительного стресса и позволяющего судить о наличии мембранопротекторной активности у исследуемых соединений. Рассмотрены критерии комплексной оценки состояния эритроцитов, используемые при изучении клеточных и молекулярных механизмов антиоксидантной активности субстанций широкого спектра на модели окислительного гемолиза эритроцитов. К числу традиционных методов относится определение интенсивности процессов перекисного окисления мембранных липидов на основании концентрации продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, а также оценка относительного содержания окисленных форм гемоглобина в эритроцитах. Перспективный подход – использование современных флуоресцентных методов. В частности, чувствительный маркер окислительного стресса в эритроцитах – флуоресценция продуктов деградации гема, по снижению интенсивности которой можно судить о наличии антиоксидантной активности у исследуемых соединений. Актуальный флуоресцентный метод – оценка уровня окислительного стресса путем измерения внутриклеточной концентрации АФК в эритроцитах. Анализ собственных и литературных данных позволяет рекомендовать метод окислительного гемолиза эритроцитов в скрининге вновь разработанных соединений с целью отбора наиболее интересных кандидатов для дальнейшего углубленного изучения. Его использование целесообразно при установлении зависимости структура–активность и выработке стратегии целенаправленного синтеза новых биологически активных соединений, сочетающих высокую гемосовместимость и антиоксидантную активность, перспективных для биомедицинского применения.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, эритроциты, окислительный гемолиз

DOI: 10.31857/S0132342324060026, **EDN:** NGLVVD

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	721
2. ЭРИТРОЦИТ – УНИВЕРСАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ <i>IN VITRO</i>	722
3. ЭРИТРОЦИТЫ В ИССЛЕДОВАНИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ И МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ	722
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	726

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; АAPH – 2,2'-азобис(амидинопропан)-дигидрохлорид; ВНТ – бутилированный гидрокситолул, ионол; ferrylHb – феррилгемоглобин; metHb – метгемоглобин; MDA – малоновый диальдегид; охуHb – оксигемоглобин; ТВА – 2-тиобарбитуровая кислота.

Автор для связи: (+7 (912) 561-54-65; эл. почта: shevchenko@ib.komisc.ru).

1. ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) генерируются в ходе нормального метаболизма и участвуют в различных клеточных процессах, образуются при воздействии физических факторов и при метаболизме ксенобиотиков [1–5]. Вместе с тем избыток АФК опасен для клеток, что обусловлено их способностью вызывать окислительную модификацию ключевых биомолекул: перекисное окисление липидов (ПОЛ), карбонилирование белков, образование карбонильного (альдегидно-кетонового) аддукта, нитрование, сульфоксидирование, повреждение цепи ДНК (разрывы или окисление азотистых оснований) [6]. Интенсификация процессов ПОЛ сопровождается изменениями структуры и свойств биологических мембран и функции клеток. Соединения, способные препятствовать окислению или замедлять его, действуя в более низкой концентрации по сравнению с концентрацией защищаемого субстрата, относят к антиоксидантам [2]. Усиление образования АФК наряду с уменьшением выработки антиоксидантов приводит к дисбалансу между количеством химически активных окислителей и способностью биологической системы к детоксикации, что идентифицируется как окислительный стресс [6–11].

В настоящее время окислительный стресс ассоциируется со старением и многочисленными хроническими заболеваниями, включая ревматоидный артрит, атеросклероз, сахарный диабет, неврологические и нейродегенеративные расстройства, а также сердечно-сосудистые патологии [2, 3, 6, 9, 12–21]. В последние два десятилетия активно разрабатываются терапевтические стратегии, нацеленные на использование регуляторов свободно-радикальных процессов для лечения заболеваний, связанных с интенсификацией образования АФК [18, 22]. Как природные, так и синтетические антиоксиданты широко используются не только в фармацевтике, но и в пищевой промышленности [3, 20, 23–28]. Вместе с тем сохраняет актуальность поиск новых эффективных и малотоксичных антиоксидантов, их выделение и производство из доступного растительного сырья [11, 29, 30]. В этом плане предметом интенсивных исследований все чаще становятся растительные фенолы вследствие их доступности, высокой биологической активности и меньших побочных эффектов по сравнению с синтетическими антиоксидантами [5, 18, 22, 30–32].

Многолетний опыт исследований природных и синтетических соединений, биологически активных комплексов естественного происхождения и пищевых продуктов свидетельствует о том, что на сегодняшний день не существует простых и универсальных методов оценки антиоксидантной активности в системах *in vitro* [5, 11, 23, 25, 33–42]. Получившие широкое распространение химические тесты не в полной мере учитывают параметры, имеющие значение в биологическом окружении, в том числе липофильность, биодоступность [5, 43, 44], а также 3D-структуру антиоксидантов [22]. Известно, что липофильность, степень инкорпорации, распределение и ориентация в липидном бислойе клеточной мембраны, а также способность к ее стабилизации за счет уменьшения текучести являются факторами, вносящими решающий вклад в эффективность некоторых фенольных антиоксидантов [45–52]. Полагают, что способность этих соединений ограничивать текучесть мембран затрудняет диффузию свободных радикалов и таким образом снижает интенсивность свободнорадикальных реакций [46]. С мембраностабилизирующим действием связывают биологическую активность витамина Е [53] и танинов [54]. Способностью взаимодействовать с гидрофобными и/или гидрофильными областями мембранны посредством образования водородных связей отчасти обусловлена цитопротекторная и антиоксидантная активность отдельных амфифильных производных кофеина [55]. Взаимодействием флавоноидов с мембраной эритроцитов путем образования гидрофобных и гидрофильных связей с белками и липидами объясняют антиоксидантный и мембранопротекторный эффекты экстракта папайи [56]. Проведенные нами комплексные исследования механизмов биологической активности широко известного пространственно-затрудненного фенольного антиоксиданта ВНТ (бутилированный гидрокситолуол, ионол) и новых полусинтетических изоборнилфенолов, синтезированных в Институте химии Коми НЦ УрО РАН, также указывают на то, что способность фенольных антиоксидантов взаимодействовать с клеточной мембраной – важный фактор, определяющий их активность [57, 58].

Таким образом, необходимым условием выявления потенциальных биоантиоксидантов является комплексный подход, сочетающий использование тест-систем различной степени сложности, включая репрезентативные биологические модели, в том числе клеточные [34, 38, 39, 42–44, 59–63].

2. ЭРИТРОЦИТ – УНИВЕРСАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ *IN VITRO*

В последние десятилетия эритроциты являются предметом интенсивного научного интереса [64]. Это уникальные, высокоспециализированные и самые распространенные в организме человека клетки, функция которых не ограничивается транспортом O_2 и CO_2 [64–66]. Зрелые эритроциты млекопитающих не обладают внутренними органеллами, что дает возможность изучать функциональные свойства плазматической мембраны без помех, накладываемых внутриклеточными мембранными образованиями [64, 67–74]. Менее специализированная, чем другие клеточные мембранны, мембрана эритроцитов осуществляет общие функции, что позволяет рассматривать эритроцит как универсальную репрезентативную модель для изучения мембранных систем других клеток [71, 72, 74–77]. Отсутствие ядра и митохондрий исключает влияние АФК на транскрипцию и регуляцию экспрессии генов [43, 78, 61], а также продукцию АФК митохондриями [79], что выгодно отличает эритроцит как модельный объект от других клеток млекопитающих.

Вследствие значительного содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидах мембран, а также высокой концентрации гемоглобина, являющегося промотором окислительных процессов, эритроциты высокочувствительны к окислительным повреждениям [39, 47, 64, 66, 80–90]. Основной источник внутриклеточных АФК в эритроцитах – автоокисление оксигемоглобина, в результате которого образуется супероксид (O_2^-) и H_2O_2 [83, 91, 92].

Указанные выше особенности делают эритроциты удобной и доступной моделью *in vitro* при проведении токсикологических и фармакологических экспериментов [5, 90]. Эти клетки могут использоваться при изучении взаимодействия субстанций различного происхождения и назначения (в том числе лекарственных средств, пестицидов и тяжелых металлов) с клеточной мембраной [64, 77, 93, 94], токсичности ксенобиотиков [64, 90, 95], оценке потенциальной гемосовместимости [64, 96, 97]. Эритроциты могут быть полезны для выявления потенциальных антиоксидантов, установления зависимости структура–активность и детального изучения механизмов действия биологически активных соединений [5, 36, 45, 55, 61, 66, 89, 98–101]. Скрининг с использованием эритроцитов может проводиться и в доклинической оценке вновь разработанных соединений с целью отбора наиболее перспективных кандидатов для дальнейших углубленных исследований [18, 64, 102, 103]. Эксперименты *in vitro* с использованием клеток

млекопитающих представляют интерес и с точки зрения сокращения объема экспериментов на животных, что соответствует современным этическим принципам и существенно удешевляет работы [42, 64, 90, 104].

При проведении экспериментов *in vitro* практикуется использование эритроцитов млекопитающих разных видов, прежде всего это человек [15, 55, 56, 64, 105–111] и лабораторные животные: кролики [39, 100], крысы [47, 70, 86, 89, 112, 113] и мыши [114–117]. Кроме того, возможно использование эритроцитов овец [30, 39, 44, 118], крупного рогатого скота [39, 119, 94], свиней [120], верблюдов [94] и лошадей [39, 98]. В большинстве публикаций выбор источника эритроцитов никак не обосновывается, очевидно, он обусловлен их доступностью для конкретной лаборатории [39, 121].

Необходимо отметить существование явно выраженных различий между эритроцитами млекопитающих различных видов, включая человека, в том числе по характеристикам липидов мембран [94, 122, 123]. Нами, в частности, были обобщены результаты сравнительного анализа состава фосфолипидов эритроцитов крови различных видов грызунов, выявлены существенные межвидовые различия в соотношении холинсодержащих фракций фосфолипидов (фосфатидилхолина и сфингомиэлина) [121]. Экспериментально подтверждено, что указанные особенности структуры эритроцитарных мембран обусловливают различия в реакции эритроцитов грызунов разных видов на воздействие химических соединений, способных взаимодействовать с липидами мембраны [124]. На вариабельность ответа эритроцитов животных разных видов на воздействие природных соединений, тяжелых металлов и АФК указано и в работах [39, 94, 125, 126]. Таким образом, использование эритроцитов в качестве модели *in vitro* при изучении механизмов действия соединений различной природы предполагает адекватный выбор их источника и выполнение всех экспериментов на одном объекте [121, 124].

3. ЭРИТРОЦИТЫ В ИССЛЕДОВАНИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ И МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ

Использование эритроцитов непосредственно для выявления антиоксидантной активности различных субстанций, а также в целях углубленного изучения ее молекулярных и клеточных механизмов началось в 80–90-х гг. XX столетия [45, 67, 105, 127]. С тех пор метод окислительного гемолиза, основанный на ингибировании анти-

оксидантами повреждений мембранных эритроцитов, индуцированных источниками свободных радикалов, нашел широкое применение в мировой практике. Разработаны и продолжают совершенствоваться его различные вариации и комбинации с другими методами [5, 39, 62, 69, 70, 98, 128].

Окислительный гемолиз эритроцитов активно используется для оценки антиоксидантных свойств экстрактов лекарственных и пищевых растений [5, 29, 43, 56, 62, 108, 109, 112, 119, 129–132], а также соков, вина и чая [36, 129, 133]. Указанный метод нашел широкое применение при выявлении и изучении антиоксидантной активности индивидуальных соединений растительного происхождения, их производных и смесей, в том числе фенольных кислот и полифенолов [48, 30, 60, 118, 134–137], алкалоидов [55], поли- [113, 114, 138, 139] и олигосахаридов [38, 106, 115, 116], гликопротеинов [140], аминокислот [141], пептидов [100, 110], а также синтетических низкомолекулярных соединений [73, 142, 143].

В последние годы окислительный гемолиз эритроцитов активно используется и в нашей лаборатории при исследовании антиоксидантной активности разнообразных гидроксиароматических соединений [58, 144–166], их конъюгатов с порфиринаами [167], растительными полисахаридами [168, 169], полизиленгликолями [170] и наночастицами на основе бёмита (γ -Al(OH)) [171–173]. С использованием эритроцитов в качестве клеточной модели нами проведена сравнительная оценка антиоксидантных свойств производных хлорофилла *a* [174], различных гетероциклических соединений [175–177], аллилполиалкоксибензенов [178], монотерпеновых спиртов [179], комплексов меди с терпеновыми производными этилендиамина [180], антрахинонов [181–192], широкого спектра сероорганических соединений [182–192]. Нашел свое применение этот подход и в комплексном изучении биологической активности растительных экстрактов: древесной зелени сосны и лиственницы [193], плодов жимолости голубой [194], барбариса [195], рябины обыкновенной [196], а также отрубей пшеницы различных сортов [197].

Окислительный гемолиз может быть инициирован различными химическими веществами, способными к образованию радикалов. Чаще всего для этих целей используют 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорид (ААРН) [5, 29, 38, 39, 44, 45, 55, 59, 62, 69, 98–100, 105, 106, 108–110, 114, 118, 127, 130, 132, 134, 136–140, 142, 143, 198, 199] и пероксид водорода [38, 56, 62, 66, 105, 112, 115, 117, 119, 131, 135]. ААРН – небольшая молекула, при разложении которой в водной

фазе с постоянной скоростью образуются сначала алкильные (R^\bullet), а далее, вследствие реакции с кислородом, – пероксильные (ROO^\bullet) радикалы, воздействующие на мембрану эритроцита [5, 39, 62, 67, 69, 105, 127, 200]. ААРН индуцирует гемолиз, интенсивность которого зависит от времени и концентрации ААРН. Характеризующая его сигмоидальная кривая имеет лаг-фазу, уменьшающуюся с увеличением концентрации ААРН [39, 106]. Гемолиз, индуцированный ААРН, включает полное и быстрое истощение внутриклеточного восстановленного глутатиона [69, 105, 106], за которым следует ПОЛ, окисление и деградация мембранных белков с образованием высокомолекулярных продуктов [59, 69, 70, 105, 106, 198, 200], окисление оксигемоглобина [98, 106, 136] и транспортных трансмембранных белков полосы 3 [70, 132, 200], и в конечном итоге к лизису клеток.

В отличие от ААРН, H_2O_2 – физиологический гидропероксид, который постоянно образуется в различных органах и клетках, включая эритроциты, вследствие дисмутации супероксидного анион-радикала $O_2^\bullet-$ [84, 201]. Экзогенный пероксид водорода легко проникает в эритроциты [84, 201] и взаимодействует с первичной мишенью – оксигемоглобином (oxyHb), окисляя его до метгемоглобина (metHb) и феррилгемоглобина (ferrylHb) с образованием высокореактивного гидроксильного радикала OH^\bullet [84, 105, 107, 202], самого сильного из известных окислителей [60]. Феррильные производные обладают относительно высокой цитотоксичностью [203] и способны окислять различные биомолекулы, включая SH-содержащие ферменты [202]. Взаимодействие окисленного гемоглобина с мембранными белками полосы 3 приводит к нарушению мембранных транспорта и проницаемости [66, 204]. Окисление гемоглобина H_2O_2 сопровождается деградацией гема, высвобождением железа и формированием флуоресцирующих продуктов [92, 205–207]. Другое последствие окислительных повреждений эритроцитов крови под воздействием H_2O_2 – активация ПОЛ [66, 67, 127].

Общий механизм действия антиоксидантов в условиях окислительного гемолиза эритроцитов может включать их взаимодействие с фосфолипидами мембранных, способствующее снижению текучести; ингибирование перекисного окисления мембранных липидов; хелатирование Fe^{2+} , высвобождающегося при окислении гемоглобина; взаимодействие с триптофановыми остатками белков, включая белки полосы 3 [5, 208]. О наличии антиоксидантной и мемранопротекторной активности у исследуемых субстанций судят по их способности увеличивать выживаемость эрит-

роцитов в условиях окислительного стресса. В процессе исследования оценивают уровень гемолиза (в динамике) и наличие лаг-фазы, т.е. времени, в течение которого соединения, обладающие антиоксидантной активностью, способны полностью ингибировать гемолиз. Добавление экзогенных антиоксидантов удлиняет лаг-фазу, а разница в лаг-фазе в присутствии и при отсутствии антиоксидантов рассматривается как период ингибирования, отражающий способность антиоксиданта защищать эритроциты [39, 67, 88, 106, 134, 200].

Количественная оценка уровня гемолиза, как правило, проводится спектрофотометрическим методом по концентрации гемоглобина. В большинстве публикаций содержится информация об определении степени гемолиза по абсорбции предварительно отцентрифужированного супернатанта при $\lambda = 540$ – 544 нм, что соответствует максимуму поглощения оксигемоглобина (oxyHb) [39]. Однако при указанной длине волны можно корректно определять лишь концентрацию оксигемоглобина, тогда как в процессе окислительного гемолиза происходит образование метгемоглобина (metHb) и смещение максимума поглощения, вследствие чего истинная степень гемолиза не дооценивается [5, 98]. Выход из этой ситуации – регистрация поглощения при $\lambda = 523$ – 524 нм или при 591 нм – изосбестических точках в реакции окисления гемоглобина. В этом случае независимо от степени окисления гемоглобина измеренная абсорбция будет отражать концентрацию всего высвобожденного гемоглобина [5, 39, 98, 209].

Оценка антиоксидантной активности широкого спектра субстанций методом окислительного гемолиза предусматривает использование комплекса критериев, характеризующих состояние эритроцитов. К числу традиционных методов относится анализ интенсивности процессов ПОЛ на основании концентрации продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, а также определение относительного содержания окисленных форм гемоглобина (metHb и ferrylHb) в эритроцитах. Соединения, обладающие антиоксидантной активностью, не только увеличивают выживаемость эритроцитов, ингибируя окислительный гемолиз (т.е. проявляют мембранопротекторную активность), но и способствуют снижению интенсивности ПОЛ в мембранах эритроцитов. Образующиеся вследствие интенсификации ПОЛ гидроперекиси липидов очень нестабильны и быстро распадаются на вторичные продукты, такие как альдегиды (например, 4-гидрокси-2,3-ноненаль) и малоновый диальдегид (MDA) [5, 210]. MDA представляет собой высокореактив-

ную бифункциональную молекулу, способную нарушать различные функции мембран путем сшивания белков и фосфолипидов, что, в конечном итоге, приводит к их разрушению [66, 211–213]. Ввиду того, что MDA способен взаимодействовать с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-thiobarbituric acid, TBA) с образованием окрашенного комплекса, оценка интенсивности процессов ПОЛ в мембранах эритроцитов на основании концентрации TBA-активных продуктов (TBA-reactive substances, TBA-RS) широко используется при оценке антиоксидантной активности различных соединений [5, 29, 30, 44, 48, 55, 60, 62, 65, 66, 69, 70, 100, 105–107, 118, 127, 136, 137, 140, 198].

Поскольку содержание гемоглобина (Hb) составляет 95–97% от общего количества белков эритроцитов, именно он является основной мишенью АФК в этих клетках. В отличие от оксигемоглобина, метгемоглобин не способен выполнять основную физиологическую функцию – транспорт кислорода, что в условиях организма приводит к возникновению острой или хронической гипоксии [55, 214, 215]. Способность потенциальных биоантиоксидантов снижать содержание продуктов окисления гемоглобина (metHb и ferrylHb) также традиционно используют при оценке активности различных соединений и экстрактов в условиях окислительного гемолиза [29, 38, 54, 55, 66, 69, 105, 106, 108, 109, 136, 204].

Перспективный подход – использование современных флуоресцентных методов. Так, помимо относительного содержания окисленных форм гемоглобина чувствительным маркером окислительного стресса является флуоресценция продуктов деградации гема в лизатах эритроцитов [92, 206, 207, 2015]. Нами экспериментально подтверждено, что снижение интенсивности флуоресценции этих продуктов в присутствии потенциальных антиоксидантов также может использоваться как один из показателей, характеризующих антиоксидантную активность широкого спектра соединений [146–151, 153, 155, 157, 162–166, 177]. Отметим, что указанный метод может использоваться лишь в случае отсутствия собственной флуоресценции у изучаемых соединений в исследуемой области спектров (возбуждение при $\lambda = 321$ нм, эмиссия при $\lambda = 450$ – 480 нм).

Актуальный флуоресцентный метод оценки уровня окислительного стресса – прямое измерение внутриклеточной концентрации АФК в эритроцитах (cellular antioxidant assay, CAA-RBC) [5]. 2',7'-Диацетат дихлордигидрофлуоресцина (HDCF-DA) диффундирует в клетки и деацети-

лируется клеточными эстеразами с образованием 2',7'-дихлордигидрофлуоресцена (H₂DCF) [5, 34, 43, 61, 63, 90, 215, 216]. В процессе окислительного гемолиза эритроцитов H₂DCF быстро окисляется до конечного флуоресцирующего продукта – 2,7'-дихлорфлуоресцена (DCF). Степень ингибирования клеточной флуоресценции в последние годы широко используется в качестве одного из критериев антиоксидантной активности соединений [5, 35, 42, 43, 44, 61, 99, 111, 118, 130, 133, 139, 140, 215, 217, 218].

Исследования антиоксидантных свойств отдельных соединений, преимущественно фенольной природы, а также содержащих их растительных экстрактов может сопровождаться анализом морфологической трансформации эритроцитов, дающей ценную информацию как об особенностях взаимодействия антиоксидантов с клеточной мембраной, их распределении в ней, так и о физиологическом состоянии эритроцита в условиях окислительного стресса. Форма эритроцитов и ее изменения – важный показатель функционального состояния этих клеток в норме и при воздействии различных факторов [65, 71, 72, 208, 219–223]. По структуре поверхности эритроциты здорового организма представляют собой гетерогенную популяцию клеток, состав которой может динамически изменяться под воздействием физиологических и патологических факторов. В норме основную массу зрелых циркулирующих в крови эритроцитов составляют дискоциты [65, 224]. Вместе с тем морфологические изменения эритроцитов наблюдаются не только у циркулирующих в крови клеток, но также имеют место в условиях *in vitro* при взаимодействии эритроцитов с некоторыми химическими соединениями. Характер изменения формы эритроцитов вследствие интеркаляции экзогенных веществ в клеточную мембрану указывает на особенности распределения соединений во внутримембранном пространстве. Считается [225], что соединения, приводящие к образованию эхиноцитов (эритроцитов со множественными шиповидными выростами), встраиваются во внешний монослой эритроцитарной мембранны, вызывая непропорциональное увеличение его площади. В случае проникновения вещества во внутренний монослой происходит увеличение площади последнего, что приводит в конечном итоге к формированию стоматоцитов (эритроцитов чашевидной формы). Таким образом, ценная информация об особенностях взаимодействия различных соединений с мембраной и их распределении в ней может быть получена при

анализе морфологической трансформации эритроцитов методом сканирующей электронной микроскопии [72, 75, 90, 225, 226]. Указанный подход использовался при изучении молекулярных и клеточных механизмов действия экстрактов растений и прополиса, содержащих природные антиоксиданты [72, 132, 199, 222, 223], индивидуальных флавоноидов и фенольных кислот [71, 219, 221], нестероидных противовоспалительных и иных фармакологических препаратов [72, 75, 220, 227, 228], производных 5-гидроксибензимидазола [226], синтезированных в ИХФ РАН гибридных антиоксидантов (ИХФАнов) [229–231] и анфенов [232]. Для ИХФАнов отмечена не только способность изменять форму эритроцитов за счет интеркаляции веществ в мембранные слои, но и существенная гемолитическая активность в высоких концентрациях [231]. Анализ морфологической трансформации способен дать информацию не только о распределении антиоксидантов в клеточной мембране, но также и об их способности препятствовать патологической модификации формы клеток под воздействием H₂O₂ [56, 112], АAPH [132], а также других индукторов окислительного гемолиза [71, 119, 221–223]. Исследование поверхностной архитектоники эритроцитов методом сканирующей электронной микроскопии проводилось и нами в комплексном изучении механизмов активности новых антиоксидантов – изоборнилфенолов и их производных [58, 233], а также терпенофенол-хлориновых конъюгатов [174]. Анализ морфологической трансформации эритроцитов при взаимодействии с изоборнилфенолами подтвердил способность этих соединений взаимодействовать с клеточной мембраной и изменять ее структурное состояние. Выявлена статистически значимая связь между характером морфологической трансформации эритроцитов (долей необратимо измененных клеток – стоматоцитов) и эритротоксичностью отдельных изоборнилфенолов [58, 233]. Изучение поверхностной структуры эритроцитов после инкубации с новыми терпенофенол-хлориновыми конъюгатами показало, что мембранопротекторная и антиоксидантная активность синтезированных соединений существенным образом зависит от их способности интеркалировать в эритроцитарную мембрану, что в значительной степени определяется природой заместителя амидной группы в положении 13(2) [174].

О способности антиоксидантов фенольной природы взаимодействовать с липидной фазой биомембран и изменять ее структуру можно судить

и на основании экспериментов с дополнительным воздействием на эритроциты Triton X-100 (алкилфенилполиэтиленгликоля). Указанный неионный детергент способен проникать в липидный бислой, нарушать его структуру и увеличивать подвижность углеводородных цепей фосфолипидов, что приводит к увеличению проницаемости мембраны и, в итоге, к гемолизу [234, 235]. Определяющий фактор устойчивости мембран к воздействию Triton X-100 – степень упорядоченности ацильных цепей фосфолипидов [236]. По нашим данным, предварительная инкубация эритроцитов с терпенофенолами, содержащими свободную карбоксильную группу, усиливалась их чувствительность к гемолитическому действию Triton X-100 [124, 145]. Полученные результаты позволяют предположить, что указанные фенольные антиоксиданты даже в относительно низких концентрациях, не вызывающих гемолиза, способны существенно изменять структуру липидной фазы мембран, что не может не отразиться на их биологической активности [154, 233]. Это предположение хорошо согласуется с результатами экспериментов, свидетельствующих о том, что именно различия в физико-химических особенностях структуры мембран обусловливают неодинаковую чувствительность эритроцитов млекопитающих разных видов к дестабилизирующему действию Triton X-100 [121, 124, 236].

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эритроцит в системе *in vitro* – удобная и доступная модель для изучения молекулярных и клеточных механизмов действия антиоксидантов. Скрининг с использованием эритроцитов может применяться в оценке вновь разработанных соединений с целью отбора наиболее интересных кандидатов для дальнейшего углубленного изучения. Полученные результаты могут способствовать целенаправленному синтезу новых биологически активных соединений, сочетающих высокую гемосовместимость и антиоксидантную активность, перспективных для биомедицинского применения.

Рассмотренные в обзоре подходы, в основе которых лежит использование эритроцитов в качестве модельного объекта, далеко не исчерпывающие. Использование тех или иных методов в скрининге, нацеленном на выявление новых антиоксидантов, а также в углубленном изучении механизмов их действия зависит как от поставленных задач, так и от возможностей конкретной лаборатории. В данном обзоре сделан акцент на методы, наиболее часто применяемые в исследованиях новых субстанций, активно проводимых в последнее десятилетие на базе Института биологии Коми НЦ

УрО РАН в тесном содружестве с сотрудниками Института химии Коми НЦ УрО РАН. Анализ собственных и литературных данных позволяет рекомендовать метод окислительного гемолиза эритроцитов в скрининге новых соединений с целью отбора наиболее интересных продуктов для дальнейшего углубленного изучения, исследование зависимости структура–активность, выработке стратегии целенаправленного синтеза новых биологически активных соединений.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание № 122040600022-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных автором данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор ОГШ написал данную статью.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Prior R.L., Cao G.* // HortScience. 2000. V. 35. P. 588–592.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.4.588>
2. *Litescu S.C., Eremia S., Radu G.L.* // Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology / Eds. Giardi M.T., Rea G., Berra B. Springer, Boston, MA, 2010. V. 698.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7347-4_18
3. *Neha K., Haider M.R., Pathak A., Yar M.S.* // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 178. P. 687–704.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
4. *Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tyagunova E.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 657–674.
<https://doi.org/10.31857/S013234232005022X>
5. *Cruz T.M., Lima A.S., Silva A.O., Mohammadi N., Zhang L., Azevedo L., Marques M.B., Granato D.* // Food Chem. 2024. V. 440. P. 138281.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138281>

6. *Pisoschi A.M., Pop A., Jordache F., Stanca L., Predoi G., Serban A.I.* // Eur. J. Med. Chem. 2021. V. 209. P. 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>
7. *Sies H.* // Am. J. Med. 1991. V. 91. P. 31S–38S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)
8. *McCall M.R., Frei B.* // Free Radic. Biol. Med. 1999. V. 26. P. 1034–1053. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00302-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00302-5)
9. *Willett W.C.* // Science. 2002. V. 296. P. 695–698. <https://doi.org/10.1126/science.1071055>
10. *Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrato F., Altavilla D., Bittar A.* // Oxid. Med. Cell. Longev. 2017. V. 2017. P. 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
11. *Siddeeq A., AlKehayez N.M., Abu-Hiamed H.A., Al-Sanea E.A., AL-Farga A.M.* // Saudi J. Biol. Sci. 2021. V. 28. P. 1633–1644. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>
12. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* // Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford, New York: Oxford University Press, 1999. 936 p. ISBN: 9780198500452.
13. *Noda N., Wakasugi H.* // Japan Med. Assoc. J. 2001. V. 44. P. 535–539.
14. *Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee H., Zhu X.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1842. P. 1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2013.10.015>
15. *Wojtunik-Kulesza K.A., Oniszczuk A., Oniszczuk T., Waksmundzka-Hajnos M.* // Rev. Biomed. Pharmacother. 2016. V. 78. P. 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.bioph.2015.12.024>
16. *Chen C., Zhang Y., Gao Y., Xu Q., Ju X., Wang L.* // J. Functional Foods. 2016. V. 26. P. 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.016>
17. *Ranneh Y., Ali F., Akim A.M., Abd H., Hamid H., Khazaai A.F.* // Appl. Biol. Chem. 2017. V. 60. P. 327–338. <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0285-9>
18. *Liu Z.-Q.* // Eur. J. Med. Chem. 2020. V. 189. P. 112020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112020>
19. *McKay G.J., Lyner N., Linden G.J., Kee F., Moitry M., Biasch K., Amouyal Ph., Dallongeville J., Bongard V., Ferrieres J., Gey K.F., Patterson C.C., Woodside J.V.* // Eur. J. Nutr. 2021. V. 60. P. 2631–2641. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02455-2>
20. *Varesi A., Varesi A., Chirumbolo S., Lim C., Pierella E., Piccini G.B., Carrara A., Ricevuti G., Scassellati C., Bonvicini C., Pascale A.* // Antioxidants (Basel). 2022. V. 11. P. 1224. <https://doi.org/10.3390/antiox11071224>
21. *Martemucci G., Costagliola C., Mariano M., D'Andrea L., Napolitano P., D'Alessandro A.* // Oxygen. 2022. V. 2. P. 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>
22. *Liu Z.-Q.* // Food Chem. 2022. V. 380. P. 132143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132143>
23. *Cavallini G., Dachà M., Potenza L., Ranieri A., Scattino C., Castagna A., Bergamini E.* // Plant Foods Hum. Nutr. 2014. V. 69. P. 108–114. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0414-0>
24. *Carocho M., Morales P., Ferreira I.C.F.R.* // Trends Food Sci. Technol. 2018. V. 71. P. 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>
25. *Görmert E.D., Gökmen V.* // Food Res. Int. 2018. V. 105. P. 76–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.056>
26. *Olmo-Cunillera A., Escobar-Avello D., Pérez A.J., Marhuenda-Muñoz M., Lamuela-Raventós R.M., Vallverdú-Queralt A.* // Nutrients. 2020. V. 12. P. 54. <https://doi.org/10.3390/nu12010054>
27. *Sharma A., Yada M., Tiwari A., Ali U., Krishnan M., Bala M., Mridula D., Sharma P., Goudar G., Roy J.K., Navik U., Garg M.* // J. Cereal Sci. 2023. V. 112. P. 103719. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2023.103719>
28. *Chen X., Tang W., Li X., Zhuang K., Lyu Q.* // LWT. 2023. V. 177. P. 114369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114369>
29. *Jesus F., Gonçalves A.C., Alves G., Silva L.R.* // Food Res. Int. 2019. V. 116. P. 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.079>
30. *Zheng Q., Tan W., Feng X., Feng K., Zhong W., Liao C., Liu Y., Li S., Hu W.* // Molecules. 2022. V. 27. P. 7625. <https://doi.org/10.3390/molecules27217625>
31. *Adelakun O.E., Kudanga, T., Green, I.R., le Roes-Hill, M., Burton, S.G.* // Process Biochem. 2012. V. 47. P. 1926–1932. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.027>
32. *Aruwa C.E., Amoo S.O., Koordanally N., Kudanga T.* // Biocatal. Agrie. Biotechnol. 2021. V. 35. P. 102105. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102105>
33. *Huang D., Ou B., Prior R.L.* // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 184–11856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
34. *Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P.* // Prog. Lipid Res. 2007. V. 46. P. 244. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.05.002>
35. *Singh S., Singh R.P.* // Food Rev. Int. 2008. V. 24. P. 392–415. <https://doi.org/10.1080/87559120802304269>
36. *Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.-O., Dommes J.* // Food Chem. 2009. V. 113. P. 1226–1233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.013>
37. *Niki E.* // Free Radic. Biol. Med. 2010. V. 49. P. 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>
38. *Fernandes J.C., Eaton P., Nascimento H., Giao M.S., Ramos O.S., Belo L., Silva A.S., Pintado M.E., Malcata F.X.* // Carbohydr. Polym. 2010. V. 79. P. 1101–1106. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.050>
39. *Takebayashi J., Chen J., Tai A.A.* // In: Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology / Ed. Armstrong D. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. V. 594. P. 287–296. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_20

40. *Alam M.N., Bristi N.J., Rafiquzzaman M.* // Saudi Pharm. J. 2013. V. 21. P. 143–152.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsp.2012.05.002>
41. *Carocho M., Ferreira I.C.F.R.* // Food Chem. Toxicol. 2013. V. 51. P. 15–25.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
42. *Martinelli E., Granato D., Azevedo L., Gonçalves J.E., Lorenzo J.M., Munekata P.E.S., Simal-Gandara J., Barba F.J., Carrillo C., Rajoka M.S.R., Lucin L.* // Trends Food Sci. Technol. 2021. V. 116. P. 232–243.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.024>
43. *López-Alarcón C., Denicola A.* // Anal. Chim. Acta. 2013. V. 763. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
44. *He J.-R., Zhu J.-J., Yin S.-W., Yang X.-Q.* // Food Hydrocolloids. 2022. V. 122. P. 107076.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107076>
45. *Koga T., Moro K., Terao J.* // Lipids. 1998. V. 33. P. 58–995.
<https://doi.org/10.1007/s11745-998-0244-4>
46. *Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M.* // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 373. P. 102–109.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1525>
47. *López-Revuelta A., Sánchez-Gallego J.I., Hernández-Hernández A., Sánchez-Yagüe Y., Llanillo M.* // Chem. Biol. Interact. 2006. V. 161. P. 79–91.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.03.004>
48. *Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., Piacentini M.P., Piatti E.* // Food Chem. 2007. V. 104. P. 1635–1640.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.014>
49. *Chaudhuri S., Banerjee A., Basu K., Sengupta B., Sengupta P.K.* // Int. J. Biol. Macromol. 2007. V. 41. P. 42–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.12.003>
50. *Chen Y., Deuster P.* // Chemico-Biological Interactions. 2009. V. 182. P. 7–12.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.06.007>
51. *Hapner C.D., Deuster P., Chen Y.* // Chem. Biol. Interact. 2010. V. 186. P. 275–279.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.05.010>
52. *Koh J.J., Qiu S., Zou H., Lakshminarayanan R., Li J., Zhou X., Tang C., Saraswathi P., Verma C., Tan D.T.H., Tan A.L., Liu S., Beuerman R.W.* // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1828. P. 834–844.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.004>
53. *Wang F., Wang T., Lai J., Li M., Zou C.* // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 71. P. 799–805.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.002>
54. *Olchowik-Grabarek E., Makarova K., Mavlyanov S., Abdullajanova N., Zamaraeva M.* // Environ Sci. Pollut. Res. 2018. V. 25. P. 1200–1209.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0520-2>
55. *Sierakowska A., Jasiewicz B., Piosik Ł., Mrówczyńska L.* // Sci. Rep. 2023. V. 13. P. 1785.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-27205-8>
56. *Kumar S.S., Ka K., John M.* // Food and Humanity. 2023. V. 1. P. 159–164.
<https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.05.007>
57. *Shishkina L.N., Kozlov M.V., Marakulina K.M., Plashchina I.G., Plyusnina S.N., Shevchenko O.G., Fedorova I.V., Chukicheva I.Y., Kutchin A.V.* // Biophysics. 2012. V. 57. P. 786–791.
<https://doi.org/10.1134/S0006350912060164>
58. *Shevchenko O.G., Plyusnina S.N., Shishkina L.N., Chukicheva I.Y., Fedorova I.V., Kutchin A.V.* // Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A. 2013. V. 7. P. 302–312.
<https://doi.org/10.1134/S1990747812060062>
59. *Hseu Y.-C., Chang W.-H., Chen C.-S., J.-W. Liao, Huang C.-J., Lu F.-J., Chia Y.-C., Hsu H.-K., Wu J.-J., Yang H.-L.* // Food Chem. Toxicol. 2008. V. 46. P. 105–114.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.003>
60. *Filipe P., Silva A.M.S., Seixas R.S.G.R., Pinto D.C.G.A., Santos A., Patterson L.K., Silva J.N., Cavaleiro J.A.S., Freitas J.P., Mazie J.-C., Santus R., Morlie P.* // Biochem. Pharmacol. 2009. V. 77. P. 957–964.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.023>
61. *Blasa M., Angelino D., Gennari L., Ninfali P.* // Food Chem. 2011. V. 125. P. 685–691.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.065>
62. *Botta A., Martínez V., Mitjans M., Balboa E., Conde E., Vinardell M.P.* // Toxicol. In Vitro. 2014. V. 28. P. 120–124.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.10.004>
63. *Chen Y., Lin Q., Wang J., Mu J., Liang Y.* // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 224. P. 958–971.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.181>
64. *Podsiedlik M., Markowicz-Piasecka M., Sikora J.* // Chem. Biol. Interact. 2020. V. 332. 109305.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109305>
65. *Fujii J., Homma T., Kobayashi S., Warang P., Madkaikar M., Mukherjee M.B.* // Free Radic. Res. 2021. V. 55. P. 562–580.
<https://doi.org/10.1080/10715762.2021.1873318>
66. *Remigante A., Spinelli S., Straface E., Gambardella L., Caruso D., Falliti G., Dossena S., Marino A., Mora-bito R.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 10991.
<https://doi.org/10.3390/ijms231910991>
67. *Niki E., Yamamoto Y., Takahashi M., Yamamoto K., Yamamoto Y., Komuro E., Miki M., Mino M.* // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 1988. V. 34. P. 507–515.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.34.507>
68. *Chen J.Y., Huestis W.H.* // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1323. P. 299–309.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(96\)00197-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(96)00197-6)
69. *Zou C.G., Agar N.S., Jones G.L.* // Life Sci. 2001. V. 69. P. 75–86.
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(01\)01112-2](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)01112-2)
70. *Reddy C.S.S.S., Subramanyam M.V.V., Vani R., Devi S.A.* // Toxicol. In Vitro. 2007. V. 21. P. 1355–1364.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>

71. *Suwalsky M., Vargas P., Avello M., Villena F., Sotomayor C.P.* // *Int. J. Pharm.* 2008. V. 363. P. 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.005>
72. *Suwalsky M., Manrique M., Villena F., Sotomayor C.P.* // *Biophys. Chem.* 2009. V. 141. P. 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2008.12.010>
73. *Omarova E.O., Antonenko Y.N.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2014. V. 79. P. 139–145. <https://doi.org/10.1134/S0006297914020072>
74. *Manaargadoo-Catin M., Ali-Cherif A., Pougnas J.-L., Perrin C.* // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2016. V. 228. P. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.10.011>
75. *Suwalsky M., Belmar J., Villena F., Gallardo M.J., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. V. 539. P. 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.09.006>
76. *D'Alessandro A., Hansen K.C., Eisenmesser E.Z., Zimring J.C.* // *Blood Transfus.* 2019. V. 17. P. 281–288. <https://doi.org/10.2450/2019.0072-19>
77. *Petit K., Suwalsky M., Colina J.R., Aguilar L.F., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2019. V. 1861. P. 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.10.009>
78. *Finkel T.* // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1998. V. 10. P. 248–253. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(98\)80147-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80147-6)
79. *Buehler P.W., Alayash A.I.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2005. V. 7. P. 1755–1760. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1755>
80. *Chiu D., Lubin B., Shohet S.B.* // *Free Radicals in Biology* / Ed. Pryor W.A. New York: Academic Press, 1982. V. 5. P. 115–160. ISBN: 9780323156837
81. *Chiu D., Kuypers F., Lubin B.* // *Semin. Hematol.* 1989. V. 26. P. 257–276.
82. *Sadrzadeh S.M.H., Graf E., Panter S.S., Hallaway P.E., Eaton J.W.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 14354–14356.
83. *Clemens M.R., Waller H.D.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1987. V. 45. P. 251–268. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90068-5)
84. *Van den Berg J.M., Kamp J.A.F., Lubin B.H., Roelofsen B., Kuypers F.A.* // *Free Radic. Biol. Med.* V. 1992. V. 12. P. 487–498. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90102-m](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90102-m)
85. *Domanski A.V., Lapshina E.A., Zavodnik I.B.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. P. 761–769. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0181-5>
86. *López-Revuelta A., Sánchez-Gallego J.I., Hernandez-Hernandez A., Sánchez-Yagge J., Llanillo T.M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1734. P. 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.02.004>
87. *Dai F., Miao Q., Zhou B., Yang L., Liu Z.* // *Life Sci.* 2006. V. 78. P. 2488–2493. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.009>
88. *Liu Z.-Q.* // *Cell Biochem. Biophys.* 2006. V. 44. P. 233–239. <https://doi.org/10.1385/CBB:44:2:233>
89. *Shiva S., Subramanyam M.V., Vani R., Asha D.* // *Toxicol. In Vitro* 2007. V. 21. P. 1355–1364. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>
90. *Farag M.R., Alagawany M.* // *Chem. Biol. Interact.* 2018. V. 279. P. 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>
91. *Misra H.P., Fridovich I.J.* // *Biol. Chem.* 1972. V. 247. P. 6960–6962. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)44679-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)44679-6)
92. *Nagababu E., Chrest F.J., Rifkind J.M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1620. P. 211–217. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00537-8)
93. *Okamoto K., Maruyama T., Kaji Y., Harada M., Mawatari S., Fujino T., Uyesaka N.* // *Jpn. J. Physiol.* 2004. V. 54. P. 39–46. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.54.39>
94. *Alburaidi B.S., Alsenaidy A.M., Hasan A., Siddiqi N.J., Alrokayan S.H., Odeibat H.A., Abdulnasir A.J., Khan H.A.* // *J. King Saud University – Science.* 2022. V. 4. P. 101772. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101772>
95. *Anjum R., Maheshwari N., Mahmood R.* // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2022. V. 69. P. 126888. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126888>
96. *Jeswani G., Alexander A., Saraf S., Saraf S., Qureshi A., Ajazuddin* // *J. Controlled Release.* 2015. V. 211. P. 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.001>
97. *Dhonnar S.L., More R.A., Adole V.A., Jagdale B.S., Sadgir N.V., Santosh S.* // *J. Mol. Struct.* 2022. V. 1253. P. 132216. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132216>
98. *Nuruki Y., Matsumoto H., Tsukada M., Tsukahara H., Takajo T., Tsuchida K., Anzai K.* // *Chem. Pharm. Bull.* 2021. V. 69. P. 67–71. <https://doi.org/10.1248/cpb.c20-00568>
99. *Grodzicka M., Pena-Gonzalez C.E., Ortega P., Michlewski S.* // *Sustainable Materials and Technologies.* 2022. V. 33. P. e00497. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2022.e00497>
100. *Li H., Lin G., Liang Z., Li Y., Zhang R.* // *J. Mol. Struct.* 2024. V. 1295. P. 136808. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136808>
101. *Mustafa Y.F.* // *J. Mol. Struct.* 2024. V. 1302. P. 137471. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.137471>
102. *Saravanan A., Das P., Maruthapandi M., Aryal S., Michaeli S., Mastai Y., Luong J.H.T., Gedanken A.* // *Surfaces and Interfaces.* 2024. V. 46. P. 103857. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2024.103857>
103. *Gangurde K.B., More R.A., Adole V.A., Ghotekar D.S.* // *J. Mol. Struct.* 2024. V. 1299. P. 136760. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136760>

104. *Orsine J.V.C., Costa R., Silva R., Santos M., Novaes M.* // Int. J. Nutr. Met. 2012. V. 4. P. 19–23. <https://doi.org/10.5897/IJNAM11.064>
105. *Ko F.N., Hsiao G., Kuo Y.H.* // Free Radic. Biol. Med. 1997. V. 22. P. 215–222. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00295-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00295-x)
106. *Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y.* // Food Chem. Toxicol. 2009. V. 47. P. 1591–1599. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.006>
107. *Bellik Y., Iguer-Ouada M.* // Food Chem. 2016. V. 190. P. 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.126>
108. *Gonçalves A.C., Bento C., Silva B.M., Silva L.R.* // Food Res. Int. 2017. V. 95. P. 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.023>
109. *Bento C., Gonçalves A.C., Silva B., Silva L.R.* // J. Functional Foods. 2018. V. 43. P. 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.018>
110. *Du R., Liu K., Zhao S., Chen F.* // ACS Omega. 2020. V. 5. P. 12751–12759. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00349>
111. *Ahumada-Santos Y.P., Lypez-Angulo G., Pinto-González R.M., Clemente-Soto A.F., Lypez-Valenzuela J.A., Delgado-Vargas F.* // ADV. TRADIT. MED. (ADTM). 2024. <https://doi.org/10.1007/s13596-023-00735-w>
112. *Ajila C.M., Rao P.U.J.S.* // Food Chem. Toxicol. 2008. V. 46. P. 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.024>
113. *Yan Y., Yu C., Chen J., Li X., Wang W., Li S.* // Carbohydr. Polym. 2011. V. 83. P. 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.045>
114. *Li X.M., Li X.L., Zhou A.G.* // Eur. Polymer J. 2007. V. 43. P. 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.10.025>
115. *Sun C.L., Wang L., Li J., Liu H.* // Food Chem. 2014. V. 160. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.067>
116. *Wu G.-H., Hu T., Li Z.-Y., Huang Z.-L., Jiang J.-G.* // Food Chem. 2014. V. 148. P. 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.029>
117. *Hou J., Cui H.-L.* // Curr. Microbiol. 2018. V. 75. P. 266–271. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1374-z>
118. *Yin Z.N., Wu W.J., Sun C.Z., Liu H.F., Chen W.B., Zhan Q.P., Lei Z.G., Xin X., Ma J.J., Yao K., Min T., Zhang M.M., Wu H.* // Biomed. Environ. Sci. 2019. V. 32. P. 11–21. <https://doi.org/10.3967/bes2019.002>
119. *Loganayaki N., Siddhuraju P., Manian S.J.* // Food Sci. Technol. 2013. V. 50. P. 687–695. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0389-x>
120. *Singh R.P., Kaur G.* // Food Chem. Toxicol. 2008. V. 46. P. 553–556. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.037>
121. *Shevchenko O.G., Shishkina L.N.* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2011. V. 47. P. 179–186. <https://doi.org/10.1134/S0022093011020071>
122. *Al-Qarawi A.A., Mousa H.M.* // J. Arid Environments. 2004. V. 59. P. 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.02.004>
123. *Ivanov I.T.* // Comp. Biochem. Physiol.(A). Mol. Integr. Physiol. 2007. V. 147. P. 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.016>
124. *Shevchenko O.G., Plyusnina S.N.* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2017. V. 53. P. 298–307. <https://doi.org/10.1134/S0022093017040068>
125. *Brzezinska-Slebodzinska E.* // Vet. Res. Commun. 2003. V. 27. P. 211–217. <https://doi.org/10.1023/A:1023344607691>
126. *Mineo H., Ogita A., Kanayama N., Kawagishi M., Sato E., Yamamoto N., Izawa A.K.M.* // Eur. J. Pharmacol. 2013. V. 702. P. 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.029>
127. *Miki M., Tamai H., Mino M., Yamamoto Y., Niki E.* // Arch. Biochem. Biophys. 1987. V. 258. P. 373–380. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90358-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90358-4)
128. *Jani N., Ziogas J., Angus J.A., Wright C.E.* // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2012. V. 65. P. 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.03.006>
129. *Costa R.M., Magalhães A.S., Pereira J.A., Andrade P.B., Valentão P., Carvalho M., Silva B.M.* // Food Chem. Toxicol. 2009. V. 47. P. 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.019>
130. *Frassinetti S., Gabriele M., Caltavuturo L., Longo V., Pucci L.* // Plant Foods Hum. Nutr. 2015. V. 70. P. 35–41. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0453-6>
131. *Afsar T., Razak S., Khan M.R., Mawash S., Almajwal A., Shabir M., Haq I.U.* // BMC Complement. Altern. Med. 2016. V. 16. P. 258. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1240-8>
132. *García-Becerra L., Mitjans M., Rivas-Morales C., Verde-Star J., Oranday-Cárdenas A., María P.V.* // Food Chem. 2011. V. 194. P. 1081–1088. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.131>
133. *Zhang L., Santos J.S., Cruz T.M., Marques M.B., do Carmo M.A.V., Azevedo L., Wang Y., Granato D.* // Food Res. Int. 2019. V. 125. P. 108516. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108516>
134. *Banerjee A., Kunwar A., Mishra B., Priyadarshini K.I.* // Chem. Biol. Interact. 2008. V. 174. P. 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.009>
135. *Barreca D., Lagana G., Tellone E., Ficarra S., Leuzzi U., Galtieri A., Bellocco E.J.* // Membrane Biol. 2009. V. 230. P. 163–171. <https://doi.org/10.1007/s00232-009-9197-x>
136. *Qin B., Yang K., Cao R.* // J. Chem. 2020. P. 2786359. <https://doi.org/10.1155/2020/2786359>
137. *Jamialahmadi K., Amiri A.H., Zahedipour F., Faraji F., Karim G.* // J. Pharmacopuncture. 2022. V. 25. P. 344–353. <https://doi.org/10.3831/KPI.2022.25.4.344>

138. *Sen V.D., Sokolova E.M., Neshev N.I., Kulikov A.V., Pliss E.M.* // *Reactive and Functional Polymers*. 2017. V. 111. P. 53–59.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.12.006>
139. *Chen W., Ma J., Gong F., Xi H., Zhan Q., Li X., Wei F., Wu H., Lai F.* // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 200. P. 446–455.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.007>
140. *Zhang H., Han L., Sun X., Yu Y., Lv C., Lu J.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 217. P. 761–774.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.023>
141. *Zheng L., Dong H., Su G., Zhao Q., Zhao M.* // *Food Chem.* 2016. V. 197. P. 807–813.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.012>
142. *Kim J., Hong V.S., Lee J.* // *Arch. Pharm. Res.* 2014. V. 37. P. 324–331.
<https://doi.org/10.1007/s12272-013-0189-0>
143. *Jasiewicz B., Babijczuk K., Warzajtis B., Rychlewska U., Starzyk J., Costa G., Mrywczynska L.* // *Molecules*. 2023. V. 28. P. 708.
<https://doi.org/10.3390/molecules28020708>
144. *Buravlev E.V., Chukicheva I.Y., Shevchenko O.G., Suponitsky K.Y., Kutchin A.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2011. V. 37. P. 614–618.
<https://doi.org/10.1134/S1068162011050049>
145. *Buravlev E.V., Chukicheva I.Y., Sukrusheva O.V., Schevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Russ. Chem. Bull.* 2015. V. 64. P. 1406–1412.
<https://doi.org/10.1007/s11172-015-1024-1>
146. *Buravlev E.V., Chukicheva I.Y., Shevchenko O.G., Suponitskii K.Y., Kutchin A.V.* // *Russ. Chem. Bull.* 2017. V. 66. P. 91–98.
<https://doi.org/10.1007/s11172-017-1705-z>
147. *Buravlev E.V., Chukicheva I.Y., Schevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Russ. Chem. Bull.* 2017. V. 66. P. 297–303.
<https://doi.org/10.1007/s11172-017-1731-x>
148. *Buravlev E.V., Fedorova I.V., Shevchenko O.G.* // *Russ. Chem. Bull.* 2019. V. 68. P. 985–992.
<https://doi.org/10.1007/s11172-019-2508-1>
149. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G.* // *Russ. Chem. Bull.* 2019. V. 68. P. 79–85.
<https://doi.org/10.1007/s11172-019-2419-1>
150. *Buravlev E.V., Fedorova I.V., Shevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Russ. Chem. Bull.* 2020. V. 69. P. 1573–1578.
<https://doi.org/10.1007/s11172-020-2937-x>
151. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G.* // *Russ. Chem. Bull.* 2020. V. 69. P. 1971–1978.
<https://doi.org/10.1007/s11172-020-2987-0>
152. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Russ. Chem. Bull.* 2021. V. 70. P. 183–190.
<https://doi.org/10.1007/s11172-021-3075-9>
153. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G.* // *Russ. Chem. Bull.* 2022. V. 71. P. 2621–2628.
<https://doi.org/10.1007/s11172-022-3691-z>
154. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015. V. 25. P. 826–829.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.075>
155. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G., Chukicheva I.Y., Kutchin A.V.* // *Chem. Papers.* 2018. V. 72. P. 201–208.
<https://doi.org/10.1007/s11696-017-0272-y>
156. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G., Anisimov A.A., Suponitsky K.Y.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 152. P. 10–20.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.022>
157. *Buravlev E.V., Dvornikova I.A., Shevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Chem. Biodivers.* 2019. V. 16. P. e1900362.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201900362>
158. *Buravlev E.V., Fedorova I.V., Shevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Chem. Biodivers.* 2019. V. 16. P. e1800637.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201800637>
159. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G., Suponitsky K.Y.* // *Chem. Biodivers.* 2021. V. 18. P. e2100221.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.202100221>
160. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G.* // *ChemistrySelect*. 2022. V. 7. P. e202202474.
<https://doi.org/10.1002/slct.202202474>
161. *Buravlev E.V., Shevchenko O.G.* // *Chem. Papers.* 2023. V. 77. P. 6169–6182.
<https://doi.org/10.1007/s11696-023-02930-0>
162. *Shevchenko O.G., Buravlev E.V.* // *Russ. Chem. Bull.* 2023. V. 72. P. 1972–1990.
<https://doi.org/10.1007/s11172-023-3991-y>
163. *Chukicheva I.Yu., Fedorova I.V., Nizovtsev N.A., Koroleva A.A., Shevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Chem. Nat. Compd.* 2018. V. 54. P. 875–882.
<https://doi.org/10.1007/s10600-018-2503-z>
164. *Chukicheva I.Y., Fedorova I.V., Shevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Russ. Chem. Bull.* 2023. V. 72. P. 2215–2223.
<https://doi.org/10.1007/s11172-023-4018-4>
165. *Shchukina O.V., Chukicheva I.Y., Kolegova T.A., Kutchin A.V., Shevchenko O.G., Suponitsky K.Y.* // *Russ. J. Gen. Chem.* 2018. V. 88. P. 664–675.
<https://doi.org/10.1134/S1070363218040096>
166. *Shchukina O.V., Chukicheva I.Y., Kutchin A.V., Shevchenko O.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 787–794.
<https://doi.org/10.1134/S1068162018050151>
167. *Buravlev E.V., Belykh D.V., Chukicheva I.Y., Tarabukina I.S., Shevchenko O.G., Kutchin A.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013. V. 39. P. 434–437.
<https://doi.org/10.1134/S1068162013040055>
168. *Torlopov M.A., Shevchenko O.G., Chukicheva I.Y., Udroatinina E.V.* // *Reactive and Functional Polymers.* 2020. V. 156. P. 104740.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104740>
169. *Torlopov M.A., Shevchenko O.G., Drozd N.N., Udroatinina E.V.* // *Reactive and Functional Polymers.* 2023. V. 182. P. 105457.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105457>

170. Chukicheva I.Y., Torlopov M.A., Buravlev E.V., Shevchenko O.G., Kuchin A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. V. 40. P. 76–81.
<https://doi.org/10.1134/s1068162014010026>
171. Martakov I.S., Shevchenko O.G., Torlopov M.A., Gerasimov E.Y., Sitnikov P.A. // J. Inorg. Biochem. 2019. V. 199. P. 110782.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110782>
172. Martakov I.S., Shevchenko O.G. // J. Inorg. Biochem. 2020. V. 210. P. 111168.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111168>
173. Martakov I.S., Shevchenko O.G., Torlopov M.A., Sitnikov P.A. // J. Mol. Struct. 2022. V. 1248. P. 131471.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131471>
174. Belykh D.V., Buravlev E.V., Chukicheva I.Yu., Tarabukina I.S., Kuchin A.V., Shevchenko O.G., Plyusnina S.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38. P. 558–564.
<https://doi.org/10.1134/S1068162012050044>
175. Dvornikova I.A., Buravlev E.V., Fedorova I.V., Shevchenko O.G., Chukicheva I.Y., Kuchin A.V. // Russ. Chem. Bull. 2019. V. 68. P. 1000–1005.
<https://doi.org/10.1007/s11172-019-2510-7>
176. Popova S.A., Shevchenko O.G., Chukicheva I.Y., Kuchin A.V. // Chem. Biodivers. 2019. V. 16. P. e1800317.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201800317>
177. Popova S.A., Shevchenko O.G., Chukicheva I.Y. // Chem. Biolog. Drug Design. 2022. V. 100. P. 994–1004.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.13955>
178. Samet A.V., Shevchenko O.G., Rusak V.V., Chartov E.M., Myshlyavtsev A., Rusanov D., Semenova M.N., Semenov V.V. // J. Nat. Prod. 2019. V. 82. P. 1451–1458.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00878>
179. Nikitina L.E., Lisovskaya S.A., Startseva V.A., Frolova L.L., Kuchin A.V., Shevchenko O.G., Ostolopovskaya O.V., Pavelyev R.S., Khelkhal M.A., Gilfanov I.R., Fedyunina I.V., Khaliullin R.R., Akhverdiev R.F., Gerasimov A.V., Abzaldinova E.V., Izmailov A.G. // Bionanoscience. 2021. V. 11. P. 970–976.
<https://doi.org/10.1007/s12668-021-00912-8>
180. Gur'eva Y.A., Zalevskaya O.A., Shevchenko O.G., Slepukhin P.A., Makarov V.A., Kuchin A.V. // RSC Adv. 2022. V. 12. P. 8841–8851.
<https://doi.org/10.1039/d2ra00223j>
181. Buravlev E.V., Shevchenko O.G. // Chem. Papers. 2023. V. 77. P. 499–508.
<https://doi.org/10.1007/s11696-022-02492-7>
182. Izmest'ev E.S., Sudarikov D.V., Shevchenko O.G., Rubtsova S.A., Kuchin A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 77–82.
<https://doi.org/10.7868/S0132342314050078>
183. Pestova S.V., Izmestev E.S., Rubtsova S.A., Shevchenko O.G., Kuchin A.V. // Russ. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 723–731.
<https://doi.org/10.1007/s11172-015-0926-2>
184. Pestova S.V., Izmest'ev E.S., Shevchenko O.G., Rubtsova S.A., Kuchin A.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 302–310.
<https://doi.org/10.1134/S1068162017030141>
185. Gyrdymova Y.V., Sudarikov D.V., Shevchenko O.G., Rubtsova S.A., Kuchin A.V. // Chemistry Biodiversity. 2017. V. 14. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201700296>
186. Gyrdymova Y.V., Demakova M.Y., Shevchenko O.G., Sudarikov D.V., Frolova L.L., Rubtsova S.A., Kuchin A.V. // Chem. Nat. Compd. 2017. V. 53. P. 895–900.
<https://doi.org/10.1007/s10600-017-2150-9>
187. Gyrdymova Y.V., Sudarikov D.V., Shevchenko O.G., Rubtsova S.A., Slepukhin P.A., Patov S.A., Lakhvich F.A., Pashkovskii F.S., Kuchin A.V. // Chem. Nat. Compd. 2018. V. 54. P. 883–888.
<https://doi.org/10.1007/s10600-018-2504-y>
188. Melekhin A.K., Sudarikov D.V., Shevchenko O.G., Rubtsova S.A., Kuchin A.V. // Chem. Nat. Compd. 2018. V. 54. P. 281–285.
<https://doi.org/10.1007/s10600-018-2324-0>
189. Sudarikov D.V., Krymskaya Y.V., Shevchenko O.G., Slepukhin P.A., Rubtsova S.A., Kuchin A.V. // Chemistry Biodiv. 2019. V. 16. P. e1900413.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201900413>
190. Sudarikov D.V., Krymskaya Y.V., Melekhin A.K., Shevchenko O.G., Rubtsova S.A. // Chemical Papers. 2021. V. 75. P. 2957–2963.
<https://doi.org/10.1007/s11696-020-01362-4>
191. Sudarikov D.V., Gyrdymova Y.V., Borisov A.V., Lukyanova J.M., Rumyantcev R.V., Shevchenko O.G., Baidamshina D.R., Zakarova N.D., Kayumov A.R., Sinegubova E.O., Volobueva A.S., Zarubaev V.V., Rubtsova S.A. // Molecules. 2022. V. 27. P. 5101.
<https://doi.org/10.3390/molecules27165101>
192. Ksenofontov A.A., Bocharov P.S., Antina E.V., Shevchenko O.G., Samorodov A.V., Gilfanov I.R., Pavelyev R.S., Ostolopovskaya O.V., Startseva V.A., Fedyunina I.V., Azizova Z.R., Gaysin S.I., Pestova S.V., Izmest'ev E.S., Rubtsova S.A., Khelkhal M.A., Nikitina L.E. // Biomol. 2022. V. 12. P. 1599.
<https://doi.org/10.3390/biom12111599>
193. Nikanova N.N., Hurshkainen T.V., Shevchenko O.G., Kuchin A.V. // Holzforschung. 2022. V. 76. P. 276–284.
<https://doi.org/10.1515/hf-2021-0122>
194. Golubev D., Zemskaya N., Shevchenko O., Shaposhnikov M., Kukuman D., Patov S., Punegov V., Moskalev A. // Biogerontology. 2022. V. 23. P. 215–235.
<https://doi.org/10.1007/s10522-022-09954-1>
195. Golubev D., Platonova E., Zemskaya N., Shevchenko O., Shaposhnikov M., Nekrasova P., Patov S., Ibragimova U., Valuisky N., Borisov A., Zhukova X., Sorokina S., Litvinov R., Moskalev A. // Biogerontology. 2023. V. 25. P. 507–528.
<https://doi.org/10.1007/s10522-023-10083-6>
196. Platonova E.Yu., Golubev D.A., Zemskaya N.V., Shevchenko O.G., Patov S.A., Shaposhnikov M.V., Moskalev A.A. // Molecular Biology. 2023. V. 57. P. 978–992.
<https://doi.org/10.1134/S0026893323060134>

197. *Mikhailova D.V., Shevchenko O.G., Golubev D.A., Platonova E.Y., Zemskaya N.V., Shoeva O.Y., Gordieva E.I., Patov S.A., Shaposhnikov M.V., Khlestkina E.K., Moskalev A.A.* // *Antioxidants (Basel)*. 2023. V. 12. P. 2010. <https://doi.org/10.3390/antiox12112010>
198. *Yang H.-L., Korivi M., Lin M.-K., Chang H.C.-W., Wu C.-R., Lee M.-S., Chen W.T.-L., Hseu Y.-C.* // *J. Food Drug Anal.* 2017. V. 25. P. 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.007>
199. *Woźniak M., Mrówczyńska L., Waśkiewicz A., Rogoziński T., Ratajczak I.* // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019. V. 29. P. 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.bjpf.2019.02.002>
200. *Sato Y., Kanazawa S., Sato K., Suzuki Y.* // *Biochemistry*. 1995. V. 21. P. 8940–8949. <https://doi.org/10.1248/bpb.21.250>
201. *Halliwell B., Clement M.V., Longa L.H.* // *FEBS Lett.* 2000. V. 486. P. 10–13. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02197-9)
202. *Kowalczyk A., Puchała M., Wesołowska K., Serafin E.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1774. P. 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.11.005>
203. *Everse J., Hsia N.* // *Free Radic. Biol. Med.* 1997. V. 22. P. 1075–1099. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00499-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00499-6)
204. *Rocha S., Costa E., Coimbra S., Nascimento H., Catarino C., Rocha-Pereira P., Quintanilha A., Belo L., Santos-Silva A.* // *Blood Cells Mol Dis.* 2009. V. 43. P. 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.03.002>
205. *Nagababu E., Rifkind J.M.* // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1998. V. 247. P. 592–596.
206. *Nagababu E., Fabry M.E., Nagel R.L., Rifkind J.M.* // *Blood Cells Mol. Dis.* 2008. V. 41. P. 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.12.003>
207. *Nagababu E., Mohanty J.G., Bhamidipaty S., Ostera G.R., Rifkind J.M.* // *Life Sciences*. 2010. V. 86. P. 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.11.015>
208. *Choudhary O. P., Sarkar R., Priyanka, Chethan G.E., Doley P.J., Kalita P.C., Kalita A.* // *Ann. Med. Surg. (Lond)*. 2021. V. 70. P. 102895. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102895>
209. *Takebayashi J., Kaji H., Ichiyama K., Makino K., Gohda E., Yamamoto I., Tai A.* // *Free Rad. Biol. Med.* 2007. V. 43. P. 1156–1164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.002>
210. *Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O.* // *World Allergy Organ. J.* 2012. V. 5. P. 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
211. *Hebbel R.P., Leung A., Mohandas N.* // *Blood*. 1990. V. 76. P. 1015–1020.
212. *Sugihara T., Rawicz W.E.A., Hebbel R.P.* // *Blood*. 1991. V. 77. P. 2757–2763.
213. *Çimen M.* // *Clin. Chim. Acta*. 2008. V. 390. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.12.025>
214. *Skold A., Cosco D.L., Klein R.* // *South. Med. J.* 2011. V. 104. P. 757–761. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e318232139f>
215. *Arif A., Salam S., Mahmood R.* // *Toxicol. In Vitro*. 2020. V. 65. P. 104810. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104810>
216. *Park S., Saravanakumar K., Sathiyaseelan A., Park S.J., Hu X., Wang M.-H.* // *LWT*. 2022. V. 154. P. 112727. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112727>
217. *Singh S., Singh D.K., Meena A., Dubey V., Masood N., Luqman S.* // *Phytomedicine*. 2019. V. 55. P. 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.07.009>
218. *Peng A., Lin L., Zhao M., Sun B.* // *Food Res. Int.* 2019. V. 123. P. 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.046>
219. *Suwalsky M., Jemiola-Rzeminska M., Astudillo C., Gallardo M.J., Staforelli J.P., Villena F., Strzalka K.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1848. P. 2829–2838. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.08.017>
220. *Suwalsky M., Zambrano P., Villena F., Manrique-Moreno M., Gallardo M.J., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K., Edwards A.M., Mennickent S., Dukes N.* // *J. Membr. Biol.* 2015. V. 248. P. 683–693. <https://doi.org/10.1007/s00232-015-9780-2>
221. *Suwalsky M., Colina J., Gallardo M.J., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K., Manrique-Moreno M., Sepúlveda B.* // *J. Membr. Biol.* 2016. V. 249. P. 769–779. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9924-z>
222. *Suwalsky M., Ramírez P., Avello M., Villena F., Gallardo M.J., Barriga A., Manrique-Moreno M.* // *J. Membr. Biol.* 2016. V. 249. P. 349–361. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9873-6>
223. *Suwalsky M., Duguet J., Speisky H.* // *J. Membr. Biol.* 2017. V. 250. P. 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9955-0>
224. *Novitskii V.V., Ryazantseva N.V., Semin I.R.* // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2000. V. 130. P. 979–982. <https://doi.org/10.1023/A:1002870025084>
225. *Sheetz M.P., Singer S.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. P. 4457–4461. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.11.4457>
226. *Luneva O.G., Gendel' L.Ya., Kuznetsov Yu.V., Smirnov L.D.* // *Biophysics*. 2005. V. 50. P. 294–298.
227. *Manrique-Moreno M., Suwalsky M., Villena F., Garidel P.* // *Biophys. Chem.* 2010. V. 147. P. 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2009.12.010>

228. *Manrique-Moreno M., Villena F., Sotomayor C.P., Edwards A.M., Mucoz M.A., Garidel P., Suwalsky M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1808. P. 2656–2664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.005>
229. *Parshina E.Yu., Rubin A.B., Gendel L.Ya.* // *Biophysics.* 2004. V. 49. P. 981–985.
230. *Parshina E.Yu., Gendel L.Ya., Rubin A.B.* // *Biol. Bull.* 2007. V. 34. P. 537–541. <https://doi.org/10.1134/S1062359007060015>
231. *Parshina E.Yu., Gendel L.Ya., Rubin A.B.* // *Biophysics.* 2009. V. 54. P. 706–708. <https://doi.org/10.1134/S0006350909060098>
232. *Parshina E.Y., Silicheva M.A., Volod'kin A.A., Gendel L.Y.* // *Biophysics.* 2017. V. 62. P. 754–758. <https://doi.org/10.1134/S0006350917050189>
233. *Shevchenko O.G., Plyusnina S.N., Buravlev E.V., Chukicheva I.Y., Fedorova I.V., Shchukina O.V., Kutchin A.V.* // *Russ. Chem. Bull.* 2017. V. 66. P. 1881–1890. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1962-x>
234. *Basiglio C.L., Pozzi E.J.S., Mottino A.D., Roma M.G.* // *Chem. Biol. Interact.* 2009. V. 79. P. 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.12.008>
235. *Preté P.S.C., Domingues C.C., Meirelles N.C., Malheiros S.V.P., Goñi F.M., Paula E., Schreier S.* // *Biochim. Biophys. Acta. (Biomembr.)* 2011. V. 1808. P. 1641–1670. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.10.016>
236. *Rodi P.M., Trucco V.M., Gennaro A.M.* // *Biophys. Chem.* 2008. V. 135. P. 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2008.02.015>

Blood Erythrocytes – a Biological Model for Evaluating Antioxidant Activity of Chemical Compounds

O. G. Shevchenko*, #

* Phone: +7 (912) 561-54-65; e-mail: shevchenko@ib.komisc.ru

* Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Kommunisticheskaya 28, Syktyvkar, 167982 Russia

This review presents an analysis of literature, including our own work, on various aspects of using RBC as an *in vitro* model in the comprehensive evaluation of antioxidant activity of a wide range of natural and synthetic compounds, their mixtures, and plant extracts. The existing practice of using human, laboratory, and domestic animal red blood cells is examined. The characteristics of the most commonly used initiators of oxidative stress in such studies, 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) and H₂O₂, as well as the mechanisms underlying the development of the hemolytic process are discussed. A critical analysis of methodological approaches to assessing the level of hemolysis is provided. The review further discusses the evaluation of erythrocyte survival under oxidative stress conditions and the ability of the tested compounds to act as membrane protectors. The text considers the criteria for a comprehensive assessment of erythrocytes, facilitating the study of cellular and molecular mechanisms underlying antioxidant activity of a wide range of substances on a model of oxidative hemolysis of erythrocytes. Traditional methods include assessment of the intensity of membrane lipid peroxidation (LPO) processes through measurement of concentration of products that react with 2-thiobarbituric acid, as well as assessment of relative content of oxidized forms of hemoglobin in erythrocytes. The use of modern fluorescent methods is another promising approach. In particular, the fluorescence of heme degradation products, the decrease in intensity of which can indicate the presence of antioxidant activity in the compounds under investigation, is a sensitive marker of oxidative stress in erythrocytes. Another prominent fluorescent method is the assessment of the level of oxidative stress by measuring the intracellular concentration of ROS in erythrocytes. Analysis of our own and literature data allows us to recommend the method of oxidative hemolysis of erythrocytes as the method to screen newly developed compounds in order to select the most interesting candidates for further in-depth studies. It is appropriate for establishing the structure-activity relationship and developing a strategy for the targeted synthesis of new biologically active compounds combining high hemocompatibility and antioxidant activity, promising for biomedical applications.

Keywords: antioxidant activity, erythrocytes, oxidative hemolysis



УДК 547.853.3

КОВАЛЕНТНЫЕ ИНГИБИТОРЫ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (EGFR) В ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ЛЕКАРСТВЕННО- УСТОЙЧИВОГО НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

© 2024 г. А. Б. Швецов*, #, А. В. Семёнов*

* Национальный исследовательский Мордовский государственный университет,
Россия, 430005 Саранск, ул. Большевистская, 68

Поступила в редакцию 30.01.2024 г.

После доработки 25.02.2024 г.

Принята к публикации 26.02.2024 г.

Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) – основной подтипа рака легких, выступающий частой причиной смертности от онкологии во всем мире. Ведущую роль в патогенезе НМРЛ играют мутации в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), обуславливающие его патологическую активность. Первое поколение ингибиторов EGFR, действующих обратимо, эффективно блокирует эффекты EGFR с активирующими мутациями за счет выигрыша в конкуренции с АТФ за связывание с киназой. Однако через несколько месяцев лечения часто возникает вторичная мутация T790M, являющаяся причиной резистентности к последующей терапии данными препаратами. Эффективное ингибирование EGFR с мутацией T790M оказалось возможным за счет ингибиторов второго поколения, действующих по ковалентному механизму. Однако второе поколение ковалентных ингибиторов получило ограниченное применение в терапии вследствие недостаточной селективности к EGFR T790M и узкого терапевтического окна. Открытие ковалентных ингибиторов на основе пиримидина обусловило появление ряда эффективных и более безопасных препаратов третьего поколения для лечения НМРЛ с мутацией EGFR T790M. Настоящий обзор содержит краткое описание ингибиторов EGFR первого и второго поколений и подробное рассмотрение основных этапов разработки ингибиторов третьего поколения. Основной акцент сделан на выявленных закономерностях “структура–активность”. Приведены данные по ингибиторам, получившим статус одобренных препаратов для лечения НМРЛ. Указаны перспективные направления разработки новых ингибиторов EGFR.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, рецептор эпидермального фактора роста, двойная мутация, ковалентные ингибиторы, ингибирующая активность, пиримидины, молекулярное моделирование

DOI: 10.31857/S0132342324060037, **EDN:** NFUMER

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	736
2. ИНГИБИТОРЫ EGFR ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ	737
3. ИНГИБИТОРЫ EGFR ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ	737

Сокращения: АТФ – аденоинтрифосфорная кислота; ГЭБ – гемато-энцефалический барьер; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; РСА – рентгеноструктурный анализ; ТМЭДА – N,N,N' - trimetilэтилендиамин; ALK – киназа анапластической лимфомы; ВТК – киназа Брутона; DM – двойная мутация; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США; IGFR1 – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; РДВ – база данных белков; Src – протеинтиозинкиназа; ТКИ – ингибиторы тирозинкиназы; WT – дикий тип.

Автор для связи: (тел.: +7 (917) 996-41-38; эл. почта: shvetsov.1984@list.ru).

4. ИНГИБИТОРЫ EGFR ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ	738
5. ИНГИБИТОРЫ EGFR DM С АМИНОПИРИМИДИНОВЫМ ОСТОВОМ	740
6. ИНГИБИТОРЫ С ПИРРОЛОПИРИМИДИНОВЫМ ОСТОВОМ	750
7. ИНГИБИТОРЫ С ПУРИНОВЫМ И ПИРАЗОЛОПИРИМИДИНОВЫМ ОСТОВАМИ	752
8. ИНГИБИТОРЫ С ТИОФЕНО- И ТИОПИРАНОПИРИМИДИНОВЫМИ ОСТОВАМИ	752
9. ИНГИБИТОРЫ EGFR DM С ФУРАНОПИРИМИДИНОВЫМ ОСТОВОМ	753
10. ИНГИБИТОРЫ С ХИНАЗОЛИНОВЫМ, ПИРИДО- И ПИРИМИДОПИРИМИДИНОВЫМИ ОСТОВАМИ	754
11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	755
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	755

1. ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого – одна из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей. Согласно данным международного агентства по изучению рака (IARC), в 2020 г. в мире было зарегистрировано >19 млн новых случаев онкологических заболеваний, среди которых второе место занимает рак легкого. В России среди всех зарегистрированных случаев злокачественных новообразований в 2022 г. 3-е место пришлось на легочную локализацию [1]. Рак легкого – ведущая причина смерти от онкологических заболеваний у мужчин [2].

Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) – основной гистологический подтип рака легких, составляющий ~80% всех случаев заболевания [3]. Исследования показали, что важнейшую роль в патогенезе НМРЛ играет рецептор эпидермального фактора роста человека EGFR (epidermal growth factor receptor), представляющий собой белок клеточной поверхности, который связывается со своим природным лигандом, эпидермальным фактором роста (EGF), индуцируя аутофосфорилирование тирозина и запуская процесс пролиферации клеток [4]. Активность EGFR и опосредованная им клеточная передача сигналов хорошо скоординированы и строго контролируются в нормальных клетках. Разбалансировка сигнальной системы EGFR ведет к нарушению регуляции тирозинкиназной активности. В результате чрезмерной активации EGFR запускается каскад биохимических реакций, приводящих к повышению уровня пролиферации опухолевых клеток, росту опухоли, патологического ангиогенеза и метастазирования. Для опухолевых клеток выявлены следующие основные механизмы активации EGFR-зависимых сигнальных путей:

- 1) гиперэкспрессия EGFR;
- 2) избыточная продукция факторов роста (TGF- α , EGF);
- 3) мутация в гене, кодирующем EGFR, и, как следствие, активация рецептора в отсутствие факторов роста;
- 4) гетеродимеризация рецептора, приводящая к постоянной активации тирозинкиназы в отсутствие лиганда.

Ведущую роль в патогенезе НМРЛ играют мутации. Было установлено, что большинство мутаций (85–90%) в домене EGFR представлены делецией в экзоне 19 (Del19) и заменой Leu858 на Arg в экзоне 21 (L858R), которые называются “активирующими”, поскольку приводят к лиганд-независимой тирозинкиназной активности [5]. Остаток Leu858 расположен в петле активации и является частью цепочки гидрофобных аминокислот, образующих активационную спираль. При замене лейцина более гидрофильным аргинином эта спираль искажается, что приводит к дестабилизации неактивной конформации EGFR, способствуя тем самым переходу в активное состояние. При делеции экзона 19 происходит укорочение С-спирали на 1–3 остатка, что, вероятно, не позволяет С-спирали повернуться наружу и перейти в неактивное состояние [6]. Было установлено, что активирующие мутации EGFR встречаются в ~10–15% случаев НМРЛ у пациентов европеоидной расы и в ~30–40% у пациентов из Восточной Азии [7]. Для блокирования биологических эффектов, реализуемых посредством гиперактивации EGFR, в качестве основных стратегий применяют использование моноклональных тел, действующих непосредственно против связывающего домена EGFR.

или образующих неактивный комплекс с EGF и TGF- α , и использование низкомолекулярных ингибиторов, способных воздействовать на внутриклеточный домен EGFR и прерывать процесс фосфорилирования за счет конкурирования с АТФ, а также комбинации данных стратегий. В настоящем обзоре будут рассмотрены три поколения низкомолекулярных ингибиторов, способных ингибировать мутантные формы EGFR и обусловливающих осложнения при лечении НМРЛ.

2. ИНГИБИТОРЫ EGFR ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

Созданные в 2003–2004 гг. ингибиторы EGFR первого поколения (гэфитиниб (1), эрлотиниб (2) и икотиниб (3), рис. 1 a) проектировались как АТФ-миметики [8], конкурентно и обратимо связывающиеся с АТФ-сайтом EGFR (рис. 1 b , 1 c) [9]. Лечение НМРЛ этими препаратами приводило к положительному ответу у ~60–80% пациентов, однако в большинстве случаев после 10–12 месяцев терапии наблюдалось развитие резистентности [10]. Ее основной причиной оказалась мутация

T790M (замена Thr790 на Met), приводящая к резкому снижению (как минимум на 50%) эффективности ингибиторов, в основном за счет повышения аффинности рецептора к АТФ [11, 12]. Во многих случаях лекарственно-резистентная мутация T790M существует вместе с активирующей мутацией L858R, образуя двойную мутацию EGFR L858R/T790M (double mutation, EGFR DM), придающую устойчивость к любым конкурентным АТФ-ингибиторам [13]. Для преодоления повышенного сродства мутантной киназы EGFR DM к АТФ при ее физиологических концентрациях (1–10 мМ) потенциальный ингибитор должен обладать сверхбыстрым действием, что может быть достигнуто за счет ковалентного связывания [14].

3. ИНГИБИТОРЫ EGFR ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

Разработка ковалентных ингибиторов EGFR T790M началась в 1990-х гг. Их основой выступил хиназолиновый остаток, способный образовывать водородную связь с “шарнирным” Met793 EGFR и оснащенный электрофильной “боеголовкой” (акцептор Михаэля), нацеленной на тиольный

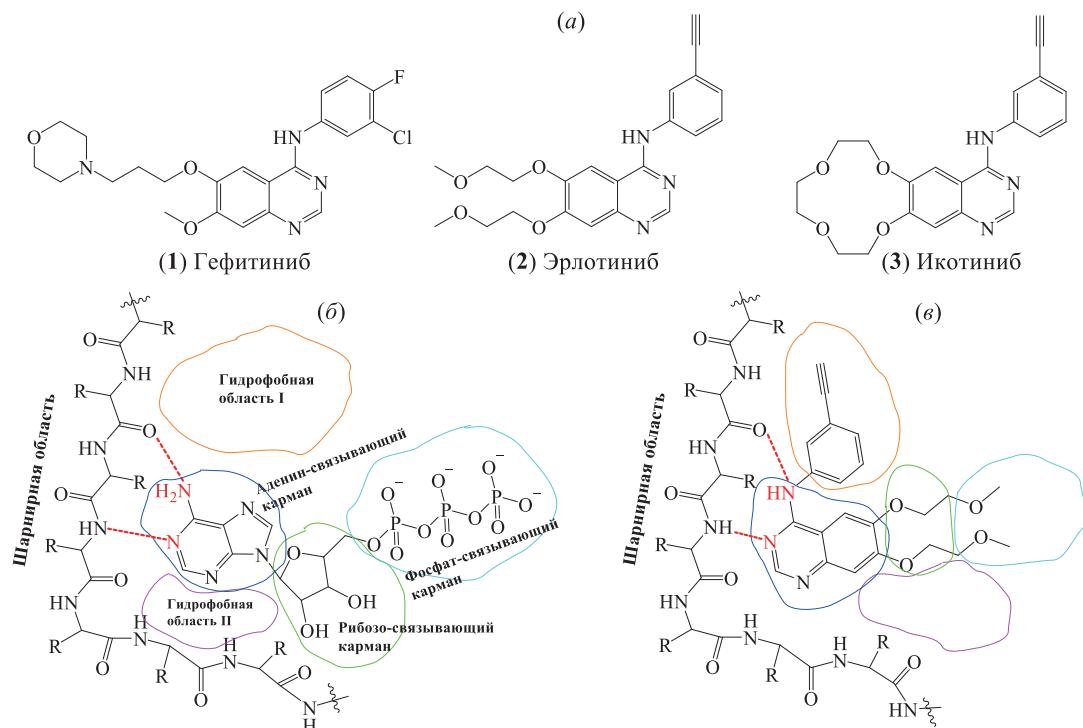


Рис. 1. (a) – Ингибиторы EGFR первого поколения; (б) – строение АТФ-связывающего сайта EGFR [9]; (в) – способ связывания эрлотиниба с EGFR [9].

остаток Cys797 на краю активного сайта киназы. Ковалентное связывание способствует конкурентному преимуществу над АТФ и увеличивает время действия ингибитора [15].

Первым одобренным FDA в 2013 г. ковалентным ингибитором стал афатиниб (4) (рис. 2), показавший в тестах *in vitro* концентрацию полумаксимального ингибирования в отношении мутантной киназы ($IC_{50}^{EGFR\ DM}$) на уровне 10 нМ, что оказалось на два порядка ниже по сравнению с гефитинибом. Кроме того, афатиниб показал выраженное противоопухолевое действие на модели ксенотранспланта H1975, несущего мутацию EGFR DM (модель *in vivo*) [16]. При исследовании методами PCA комплекса афатиниба с EGFR DM (PDB: 4G5J) было установлено, что между азотом Met793 в шарнирной области и хиназолиновым остовом ингибитора образуется водородная связь. Гидрофобная часть молекулы ориентируется вглубь сайта связывания. Данные о распределении электронной плотности свидетельствуют об образовании ковалентной связи между Cys797 и акцепторной группой Михаэля [17]. Однако применение афатиниба в качестве монотерапии для преодоления приобретенной резистентности T790M оказалось неэффективным и существенно ограниченным из-за недостаточной селективности и, как следствие, проявлении кожной и желудочно-кишечной токсичности в дозах, необходимых для эффективного ингибирования EGFR T790M [18].

В качестве ингибитора EGFR T790M также был исследован нератиниб (5) (рис. 2), показавший в доклинических исследованиях многообещающую антитрополиферативную активность в отношении клеточной линии H1975 [19]. Однако в клинических исследованиях нератиниб не был эффективен в лечении пациентов с НМРЛ, ранее полу-

чавших положительный эффект от терапии ТКИ (ингибиторами тирозинкиназы) EGFR первого поколения, а также низкую биодоступность и ряд побочных эффектов вследствие узкого терапевтического окна [20]. Способ связывания нератиниба с EGFR T790M аналогичен таковому для афатиниба (PDB: 2JIV) [21].

Был исследован ряд других ковалентных ингибиторов: дакомитиниб (6) [22], пелитиниб (7) [23], канертиниб [24] (рис. 2) и др., но ни одному из них не удалось преодолеть проблемы лекарственной резистентности, связанные с мутацией T790M в долгосрочной перспективе за счет сходных недостатков: узкого терапевтического окна, побочных и токсических эффектов, обусловленных высокой степенью активности в отношении киназы дикого типа, находящейся в здоровых тканях [25, 26].

4. ИНГИБИТОРЫ EGFR ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ

Разработка в 2009 г. Zhou et al. соединения WZ4002 (8) (рис. 3а) дало начало третьему поколению ингибиторов EGFR. Пиrimидиновый остов WZ4002 имел меньший размер, большую гибкость и способность к размещению в сайте связывания в условиях стерических затруднений, возникающих вследствие появления более объемного и гидрофобного мутантного Met790 в EGFR DM. В тестах *in vitro* ингибитор показал 14-кратную селективность к EGFR T790M, а в сравнении с нератинибом (5) и гефитинибом (1) имел на два порядка более низкую активность в отношении EGFR дикого типа. WZ4002 вызывал значительную регрессию опухоли в моделях *in vivo*, имел пероральную доступность 24% и период полувыведения ($T_{1/2}$) 2.5 ч [27]. По данным PCA комплекса WZ4002 с EGFR T790M (PDB: 3IKA), молекула ингибитора находится в

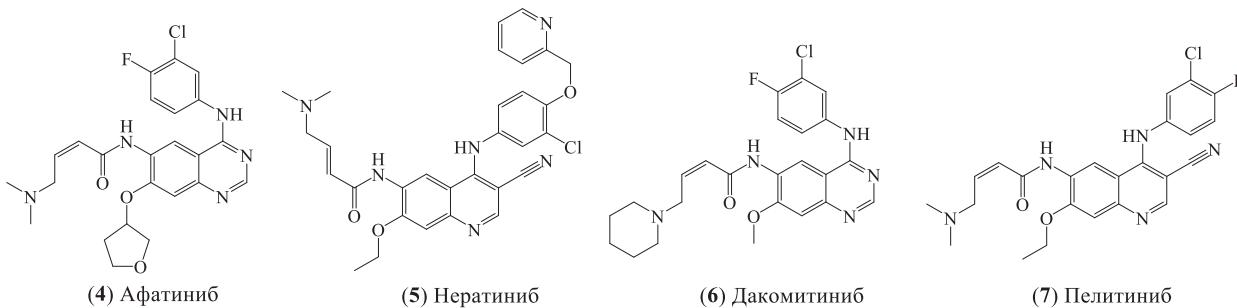


Рис. 2. Ингибиторы EGFR второго поколения.

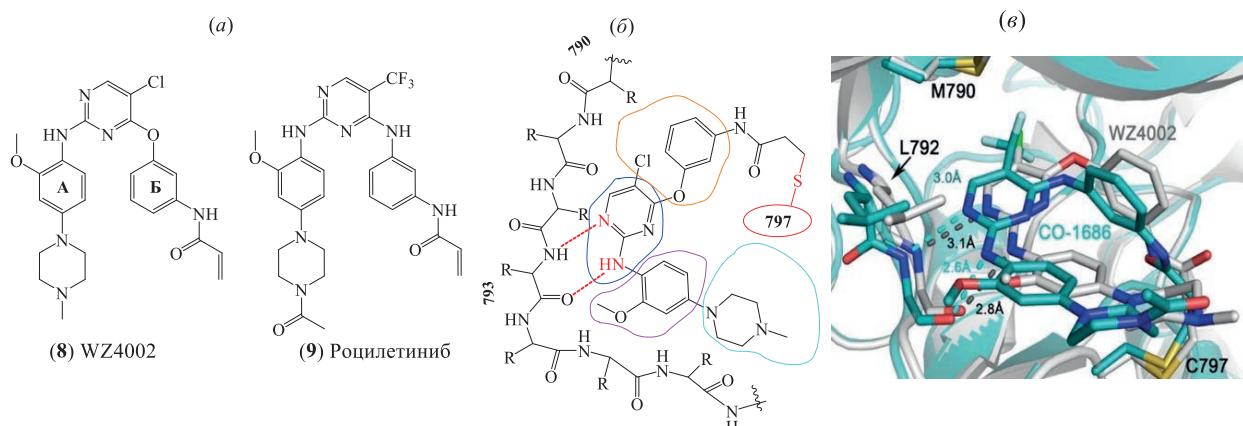


Рис. 3. (а) – Первые ингибиторы EGFR третьего поколения; (б) – способ связывания WZ4002 с EGFR; (в) – наложение суперпозиций WZ4002 и роцилэтиниба в EGFR T790M [30].

сайте связывания киназы в U-образной конформации и образует ковалентную связь с Cys797 (рис. 3б). 2-Аминопиримидиновый остов образует бидентатную водородную связь с “шарнирным” Met793. Хлор взаимодействует с мутантным “привратниковым” Met790, что, вероятно, обусловливает селективность WZ4002 в отношении DM, поскольку немутантный Thr790 не обеспечивает такого взаимодействия. Фенильное кольцо А (рис. 3а) гидрофобно взаимодействует с Gly796. Метоксигруппа взаимодействует с Leu792 и Pro794 в “шарнирной” области. Фенильное кольцо Б, располагающееся почти перпендикулярно к пиримидиновому циклу, выступает в качестве “линкера” для акриламидной группы, благоприятно располагая ее для взаимодействия вблизи Cys797. Данная информация послужила важнейшей отправной точкой для дальнейших разработок TKI третьего поколения.

В 2011 г. был получен 2,4-диаминопиримидиновый ингибитор роцилэтиниб (9) (рис. 3а). В тестах *in vitro* ингибитор показал 12–22-кратную селективность в отношении EGFR DM [28]. Роцилэтиниб эффективно ингибирировал рост клеточных линий НМРЛ, несущих мутации EGFR DM и EGFR del19/T790M на уровне $IC_{50} = 7$ –32 нМ, тогда как для клеточных линий, несущих EGFR WT, IC_{50} составляла 547–4275 нМ. В сравнении с афатинибом, роцилэтиниб показал более выраженный противоопухолевый эффект *in vivo* [29]. Способ связывания ингибитора (9) в целом аналогичен WZ4002 (рис. 3б) (PDB: 5XDK) [30]. Метоксильный заместитель ориентируется в сторону боковой цепи Leu792 и, вероятно, обуславливает селективность ингибитора (9) в отношении се-

мейства киназ EGFR, поскольку другие киназы (JAK, TEC) содержат более объемный остаток в данном положении. Трифторметильная группа гидрофобно взаимодействует с Met790.

В ходе фазы I/II клинических испытаний был выявлен частый побочный эффект роцилэтиниба в виде гипергликемии за счет ингибиравания IGFR1 его основным метаболитом [31]. Позже выяснилось, что количества метаболитов в плазме крови у людей значительно выше, чем в до-клинических моделях, вследствие различий в механизмах метаболизма [32]. Вследствие этого, а также ввиду наличия более безопасных препаратов в 2016 г. исследования роцилэтиниба были прекращены [33].

Прорывной разработкой оказался осимертиниб, получивший в 2015 г. ускоренное одобрение FDA для применения в США [13], а в феврале 2016 г. – в Европейском Союзе. Разработке осимертиниба предшествовало получение соединения (10) (схема 1), которое ингибирировало рост клеток H1975 с 220-кратной селективностью относительно клеток LoVo, несущих EGFR WT [34]. Далее был осуществлен перенос концевой аминогруппы на фенильное кольцо, что привело к получению соединения (11), которое продемонстрировало более высокую киназную активность и селективность, а также более низкую липофильность. Однако оно по-прежнему сильно ингибирировало IGFR1 и имело высокое сродство к ионным каналам hERG. Дальнейшая структурная оптимизация была сосредоточена на заместителях в положениях 4 и 5 пиримидинового ядра, которые оказывают влияние на активность, селективность и физико-

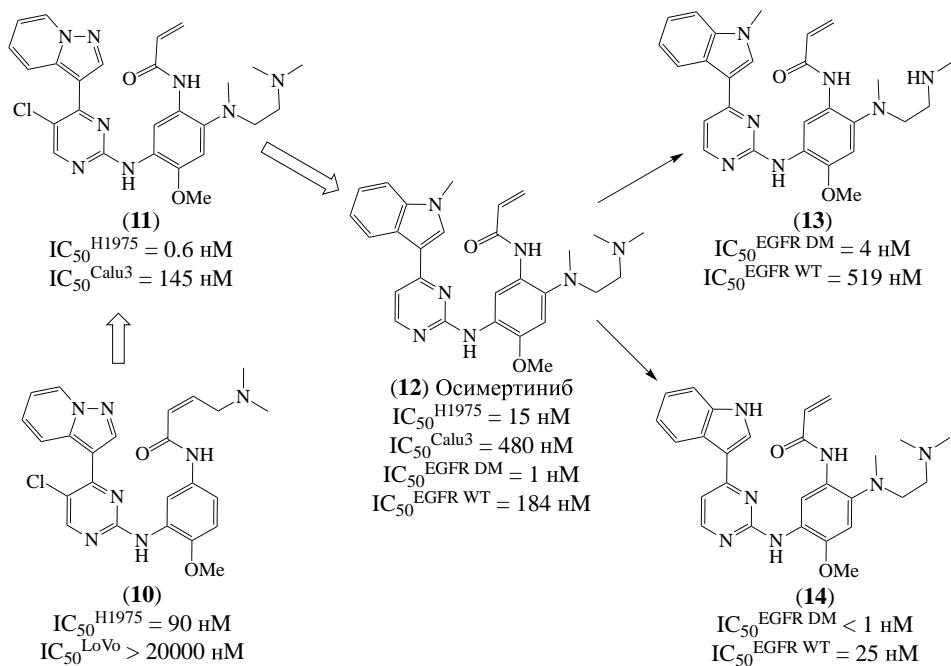


Схема 1. Предшественники осимертиниба и его основные метаболиты.

химические свойства. Удаление 5-Cl и замена “головного” пиридазопиримидина на *N*-метилиндол привели к получению осимертиниба (12) с улучшенными фармакокинетическими характеристиками и сниженной аффинностью к hERG и IGFR1. Киназная ингибирующая активность осимертиниба *in vitro* составила $IC_{50}^{EGFR\ DM} = 1\text{ нМ}$, $IC_{50}^{EGFR\ WT} = 184\text{ нМ}$. Было установлено, что соединение (12) в организме подвергается интенсивному метаболизму с участием цитохрома P450 с образованием основных метаболитов (13) и (14) (схема 1), обнаруживаемых в плазме крови в примерном соотношении 32 и 67% соответственно. Метаболит (13) демонстрирует сопоставимую с исходным соединением ингибирующую активность и селективность, тогда как соединение (14) обладает существенно меньшей избирательностью к EGFR DM и обуславливает большинство токсических эффектов осимертиниба [35]. Режим связывания соединения (12) с киназами EGFR T790M (PDB: 6JX0, 6JX4) и EGFR WT (PDB: 6JWL, 6JXT) был исследован и в целом соответствовал роцилетинибу и WZ4002 [36].

Заметим, что для ковалентных ингибиторов значения IC_{50} не строго характеристичны, поскольку сильно зависят от условий проведения испытания (особенно от времени инкубирования) [37–39]. Хотя были попытки сделать метод определения

IC₅₀ более универсальным для применения к необратимым ингибиторам (например, в работе [40]), сравнение с референсным препаратом остается основной мерой активности таких соединений.

Последовавший клинический успех осимертиниба и фактический его монополизм на рынке препаратов для лечения НМРЛ с мутацией T790M (НМРЛ^{T790M}) вызвал резкий рост числа работ по получению его аналогов. Кроме того, он не был лишен побочных эффектов, таких как гипергликемия, сыпь, диарея, кардиотоксичность [41]. Разработанные новые ингибиторы EGFR третьего поколения можно условно разделить по общности структурного остова на аминопиrimидиновые, пирролопиrimидиновые, пуриновые, пиразолопиrimидиновые, тиофенопиrimидиновые, тиопиранопиrimидиновые, фуранопиrimидиновые, хиназолиновые, пиридопиrimидиновые и пиридинопиrimидиновые.

5. ИНГИБИТОРЫ EGFR DM С АМИНОПИРИМИДИНОВЫМ ОСТОВОМ

На основе структуры (15) (схема 2) была получена серия аналогов WZ4002 с метилтиольной группой в положении 5 пиримидинового цикла, установленной с целью усиления взаимодействия с мутантным Met790 и ограничением конфор-

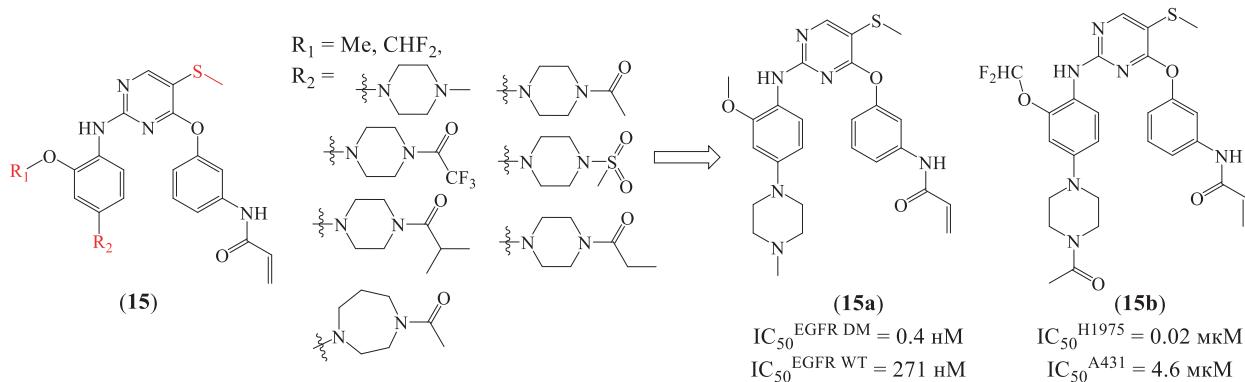


Схема 2. 5-Метилтио-аналоги WZ4002.

мационного вращения фенильного линкера [42]. По результатам киназных тестов *in vitro* ингибитор (15a) превзошел референсное соединение (12) по активности в 27 раз и селективности в 18 раз. В клеточных тестах лучшие результаты показал ингибитор (15b) с активностью в 2.5 раза, а селективностью в 13 раз превосходящие таковые для ингибитора (12).

Также была получена серия аналогов WZ4002 с мочевиной в качестве линкерной вставки и различными заместителями при гидрофильной части молекулы (16) (схема 3) [43]. Соединения продемонстрировали умеренное ингибиование киназ *in vitro*. Наиболее оптимальный баланс свойств показал соединение (16a) с активностью к EGFR DM, близкой к активности соединения (8), но пятикратно увеличенной селективностью. Отмечается, что для данного ряда соединений было выявлено нецелевое ингибиование киназы Src.

Были смоделированы и получены производные WZ4002 с тио- и сульфоксиалкильными линкерами в гидрофильной части молекулы (17) (схема 4) [44]. Ингибитор (17a) в киназном тесте *in vitro* показал активность, сравнимую с референсным соединением (9), тогда как в клеточном teste (17a) был в 4 раза более активен в отношении H1975, а по селективности в 9 раз превзошел соединение (9).

Для ряда полученных новых структурных аналогов роцилетиниба (9) (схема 5) было установлено, что значительные отклонения от исходной структуры (9) приводили к существенной потере целевой активности [45]. Дезактивирующее влияние также оказывали электронодонорные заместители при акриламидной группе. Наиболее активный ингибитор (18a) двукратно уступал роцилетинибу по активности в отношении EGFR DM.

В качестве перспективного таргетного препарата было получено производное роцилетиниба с радио-

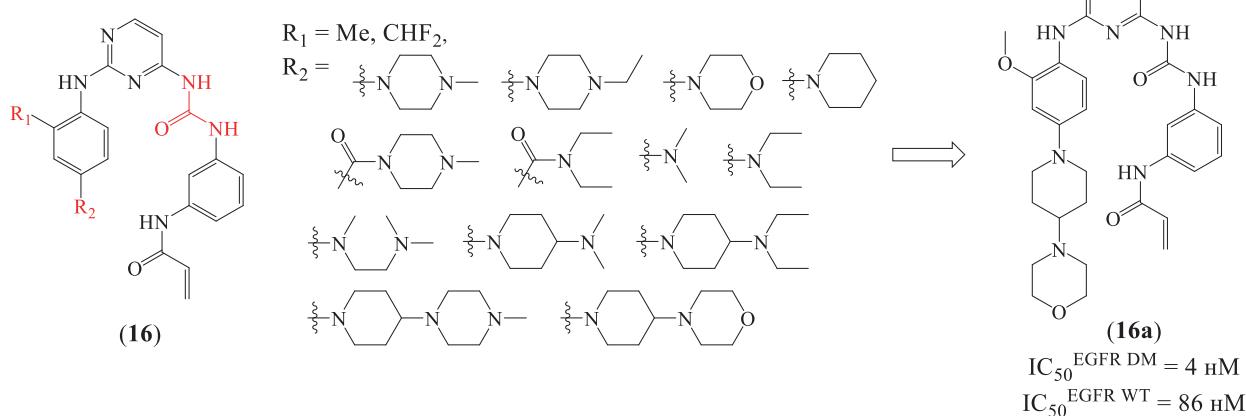


Схема 3. Аналоги WZ4002 с мочевиной в качестве линкерной вставки.

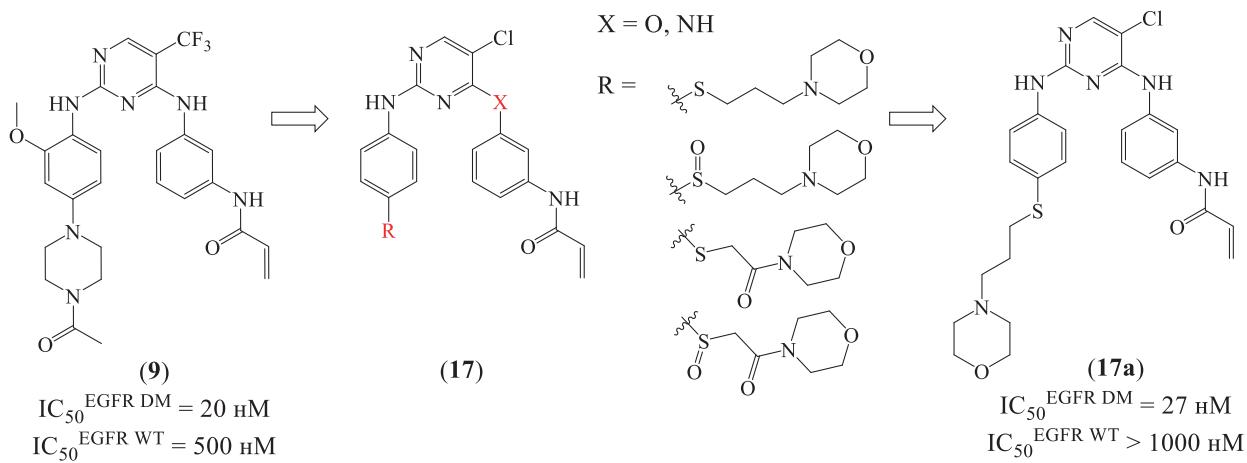


Схема 4. Аналоги роцилэтиниба.

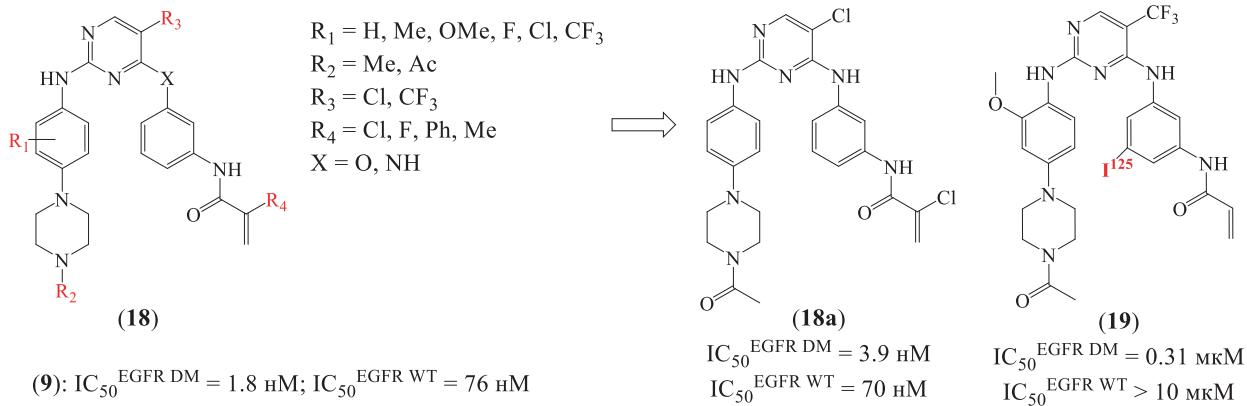


Схема 5. Аналоги роцилэтиниба.

активным иодом¹²⁵ в положении 5 фенильного линкера – соединение (19) (схема 5) [46]. Хотя его ингибирующая активность *in vitro* была ниже, чем у соединения (9), селективность в отношении EGFR DM оставалась в пределах 10–30, что позволяло использовать его в качестве препарата, специфичного к двойной мутации. В тестировании *in vitro* на клетках H1975 и H441 (несущих EGFR WT) ингибитор (19) действительно показал 10-кратное преимущественное средство к клеткам H1975. Однако в испытаниях на животных не было зафиксировано накопления радиоактивного иода в трансплантиантной опухоли H1975 относительно нормальных тканей, предположительно, вследствие повышенной липофильности соединения (19).

На основе 2,4-диаминопirimидинового осно-
ва структуры (20) (схема 6) была получена серия TKI EGFR DM, из которых 5-бром-производные были наиболее активны *in vitro*, предположительно, за счет дополнительного взаимо-

действия брома с Met790 [47]. Среди заместителей (R₄) предпочтительными оказались индол, *N*-метилиндол и дигидроинден. Ингибитор (20a) показал высокую целевую активность и селективность на уровне соединения (12), а также выраженное противоопухолевое действие *in vivo* без выраженных токсических эффектов.

С целью защиты метильных групп соединения (12) от метаболического деметилирования были получены его *N*-оксидные и фторированные производные (схема 7) [48]. В киназных тестах *in vitro* ингибитор (21a) был наименее активен в отношении EGFR DM и сравнимым с референсным ингибитором (12). Самую высокую селективность *in vitro* и *in vivo* показало соединение (21b).

В ряду ингибиторов, полученных путем замены *N*-метильной группы (R₂) на индольном фрагменте структуры (22) (схема 8), наиболее активным *in vitro* оказался *N*-циклогексипропильный ингибитор (22a), в 3 раза превзойдя осиметиниб

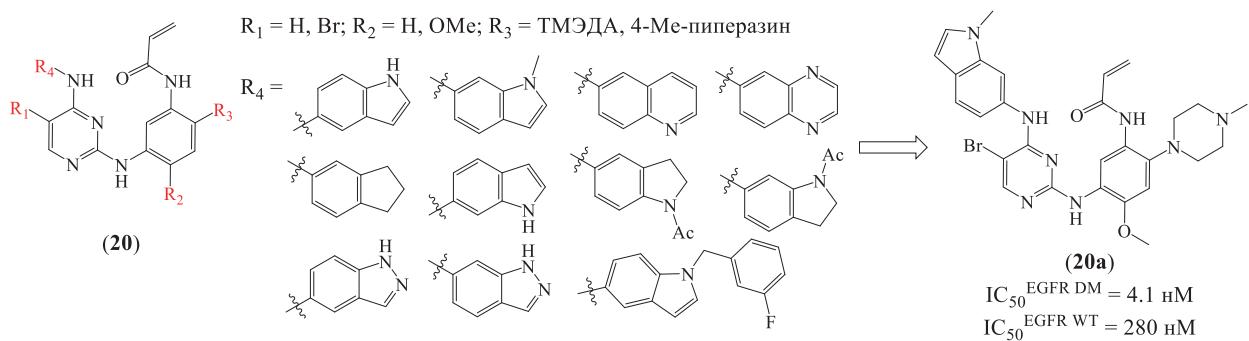


Схема 6. 2,4-Диаминопиримидиновые аналоги осимертиниба.

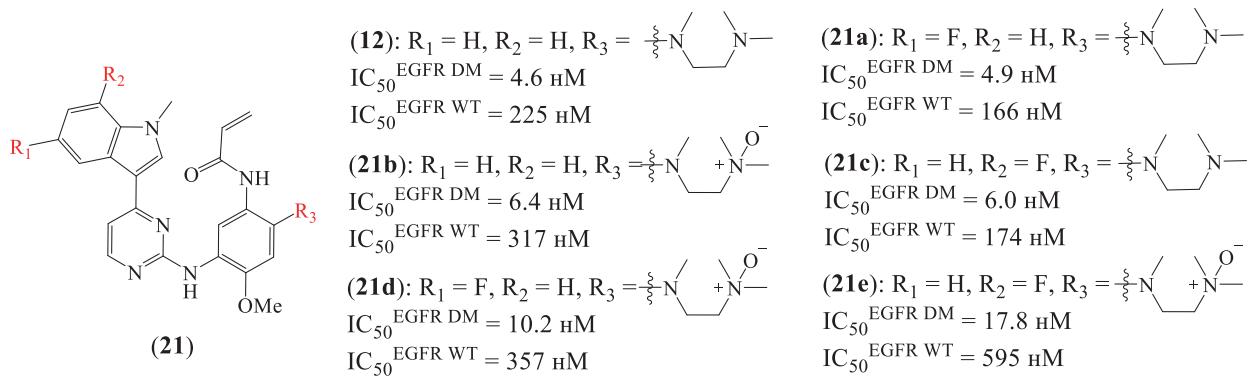


Схема 7. N-Оксидные и фторированные аналоги осимертиниба.

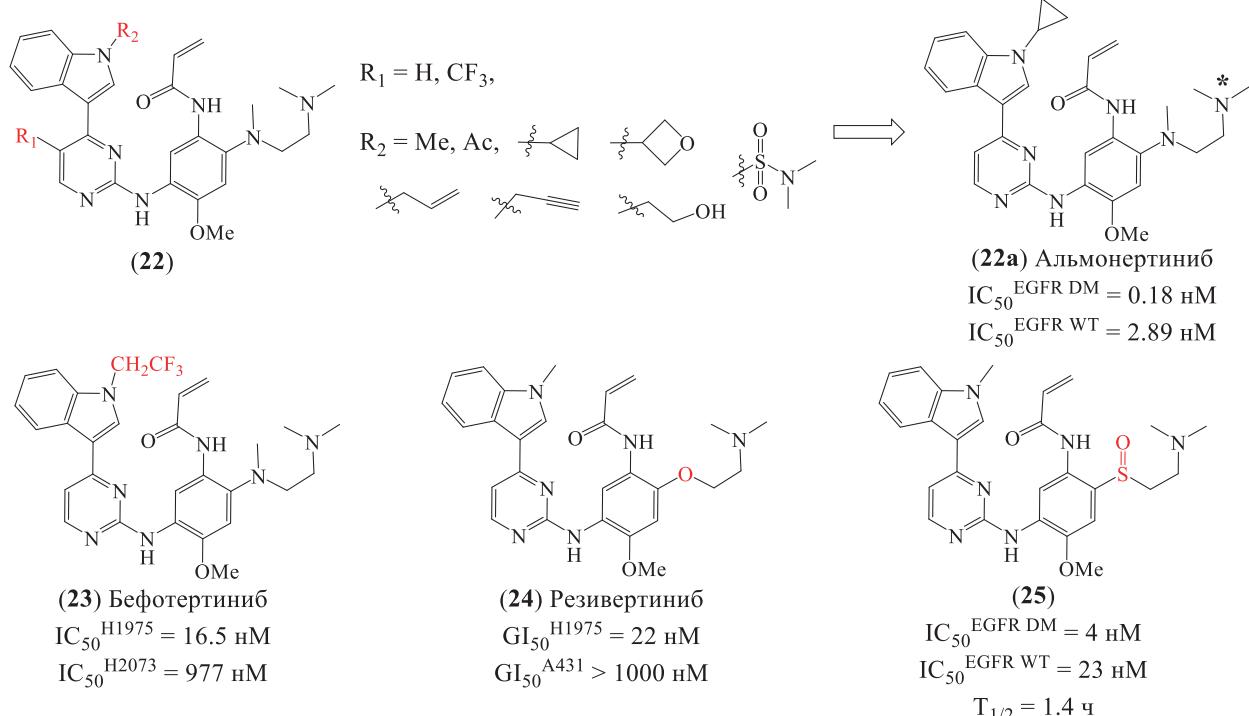


Схема 8. Аналоги осимертиниба.

по активности и в 8 раз – по селективности [49]. Соединение (22а) продемонстрировало выраженную противоопухолевую активность *in vivo* и удовлетворительные параметры фармакокинетики. Был идентифицирован один метаболит, деметилированный по азоту (указан звездочкой в формуле соединения (22а)). В клеточных тестах соединение (22а) также было активным и ингибирировало рост клеток H1975 с $IC_{50} = 2.44$ нМ и 208-кратной селективностью [50]. Ингибитор (22а) – альмонертиниб – прошел доклинические испытания, фазу II клинических исследований, и в 2020 г. был одобрен в качестве препарата для лечения НМРЛ^{T790M} в КНР [51]. Альмонертиниб не вызывал некоторые характерные для осимертиниба побочные эффекты (гипергликемия, сыпь) и обладал более длительным периодом полувыведения 25 ч [52].

N-Трифторэтилииндольный аналог осимертиниба – бефотертиниб (23) (схема 8) – показал эффективность в доклинических исследованиях и приемлемый профиль безопасности в начальных фазах клинических исследований. По завершении в 2023 г. III фазы клинических исследований бефотертиниб получил одобрение в КНР для лечения метастатического НМРЛ^{T790M} [53, 54]. Другой близкий аналог осимертиниба – резивертиниб (24)

(схема 8) – продемонстрировал наномолярную активность и высокую селективность в отношении EGFR DM *in vitro* [55], был эффективен в до-клинических исследованиях и в настоящее время проходит III фазу клинических испытаний в КНР [56, 57].

Циклопропильная группа, показанная на примере альмонертиниба, как и сульфоксидная группа, довольно часто используется при разработке лекарств для модулирования различных свойств, в том числе метаболической стабильности [58]. Так, была получена серия циклопропил- и серо-содержащих аналогов ингибитора (12) на основе структуры (26) (схема 9) [59]. Удовлетворительную активность показали только те ингибиторы, которые содержали концевую диметиламинную группу. Соединение (26а) в тестах *in vitro* было в 13 раз более активным и в 2.5 раза более селективным по отношению к EGFR DM, чем референс (12). Эффективность *in vivo* была сопоставима. В сравнении с полученным ранее аналогом (25) (схема 8) [60], ингибитор (26а) имел больший период полувыведения – 2.5 ч.

Введениедейтерия в структуру лекарственных молекул – также известный метод модуляции их физико-химических и фармакологических свойств [61, 62]. Соединение (27а) (схема 10),

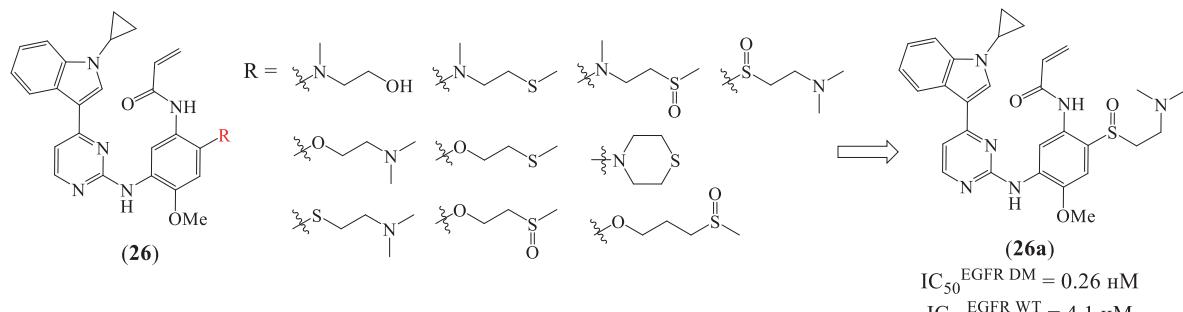


Схема 9. Циклопропильные аналоги осимертиниба.

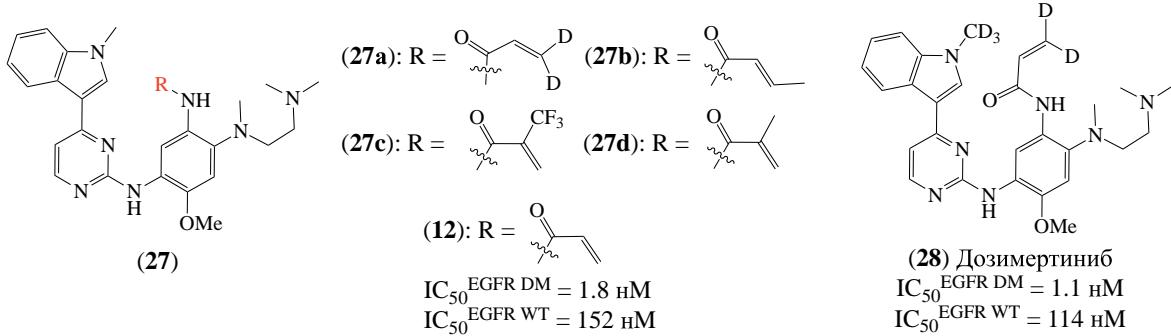


Схема 10. Дозимертиниб и его предшественники.

полученное в результате замены водородов на дейтерий при β -углероде акриламидной группы, показало сниженную активность в сравнении с осимертинибом (12). Малоперспективными были и другие модификации акриламида (27b), (27c) и (27d) [63]. Однако соединение (28) (схема 10), дополнительно дейтерированное по *N*-метильной группе индола, уже ингибирировало *in vitro* киназу EGFR DM на уровне ингибитора (12), но было менее селективным. В клеточном же тесте соединение (28) было более активным и селективным, а в модели *in vivo* показало сравнимую с референсом эффективность. Ингибитор (28), или дозимертиниб, обнаруживал значительно меньшую концентрацию *N*-деметилированного по индолу метаболита AZ5104-D2 в плазме крови лабораторных животных, чем аналогичного метаболита AZ5104 в случае осимертиниба, что могло объяснить более низкую токсичность дозимертиниба *in vivo*. С 2020 г. проводятся клинические исследования дозимертиниба в КНР (CXHL2000060, CXHL2000061).

Из ряда аналогов осимертиниба на основе структуры (29) (схема 11) приемлемую целевую активность показали только соединения, содержащие ТМЭДА-боковую цепь (R_2) [64]. Фторирование метоксигруппы (R_3) слабо модулировало активность. Умеренно различались по активности аналоги, содержащие в положении (R_1) бензоизоксазол, пирролопиридин и тиенопиразол. Лучшие результаты показало соединение (29a), уступая в 1.7 раз по активности, но превосходя в 2.5 раза по селективности референсный ингибитор (12). Два основных метаболита (29a), *N*-деметилированных по ТМЭДА, показали сниженную ингибирующую активность *in vitro* в сравнении с исходным соединением и ингибитором (12).

Изучение режима связывания осимертиниба с EGFR T790M (PDB: 3IKA) показало, что только один азот в пиримидиновом цикле используется для образования водородной связи с Met793, что было применено для получения новых ингибиторов на основе 4-аминопиримидина [65]. Кроме того, наличие свободного пространства в гидрофобной области сайта связывания (синяя окружность над формулой соединения (12) на схеме 12), с которым взаимодействует метилиндольный фрагмент, допускало его модификацию путем стерического расширения. Было обнаружено, что среди полученных соединений все 4-аминопиримидины показали резко сниженную активность *in vitro* в сравнении с 2-аминопиримидиновыми аналогами. Аналогично результатам, полученным в работах [64] и [66], умеренную и высокую активность продемонстрировали только ингибиторы, имеющие ТМЭДА-боковую цепь (R_4). Влияние небольших заместителей R_1 и R_2 было различным, но в целом они умеренно снижали активность и повышали селективность. Только соединения с 5,6-дигидро-4Н-пирролохинолиновым фрагментом (R_3) вместо метилиндола осимертиниба показали активность и селективность на уровне референса. Наиболее активный ингибитор (31a) (схема 12) был сопоставим по активности с соединением (12) *in vitro* и *in vivo*.

В исследовании другой серии ингибиторов, у которых метилиндольный фрагмент был заменен некоторыми трициклическими группами, было отмечено соединение (32), или оритиниб (схема 12), показавший $IC_{50}^{H1975} = 2 \text{ нМ}$ и $IC_{50}^{A431} = 414 \text{ нМ}$, что выше в 2.3 раза по активности и в 3.3 раза по селективности в сравнении с соединением (12) [67]. Соединение (32) показало многообещающие результаты на этапе доклинических исследований. Была установлена его способность проникать

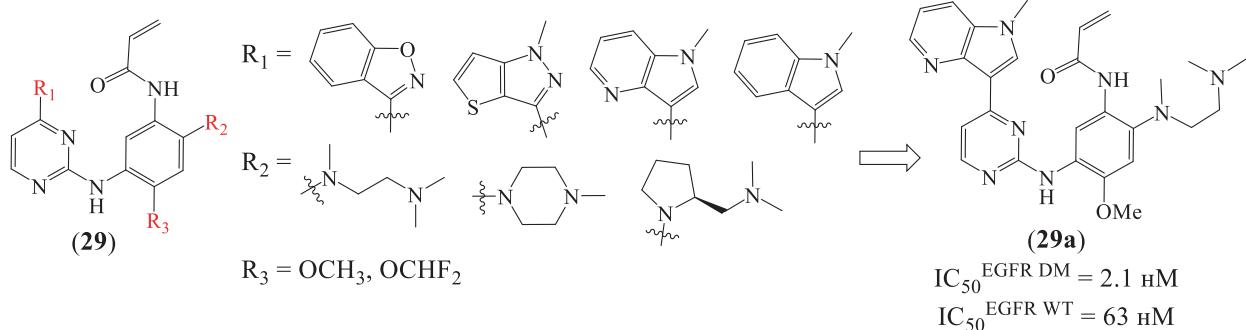


Схема 11. Аналоги осимертиниба.

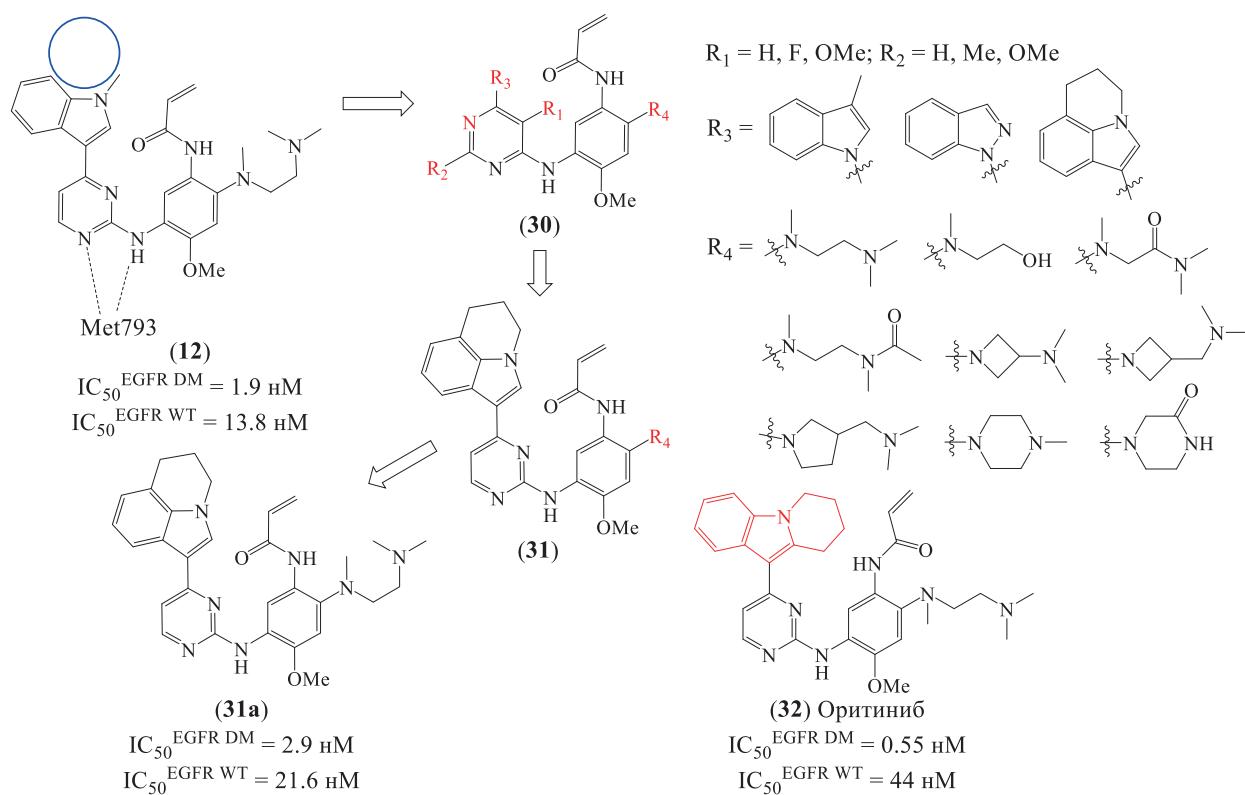


Схема 12. Аналоги осимертиниба.

через ГЭБ и проявлять меньше побочных эффектов *in vivo* в сравнении с соединением (12). Основной метаболит (32) слабо ингибиравал IGFR1 [68]. Оритиниб в настоящее время проходит III фазу клинических испытаний (NCT04239833) как препарат для лечения метастазированного в ЦНС НМРЛ^{T790M} в КНР.

Ряды новых аналогов осимертиниба были получены заменой метилиндольного фрагмента на анилины, *ортого*-замещенные пиразолами или триазолами, с целью повышения селективности к EGFR DM за счет более сильного взаимодействия с Met790 (схема 13) [69]. Умеренную и высокую активность *in vitro* показали только ингибиторы, содержащие ТМЭДА-боковую цепь. Наиболее активный и селективный ингибитор (33а) превзошел в 3 раза по активности и в 4 раза по селективности референсный ингибитор (12). Дальнейшие исследования выявили перспективный ингибитор лимертиниб (34) (рис. 4). Он показал субнаномолярную киназную активность *in vitro* с 20-кратной селективностью [70]. Лимертиниб был эффективен *in vivo*, а также вызывал регрессию опухоли у больного НМРЛ с приобретенной резистентностью к TKI EGFR раннего поколения

[71]. В настоящее время ингибитор (34) проходит III фазу клинических испытаний (NCT04143607).

Пиридиновые TKI (35) и (36) (рис. 4) были разработаны на основе результатов молекулярного моделирования, которое показало, что данные молекулы надлежащим образом ориентируются в активном сайте EGFR DM с образованием бидентатной водородной связи с Met793 и ковалентной связи с Cys797 [72]. Однако в тестах *in vitro* ингибитор (35) был малоактивным, тогда как ингибитор (36) показал наномолярную активность с преимущественной селективностью к EGFR WT.

Также с применением методов *in silico* получена серия аналогов осимертиниба, содержащая замещенные пиразолы и триазолы [73]. Наиболее селективные *in vitro* соединения (37) и (38) (рис. 5) ингибиравали киназу EGFR DM на уровне соединения (12), при этом ингибитор (38) был в 5 раз более селективен, чем референс. Ингибиторы умеренно проникали через ГЭБ и были способны подавлять рост внутричерепных опухолевых систем H1975. Позднее была опубликована структура ингибитора (39), или лазертиниба (рис. 5), показавшего сопоставимую с соединением (12) ак-

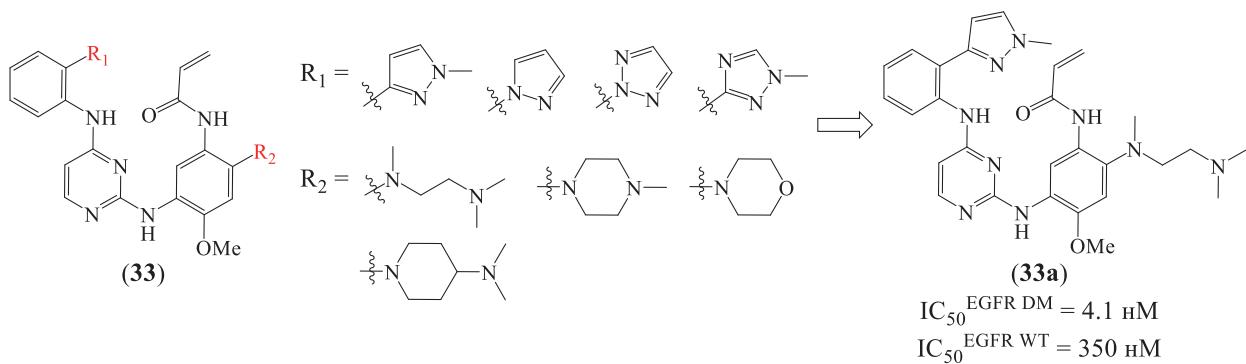


Схема 13. Пиразол- и триазол-содержащие 2,4-диаминопиридины.

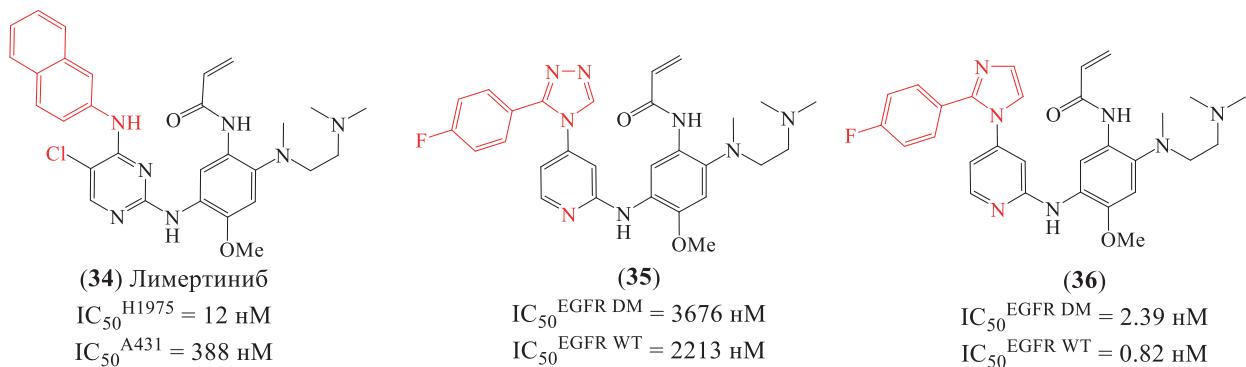


Рис. 4. Лимертиниб и пиридиновые аналоги осимертиниба.

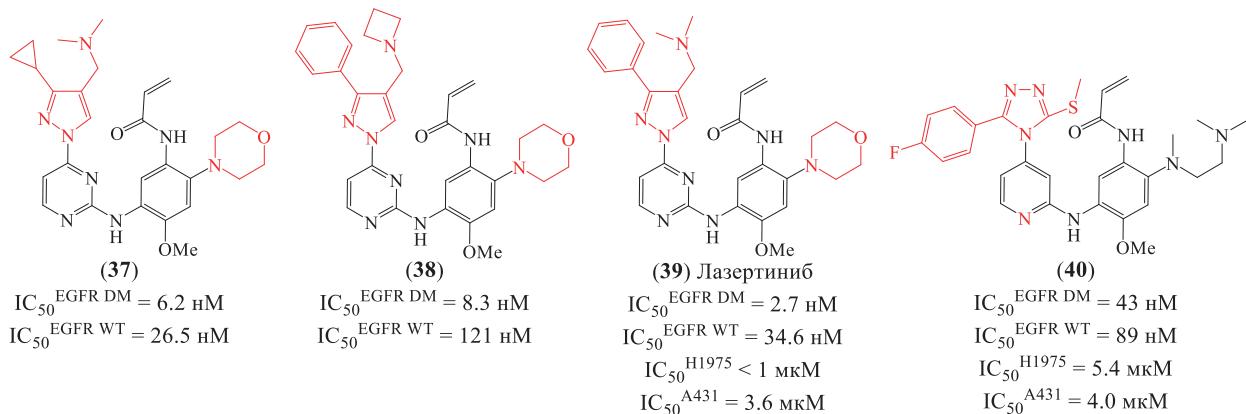


Рис. 5. Пиразол- и триазол-содержащие аналоги осимертиниба.

тивность *in vitro*, но более высокую селективность. Он был высокоэффективен *in vivo* и проникал через ГЭБ [74]. Лазертиниб (39) перешел в активную фазу клинических испытаний и по завершении II фазы в 2021 г. получил одобрение для лечения метастазированного НМРЛ^{T790M} в Южной Корее [75].

По результатам молекулярного моделирования некоторые 2-амино-4-(1,2,4-триазол)-пиридины хорошо воспроизводили конфигурацию ингиби-

тора (39) при стыковке к EGFR DM, проведен синтез этих соединений [76, 77]. Однако по результатам тестов *in vitro* все соединения оказались малоактивными и неселективными. Только ингибитор (40) (рис. 5) показал 2-кратную селективность в отношении EGFR DM, что значительно уступало референсным (12) и (39).

Были исследованы некоторые аминопиразоловые фрагменты (R_1) для структуры (41) (схема 14) [78]. Все они показали сниженную активность в

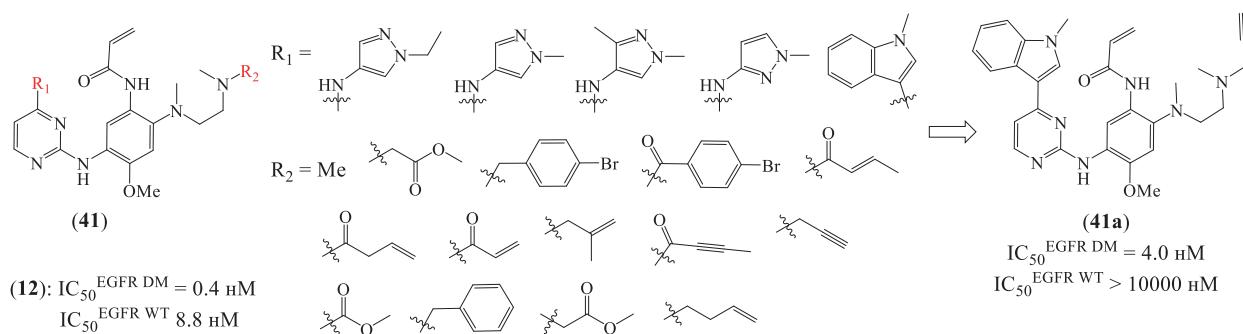


Схема 14. Модификации “головной” и аминной частей осимертиниба.

сравнении с аналогами, содержащими *N*-метил-индол. Ряд перспективных соединений был получен в результате модификации ТМЭДА боковой цепи (R_2). Из них соединение (41а), уступая по активности ингибитору (12), было существенно более селективным. Отмечается, что установленная в тестах *in vitro* селективность коррелировала с теоретически рассчитанной энергией взаимодействия между аминной боковой цепью и Asp800 или Glu804 посредством солевого мостика.

Другой путь разработки новых аналогов осимертиниба был реализован заменой фенильного линкера на пиридиновый в структуре соединения (42) (схема 15) [79]. Малоактивными оказались ингибиторы с пириимидиновыми и пиразо-

ловыми заместителями R_1 , а также те, что имели комбинацию заместителей: R_1 = любой фторированный метилиндол, R_2 = хлор, R_3 = изопропил. Наиболее активное и селективное соединение (42а) – фурмонертиниб (ранее алфлутиниб) – превзошло референсный ингибитор (12) *in vitro* и *in vivo*. Обобщенный профиль безопасности соединения (42а) был аналогичен таковому для соединения (12). По завершении доклинических исследований и II фазы клинических испытаний фурмонертиниб получил в 2021 г. одобрение в КНР для лечения метастатического НМРЛ^{T790M} [80, 81].

Изостерическая замена *N*-метилиндольного фрагмента в структуре (12) на тетрагидротиено-пиридиновый привела к получению новой серии ингибиторов EGFR DM (схема 16) [82].

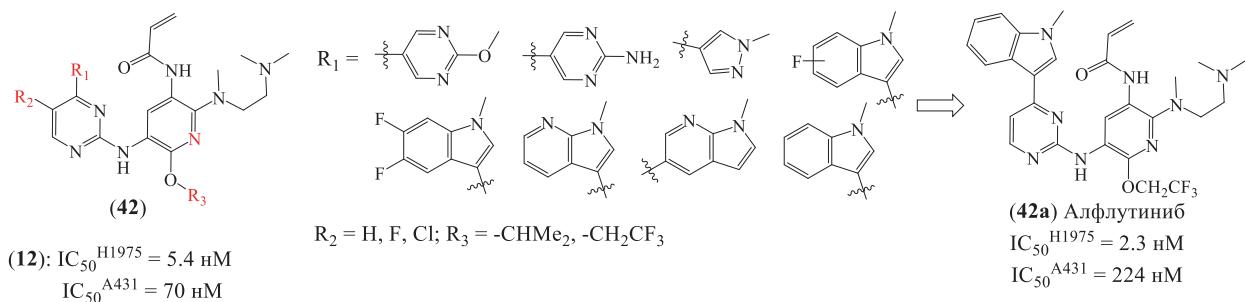


Схема 15. Аналоги осимертиниба с пиридиновым линкером.

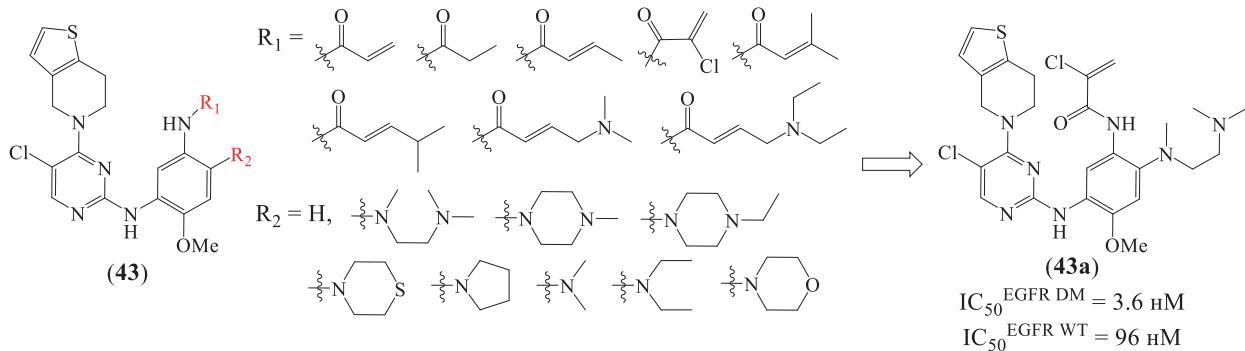


Схема 16. Тетрагидротиенопиридиновые аналоги осимертиниба.

Тестирование *in vitro* показало, что наименее активными были наиболее гидрофобные соединения с тиоморфолином, а также ингибиторы, не содержащие аминной боковой цепи. Алкильные заместители при акриламиде снижали целевую активность. Ингибитор (43а) показал сопоставимую с соединением (12) целевую активность и увеличенную в 3 раза селективность.

Было исследовано влияние на активность некоторых электронодонорных и электроноакцепторных заместителей при акриламидной “боеголовке” (R_1), а также в пирамидиновом (R_2 , R_3) и индольном (R_4) фрагментах структуры (44) (схема 17) [83]. Показано, что введение электроноакцепторных заместителей в акриламидную группу в целом повышало активность ингибиторов, но снижало селективность; электронодонорные заместители в целом снижали ингибирующую активность. Среди модификаций акриламида предпочтение было отдано гексенамидной группе в силу наиболее высокого достигнутого значения селективности. Цианогруппа в положении 5 и ме-

тильная группа в положении 4 пирамидинового цикла, предназначенные для дополнительного взаимодействия ингибитора с Met790, обусловили умеренное снижение активности, но повышение селективности ингибиторов. Гексенамидная группа в комбинации с 4-метилпирамидиновым основом в структуре соединения (44а) позволили повысить селективность в отношении EGFR DM в 95 раз при сохранении целевой активности на уровне референса (12). Все соединения со фторированным индолом показали сниженную активность.

Поскольку алленамиды способны избирательно реагировать с остатком цистеина в пептидах [84], были получены серии аналогов осимертиниба с алленамидной “боеголовкой” на основе структур (45) и (46) (схема 18) [85]. В тестах *in vitro* была установлена высокая активность алленамидных ингибиторов в отношении как EGFR DM, так и EGFR WT. Из данных исследования кинетики следовало, что ковалентная реактивность алленамидной группы на порядок превосходит реак-

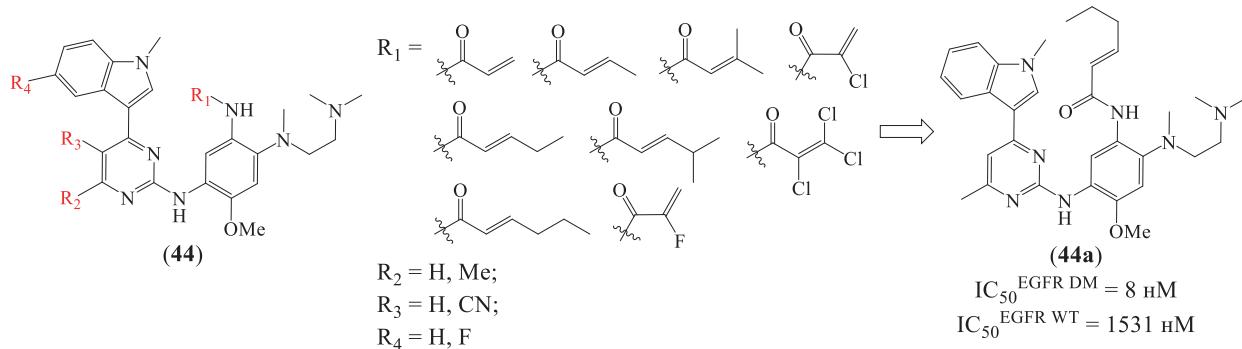


Схема 17. Модификации акриламида и пирамидинового остова.

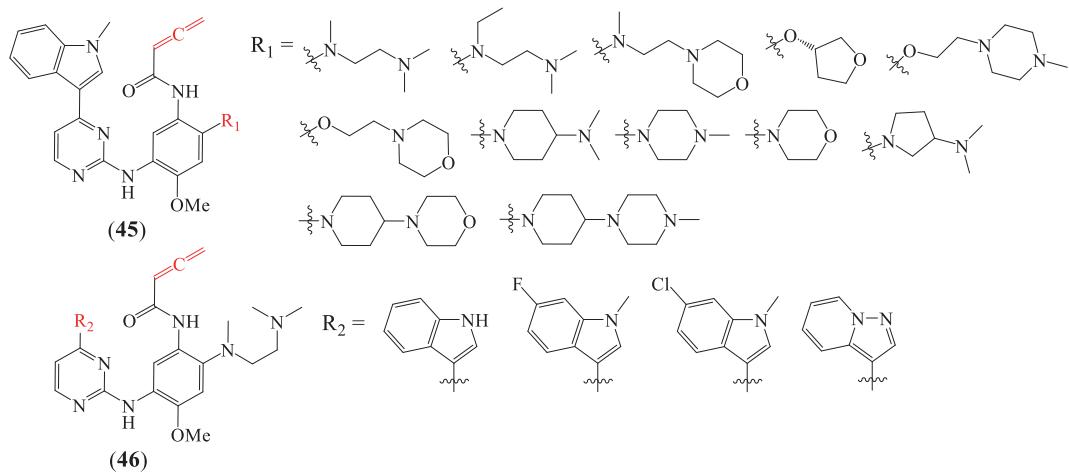


Схема 18. Алленамидные аналоги осимертиниба.

тивность акриламида. И это, по-видимому, обуславливает низкую стабильность и пероральную биодоступность таких соединений, а также неприемлемые параметры фармакокинетики, что делает их малоперспективными.

Стоит подчеркнуть, что выбор оптимального по реакционной способности акцептора Михаэля – важный этап разработки ковалентных ингибиторов, чему посвящено множество работ. Обобщив и систематизировав накопленный к 2023 г. опыт создания ковалентных ингибиторов, Zhao и Bourne классифицировали известные “боеголовки” по предпочтительности применения к различным семействам киназ. Из приведенных схем следует, что в отношении EGFR предпочтителен выбор акриламидной группы [86].

В некоторых случаях возможна разработка ингибиторов с одновременным действием на две мишени вследствие схожести строения сайтов связывания данных киназ, например, EGFR DM и ALK. Было установлено, что аминопиrimидиновое ядро ингибиторов EGFR и ALK образует идентичные водородные связи с шарнирными Met793 и Met1199 соответственно. Однако для ингибиторов EGFR DM важным является образование ковалентной связи между акцептором Михаэля и Cys797, тогда как для ингибиторов ALK ключевой выступает водородная связь между изопропилсульфоновой группой и Lys1150 [87–89]. Были получены серии таких ингибиторов, наиболее активные из них показаны на рис. 6.

При разработке 2,4-диаминопиrimидиновых ингибиторов двойного действия EGFR DM/BTK было получено соединение (50) (рис. 6), показавшее многообещающие результаты в доклинических исследованиях. Сунвозертиниб (50) по завер-

шении II фазы клинических испытаний в 2023 г. был одобрен в КНР для лечения метастатического НМРЛ^{T790M} [90, 91].

Информация по упомянутым ингибиторам с аминопиrimидиновым остатом сведена в табл. 1.

6. ИНГИБИТОРЫ С ПИРРОЛОПИРИМИДИНОВЫМ ОСТОВОМ

Согласно данным молекулярного моделирования, конденсированные с пиридином циклы могут обуславливать дополнительные полезные взаимодействия в активном сайте EGFR DM. Таким образом, были разработаны новые структурные остаты для TKI третьего поколения. Так, при скрининге пирролопиридиновых TKI многообещающие результаты показал ингибитор PF-06459988 (51) (рис. 7), который в клеточных тестах *in vitro* ингибирал рост клеток H1975 на уровне осимертиниба (12), а по селективности превзошел его в 40 раз [92]. PF-06459988 проходил клинические испытания как препарат для лечения НМРЛ^{T790M} (NCT02297425), но исследования были досрочно завершены в 2018 г. на II фазе.

В 2014 г. был разработан пирролопиридиновый ингибитор (52) (рис. 7), известный как авитиниб – первый собственный ингибитор EGFR третьего поколения в КНР [93]. Соединение (52) ингибирало киназу EGFR DM с $IC_{50} = 0.18$ нМ и 43-кратной селективностью, а в клеточных тестах показало $IC_{50}^{H1975} = 7.3$ нМ и 43-кратную селективность. Авитиниб проявил мощную противоопухолевую эффективность *in vivo* без признаков потери массы тела у лабораторных животных в качестве меры токсичности [94]. Клинические исследования авитиниба продолжаются (NCT03856697, NCT03058094, NCT05361915 и др.).

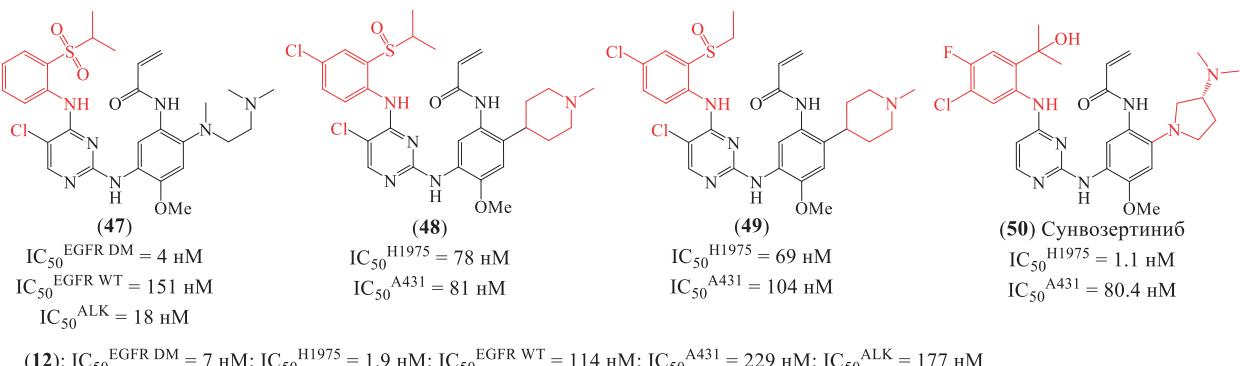


Рис. 6. Ингибиторы двойного действия EGFR DM/ALK и EGFR DM/BTK.

Таблица 1. Сводная информация по ингибиторам EGFR DM с аминопиrimидиновым остатком

Ингибитор	IC_{50} EGFR DM, нМ	Селективность	Метод исследования	Ссылка
(9)	0.5	12	Киназное профилирование, панель Reaction Biology (США)	[28]
(12)	1.0	184	Киназное профилирование, панель EMD Kinase Profiler	[35]
(15a)	0.4	677	Иммуноферментный анализ (ELISA), инкубация 1 ч	[42]
(18a)	3,9	18	Гомогенная флуоресценция с временным разрешением (HTRF), комплект Cisbio (США), инкубация 0.5 ч	[45]
(20a)	4.1	68	ELISA	[47]
(21b)	6.4	50	Киназное профилирование, панель Z'-LYTE (Invitrogen, США)	[48]
(22a)	0.18	16	Гомогенная флуоресценция с временным разрешением (HTRF), инкубация 30 мин	[49]
(23)	16.5 (H1975)	59	Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток, комплект Cell Titer-Glo, инкубация 72 ч	[53]
(24)	22 (H1975)	>45	Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток с использованием резазурина, инкубирование 72 ч	[55]
(26a)	0.26	16	Резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), комплект Z'-Lyte (Thermo, США)	[59]
(28)	1.1	103	ELISA	[63]
(29a)	2.1	30	Комплекты для анализа активности киназ (Eurofins, Carna, Германия)	[64]
(32)	0.55	80	Комплекты для анализа активности киназ (Eurofins, Carna, Германия)	[67]
(33a)	4.1	85	ELISA	[69]
(34)	0.3	20	ELISA	[70]
(39)	2.7	13	Резонансный перенос энергии флуоресценции Lance Ultra с временным разрешением (TR-FRET), инкубация 1 ч	[74]
(41a)	4.0	>2500	HTRF, комплект KinEASE-TK (Cisbio, США), инкубация 40 мин	[78]
(42a)	2.3 (H1975)	97	Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток с использованием сульфородамина B, инкубация 72 ч	[79]
(43a)	3.6	27	ELISA	[82]
(44a)	8	191	ELISA	[83]
(50)	1.1	73	Комплект Multi-Spot (Meso Scale, США), инкубация 4 ч	[90]

На основе структуры авитиниба были получены серии новых ингибиторов EGFR DM, из которых соединение (53) (рис. 7) показало наиболее высокую активность и селективность *in vitro*, сопоставимую с референсным ингибитором (52) [95]. В результате исследований влияния заместителей в положениях 3 и 4 пирролопирамидинового остатка было получено соединение (54) (рис. 7) с субнаномолярным значением IC_{50} и 33-кратной селективностью [96, 97]. Хотя в клеточных тестах порядок значений IC_{50} был иной,

высокая селективность сохранялась. В кинетических тестах было установлено, что данный ряд ингибиторов обладает высокой аффинностью к EGFR DM и низкой степенью зависимости от образования ковалентной связи для достижения эффективного ингибирования, что может быть использовано в случае третичной мутации L858R/T790M/C797S, являющейся одной из причин резистентности к ингибиторам EGFR третьего поколения [98]. Сообщается, что в случае замены пирролопирамидинового ос-

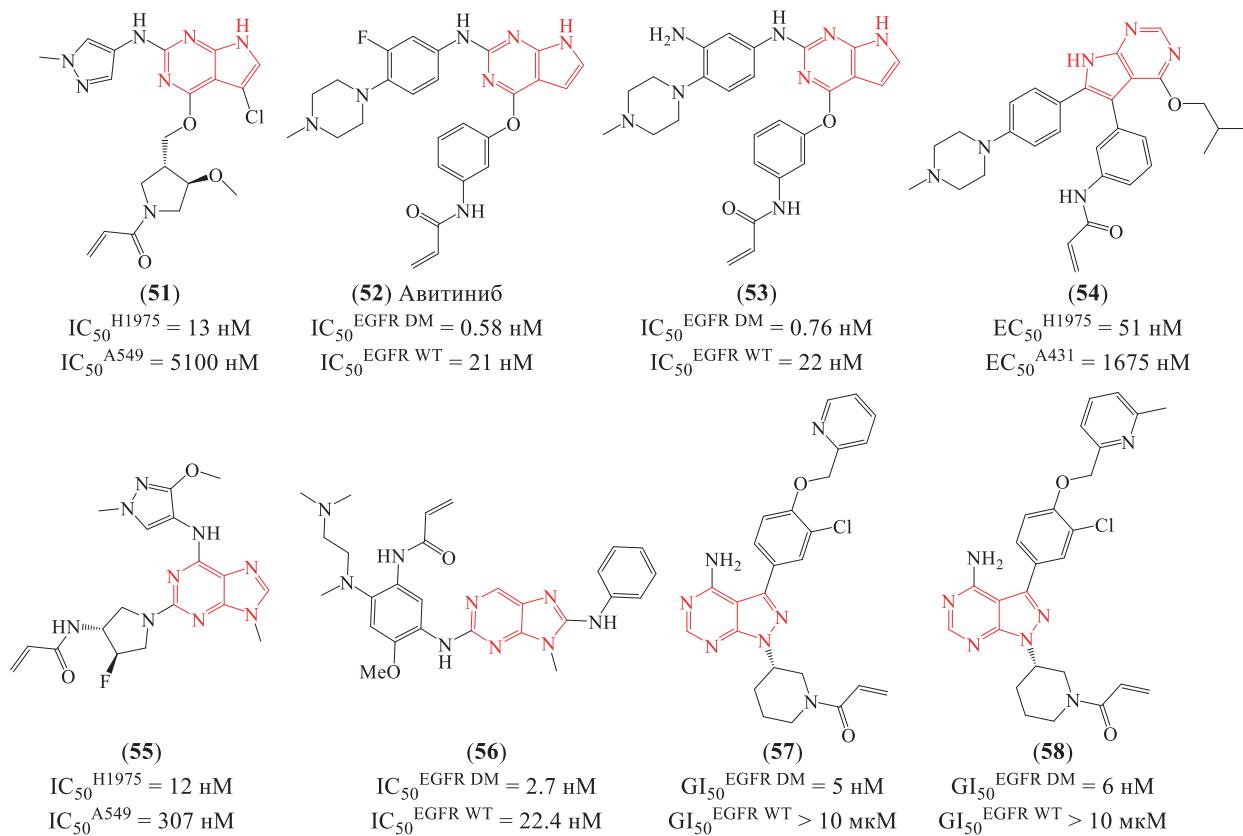


Рис. 7. Пиррол-, пиразол-пиrimидиновые и пуриновые ингибиторы EGFR DM.

това на пирролопиридиновый происходит значительное снижение целевой активности и селективности [99, 100].

7. ИНГИБИТОРЫ С ПУРИНОВЫМ И ПИРАЗОЛОПИРИМИДИНОВЫМ ОСТОВАМИ

Пуриновый ингибитор (55), известный как мавелертиниб (или PF-06747775) (рис. 7), был получен модификацией соединения (51) [101]. В доклинических исследованиях мавелертиниб показал наномолярную активность и 26-кратную селективность в отношении EGFR DM, а также высокую эффективность *in vivo*, пероральную доступность ~80% и приемлемый профиль безопасности. Разработка мавелертиниба была прекращена на II фазе клинических испытаний в 2020 г. (NCT02349633).

Тестирование *in vitro* серий пуриновых TKI EGFR DM выявило перспективное соединение (56) (рис. 7), сопоставимое по активности и селективности с референсным соединением (12) [102]. На основе структуры известного пуринового

ингибитора BTK ибрутиниба были получены ингибиторы EGFR DM (57) и (58) (рис. 7), которые дозозависимо вызывали гибель клеток H1975 при наномолярных концентрациях с 500-кратной селективностью, были эффективны *in vivo*, а также слабо ингибировали INSR и IGF1R [103, 104].

8. ИНГИБИТОРЫ С ТИОФЕНО- И ТИОПИРАНОПИРИМИДИНОВЫМИ ОСТОВАМИ

Разработка тиофенопириимидинового ингибитора EGFR DM олмутиниба (59) (рис. 8) началась в 2013 г. Он ингибировал *in vitro* киназу EGFR DM с $IC_{50} = 10 \text{ нМ}$ и селективностью 222 [105]. В долгосрочных моделях *in vivo* олмутиниб продемонстрировал устойчивый противоопухолевый эффект [106]. По завершении фазы I/II клинических испытаний в 2016 г. олмутиниб получил первое одобрение в Южной Корее как препарат для второлинейной терапии НМРЛ^{T790M}. Однако в 2021 г. клинические испытания были прекращены на II фазе из-за выявленных проблем с безопасностью [107].

На основе олмутиниба (59) были получены ряды новых ТКИ EGFR DM, из которых ингибитор (60) был наиболее активен *in vitro* и сопоставим с референсом (59) [108]. Исследования *in silico* показали перспективность стерического расширения тиофенопирамидинового остава до тиопиранопирамидинового за счет дополнительного связывания в активном сайте киназы [109]. Однако тестирование *in vitro* показало, что в целом тиопиранопирамидиновые ингибиторы, например, соединение (61) (рис. 8), были менее активны, чем их тиофенопирамидиновые аналоги. В ряду сульфоновых производных соединение (62) (рис. 8) уступало по активности, но в 60 раз превосходило по селективности референсный ингибитор (12) [110].

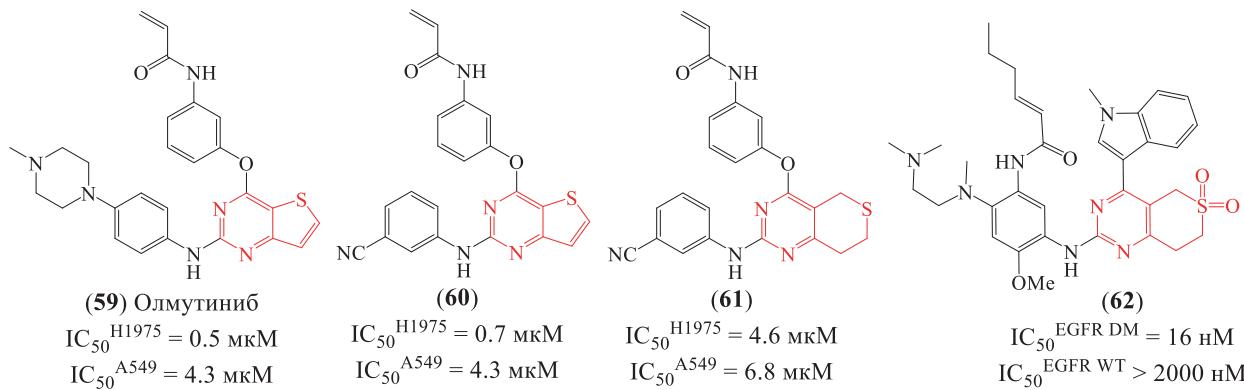


Рис. 8. Тиофено- и тиопиранопирамидиновые ингибиторы EGFR DM.

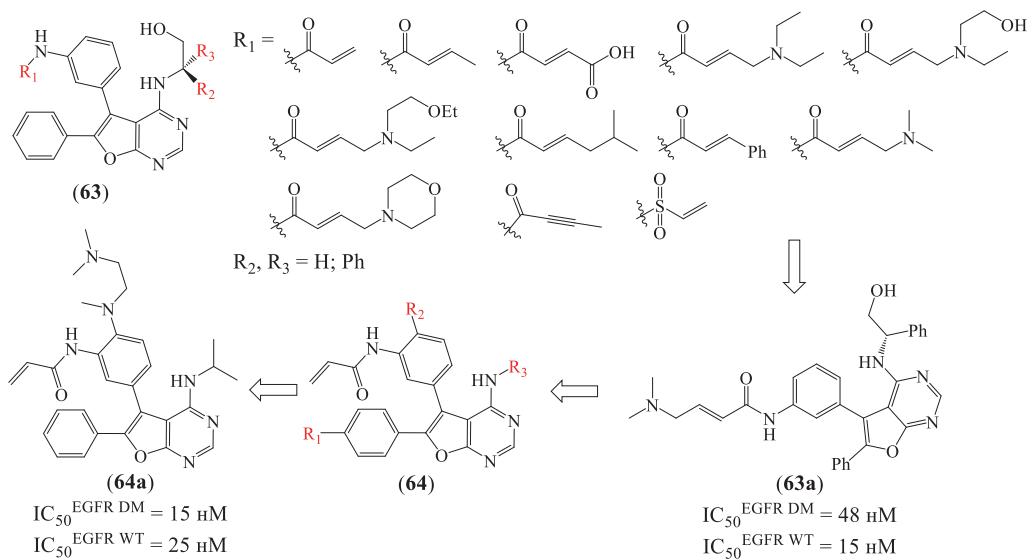


Схема 19. Фуранопирамидиновые ингибиторы EGFR DM.

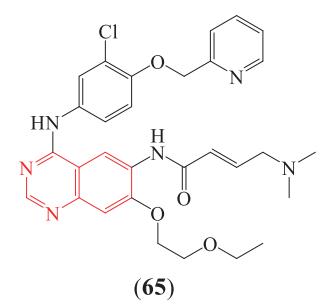
DBPR112) участвовал в клинических испытаниях (NCT03246854), которые в 2018 г. были прекращены на I фазе.

На следующем этапе была проведена оптимизация структуры соединения (64) (схема 19) путем подбора оптимальных алкильных заместителей R₁ и R₃, а также солюбилизирующей группы R₂ методами *in silico*. Соединение (64a) показало наилучший баланс характеристик, включая 1.7-кратную киназную селективность *in vitro*, эффективное подавление роста опухоли H1975 *in vivo*, приемлемые параметры фармакокинетики и пероральную доступность 27% [114]. Доклинические исследования соединения (64a) продолжаются.

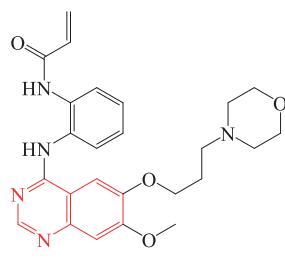
10. ИНГИБИТОРЫ С ХИНАЗОЛИНОВЫМ, ПИРИДО- И ПИРИДОПИРИМИДИНОВЫМИ ОСТОВАМИ

Несмотря на то, что хиназолиновый остаток характерен для ингибиторов EGFR первого и второго поколений, он также используется в разработке TKI третьего поколения [115, 116]. Ингибитор (65) (рис. 9) показал 4.7-кратную селективность *in vitro* в отношении клеток H1975

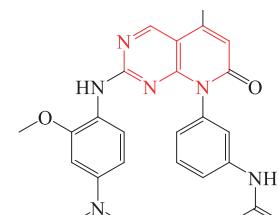
и был эффективен *in vivo* на уровне референса (12) [117]. Соединение (66) (рис. 9) ингибирировало киназу EGFR DM с IC₅₀ = 4.3 нМ и 24-кратной селективностью, сопоставимой с референсным соединением (9) [118]. Однако в клеточных тестах соединение (66) показало уже микромолярную активность с 1.5-кратной селективностью, значительно уступая референсу. Пиридинопириимидиновый ингибитор (67) (рис. 9) был наиболее активным *in vitro* в своей серии TKI, превзойдя референсный осимертиниб по активности в 8.7 раз, а по селективности – в 10 раз [119]. Полученные данные PCA комплекса соединения (67) с EGFR^{T790M} (PDB: 5GMP) позволили смоделировать и получить новую серию ингибиторов, среди которых наилучший баланс свойств, включая умеренные параметры фармакокинетики и пероральную биодоступность 16%, показал ингибитор (68) (рис. 9), сопоставимый *in vitro* с референсным соединением (12) [120]. Ингибитор (69) (рис. 9) в клеточных тестах был сопоставим с соединением (12), имея IC₅₀^{H1975} = 45 нМ. Его киназная активность и селективность в 4.7 и 5 раз соответственно превосходили таковые для осимертиниба. В доклинических испытаниях



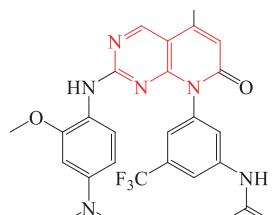
(65)
IC₅₀^{H1975} = 60.6 нМ
IC₅₀^{A431} = 288 нМ



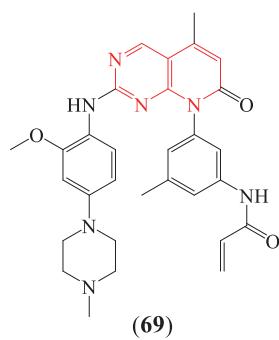
(66)
IC₅₀^{H1975} = 8.7 мкМ
IC₅₀^{A431} = 13.4 мкМ



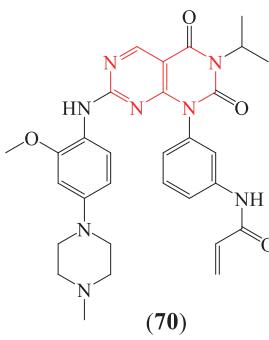
(67)
IC₅₀^{EGFR DM} = 0.8 нМ
IC₅₀^{EGFR WT} = 240 нМ



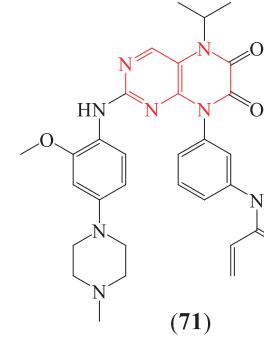
(68)
IC₅₀^{EGFR DM} = 2.0 нМ
IC₅₀^{EGFR WT} = 182 нМ



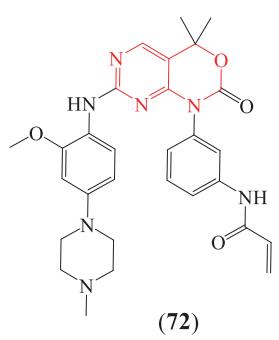
(69)
IC₅₀^{EGFR DM} = 2.0 нМ
IC₅₀^{EGFR WT} = 185 нМ



(70)
IC₅₀^{EGFR DM} = 0.3 нМ
IC₅₀^{EGFR WT} = 79 нМ



(71)
IC₅₀^{EGFR DM} = 0.3 нМ
IC₅₀^{EGFR WT} = 2.0 нМ



(72)
IC₅₀^{EGFR DM} = 4.5 нМ
IC₅₀^{EGFR WT} = 156 нМ

Рис. 9. Ингибиторы EGFR DM с хиназолиновыми и модифицированными хиназолиновыми остатками.

соединения (69) были установлены противоопухолевая эффективность *in vivo*, слабое ингиби-
рование FGFR1 и пероральная биодоступность 25% [121]. Модификацией хиназолинового остава был получен ингибитор (70) (рис. 9), который по киназной активности был в 67 раз более активен, чем референсный ингибитор (9), и в 19 раз более селективен. Селективность соединения (70) на клетках была 36-кратной с $IC_{50}^{H1975} = 44$ нМ и с $IC_{50}^{A431} = 1564$ нМ, что было сопоставимо с соединением (9) [122]. Последующая структурная оптимизация привела к получению серии птеридиндионовых ТКИ, из которых наиболее активный ингибитор (71) (рис. 9) в киназных тестах уступал по селективности соединению (9), тогда как в клеточных тестах превосходил референс по активности в 1.7 раз, а по селективности – в 20 раз [123]. Ингибитор (72) (рис. 9), полученный дальнейшей модификацией соединения (71), был сопоставим с роциллетинибом в киназных тестах, а в клеточных тестах уступал ему в 2 раза по активности и селективности [124].

Были получены и другие ряды ТКИ EGFR DM с хиназолиновым и модифицированными хиназолиновыми оставами, однако существенных преимуществ над существующими ингибиторами достигнуто не было [125–128].

11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что осимертиниб (12) стал эталоном лечения лекарственно-устойчивого НМРЛ, он не лишен недостатков, проявляющихся в ингибировании им и его метаболитами других киназ, влекущих за собой ряд побочных дозозависимых эффектов. Развитие методов *in silico*, а также накопленный опыт создания ТКИ EGFR DM на основе WZ4002 (8), роциллетиниба (9) и в большей степени осимертиниба (12) позволили выявить основные структурные факторы, ответственные за целевую активность и селективность. Было показано, что значительные отклонения от структурного шаблона соединения (12) приводят к критической утрате активности и селективности. Наиболее перспективными направлениями структурной модификации соединения (12) оказались *N*-метилиндолный фрагмент и *N,N,N'*-триметилэтилендиаминовая боковая группа. Модификация *N*-метилиндола ограничена стерическими факторами, поскольку группа ориенти-

руется внутрь активного сайта киназы. Боковая группа ориентируется в область растворителя и балансирует физико-химические свойства молекулы, что задает свой коридор для модификации. В настоящем обзоре приведен ряд работ, в которых данные направления были успешно реализованы с получением клинически одобренных ингибиторов EGFR DM. Также на основе представленных данных можно заключить, что несмотря на высокую степень исследованности и запатентованности пространства структурных аналогов (12), возможность разработки новых эффективных препаратов для лечения лекарственно-устойчивого НМРЛ по-прежнему остается, что сохраняет перспективы для преодоления монополии осимертиниба в данном сегменте национального здравоохранения.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных авторами данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равный вклад в написание этой статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” МЗ РФ, 2022. С. 28.
2. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” МЗ РФ, 2022. С. 5.
3. Chunhacha P., Chanvorachote P. // Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol. 2012. V. 4. P. 149–155. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23071872/>

4. Stamos J., Sliwkowski M., Eigenbrot C. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 46265–46272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207135200>
5. Amelia T. // *Molecules*. 2022. V. 27. P. 819. <https://doi.org/10.3390/molecules27030819>
6. Yun C.-H., Boggon T., Li Y., Woo M., Greulich H., Meyerson M., Eck M. // *Cancer Cell*. 2007. V. 11. P. 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.12.017>
7. Sharma S., Bell D., Settleman J., Haber D. // *Nat. Rev. Cancer*. 2007. V. 7. P. 169–181. <https://doi.org/10.1038/nrc2088>
8. Castellanos E.H., Horn L. // *Curr. Treat. Options Oncol.* 2015. V. 16. P. 51. <https://doi.org/10.1007/s11864-015-0365-1>
9. Elzahabi H., Nossier E., Alasfoury R., El-Manawaty M., Sayed S., Elkaeed E., Metwaly A., Hagras M., Eissa I. // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2022. V. 37. P. 1053–1076. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2062752>
10. Karachaliou N., Fernandez-Bruno M., Bracht J., Rosell R. // *Transl. Cancer Res.* 2019. V. 8. P. S23–S47. <https://doi.org/10.21037/tcr.2018.10.06>
11. Ko B., Paucar D., Halmos B. // *Lung Cancer (Auckl)*. 2017. V. 8. P. 147–159. <https://doi.org/10.2147/lctt.s117944>
12. Eck M., Yun C.-H. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1804. P. 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.010>
13. Yver A. // *Ann. Oncol.* 2016. V. 27. P. 1165–1170. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw129>
14. Ward R., Goldberg F. // *Kinase Drug Discovery*. Royal Society of Chemistry, 1th ed., 2011. P. 332. <https://doi.org/10.1039/9781849733557>
15. Engelman J., Zejnullahu K., Gale C., Lifshits E., Gonzales A., Shimamura T., Zhao F., Vincent P., Naumov G., Bradner J., Althaus I., Gandhi L., Shapiro G., Nelson J., Heymach J., Meyerson M., Wong K., Jänne P. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 11924–11932. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-1885>
16. Li D., Ambrogio L., Shimamura T., Kubo S., Takahashi M., Chirieac L., Padera R., Shapiro G., Baum A., Himmelsbach F., Rettig W., Meyerson M., Solca F., Greulich H., Wong K. // *Oncogene*. 2008. V. 27. P. 4702–4711. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.109>
17. Solca F., Dahl G., Zoephel A., Bader G., Sanderson M., Klein C., Kraemer O., Himmelsbach F., Haaksma E., Adolf G. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012. V. 343. P. 342–350. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.197756>
18. Katakami N., Atagi S., Goto K., Hida T., Horai T., Inoue A., Ichinose Y., Koboyashi K., Takeda K., Kura K., Nishio K., Seki Y., Ebisawa R., Shahidi M., Yamamoto N. // *J. Clin. Oncol.* 2013. V. 31. P. 3335–3341. <https://doi.org/10.1200/jco.2012.45.0981>
19. Kwak E., Sordella R., Bell D., Godin-Heymann N., Okimoto R., Brannigan B., Harris P., Driscoll D., Fidias P., Lynch T., Rabindran S., McGinnis J., Wissner A., Sharma S., Isselbacher K., Settleman J., Haber D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 7665–7670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502860102>
20. Sequist L., Besse B., Lynch T., Miller V., Wong K., Gitlitz B., Eaton K., Zacharchuk C., Freyman A., Powell C., Ananthakrishnan R., Quinn S., Soria J.-C. // *J. Clin. Oncol.* 2010. V. 28. P. 3076–3083. <https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.9414>
21. Yun C.-H., Mengwasser K., Toms A., Woo M., Greulich H., Wong K.-K., Meyerson M., Eck M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 2070–2075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709662105>
22. Kalous O., Conklin D., Desai A., O'Brien N., Ginter C., Anderson L., Cohen D., Britten C., Taylor I., Christensen J., Slamon D., Finn R. // *Mol. Cancer Ther.* 2012. V. 11. P. 1978–1987. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0730>
23. Yoshimura N., Kudoh S., Kimura T., Mitsuoka S., Matsuura K., Hirata K., Matsui K., Negoro S., Nakagawa K., Fukuoka M. // *Lung Cancer*. 2006. V. 51. P. 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.10.006>
24. Jänne P., Pawel J., Cohen R., Crino L., Butts C., Olson S., Eiseman I., Chiappori A., Yeap B., Lenehan P., Dasse K., Sheeran M., Bonomi P. // *J. Clin. Oncol.* 2007. V. 25. P. 3936–3944. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.1336>
25. Ghosh A., Samanta I., Mondal A., Liu W. // *Chem. Med. Chem.* 2019. V. 14. P. 889–906. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900107>
26. Yu H., Riely G. // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2013. V. 11. P. 161–169. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2013.0024>
27. Zhou W., Ercan D., Chen L., Yun C.-H., Li D., Capelletti M., Cortot A., Chirieac L., Iacob R., Padera R., Engen J., Wong K.-K., Eck M., Gray N., Jänne P. // *Nature*. 2009. V. 462. P. 1070–1074. <https://doi.org/10.1038/nature08622>
28. Sjin R., Lee K., Walter A., Dubrovskiy A., Sheets M., Martin T., Labenski M., Zhu Z., Tester R., Karp R., Medikonda A., Chaturvedi P., Ren Y., Haringsma H.,

- Etter J., Raponi M., Simmons A., Harding T., Niu D., Nacht M., Westlin W., Petter R., Allen A., Singh J. // Mol. Cancer Ther. 2014. V. 13. P. 1468–1479. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-13-0966>
29. Walter A., Sjin R., Haringsma H., Ohashi K., Sun J., Lee K., Dubrovskiy A., Labenski M., Zhu Z., Wang Z., Sheets M., Martin T., Karp R., Kalken D., Chaturvedi P., Niu D., Nacht M., Petter R., Westlin W., Lin K., Jaw-Tsai S., Raponi M., Dyke T., Etter J., Weaver Z., Pao W., Singh J., Simmons A., Harding T., Allen A. // Cancer Discov. 2013. V. 3. P. 1404–1415. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-13-0314>
30. Yan X.-E., Zhu S.-J., Liang L., Zhao P., Choi H., Yun C.-H. // Oncotarget. 2018. V. 9. P. 13652–13665. <https://doi.org/10.18632%2Foncotarget.18588>
31. Van Der Steen N., Caparello C., Rolfo C., Pauwels P., Peters G., Giovannetti E. // Onco Targets Ther. 2016. V. 9. P. 6065–6074. <https://doi.org/10.2147/ott.s97644>
32. Simmons A., Jaw-Tsai S., Haringsma H., Allen A., Harding T. // Cancer Res. 2015. V. 75. P. 793. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-793>
33. Dhangra K. // Ann. Oncol. 2016. V. 27. P. 1161–1164. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw140>
34. Finlay M.R., Anderton M., Ashton S., Ballard P., Bethel P., Box M., Bradbury R., Brown S., Butterworth S., Campbell A., Chorley C., Colclough N., Cross D., Currie G.S., Grist M., Hassall L., Hill G., James D., James M., Kemmitt P., Klinowska T., Lamont G., Lamont S., Martin N., McFarland H., Mellor M., Orme J., Perkins D., Perkins P., Richmond G., Smith P., Ward R., Waring M., Whittaker D., Wells S., Wrigley G. // J. Med. Chem. 2014. V. 57. P. 8249–8267. <https://doi.org/10.1021/jm500973a>
35. Cross D., Ashton S., Ghiorghiu S., Eberlein C., Neahan C., Spitzler P., Orme J., Finlay M.R., Ward R., Mellor M., Hughes G., Rahi A., Jacobs V., Brewer M., Ichihara E., Sun J., Jin H., Ballard P., Al-Kadhim K., Rowlinson R., Klinowska T., Richmond G., Cantarini M., Kim D.-W., Ranson M., Pao W. // Cancer Discov. 2014. V. 4. P. 1046–1061. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-14-0337>
36. Yan X.-E., Ayaz P., Zhu S.-J., Zhao P., Liang L., Zhang C., Wu Y.-C., Li J.-L., Choi H.-G., Huang X., Shan Y., Shaw D., Yun C.-H. // J. Med. Chem. 2020. V. 63. P. 8502–8511. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00891>
37. Mah R., Thomas J., Shafer C. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014. V. 24. P. 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.003>
38. Jackson P., Widen J., Harki D., Brummond K. // J. Med. Chem. 2016. V. 60. P. 839–885. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00788>
39. Streleow J. // SLAS Discov. 2017. V. 22. P. 3–20. <https://doi.org/10.1177/1087057116671509>
40. Kuzmič P. // bioRxiv. 2020. P. 171207. <https://doi.org/10.1101/2020.06.25.171207>
41. Soria J.-C., Ohe Y., Vansteenkiste J., Reungwetwattana T., Chewaskulyong B., Lee K.-H., Dechaphunkul A., Imamura F., Nogami N., Kurata T., Okamoto I., Zhou C., Cho B., Cheng Y., Cho E.K., Voon P.J., Planchard D., Su W.-C., Gray J., Lee S.-M., Hodge R., Marotti M., Rukazakov Y., Ramalingam S. // N. Engl. J. Med. 2018. V. 378. P. 113–125. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1713137>
42. Xiao Q., Qu R., Gao D., Yan Q., Tong L., Zhang W., Ding J., Xie H., Li Y. // Bioorg. Med. Chem. 2016. V. 24. P. 2673–2680. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.032>
43. Zhou F., Zhang L., Jin Y., Liu W., Cheng P., He X., Xie J., Shen S., Lei J., Ji H., Hu Y., Liu Y., Cui Y., Lv Q., Lan J. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 28. P. 1257–1261. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.12.009>
44. Yi Y., Wang L., Zhao D., Huang S., Wang C., Liu Z., Sun H., Liu K., Ma X., Li Y. // Chem. Biol. Drug. Des. 2018. V. 92. P. 1988–1997. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13370>
45. Shao J., Liu S., Liu X., Pan Y., Chen W. // Bioorg. Med. Chem. 2020. V. 28. P. 115680. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115680>
46. Fawwaz M., Mishiro K., Nishii R., Sawazaki I., Shiba K., Kinuya S., Ogawa K. // Molecules. 2020. V. 25. P. 2914. <https://doi.org/10.3390/molecules25122914>
47. Chen L., Fu W., Feng C., Qu R., Tong L., Zheng L., Fang B., Qiu Y., Hu J., Cai Y., Feng J., Xie H., Ding J., Liu Z., Liang G. // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 140. P. 510–527. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.061>
48. Gao H., Yang Z., Yang X., Rao Y. // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 4553–4559. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.004>
49. Liu Q., Luo Y., Li Z., Chen C., Fang L. // Bioorg. Med. Chem. 2021. V. 36. P. 116094. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116094>
50. Yu H., Wei M., Cui Y., Sun X., Tong Z., Sun G., Tan S., Ma J., Gao P., Liao J., Liu Z., Wang S., Xiu W. // Patent Application WO2016054987A1, published 14.04.2016.
51. Yang C.-H., Camidge D.N., Yang C.-T., Zhou J., Guo R., Chiu C.-H., Chang G.-C., Shiah H.-S., Chen Y., Wang C.-C., Berz D., Su W.-C., Yang N., Wang Z., Fang J., Chen J., Nikolinakos P., Lu Y., Pan H., Maniam A., Bazhenova L., Shirai K.,

- Jahanzeb M., Willis M., Masood N., Chowhan N., Hsia T.-C., Jian H., Lu S. // *J. Thorac. Oncol.* 2020. V. 15. P. 1907–1918.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.09.001>
52. Lu S., Wang Q., Zhang G., Dong X., Yang C.-T., Song Y., Chang G.-C., Lu Y., Pan H., Chiu C.-H., Wang Z., Feng J., Zhou J., Xu X., Guo R., Chen J., Yang H., Chen Y., Yu Z., Shiah H.-S., Wang C.-C., Yang N., Fang J., Wang P., Wang K., Hu Y., He J., Wang Z., Shi J., Chen S., Wu Q., Sun C., Li C., Wei H., Cheng Y., Su W.-C., Hsia T.-C., Cui J., Sun Y., Ou S.-H., Zhu V., Yang J. // *J. Thorac. Oncol.* 2022. V. 17. P. 411–422.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.10.024>
53. Jiang Y. // Patent CN105085489A, published 25.11.2015.
54. Blair H. // *Drugs*. 2023. V. 83. P. 1433–1437.
<https://doi.org/10.1007/s40265-023-01946-w>
55. Peng J., Costanzo M., Greco M., Green M., Wilde V., Zhang D. // Patent Application WO2016094821A2, published 16.06.2016.
56. Shi Y., Zhao Y., Yang S., Zhou J., Zhang L., Chen G., Fang J., Zhu B., Li X., Shu Y., Shi J., Zheng R., Wang D., Yu H., Huang J., Zhuang Z., Wu G., Zhang L., Guo Z., Greco M., Li X., Zhang Y. // *J. Thorac. Oncol.* 2022. V. 17. P. 708–717.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.01.015>
57. Yang S., Wu S., Zhao Y., Chen G., Zhu B., Li X., Wang K., Shi J., Cang S., Yao W., Fan Y., Fang J., Zhang L., Zhou J., Wu L., Zheng R., Huang M., Pan Y., Yang Z., Sun M., Yu H., Wang D., Huang J., Wang L., Shu Y., Chen Z., Liu C., Li J., Liu J., Sun S., Guo Y., Meng Z., Liu Z., Han Z., Wu G., Lu H., Ma R., Hu S., Zhao G., Zhang L., Liu Z., Xie C., Zhong D., Zhao H., Bi M., Yi S., Guo S., Yi T., Li W., Lin Y., Chen Z., Zhuang Z., Guo Z., Greco M., Wang T., Zhou A., Shi Y. // *Lung Cancer*. 2023. V. 180. P. 107194.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2023.107194>
58. Talele T. // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. P. 8712–8756.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00472>
59. Li J., An B., Song X., Zhang Q., Chen C., Wei S., Fan R., Li X., Zou Y. // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. V. 212. P. 113019.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113019>
60. An B., Pan T., Hu J., Pang Y., Huang L., Chan A., Li X., Yan J. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 183. P. 111709.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111709>
61. Gant T. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 57. P. 3595–3611.
<https://doi.org/10.1021/jm4007998>
62. Di Martino R., Maxwell B., Pirali T. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2023. V. 22. P. 562–584.
<https://doi.org/10.1038/s41573-023-00703-8>
63. Meng Y., Yu B., Huang H., Peng Y., Li E., Yao Y., Song C., Yu W., Zhu K., Wang K., Yi D., Du J., Chang J. // *J. Med. Chem.* 2021. V. 64. P. 925–937.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02005>
64. Zhou P., Chen G., Gao M., Wu J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. P. 6135–6145.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.018>
65. Zhang H., Wu W., Feng C., Liu Z., Bai E., Wang X., Lei M., Cheng H., Feng H., Shi J., Wang J., Zhang Z., Jin T., Chen S., Hu S., Zhu Y. // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. V. 135. P. 12–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.036>
66. Bouffard E., Zaro B., Dix M., Cravatt B., Wong C.-H. // *Tetrahedron Lett.* 2021. V. 74. P. 153178.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2021.153178>
67. Wang Y., Zhang X., Zhao L., Wang X., Han L., Dai X. // Patent Application WO2017088746A1, published 01.06.2017.
68. Han L., Zhang X., Wang Z., Zhang X., Zhao L., Fu W., Liang X., Zhang Z., Wang Y. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 665253.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.665253>
69. Yan Q., Chen Y., Tang B., Xiao Q., Qu R., Tong L., Liu J., Ding J., Chen Y., Ding N., Tan W., Xie H., Li Y. // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 152. P. 298–306.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.052>
70. Zhang T., Qu R., Chan S., Lai M., Tong L., Feng F., Chen H., Song T., Song P., Bai G., Liu Y., Wang Y., Li Y., Su Y., Shen Y., Sun Y., Chen Y., Geng M., Ding K., Ding J., Xie H. // *Mol. Cancer*. 2020. V. 19. P. 90.
<https://doi.org/10.1186/s12943-020-01202-9>
71. Shi Y., Li B., Wu L., Pan Y., Pan Z., Liu Y., Fan Y., Ji Y., Fang J., Shi Q., Shi J., Gao H., Hu Y., Wang X., He Z., Ma R., Zhang Y., Jiang D., Bai Y., Zhang Y., Huang L., Zhou T., Liu H., Wang D., Wen Q., Chen G., Zang A., Wang X., Zhang X., Hu J., Yang R., Zhang G., Gu K., Wang L., Wang Q., Wei Z., Li Z., Lu H., Zhang H., Chen H., Song T. // *J. Thorac. Oncol.* 2022. V. 17. P. 1205–1215.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.05.011>
72. Yang Z., Yang H., Ai Y., Zhang L., Li Z., Wan S., Xu X., Zhang H., Wu S., Zhang J., Zhang T. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2020. V. 152. P. 105463.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105463>
73. Rho J.K., Lee I.Y., Choi Y.J., Choi C.-M., Hur J.-Y., Koh J.S., Lee J., Suh B.-C., Song H.-J., Salgaonkar P., Lee J., Lee J., Jung D.S., Kim S.-Y., Woo D.-C., Baek I.-J., Lee J.-Y., Ha C.H., Sung Y.H., Kim J.K., Kim W.S., Song J.S., Kim C.H., Bivona T., Lee J.C. // *Cancer Res.* 2017. V. 77. P. 1200–1211.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-2432>

74. *Yun J., Hong M.H., Kim S.-Y., Park S.-W., Kim S., Yun M.R., Kang H.N., Pyo K.H., Lee S.S., Koh J.S., Song H.-J., Kim D.K., Lee Y.S., Oh S.-W., Choi S., Kim H.R., Cho B.C.* // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. P. 2575–2587.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-2906>
75. *Dhillon S.* // *Drugs.* 2021. V. 81. P. 1107–1113.
<https://doi.org/10.1007/s40265-021-01533-x>
76. *Yang H., Yan R., Jiang Y., Yang Z., Zhang X., Zhou M., Wu X., Zhang T., Zhang J.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. V. 187. P. 111966.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111966>
77. *Günther M., Lategahn J., Juchum M., Döring E., Keul M., Engel J., Tumbrink H., Rauh D., Laufer S.* // *J. Med. Chem.* 2017. V. 60. P. 5613–5637.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00316>
78. *Yang T., Zhang W., Cao S., Sun S., Cai X., Xu L., Li P., Zheng Z., Li S.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2022. V. 228. P. 113984.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113984>
79. *Luo H., Zhou H., Wang S., Wu Y.* // Patent US10072002B2, published 11.09.2018.
80. *Deeks E.* // *Drugs.* 2021. V. 81. P. 1775–1780.
<https://doi.org/10.1007/s40265-021-01588-w>
81. *Shi Y., Zhang S., Hu X., Feng J., Ma Z., Zhou J., Yang N., Wu L., Liao W., Zhong D., Han X., Wang Z., Zhang X., Qin S., Ying K., Feng J., Fang J., Liu L., Jiang Y.* // *J. Thorac. Oncol.* 2020. V. 15. P. 1015–1026.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.01.010>
82. *Li Y., Chang Y., Fu J., Ding R., Zhang L., Liang T., Liu Y., Liu Y., Hu J.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 226. P. 113845.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113845>
83. *Zhao B., Xiao Z., Qi J., Luo R., Lan Z., Zhang Y., Hu X., Tang Q., Zheng P., Xu S., Zhu W.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 163. P. 367–380.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.069>
84. *Abbas A., Xing B., Loh T.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014. V. 53. P. 7491–7494.
<https://doi.org/10.1002/anie.201403121>
85. *Chen D., Guo D., Yan Z., Zhao Y.* // *Med. Chem. Comm.* 2017. V. 9. P. 244–253.
<https://doi.org/10.1039/C7MD00571G>
86. *Zhao Z., Bourne P.* // *Pharmaceuticals.* 2022. V. 15. P. 1322.
<https://doi.org/10.3390/ph15111322>
87. *Chen Y., Wu J., Wang A., Qi Z., Jiang T., Chen C., Zou F., Hu C., Wang W., Wu H., Hu Z., Wang W., Wang B., Wang L., Ren T., Zhang S., Liu Q., Liu J.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. V. 139. P. 674–697.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.035>
88. *Jang J., Son J.B., To C., Bahcall M., Kim S.Y., Kang S.Y., Mushajiang M., Lee Y., Jänne P., Choi H.G., Gray N.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. V. 136. P. 497–510.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.079>
89. *Fan Y., Li W., Nie W., Yao H., Ren Y., Wang M., Nie H., Gu C., Liu J., An B.* // *Molecules.* 2023. V. 28. P. 2006.
<https://doi.org/10.3390/molecules28052006>
90. *Li Z., Zou H., Zhu W., Shen C., Wang R., Liu W., Chen X., Tsui H., Yang Z., Zhang X.* // Patent Application WO2019149164A1, published 08.08.2019.
91. *Dhillon S.* // *Drugs.* 2023. V. 83. P. 1629–1634.
<https://doi.org/10.1007/s40265-023-01959-5>
92. *Cheng H., Nair S., Murray B., Almaden C., Bailey S., Baxi S., Behenna D., Cho-Schultz S., Dalvie D., Dinh D., Edwards M., Feng J.L., Ferre R., Gajiwala K., Hemkens M., Jackson-Fisher A., Jalaie M., Johnson T., Kania R., Kephart S., Lafontaine J., Lunney B., Liu K., Liu Z., Matthews J., Nagata A., Niessen S., Ornelas M., Orr S., Pairish M., Planken S., Ren S., Richter D., Ryan K., Sach N., Shen H., Smeal T., Solowiej J., Sutton S., Tran K., Tseng E., Vernier W., Walls M., Wang S., Weinrich S., Xin S., Xu H., Yin M.-J., Zientek M., Zhou R., Kath J.* // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. P. 2005–2024.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01633>
93. *Xu X., Wang X., Mao L., Zhao L., Xi B.* // Patent US9586965B2, published 07.03.2017.
94. *Xu X., Mao L., Xu W., Tang W., Zhang X., Xi B., Xu R., Fang X., Liu J., Fang C., Zhao L., Wang X., Jiang J., Hu P., Zhao H., Zhang L.* // *Mol. Cancer Ther.* 2016. V. 15. P. 2586–2597.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-16-0281>
95. *Xia Z., Huang R., Zhou X., Chai Y., Chen H., Ma L., Yu Q., Li Y., Li W., He Y.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 224. P. 113711.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113711>
96. *Tomassi S., Lategahn J., Engel J., Keul M., Tumbrink H., Ketzer J., Mühlenberg T., Baumann M., Schultz-Fademrecht C., Bauer S., Rauh D.* // *J. Med. Chem.* 2017. V. 60. P. 2361–2372.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01626>
97. *Lategahn J., Keul M., Klövekorn P., Tumbrink H., Niggenaber J., Müller M., Hodson L., Fläbhoff M., Hardick J., Grabe T., Engel J., Schultz-Fademrecht C., Baumann M., Ketzer J., Mühlenberg T., Hiller W., Günther G., Unger A., Müller H., Heimsoeth A., Golz C., Blank-Landeshammer B., Kollipara L., Zahedi R., Strohmann C., Hengstler J., Otterlo W., Bauer S., Rauh D.* // *Chem. Sci.* 2019. V. 10. P. 10789–10801.
<https://doi.org/10.1039/C9SC03445E>

98. Thress K., Paweletz C., Felip E., Cho B., Stetson D., Dougherty B., Lai Z., Markovets A., Vivancos A., Kuang Y., Ercan D., Matthews S., Cantarini M., Barrett J., Jänne P., Oxnard G. // *Nat. Med.* 2015. V. 21. P. 560–562.
<https://doi.org/10.1038/nm.3854>
99. Lategahn J., Tumbrink H., Schultz-Fademrecht C., Heimsoeth A., Werr L., Niggenaber J., Keul M., Parmaksiz F., Baumann M., Menninger S., Zent E., Landel I., Weisner J., Jeyakumar K., Heyden L., Russ N., Müller F., Lorenz C., Brägelmann J., Spille I., Grabe T., Müller M., Heuckmann J., Klebl B., Nussbaumer P., Sos M., Rauh D. // *J. Med. Chem.* 2022. V. 65. P. 6643–6655.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02080>
100. Günther M., Laux J., Laufer S. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018. V. 128. P. 91–96.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.021>
101. Planken S., Behenna D., Nair S., Johnson T., Nagata A., Almaden C., Bailey S., Ballard E., Bernier L., Cheng H., Cho-Schultz S., Dalvie D., Deal J., Dinh D., Edwards M., Ferre R., Gajiwala K., Hemkens M., Kania R., Kath J., Matthews J., Murray B., Niessen S., Orr S., Pairish M., Sach N., Shen H., Shi M., Solowiej J., Tran K., Tseng E., Vicini P., Wang Y., Weinrich S., Zhou R., Zientek M., Liu L., Luo Y., Xin S., Zhang C., Lafontaine J. // *J. Med. Chem.* 2017. V. 60. P. 3002–3019.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01894>
102. Hu J., Han Y., Wang J., Liu Y., Zhao Y., Liu Y., Gong P. // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. P. 1810–1822.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.029>
103. Hu C., Wang A., Wu H., Qi Z., Li X., Yan X., Chen C., Yu K., Zou F., Wang W., Wang W., Wu J., Liu J., Wang B., Wang L., Ren T., Zhang S., Yun C., Liu J., Liu Q. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 18359–18372.
<https://doi.org/10.18632%2Foncotarget.15443>
104. Wang A., Li X., Wu H., Zou F., Yan X.-E., Chen C., Hu C., Yu K., Wang W., Zhao P., Wu J., Qi Z., Wang W., Wang B., Wang L., Ren T., Zhang S., Yun C.-H., Liu J., Liu Q. // *J. Med. Chem.* 2017. V. 60. P. 2944–2962.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01907>
105. Cha M.-Y., Kang S.-J., Kim M.-R., Lee J.-Y., Jeon J.-Y., Jo M.-G., Kwak E.-J., Lee K.-O., Ha T.-H., Suh K.-H., Kim M.-S. // Patent Application US20130116213A1, published 09.05.2013.
106. Kim E. // *Drugs.* 2016. V. 76. P. 1153–1157.
<https://doi.org/10.1007/s40265-016-0606-z>
107. Park K., Jänne P., Kim D.-W., Han J.-Y., Wu M.-F., Lee J.-S., Kang J.-H., Lee D.H., Cho B.C., Yu C.-J., Pang Y.K., Felip E., Kim H., Baek E., Noh Y.S. // *Cancer.* 2021. V. 127. P. 1407–1416.
<https://doi.org/10.1002/cncr.33385>
108. Xiao Z., Zhou Z., Chu C., Zhang Q., Zhou L., Yang Z., Li X., Yu L., Zheng P., Xu S., Zhu W. // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. V. 203. P. 112511.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112511>
109. Xiao Z., Chu C., Zhou L., Zhou Z., Zhang Q., Yang F., Yang Z., Zheng P., Xu S., Zhu W. // *Bioorg. Med. Chem.* 2020. V. 28. P. 115669.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115669>
110. Zhao B., Zhao C., Hu X., Xu S., Lan Z., Guo Y., Yang Z., Zhu W., Zheng P. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 185. P. 111809.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111809>
111. Coumar M.S., Chu C.Y., Lin C.W., Shiao H.Y., Ho Y.L., Reddy R., Lin W.H., Chen C.H., Peng Y.H., Leou J.S., Lien T.W., Huang C.T., Fang M.Y., Wu S.H., Wu J.S., Chittimalla S.K., Song J.S., Hsu J.T., Wu S.Y., Liao C.C., Chao Y.S., Hsieh H.P. // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. P. 4980–4988.
<https://doi.org/10.1021/jm1000198>
112. Peng Y.-H., Shiao H.-Y., Tu C.-H., Liu P.-M., Hsu J., Amancha P.K., Wu J.-S., Coumar M.S., Chen C.-H., Wang S.-Y., Lin W.-H., Sun H.-Y., Chao Y.-S., Lyu P.-C., Hsieh H.-P., Wu S.-Y. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. P. 3889–3903.
<https://doi.org/10.1021/jm400072p>
113. Lin S.-Y., Hsu Y.C., Peng Y.-H., Ke Y.-Y., Lin W.-H., Sun H.-Y., Shiao H.-Y., Kuo F.-M., Chen P.-Y., Lien T.-W., Chen C.-H., Chu C.-Y., Wang S.-Y., Yeh K.-C., Chen C.-P., Hsu T.-A., Wu S.-Y., Yeh T.-K., Chen C.-T., Hsieh H.-P. // *J. Med. Chem.* 2019. V. 62. P. 10108–10123.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00722>
114. Li M.-C., Coumar M., Lin S.-Y., Lin Y.-S., Huang G.-L., Chen C.-H., Lien T.-W., Wu Y.-W., Chen Y.-T., Chen C.-P., Huang Y.-C., Yeh K.-C., Yang C.-M., Kalita B., Pan S.-L., Hsu T.-A., Yeh T.-K., Chen C.-T., Hsieh H.-P. // *J. Med. Chem.* 2023. V. 66. P. 2566–2588.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01434>
115. Das D., Xie L., Wang J., Xu X., Zhang Z., Shi J., Le X., Hong J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. V. 29. P. 591–596.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.12.056>
116. Das D., Hong, J. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 170. P. 55–72.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.004>
117. Das D., Xie L., Wang J., Shi J., Hong J. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 99. P. 103790.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103790>
118. Liu Z., Wang L., Feng M., Yi Y., Zhang W., Liu W., Li L., Liu Z., Li Y., Ma X. // *Bioorg. Chem.* 2018. V. 77. P. 593–599.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.01.035>
119. Xu T., Peng T., Ren X., Zhang L., Yu L., Luo J., Zhang Z., Tu Z., Tong L., Huang Z., Lu X., Geng M., Xie H., Ding J., Ding K. // *MedChemComm.* 2015. V. 6. P. 1693–1697.
<https://doi.org/10.1039/C5MD00208G>
120. Yu L., Huang M., Xu T., Tong L., Yan X., Zhang Z., Xu Y., Yun C., Xie H., Ding K., Lu X. // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. V. 126. P. 1107–1117.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.006>

121. *Zhang Z., Zou J., Yu L., Luo J., Li Y., Tu Z., Ren X., Wei H., Song L., Lu X., Ding K.* // *Cancer Med.* 2018. V. 7. P. 1430–1439.
<https://doi.org/10.1002/cam4.1392>
122. *Hao Y., Lyu J., Qu R., Tong Y., Sun D., Feng F., Tong L., Yang T., Zhao Z., Zhu L., Ding J., Xu Y., Xie H., Li H.* // *J. Med. Chem.* 2018. V. 61. P. 5609–5622.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00346>
123. *Hao Y., Wang X., Zhang T., Sun D., Tong Y., Xu Y., Chen H., Tong L., Zhu L., Zhao Z., Chen Z., Ding J., Xie H., Xu Y., Li H.* // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. P. 7111–7124.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00403>
124. *Hao Y., Lyu J., Qu R., Sun D., Zhao Z., Chen Z., Ding J., Xie H., Xu Y., Li H.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 3830.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04184-9>
125. *Wurz R., Petrus L., Ashton K., Brown J., Chen J.J., Herberich B., Hong F.-T., Hu-Harrington E., Nguyen T., St. Jean, D., Jr., Tadesse S., Bauer D., Kubryk M.*
126. *Zhan J., Cooke K., Mitchell P., Andrews K., Hsieh F., Hickman D., Kalyanaraman N., Wu T., Reid D., Lobenhofer E., Andrews D., Everds N., Guzman R., Parsons A., Hedley S., Tedrow J., Thiel O., Potter M., Radinsky R., Beltran P., Tasker A.* // *ACS Med. Chem. Lett.* 2015. V. 6. P. 987–992.
<https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00193>
127. *Pawara R., Ahmad I., Nayak D., Wagh S., Wadkar A., Ansari A., Belamkar S., Surana S., Kundu C., Patil C., Patel H.* // *Bioorg. Chem.* 2021. V. 115. P. 105234.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105234>
128. *Amaral D., Lategahn J., Fokoue H., Silva E., Sant'Anna C., Rauh D., Barreiro E., Laufer S., Lima L.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 14.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36846-7>
129. *Zhang H., Wang J., Zhao H.-Y., Yang X.-Y., Lei H., Xin M., Cao Y.-X., Zhang S.-Q.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2018. V. 26. P. 3619–3633.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.05.039>

Covalent Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitors in Targeted Therapy of Drug-Resistant Non-small Cell Lung Cancer

A. B. Shvetsov*,# and A. V. Semenov*

Phone: +7 (917) 996-41-38; e-mail: shvetsov.1984@list.ru

* National Research Ogarev Mordovia State University, ul. Bolshevistskaya 68, Saransk, 430005 Russia

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the main subtype of lung cancer and is a common cause of cancer-related mortality worldwide. Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene play a leading role in the pathogenesis of NSCLC, causing its pathological activity. The first generation of EGFR inhibitors, acting reversibly, effectively block the effects of EGFR with activating mutations by benefiting from competition with adenosine triphosphate for binding to the kinase. However, after several months of treatment, a secondary T790M mutation often occurs, causing resistance to subsequent therapy with these drugs. Effective inhibition of EGFR with the T790M mutation was possible due to second-generation inhibitors acting via a covalent mechanism. However, the second generation of covalent inhibitors has received limited use in therapy due to insufficient selectivity for EGFR T790M and a narrow therapeutic window. The discovery of covalent pyrimidine-based inhibitors has led to the emergence of a number of effective and safer third-generation drugs for the treatment of NSCLC with the EGFR T790M mutation. This review contains a brief description of first- and second-generation EGFR inhibitors and a detailed discussion of the main stages in the development of third-generation inhibitors. The main emphasis is placed on the identified “structure–activity” patterns. Data are provided on inhibitors that have received the status of approved drugs for the treatment of NSCLC. Promising directions for the development of novel EGFR inhibitors are indicated.

Keywords: *non-small cell lung cancer, epidermal growth factor receptor, double mutation, covalent inhibitors, inhibitory activity, pyrimidines, molecular modeling*



УДК 577.164.16; 615.28; 615.277.3

ВИТАМИН В₁₂ В СИСТЕМАХ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2024 г. А. А. Скуредина*, #, Д. Е. Ялама*, И. М. Ле-Дейген*

* Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

Поступила в редакцию 16.03.2024 г.

После доработки 24.03.2024 г.

Принята к публикации 25.03.2024 г.

Витамин В₁₂ – жизненно необходимое биологически активное соединение для человека, участвующее в широком круге метаболических процессов. Распространенность дефицита витамина В₁₂ и его низкая проникающая способность в клетки обуславливает актуальность разработки систем доставки для создания лекарственных формул с улучшенными биофармацевтическими свойствами. В данной работе представлена краткая характеристика основных химических и биохимических свойств витамина В₁₂, а также обсуждаются пероральные, инъекционные и трансдермальные многокомпонентные лекарственные формы витамина В₁₂, которые направлены на решение данной проблемы. Более того, представлен анализ литературы по перспективам использования витамина В₁₂ в качестве вспомогательного компонента для пассивной и активной доставки других лекарственных молекул, например, пептидно-нуклеиновых кислот и противоопухолевых препаратов. В обзоре подробно рассмотрены типы предлагаемых систем доставки биологически активных соединений с использованием витамина В₁₂ в качестве одного из компонентов.

Ключевые слова: витамин В₁₂, системы доставки лекарств

DOI: 10.31857/S0132342324060047, **EDN:** NFULKV

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	763
2. ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИТАМИНА В ₁₂	763
3. МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ В ₁₂	765
4. СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ВИТАМИНА В ₁₂	767
4.1. Регуляция физико-химических свойств В ₁₂ при инкапсуляции в систему доставки	767
4.2. Трансдермальные системы доставки В ₁₂	769
4.3. Комбинированные системы доставки В ₁₂ с другими витаминами	770
5. ВИТАМИН В ₁₂ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ДЛЯ ДРУГИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ	771
5.1. Конъюгаты В ₁₂ и их антибактериальная активность	771
5.2. Светочувствительные конъюгаты В ₁₂	773
5.3. Конъюгаты В ₁₂ с противоопухолевыми препаратами	774
5.4. Использование В ₁₂ в системе доставки других лекарственных компонентов	774
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	776
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	777

Сокращения: В₁₂ – витамин В₁₂; ПНК – пептидно-нуклеиновые кислоты.

Автор для связи: (эл. почта: anna.skuredina@yandex.ru).

1. ВВЕДЕНИЕ

Витамин В₁₂ (В₁₂) необходим для осуществления многочисленных биохимических процессов, в том числе синтеза и обмена белков, углеводов, липидов, созревания эритроцитов и миelinового слоя. Поскольку В₁₂ не синтезируется *in vivo* (за исключением некоторых прокариот и архей), он попадает в организм человека посредством приема пищи. Основной источник В₁₂ – продукты животного происхождения (мясо, молоко, рыба и т.д.); лишь небольшую долю вещества можно получить с помощью растительной пищи, например, сушеных зеленых водорослей [1, 2].

Недостаток В₁₂ в клетках может возникать в результате наследственных факторов, которые обусловливают снижение всасываемости витамина В₁₂ в кишечнике: мутациях в генах *CUBN* и *AMN* (синдром Имерслунд–Гресбека) или различных мутациях гена *GIF* (мутации в сайтах сплайсинга, частичная делеция гена и др.) [3, 4]. Кроме того, дефицит В₁₂ наблюдается при повышенной потребности в нем (например, при беременности), неполноценного питания, нарушения всасываемости витамина (в том числе впоследствии хирургических вмешательств в желудочно-кишечный тракт), дефицита транспортных белков и др. При выраженным дефиците В₁₂ наблюдаются системные нарушения со стороны кроветворной, нервной и эндокринной систем, атрофии слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и развитие характерной клиники фуникулярного миелоза (повреждение спинного мозга).

Суточная потребность взрослого человека в витамине В₁₂ составляет 2.4 мкг. Для восполнения дефицита В₁₂ рекомендуется пероральное применение форм препарата или парентеральные (чаще внутримышечные) инъекции. Используют дозы 100–200 мкг/сут через день, а в случае нарушения функции нервной системы дозировку увеличивают до 500 мкг/сут в первую неделю ежедневно, далее – с интервалами между введениями до 5–7 дней [5]. Остро стоит проблема восполнения дефицита В₁₂ у пациентов с существенными нарушениями ЖКТ, такими как целиакия и болезнь Крона, а также у пациентов после операций (уменьшение желудка и/или перестраивание кишечника вследствие бariatрической хирургии, резекция желудка или кишечника, особенно подвздошной кишки) [6, 7], поскольку пероральный прием препарата не приводит к удовлетворительным результатам, а пожизненная инъекционная терапия снижает качество жизни и сопряжена с развитием местных осложнений.

В качестве альтернативы для таких пациентов могут использоваться назальные формы В₁₂, для которых характерна биодоступность 2–5%, что соответствует показателю при пассивной адсорбции витамина в кишечнике [8]. Результаты клинических испытаний назальной формы В₁₂ CureSupport (Нидерланды) [9], проведенных на 51 пациенте с синдромом хронической усталости, показали увеличение концентрации В₁₂ в плазме крови в 3 раза через 3 месяца введения по 5 мг – по одной капле в каждую ноздрю 2 раза в неделю.

Также в качестве альтернативы существуют сублингвальные формы В₁₂. Согласно ретроспективному анализу перспективности использования таких систем в терапии, было показано [10], что прием сублингвальной формы Contract Pharmacal Corp. (США) позволяет повысить концентрацию В₁₂ в крови до уровня, который примерно соответствует результатам при внутримышечных инъекциях. К достоинствам такой формы введения относятся удобство и простота использования, что положительно сказывается на соблюдении пациентом рекомендаций врачей при длительной терапии.

В последнее время предлагается использовать В₁₂ не в свободной форме, а в комплексе с наноматериалами различной химической природы. При инкапсуляции препарата в систему доставки (носитель) возможно достижение замедленного высвобождения В₁₂ и увеличение его биодоступности. Подобные системы представляют собой перспективные материалы с точки зрения удобной формы В₁₂ для высокоэффективной терапии дефицита витамина [8]. С другой стороны, в литературе предлагается использовать В₁₂ для решения и других важных биомедицинских задач. В частности, в связи с особенностями некоторых свойств В₁₂ возможно его использование с целью направленной регуляции характеристик другой биологически активной молекулы.

Данный обзор посвящен исследованию существующих систем доставки, содержащих В₁₂ в качестве основного или вспомогательного компонента, для определения наиболее перспективной траектории поиска новых высокоэффективных лекарственных форм.

2. ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИТАМИНА В₁₂

В₁₂ относится к водорастворимым витаминам В-группы (растворимость в воде ~10 мг/мл [11]). С химической точки зрения под термином “витамин В₁₂” зачастую понимают круг корриноидных

соединений (макроциклов, схожих с порфиринаами). Присутствие иона кобальта обусловливает более распространенное название этой группы соединений – кобаламины (рис. 1): 5'-дезоксиаденозилкобаламин, метилкобаламин, гидроксобаламин и глутатионилкобаламин и др. Среди всех кобаламинов наиболее часто в работах упоминается цианокобаламин – наиболее стабильная форма B_{12} . Вместе с гидроксикобаламином они представляют собой витамеры, т.е. соединения со схожей структурой и биологической функцией в организме.

Часть молекулы B_{12} , связанная с кобальтом (корриновое кольцо), имеет плоское строение. В перпендикулярной плоскости расположен нуклеотидный фрагмент. Образованная структура носит название кобаламина. Шесть ковалентных связей кобальта распределены следующим образом: четыре связи – с атомами азота корринового кольца, одна связь – с азотом в нуклеотидном фрагменте, а шестая связь – с цианогруппой (для цианокобаламина), метильной группой (для метилкобаламина) и т.д. [12].

Стабильность цианокобаламина зависит от условий среды, в том числе от pH и температуры. Например, в работе [13] показано, что наибольшее значение времени полужизни ($t_{1/2}$) витамина наблюдается при pH 6 и 4°C ($t_{1/2} = 231$ день). При нагреве растворов до 37°C увеличивается скорость деградации B_{12} : наблюдается снижение $t_{1/2}$ в ~2 раза. Важно отметить, что значение pH в большей степени оказывает влияние на стабильность цианокобаламина. Так, при 37°C

для pH 6 $t_{1/2}$ составляет 116 дней, а при pH 2 $t_{1/2} = 8$ дней.

Связанный с белками B_{12} попадает в пищеварительную систему с пищей (рис. 2). Высвобождение B_{12} происходит в желудке в результате кислотного гидролиза белков, после чего витамин образует комплекс с белком транскобаламином I, что позволяет защитить B_{12} от возможных химических превращений в агрессивной среде желудка [2].

Комплекс B_{12} –транскобаламин I разрушается панкреатическими ферментами в двенадцатерстной кишке. Путем пассивной диффузии энteroциты поглощают не более 2% B_{12} , поэтому ключевым аспектом, усиливающим дальнейший транспорт витамина, является образование его комплекса с гликопротеином внутренним фактором (фактором Кастла), который кодируется геном *CUBN*. Внутренний фактор обеспечивает поглощение B_{12} путем рецептор-опосредованного эндоцитоза на апикально экспрессируемом рецепторе (кубулин). При дефиците или в отсутствие фактора Кастла в значительной степени снижается эффективность всасывания витамина B_{12} .

Спустя 2.5–4 ч после первоначального приема B_{12} попадает в кровь в комплексе с белком транскобаламином II. После рецептор-опосредованного (TCblR) проникновения в целевые клетки свободный B_{12} высвобождается в результате деградации комплекса в лизосомах. Внутри клеток вне зависимости от формы B_{12} с помощью ряда ферментов и шаперонов витамин переводится в метилкобаламин (преобладающая форма B_{12} в плазме крови) или в 5'-дезоксиаденозилкобаламин

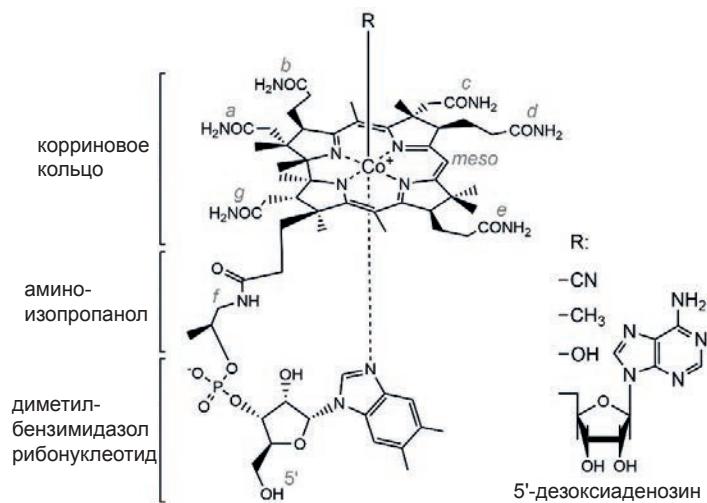


Рис. 1. Химические структуры кобаламинов.

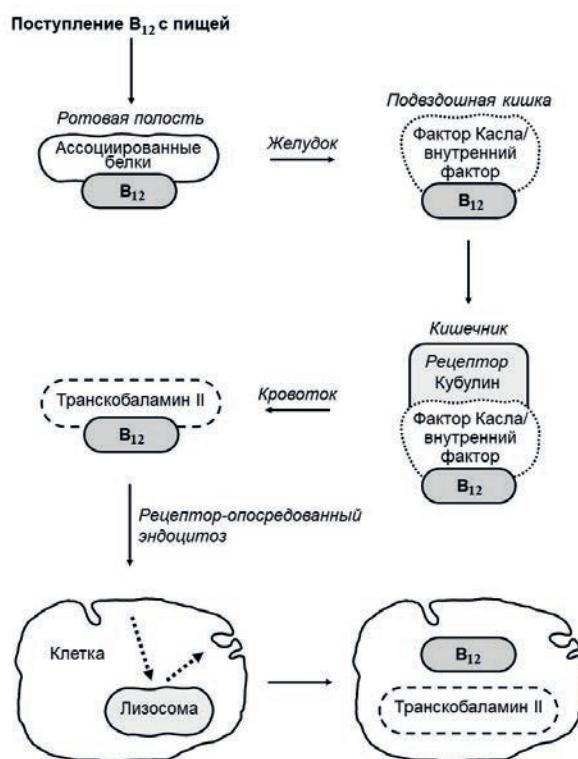


Рис. 2. Схема метаболизма витамина В₁₂ [32].

(преобладающая форма в тканях) [2, 14]. Таким образом, В₁₂ связывается с большим количеством белков, что необходимо учитывать при его использовании в качестве компонента системы доставки. Этот аспект подробнее будет рассмотрен далее.

В₁₂ участвует в большом количестве жизненно важных химических реакций. Так, адено-зилкобаламин необходим для получения сукцинил-КоА, интермедиата цикла Кребса, а метилкобаламин – для превращения гомоцистеина в метионин. Преимущественно В₁₂ выступает в качестве кофактора или кофермента. Кобаламин-зависимые ферменты можно разделить на четыре основных класса, которые включают процессы метилирования, изомеризации, восстановительного дегалогенирования. Таким образом, дефицит В₁₂ может повлиять на широкий спектр биохимических реакций, затрагивающих метаболизм ДНК, гормонов, жиров и белков. Кроме того, происходит накопление продуктов метаболизма в плазме и моче, например, метилмалоновой кислоты, которая при высоких концентрациях токсична [8, 12].

3. МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ В₁₂

Основной недостаток существующих методов восполнения дефицита В₁₂ при пероральном применении – низкая биодоступность препарата. Принимая во внимание разветвленную схему метаболизма В₁₂ (рис. 2), можно выделить две основные функциональные структуры, которые в наибольшей степени влияют на проникновение препарата в клетки: транспортные белки и поверхность эндоцитов.

Ramalho et al. [15] задавались вопросом о роли биомембран в биодоступности В₁₂ и исследовали взаимодействие В₁₂ с модельными биомембранами с целью выявления роли липидного состава везикул на распределение и проникновение В₁₂. Везикулы были получены на основе мажорных фосфолипидов биомембран эукариот (1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, сфингомиelin и холестерин). Авторы исследовали коэффициент распределения В₁₂, а также локализацию витамина в бислое, его влияние на текучесть липидной мембраны. В₁₂ продемонстрировал высокое сродство к мембранам, при этом наиболее вероятно В₁₂ локализован вблизи гидрофильных фрагментов липидов, но также способен проникать в толщу бислоя. Взаимодействие В₁₂ с везикулами не обуславливает изменение текучести мембран. Авторы пришли к выводу, что количество типов липидов в бислое – это основной фактор, регулирующий взаимодействие В₁₂ с бислоем. Увеличение сложности архитектуры, упорядоченности и жесткости бислоя способствуют снижению возможной диффузии молекул. Тем не менее на основании результатов исследования можно предположить, что низкая биодоступность витамина не обусловлена только невысоким взаимодействием В₁₂ с биологическими мембранами.

Ранее обсуждалось, что недостаток белков, а именно транскобаламинов и внутреннего фактора, может способствовать возникновению дефицита В₁₂. Таким образом, использование комплекса белок–В₁₂ может способствовать увеличению биодоступности вещества. В 2018 г. для увеличения биодоступности В₁₂ в литературе были описаны еще три основных подхода (табл. 1). Важно отметить, что до сих пор не определена наиболее успешная стратегия разработки высокоэффективных терапевтических форм В₁₂.

Наиболее простым решением могут показаться альтернативные способы введения В₁₂.

Таблица 1. Основные методы увеличения биодоступности B_{12} [48]

№	Метод	Примеры дополнительных компонентов	Степень изученности в литературе	Недостатки метода
1	Использование комплекса B_{12} с веществами, обуславливающими усиление пероральной адсорбции	Салькапрозат натрия, внутренний фактор, транскобаламин, D-сорбитол и др.	Средняя	Неизвестны задействованные механизмы, неочевиден потенциальный эффект улучшения абсорбции
2	Альтернативные методы введения B_{12}	Пероральные, трансдермальные, сублингвальные формы, внутримышечные инъекции и др.	Средняя	Отсутствуют клинические исследования по сравнению различных форм введения
3	Альтернативные биотехнологические подходы	Рекомбинантный внутренний фактор, генно-модифицированные микроорганизмы – продуценты B_{12} и др.	Низкая	Нерациональность использования и высокая стоимость
4	Системы доставки	Инкапсуляция B_{12} в носители различной природы (неорганические и органические)	Средняя	Отсутствуют клинические обоснования для использования у человека

В метаанализе 2024 г. обсуждается вопрос о наиболее эффективном способе приема B_{12} [16]. Авторы выбрали 13 публикаций, из них 8 – рандомизированные клинические испытания, которые удовлетворяли ряду критериев: исследования проводились на пациентах с дефицитом B_{12} , экспериментальная и контрольные группы получали B_{12} разными способами, оценивали концентрацию B_{12} или B_{12} -ассоциированного показателя (фолиевая кислота, гемоглобин, гематокрит, средний объем эритроцитов, гомоцистеин плазмы, метилмалоновая кислота в моче, лейкоциты и тромбоциты). Показано, что повышение уровня B_{12} в крови наиболее выражено для внутримышечных инъекций, далее идут подъязычные формы и на последнем месте – пероральное применение. Однако, как отмечают авторы, другие исследуемые показатели (общий анализ крови и концентрация гомоцистеина), а также клинические проявления были сопоставимы для всех трех способов введения B_{12} . Таким образом, все перечисленные способы введения B_{12} в организм обуславливают сравнимый терапевтический результат, но с точки зрения переносимости пациентами, преимуществ и недостатков каждого способа сублингвальный способ предпочтительнее внутримышечного и перорального. Тем не менее требуются более масштабные исследования для подтверждения данного результата.

На сегодняшний день развиваются альтернативные биотехнологические подходы для прео-

доления дефицита B_{12} (табл. 1, № 3). Например, в работе [17] предлагается использовать микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* в качестве дополнительного источника B_{12} , что особенно актуально для вегетарианцев. Авторы проводят обогащение клеток витамином B_{12} посредством вставки кодируемого участка человеческого внутреннего фактора в ген *PSAD* и последующей экспрессии белка в цитоплазме и внеклеточном пространстве. Показано, что в случае цитоплазматического фактора Касла концентрация B_{12} в клеточных лизатах выше, чем в контролльном штамме. Тем не менее биотехнологические подходы недостаточно изучены и не позволяют определить рациональность использования дополнительных компонентов, которые могут иметь высокую стоимость (в первую очередь, технологии их получения). Кроме того, недостаток исследований не позволяет предсказать, какие механизмы задействованы в регуляции биодоступности B_{12} и на сколько данный показатель возможно увеличить.

Современные достижения инструментальных методов исследования и разнообразные подходы к дизайну наноматериалов открывают новые возможности для разработки высокоэффективных лекарственных форм. Таким образом, наиболее популярный подход к разработке новых форм B_{12} – использование различных систем доставки, чаще всего для перорального введения [8].

4. СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ВИТАМИНА В₁₂

4.1. Регуляция физико-химических свойств В₁₂ при инкапсуляции в систему доставки

Описанные в литературе исследования систем доставки В₁₂ в основном нацелены на предотвращение неспецифического распределения витамина, а также разработки систем с контролируемым высвобождением. Данные задачи особенно важны для целенаправленной доставки В₁₂ в костный мозг и нервные клетки для восстановления миелина. Инкапсуляция В₁₂ в разнообразные носители способствует повышению биодоступности витамина, снижению частоты введения препарата, а также снижению стоимости продукции. Таким образом, подобные системы обладают значительными преимуществами для пациентов [8].

Некоторые примеры систем доставки В₁₂ представлены в табл. 2. В качестве носителей в большинстве случаев используются матрицы из органических веществ различной природы: полисахариды, синтетические полиэлектролиты, липиды и полипептиды. Чаще всего предлагаемые носители используют не в чистом виде, их подвергают модификации разнообразными агентами для регуляции свойств полученного высокомолекулярного вещества. Так, во многих работах показано, что сшивка цепей полимера обусловливает более выраженное замедленное высвобождение инкапсулированного В₁₂.

Тем не менее не все системы доставки способны обеспечить замедленное высвобождение витамина В₁₂. Так, в работе [18] методом распылительной сушки были получены сферические микрочастицы (3 мкм в диаметре) на основе одного из трех биополимеров: хитозана, карбоксилированного хитозана и альгината. В данные системы был инкапсулирован В₁₂ или витамин С. В зависимости от химической природы носителя наблюдалась различная скорость высвобождения в деионизированную воду для обоих препаратов: 100%-ное высвобождение наблюдается в течение 120 мин для хитозана, 15–20 мин – для модифицированного хитозана и альгината. Авторы связывают скорость высвобождения препарата с морфологией микрочастиц – замедление характерно для образцов с более грубой поверхностью.

Предложены гибридные микрогели [19], полученные методом эмульсионной полимеризации, на основе хитозана и непористого силикагеля, модифицированных винильными группами.

В зависимости от массового соотношения исходных полимеров были получены образцы микрогелей, способные высвобождать 100% инкапсулированного В₁₂ за 45–60 мин. Столь быстрое высвобождение авторы связывают с высокой гидрофильностью В₁₂, а также с тем фактом, что при pH 1.2 и 7.4 протонированные группы хитозана отталкиваются друг от друга, формируя каналы в геле, что снижает стерические затруднения для витамина В₁₂.

Согласно табл. 2, помимо профиля высвобождения витамина также исследуется и другой важный параметр – степень инкапсуляции В₁₂ в носитель. Как правило, витамин вносится в раствор материала на этапе его получения/синтеза или готовый носитель вымачивается в растворе В₁₂. После очистки системы доставки от несвязавшегося вещества проводят определение степени включения В₁₂ относительно добавленного количества. В целом для В₁₂ характерны степени включения >30%, при этом часто этот параметр достигает значений >80%.

В большинстве работ предложенные нано- и микрочастицы, волокна и гидрогели охарактеризованы с точки зрения морфологии поверхности материала, а также их физико-химических свойств. Результаты испытаний *in vitro* и *in vivo*, как правило, получены с использованием клеточного монослоя эукариотических клеток и исследований фармакокинетических параметров на животных моделях (грызунах) соответственно.

Для исследования влияния носителя на проникающую способность В₁₂ в клетки использовали монослой аденокарциномы Caco-2, моделирующий энтероциты, выстилающие тонкую кишку. Проницаемость препаратов изучают в двух направлениях (от апикальной стороны к базолатеральной и наоборот) на монослое 20-дневной клеточной культуры на микропористом фильтре. По изменению концентрации вещества во внешнем растворе с учетом площади клеточной поверхности рассчитывают коэффициент проницаемости P_{app} (apparent permeability coefficient, см/с), а также индекс асимметрии транспорта. Возможно проведение корреляции между данными *in vitro* и ожидаемыми результатами *in vivo*: при значениях $P_{app} \sim 10^{-6}$ см/с препарат полностью (на 100%) адсорбируется в желудочно-кишечном тракте, а при $P_{app} \sim 10^{-7}$ см/с адсорбция препарата составляет менее 1%. Оптимальным диапазоном значений P_{app} считается 10^{-6} – 10^{-5} см/с [20].

Инкапсуляция В₁₂ в системы доставки позволяет увеличить параметр P_{app} в несколько раз

Таблица 2. Системы доставки витамина B₁₂

Тип системы	Химическая структура носителя B ₁₂	Тип включения B ₁₂ в систему доставки	Степень включения B ₁₂ в систему доставки*	Наиболее важные результаты	Ссылка
Полимерный носитель	Полиакриловая кислота, модифицированная цистеином	Добавление раствора с последующей лиофильной сушки	—	Трехкратное увеличение площади под кривой (AUC) у крыс при пероральном введении	[49]
	Полимерные капсулы, полученные путем покрытия частиц каффриона кальция поли(гидрохоридаллигамон) и поли(4-стиролсульфонатом) Кубосомы на основе фитантриола и плюроника F127	Адсорбция из раствора	~100%	Формирование ассоциатов B ₁₂ в полимерной капсule	[50]
	Гидрогель на основе желатина и дубильной кислоты	Адсорбция из раствора	30%	B ₁₂ стабилизирует липидную систему, выступая в роли структурообразующего элемента	[51]
	Микрочастицы из поликарбоната, модифицированного L-цистеином	Добавление раствора к полимеру перед распылительной сушкой	~1% по массе относительно микрочастиц	Замедленное высвобождение B ₁₂ (100% за 3 ч, pH 7.4). Увеличение проницаемости через монолой Сасо-2 и слизистую оболочки кишечника крысы в ~3.8 и ~4.8 раза соответственно	[52]
	pH-чувствительные материалы на основе модифицированных нанослоев монтиориллонита	Адсорбция из раствора	20–160 мг на 1 г носителя	Отсутствие наблюдаемого высвобождения B ₁₂ при pH 1.2 и замедление кинетики высвобождения витамина при pH 7.4 (< 50%) за 400 мин	[53]
	Микрочастицы, нановолокна и пленки на основе зеина, проламина кукурузы	Добавление раствора к белку перед распылительной сушки или электрореципрининга	>60%	Замедленное высвобождение B ₁₂ в этанол (100% наблюдается через 140–3000 мин в зависимости от формы носителя и способа его получения)	[54]
	Наночастицы из изолятов соевого белка	Добавление к раствору белка и внесение хлорида кальция	~10–13%	Увеличение проникновения B ₁₂ через монолой Сасо-2 в 2–3 раза. Увеличение проникновения в 3–4-й участки тонкой кишки крыс по сравнению с раствором свободного B ₁₂	[55]
	Твердые липидные наночастицы	Добавление к липидной матрице в жидко-кристаллической фазе	~92%	Замедленное высвобождение при pH 7.4 и 6.8 (только в первые 15 мин). Наночастицы локализуются в цитоплазме и мембране ядра клеточной линии H-Ras 5RPT7 фибробластов, в то время как свободный B ₁₂ обнаружен преимущественно вне клеток. Усиление цитотоксических свойств препарата (наиболее выраженное усиление составляет 53%)	[56]
	Липосомы и липосомы, функционализированные трансферрином	Добавление к липидной пленке	14–27%	Выраженное замедленное высвобождение B ₁₂ : за 9 дней 20% в случае B ₁₂ , инкапсулированного в липосомы, модифицированные трансферрином, а в случае свободного B ₁₂ – 100% (pH 7.4)	[57]
Комплексные системы	Наночастицы на основе белков семян ячменя, α -токотферола и соевого фосфатидилхолина, модифицированные янтарным антидриидом	Добавление к исходной смеси компонентов	~70%	Замедленное высвобождение B ₁₂ в присутствии пепсина и без пепсина при pH 2.0 и с панкреатином или без панкреатина при pH 7.4. Улучшение проникновения в монолой Сасо-2 в 20 раз, а также высокая степень поглощения клетками в присутствии ингибиторов различных путей эндоситоза	[58]

* Если не указано иное, степень включения рассчитывали как отношение количества инкапсулированного B₁₂ относительно количества B₁₂, добавленного в систему.

(табл. 2). Во многих работах проводили анализ поглощения В₁₂ клетками Сaco-2 (в процентах относительно добавленного), а также определяли процент захваченных частиц. Отмечается, что инкапсуляция витамина в систему доставки приводила к значительному увеличению поглощения В₁₂ (от 2 до 20 раз).

Кроме того, особый интерес вызывает способность В₁₂ обуславливать нейропротекторные свойства *in vitro* как в свободном виде, так и в системе доставки. Так, в работе [15] была изучена многокомпонентная система для сублингвального и трансдермального применения. Авторы инкапсулировали В₁₂ в наночастицы, полученные из нескольких типов полимеров, и опционально впоследствии частицы помещали в матрицу нановолокна. Нейропротекторный потенциал синтезированных наноматериалов *in vitro* был изучен на клетках SH-SY5Y. Изначально к клеткам добавляли β-амилоидный пептид (Aβ₁₋₄₂), который способствовал подавлению жизнеспособности клеток до 28.6%. Предложенные наноматериалы, содержащие В₁₂, проявляли высокий нейропротекторный эффект, вероятно, из-за высокой дозы препарата и контролируемого высвобождения, что перспективно для разработки лекарственных форм с целью предотвращения нейродегенеративных заболеваний.

Таким образом, в качестве носителей для В₁₂ используются вещества различной природы, которые позволяют в значительной степени влиять на физико-химические и биологические свойства В₁₂. Среди предложенных систем доставки наиболее часто исследуются высокомолекулярные соединения в формеnano- или микрочастиц. На сегодняшний день большинство авторов предлагает системы для перорального введения. Интересно, что в работе [21] рассмотрены микрочастицы на основе бычьего сывороточного альбумина для ингаляционного введения В₁₂. Белок дополнитель но покрывали мукоадгезивным полисахаридом пуллуланом. Система характеризовалась высокой степенью загрузки микрочастиц витамином В₁₂ (88%), продемонстрировала выраженное увеличение максимальной концентрации В₁₂ в крови при интранархеальном введении крысам, а также увеличение биодоступности в 4.5 раза. Тем не менее на сегодняшний день в литературе ингаляционный способ введения В₁₂ описан в недостаточной степени. Помимо вышеперечисленных систем доставки В₁₂ среди исследователей очень популярны системы трансдермальной доставки

как наиболее простой и удобный способ введения В₁₂.

4.2. Трансдермальные системы доставки В₁₂

В работе [22] были получены гибридные нановолокна на основе полисахарида хитозана и азолектина методом электроспиннинга. Авторы определили размеры, структуру, морфологию волокон, а также продемонстрировали отсутствие цитотоксичности на культуре клеток фибробластов мыши L929. Загрузку волокон витамином В₁₂ осуществляли путем замешивания исходной смеси хитозана и азолектина с раствором препарата перед проведением электроспиннинга. Показано замедленное высвобождение В₁₂ (100% свободного витамина во внешнем растворе наблюдается по истечении 48 ч). К сожалению, на основе представленных результатов невозможно оценить перспективы использования нановолокон, поскольку не было проведено исследований в системе, моделирующей кожный барьер.

Напротив, Yekrang et al. [23] для своих систем определили не только физико-химические параметры, но и характеристики *in vitro* с точки зрения механической прочности материала и его биодеградации, а также фармакокинетические параметры В₁₂ *in vivo*. В работе предложены пластиры на основе нановолокон из поливинилового спирта и хитозана, полученных методом электроспиннинга. В экспериментах *in vivo* крыс разделили на контрольную группу и группу, в которой животным помещали пластырь на область кожи между лопаток. Для второй группы показано увеличение уровня В₁₂ в крови на 22% (спустя 8 ч после нанесения пластиря), что указывает на успешное проникновение и перенос В₁₂ через кожный барьер, а также поступление препарата в кровоток. Согласно гистологическим исследованиям, нановолокна не способствуют повреждению кожного покрова, а также не обуславливают возникновение воспалительных процессов. Состояние эпидермиса и дермы в обеих группах было одинаковым. Важно отметить, что для регуляции свойств материала предложена модификация нановолокон посредством сшивки цепей хитозана глутаровым альдегидом. При исследовании влияния сшивки на физико-химические параметры пластиря показано более значительное замедление высвобождения В₁₂ (в фосфатный буфер, 37°C), снижение скорости биодеградации (на ~20%) и улучшение механических свойств.

Более глубокое исследование системы трансдермальной доставки B_{12} провели Ramöller et al. [24], которые предложили в качестве носителя B_{12} быстрорасторимые микроиглы из поливинилпирролидона. В первую очередь, была исследована возможность проникновения микроигл в модель искусственной кожи (восемь слоев Parafilm M). Определено, что микроиглы за-глубляются в толщу слоя до 381 мкм, что составляет $\sim 64\%$ от их общей длины (600 мкм). При нанесении пластиря с микроиглами на кожу новорожденных свиней $> 100\%$ образца растворяется в течение 2 мин. С помощью вертикальной диффузионной ячейки Франца показано высвобождение B_{12} в фосфатно-солевой буфер (pH 7.4) при 37°C: 20% через 15 мин и 70% через 5 ч. Таким образом, результаты исследований *in vitro* указывают на успешное проникновение системы доставки сквозь кожный барьер и эффективное высвобождение препарата.

При исследовании фармакокинетических параметров *in vivo* мышам вводили подкожно контроль (раствор B_{12}) или помещали образец материала (4 микроиглы) на кожу спины и фиксировали пластирем. После удаления пластиря с микроиглами показано полное растворение образца и отсутствие покраснения кожи. При исследовании концентрации B_{12} в крови в случае контроля (подкожное введение) максимальная концентрация составила $\sim 1.30 \pm 0.25$ мкг/мл, что в 3.5 раза больше концентрации, достигнутой в случае трансдермального проникновения препарата. Важно отметить, что в пластире содержалось в 2.7 раза больше B_{12} , чем в подкожной инъекции. Как отмечают авторы, такой результат может быть связан с тем, что не вся микроигла проникает в кожу (64% по результатам *in vitro*), что значительно снижает биодоступность препарата. Однако при дальнейшем определении содержания B_{12} в крови обнаружено, что у мышей контрольной группы после 24 ч витамин не был обнаружен, в то время как в случае микроигл у отдельных животных был у отдельных животных зафиксировано присутствие препарата даже через 30 ч после введения.

Таким образом, в литературе предлагаются разнообразные материалы для трансдермальной доставки, в первую очередь, на основе полимерных волокон и микроигл. Однако применение трансдермальных форм B_{12} все еще ограничено в связи с трудностями по преодолению кожного барьера.

Помимо непосредственно форм B_{12} для трансдермальной доставки существует несколько работ по изучению влияния B_{12} на эффективность заживления кожных ран. Например, в работе [25] получены нановолокна на основе поликаапролактона и желатина (последний использовался для увеличения гидрофильности поверхности волокон). Добавление B_{12} значительно усиливало пролиферацию клеток L929 спустя 1 и 3 суток культивирования. Авторы провели исследования *in vivo* на крысах для сравнения заживляющего потенциала материала. В результате хирургического вмешательства животным проводили удаление кусочка кожи в области спины, после чего закрывали рану пластирем, содержащим B_{12} , “пустым” пластирем или стерильной марлей. При анализе скорости заживления повреждения обнаружено, что за 7 дней в контрольной группе наблюдалось уменьшение размера раны на $\sim 20\%$, а в случае B_{12} -нановолокон этот показатель составил $\sim 60\%$. При этом для незагруженных нановолокон достижение 60%-ного заживления раны наблюдалось только за 14 дней, в то время как при использовании B_{12} -пластиря за две недели размер раны уменьшился на 92%. При обсуждении механизма такой выраженной эффективности заживления кожного повреждения авторы ссылаются на другие работы, в которых показано участие B_{12} в пролиферации резидентных клеток фибробластов и кератиноцитов, а также в усилении синтеза белков, среди которых может быть коллаген.

Подобные исследования указывают на высокий потенциал применения материалов, содержащих B_{12} , для кожных покровов в качестве платформы как для доставки B_{12} , так и для ускорения заживления раневых повреждений. Особый интерес в случае трансдермальной доставки представляют собой носители – наноматериалы, в частности нановолокна, полученные методом электроспиннинга.

4.3. Комбинированные системы доставки B_{12} с другими витаминами

Существуют и системы доставки с несколькими витаминами, один из которых – витамин B_{12} . Комбинированные лекарственные формы, содержащие ряд биологически активных молекул, перспективны в качестве терапевтических агентов, поскольку позволяют при однократном приеме обеспечивать одновременную доставку нескольких веществ.

В работе [26] предложена система одновременной доставки B_{12} и витамина B_9 на основе частиц

сополимера полигликолиевой и полимолочной кислот. Инкапсулирование препаратов в частицы с диаметром 190 нм показало высокий процент загрузки препаратами относительно количества введенного вещества: ~89% для витамина В₉ и ~70% для В₁₂. Система доставки обеспечивает значительное замедление высвобождения обоих витаминов в эксперименте с биорелевантными средами, моделирующими прохождение системы через пищеварительный тракт. Так, в общей сложности методом равновесного диализа показано, что за 5 ч из носителя высвободилось < 10% В₁₂, что более чем в 4 раза меньше по сравнению с раствором свободного витамина. Для витамина В₉ наблюдалась аналогичная тенденция, однако менее выраженная. Авторы склоняются к тому, что причина выраженной разницы в профилях высвобождения витаминов связана с более высокой гидрофильностью В₁₂. В продолжении эксперимента по высвобождению препарата в работе исследована биодоступность витаминов *in vitro*. Показано увеличение биодоступности В₁₂ в ~1.8 раза, что обусловлено замедленным высвобождением и защитой носителем от внешних факторов.

Более сложные многокомпонентные системы рассмотрены в работе [27], в которой предложены офтальмологические гели для более эффективного заживления ран роговицы и регенерации нервных волокон. Авторы изучали сшитые и нешитые гиалуронаты с инкапсулированным таурином, витамином В₆ и В₁₂, взятыми в различных массовых соотношениях, а также препарат RenerviX с аналогичным качественным составом. Результаты исследований формуляций на клеточной линии роговицы кролика (SIRC) и испытания *in vivo* на кроликах показали высокую эффективность систем для восстановления функциональных нервов роговицы, защиты клеток от окислительного стресса и высокую скорость заживления ран. Тем не менее для достижения ключевых показателей наличие витаминов было не обязательным фактором, что ставит под сомнение необходимость этих компонентов в формуляции. Однако в более ранней работе [28] в исследованиях на крысах для гелей аналогичного состава (гуалуронат, содержащий таурин и В₁₂) было показано выраженное ускорение реэпителиализации роговицы после механической травмы при наличии 0.05% В₁₂.

В целом предлагаемые системы доставки нескольких витаминов аналогичны системам доставки В₁₂: наблюдается замедленное высвобождение препарата и увеличение биодоступ-

ности. Тем не менее в литературе не отмечается взаимное влияние В₁₂ на физико-химические и биологические параметры других витаминов, и наоборот. Таким образом, разработка многофункциональной системы на основе нескольких витаминов может быть весьма перспективной с точки зрения удобства для пациентов.

5. ВИТАМИН В₁₂ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ДЛЯ ДРУГИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Во многих исследованиях В₁₂ используется в качестве не основного терапевтического агента, а вспомогательного компонента для улучшения ряда свойств другого препарата. Подобные системы, как правило, нацелены на адресную доставку широкого спектра лекарств, в основном низкомолекулярных соединений, а также макромолекул разных терапевтических групп. При этом возможно использование как свободного В₁₂ или его производных, так и ковалентная пришивка В₁₂ непосредственно к исследуемой молекуле или через спейсер. Наиболее известный пример подобных систем – конъюгат В₁₂–инсулин [29, 30], полученный с целью улучшения доставки белка для эффективной регуляции концентрации глюкозы в крови.

5.1. Конъюгаты В₁₂ и их антибактериальная активность

Для осуществления присоединения В₁₂ посредством формирования ковалентных связей необходимо обратить внимание на доступные функциональные группы В₁₂, по которым возможно провести модификацию [31]. Здесь следует подчеркнуть, что формирование комплексов В₁₂ с белками – важный фактор для химической стабильности и транспорта препарата *in vivo* (рис. 2). Поэтому необходимо учитывать, какие функциональные группы нежелательно задействовать для формирования новых связей. При этом в литературе отсутствуют работы по изучению влияния структурных изменений В₁₂ на формирование комплексов с белками. Отмечено [2, 32], что K_d комплексов белок–В₁₂ составляют $\sim 10^{-15}$ М, при этом комплексы образуются путем “обволакивания” почти всей молекулы В₁₂ белком. Таким образом, В₁₂ прочно удерживается внутри белковой глобулы. Незащищенной остается 5'-гидроксигруппа рибозного фрагмента – основной сайт химической модификации для получения производных В₁₂ или конъюгатов (рис. 1). Также часто подвергают модификации

фосфатную группу и периферический ϵ -пропионамид.

Например, в работе [11] вводили небольшие фрагменты с концевыми карбоксильными группами в цианокобаламин путем образования сложноэфирных связей по 2'- и/или 5'-гидроксильной группе рибозного фрагмента. Синтезированные вещества в 20 раз превосходили исходный витамин по растворимости в фосфатносолевом буфере и дистиллированной воде. В общей сложности <50% от внесенных в водный раствор конъюгатов поворглись гидролизу за 24 ч.

В литературе также предлагается модифицировать непосредственно макроцикл коррин, что было продемонстрировано в работе [33]. Авторы исследовали влияние структурных особенностей форм B_{12} на проникновение молекул в бактериальные клетки. Для этой цели на примере кобиевой кислоты была внесена флуоресцентная метка (Orgeon green или BoDIPY) через спейсер к C5 корринового кольца. Исследования проводили на нескольких штаммах *E. coli*, содержащих и не содержащих BtuB-рецептор, ответственный за поглощение B_{12} , а также на *M. tuberculosis*. Продемонстрировано успешное проникновение модифицированных аналогов кобиевой кислоты в *M. tuberculosis* и *E. coli* с активным геном *btuB*, при этом для некоторых штаммов поглощение данных соединений на порядок превосходило поглощение исходного цианокобаламина. Таким образом, при разработке таргетных лекарственных форм с использованием B_{12} необходимо учитывать не только взаимодействие B_{12} с транспортными белками, но и особенности молекулярного узнавания витамина на поверхности клеток микроорганизмов.

Для разработки эффективных антибактериальных лекарственных препаратов в работах изучаются конъюгаты B_{12} с пептидно-нуклеиновыми кислотами (ПНК) [34]. ПНК представляют собой олигомерные молекулы, в которых азотистые основания соединены с остовом (рис. 3) – пептидной незаряженной ахиральной структурой, не содержащей пентоз и остатков фосфорной кислоты. В связи с особенностью своего строения ПНК – это в некотором смысле аналоги нуклеиновых кислот, что обуславливает их способность образовывать устойчивые дуплексы ПНК–ПНК, ПНК–ДНК и ПНК–РНК, а также триплексы (ПНК)₂(ДНК). При этом, в отличие от нуклеиновых кислот, ПНК исключительно чувствительны к наличию некомплементарных пар в структуре ДНК или РНК [35].

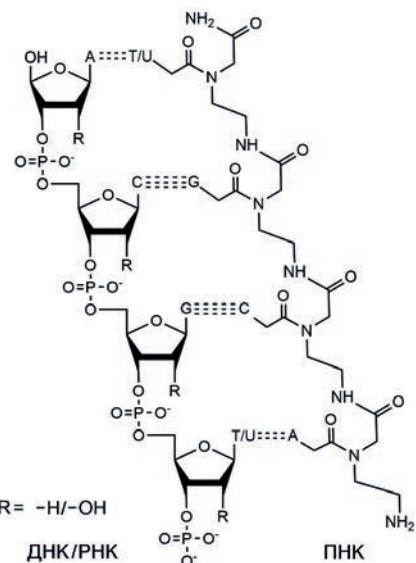


Рис. 3. Схематичное представление взаимодействие цепи ПНК с ДНК/РНК.

Высокая чувствительность и стабильность обуславливает особый интерес к ПНК в вопросах создания новых лекарственных препаратов. Так, в работе [36] в качестве противомикробного компонента авторы синтезировали ПНК, комплементарную 10 остаткам нуклеотидов в мРНК гена *acpP*, кодирующем белок-переносчик, который участвует в биосинтезе жирных кислот. B_{12} был присоединен к N-концу ПНК по 5'-ОН группе рибозного фрагмента двумя способами: либо с образованием карбамидной связи через линкер $-(CH_2)_6-$ и триазол, либо с формированием связи $-S-S-$.

При исследовании антибактериальной активности образцов на *E. coli* K-12 MG1655 в бульоне Мюллера–Хинтон (МНВ) не наблюдалось ингибирование роста микроорганизмов. Авторы связывают этот результат с тем, что среда МНВ не селективная, содержит много разнообразных питательных веществ, в том числе и продукты животного происхождения, что может исключать необходимость дополнительного потребления клетками B_{12} -содержащего конъюгата. Выбор другой питательной среды (Скарлет и Тернер) обусловлен наличием этаноламина в качестве источника азота. Химические превращения этого субстрата сопряжены с ферментом, для которого B_{12} является кофактором. Для данных условий авторы продемонстрировали выраженную антибактериальную активность синтезированных конъюгатов, причем минимальная ингибирующая концентрация образцов (5 мкМ) была сравнима

с конъюгатами, в которых вместо В₁₂ к ПНК был пришит пептид (KFF)₃K, который хорошо проникает в клетки. Поскольку использование таких катионных синтетических пептидов, как (KFF)₃K, не всегда целесообразно, В₁₂ показал себя перспективным компонентом ПНК для разработки высокоэффективных лекарственных форм.

К аналогичному выводу пришла группа ученых под руководством профессора J. Trylska [37–39]. Авторы исследовали методом компьютерного моделирования механизм проникновения конъюгатов В₁₂–ПНК внутрь бактериальной клетки, а также продемонстрировали антибактериальную активность таких систем на *E. coli* и *S. typhimurium*. Важно отметить, что ПНК был пришит к различным функциональным группам витамина В₁₂: кобальту, –ОН 5'-рибозного фрагмента, амидным группам *c* и *e* в мезо-положении и –ОН-группе кобинамида. Наиболее выраженная активность продемонстрирована для модификации рибозного фрагмента.

Помимо ПНК возможно использовать и олигонуклеотидные последовательности, которые могут блокировать репликацию белков посредством специфичного взаимодействия с мРНК. Так, показана возможность блокирования гена *trfp1* в плазмиде в клетках *E. coli* и *S. typhimurium* [40]. Снижение экспрессии красного флуоресцентного белка в бактериях на 50% указывало на успешное проникновение и ингибирование синтеза белка. Подобные конъюгаты можно использовать в качестве подхода для селективного ингибирования синтеза бактериальных белков.

Таким образом, системы ПНК–В₁₂ и олигонуклеотиды–В₁₂ – это перспективные антибактериальные агенты, которые можно использовать целенаправленно для ингибирования экспрессии необходимых бактериальных белков. Кроме того, данные конъюгаты имеют большое значение для преодоления резистентности микроорганизмов к существующим антибактериальным низкомолекулярным соединениям.

5.2. Светочувствительные конъюгаты В₁₂

Для биомедицинского применения В₁₂ T.A. Shell и D.S. Lawrence [41] предложили обратить внимание на особенности светочувствительности витамина. Авторы собрали свои основные результаты, а также достижения коллег по разнообразным конъюгатам В₁₂, способным разрушаться под действием электромагнитного излучения.

В случае синтезированных алкилкобаламинов связь углерод–кобальт непрочная (<30 ккал/моль), поэтому возможно провести направленный фотогемолиз под действием света в видимой области, который способно поглощать корриновое кольцо (330–560 нм), т.е. В₁₂ можно использовать для разработки фототерапевтических средств с заданными характеристиками активации. Например, авторы рассматривают возможности направленного действия конъюгатов В₁₂–доксорубицин и В₁₂–цАМФ. Оба типа конъюгатов не оказывали никакого воздействия на жизнеспособность и/или морфологию клеточных линий REF52 и HeLa соответственно. При облучении длиной волны 530 нм, при которой происходит фотогемолиз, высвобождаются свободные биологически активные агенты, и, ожидаемо, доксорубицин способствует снижению жизнеспособности клеток, а цАМФ – сокращению и округлению клеток. Интересно отметить, что в случае конъюгата В₁₂–BODYPY расщепление наблюдается при длине волны 650 нм, значение которой выходит за возможности поглощения корринового кольца. Таким образом, флуорофоры могут выступать в качестве “антенн” для длин волн активации до 800 нм.

В качестве сложной комплексной лекарственной формы, включающей в себя все рассмотренные результаты, авторы обсуждают двухкомпонентную систему, в которой представлены конъюгат липид–В₁₂–лекарство и липид–флуорофор. В экспериментах *in vitro* одновременно исследуются клетки HeLa и эндоциты, содержащие липидные конструкции. На примере противовоспалительного средства дексаметазона показано, что фототерапевтические конструкции изначально находились только на поверхности клеток-носителей; активация заданной длиной волны способствует высвобождению лекарственного препарата, который впоследствии проникает во второй тип клеток.

Важно отметить, что локализация подобных конструкций не ограничивается только поверхностью клеток-носителей, возможно введение в эндосомы, что может быть использовано для высвобождения вещества непосредственно в цитоплазму клеток-носителей. Подобные лекарственные формы были успешно протестиированы *in vitro* на стволовых клетках, способных переходить в глиобластому, а также *in vivo*. Таким образом, вышеописанные примеры фотоактивных конструкций – перспективные сложные системы доставки лекарств с высокой временной точностью.

5.3. Конъюгаты B_{12} с противоопухолевыми препаратами

В литературе витамин B_{12} рассматривается как перспективный компонент многих комплексных лекарственных форм противоопухолевых препаратов. Многие авторы обращают внимание на активный метаболизм раковых клеток. Для клеточного поглощения B_{12} требуется формирование комплекса витамина с транскобаламином II (рис. 2) с помощью белка рецептора плазматической мембраны (TCbLR), кодируемого геном *CD320*. Поступление B_{12} в клетки млекопитающих обусловлено высокой аффинностью и селективностью рецептора к комплексу транскобаламин– B_{12} . Важно отметить, что рецептор TCbLR поглощается клеткой вместе с комплексом транскобаламин– B_{12} и деградирует в лизосомах, что способствует высвобождению витамина в цитоплазму. Появление новых рецепторов на поверхности клеток зависит от уровня экспрессии *CD320*. Данный процесс взаимосвязан с клеточным циклом, т.е. высокое содержание белка наблюдается в активно пролиферирующих клетках, в то время как более низкий уровень экспрессии наблюдается в дифференцированных клетках в G_0 -фазе. Таким образом, многие линии раковых клеток демонстрируют более высокую экспрессию TCbLR, что может использоваться для адресной доставки и увеличения эффективности действия лекарств [42].

Для усиления эффекта от данного подхода можно обратить внимание на еще одну особенность раковых клеток: в опухоли концентрация глутамина в 4 раза выше, чем в нормальной ткани, т.е. возможно более активное расщепление –S-S– связей посредством реакций тиол-дисульфидного обмена именно в патологической ткани. Так, в работе [43] авторы разработали трехступенчатый синтез конъюгатов B_{12} с дисульфидной связью в 5'-положении рибозного фрагмента. Получены соединения, содержащие остатки цистеина, глутамина, олигопептида и др. Дисульфидные конъюгаты перспективны тем, что глутамион/дисульфид глутамина – хорошо изученная окислительно-восстановительная пара в животных клетках, которая обеспечивает антиоксидантную активность. Похожие системы доставки на основе полимеров подробно изложены в работе [44].

5.4. Использование B_{12} в системе доставки других лекарственных компонентов

Для доставки низкомолекулярных лекарственных веществ (реже макромолекул) в литературе используют разнообразные носители (табл. 3).

В случае подобных многокомпонентных систем с B_{12} возможно включение витамина в систему посредством нековалентного связывания или путем “декорирования” носителя витамином (ковалентная пришивка), в который впоследствии будет инкапсулирован препарат. Модификацию B_{12} , как правило, проводят по –OH-группе рибозного фрагмента с использованием спейсера небольшого размера или без спейсера. Согласно табл. 3, авторы используют разнообразные типы носителей с точки зрения химической структуры (однокомпонентные/многокомпонентные, неорганической/органической природы) и формы (нано- и микрочастицы, нановолокна). Особенно часто B_{12} применяют для доставки противоопухолевых препаратов, по-видимому, вследствие высокой активности *CD320*.

Некоторые работы исследуют комплексные системы с B_{12} , но не выявляют роль витамина в свойствах предлагаемого материала. Например, разработан пластырь из нановолокон из поликаролактона с инкапсулированным B_{12} и ингибитором ацетилхолинэстеразы донепезилом для терапии болезни Альцгеймера [45]. Материал продемонстрировал двойной профиль высвобождения донепезила, повышение жизнеспособности клеток SH-SY5Y в присутствии $A\beta_{1-42}$ и снижение экспрессии генов, кодирующих предшественников β -амилоида.

Для низкомолекулярных лекарственных молекул вследствие инкапсуляции в носитель ожидаемо наблюдается замедленное высвобождение препарата. B_{12} в качестве дополнительного агента в большинстве случаев ковалентно пришивают к системе доставки, т.е. проводят “декорирование” поверхности носителя. Главное преимущество подобных систем – выраженное увеличение эффективности транспортировки основной действующей молекулы через клеточный монослой. Такой результат достигается посредством взаимодействия B_{12} на поверхности носителя с энteroцитами, что, по-видимому, повышает количество адсорбированных молекул лекарственных форм и последующее их поглощение.

Описанный эффект наблюдается и для биологически активных высокомолекулярных соединений. Особый интерес среди макромолекул представляют собой белки, поскольку в случае пероральной комплексной системы доставки возможно сразу решить две задачи: увеличение стабильности полипептида (ферментативная деградация, низкое значение рН), а также улучшение проникновения в энteroциты, что показано на

Таблица 3. Системы доставки активного агента с использованием витамина В₁₂

Тип системы	Система доставки	Активное вещество			Наиболее важные результаты влияния введения витамина В ₁₂ в систему доставки	Ссылка
		Химическая структура	Название	Краткая характеристика		
Системы доставки низкомолекулярных веществ						
Мицеллы	К модификации системы В ₁₂ *	Модификация серидин-поли(γ-бензил-L-глутамата) с использованием N,N'-карбонилдинимидазола	Паклитаксел	Противоопухолевое средство	Усиление проникновения паклитаксела в клетки BGC-823/PR через CD320-опосредованный путь эндоцитоза, что способствует более выраженному снижению деления клеток и их пролиферации. Данное эффекты значительно ниже в присутствии свободного В ₁₂ . Значительное снижение размера опухолей в экспериментах <i>in vivo</i>	[59]
Силикагель	Н	Пористые наночастицы диоксида кремния с карбоксильными группами	Цисплатин	Противоопухолевое средство, неорганический комплекс	Снижение высвобождения цисплатина из наночастиц на 26% по сравнению с частицами, не содержащими витамин В ₁₂	[60]
Частицы производных хитозана	К	Модификация гликоль-хитозана по аминогруппам лезоксихолевой кислотой и В ₁₂	Скутедларин	Противоопухолевое средство	Увеличение проникновения в клетки Сасо-2 в 2.5 раза за 2 ч инкубации с Сасо-2. Повышение biodоступности скутедларина в ~2-3 раза, выраженное снижение индекса резистентности и уровня экспрессии белков антионкоза (VEGFR2 и vWF) сегрегации в <i>in vivo</i> экспериментах на крысах с дистетом II типа	[61]
Микрочастицы диатомовой земли	К	Модификация поверхности носителя с помощью янтарного антидрида	Цисплатин, 5-фторурацил, комплекс три-гидратил[2',2'-бипиридин]-4,4'-диамин-рутени(II)	Противоопухолевые средства	Значительное усиление адсорбции микрочастиц на поверхность клеток НГ-29 и МСF-7 (увеличение количества адсорбированных частиц до 3 раз)	[62]
Частицы на основе гиалуроновой кислоты	К	Модификация поверхности гиалуроновой кислоты, в качестве линкера использованы колестин	Колестин	Пептид	Снижение нефротоксичности на 20-30% (НЕК 293) при сохранении противомикробной активности. Увеличение P_{app} до 3.5×10^{-6} см/с	[63]
Модифицированные липидные частицы	К	Твердые липидные частицы, покрытые конъюгатом В ₁₂ со стearиновой кислотой	Амфотерцин В	Противогрибковый препарат	Снижение значения IC ₅₀ в 2 раза (<i>Leishmania donovani</i>)	[64]
Системы доставки макромолекул						
Частицы производных хитозана	К	Модификация триметилхитозана по аминогруппе с использованием янтарного антидрида	Инсулин	Гормон Белок	Усиление поглощения модифицированных частиц комплексом клеток Сасо-2 и НТ29-MTX при наличии и отсутствии слизи на клеточной поверхности	[65]
Мицеллы	К	Модификация дексстран-г-полиглицилоксидного эпилового эфира через 2,2'-(этиледиокси) бис(этиламиновый) спейсер	Циклоспорин А	Иммуноадрессант Полипептид	Увеличение апикального и базолатерального проникновения циклоспорина через моноласти клеток в ~2 раза по сравнению с немодифицированными мицеллами	[66]

* К – ковалентная пришивка В₁₂ к носителю; Н – удержание молекул В₁₂ в носителе посредством нековалентных взаимодействий.

клеточной линии Caco-2 (табл. 3). Например, в работе [46] были получены альгинатные наночастицы, модифицированные кобаламином. В данные системы инкапсулировали инсулин, который использовали в качестве модельного пептидного лекарственного препарата. Сферические частицы продемонстрировали более высокую способность к проникновению через монослой Caco-2 (увеличение значения P_{app} в среднем на 10–25%). Эксперименты *in vivo* показали, что при пероральном введении наночастиц мышам с сахарным диабетом I типа наблюдается более длительное удержание в кишечнике. Кроме того, продемонстрировано более выраженное снижение уровня глюкозы в крови в течение 12 ч (на 54% по сравнению с 25% в случае немодифицированных частиц при одинаковой дозе инсулина). Таким образом, использование B_{12} в подобных системах имеет большой потенциал для эффективной пероральной доставки пептидных лекарственных средств.

Важно отметить, что также существуют работы по доставке олигонуклеотидов. Для ингибирования быстрого роста и метастазирования рака желудка в работе [47] предлагается декорировать витамином наночастицы двух типов: полиэтиленгликоля и сополимера гликолиевой и молочных кислот. В качестве противоопухолевого препарата авторы используют микроРНК, которая способствует апоптозу клеток рака человека. Для предложенных систем характерно избирательное связывание с *CD320* и увеличение количества доставленной микроРНК в клетки BGC-823, что способствует митохондриально-опосредованному апоптозу. Испытания *in vivo* на мышах показали снижение размеров опухолей на 60–90%.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Витамин B_{12} – жизненно необходимое соединение для человека. Наследственные заболевания, хирургические вмешательства, нарушение питания, а также низкая проникающая способность в клетки B_{12} могут приводить к возникновению дефицита витамина. Для более эффективной терапии в литературе предлагается использовать несколько подходов, среди которых – инкапсуляция B_{12} в системы доставки как наиболее изученный и быстроразвивающийся подход. Системы доставки кобаламинов в существенной форме способствуют замедленному или стимул-чувствительному высвобождению препарата, увеличению проникновения B_{12} в энteroциты, а также увеличению биодоступности препарата. Степень загрузки B_{12} может варьироваться в

зависимости от природы носителя и в ряде случаев достигает значений >90%.

Поскольку на сегодняшний день отсутствуют крупномасштабные исследования по наиболее эффективному методу введения B_{12} *in vivo* с точки зрения терапевтического эффекта, то все предлагаемые системы доставки имеют потенциал для дальнейшего применения. Наиболее популярны в литературе носители на основе модифицированных высокомолекулярных соединений (из одного или нескольких типов полимеров), формирующие наночастицы или волокна для пероральной или трансдермальной доставки соответственно.

Рассмотренные в обзоре системы доставки имеют потенциал последующей коммерциализации и внедрения в клиническую практику для коррекции дефицита витамина B_{12} . С другой стороны, фундаментальный интерес представляет собой использование витамина B_{12} как вспомогательного компонента для доставки других лекарственных молекул: пептидно-нуклеиновых кислот, пептидов, белков и противоопухолевых препаратов. Здесь потенциал использования витамина B_{12} существенно шире: рассматривается возможность включения его в лекарственные формуляции для борьбы с социально-значимыми заболеваниями, такими как резистентные инфекции, онкологические и нейродегенеративные заболевания. Это направление требует дополнительных исследований на стыке биоорганической и медицинской химии и потенциально открывает новые перспективы для создания лекарственных препаратов с улучшенными биофармацевтическими свойствами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равный вклад в написание этой статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guéant J.L., Guéant-Rodriguez R.M., Alpers D.H. // Vitam. Horm. 2022. V. 119. P. 241–274. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.01.016>
- Temova Rakuša Ž., Roškar R., Hickey N., Geremia S. // Molecules. 2022. V. 28. P. 240. <https://doi.org/10.3390/molecules28010240>
- Kozyraki R., Cases O. // Biochimie. 2013. V. 95. P. 1002–1007. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.11.004>
- Tanner S.M., Li Z., Perko J.D., Öner C., Çetin M., Altay Ç., Yurtsever Z., David K.L., Faiivre L., Ismail E.A., Gräsbeck R., de la Chapelle A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 4130–4133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500517102>
- Клинические рекомендации “Железодефицитная анемия” 2021-2022-2023 (09.09.2021), разработанные Национальным гематологическим обществом, Национальным обществом детских гематологов и онкологов – Утверждены Минздравом РФ.
- Antoine D., Li Z., Quilliot D., Sirveaux M.A., Meyre D., Mangeon A., Brunaud L., Guéant J.L., Guéant-Rodriguez R.M. // Clin. Nutr. 2021. V. 40. P. 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.04.029>
- Montoro-Huguet M.A., Belloc B., Domínguez-Cajal M. // Nutrients. 2021. V. 13. P. 1254. <https://doi.org/10.3390/nu13041254>
- Fidaleo M., Tacconi S., Sbarigia C., Passeri D., Rossi M., Tata A.M., Dini L. // Nanomaterials. 2021. V. 11. P. 743. <https://doi.org/10.3390/nano11030743>
- Van Campen C.M.C., Riepma K., Visser F.C. // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 1102. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01102>
- Bensky M.J., Ayalon-Dangur I., Ayalon-Dangur R., Naamany E., Gafter-Gvili A., Koren G., Shiber S. // Drug Deliv. Transl. Res. 2019. V. 9. P. 625–630. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-00613-y>
- Wang X., Wei L., Kotra L.P. // Bioorg. Med. Chem. 2007. V. 15. P. 1780–1787. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.036>
- Smith A.D., Warren M.J., Refsum H. // Adv. Food Nutr. Res. 2018. V. 83. P. 215–279. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.11.005>
- Bajaj S.R., Singhal R.S. // J. Food Eng. 2020. V. 272. P. 109800. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109800>
- Rizzo G., Lagana A.S. // Molecular Nutrition: Vitamins / Ed. Patel V.B. London: Academic Press, 2020. P. 105–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811907-5.00005-1>
- Ramalho M.J., Andrade S., Coelho M.A.N., Loureiro J.A., Pereira M.C. // Colloids Surf. B. 2020. V. 194. P. 111187. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111187>
- Abdelwahab O.A., Abdelaiz A., Diab S., Khazragy A., Elboraday T., Fayad T., Diab R.A., Negida A. // Ir. J. Med. Sci. 2024. V. 193. P. 1621–1639. <https://doi.org/10.1007/s11845-023-03602-4>
- Lima S., Webb C.L., Deery E., Robinson C., Zedler J.A.Z. // Biology. 2018. V. 7. P. 19. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY7010019>
- Estevinho B.N., Carlan I., Blaga A., Rocha F. // Powder Technol. 2016. V. 289. P. 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.11.019>
- Galidioli Pellá M.C., Simão A.R., Lima-Tenório M.K., Tenório-Neto E., Scariot D.B., Nakamura C.V., Rubira A.F. // Carbohydr. Polym. 2020. V. 239. P. 116236. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116236>
- Шохин И.Е., Кулинич Ю.И., Раменская Г.В., Кукес В.Г. // Биомедицина. 2012. Т. 3. С. 91–97.
- Sugandhi V.V., Mahajan H.S. // J. Drug Delivery Sci. Tech. 2022. V. 70. P. 103212. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103212>
- Mendes A.C., Gorzelanny C., Halter N., Schneider S.W., Chronakis I.S. // Int. J. Pharm. 2016. V. 510. P. 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.016>
- Yekrang J., Gholam Shahbazi N., Rostami F., Ramyar M. // Int. J. Biol. Macromol. 2023. V. 230. P. 123187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123187>
- Ramöller I.K., Tekko I.A., McCarthy H.O., Donnelly R.F. // Int. J. Pharm. 2019. V. 566. P. 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.066>
- Farzanfar S., Kouzekanani G.S., Mirjani R., Shekarchi B. // Biomed. Eng. Lett. 2020. V. 10. P. 547–554. <https://doi.org/10.1007/s13534-020-00165-6>
- Ramalho M.J., Loureiro J.A., Pereira M.C. // ACS Appl. Nano Mater. 2021. V. 4. P. 6881–6892. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c00954>
- Bucolo C., Maugeri G., Giunta S., D'Agata V., Drago F., Romano G.L. // Front. Pharmacol. 2023. V. 14. P. 1109291. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1109291>
- Romano M.R., Biagioli F., Carrizzo A., Lorusso M., Spadaro A., Micelli Ferrari T., Vecchione C., Zurria M., Marrazzo G., Mascio G., Sacchetti B., Madonna M., Fornai F., Nicoletti F., Lograno M.D. // Exp. Eye Res. 2014. V. 120. P. 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.017>
- Petrus A.K., Vortherms A.R., Fairchild T.J., Doyle R.P. // ChemMedChem. 2007. V. 2. P. 1717–1721. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700239>
- Clardy-James S., Allis D.G., Fairchild T.J., Doyle R.P. // MedChemComm. 2012. V. 3. P. 1054–1058. <https://doi.org/10.1039/c2md20040f>
- Wierzba A.J., Hassan S., Gryko D. // Asian J. Org. Chem. 2018. V. 8. P. 6–24. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201800579>
- Petrus A.K., Fairchild T.J., Doyle R.P. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2009. V. 48. P. 1022–1028. <https://doi.org/10.1002/anie.200800865>
- Lawrence A.D., Nemoto-Smith E., Deery E., Baker J.A., Schroeder S., Brown D.G., Tullet J.M.A., Howard M.J., Brown I.R., Smith A.G., Boshoff H.I., Barry C.E., Warren M.J. // Cell Chem. Biol. 2018. V. 25. P. 941–951.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.04.012>
- Wierzba A.J., Wojciechowska M., Trylska J., Gryko D. // Methods Mol. Biol. 2021. V. 2355. P. 65–82. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1617-8_7
- Анцынович С.И. // Успехи химии. 2002. Т. 39. № 1. С. 81–96. <https://doi.org/10.1070/RC2002v071n01ABEH000691>

36. Równicki M., Dąbrowska Z., Wojciechowska M., Wierzba A.J., Maximova K., Gryko D., Trylska J. // ACS Omega. 2019. V. 4. P. 819–824.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03139>
37. Wierzba A.J., Maximova K., Wincenciuk A., Równicki M., Wojciechowska M., Nexo E., Trylska J., Gryko D. // Chemistry. 2018. V. 24. P. 18772–18778.
<https://doi.org/10.1002/chem.201804304>
38. Pieńko T., Wierzba A.J., Wojciechowska M., Gryko D., Trylska J. // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. P. 2968–2979.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b00649>
39. Pieńko T., Czarnecki J., Równicki M., Wojciechowska M., Wierzba A.J., Gryko D., Bartosik D., Trylska J. // Biophys. J. 2021. V. 120. P. 725–737.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.01.004>
40. Giedyk M., Jackowska A., Równicki M., Kolanowska M., Trylska J., Gryko D. // Chem. Commun. 2019. V. 55. P. 763–766.
<https://doi.org/10.1039/c8cc05064c>
41. Shell T.A., Lawrence D.S. // Acc. Chem. Res. 2015. V. 48. P. 2866–2874.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00331>
42. Gick G.G., Arora K., Sequeira J.M., Nakayama Y., Lai S.C., Quadros E.V. // Exp. Cell Res. 2020. V. 396. P. 112256.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112256>
43. Wierzba A., Wojciechowska M., Trylska J., Gryko D. // Bioconjug. Chem. 2016. V. 27. P. 189–197.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00599>
44. Liu L., Liu P. // Front. Mater. Sci. 2015. V. 9. P. 211–226.
<https://doi.org/10.1007/s11706-015-0283-y>
45. Ertas B., Onay I.N., Yilmaz-Goler A.M., Karademir-Yilmaz B., Aslan I., Cam M.E. // J. Drug Delivery Sci. Tech. 2023. V. 89. P. 104963.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104963>
46. Long L., Lai M., Mao X., Luo J., Yuan X., Zhang L.M., Ke Z., Yang L., Deng D.Y.B. // Int. J. Nanomedicine. 2019. V. 14. P. 7743–7758.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S218944>
47. Chen Z., Liang Y., Feng X., Liang Y., Shen G., Huang H., Chen Z., Yu J., Liu H., Lin T., Chen H., Wu D., Li G., Zhao B., Guo W., Hu Y. // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 2021. V. 120. P. 111722.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111722>
48. Brito A., Habeych E., Silva-Zolezzi I., Galaffu N., Allen L.H. // Nutr. Rev. 2018. V. 76. P. 778–792.
<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy026>
49. Sarti F., Müller C., Iqbal J., Perera G., Laffleur F., Bernkop-Schnürch A. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2013. V. 84. P. 132–137.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.024>
50. Maiorova L.A., Erokhina S.I., Pisani M., Barucca G., Marcaccio M., Koifman O.I., Salnikov D.S., Groanova O.A., Astolfi P., Ricci V., Erokhin V. // Colloids Surf. B. 2019. V. 182. P. 110366.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110366>
51. Nath J., Saikia P.P., Handique J., Gupta K., Dolui S.K. // J. Appl. Polym. Sci. 2020. V. 137. P. 49193.
<https://doi.org/10.1002/app.49193>
52. Sarti F., Iqbal J., Müller C., Shahnaz G., Rahmat D., Bernkop-Schnürch A. // Anal. Biochem. 2012. V. 420. P. 13–19.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.08.039>
53. Ramazani Afarani Z., Sarvi M.N., Akbari Alavijeh M. // J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 2018. V. 84. P. 19–27.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.01.002>
54. Coelho S.C., Laget S., Benaut P., Rocha F., Estevinho B.N. // Powder Technol. 2021. V. 392. P. 47–57.
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.06.056>
55. Zhang J., Field C.J., Vine D., Chen L. // Pharm. Res. 2015. V. 32. P. 1288–1303.
<https://doi.org/10.1007/s11095-014-1533-x>
56. Genç L., Kutlu H.M., Güney G. // Pharm. Dev. Technol. 2015. V. 20. P. 337–344.
<https://doi.org/10.3109/10837450.2013.867447>
57. Andrade S., Ramalho M.J., Loureiro J.A., Pereira M.C. // Int. J. Pharm. 2022. V. 626. P. 122167.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122167>
58. Liu G., Yang J., Wang Y., Liu X., Guan L.L., Chen L. // Food Hydrocoll. 2019. V. 92. P. 189–197.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.020>
59. Guo W., Deng L., Chen Z., Chen Z., Yu J., Liu H., Li T., Lin T., Chen H., Zhao M., Zhang L., Li G., Hu Y. // Nanomedicine. 2019. V. 14. P. 353–370.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0321>
60. Thepphankulngarm N., Wonganan P., Sapcharoenkun C., Tuntulani T., Leeladee P. // New J. Chem. 2017. V. 41. P. 13823–13829.
<https://doi.org/10.1039/c7nj02754k>
61. Wang J., Tan J., Luo J., Huang P., Zhou W., Chen L., Long L., Zhang L. ming, Zhu B., Yang L., Deng D.Y.B. // J. Nanobiotechnology. 2017. V. 15. P. 18.
<https://doi.org/10.1186/s12951-017-0251-z>
62. Delasoie J., Rossier J., Haeni L., Rothen-Rutishauser B., Zobi F. // Dalton Trans. 2018. V. 47. P. 17221–17232.
<https://doi.org/10.1039/c8dt02914h>
63. Dubashynskaya N.V., Bokatyi A.N., Sall T.S., Egorova T.S., Nashchekina Y.A., Dubrovskii Y.A., Murashko E.A., Vlasova E.N., Demyanova E.V., Skorik Y.A. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 11550.
<https://doi.org/10.3390/ijms241411550>
64. Singh A., Yadagiri G., Parvez S., Singh O.P., Verma A., Sundar S., Mudavath S.L. // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 2020. V. 117. P. 111279.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111279>
65. Ke Z., Guo H., Zhu X., Jin Y., Huang Y. // J. Pharm. Pharm. Sci. 2015. V. 18. P. 155–170.
<https://doi.org/10.18433/j3j88q>
66. Francis M.F., Cristea M., Winnik F.M. // Biomacromolecules. 2005. V. 6. P. 2462–2467.
<https://doi.org/10.1021/bm0503165>

Vitamin B₁₂ in Drug Delivery Systems

A. A. Skuredina^{*, #}, D. E. Ialama^{*}, and I. M. Le-Deygen^{*}

[#] E-mail: anna.skuredina@yandex.ru

** Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia*

Vitamin B₁₂ is a vital biologically active compound for human and is involved in a wide range of metabolic processes. The widespread vitamin B₁₂ deficiency and vitamin's low penetrating ability into cells determine the urgency of delivery systems development for the design of formulations with improved biopharmaceutical properties. This work provides a brief discussion of the main chemical and biochemical properties of the vitamin B₁₂, as well as considers oral, injectable and transdermal multicomponent dosage forms of vitamin B₁₂ that are aimed at solving the issue. Moreover, the literature analysis of the prospects of using vitamin B₁₂ as an auxiliary component for both passive and active delivery of other drug molecules, for example, peptide nucleic acids and antitumor drugs, is presented. The review describes in detail the types of proposed delivery systems for biologically active compounds, in which vitamin B₁₂ is one of the components.

Keywords: *vitamin B₁₂, drug delivery systems*



УДК 54.057:547.99:57.083.36

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭФИРОВ И АМИДОВ МАЛЕОПИМАРОВОЙ И ДИГИДРОХИНОПИМАРОВОЙ КИСЛОТ

© 2024 г. Е. В. Третьякова*, #, С. Р. Шарафутдинова*, **

* Уфимский институт химии Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
Россия, 450054 Уфа, просп. Октября, 71

** ФГБОУ ВОУ “Уфимский университет науки и технологий”, Россия, 450076 Уфа, ул. Заки Валиди, 32

Поступила в редакцию 14.04.2024 г.

После доработки 18.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

В результате взаимодействия гидроксильных производных метилового эфира дигидрохинопимаровой кислоты с диэтилхлорфосфитом синтезированы новые 1-, 1,4- и 1,4,20-диэтоксифосфорил-содержащие эфиры. Исследование цитотоксической активности *in vitro* на 60 линиях клеток девяти различных опухолей человека эфиров метилового эфира дигидрохинопимаровой кислоты с диэтоксифосфорильным, фурановым и индолным фрагментами, а также амидов дитерпеновых кислот с остатками линейных, гетероциклических и ароматических аминов показало, что диэтоксифосфорильный и бензиламинный заместители имеют ключевое значение для проявления цитотоксического эффекта. Диэтоксифосфорилпроизводные (XIX) и (XVII), а также бензиламид (IX) дигидрохинопимаровой кислоты проявили цитотоксическую активность в отношении одной, семи и четырех клеточных линий рака молочной железы, лейкемии, немелкоклеточного рака легких, меланомы и рака предстательной железы соответственно. Наибольшую активность проявил бензиламид малеопимаровой кислоты (XIII), эффективно угнетающий рост 19 клеточных линий восьми видов рака и обладающий значительным цитотоксическим действием относительно всех шести исследуемых клеточных линий лейкемии.

Ключевые слова: абietановые дитерпеноиды, дигидрохинопимаровая кислота, малеопимаровая кислота, эфиры, амиды, фосфорилирование, цитотоксическая активность

DOI: 10.31857/S0132342324060051, **EDN:** NFTZHA

ВВЕДЕНИЕ

Природные дитерпеновые кислоты ряда абietана (абietиновая, дегидроабietиновая и левопимаровая кислоты) и их синтетические производные представляют собой важный класс биологически активных соединений с широким спектром биологического и фармакологического действия и в последнее время привлекают значительное внимание благодаря своему противоопухолевому потенциалу [1–3]. Отмечается способность дитерпеновых кислот ингибировать пролиферацию клеток опухолей, вызывать их гибель при воздействии на сигнальные пути апоптоза и ферроптоза, ядерные факторы NF-кВ, Р13К/АКТ, митохондрии и другие потенциальные молекулярные мишени [4–6]. Кроме

того, при использовании смоляных кислот в комбинации с известными противораковыми препаратами происходит значительное увеличение противоопухолевого потенциала и снижение токсичности лекарственного агента [7–9]. Исследование *in vivo* антиметастатической активности абietиновой кислоты в сочетании с таксолом на клетках меланомы показало способность дитерпеновой кислоты эффективно ингибировать метастазирование в легких, что может привести к ее использованию в качестве антиметастатического средства или адьюванта при противоопухолевой терапии [10]. 7,8-Эпокси-13,17-триоксолан-абietиновая кислота проявляет низкую токсичность и обладает комбинированными свойствами: при высокой противовоспалительной и противоязвенной активности

Автор для связи: (эл. почта: tretyakovaev@gmail.com).

оказывает действие на злокачественные клетки MeWo [11], что является немаловажным при возникновении инфекционных осложнений у онкологических больных.

В продолжение исследований по разработке новых фармакологически перспективных средств путем модификации смоляных кислот с целью изучения и анализа влияния заместителей в различных положениях дитерпенового скелета на биологическую активность в настоящей работе представлены результаты синтеза 1-, 1,4- и 1,4,20-эфиров метилдигидрохинопимарата с диэтоксифосфорильным, фурановым и индолным фрагментами, а также C20-амидов дигидрохинопимаровой и малеопимаровой кислот, содержащих остатки линейных, гетероциклических и ароматических аминов. Проведена первичная оценка цитотоксической активности *in vitro* 16 синтезированных соединений в отношении 60 клеточных линий девяти различных видов опухолей человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что функционализация C20-карбоксильной группы смоляных кислот и их диновых аддуктов путем введения различных биоактивных фрагментов может значительно усилить цитотоксическую активность исходных соединений. Так, модификация C20-положения малеопимаровой и дигидрохинопимаровой кислот посредством многокомпонентных реакций Манниха и Уги позволила получить производные, эффективно ингибирующие клеточные линии меланомы, лейкемии, эпителиального рака кишечника, почек, предстательной и молочной желез, а также немелкоклеточного рака легких [12, 13]. Химические модификации метилового эфира дигидрохинопимаровой кислоты путем введения оксиминовых фрагментов в положения C1- и C4-цикла *E* способствовали появлению широкого спектра цитотоксической активности *in vitro*, а также противоопухолевой активности *in vivo* в отношении трансплантированной карциномы молочной железы мыши Ca755 и адено-карциномы толстой кишки животных AKATOL [2]. Выраженный антитрополиферативный эффект в отношении культур опухолевых клеток Jurkat, K562, U937 и HeLa отмечен у аналогов метилдигидрохинопимарата с нитрильными заместителями в C1-, C4- и C20-положениях молекулы [14], вызывающих гибель клеток путем апоптоза в фазах S и G2 клеточного цикла, в то время как 1- и 1,3-пропаргиловые эфиры метилдигидрохинопимарата проявляют цитотоксическую ак-

тивность в отношении клеточных линий лейкемии, меланомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичников и почек [15].

С целью изучения влияния заместителей в указанных положениях дигидрохинопимаровой кислоты и анализа влияния структуры дитерпенового соединения на цитотоксическую активность нами были синтезированы 1-, 1,4- и 1,4,20-эфиры метилдигидрохинопимарата с фрагментами фурановой и индолуксусной кислот (I–V) и C20-амиды дигидрохинопимаровой и малеопимаровой кислот с фрагментами линейных, гетероциклических и ароматических аминов (VI–XIII). Синтез указанных соединений осуществляли согласно описанным в литературе методикам [16, 17]. Структуры синтезированных производных (I–XIII) представлены на рис. 1.

Из литературных данных следует, что присутствие фосфониевых и фосфонатных группировок в молекулах природных соединений обеспечивает увеличенную митохондриальную проницаемость вещества [18–20]. В ряду митохондриально-направленных противоопухолевых агентов наиболее многообещающие результаты были получены при использовании фосфониевых солей пентациклических лупановых тритерпеноидов [21–23]. Недавно появилось сообщение о синтезе C2- и C3-четвертичных фосфониевых солей хинопимаровой кислоты, содержащих енольный фрагмент у атома фосфора, однако данные об изучении их биологического действия отсутствуют [24].

В качестве субстратов для фосфорилирования нами были выбраны доступные дитерпеновые спирты – метиловые эфиры 1 β -гидрокси-, 1 β ,4 α -дигидрокси- и 1 β ,4 α ,20 α -тригидрокси-дигидрохинопимаровой кислоты (XIV–XVI), легко и с высокими выходами образующиеся при восстановлении метилдигидрохинопимарата боргидридом натрия или алюмогидридом лития [25]. Реакция диэтилхлорфосфита со спиртами (XIV–XVI) протекает в течение 3 ч в присутствии диметиламинопиридина в пиридине с образованием соответствующих диэтоксифосфорильных производных (XVII–XIX) с выходами 80–85% (схема 1).

Структуры синтезированных соединений подтверждены с использованием масс-спектрометрии, одно- и двумерной (COSY, NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC) спектроскопии ЯМР. Во всех случаях молекулярные ионные пики соответствовали молекулярным массам синтезированных соединений. В спектрах ^1H -ЯМР

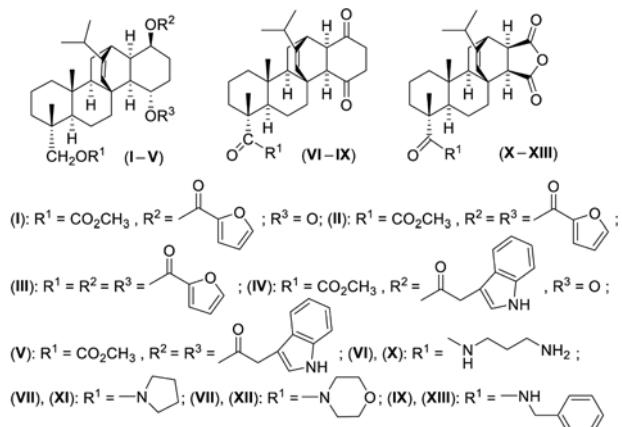
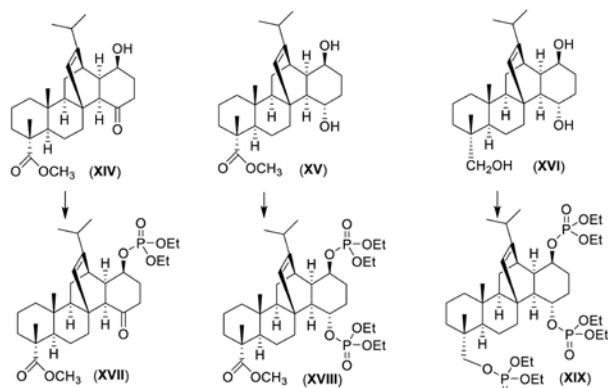


Рис. 1. Эфиры метилдигидрохинопимарата (I–V) [16] и амиды дигидрохинопимаровой (VI–IX) и малеопимаровой (X–XIII) кислот [17].



Реагенты и условия: $(EtO)_2POCl$, DMAP, пиридин, 0–23°C, 3 ч.

Схема 1. Синтез диэтоксифосфорильных производных (XVII–XIX).

соединений (XVII–XIX) наблюдаются сигналы метиленовых протонов этоксигруппы при δ 3.95–4.10 м.д. В спектрах ^{13}C -ЯМР новых соединений присутствуют сигналы в области δ 63.4–83.3 м.д., принадлежащие атомам углеродов C1-, C1,C4- и C1,C4,C20-моно-, ди- и тризамещенных диэтоксифосфорилпроизводных. Из спектров ^1H - ^{13}C HSQC соединений (XVII–XIX) следует, что протоны H1 и H4 соединений (XVIII) и (XIX) проявляются в виде уширенных сигналов при δ 3.81–3.82 и 4.00–4.15 м.д., соответствующие им атомы углерода имеют химический сдвиг при δ 71.4–73.5 и 63.4–72.8 м.д. Для сигнала атома C20 в спектре соединения (XIX) характерен химический сдвиг при δ 83.3 м.д., протоны H20 обнаруживаются в виде уширенного сигнала при δ 4.05 м.д.

Цитотоксическую активность синтезированных соединений (I–XIII) и (XVII–XIX) изучали методом высокоеффективного биологического

скрининга согласно международной научной программе Национального института здоровья США – DTP (Developmental Therapeutic Program) Национального института рака (Бетезда, Мэриленд, США) [26–28] *in vitro* на 60 линиях клеток девяти различных опухолей человека (в том числе лейкемии, немелкоклеточного рака легких, эпителиального рака кишечника, центральной нервной системы, меланомы, рака яичников, почек, молочной и предстательной железы). При первичном тестировании активности соединения вносили в среду культивирования клеток в конечной концентрации 10 мкМ на 48 ч. Количественный критерий активности соединений – процент роста клеток линий рака (GP, %) в сравнении с контролем (контроль – 100%, значения от 0 до 100 означают задержку роста, значения менее 0 – летальность) [26–28]. В соответствии с критерием, принятым в Национальном институте рака, вещества считаются активными в случае, если они ингибируют рост клеток до 32% от контроля или вызывают их гибель. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Установлено, что дитерпеновые эфиры (I–V) с фурановым и индольным заместителями, а также амиды с диаминопропановым (VI), (X), пирролидиновым (VII), (XI) и морфолиновым (VIII), (XII) фрагментами не обладают цитотоксической активностью в отношении исследуемой панели опухолевых клеток. Тризамещенное диэтоксифосфорилпроизводное (XIX) проявило умеренную цитотоксическую активность в отношении одной клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-468, в то время как монозамещенный эфир (XVII) был активен в отношении семи клеточных линий (K-562, MOLT-4, RMPI-8226 лейкемии, NCI-H522 немелкоклеточного рака легких, SK-MEL-5 меланомы, PC-3 рака предстательной железы и MDA-MB-468 молочной железы). Бензиламид дигидрохинопимаровой кислоты (IX) ингибирировал клеточные линии CCRF-CEM, MOLT-4 лейкемии и LOX-IMVI меланомы, а наиболее чувствительной к его воздействию оказались клетки линии NCI-H522 немелкоклеточного рака легких. Наибольшую активность проявил бензиламид малеопимаровой кислоты (XIII), эффективно угнетающий рост 19 клеточных линий восьми видов рака. Наиболее чувствительной к нему была линия LOX-IMVI меланомы. Следует также отметить значительный цитотоксический эффект соединения (XIII) относительно всех исследуемых клеточных линий лейкемии (табл. 1).

Таблица 1. Цитотоксичность соединений (I–XIII) и (XVII–XIX) на 60 линиях опухолевых клеток

Линия клеток	Рост клеток, %															
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)	(XI)	(XII)	(XIII)	(XVII)	(XVIII)	(XIX)
Лейкемия																
CCRF-CEM	90.51	105.41	108.57	99.30	72.83	107.02	75.39	91.82	9.73	97.63	71.41	98.21	16.71	55.10	106.02	51.78
HL-60(TB)	80.01	91.91	93.92	100.67	52.31	101.70	79.78	85.78	53.53	110.00	92.27	92.01	3.62	36.37	100.78	45.14
K-562	69.81	103.99	108.61	88.35	58.28	95.66	72.60	92.05	55.70	87.86	87.31	94.49	21.49	30.10	88.26	57.45
MOLT-4	82.11	103.32	101.80	78.77	54.80	89.97	49.52	86.62	16.18	98.06	98.62	90.81	15.53	29.96	104.15	40.62
RPMI-8226	83.18	99.45	115.00	84.32	42.70	90.56	66.64	88.12	40.39	87.32	64.79	96.56	24.73	21.93	89.32	43.91
SR	61.87	93.39	93.33	94.65	—	89.91	72.16	79.79	44.41	87.79	—	80.74	6.39	37.47	94.56	43.26
Немелкоклеточный рак легкого																
A549(ATCC)	83.54	102.34	109.13	86.92	69.13	91.04	87.08	99.10	81.61	87.36	92.34	95.56	33.74	49.67	94.54	73.00
EKVVX	70.48	99.06	111.00	87.30	77.46	91.59	81.29	103.01	49.83	95.67	95.45	93.56	33.85	41.45	101.61	57.50
HOP-62	86.92	96.90	106.83	98.01	92.55	98.25	103.11	110.80	94.38	116.37	92.31	98.63	57.17	76.78	105.31	92.79
HOP-92	70.64	102.11	109.85	—	88.92	86.15	82.61	106.49	68.88	69.29	86.59	89.81	64.71	46.76	96.23	55.32
NCI-H226	82.32	103.04	99.17	84.11	73.12	98.71	78.56	101.89	40.65	92.23	88.71	85.55	76.08	48.88	85.31	62.36
NCI-H23	89.46	103.82	106.57	81.81	77.12	94.54	87.61	97.06	59.03	91.78	91.05	93.04	23.01	50.29	90.83	62.54
NCI-H322M	100.60	106.46	107.01	97.17	98.57	104.72	95.87	117.14	93.43	103.18	99.65	102.31	101.75	102.19	104.42	—
NCI-H460	93.92	117.26	114.99	105.99	83.12	99.77	103.14	113.37	84.53	105.49	100.25	98.73	17.59	66.46	100.57	77.04
NCI-H522	82.05	99.59	97.54	93.90	81.25	94.78	70.27	78.60	-12.51	94.75	85.58	78.59	17.01	31.62	92.88	76.84
Эпителиальный рак кишечника																
COLO 205	96.26	114.71	113.70	101.15	78.03	107.62	118.37	122.16	103.29	108.35	100.33	107.98	79.62	47.56	106.73	91.73
HCC-2998	99.19	107.50	109.47	105.15	82.98	105.07	91.95	105.17	90.00	103.03	92.18	109.44	53.83	58.87	95.79	80.82
HCT-116	86.46	109.85	111.43	86.20	58.51	100.04	81.90	91.96	60.43	86.08	91.38	95.27	23.13	32.85	98.73	38.61
HCT-15	88.10	107.38	105.79	89.50	82.09	97.15	82.96	100.08	56.04	91.28	98.04	96.00	9.01	49.79	94.83	66.00
HT29	80.84	115.79	115.51	88.75	81.49	104.28	85.11	100.54	81.70	102.46	102.96	109.54	18.83	42.48	99.27	64.40
KM12	93.33	105.49	101.97	90.12	79.03	100.32	96.73	98.89	84.59	96.00	93.23	98.51	24.86	50.89	97.40	76.46
SW-620	91.06	101.94	108.62	100.75	85.88	105.67	91.82	112.97	85.36	106.26	99.24	98.82	54.20	56.09	99.13	88.77
Рак центральной нервной системы																
SF-268	85.12	107.79	104.70	89.59	78.22	95.15	95.47	98.62	80.42	90.43	97.81	105.92	46.59	76.42	101.37	72.80
SF-295	95.87	98.30	103.34	91.56	75.81	91.60	86.79	99.98	83.07	95.36	91.91	96.29	17.78	69.09	94.10	73.86
SF-539	79.88	103.33	104.58	89.51	89.19	94.60	93.50	101.94	72.16	93.64	96.31	95.22	63.23	71.69	100.42	92.47
SNB-19	87.49	98.37	101.76	97.43	102.13	95.62	97.85	103.15	83.21	90.28	96.36	96.51	37.87	68.08	99.47	77.30
SNB-75	98.36	97.83	93.32	85.70	90.50	93.32	100.08	90.42	80.77	85.00	77.53	94.24	69.61	100.31	101.40	—
U-251	75.61	100.16	102.45	90.44	88.14	93.45	96.88	98.66	67.02	91.10	95.97	25.09	42.12	94.08	80.90	

Таблица 1. (Продолжение)

Линия клеток	Рост клеток, %															
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)	(XI)	(XII)				
Меланома																
LOX IMVI	98.73	110.53	109.23	95.00	77.88	93.96	83.49	88.55	27.02	97.03	97.51	83.20	-8.46	62.39	100.44	74.82
MALME-3M	92.03	107.51	106.90	93.41	92.99	114.34	111.12	114.46	95.48	94.44	100.95	103.38	87.03	86.22	103.56	—
M14	—	—	—	92.40	81.28	95.50	99.07	102.59	86.90	92.41	101.52	98.50	54.32	55.35	105.41	82.47
MDA-MB-435	91.56	104.06	101.49	105.86	90.22	104.85	92.96	99.44	86.00	101.16	94.76	102.79	49.57	51.99	100.67	79.58
SK-MEL-2	95.71	106.64	102.35	90.23	93.29	97.96	94.50	100.53	99.23	93.69	101.10	90.17	46.99	71.33	89.77	74.56
SK-MEL-28	92.45	103.90	104.50	105.97	120.81	112.95	95.51	107.59	68.58	97.93	124.09	101.89	68.13	72.73	106.10	92.44
SK-MEL-5	89.62	101.67	101.45	96.90	88.33	96.43	80.31	101.28	69.26	97.47	83.35	93.55	72.22	18.09	96.18	43.11
UACC-257	84.55	110.09	107.85	98.38	84.37	103.20	90.28	97.93	77.63	93.22	92.06	103.63	82.13	41.76	98.38	86.34
UACC-62	62.00	92.55	94.63	66.45	80.93	88.05	67.09	81.57	59.64	66.77	86.99	79.42	50.21	46.12	69.09	61.54
Рак яичника																
IGROV1	71.65	99.39	113.37	74.17	96.34	105.34	101.27	107.11	90.57	96.62	98.95	95.48	31.13	72.09	105.94	—
OVCAR-3	92.51	123.22	127.35	88.13	84.36	99.71	102.53	108.62	86.90	98.96	102.31	106.89	41.97	67.65	106.29	84.79
OVCAR-4	77.61	102.95	102.41	85.60	77.50	104.17	84.04	87.92	47.34	98.88	86.99	95.76	49.79	49.51	100.30	53.80
OVCAR-5	96.14	106.76	111.53	102.46	128.97	115.71	103.34	114.46	83.78	104.18	134.41	99.51	93.56	92.74	99.35	117.52
OVCAR-8	88.37	100.07	100.74	89.91	89.18	94.05	97.25	106.40	75.08	91.78	91.74	98.96	42.71	55.48	95.70	85.49
NC/ADR-RES	83.42	107.01	109.84	85.89	85.65	103.67	80.32	97.19	74.03	90.48	90.00	98.17	37.37	44.28	96.61	61.81
SK-OV-3	96.10	114.79	107.82	100.69	90.94	99.52	99.43	96.83	104.79	112.96	96.91	89.19	74.49	54.04	104.72	79.76
Рак почки																
786-0	85.74	94.30	109.56	93.68	78.90	102.07	91.66	100.93	87.17	93.12	93.39	103.52	70.55	63.27	99.25	75.07
A498	102.42	114.96	112.50	112.80	105.94	104.77	130.94	124.70	97.76	100.98	91.78	121.19	85.17	91.10	118.27	108.87
ACHN	81.99	111.68	109.82	88.25	71.27	97.21	93.32	98.94	70.69	92.59	94.97	82.16	25.74	65.20	100.32	72.20
CAKI-1	67.09	95.80	90.16	65.83	56.44	68.64	93.74	100.13	88.70	59.79	84.48	86.61	77.13	63.24	72.72	48.44
RXF 393	—	—	—	80.54	95.63	98.65	94.13	—	—	86.63	114.69	—	—	—	87.63	86.23
SN12C	87.45	100.91	103.87	88.12	99.85	112.49	113.61	107.22	83.41	95.55	107.38	97.02	52.05	65.44	98.49	77.39
TK-10	102.86	105.11	107.84	121.49	104.70	101.29	71.05	112.89	96.89	111.78	90.00	116.33	44.87	83.23	110.53	97.16
UO-31	74.05	101.03	96.35	64.47	54.93	75.70	91.66	89.29	48.15	79.42	74.80	59.04	43.37	53.46	90.10	—

Таблица 1. (Окончание)

Линия клеток	Рост клеток, %																
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)	(XI)	(XII)					
PC-3	51.29	87.94	101.41	60.56	41.05	76.21	50.56	68.65	36.88	69.12	68.54	85.34	33.34	23.49	75.25	36.52	
DU-145	99.71	112.91	121.25	98.67	95.28	104.34	103.11	112.64	98.12	102.91	113.67	107.50	55.26	83.15	106.06	92.38	

Рак предстательной железы																
Рак молочной железы																
MCF7	80.36	98.29	95.95	83.81	68.22	86.78	74.86	102.06	42.66	74.78	94.53	75.02	13.20	33.16	81.93	53.45
MDA-MB-231/ATCC	78.69	100.64	99.89	89.89	81.53	99.87	90.84	95.74	86.52	86.10	91.59	89.66	77.09	66.95	90.34	66.95
HS 578T	92.58	110.41	106.94	92.12	91.91	100.12	82.68	91.81	63.06	106.54	89.51	97.23	44.61	59.55	108.39	86.33
BT-549	110.36	99.78	100.52	118.96	102.88	121.29	95.27	88.25	68.72	123.43	89.67	102.77	69.55	54.86	137.77	85.84
T-47D	76.39	98.91	100.38	77.90	47.86	90.13	76.20	98.06	51.82	79.65	79.16	88.34	55.96	42.10	81.48	33.51
MDA-MB-468	86.84	101.65	98.19	86.71	77.43	101.28	77.46	104.59	70.10	107.46	84.38	91.05	41.47	7.96	103.71	26.41

Примечание: приведена выживаемость клеток (%), культивированных в присутствии 10 мМ исследуемого соединения, по сравнению с контролльными клетками (без добавления соединения в культуральную среду). Полужирным шрифтом выделены значения, указывающие на $\geq 50\%$ -ное ингибирование роста линий опухолевых клеток. Отрицательные значения соответствуют гибели клеток. Прочерк – отсутствие данных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Температуры плавления определяли на микростолике RNMK-05 (Boetius Aps, Германия). Оптическое поглощение измеряли на поляриметре 241 MC (Perkin-Elmer, Германия) в трубке длиной 1 дм. ТСХ-анализ проводили на пластинках Сорб菲尔 (ЗАО “Сорбполимер”, Россия), используя систему растворителей хлороформ–этилацетат, 1 : 1. Вещества обнаруживали 10%-ным раствором серной кислоты с последующим нагреванием при 100–120°C в течение 2–3 мин. Элементный анализ осуществляли на CHNS-анализаторе EuroEA-3000 (Eurovector Instruments, Италия), основной стандарт – ацетанилид. Колоночную хроматографию проводили на SiO₂ (Silica 60, Macherey-Nagel, Германия). Масс-спектры соединений регистрировали на ВЭЖХ-масс-спектрометре LCMS-210 EV (Shimadzu, Япония). Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали на импульсном спектрометре Avance III (Bruker, Швейцария) с рабочей частотой 500 МГц (¹H) и 125 МГц (¹³C) с использованием 5-мм датчика с Z-градиентом PABBO при постоянной температуре образца 298 К. Химические сдвиги в спектрах ¹H- и ¹³C-ЯМР приведены в м.д. относительно сигнала внутреннего стандарта тетраметилсила (TMS). Эфиры метилдигидрохинопимарата (**I–V**) [16], (**XIV–XVI**) [25] и амиды дигидрохинопимаровой (**VI–IX**) и малеопимаровой (**X–XIII**) кислот [17, 26] были получены по ранее описанным методикам.

Общая методика синтеза соединений (XVII–XIX). К перемешиваемому раствору 1 ммоль соответствующего дитерпенового спирта (**XIV–XVI**) в 10 мл пиридина в присутствии катализитического количества диметиламино-пиридина при 0°C по каплям добавляли диэтилхлорfosфат (0.28 мл (1.9 ммоль) для соединения (**XVII**), 0.56 мл (3.8 ммоль) для соединения (**XVIII**) и 0.84 мл (5.7 ммоль) для соединения (**XIX**)), медленно доводили температуру до комнатной и продолжали перемешивание в течение 6–8 ч. После завершения реакции (ТСХ-контроль) реакционную смесь выливали в холодную воду (50 мл). Образующийся осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтрального значения pH, сушили и очищали методом колоночной хроматографии на SiO₂, используя смесь петролейный эфир–этилацетат в объемном соотношении от 5 : 1 до 1 : 1 в качестве элюента.

Метил 1-((диэтилксифосфорил)окси)-13-изопропил-7,10a-диметил-4-оксо-2,3,4,4a,5,6,6a,7,8,9,10,10a,10b,11,12,12a-гексадекагидро-

1Н-4b,12-этенохризен-7-карбоксилат (XVII). Выход 87% (0.49 г), т. пл. 101°C, $[\alpha]_D^{20} +81^\circ$ (с 0.05, CHCl₃). ¹H-ЯМР (δ , м.д.; *J*, Гц): 0.61 (3Н, с, 18-CH₃); 0.86–0.96 (1Н, м, 10-CH₂), 1.02 (3Н, д, *J* 7.0, 17-CH₃), 1.05 (3Н, д, *J* 7.0, 16-CH₃), 1.21 (3Н, с, 19-CH₃), 1.31–1.69 (10Н, м, 6,8,9,10,11-CH₂, 10b-CH), 1.77–1.80 (5Н, м, 6b-CH, 2-CH₂, 3-CH₂), 1.98–2.48 (4Н, м, 1a-CH, 4a-CH, 15-CH, 5-CH₂), 2.69–2.71 (1Н, м, 5-CH₂), 2.81 (1Н, с, 12-CH), 3.65 (3Н, с, 21-CH₃), 3.75 (1Н, с, 1-CH), 3.99–4.02 (10Н, м, 1'-CH₂, 1"-CH₂, 2'-CH₃, 2"-CH₃), 5.61 (1Н, с, 14-CH). ¹³C-ЯМР (δ , м.д.): 15.7, 16.8, 17.0, 19.5, 21.4, 21.8, 27.2, 29.8, 30.1, 32.8, 34.5, 35.1, 36.4, 36.6, 37.5, 37.9, 38.1, 40.4, 45.8, 47.1, 47.8, 49.4, 51.9, 54.9, 55.1, 62.1, 68.2 (C-1), 124.5 (C-13), 147.6 (C-14), 179.2 (C-20), 213.5 (C-4). МС (APCI) *m/z* 565.32 [M+H]⁺ (вычислено для C₃₁H₅₀O₇P, 564.70). Найдено (%): C, 66.00; H, 8.70; P, 5.50. C₃₁H₄₉O₇P. Вычислено (%): C, 65.94; H, 8.75; P, 5.48.

Метил 1,4-бис((диэтоксифосфорил)окси)-13-изопропил-7,10a-диметил-2,3,4,4a,5,6,6a,7,8,9,10,10a,10b,11,12,12a-гексадекагидро-1Н-4b,12-этенохризен-7-карбоксилат (XVIII). Выход 82% (0.57 г), т. пл. 92°C, $[\alpha]_D^{20} +35^\circ$ (с 0.05, CHCl₃). ¹H-ЯМР спектр (δ , м.д.; *J*, Гц): 0.71–0.76 (1Н, м, 10-CH₂), 0.79 (3Н, с, 18-CH₃), 0.95 (3Н, д, *J* 7.0, 17-CH₃), 0.98 (3Н, д, *J* 7.0, 16-CH₃), 1.12 (3Н, с, 19-CH₃), 1.31–1.69 (10Н, м, 6,8,9,10,11-CH₂, 10b-CH), 1.77–1.80 (5Н, м, 6b-CH, 2-CH₂, 3-CH₂), 1.98–2.20 (4Н, м, 1a-CH, 4a-CH, 15-CH, 5-CH₂), 2.25–2.31 (1Н, м, 5-CH₂), 2.99 (1Н, с, 12-CH), 3.51 (3Н, с, 21-CH₃), 3.82 (1Н, уш.с., 1-CH), 3.95–4.10 (20Н, м, 1'-CH₂, 1"-CH₂, 3'-CH₂, 3"-CH₂, 2'-CH₃, 2"-CH₃, 4'-CH₃, 4"-CH₃), 4.15 (1Н, уш.с., 4-CH), 5.20 (1Н, с, 14-CH). ¹³C-ЯМР (δ , м.д.): 15.7, 16.3, 16.5, 16.8, 17.1, 18.5, 20.4, 21.2, 21.9, 22.7, 26.6, 29.6, 32.2, 33.7, 35.4, 35.9, 36.7, 37.8, 38.6, 42.1, 42.6, 45.0, 47.5, 48.3, 49.2, 49.7, 51.5, 52.3, 56.7, 60.9, 63.4 (C-4), 71.4 (C-1), 124.5 (C-13), 149.8 (C-14), 179.2 (C-20). МС (APCI) *m/z* 703.37 [M+H]⁺ (вычислено для C₃₅H₆₁O₁₀P₂, 703.80). Найдено (%): C, 60.00; H, 8.60; P, 8.80. C₃₅H₆₀O₁₀P₂. Вычислено (%): C, 59.82; H, 8.61; P, 8.81.

7-(((Диэтоксифосфорил)окси)метил)-13-изопропил-7,10a-диметил-2,3,4,4a,5,6,6a,7,8,9,10,10a,10b,11,12,12a-гексадекагидро-1Н-4b,12-этенохризен-1,4-диил тетраэтилбис(фосфат) (XIX). Выход 79% (0.64 г), т. пл. 75°C, $[\alpha]_D^{20} +11^\circ$ (с 0.05, CHCl₃). ¹H-ЯМР (δ , м.д. (*J*, Гц): 0.72–0.76 (1Н, м, 10-CH₂), 0.79 (3Н, с, 18-CH₃), 0.95 (3Н, д, *J* 7.0, 16-CH₃), 0.98 (3Н, д, *J* 7.0, 17-CH₃), 1.02 (3Н, с, 19-CH₃), 1.31–1.69 (10Н, м, 6,8,9,10,11-CH₂, 10b-CH), 1.77–1.80 (5Н, м, 6b-CH, 2-CH₂, 3-CH₂), 1.98–2.20 (4Н, м, 1a-CH, 4a-CH, 15-CH, 5-CH₂), 2.35–2.40 (1Н, м, 5-CH₂), 3.50 (1Н, с, 12-CH), 3.81 (1Н, уш.с., 1-CH), 4.00 (2Н, уш.с., 20-CH₂), 3.95–4.10 (20Н, м, 1'-CH₂, 1"-CH₂, 3'-CH₂, 3"-CH₂, 2'-CH₃, 2"-CH₃, 4'-CH₃, 4"-CH₃), 4.12 (1Н, уш.с., 4-CH), 5.25 (3Н, с, 14-CH). ¹³C-ЯМР (δ , м.д.): 14.7,

15.7, 15.8, 16.5, 16.8, 17.2, 17.6, 18.5, 18.8, 19.0, 20.4, 21.2, 21.9, 22.8, 26.6, 29.6, 32.1, 33.7, 35.4, 35.8, 36.5, 37.8, 38.2, 38.4, 39.4, 39.9, 42.2, 42.6, 45.0, 47.5, 48.5, 49.9, 56.8, 72.8 (C-4), 73.5 (C-1), 83.3 (C-20), 124.5 (C-13), 149.8 (C-14). МС (APCI) *m/z* 811.40 [M+H]⁺ (вычислено для C₃₈H₇₀O₁₂P₃, 811.88). Найдено (%): C, 56.30; H, 8.60; P, 11.50. C₃₈H₆₉O₁₂P₃. Вычислено (%): C, 56.29; H, 8.58; P, 11.46.

Цитотоксическая активность соединений. Методика тестирования цитотоксической активности *in vitro* соединений (I–XIII) и (XVII–XIX) в NCI (США) описана в работах [27–30].

Для исследований использовали модель *in vitro*, позволяющую стандартизировать условия эксперимента для повторяющихся серий [30]. Исследуемые соединения растворяли в DMSO и доводили концентрацию до 10 мкМ. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 10 мкл раствора соединения и 190 мкл клеточной суспензии. Опухолевые клетки инкубировали с исследуемым соединением в течение 48 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ с относительной влажностью 100%. Рост клеток останавливали добавлением 50 мкл холодной 50%-ной трихлоруксусной кислоты и выдерживанием смеси в течение 60 мин при 4°C. Микропланшеты промывали 5 раз холодной водой и сушили на воздухе. Добавляли в каждую лунку по 100 мкл 0.4%-ного раствора сульфородамина В в 1%-ной уксусной кислоте и выдерживали смесь при комнатной температуре 10 мин. После окрашивания несвязанный краситель и оставшиеся мертвые клетки удаляли 5-кратным промыванием 1%-ной уксусной кислотой. Микропланшеты сушили на воздухе. Связанный краситель затем растворяли в 200 мкл 10 мкМ водного раствора трис(гидроксиметил)аминометана (Trizma base) (Merck, Германия) и считывали поглощение на автоматическом микропланшетном фотометре Epoch (BioTeck Instruments, Inc., США) при длине волны 515 нм. Для добавления реагентов и промывки микропланшетов использовали устройства ELx405 (BioTek Instruments Inc., США) и Titertek Zoom 538 (Titertek Instruments, США). Оптическую плотность красителя сульфородамина В измеряли на универсальном микропланшетном фотометре Teacan Sunrise Reader (Tecan Austria GmbH, Австрия) при длине волны 430 нм.

Процент роста опухолевых клеток (GP) при их ингибировании (TD < T₀) рассчитывали по формуле:

$$GP = [(TD - T_0)/T_0] \times 100\%,$$

где TD – средняя оптическая плотность опухолевых клеток в конце теста, T₀ – средняя оптическая плотность опухолевых клеток в начальный момент времени, до добавления испытуемого соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для анализа влияния структуры абиетанового дитерпеноида на цитотоксическую активность синтезированы 1-, 1,4- и 1,4,20-эфиры метилдигидрохинопимарата с фрагментами фурановой и индолуксусной кислот и C20-амиды дигидрохинопимаровой и малеопимаровой кислот с фрагментами линейных, гетероциклических и ароматических аминов. С помощью реакции фосфорилирования диэтилхлорфосфатом осуществлена модификация положений C1, C4 и C20 гидроксипроизводных метилового эфира дигидрохинопимаровой кислоты.

Проведена первичная оценка цитотоксической активности *in vitro* 16 синтезированных соединений в отношении панели из 60 клеточных линий опухолевых клеток. Установлено, что введение дигидрохинопимарового заместителя в положение C1 кольца Е метилового эфира дигидрохинопимаровой кислоты и бензиламинного фрагмента в C20 малеопимаровой кислоты приводят к получению соединений с выраженной цитотоксической активностью. Диэтоксифосфорилсодержащий эфир (XVII) и бензиламид (XIII) эффективно угнетали рост 7 и 19 клеточных линий пяти и восьми видов рака соответственно. Наиболее чувствительными к воздействию этих соединений оказались клетки NCI-H522 (немелкоклеточный рак легких) и LOX-IMVI (меланома).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтезированные производные могут быть рекомендованы для углубленного изучения и разработки на их основе перспективной группы препаратов цитотоксического действия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР получены с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Химия” и “Агидель” Уфимского федерального исследовательского центра РАН.

Авторы выражают благодарность Национальному институту рака США (National Cancer Institute, NCI) за определение цитотоксической активности *in vitro* соединений (I–XIX).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по теме государственного задания № 1021062311392-9-1.4.1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы ЕВТ и СРШ – подготовка и характеристика соединений. Автор ЕВТ – подготовка и финальное редактирование текста статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wiemann J., Al-Harrasi A., Csuk R. // Anticancer Agents Med. Chem. 2020. V. 20. P. 1756–1767. <https://doi.org/10.2174/187152062066200317110010>
2. Tretyakova E.V., Smirnova I.E., Kazakova O.B., Tolstikov G.A., Yavorskaya N.P., Golubeva I.S., Pugacheva R.B., Apryshko G.N., Poroikov V.V. // Bioorg. Med. Chem. 2014. V. 22. P. 6481–6489. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.030>
3. Ahmad B., Tian C., Tang J.-X., Dumbuya J.S., Li W., Lu J. // Front. Pharmacol. 2024. V. 15. P. 1392203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1392203>
4. Hafez H., Osman S., Ebrahim H.Y., Hassan Z.A. // Molecules. 2022. V. 27. P. 293. <https://doi.org/10.3390/molecules27010293>
5. Liu X., Chen W., Liu Q., Dai J. // Onco Targets Ther. 2019. V. 12. P. 4825–4837. <https://doi.org/10.2147/OTT.S199161>
6. Xu Y., Tong Y., Lei Z., Zhu J., Wan L. // Biomed. Pharmacother. 2023. V. 158. P. 114154. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114154>
7. Lin C.H., Chuang H.S. // Patent US7015248B2, published 01.04.2004.
8. Tanaka R., Tokuda H., Ezaki Y. // Phytomedicine. 2008. V. 15. P. 985–992. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.02.020>
9. Yoshida N., Takada T., Yamamura Y., Adachi I., Suzuki H., Kawakami J. // Drug Metab. Dispos. 2008. V. 36. P. 1206–1211. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019513>
10. Hsieh Y.S., Yang S.F., Hsieh Y.H., Hung C. H., Chu S.C., Yang S.H., Chen P.N. // Am. J. Chin. Med. 2015. V. 43. P. 1697–1714. <https://doi.org/10.1142/S0192415X15500962>
11. Kazakova O.B., Smirnova I.E., Do Tkhi Tkhu Kh, Tkhanh Tra Nguen, Apryshko G.N., Zhukova O.S., Medvedeva N.I., Nazyrov T.I., Tret'yakova E.V., Chudov I.V., Ismagilova A.F., Suponitskii K.Iu., Kazakov D.V., Safarov F.E., Tolstikov G.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 202–210. <https://doi.org/10.1134/s1068162013020088>
12. Tret'yakova E.V., Zakirova G.F., Salimova E.V., Kukovinets O.S., Odinokov V.N., Parfenova L.V. // Med. Chem. Res. 2018. V. 27. P. 2199–2213. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-2227-4>
13. Smirnova A.A., Zakirova L.M., Smirnova I.E., Tretyakova E.V. // Molbank. 2023. V. 2023. P. M1707. <https://doi.org/10.3390/M1707>

14. *Tretyakova E.V., Salimova E.V., Parfenova L.V., Yunusbaeva M.M., Dzhemileva L.U., D'yakonov V.V., Dzhemilev U.M.* // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2019. V. 19. P. 1172–1183.
<https://doi.org/10.2174/1871520619666190404100846>
15. *Tretyakova E.V., Salimova E.V., Parfenova L.V.* // *Nat. Prod. Res.* 2020. V. 36. P. 79–86.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1762187>
16. *Tretyakova E., Heise N.V., Csuk R., Kazakova O.* // *Nat. Prod. Res.* 2023. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2266107>
17. *Smirnova I.E., Tretyakova E.V., Baev D.S., Kazakova O.B.* // *Nat. Prod. Res.* 2023. V. 37. P. 313–321.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1969566>
18. *Zielonka J., Josep J., Sikora A., Hardy M., Ouari O., Vasquez-Vivar J., Cheng G., Lopez M., Kalyanaraman B.* // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. P. 10043–10120.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>
19. *Chrobak E., Bębenek E., Kadela-Tomanek M., Latocha M., Jelsch C., Wenger E., Boryczka S.* // *Molecules.* 2016. V. 21. P. 1123.
<https://doi.org/10.3390/molecules21091123>
20. *Abdou W.M., Shaddy A.A.* // *Arkivoc.* 2009. P. 143–182.
<https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0010.910>
21. *Spivak A.Y., Nedopekina D.A., Shakurova E.R., Khalitova R.R., Gubaidullin R.R., Odinokov V.N., Dzhemilev U.M., Bel'skii Y.P., Bel'skaya N.V., Stankevich S.A., Korotkaya E.V., Khazanov V.A.* // *Russ. Chem. Bull.* 2013. V. 62. P. 188–198.
<https://doi.org/10.1007/s11172-013-0028-y>
22. *Спивак А.Ю., Халимова Р.Р., Шакурова Э.Р., Недопекина Д.А., Губайдуллин Р.Р., Одиноков В.Н., Джемилев У.М., Бельский Ю.П., Бельская Н.В., Станкевич С.А., Хазанов В.А.* // *Патент RU2551647C2*, опубл. 27.05.2015.
23. *Кайзер Д., Спивак А.Ю., Недопекина Д.А., Губайдуллин Р.Р., Одиноков В.Н., Джемилев У.М., Бельский Ю.П., Бельская Н.В., Станкевич С.А., Хазанов В.А.* // *Патент RU2576658C2*, опубл. 10.03.2016.
24. *Shinkareva A.M., Nemtarev A.V., Chachkov D.V., Dobrynnin A.B., Litvinov I.A., Mironov V.F.* // *Mend. Commun.* 2024. V. 34. P. 113–115.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2024.01.034>
25. *Smirnova I.E., Tretyakova E.V., Flekhter O.B., Spirikhin L.V., Galin F.Z., Tolstikov G.A., Starikova Z.A., Korlyukov A.A.* // *Russ. J. Org. Chem.* 2008. V. 44. P. 1598–1605.
<https://doi.org/10.1134/S1070428008110055>
26. *Vafina G.F., Khanova M.D., Meshcheryakova S.A., Bulgakov A.K.* // *Chem. Nat. Compd.* 2019. V. 55. P. 868–870.
<https://doi.org/10.1007/s10600-019-02835-z>
27. *NCI-60 Screening Methodology* // National Cancer Institute. Developmental Therapeutics Program.
https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm
28. *Grever M.R., Schepartz S.A., Chabner B.A.* // *Semin. Oncol.* 1992. V. 19. P. 622–638.
29. *Boyd M.R., Paull K.D.* // *Drug Dev. Res.* 1995. V. 34. P. 91–109.
<https://doi.org/10.1002/ddr.430340203>
30. *Shoemaker R.H.* // *Nature Rev.* 2006. V. 6. P. 813–823.
<https://doi.org/10.1038/nrc1951>

Synthesis and Cytotoxic Activity Evaluation of Maleopimaric and Dihydroquinopimaric Esters and Amides

E. V. Tretyakova*, # and S. R. Sharafutdinova*, **

E-mail: tretyakovaev@gmail.com

* *Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
prosp. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Russia*

** *Ufa University of Science and Technology, Ufa, ul. Zaki Validi 32, 450076 Russia*

The new 1-, 1,4- and 1,4,20-diethoxyphosphoryl-containing esters were synthesized as a result of interaction of dihydroquinopimaric acid methyl ester hydroxyl derivatives with diethylchlorophosphite. A study of the cytotoxic activity *in vitro* on 60 cell lines of nine different human tumors of methyl ester of dihydroquinopimaric acid with diethoxyphosphoryl, furan and indole fragments, as well as diterpene amides with linear, heterocyclic and aromatic amines residues showed that diethoxyphosphoryl and benzylamine substituents are of key importance for the manifestation of the cytotoxic effect. Diethoxyphosphoryl derivatives (**XIX**) and (**XVII**), and benzylamide (**IX**) showed cytotoxic activity against one, seven and four cell lines of breast cancer, leukemia, non-small cell lung cancer, melanoma and prostate cancer, respectively. The greatest activity was demonstrated by maleopimaric acid benzylamide (**XIII**), which effectively inhibited the growth of 19 cell lines of eight cancer types and had a significant cytotoxic effect against all studied leukemia cell lines.

Keywords: *abietane diterpenoids, dihydroquinopimaric acid, maleopimaric acid, esters, amides, phosphorylation, cytotoxic activity*



УДК 577.113.(4+7)

АДАПТАЦИЯ ПРОТОКОЛА АВТОМАТИЧЕСКОГО ТВЕРДОФАЗНОГО ФОСФИТАМИДНОГО СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИХ *N*-НЕЗАМЕЩЕННЫХ АМИДОФОСФАТНЫХ АНАЛОГОВ (P-NH₂)¹

© 2024 г. Е. А. Малова*, #, И. А. Пышная*, #, М. И. Мещанинова*, Д. В. Пышный*

* ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” Сибирского отделения РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 04.03.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Предложен новый подход к автоматизированному синтезу *N*-незамещенных амидофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов (P-NH₂), основанный на оптимизированном протоколе твердофазного фосфитамидного синтеза с использованием реакции Штаудингера. Показано быстрое и эффективное окисление модельных P^(III)-содержащих фосфиттриэфиров органическим азидом – (9-флуоренил)-метоксикарбонилазидом (FmocN₃) – до соответствующих фосфамидов –(OPO(OR)(NFmoc))–, где R – остатки нуклеозидной или алкильной природы. Удаление щелочелабильной флуоронильной группы с модифицированного межнуклеозидного звена позволяет получать в цепи олигонуклеотида электронейтральные (при физиологических условиях pH ~ 7) *N*-незамещенные амидофосфатные остатки (–(OPO(O)(NH₂))– или (P-NH₂)) вместо классических отрицательно заряженных фосфодиэфиров (–(OPO(O)(O[–]))– или (P-O[–])). При оптимизации синтетического протокола продемонстрировано, что для повышения эффективности синтеза P-NH₂-олигонуклеотидов (до ~80% на модифицированное звено) необходимо включение в протокол автоматического синтеза дополнительной стадии отщепления Fmoc-группы после проведения каждой стадии окисления растущей цепи олигомера по реакции Штаудингера. Показано практически полное отсутствие зависимости выхода P-NH₂-олигонуклеотидов как от локализации P-NH₂-звена в цепи, так и от типа модифицируемого динуклеотидного фрагмента. Получен набор моно- и бис-модифицированных октадезоксирибонуклеотидов и проведено детальное исследование термической стабильности комплементарных ДНК/ДНК-комплексов в различных буферных условиях. Показано, что в условиях высокой ионной силы раствора (1 M NaCl, pH 7.2) введение одного P-NH₂-звена снижает термостабильность комплекса ДНК в среднем на 1.3°C. При уменьшении ионной силы раствора дестабилизирующий эффект P-NH₂-модификации достоверно снижается, что дополнительное подтверждает электронейтральный статус вводимого амидофосфатного звена. Таким образом, нами разработан протокол получения частично модифицированных производных олигонуклеотидов, несущих незаряженные, но изоструктурные к нативным P-O-звеньям амидофосфатные остатки P-NH₂.

Ключевые слова: амидофосфатные производные олигодезоксирибонуклеотидов, автоматический синтез, реакция Штаудингера, оптимизация протокола синтеза

DOI: 10.31857/S0132342324060065, **EDN:** NFNVA

ВВЕДЕНИЕ

Основу всех известных на данный момент в биологии систем хранения и передачи генетической информации составляют биополимеры на основе

рибофуранозных нуклеиновых кислот (НК) – ДНК и РНК. Функциональные свойства этих биополимеров уникальны, к ним относятся, в частности, химическая стабильность фосфатных эфиров и ди-

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342324060065 для авторизованных пользователей. Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты; FmocN₃ – (9-флуоренил)-метоксикарбонилазид; ON – олигонуклеотид; PMO – морфолиновые олигонуклеотиды; PNA – пептидо-нуклеиновые кислоты; PGO – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды; P-NH₂ – *N*-незамещенные амидофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов.

Автор для связи: (+7 (383) 363-51-36; эл. почта: malova.ev.an@gmail.com, pyshnaya@niboch.nsc.ru).

эфиров [1] и доминирующее влияние полианионного фосфодиэфирного скелета на физико-химические свойства НК. Полианионный характер остава НК позволяет облегчить считывание информации путем стабилизации линейной протяженной конформации за счет отталкивания заряда, а также снимает ограничения растворимости, которые накладываются объемной структурой азотистых оснований [2].

С развитием химического синтеза фрагментов нуклеиновых кислот – олигонуклеотидов (ОН) – обозначилось их фундаментальное и практическое приложение. Так, например, был предложен антисмысловой подход [3], позволяющий воздействовать на биосинтез белка посредством ингибирования трансляции мРНК за счет комплементарных взаимодействий с РНК-мишениями. Одни из основных препятствий к широкому использованию олигонуклеотидов с природными фосфодиэфирными связями *in vivo* – деградация олигонуклеотидов в присутствии нуклеаз и низкая эффективность внутриклеточного проникновения. Для снятия описанных ограничений проводятся исследования по разработке модифицированных олигонуклеотидов и их аналогов.

Известно много способов и подходов к изменению физико-химических свойств олигонуклеотидов, в том числе синтез аналогов НК с незаряженным оставом, таких как морфолиновые (PMO) и пептидонуклеиновые кислоты (PNA), алкилфосфонаты, фосфорилганидиновые (PGO) и другие *N*-замещенные амидофосфатные аналоги, а также *N*-незамещенные амилофосфаты (P-NH₂) [4–7]. На основе ряда незаряженных аналогов созданы и одобрены терапевтические препараты для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (EXONDYS 51®, 2016; VYONDYS 53®, 2019; VILTEPSO®, 2020; AMONDYS 45®, 2021) [8, 9]. Незаряженные аналоги объединены репрезентативными свойствами – их устойчивостью к действию нуклеаз [10–13], способностью образовывать комплементарные комплексы с природными НК-мишениями [14–16], в особенности PGO гибридизуются даже в условиях с крайне низкой ионной силой растворов, что нереализуемо для природных ON [17]. Как правило, незаряженные последовательности ON характеризуются ограниченной растворимостью в водных растворах [18] и сложностью синтеза некоторых из их представителей [19–21]. В частности, синтез PMO и алкилфосфонатов подразумевает использование дорогостоящих специфических мономеров [22]. В случае PNA вовсе требуется наработка абсолютно неспецифических

для нуклеотидной химии аминокислотоподобных мономеров [23]. В этой связи следует отметить, что совместить получение незаряженных аналогов ON со стандартным автоматическим твердофазным амилофосфитным подходом к синтезу олигонуклеотидов, внедряя минимальное количество изменений, удается не всегда. Только при синтезе PGO-аналогов удалось создать подход, наиболее приближенный к стандартным условиям получения олигонуклеотидов [7, 24], поскольку этот способ реализован на основе использования классических общедоступных мономеров и базируется на использовании методики альтернативного окисления атома Р(III) по реакции Штаудингера, что совмещено с протоколом автоматического синтеза ON. Потенциал применимости PGO в области молекулярной диагностики и биомедицины уже убедительно продемонстрирован [25–32].

В ряду вышеописанных электронейтральных ON стоит обратить особое внимание на *N*-незамещенные амилофосфатные олигодезоксирибонуклеотиды (или P-NH₂-аналоги). В отличие от ранее описанных аналогов, P-NH₂ практически изоструктурны природным нуклеиновым кислотам (в первом приближении имея ту же молекулярную массу), но в то же время электронейтральны, благодаря чему сильно отличаются по свойствам от нативных олигонуклеотидов. Впервые их синтез был описан в 1986 г. [33] на примере получения динуклеотида T*T, где звездочкой указано месторасположение модифицированного амилофосфатного звена. В рамках предложенного подхода проводили окислительное амидирование дизэфирного Н-фосфонатного звена раствором аммиака (10%) в CCl₄. После долгого перерыва интерес к их синтезу вновь возник в 1996–1997 гг. [13, 34–39] параллельно у двух независимых групп под руководством Р. Айера и Б. Ренера. В рамках первых работ обозначилась проблема гидролиза при щелочном деблокировании, которую решали, применяя различные стратегии защиты мономеров, пригодные для удаления безводными аммиачными смесями [13, 34]. Кардинальных изменений в способах введения P-NH₂-модификации в углеводофосфатный остав не производили, основным подходом по-прежнему оставалось окислительное амидирование. Однако в 1997 г. группой Б. Ренера был представлен иной подход, основанный на окислении ОМе-фосфиттриэфирного звена растущей цепи ON по реакции Михаэлиса–Арбузова под действием иода и 2-нитробензиламина с последующим фотолитическим отщеплением 2-нитробензильного

остатка [36]. Указанные выше исследовательские группы смогли провести предварительные физико-химические и молекулярно-биологические исследования, в рамках которых показали перспективность *N*-незамещенных амидофосфатных ($\text{P}-\text{NH}_2$) аналогов в качестве антисмыловых олигонуклеотидов [35, 37–39]. Позднее, в 2014 г., группа под руководством Д.В. Пышного продемонстрировала подход к синтезу амидофосфатных аналогов с использованием алкил- и арилазидов [40]. На том этапе подход имел ограниченную совместимость этапа окисления выбранными азидами с протоколом стандартного автоматического синтеза ON. Неугасающий интерес к эффективному синтезу $\text{P}-\text{NH}_2$ продемонстрировала группа М. Карузерса [41], когда в 2015 г. они предложили новый метод постсинтетической модификации боранфосфонатных олигодезоксинуклеотидов посредством иод-зависимого замещения при атоме фосфора с целью получения $\text{P}-\text{NH}_2$ -аналогов. Основное ограничение данного подхода – необходимость использования для синтеза ON неканонических, коммерчески не доступных амидофосфитных мономеров. Таким образом, синтез *N*-незамещенных амидофосфатных аналогов по представленным схемам неоправданно дорогостоящий для различных групп разработчиков биологически активных соединений на основе ON.

Целью данного исследования было детальное изучение отдельных подходов к разработке унифицированного способа автоматического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих *N*-незамещенные амидофосфатные остатки – $(\text{OPO}(\text{O})(\text{NH}_2))$ – ($\text{P}-\text{NH}_2$) вместо межнуклеозидных фосфатных остатков – $(\text{OPO}(\text{O})(\text{O}^-))$ – (PO). Создаваемый подход должен позволять вводить модификации в различные положения олигонуклеотидной цепи и должен быть совместим с использованием стандартных, коммерчески доступных амидофосфитных мономеров и твердофазных носителей на основе СРГ. В рамках такого подхода предшественником $\text{P}-\text{NH}_2$ -модификации может выступить органический азид, способный эффективно окислять промежуточный продукт олигонуклеотидного синтеза – фосфиттриэфир – и нести группировки, удаляемые при деблокировании целевого олигомера.

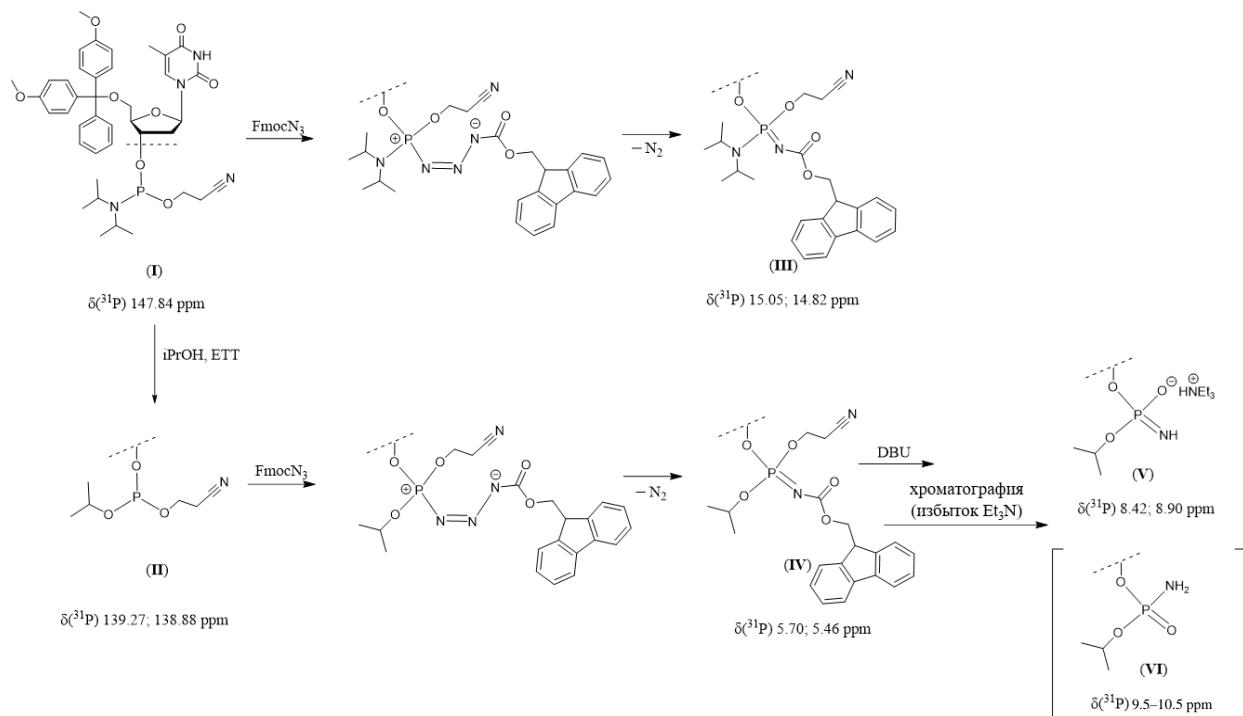
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в ряде работ [24, 42–44] была неоднократно показана применимость реакции Штадингера для получения *N*-замещенных амидофосфатных ON в рамках стандартного ами-

фосфитного твердофазного синтеза ON. При таком подходе фосфиттриэфир $\text{P}^{(\text{III})}$, образующийся на этапе конденсации амидофосфита и 5'-ОН-компоненты при наращивании ON-цепи, окисляется до иминофосфорана $\text{P}^{(\text{V})}$ при обработке органическим азидом. В данной работе мы также постарались оптимизировать использование окисления по классической схеме Штадингера для осуществления автоматического синтеза *N*-незамещенных амидофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов. Для окисления $\text{P}^{(\text{III})}$ до $\text{P}^{(\text{V})}$ в ходе реакции Штадингера в качестве азидного компонента был выбран (9-флуоренил)-метоксикарбонилазид (FmocN_3). Соответствующий азид был получен из коммерчески доступного хлорформата (FmocCl) по методу, аналогичному описанному в работе [45]. Азид получен с высоким выходом и охарактеризован методами ^1H -ЯМР- и ИК-спектроскопии (рис. S1 и S2 в дополнительных материалах). Важно отметить, что Fmoc -группа относится к разряду щелочелабильных защитных остатков [45], что дает основание предполагать ее функциональную стабильность в рамках синтетического цикла при автоматическом синтезе ON.

На первом этапе исследования мы доказали (схема 1), что выбранный нами азид (FmocN_3) быстро реагирует как с 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'-[$(\beta$ -цианэтил)-(*N,N*-диизопропил)]амидофосфитом (**I**), так и с 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'-[$(\beta$ -цианэтил)-изопропил]фосфиттриэфиром (**II**). По данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, соединения (**I**) и (**II**) менее чем за 5 мин после добавления FmocN_3 превращаются в соответствующие иминофосфораны (**III**) и (**IV**), что можно было ожидать из работы М.А. Баженова с соавт. [46]. Следует отметить, что взаимодействие органического азида (FmocN_3) с указанными $\text{P}^{(\text{III})}$ -содержащими соединениями фосфора протекало, как и ожидалось, с интенсивным выделением газа – молекулярного азота.

Реакции FmocN_3 с амилофосфитом и фосфиттриэфиром проводили непосредственно в ампулах ЯМР. Образование соединений (**III**) и (**IV**) регистрировали по ядрам $[^{31}\text{P}]$ без последующего выделения соответствующих продуктов в индивидуальном состоянии. По данным ЯМР-спектроскопии, переход от $\text{P}^{(\text{III})}$ -содержащих соединений, характеризуемых химическими сдвигами ~ 139 – 148 м.д., к $\text{P}^{(\text{V})}$ -содержащим аддуктам (химический сдвиг ~ 5.5 – 15.1 м.д.) регистрируется практически сразу после контакта FmocN_3 с источником трехвалентного фосфора. Таким образом, было доказано, что выбранный реагент FmocN_3 , при



используемых избытках (1 : 1.8 экв.) способен количественно окислять $\text{P}^{(\text{III})}$ -атом фосфора в составе соединений (I) и (II).

Обработка амидофосфата (IV) сильным основанием 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-еном (DBU) должна была привести к получению изопропильного P-NH_2 -производного тимидилата (VI) (ожидаемый амидофосфат). К удивлению, химический сдвиг атома ^{31}P -фосфора, зарегистрированный для хроматографически чистого $\text{DMTr-2'-дезокситимидин-3'-изопропиламинофосфата}$ (V) (в форме смеси R_p - и S_p -диастереомеров), составил значения, равные 8.4 и 8.9 м.д. По данным работ [41, 47], для атома фосфора в составе P-NH_2 -модификации в цепи олигонуклеотида должны были бы регистрироваться значения химических сдвигов в диапазоне 9.5–10.5 м.д. (в зависимости от растворителя), что соответствует, по мнению авторов указанных работ, именно электронейтральной форме амилофосфатного звена. Позднее, получив T^*T_5 -олигонуклеотид (здесь и далее по тексту звездочкой указано месторасположение амилофосфатного звена, имеющего структуру $-(\text{OPO(O)(NH}_2))$ – или $-(\text{OPO(O)(NFmoc)})$ –, при необходимости уточнения приводятся сокращенные обозначения, например, $\text{T}(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-\text{T})$ или $\text{T}(-\text{P}^{(\text{V})}=\text{N-Fmoc}-\text{T})$, мы

зарегистрировали химический сдвиг атома фосфора в составе амилофосфатного остатка, равный 11.8 м.д. (рис. S3 в дополнительных материалах), что соответствует ранее опубликованным данным [41, 47]. Мы считаем, что ожидаемый амилофосфат $-(\text{OPO(O)(NH}_2))$ – (VI) (схема 1), после хроматографического выделения в присутствии избытка триэтиламина $((\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N})$, должен преимущественно находиться в виде стабильной ионизированной имидофосфатной формы $-(\text{OPO(N=H)(O}^-)(\text{Et}_3\text{NH}^+))$ – (V). Этот факт подтверждается тем, что соединение (V) по данным ESI-MS-анализа (рис. 1) таковым и является, т.е. представляет собой солевую форму амилофосфата. Полученные данные хорошо согласуются с результатами работы [48], в которой показано, что амилофосфаты проявляют свойства слабых кислот ($\text{pK}_a \sim 8.2$).

Важно отметить еще раз, что воздействие FmocN_3 с $\text{P}^{(\text{III})}$ -содержащими соединениями позволяет практически количественно получать соответствующие $\text{P}^{(\text{V})}$ -содержащие аддукты. Таким образом, нами показано, что органический азид (в данном случае FmocN_3) потенциально пригоден для автоматического синтеза P-NH_2 -модифицированных олигомеров, т.к. может обеспечить быстрое, в течение нескольких минут, окис-

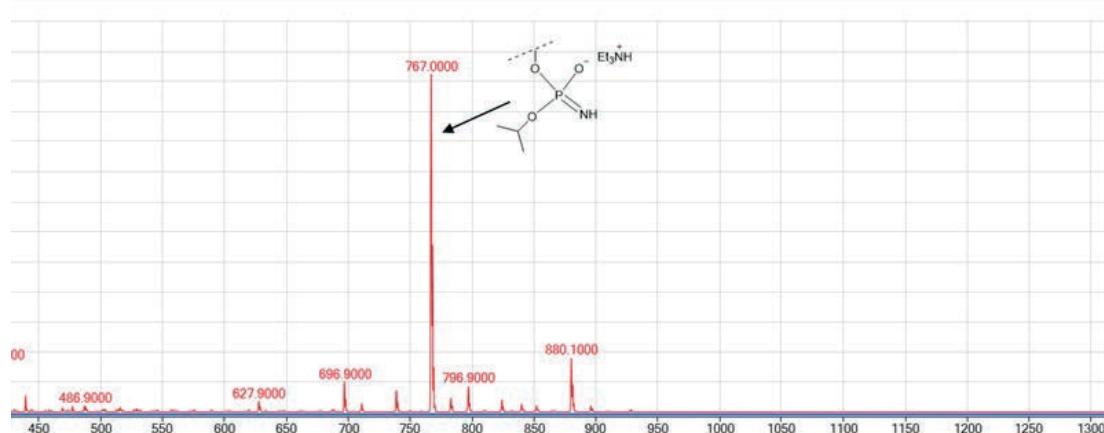


Рис. 1. ESI-MS-анализ соединения (V) (схема 1) в режиме регистрации положительных ионов.

ление фосфитов до Fmoc-содержащего амидофосфата (IV).

Далее мы апробировали реакцию окисления $P^{(III)}$ до $P^{(V)}$ с помощью $FmocN_3$ в формате автоматического ДНК-синтеза, используя стандартные коммерчески доступные 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'-[$(\beta$ -цианэтил)-(N,N -дизопропил)]-фосфитамиды и твердофазный носитель (CPG), содержащий стандартный сукцинатный линкер. Включение $P-NH_2$ -модификации в состав растущего ON первоначально проводили, синтезируя модельный гексатимиидилат по протоколу, разработанному для синтеза фосфорилгуанидиновых аналогов [32].

На первом этапе провели синтез модельных гексатимиидилатов с одной (T^*T_5) и двумя ($T^*T^*T_4$) подряд $P-NH_2$ -модификациями вблизи 5'-конца цепи олигонуклеотида. Ожидалось, что на этапе краткосрочного (30 мин, 56°C) финального деблокирования олиготимиидилатных производных и отделения от твердофазного носителя концентрированным водным раствором аммиака [49] также должно происходить и удаление Fmoc-защитной группы с $P^{(V)}=N$ -Fmoc-модифицированного иминофосфоранового межнуклеозидного звена, что приводит к формированию N -незамещенного амидофосфатного олигодезоксирибонуклеотида. Однако по данным электрофоретического анализа в денатурирующем ПААГ и ОФ-ВЭЖХ (рис. S3 в дополнительных материалах) целевой продукт удалось получить только для мономодифицированного T^*T_5 гексатимиидилата со степенью превращения не более 35% (рис. S4 в дополнительных материалах, дорожка 2). Такой результат можно было ожидать, опираясь на данные работы относительно стабильности целевого N -незамещенного амидофосфата

в условиях аммонолиза [33]. Однако не следует исключать, что $P^{(V)}=N$ -Fmoc-производное может гидролизоваться и до удаления защитной группы [50].

С целью максимального смягчения условий щелочного деблокирования удаление цианэтильных защитных групп проводили в безводных условиях 50%-ным Et_3N в CH_3CN с последующим отщеплением ON от твердофазного носителя концентрированным водным аммиаком (30 мин, 25°C), финальное удаление DMTr-группы проводили 80%-ной уксусной кислотой после отщепления от полимерного носителя. Поскольку возможной причиной низкой конверсии в целевой продукт могло выступать неполное окисление $P^{(III)}$ на этапе реализации реакции Штайдингера в условиях твердофазного синтеза ON, была проанализирована эффективность получения гексатимиидилата T^*T_5 как в условиях дискретного возрастания концентрации окислителя $FmocN_3$ с 0.1 до 0.25 M, так и варьируя продолжительность этого технологического этапа – 15, 30 и 45 мин. В составе реакционных смесей, отнесенных по совокупности данных масс-спектрометрического (рис. S5 в дополнительных материалах) и хроматографического анализов, идентифицированы нативные пента- и гексатимиидилаты (T_5 и T_6) и целевой N -незамещенный продукт, T^*T_5 (рис. 2, фракции 1, 2 и 3 соответственно). Кроме того, анализ показал, что при использовании краткосрочной схемы аммонолиза концентрированным водным аммиаком (30 мин, 25°C) исчерпывающего удаления Fmoc-защиты не происходит (рис. 2, фракция 4). Стоит особенно отметить, что данный Fmoc-содержащий амидофосфат, несущий модифицированное фосфородиэфирное звено, аналогично таковому в соединении

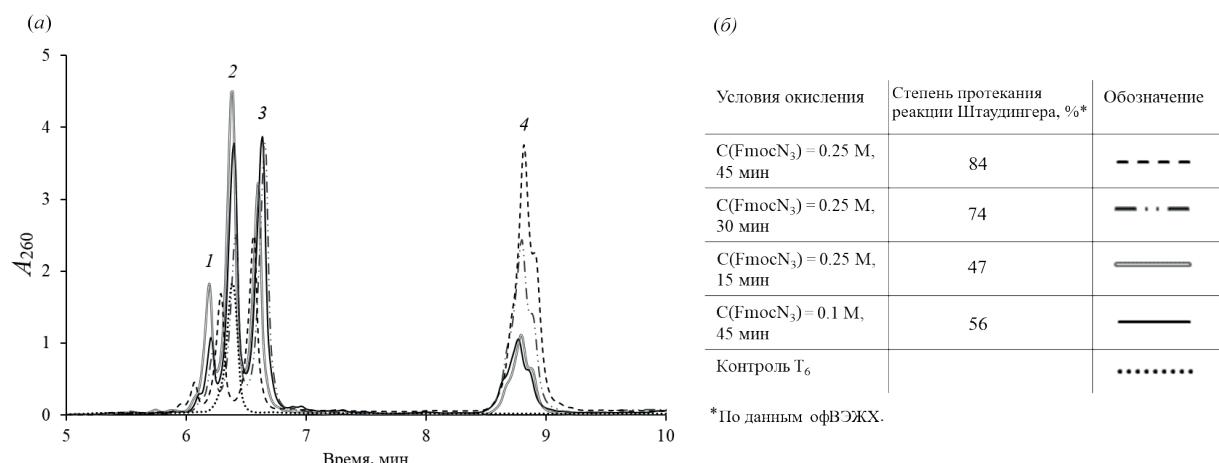


Рис. 2. (а) – оффВЭЖХ-анализ реакционных смесей гексатимилилатов (T^*T_5), полученных в разных условиях окисления по реакции Штаудингера и обработанных концентрированным водным аммиаком в течение 30 мин при 25°C. Градиент концентрации ацетонитрила 0–30% за 15 мин. Соотнесение пиков проводили по совокупности данных масс-спектрометрического анализа (рис. S4 в дополнительных материалах) и сравнения с контрольным олигонуклеотидом T_6 : пик 1 – T_5 , пик 2 – T_6 , пик 3 – $T(-P(V)-NH_2)-T_5$, пик 4 – $T(-P(V)=N-Fmoc)-T_5$; (б) – условия окисления и степень протекания реакции Штаудингера без учета степени деструкции модифицированного звена, полученные как отношение суммы интегральных площадей пиков 3 и 4 к сумме интегральных площадей всех компонентов реакционной смеси (по данным оффВЭЖХ).

(IV) (схема 1), по-видимому, неустойчив в условиях электроспрей-ионизации. По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа (рис. S6 в дополнительных материалах), хроматографически чистая фракция 4 (рис. 2) имеет в своем составе как гидрофобный защищенный гексатимилилат $T(-P(V)=N-Fmoc)-T_5$, так и значительно более гидрофильный (фракция 3) целевой мономодифицированный продукт, т.е. $T(-P(V)-NH_2)-T_5$. Результаты эксперимента четко указывают на то, что увеличение концентрации азива на этапе окисления и увеличение длительности данного этапа значительно повышают выход модифицированного $P-NH_2$ -аналога. Важно отметить, что нам удалось, повысив концентрацию окислителя и время обработки $FmocN_3$, достичь более чем 80%-ной суммарной конверсии в олигомер T^*T_5 , по данным оффВЭЖХ, даже при использовании классического аммонолиза на финальном этапе синтеза ON.

Таблица 1. Стартовый протокол для синтеза модельных гексатимилилат-*N*-незамещенных амидофосфатных олигонуклеотидов в рамках амидофосфитного твердофазного метода синтеза, разработанный по аналогии с протоколом для синтеза фосфорилгидиновых олигонуклеотидов [32]

Стадия	Реагент и условия	Время
Детритилирование	3%-ная трихлоруксусная кислота в CH_2Cl_2	172 с
Конденсация	0.07 М амидофосфит, 0.25 М 5-этилтио-1 <i>H</i> -тетразол в CH_3CN	151 с
Кэпирование	CapA (15% $(CH_3CH_2CO)_2O$ в ТГФ) CapB (13% 1-MeIm, 13% Py в ТГФ)	109 с
Окисление или окисление по Штаудингеру	0.02 М I_2 , 1% Py, 9% H_2O в ТГФ 0.1 М $FmocN_3$ в CH_3CN	27 с 1800 с
Деблокирование	Концентрированный $NH_3 \cdot H_2O$	1–48 ч

ным временем окисления по реакции Штадингера до 45 мин, дополнительно обработали концентрированным водным аммиаком в течение 24 ч и метанольно-аммиачной смесью в течение 24 ч соответственно (рис. 3, дорожки 6 и 7 соответст-

венно). Электрофоретический анализ показал высокую степень гидролиза модифицированных звеньев в случае обработки реакционной смеси концентрированным водным аммиаком; напротив, обработка метанольно-аммиачной смесью не привела к значительной деструкции амидофосфатных групп.

Полученный результат позволяет обоснованно считать, что связь $P-NH_2$ стабильна при обработке метанольно-аммиачной смесью, что подтверждается результатами работы [13]. Однако выбранный подход к удалению защитных групп не позволяет полностью удалить Fmoc-группу за 24 ч, в связи с чем было принято решение использовать предшествующее аммонолизу отщепление Fmoc-защиты обработкой раствором сильного основания (DBU) без отщепления от полимерного носителя согласно работе [34]. На следующем этапе работы мы провели синтез T^*T_5 с дополнительной обработкой DBU в ацетонитриле перед аммонолизом. В результате электрофоретического разделения реакционной смеси выявлено отсутствие модифицированного олигонуклеотида в ее составе (рис. 3, дорожка 4). Учитывая ранее показанную устойчивость $P-NH_2$ -связи к деблокированию в метанольно-аммиачной смеси и к обработке DBU в безводных условиях, причиной отсутствия целевого соединения в реакционной смеси сочли гидролиз $(-P^{(V)}=N-Fmoc-)$ -фрагмента на стадии детритилирования трихлоруксусной кислотой. Предполагаемый механизм включает в себя протонирование сложноэфирной группы Fmoc-фрагмента с последующей локализацией положительного заряда на атоме фосфора и нуклеофильной атакой молекулой воды (схема 2). Присутствие воды на стадии детритилирования полностью исключить невозможно, поскольку в синтетическом цикле присутствует вода в составе иод-содержащего окислителя.

Во избежание гидролиза Fmoc-защищенного олигонуклеотида в кислых условиях в протокол синтеза ввели стадию отщепления защитных групп у амидофосфатного звена обработкой DBU, и, таким образом, в синтетическом цикле стадии детритилирования предшествует стадия

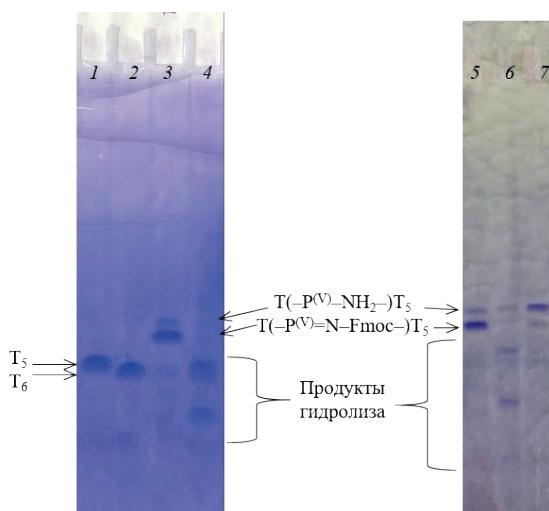


Рис. 3. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях (8 М мочевина, 89 mM Tris-богатый буфер, pH 8.3) реакционных смесей олигонуклеотидов T^*T_5 , полученных по протоколу, описанному в табл. 1, с использованием 0.25 M раствора $FmocN_3$ и продолжительностью окисления по реакции Штадингера 45 мин в зависимости от последовательной постсинтетической обработки: 1, 2 – контрольные T_5 и T_6 соответственно; 3, 5 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80%-ная уксусная кислота, 10 мин); 4 – детритилирование на CPG (3%-ная трихлоруксусная кислота в CH_2Cl_2 , 2 мин), удаление Fmoc-группы на CPG (2%-ный раствор DBU в ацетонитриле, 5 мин), аммонолиз (метанольно-аммиачная смесь, 2 ч); 6 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80%-ная уксусная кислота, 10 мин), дополнительный аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 24 ч); 7 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80%-ная уксусная кислота, 10 мин), дополнительный аммонолиз (метанольно-аммиачная смесь, 24 ч). Отнесение основных пятен произведено по данным ESI-MS-анализа после выделения оффВЭЖХ (рис. S5 в дополнительных материалах).

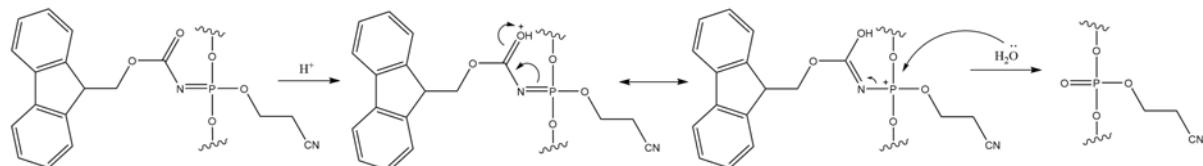


Схема 2. Предполагаемый механизм гидролиза Fmoc-содержащего фрагмента на стадии детритилирования трихлоруксусной кислотой во время синтеза $P-NH_2$ -олигонуклеотидов.

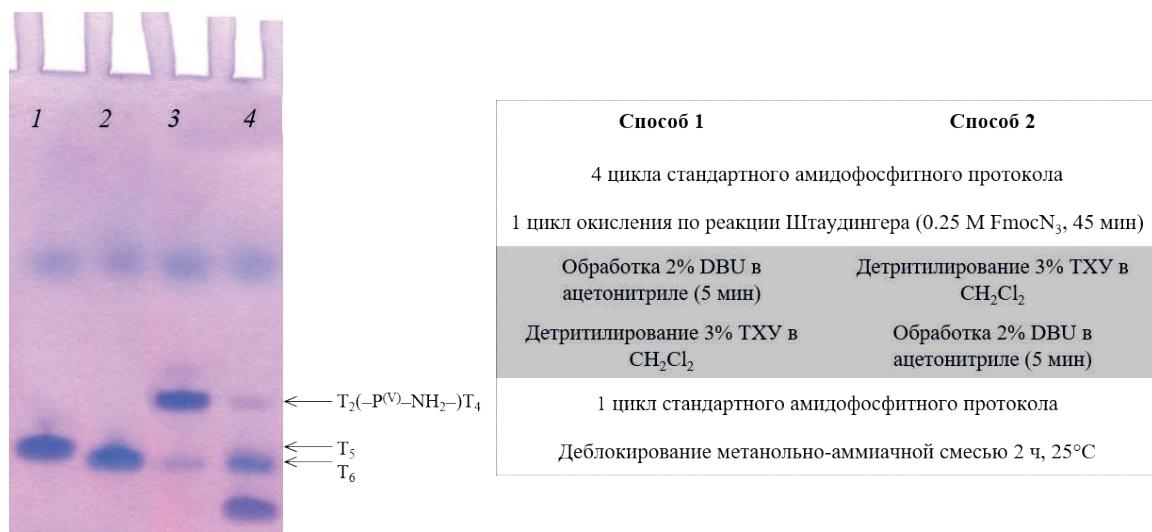


Рис. 4. ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях (8 М мочевина, 89 mM Tris-боратный буфер, pH 8.3) реакционных смесей: 1 и 2 – контрольные олигонуклеотиды T₅ и T₆ с природными фосфодиэфирными связями; 3 – T₂*T₄, полученный по способу 1; 4 – T₂(-P(V)-NH₂)-T₄, полученный по способу 2.

отщепления Fmoc- и β -цианэтильной групп с образованием $(-\text{P}(\text{O})-\text{NH}_2-)$ -фрагмента. Внедрение дополнительной стадии в цикл синтеза первоначально проводили вне автоматического синтезатора, для чего извлекали CPG с Fmoc-содержащим олигонуклеотидом из реакционной колонки и обрабатывали в пробирке раствором DBU в ацетонитриле в течение 5 мин при комнатной температуре. Экспериментально показано (рис. 4, дорожка 3), что свободная $(-\text{P}(\text{V})-\text{NH}_2-)$ -связь устойчива к обработке трихлоруксусной кислотой и другими реагентами, используемым в синтетическом цикле.

Таким образом, внедрение дополнительной стадии отщепления защитных групп у модифицированного фосфата и использование мягкого щелочного деблокирования метанольно-аммиачной смесью позволило разработать протокол

синтеза P-NH₂-олигонуклеотидов с применением отечественного оборудования, например, ASM-800 (Биоссет, Россия), стандартных коммерчески доступных мономеров и полимерных носителей (табл. 2).

Следует отметить, что при однократной модификации конверсии в целевой продукт $>85\%$ нам добиться не удалось. Так, при синтезе олигомера T*T₅, по данным ВЭЖХ-анализа, наблюдается $\sim 13\%$ продуктов гидролиза после обработки CPG-связанного олигонуклеотида метанольно-аммиачной смесью в течение первых двух часов при комнатной температуре (рис. 5, точка 0; рис. S7 в дополнительных материалах, хроматография 0). Видно, что вплоть до 5 ч дополнительного выдерживания T*T₅ в среде NH₃/CH₃OH при 56°C значимой деградации амидофосфат-содержащего аналога не происходило. Лишь спустя сутки (56°C) уровень

Таблица 2. Протокол синтеза N-незамещенных амидофосфатных (P-NH₂) олигонуклеотидов в рамках амидофосфитного метода синтеза с использованием стандартных коммерчески доступных мономеров и полимерных носителей для отечественного ДНК/РНК-синтезатора ASM-800 (Биоссет, Россия)

Стадия	Реагент и условия	Время
Детритилирование	3%-ная трихлоруксусная кислота в CH ₂ Cl ₂	172 с
Конденсация	0.07 М амидофосфит, 0.25 М этилтиотетразол в CH ₃ CN	151 с
Кэпирование	CapA (15% (CH ₃ CH ₂ CO) ₂ O в ТГФ) CapB (13% 1-MeIm, 13% Py в ТГФ)	109 с
Окисление или окисление по Штаудингеру	0.02 М I ₂ , 1% Py, 9% H ₂ O в ТГФ 0.25 М FmocN ₃ в CH ₃ CN	27 с 2700 с
Удаление Fmoc-группы	2% DBU в CH ₃ CN	300 с
Деблокирование	Метанольно-аммиачная смесь	1–24 ч

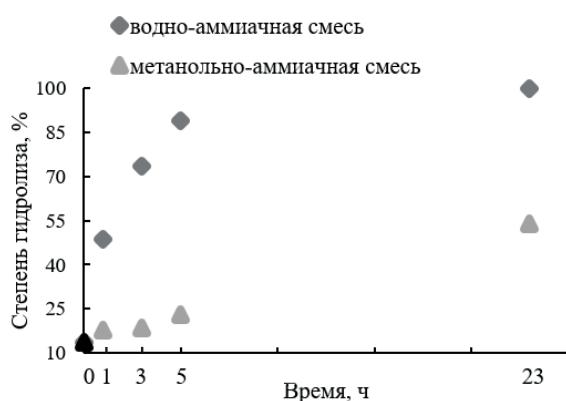


Рис. 5. Устойчивость $\text{P}-\text{NH}_2$ -олигонуклеотидов к деблокированию метанольно-аммиачной смесью по сравнению со стандартным удалением защитных групп с использованием концентрированного водного амиака, определенная по данным оФВЭЖХ.

деградации целевого продукта приближался к 50% (рис. 5, точка 23 ч; рис. S7 в дополнительных материалах, хроматография Б4). Напротив, в случае дополнительного выдерживания в среде $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ при 56°C спустя 1 ч заметна серьезная деградация амидофосфатной группы. Следует отметить, что в случае использования для синтеза олигомеров НК коммерчески доступных мономеров со стандартными защитными группами рекомендованное время деблокирования НК водно-аммиачной смесью не превышает 40 ч при комнатной температуре [52]. В случае использования метанольно-аммиачной смеси достаточно 18 ч при комнатной температуре, что было подтверждено экспериментально (рис. S8 в дополнительных материалах). Поскольку результат эксперимента демонстрирует устойчивость амидофосфатной группы к метанольно-аммиачной смеси на довольно продолжительном промежутке времени, “исходная” степень деструкции $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)$ -содержащего олигонуклеотида, полученная

после первых двух часов деблокирования при комнатной температуре и превышающая 10% по данным оФВЭЖХ, не может быть вызвана гидролизом модифицированного звена в ходе деблокирования.

Последующие эксперименты были направлены на выяснение других причин, влияющих на выход целевого N -незамещенного амидофосфатного олигонуклеотидного продукта. Для этого мы поставили задачи установить, зависит ли степень гидролиза амидофосфатной связи от следующих факторов:

- 1) места расположения одиночной $\text{P}-\text{NH}_2$ -модификации в цепи олигонуклеотида,
- 2) типа прилегающих к ней нуклеозидов,
- 3) стадии синтетического цикла.

1) Для оценки влияния места расположения модификации были синтезированы гексатимидилаты, содержащие одиночную $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)_2$ -группу в каждом из пяти межнуклеозидных положений (T_5^*T , T_4^*T_2 , T_3^*T_3 , T_2^*T_4 , T^*T_5). Данный прием должен был показать, является ли увеличение числа циклов синтеза нативных фосфодиэфирных звеньев, последовавших за введением $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)$ -остатков, фактором, определяющим степень гидролиза амидофосфатного фрагмента цепи ON. Было установлено, что вне зависимости от локализации в цепи одиночной амидофосфатной модификации конверсия в целевой гексатимидилатный продукт, по данным оФВЭЖХ, составляет в среднем 72%, т.е. не зависит от положения введения $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)$ -группы (табл. 3, фактор А).

2) Для ответа на вопрос, поставленный следующей задачей, мы провели синтез двух серий тетрамерных олигонуклеотидов, содержащих вблизи либо 5'-, либо 3'-конца цепи одиночную модификацию динуклеотидного звена $\text{X}(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)\text{T}$, где $\text{X} = \text{G}, \text{C}, \text{A}$ или T (табл. 3, фактор Б). Установлено,

Таблица 3. Степень полноты протекания реакции Штаудингера, оцененная по данным оФВЭЖХ, в зависимости от факторов, влияющих на устойчивость связи $(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-)$, таких как: 1 – число стандартных циклов амидофосфитного синтеза, следующих после стадии модификации; 2 – химическое строение динуклеотида в составе модифицированного звена

Фактор 1		Фактор 2			
Последовательность 5'→3'	Доля целевого ON, %	Последовательность 5'→3'	Доля целевого ON, %	Последовательность 5'→3'	Доля целевого ON, %
TTTT*T	79	G*TTT	60	TTG*T	70
TTTT*TT	73	C*TTT	64	TTC*T	69
TTT*TTT	73	A*TTT	48	TTA*T	69
TT*TTTT	64	T*TTT	74	TTT*T	75
T*TTTTT	72	–	–	–	–

что, по данным количественного анализа профилей ВЭЖХ, выход целевых P-NH_2 -аналогов составляет в среднем ~70%.

3) Для выявления стадии синтетического цикла, оказывающей превалирующее влияние на устойчивость ($-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2-$)-связи, был проведен скрининг стадий и условий получения T_5^*T . После стадии окисления промежуточного фосфит-триэфира олигонуклеотида раствором FmocN_3 (0.25 М) мы последовательно исключали все стадии технологического цикла (представлены на рис. S9 в дополнительных материалах), обрабатывая затем твердофазный носитель метанольно-аммиачной смесью и оценивая состав реакционных смесей методом оффВЭЖХ. На первом этапе выявить основную стадию, в ходе которой бы наблюдалось значимое уменьшение конверсии, не удалось из-за сравнительно малого количества побочных продуктов. Анализируя состав побочных продуктов, первым делом мы решили исключить гидролиз водой, входящей в состав окислителя, и преднамеренно обработали CPG с $\text{T}_5(-\text{P}^{(\text{V})}-\text{NH}_2)\text{T}$ раствором, содержащим 9% воды и ТГФ в качестве растворителя. При повторном исключении стадий и анализе реакционных смесей получили прирост к содержанию T_5 относительно предыдущего эксперимента, в то время как содержание T_6 оставалось на прежнем уровне (рис. S9 в дополнительных материалах). Обнаруженный факт привел к заключению: гомогенность реакционных смесей P-NH_2 -олигонуклеотидов, получаемых по разработанному протоколу, напрямую зависит от полноты протекания реакции Штаудингера и практически не обусловливается используемыми в синте-

тическом цикле реагентами и деблокирующими смесями. В итоге, повторив синтез T_5^*T с использованием дополнительного окисления иодом после стадии удаления Fmoc-защитной группы, мы получили прирост к содержанию T_6 в сравнении с синтезом без дополнительной стадии окисления (рис. 6).

При попытке достичнуть полного протекания реакции Штаудингера мы провели синтез T_5^*T с использованием насыщенного раствора FmocN_3 (~0.63 М). К сожалению, используя повышенную концентрацию, не удалось добиться полной конверсии (содержание побочных продуктов составило ~10%). Особенно остро проблема неполной конверсии в целевой амидофосфатный олигонуклеотид встает при переходе к множественной модификации олигонуклеотидной цепи. Причину частичного окисления с использованием FmocN_3 в ходе твердофазного синтеза предстоит выяснить в будущих экспериментах.

Гибридизационные свойства $\text{P-NH}_2\text{-ON}$.

Отметим, что к настоящему времени имеется лишь крайне ограниченный набор данных, описывающих комплексообразующие свойства P-NH_2 -амидофосфатов [25, 35–37]. Именно поэтому мы исследовали способность серии октамерных ДНК, нативного (N_8) и модифицированных олигонуклеотидов (N_{x*y*z} , где x, y, z – порядковые числа нуклеозидов в составе модифицированного звена) к формированию комплементарных комплексов с матричным октамером M_8 . Отдельной задачей была попытка определить роль влияния P-NH_2 -модификации на зависимость температуры плавления ($T_{\text{пл}}$) от ионной силы раствора (табл. 3, рис. 7).

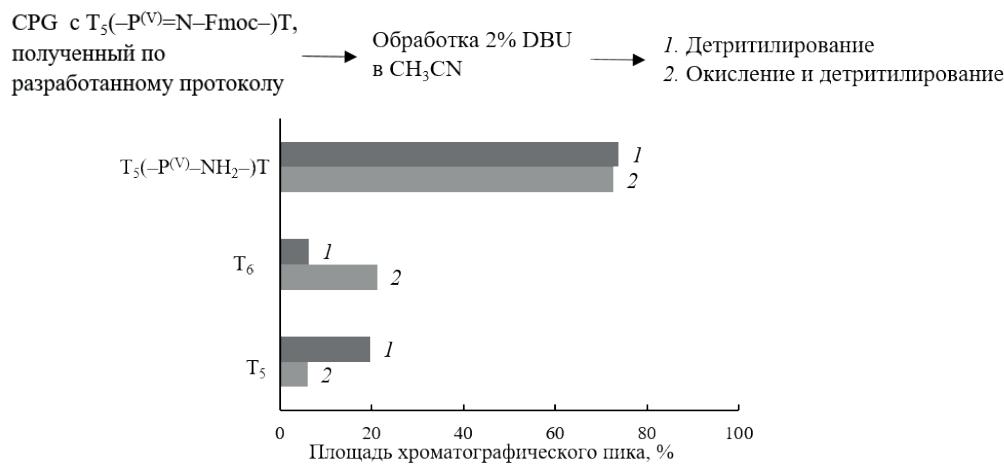


Рис. 6. Схема эксперимента по оценке влияния стадии дополнительного окисления смесью $\text{I}_2/\text{Py}/\text{H}_2\text{O}$ на соотношение побочных продуктов при синтезе P-NH_2 -олигонуклеотида. Оценку влияния проводили по данным оффВЭЖХ.

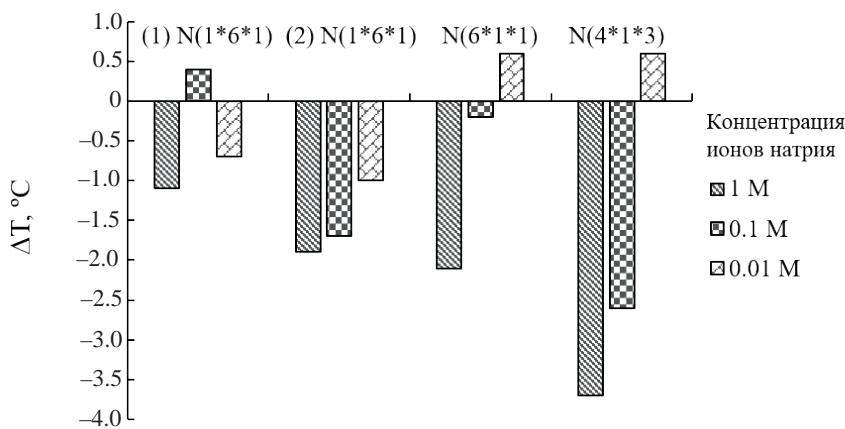


Рис. 7. Вклад P-NH₂-модификации в термическую стабильность (ΔT) комплементарных комплексов бисмодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов с матрицей AGCTACCG в зависимости от ионной силы раствора относительно немодифицированного комплекса.

Важно отметить, что именно данный фактор – электронейтральность модификации – это ключевое свойство, определяющее фундаментальный потенциал использования рассматриваемых изоструктурных P-NH₂-аналогов нативных олигонуклеотидов.

В табл. 4 представлены термодинамические параметры комплексообразования нативной ДНК-матрицы с набором модельных октануклеотидов (N_{x*y*z}) в стандартных буферных условиях (1 M NaCl, 10 mM какодилат натрия, pH 7.3). Данные были получены методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала во много волновом режиме [17]. Представленные данные – результат анализа как профилей кривых терми-

ческой денатурации, так и ренатурации анализируемых дуплексов. Следует отметить, что взаимодействие всех модельных олигомеров с ДНК-матрицей демонстрирует строго равновесный характер комплексообразования. С учетом погрешности определения величины температуры плавления исследуемых комплексов (~0.2°C) [53] установлено, что введение амидофосфатных остатков в структуру октануклеотидов лишь незначительно влияет на их сродство к мишени ДНК в условиях высокой ионной силы раствора (1 M NaCl) (табл. 4). Вне зависимости от позиции введения модификации в структуре олигомера и числа модифицированных звеньев в среднем наличие одного (–P^(V)–NH₂–)–звена приводит

Таблица 4. Результаты исследования термической стабильности олигонуклеотидных комплексов с разным числом и расположением N-незамещенных амидофосфатных групп в олигонуклеотиде N_{x*y*z} в условиях высокой ионной силы (1 M NaCl)

Комплементарный комплекс AGCTACCG матрицы с олигонуклеотидом	Выход ON после оФВЭЖХ, %	ΔS°, кал/(К·моль)	ΔH°, ккал/моль	ΔG° ₃₇ , ккал/моль	T _{пл} , °C	ΔT, °C	ΔT/mod, °C
N ₈	CGGTAGCT	–	–142 ± 1	–51.5 ± 3.9	–7.4 ± 0.2	39 ± 1	–
N _(1*7)	C*GGTAGCT	23	–162 ± 2	–57.3 ± 0.7	–7.0 ± 0.1	36 ± 1	–3
N _(4*4)	CGGT*AGCT	29	–175 ± 3	–61.4 ± 0.9	–7.2 ± 0.1	38 ± 1	–1
N _(7*1)	CGGTAGC*T	49	–157 ± 4	–56.0 ± 1.3	–7.3 ± 0.1	38 ± 1	–1
(1) N _(1*6*1)	C*GGTAGC*T	15	–157 ± 3	–55.9 ± 0.9	–7.1 ± 0.1	37 ± 1	–2
(2) N _(1*6*1)	C*GGTAGC*T	23	–132 ± 1	–48.2 ± 0.3	–7.2 ± 0.1	37 ± 1	–2
N _(6*1*1)	CGGTAG*C*T	33	–146 ± 4	–52.5 ± 1.3	–7.2 ± 0.1	38 ± 1	–1
N _(4*1*3)	CGGT*A*GCT	22	–165 ± 4	–58.1 ± 1.3	–6.9 ± 0.1	36 ± 1	–3
N _(1*1*6)	C*G*GTAGCT	28	–142 ± 9	–51.0 ± 2.9	–7.0 ± 0.1	37 ± 1	–1

Примечание: для последовательности N_(1*6*1) удалось разделить две смеси диастереомеров (1) и (2).

к снижению термической стабильности ДНК-комплексов на 1.0–2.0°C. Этот факт согласуется с данными работ французских исследователей [35]. Следует отметить, что термостабильность комплексов, формируемых различными фракциями диастереомеров олигомера $N_{(1*6*1)}$, разделенных с помощью ВЭЖХ, в условиях высокой ионной силы раствора практически не отличается (табл. 4).

Снижение ионной силы буферного раствора (при дискретном переходе от 1 к 0.1 и до 0.01 М раствора NaCl) показало, что для рассмотренных бисмодифицированных октануклеотидов явно выражен эффект введения электронейтральной P-NH₂-модификации (рис. 7; табл. S1 в дополнительных материалах). При исследовании мономодифицированных комплексов не удалось обнаружить статистически значимую зависимость от ионной силы раствора. Очевидно, что наличие P-NH₂-модификации в цепи олигомера приводит к достоверно значимому снижению заряд-обусловленной компоненты энергии взаимодействия комплементарных цепей. Заметим, что в ряде случаев при пониженной ионной силе (0.01 М NaCl) (–P^(V)–NH₂–)-содержащие аналоги демонстрируют даже несколько большую термостабильность комплементарных комплексов с ДНК-матрицей относительно таковых с участием нативных олигонуклеотидов. При этом, по-видимому, наблюдается некоторая зависимость термодинамического эффекта от локализации, нуклеотидной последовательности сайта модификации, а также его диастереомерного состояния.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали азид натрия (NaN₃), тетраметилэтилендиамин (TEMED), катионный карбоцианиновый краситель Stains-All, трис-(гидроксиметил)аминометан (Трис), какодилат натрия (Sigma-Aldrich, США); (9-флуоренил)-метоксикарбонилхлорид (FmocCl) (Fluka, Швейцария); трихлоруксусную кислоту, пиридин, триэтиламин, хлорид натрия, тетрагидрофуран (ТГФ) (Panreac, США); 5-(этилтио)-1H-тетразол (ETT) (Glen Research, США); 1-метилимидазол (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия); пропионовый ангидрид, 7 М раствор аммиака в метаноле (Acros Organics, США); кристаллический иод, ледяную уксусную кислоту, динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na₂EDTA), водный аммиак, спирт изопропиловый (Реахим, Россия); (1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен) (DBU) (Alfa Aesar, Германия); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония (PSA) (AppliChem, Германия); бромфеноловый синий, (AppliChem, Германия); бромфеноловый синий,

ксиленцианол FF (Helicon, Россия); борную кислоту (Химпром, Россия); мочевину (Союзхимпром, Россия); стандартные мономеры для фосфорамидитного протокола, полимерные носители для твердофазного автоматического синтеза с тимидин-, дезоксиаденозин- и дезоксигуанозин-3'-расщепляемым линкером (ChemGenes Co, США); воду бидистиллированную, ацетонитрил (CH₃CN) для ВЭЖХ (Fisher Chemical, Китай); дихлорметан (Вектон, Россия); ацетонитрил-*d*₃, пластиинки для TCX TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, США); хлороформ-*d* (Solvex, Россия).

Реактивы и растворители были квалификации х.ч. и о.с.ч. отечественного и импортного производства. Абсолютизирование растворителей проводили стандартными методами с последующим выдерживанием над молекулярными ситами или гидридом кальция.

Масс-спектрометрический анализ (ESI и MALDI-TOF) исследованных соединений проводили в Центре масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН на оборудовании MALDI-TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics, Германия) и ESI LC/MS/MSD XCT (Agilent Technologies, США); определяемый диапазон масс – 105–1600 *m/z*.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Magritek Spinsolve (Новая Зеландия) с частотой 80 МГц (¹H – 80 МГц, ³¹P – 32 МГц) в CH₃CN (при записи ³¹P) или дейтерированном хлороформе (при записи ¹H).

Структуру органического азида (FmocN₃) устанавливали с использованием ИК-Фурье-спектрометра Tensor 27 (Bruker, Германия) на базе НИОХ СО РАН им. Н.Н. Ворожцова. Спектр регистрировали в кювете диаметром 0.28 мм, растворителем выступал хлороформ, концентрация раствора исследуемого азида составила 1 масс.%. ИК-спектр регистрировали в диапазоне 4000–400 см^{–1}. Идентификацию химического состава азида проводили по характеристическим полосам поглощения, представленным в литературе [54].

Электрофоретическую подвижность олигонуклеотидов и их аналогов оценивали, используя 15%-ный ПААГ (акриламид : N,N'-метиленбисакриламид 29 : 1), 8 М мочевина, 89 мМ Трис-борат, pH 8.3, 2 мМ Na₂EDTA, 0.08% TEMED, 0.1% PSA) при напряжении 12 В/м в диапазоне 30–40 мин. Пробы наносили из буферного раствора, содержащего 0.1 мг/мл ксиленцианола FF в 8 М мочевине. Подвижность оценивали относительно лидирующего красителя – бромфенолового синего. Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием с помощью 0.05%-ного раствора Stains-all в 50%-ном формамиде.

Аналитическую обращенно-фазовую высокоеффективную жидкостную хроматографию (оффВЭЖХ) реакционных смесей образцов проводили на хроматографе Милихром А02 (Эконова, Россия) с использованием колонки (2×75 мм) с сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 (Эконова, Россия) и градиента концентрации CH_3CN (0–30%) в 0.02 М водном растворе триэтиламмония ацетата (рН 7.0) в течение 30 мин (скорость потока 200 мкл/мин, температура термостата 35°C). Детекцию ON осуществляли на длинах волн 260, 280 и 300 нм.

Очистку олигонуклеотидов проводили методом оффВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 series (Agilent, США). Использовали колонку (4.6×150 мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм) (Agilent, США), элюировали в градиенте концентрации CH_3CN от 0 до 50% в 0.02 М растворе триэтиламмония ацетата (рН 7.0) за 40 мин, скорость потока 1.5 мл/мин.

Амидофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов синтезировали на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) с использованием коммерчески доступных мономеров (0.1 М) для амидофосфатного протокола, в качестве активатора применяли раствор ETT (0.25 М) в CH_3CN . В качестве кэпирующих агентов выступали СрА – 15%-ный пропионовый ангидрид в ТГФ, СрВ – 16%-ный *N*-метилимидазол в ТГФ. 5'-Диметокситритильную защитную группу удаляли 3%-ной трихлоруксусной кислотой в CH_2Cl_2 . Триэфирфосфиты окисляли до триэфирфосфатов смесью 0.05 М I_2 , 1% пиридина, 9% H_2O в ТГФ. Для получения межнуклеозидного амидофосфата на стадии окисления в процессе твердофазного автоматического синтеза использовали альтернативную программу, основанную на реакции Штаудингера. В качестве окислителя применяли 0.1 М или 0.25 М раствор FmocN_3 в CH_3CN . Суммарное время окисления составляло 15–45 мин. Удаление Fmoc -защитной группы проводили обработкой 2%-ным раствором DBU в CH_3CN в течение 5 мин либо в ходе синтетического цикла на автоматическом ДНК-синтезаторе, либо отдельно в пробирке объемом 1.5 мл.

Термическую денатурацию олигонуклеотидных комплексов проводили на спектрофотометре Cary 300 Biomelt (Varian, Австралия), оснащенном терморегулируемой 6-куветной приставкой. Компоненты комплексов в эквимолярном соотношении (суммарная концентрация 10 мкМ) в буферном растворе (10 мМ какодилат натрия, 100 мМ NaCl , рН 7.2) нагревали–охлаж-

дали в диапазоне температур от 5 до 95°C со скоростью изменения температуры 0.5°C/мин. Оптическую плотность регистрировали при 260, 270 и 300 нм. Температуру плавления комплекса определяли как температуру, соответствующую максимуму первой производной кривой (или профиля) зависимости оптической плотности образца от температуры.

(9-Флуоренил)-метоксикарбонилазид (FmocN_3). (9-Флуоренил)-метоксикарбонилхлорид (1.88 ммоль) растворяли в 10 мл безводного CH_3CN . К раствору добавляли 2.64 ммоль сухого NaN_3 . Полученную суспензию перемешивали 10 ч при нагревании до 40°C. После окончания реакции супернатант отделяли фильтрованием и проводили экстракцию CH_2Cl_2 . Органический слой промывали 1 раз насыщенным солевым раствором, далее 2 раза водой, затем сушили над Na_2SO_4 (безв.). Растворитель удаляли упариванием на ротационном испарителе. Очистку проводили перекристаллизацией из гексана. Для удаления следов воды остаток в колбе дважды упаривали из ацетонитрила.

TCX в системе 85% гексан + 15% CH_2Cl_2 : R_f (FmocCl) = 0.28, R_f (FmocN_3) = 0.08.

^1H -ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , *J*, Гц): 7.79 (d, *J* 6.7, 2H), 7.55 (d, *J* 1.7, 2H), 7.42 (t, *J* 4.3, 2H), 7.27 (t, *J* 1.7, 2H), 4.50 (d, *J* 6.3, 2H), 4.31 (t, *J* 7.0, 1H). ИК (cm^{-1}): 3037, 2189, 2135, 1734, 1601, 1448, 1375, 1317, 1240, 1111, 1076, 1030, 982, 922, 864, 621, 563, 482, 424.

5'-Диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-(β -цианэтил)-изопропил]fosfittriэфир (**II**). В пластиковой пробирке с завинчивающейся крышкой к 145 мкл 0.1 М раствора 5'-диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-(β -цианэтил)-(N,N-диизопропил)]амидофосфита (**I**) в CH_3CN (0.01 ммоль) приливали 250 мкл 0.25 М раствора ETT в CH_3CN (0.04 ммоль) и 150 мкл изопропанола (абс.) (2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 5 мин при комнатной температуре. Продукт экстрагировали CH_2Cl_2 , в качестве водной фазы использовали фосфатный буфер (1 М KH_2PO_4 , рН 6.5). Органическую фазу упаривали на ротационном испарителе, сухое вещество растворяли в 500 мкл ацетонитрила. Продукт анализировали методами TCX и ЯМР-спектроскопии и использовали в последующих реакциях без дополнительной очистки.

TCX в системе 90% CH_2Cl_2 + 10% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: R_f (**I**) = 0.4, R_f (**II**) = 0.36.

^{31}P -ЯМР (32 МГц, CH_3CN): 139.27, 138.88.

5'-Диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-изопропиламинофосфат (**V**). К полученному

фосфиттриэфир (II) (0.01 ммоль) приливали 0.1 М раствор FmocN₃ (0.02 ммоль). Через 5 мин после перемешивания при комнатной температуре реакционную смесь анализировали методами ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

TCX в системе 90% CH₂Cl₂ + 10% C₂H₅OH: R_f (II) = 0.36, R_f (IV) = 0.30.

³¹P-ЯМР (32 МГц, CH₃CN): 5.70, 5.46.

К полученной реакционной смеси добавляли 15 мкл DBU с конечным содержанием основания в системе 2%, выдерживали 5 мин при комнатной температуре, затем анализировали методами ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

TCX в системе 90% CH₂Cl₂ + 10% C₂H₅OH: R_f (IV) = 0.30, R_f (V) = 0.15, 0.10 (в виде двух диастереомеров).

³¹P-ЯМР (32 МГц, CH₃CN): 5.70, 5.46.

Далее раствор экстрагировали CH₂Cl₂, водная фаза – 1 М KH₂PO₄ (pH 6.5). Органическую фазу упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле, подвижная фаза – раствор CH₂Cl₂, содержащий 1% C₂H₅OH и 0.1% (C₂H₅)₃N. Затем проводили масс-спектрометрический анализ ESI (*m/z*): 767.0, m_{теор.} = 766.9 г/моль; m_{эксп.} = 767.0 г/моль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе описан новый подход к синтезу олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих одну или несколько *N*-незамещенных амидофосфатных P-NH₂-модификаций, основанный на использовании 9-(флуоренил)-метоксиарбонилазида (FmocN₃) в рамках реакции окисления P^(III) по классической реакции Штаудингера. Основное преимущество разрабатываемого синтетического подхода – его совместимость с протоколом автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов, основанного на использовании стандартных защитных групп и линкеров на поверхности CPG-носителя. Нам, к сожалению, не удалось осуществить высокоэффективный синтез электронейтральных, изоструктурных фосфодиэфирному остатку, производных олигонуклеотидов. При этом предложены условия к получению любых мономодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов (с выходами ~80%). Однако это дало возможность детально описать влияние модификации на комплексообразование (–P^(V)–NH₂–)-содержащих производных с ДНК-матрицей с точки зрения термодинамических свойств. Важным аспектом исследования стал тот факт, что амидофосфатная группа, находясь внутри олигонуклеотидной цепи, по-видимому,

имеет возможность формировать неканонические водородные связи, влияя тем самым на распределение структурных форм свободного олигомера и/или его дуплексной формы. При этом такие неканонические взаимодействия с участием Н-донорного (–P^(V)–NH₂–)-остатка не во всех случаях могут содействовать стабилизации комплементарных комплексов ДНК. Кроме того, электронейтральность P-NH₂-группы оказывается обоснованно значимым параметром, определяющим перспективность использования соответствующих изоструктурных аналогов нативных олигонуклеотидов в молекулярно-биологических исследованиях, что было уже неоднократно продемонстрировано ранее [25, 32, 40]. Значимость экспериментально наблюдаемых эффектов, достигаемых при использовании *N*-незамещенных амидофосфатных производных олигонуклеотидов, очевидно, должна возрастать со снижением ионной силы буферной среды, т.е. в условиях роста значимости электростатических взаимодействий биомолекул. В таких условиях P-NH₂-модификация даже может способствовать формированию ДНК-дуплексов. Считаем необходимым в дальнейшем совершенствовать подходы к автоматическому синтезу (–P^(V)–NH₂–)-содержащих олигонуклеотидов – уникальных изоструктурных аналогов природных биополимеров, лишенных в сайте модификации отрицательного заряда фосфодиэфирного звена при сохранении молекулярной массы, поскольку Ar(O) ~ Mr(NH₂) = 16 Да, фрагменты –(OPO(O)(O–))– и –(OPO(O)(NH₂))– в структуре ДНК практически тождественны. Именно это обстоятельство обуславливает целесообразность разработки эффективных методов синтеза и детального изучения свойств P-NH₂-аналогов олигонуклеотидов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.А. Баженову за конструктивную критику при планировании экспериментов и обсуждении результатов, а также ОЦКП ИХБФМ СО РАН за масс-спектрометрический анализ олигонуклеотидов и Химическому исследовательскому центру коллективного пользования СО РАН (НИОХ СО РАН) за проведение спектральных и аналитических измерений.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Синтез модифицированных олигонуклеотидов проводили при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00017), а исследование их свойств выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, государственное задание ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных автором данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор ЕАМ участвовал в разработке и проведении экспериментов, анализе данных и подготовке текста статьи. Авторы ИАП, МИМ участвовали в анализе данных и подготовке текста статьи. Автор ДВП участвовал в разработке методологии, а также в доработке финального варианта текста статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knouse K., Flood D., Vantourout J., Schmidt M., McDonald I., Eastgate M., Baran P. // ACS Cent. Sci. 2021. V. 7. P. 1473–1485.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00487>
2. Benner S., Hurter D. // Bioorg. Chem. 2002. V. 30. P. 62–80.
<https://doi.org/10.1006/bioo.2001.1232>
3. Agrawal S. // Trends Biotechnol. 1996. V. 14. P. 376–387.
[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10053-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10053-6)
4. Duffy K., Arangundy-Franklin S., Holliger P. // BMC Biol. 2020. V. 18. P. 112.
<https://doi.org/10.1186/s12915-020-00803-6>
5. Oberemok V., Laikova K., Repetskaya A., Kenyo I., Gorlov M., Kasich I., Krasnodubets A., Gal'chinsky N., Fomochkina I., Zaitsev A., Bekirova V., Seidosmanova E., Dydik K., Meshcheryakova A., Nazarov S., Smaglyi N., Chelengerova E., Kulanova A., Deri K., Subbotkin M., Useinov R., Shumskykh M., Kubyshkin A. // Molecules. 2018. V. 23. P. 1302.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061302>
6. Clavé G., Reverte M., Vasseur J.-J., Smietana M. // RSC Chem. Biol. 2021. V. 2. P. 94–150.
<https://doi.org/10.1039/D0CB00136H>
7. Kandasamy P., Liu Y., Aduda V., Akare S., Alam R., Andreucci A., Boulay D., Bowman K., Byrne M., Cannon M., Chivatakarn O., Shelke J.D., Iwamoto N., Kawamoto T., Kumarasamy J., Lamore S., Lemaitre M., Lin X., Longo K., Looby R., Marappan S., Metterville J., Mohapatra S., Newman B., Paik I.H., Patil S., Purcell-Estabrook E., Shimizu M., Shum P., Standley S., Taborn K., Tripathi S., Yang H., Yin Y., Zhao X., Dale E., Vargeese C. // Nucleic Acids Res. 2022. V. 50. P. 5401–5423.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac037>
8. Egli M., Manoharan M. // Nucleic Acids Res. 2023. V. 51. P. 2529–2573.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>
9. de la Torre B., Albericio F. // Molecules. 2023. V. 28. P. 1038.
<https://doi.org/10.3390/molecules28031038>
10. Nielsen P. // Mol. Biotechnol. 2004. V. 26. P. 233–248.
<https://doi.org/10.1385/MB:26:3:233>
11. Nielsen P. // Chem. Biodivers. 2010. V. 7. P. 786–804.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201000005>
12. Arangundy-Franklin S., Taylor A., Porebski B., Genna V., Peak-Chew S., Vaisman A., Woodgate R., Orozco M., Holliger P. // Nat. Chem. 2019. V. 11. 533–542.
<https://doi.org/10.1038/s41557-019-0255-4>
13. Peyrottes S. // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. P. 1841–1848.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.10.1841>
14. Chubarov A.S., Osorbin I.P., Novikova L.M., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. // Diagnostics. 2023. V. 13. P. 250.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13020250>
15. Dong Z., Chen X., Zhuo R., Li Y., Zhou Z., Sun Y., Liu Y., Liu M. // BMC Biol. 2023. V. 21. P. 95.
<https://doi.org/10.1186/s12915-023-01599-x>
16. Sarkar S. // Biopolymers. 2023. V. 115. P. e23567.
<https://doi.org/10.1002/bip.23567>
17. Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Dyudeeva E.S., Pyshnyi D.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 461–468.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021020151>
18. Summerton J. // Int. J. Pept. Res. Ther. 2003. V. 10. P. 215–236.
<https://doi.org/10.1007/s10989-004-4913-y>
19. Bhadra J., Pattanayak S., Sinha S. // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. 2015. V. 62. P. 4.65.1–4.65.26.
<https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0465s62>
20. Braasch D., Nulf C., Corey D. // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. 2002. V. 9. P. 4.11.1–4.11.18.
<https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0411s09>
21. Kostov O., Páv O., Rosenberg I. // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. 2017. V. 70. P. 4.76.1–4.76.22.
<https://doi.org/10.1002/cpnc.35>
22. Micklefield J. // Curr. Med. Chem. 2001. V. 8. P. 1157–1179.
<https://doi.org/10.2174/0929867013372391>
23. Lee H., Jeon J., Lim J., Choi H., Yoon Y., Kim S. // Org. Lett. 2007. V. 9. P. 3291–3293.
<https://doi.org/10.1021/ol071215h>
24. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. // Act. Nat. 2014. Т. 6. С. 116–118.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-116-118>

25. *Kuznetsov N.A., Kupryushkin M.S., Abramova T.V., Kuznetsova A.A., Miroshnikova A.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S.* // *Mol. Biosyst.* 2016. V. 12. P. 67–75.
<https://doi.org/10.1039/c5mb00692a>
26. *Новопашина Д.С., Назаров А.С., Воробьева М.А., Купрюшкин М.С., Давыдова А.С., Ломзов А.А., Пышный Д.В., Altman S., Веньяминова А.Г.* // *Мол. биология.* 2018. Т. 52. С. 1045–1054.
<https://doi.org/10.1134/S0026898418060137>
27. *Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // *Biochimie.* 2020. V. 168. P. 259–267.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.013>
28. *Markov A.V., Kupryushkin M.S., Goncharova E.P., Amirkhanov R.N., Vasilyeva S.V., Pyshnyi D.V., Zenkova M.A., Logashenko E.B.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 774–782.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060268>
29. *Chubarov A.S., Oscorbin I.P., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V.* // *Diagnostics.* 2020. V. 10. P. 872.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics10110872>
30. *Pavlova A.S., Yakovleva K.I., Epanchitseva A.V., Kupryushkin M.S., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V., Ryabchikova E.I., Dovydenco I.S.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 9784.
<https://doi.org/10.3390/ijms22189784>
31. *Kupryushkin M.S., Filatov A.V., Mironova N.L., Patutina O.A., Chernikov I.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A., Altman S., Vlassov V.V.* // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2022. V. 27. P. 211–226.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.11.025>
32. *Stetsenko D., Kupryushkin M., Pyshnyi D.* // *Int. Application WO2016028187A1*, 2016.
33. *Froehler B.* // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. P. 5575–5578.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)85269-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85269-7)
34. *Iyer R., Devlin T., Habus I., Yu D., Johnson S., Agrawal S.* // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 1543–1546.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00067-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00067-6)
35. *Peyrottes S., Vasseur J.-J., Imbach J., Rayner B.* // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 5869–5872.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)01250-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)01250-6)
36. *Laurent A., Debart F., Rayner B.* // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 5285–5288.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)01153-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01153-2)
37. *Devlin T., Iyer R., Johnson S., Agrawal S.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996. V. 6. P. 2663–2668.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(96\)00498-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(96)00498-2)
38. *Peyrottes S., Vasseur J.-J., Imbach J.L., Rayner B.* // *Nucleosides and Nucleotides.* 1997. V. 16. P. 1551–1554.
<https://doi.org/10.1080/07328319708006227>
39. *Iyer R., Yu D., Devlin T., Ho N.-H., Johnson S., Agrawal S.* // *Nucleosides and Nucleotides.* 1997. V. 16. P. 1491–1495.
<https://doi.org/10.1080/07328319708006214>
40. *Стеценко Д.А., Купрюшкин М.С., Пышный Д.В.* // *Заявка RU2014134383A*, 2014.
41. *Paul S., Roy S., Monfregola L., Shang S., Shoemaker R., Caruthers M.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. P. 3253–3264.
<https://doi.org/10.1021/ja511145h>
42. *Prokhorova D.V., Chelobanov B.P., Burakova E.A., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 38–42.
<https://doi.org/10.1134/S1068162017010071>
43. *Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 664–668.
<https://doi.org/10.1134/S1068162017060024>
44. *Kupryushkin M.S., Zharkov T.D., Ilina E.S., Markov O.V., Kochetkova A.S., Akhmetova M.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Lavrik O.I., Khodyreva S.N.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 719–733.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021030110>
45. *Carpino L., Han G.* // *J. Org. Chem.* 1972. V. 37. P. 3404–3409.
<https://doi.org/10.1021/jo00795a005>
46. *Bazhenov M.A., Shernyukov A.V., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 699–708.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060074>
47. *Jiménez E.I., Gibard C., Krishnamurthy R.* // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2021. V. 60. P. 10775–10783.
<https://doi.org/10.1002/anie.202015910>
48. *Preobrazhenskaya N.N.* // *Russ. Chem. Rev.* 1972. V. 41. P. 54–65.
<https://doi.org/10.1070/RC1972v04n01ABEH002030>
49. *Johnsson R., Bogojeski J., Damha M.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. V. 24. P. 2146–2149.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.032>
50. *Gololobov Y.G., Zhmurova I.N., Kasukhin L.F.* // *Tetrahedron.* 1981. V. 37. P. 437–472.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92417-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92417-2)
51. *Jones A.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 1979. V. 1. P. 194–207.
[https://doi.org/10.1016/0141-8130\(79\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0141-8130(79)90013-8)
52. *Boal J., Wilk A., Harindranath N., Max E., Kempe T., Beauchage S.* // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 3115–3117.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.15.3115>
53. *Pyshnyi D.V., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Ivanova E.M.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2006. V. 23. P. 567–579.
<https://doi.org/10.1080/07328319708006227>
54. *Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К.* // *Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных.* Москва: Мир, 2006. 439 с.

Adaptation of a Protocol for the Automated Solid-Phase Phosphoramidite Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides for the Preparation of Their *N*-Unsubstituted Phosphoramidate Analogues (P-NH₂)

E. A. Malova^{*, #}, I. A. Pyshnaya^{*, #}, M. I. Meschaninova^{*}, and D. V. Pyshnyi^{*}

[#]Phone/fax: +7 (383) 363-51-36; e-mail: malova.ev.an@gmail.com, pyshnaya@niboch.nsc.ru

^{*}Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Acad. Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

A new approach to the automated synthesis of *N*-unsubstituted phosphoramidate oligodeoxyribonucleotides (P-NH₂) based on an optimized solid-phase phosphoramidite protocol using the Staudinger reaction has been proposed. The rapid and efficient oxidation of model P^(III)-containing phosphite triethers by the organic azide (9*H*-fluoren-9-yl)methylcarbonylazide (FmocN₃) to the corresponding phosphamides –(OPO(OR)–(NFmoc))–, where R is a residue of nucleoside or alkyl nature, has been demonstrated. Removal of the alkaline-labile fluorenyl group from the modified internucleoside linkage allows the production of electro-neutral, under physiological conditions of pH ~7, *N*-unsubstituted phosphoramidate (–(OPO(O)(NH₂))– or (P-NH₂)) residues in the oligonucleotide chain instead of the classical negatively charged phosphodiester (–(OPO(O)(O)(O[–]))– or (P-O)) residues. In optimizing the synthetic protocol, it has been demonstrated that to improve the efficiency of P-NH₂-oligonucleotide synthesis, it is necessary to include an additional Fmoc-group cleavage step in the automatic synthesis protocol after each oxidation step of the growing oligomer chain via the Staudinger reaction. An almost complete absence of dependence of the P-NH₂-oligonucleotide yield on both the localization of the P-NH₂-strand in the chain and the type of dinucleotide fragment being modified was shown. A set of mono- and bis-modified octadeoxyribonucleotides was obtained, and a detailed study of the thermal stability of complementary DNA/DNA complexes under different buffer conditions was performed. It was shown that under high ionic strength conditions (1 M NaCl, pH 7.2), the introduction of a single P-NH₂ strand reduced the thermostability of the DNA complex by an average of 1.3°C. When the ionic strength of the solution decreases, the destabilizing effect of the P-NH₂-modification decreases significantly, which further confirms the electroneutral status of the introduced phosphoramidate linkage. Thus, we have developed a protocol for the preparation of partially modified oligonucleotide derivatives bearing uncharged but isostructured to native P-O-strands – phosphoramidate residues P-NH₂.

Keywords: phosphoramidate derivatives of oligodeoxyribonucleotides, automated synthesis, Staudinger reaction, synthesis protocol optimization



УДК 57.012+57.016.4

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКА LZTFL1 МЕТОДОМ ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ (PCA-seq)

© 2024 г. И. И. Хегай*, #, С. Юй**, В. М. Ефимов*, **

* ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

** Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 05.02.2024 г.

После доработки 16.02.2024 г.

Принята к публикации 17.02.2024 г.

Однонуклеотидная мутация rs17713054G>A в промоторной области гена *LZTFL1* (leucine zipper transcription factor like 1) относится к факторам тяжелого течения коронавирусной инфекции COVID-19. Компьютерно-статистический анализ аминокислотной последовательности белка LZTFL1 методом главных компонент (PCA-seq) выявил наличие высокой корреляции между первой главной компонентой транслируемой аминокислотной последовательности и одиннадцатью аминокислотными индексами базы данных AAindex, характеризующими физико-химические и биохимические свойства белка. Индексы BEGF750102, CHOP780209, PALJ810110, GEIM800107, QIAN880121, LEVM780102 и PRAM900103 связаны с параметрами β -складчатой укладки. Белок LZTFL1 входит в состав белковых комплексов синдрома Барде–Бидля (BBS), регулирующих внутриклеточный транспорт в мерцательном эпителии легких. Предполагается, что присутствие β -складчатых элементов в структуре белка LZTFL1 играет важную роль в эндоцитозе, опосредованном рецептором ACE2, стимулируя интенсивность рециркуляции ангиотензинпревращающего фермента ACE2 и ускоряя доставку адгезированных вирионов коронавируса SARS-CoV-2 внутрь клетки в процессе инициации тяжелого острого респираторного синдрома COVID-19.

Ключевые слова: белок *LZTFL1*, мерцательный эпителий, рецептор ACE2, аминокислотный индекс, BBS-белки, метод главных компонент

DOI: 10.31857/S0132342324060075, **EDN:** NFJQUO

ВВЕДЕНИЕ

Белок LZTFL1 представляет собой продукт повсеместно экспрессируемого гена *LZTFL1* и локализуется преимущественно в цитоплазме на поверхности внутриклеточных органелл. Белок входит в состав ресничек мерцательного или реснитчатого эпителия и вовлечен в регуляцию связывания других белков на плазматической мембране для последующей их доставки внутрь клетки [1, 2]. Мерцательный эпителий образован монослоем реснитчатых клеток и выстилает все воздухоносные пути, от носовой полости до трахеи и бронхов. На апикальном конце данные клетки

имеют множественные отростки цитоплазмы в виде ресничек с повышенным содержанием микротрубочек. Реснички имеют особый белковый и липидный состав, обеспечивающий селекцию внешних сигнальных молекул и внутриклеточный трафик [3, 4]. В 2021 г. было установлено, что ген *LZTFL1* может быть фактором тяжелого течения COVID-19. Методом полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) была показана корреляция мутаций в хромосомном локусе 3р21.31 с риском дыхательной недостаточности. В составе локуса идентифицирован структурный ген *LZTFL1* и мутантный аллель rs17713054G>A, содержащий

Сокращения: LZTFL1 – транскрипционный фактор 1, подобный лейциновой застежке-молнии (leucine zipper transcription factor like 1); COVID-19 – коронавирусное заболевание (COronaVIrus Disease); PCA-seq – метод главных компонент (principal component analysis); AAindex – аминокислотный индекс (amino acid index); BBS – синдром Барде–Бидля (Bardet–Biedl Syndrome); ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2 (angiotensin-converting enzyme 2); SARS-CoV-2 – коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2); RBD – домен, связывающийся с рецептором (receptor-binding domain); Arl6 – ГТФаза 6, подобная фактору рибозилирования АДФ (ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6); CEBPB – транскрипционный фактор бета, связывающийся с энхансерным мотивом CCAAT (CCAAT/enhancer-binding protein beta).

* Автор для связи: (эл. адрес: khegay@bionet.nsc.ru).

однонуклеотидную замену в регуляторной области гена [5].

На фоне масштабных молекулярно-биологических исследований геногеографии распределения полиморфных вариантов локуса 3р21.31 и их связи с этиологией COVID-19 [6–8] актуальной задачей становится анализ функции кодируемого белка LZTFL1 в патогенезе коронавируса SARS-CoV-2. Вследствие того, что структура белка остается слабо изученной, целью данной работе было провести компьютерно-статистический анализ аминокислотной последовательности белка LZTFL1 методом главных компонент (PCA-seq).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании теоремы Такенса первичная последовательность белка LZTFL1 была преобразована в траекторную матрицу, по которой были вычислены главные компоненты аминокислотной последовательности относительно набора фрагментов длиной 64 а.о., непрерывно считываемых слева направо со сдвигом рамки считывания в одну аминокислоту в каждой следующей серии. На рис. 1 в верхней части представлена траектория первой главной компоненты аминокислотной последовательности LZTFL1 относительно номера фрагмента белка. Индивидуальные свой-

ства аминокислот учитывались в форме аминокислотных индексов. Аминокислотные индексы представляют наборы из 20 числовых значений, рассчитанных на основании кластерного анализа аминокислот и коэффициентов корреляции с отдельными физическими параметрами. В нижней части рис. 1 сплошной линией показана арифметическая средняя 11 аминокислотных индексов, наиболее коррелирующих по модулю с первой главной компонентой. Диапазон соответствующих минимальных и максимальных значений отображен серым фоном. Очевидно, что верхняя и нижняя кривые имеют практически идентичную форму, коэффициент корреляции между первой главной компонентой и средней 11 аминокислотных индексов равен 0.982, что соответствует $pB\text{-value} < 10^{-15}$.

В результате корреляционного анализа количественных параметров физико-химических свойств и первой главной компоненты LZTFL1 выявлено 11 аминокислотных индексов с коэффициентом корреляции >0.900 , их список представлен в табл. 1. Аминокислотные индексы DESM900101 и RACS820105 связаны с внутриклеточной локализацией белка. Индексы PONP800106 и CHAM830103 ориентированы, соответственно, на гидрофобные свойства и размеры боковых

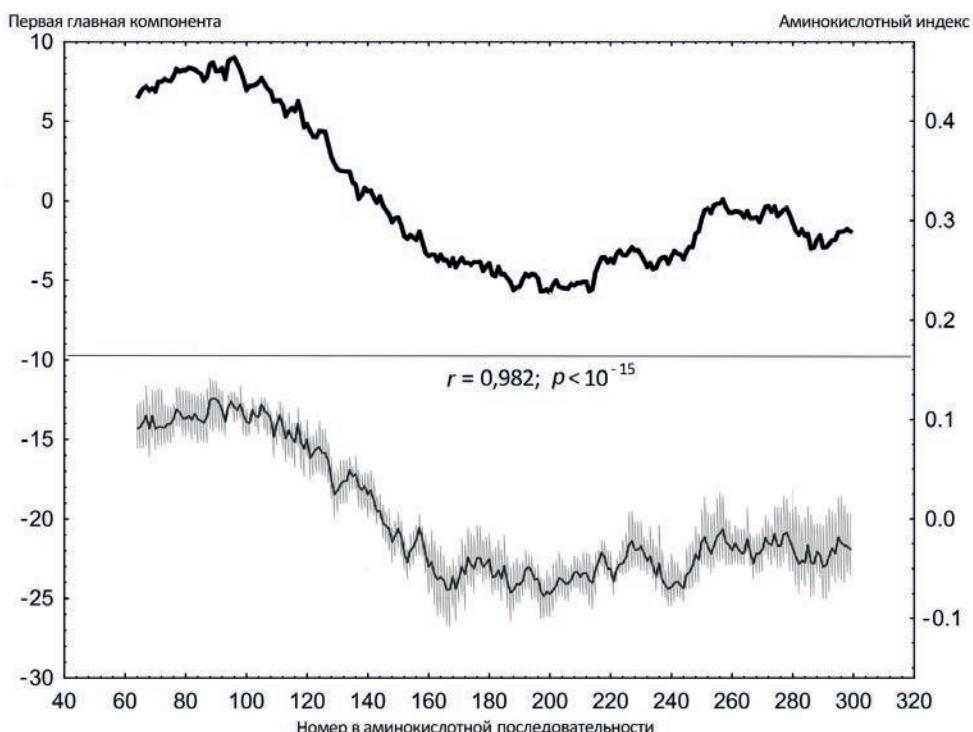


Рис. 1. Динамика позиционной изменчивости первой главной компоненты аминокислотной последовательности белка LZTFL1 (вверху) и нормированных аминокислотных индексов (внизу). Серым фоном обозначен разброс данных.

Таблица 1. Аминокислотные индексы с очень высоким коэффициентом корреляции с первой главной компонентой LZTFL1

№	Аминокислотный индекс	Коэффициент корреляции	Краткое описание
1	BEGF750102	0.964	Конформационные параметры β -структур
2	CHOP780209	0.958	Нормированная частота C-концевого β -листа
3	DESM900101	0.941	Параметры трансмембранных доменов
4	PALJ810110	0.940	Нормированная частота β -листов в составе β -структур
5	RACS820105	0.937	Средняя встречаемость во внешнем слое эндоплазматического ретикулума
6	GEIM800107	0.931	Индекс β -цепей для α/β -элементов вторичной структуры
7	QIAN880121	0.916	Вес β -листа в первом позиционном окне
8	PONP800106	0.909	Гидрофобность в области точки перегиба
9	CHAM830103	0.908	Количество атомов в боковой цепи
10	LEVM780102	0.908	Нормированная взвешенная частота β -листов
11	PRAM900103	0.908	Относительная частота в составе β -листа

цепей. Остальные аминокислотные индексы относятся к кластеру организации β -складчатых элементов в структуре белка. Максимальный коэффициент корреляции установлен для индекса BEGF750102. Данный аминокислотный индекс обязательно учитывается при статистическом анализе и построении конформации β -цепи, а следующий за ним в таблице индекс CHOP780209 принимается в расчет при оценке частоты присутствия антипараллельных β -структур на C-конце белка.

Таким образом, большинство аминокислотных индексов с наиболее высокими коэффициентами корреляции с первой главной компонентой аминокислотной последовательности LZTFL1 преимущественно связаны с параметрами β -складчатой укладки.

Начальное событие коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 – взаимодействие S-белков шипиковых пепломеров вирусной оболочки с мембранными белками заражаемой клетки. Функцию основных рецепторов SARS-CoV-2 выполняют молекулы ангиотензинпревращающего фермента ACE2 (КФ 3.4.15.1), локализованные на плазматической мембране клетки хозяина. Для агрегации S-белка и ACE2 характерна высокая аффинность связывания с чувствительностью на уровне наномолярных концентраций [9]. Во взаимодействии участвуют RBD (рецептор-связывающий домен) S-белка и N-концевой пептидазный домен ACE2. Особенность RBD – наличие антипараллельного β -листа из семи β -цепей в структуре рецептор-связывающего мотива, непосредственно контактирующего с активным центром пептидазного домена ACE2 [10, 11]. Кар-

боксипептидаза ACE2 состоит из внеклеточного акцепторного участка, трансмембранных доменов и цитоплазматического хвоста. Каталитический центр локализован во внеклеточной области и одновременно является рецептором для коронавируса SARS-CoV-2 [12]. Рецепция вируса усиливает ферментативную активность N-концевого пептидазного домена в молекуле ACE2 [13]. ACE2 экспрессируется в эпителиальных тканях большинства органов, но преимущественно локализуется в легочных превмоцитах II типа, энteroцитах тонкого кишечника и эндотелиальных клетках артерий и вен [14, 15]. ACE2, встроенный в апикальную мембрану альвеолярных бронхиол и альвеол, служит котранспортером для SARS-CoV-2 в клетки легких. Проникновение вируса в цитоплазму клеток-мишеней происходит за счет рециркуляции ACE2 вследствие регулируемого эндоцитоза [16]. Данный процесс – ключевой для вирусной инфекции.

Методом полногеномного поиска ассоциаций GWAS (genome-wide association studies) было установлено, что тяжесть патогенеза COVID-19 коррелирует с полиморфизмом в хромосомном локусе 3р21.31 [5]. На данном участке хромосомы локализован ген LZTFL1, кодирующий цитоплазматический белок – регулятор внутриклеточного транспорта. В настоящее время установлено, что белок LZTFL1 входит в семейство BBS-белков и, согласно данной номенклатуре, обозначается как BBS17 [17]. Белки семейства BBS образуют сложные гетерополимерные комплексы из различных типов BBS-белков, одни из которых взаимодействуют с мембранными гликопротеинами, другие – с внутриклеточным

цитоскелетом. Октамерные комплексы BBS-белков функционируют как адаптеры регулируемого эндоцитоза в клетках мерцательного эпителия. Белки BBS1 и BBS3 связываются с мембранный GTPазой Arl6, а субъединицы BBS4, BBS5, BBS8 и BBS9 – с фосфоинозитидами. Аффинность регулируется стерическими эффектами BBS2 и BBS7. Механизм действия более поздних по времени открытия белков BBS изучен недостаточно подробно. Мутации в комплексах BBS влияют на регулируемый эндоцитоз и являются причиной полиорганных дефектов вследствие нарушения структуры эпителиальных тканей [18, 19]. Белок LZTFL1 относится к слабоизученным элементам семейства BBS. Косвенно это отражено в его порядковом номере BBS17 в соответствующей номенклатуре белков.

Функционально активные комплексы BBS представляют собой гетерооктамеры с центральной коровой частью, собранной из консервативных субъединиц BBS1, BBS4, BBS5, BBS8 и BBS9. Наиболее важную роль в распознавании котранспортируемых белков играет BBS1, содержащий на *N*-конце домен специфического взаимодействия с GTPазой Arl6 [20]. *N*-Коревой домен белка BBS1 имеет структуру β -пропеллера. Данный вариант β -укладки характеризуется наличием четного количества высокосимметричных β -листов, расположенных в форме лопастей вокруг центрального канала. Отдельная лопасть состоит из нескольких антипараллельных β -цепей [21]. β -Пропеллеры также идентифицированы в белках BBS7 и BBS9. Домены с β -пропеллерной организацией участвуют в фиксации внешних сигнальных и структурных белков, а также способны взаимодействовать между собой при образовании внутри- и межмолекулярных связей. В частности, регуляторная функция BBS7 реализуется через стерические эффекты контактирующих β -пропеллеров BBS1 и BBS7 [17]. Функция LZTFL1 в составе комплексов BBS не исследована. Выполненный нами компьютерно-статистический анализ выявил высокую вероятность наличия множественных β -складчатых элементов в структуре белка LZTFL1. Потенциально это может быть связано с участием белка в регуляции свойств BBS-комплексов и иметь отношение к трафику с поверхности внутрь клетки.

Полиморфный вариант rs17713054G>A, детектированный в локусе 3p21.31, усиливает в 2 раза тяжесть проявления COVID-19. Однонуклеотидная замена G>A, зафиксированная в промоторной области структурного гена LZTFL1,

расположенного в данном локусе, формирует дополнительный энхансерный мотив ССААТ для связывания транскрипционного фактора СЕВРВ и увеличивает скорость транскрипции гена LZTFL1 [5]. Можно предположить, что повышение уровня белка LZTFL1 модулирует регуляцию адаптерных свойств BBS-комплексов и стимулирует интенсивность рециркуляции ACE2, в конечном итоге ускоряя доставку адгезированных вирионов SARS-CoV-2 внутрь клетки.

Таким образом, прогнозируемая β -складчатая структура белка LZTFL1 может стать ключом для понимания механизма эндоцитоза, опосредованного рецептором ACE2, в патогенезе COVID-19.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аминокислотная последовательность белка (299 а.о.), кодируемого геном *LZTFL1*, в формате FASTA была взята из GenBank NCBI (CAB95836.1). Аминокислотную последовательность белка LZTFL1 исследовали компьютерно-статистическим методом главных компонент (PCA-Seq) [22]. На основании теоремы Такенса [23] исходную последовательность длины *N* нарезали на фрагменты скользящим окном ширины *L*. Номер фрагмента – позиция последней аминокислоты фрагмента в исходной последовательности (первый фрагмент получает номер *L*, последний – *N*, всего *N*–*L*+1 фрагментов). Каждый фрагмент преобразовывали в 20-мерный вектор частот аминокислот. Между всеми фрагментами вычисляли матрицу квадратов евклидовых расстояний, которые однозначно определяют взаимное расположение фрагментов как точек в евклидовом пространстве. Методом главных координат (PCo) Гауэра [24] вычисляли координатные оси этого пространства. Проекции всех точек на эти оси образуют новые признаки, не коррелирующие между собой. Признаки упорядочиваются по убыванию дисперсии и являются главными компонентами.

Оптимальная ширина скользящего окна для анализируемой последовательности LZTFL1 составила 64 а.о., что в итоге генерировало 236 аминокислотных фрагментов. В качестве расстояния между фрагментами было выбрано хордовое расстояние Кавалли–Сфорца [25], по определению являющееся евклидовым. При *n* = 236 и числе коэффициентов корреляции 553 все коэффициенты при *r* > 0.406 достоверны с *p*-value < 10⁻⁶. Одиннадцать коэффициентов корреляции аминокислотных индексов с первой главной компонентой LZTFL1 превысили уровень

$r > 0.900$, что соответствует $pB\text{-value} < 10^{-15}$ (минимальное ненулевое $p\text{-value}$, допускаемое пакетом Statistica).

Физико-химические и биохимические свойства аминокислот учитывали после преобразования в числовые ряды в форме аминокислотных AA-индексов. Из актуальной базы данных AAindex были взяты 553 индекса 20 протеиногенных аминокислот [26]. Все AA-индексы предварительно стандартизировали (центрировали и нормировали). Для каждого фрагмента каждая аминокислота была заменена на соответствующее значение AA-индекса и было вычислено их среднее по фрагменту. Таким способом для множества фрагментов получили 553 физико-химических признака. Между ними и всеми 19 главными компонентами вычислили коэффициенты корреляции Пирсона с оценкой достоверности $pB\text{-value}$, т.е. $p\text{-value}$ с поправкой на множественные сравнения по критерию Бонферрони [27].

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием пакетов программ PAST 4 [28], Statistica 12 (StatSoft®), Jacobi 4 [29] и MS Excel 2016 (Microsoft®).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компьютерно-статистический анализ с использованием метода главных компонент (PCA-seq) выявил в аминокислотной последовательности белка LZTFL1 главные компоненты, коррелирующие с физико-химическими параметрами структурной организации белков. Из рассмотренных 553 физико-химических признаков установлена группа из одиннадцати аминокислотных индексов с очень высокой корреляцией, семь из которых указывают на особенности β -цепей. В частности, максимальный коэффициент корреляции установлен для индекса BEGF750102, учитываемого при статистическом расчете конформации β -цепи, а следующий за ним по модулю индекс CHOP780209 оценивает частоту присутствия антипараллельных β -структур на C -конце белка. Основной вывод из полученных результатов – аминокислотные индексы с наиболее высокими коэффициентами корреляции с первой главной компонентой аминокислотной последовательности LZTFL1 преимущественно связаны с параметрами β -складчатой укладки. Прогнозируемое с высокой вероятностью присутствие β -складчатых элементов в структуре белка LZTFL1 имеет практическое значение для построения модели регуляции эндоцитоза вирионов SARS-CoV-2, опосредованного

рецептором ACE2, в патогенезе COVID-19, что в перспективе может быть использовано в процессе разработки новых средств терапии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта Института цитологии и генетики СО РАН FWNR-2022-0021, FWNR-2022-0019.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор СЮ выполнил числовое преобразование данных и компьютерные вычисления. Авторы ИИХ и ВМЕ в равной степени внесли вклад в статистический анализ и подготовку текста статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Seo S., Zhang Q., Bugge K., Breslow D.K., Searby C.C., Nachury M.V., Sheffield V.C. // PLoS Genet. 2011. V. 7. P. e1002358. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002358>*
2. *Huang Q., Li W., Zhou Q., Awasthi P., Cazin C., Yap Y., Mladenovic-Lucas L., Hu B., Jeyasuria P., Zhang L., Granneman J.G., Hess R.A., Ray P.F., Kherraf Z.-E., Natarajan V., Zhang Z. // Dev. Biol. 2021. V. 477. P. 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.05.006>*
3. *Fliegauf M., Benzing T., Omran H. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. V. 8. P. 880–893. <https://doi.org/10.1038/nrm2278>*
4. *Lyu Q., Li Q., Zhou J., Zhao H. // J. Cell Biol. 2024. V. 223. P. e202307150. <https://doi.org/10.1083/jcb.202307150>*
5. *Downes D.J., Cross A.R., Hua P., Roberts N., Schwesinger R., Cutler A.J., Munis A.M., Brown J., Mielczarek O., de Andrea C.E., Melero I., COMBAT Consortium, Gill D.R., Hyde S.C., Knight J.C., Todd J.A., Sansom S.N., Issa F., Davies J.O.J., Hughes J.R. // Nat. Genet. 2021. V. 53. P. 1606–1615. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00955-3>*

6. Anderson R.M., Heesterbeek H., Klinkenberg D., Déirdre Hollingsworth T.D. // Lancet. 2020. V. 395. P. 931–934.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30567-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30567-5)
7. Tang X., Wu C., Li X., Song Y., Yao X., Wu X., Duan Y., Zhang H., Wang Y., Qian Z., Cui J., Lu J. // Natl. Sci. Rev. 2020. V. 7. P. 1012–1023.
<https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>
8. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.-L. // Nat. Rev. Microbiol. 2021. V. 19. P. 141–154.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
9. Lu J., Sun P.D. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 18579–18588.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015303>
10. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. // Nature. 2020. V. 581. P. 215–220.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
11. Hajizadeh F., Khanizadeh S., Khodadadi H., Mokhayeri Y., Ajorloo M., Malekshahi A., Heydaria E. // Microb. Pathog. 2022. V. 168. P. 105595.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105595>
12. Wysocki J., Schulze A., Batlle D. // Biomolecules. 2019. V. 9. P. 886.
<https://doi.org/10.3390/biom9120886>
13. Lu J., Sun P.D. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. P. 18579–18588.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015303>
14. Guy J.L., Lambert D.W., Warner F.J., Hooper N.M., Turner A.J. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1751. P. 2–8.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.10.010>
15. Iwasaki M., Saito J., Zhao H., Sakamoto A., Hirota K., Ma D. // Inflammation. 2021. V. 44. P. 13–34.
<https://doi.org/10.1007/s10753-020-01337-3>
16. Ren Y., Lv L., Li P., Zhang L. // J. Infect. 2022. V. 85. P. e21–e23.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.04.019>
17. Klink B.U., Gatsogiannis C., Hofnagel O., Wittighofer A., Raunser S. // eLife. 2020. V. 9. P. e53910.
<https://doi.org/10.7554/eLife.53910>
18. Muller J., Stoetzel C., Vincent M.C., Leitch C.C., Laurier V., Danse J.M., Hellé S., Marion V., Bennouna-Greene V., Vicaire S., Megarbane A., Kaplan J., Drouin-Garraud V., Hamdani M., Sigaudo S., Francannet C., Roume J., Bitoun P., Goldenberg A., Philip N., Odent S., Green J., Cossée M., Davis E.E., Katsanis N., Bonneau D., Verloes A., Poch O., Mandel J.L., Dollfus H. // Hum. Genet. 2010. V. 127. P. 583–593.
<https://doi.org/10.1007/s00439-010-0804-9>
19. Liu P., Lechtreck K.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. E934–E943.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1713226115>
20. Jin H., White S.R., Shida T., Schulz S., Aguiar M., Gygi S.P., Bazan J.F., Nachury M.V. // Cell. 2010. V. 141. P. 1208–1219.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.015>
21. Pereira J., Lupas A.N. // Front. Mol. Biosci. 2022. V. 9. P. 895496.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.895496>
22. Ефимов В.М., Ефимов К.В., Ковалева В.Ю. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. С. 1032–1036.
<https://doi.org/10.18699/VJ19.584>
23. Takens F. // Dynamical Systems and Turbulence, Lecture Notes in Mathematics. 1981. V. 898. P. 366–381.
<https://doi.org/10.1007/BFb0091924>
24. Gower J.C. // Biometrika. 1966. V. 53. P. 325–338.
<https://doi.org/10.1093/biomet/53.3-4.325>
25. Cavalli-Sforza L.L., Menozzi P., Piazza A. // J. Asian Studies. 1995. V. 54. P. 2173–2219.
<https://doi.org/10.2307/2058750>
26. Kawashima S., Pokarowski P., Pokarowska M., Kolinski A., Katayama T., Kanehisa M. // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36. P. D202–D205.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm998>
27. Benjamini Y., Hochberg Y. // J. R. Statist. Soc. B. 1995. V. 57. P. 289–300.
<https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
28. Hammer Ø., Harper D.A., Ryan P.D. // Palaeontologia Electronica. 2001. V. 4. P. 1–9.
https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
29. Polunin D., Shtaiger I., Efimov V. // bioRxiv. 2019. P. 803684.
<https://doi.org/10.1101/803684>

Structural Analysis of LZTFL1 Protein by the Principal Component Analysis Method (PCA-seq)

I. I. Khegay*, #, X. Yu**, and V. M. Efremov*, **

Phone: +7 (383) 363-49-63; e-mail: khegay@bionet.nsc.ru

* *Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, RAS,
prosp. Akad. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

** *Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

The single-nucleotide mutation rs17713054G>A in the promoter region of LZTFL1 (leucine zipper transcription factor like 1) gene is a factor in the severe course of coronavirus infection COVID-19. Computer statistical analysis of the gene by principal component analysis (PCA-seq) revealed the presence of a high correlation between the first principal component of the translated amino acid sequence and eleven amino acid indices of the AAindex database, characterizing the physicochemical and biochemical properties of the protein. The indices BEGF750102, CHOP780209, PALJ810110, GEIM800107, QIAN880121, LEVM780102, PRAM900103 are associated with β -folding parameters. The LZTFL1 protein is part of the Bardet-Biedl Syndrome (BBS) protein complexes that regulate intracellular transport in the ciliated epithelium of the lungs. It is assumed that the presence of β -sheet elements in the structure of the LZTFL1 protein plays an important role in ACE2 receptor-mediated endocytosis, stimulating the rate of angiotensin-converting enzyme 2 recycling and accelerating the delivery of adhered coronavirus SARS-CoV-2 virions into the cell during the initiation of severe acute respiratory syndrome COVID-19.

Keywords: LZTFL1 protein, ciliary epithelium, ACE2 receptor, amino acid indices, BBS proteins, principal component analysis



УДК 577.15:577.29:544.165.51-76

ИНГИБИРОВАНИЕ ДИПЕТИДИЛПЕТИДАЗЫ-IV 2-СИАНОПИРРОЛИДИНОВЫМИ ИНГИБИТОРАМИ ПРОЛИЛЭНДОПЕТИДАЗЫ¹

© 2024 г. Г. И. Макаров*, #, Н. Н. Золотов**, В. Ф. Позднев***

* Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет),
Россия, 454080 Челябинск, просп. Ленина, 76

** НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Россия, 125315 Москва, Балтийская ул., 8

*** НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Россия, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

Поступила в редакцию 03.02.2024 г.

После доработки 14.02.2024 г.

Принята к публикации 15.02.2024 г.

Многие регуляторные нейропептиды содержат большое количество остатков пролина. Уникальная конформация пролиновой пептидной связи защищает пептиды от ферментативной деградации, и поэтому особый интерес представляют ферменты, расщепляющие пролильные связи в нейропептидах. Аномальные активности сериновых пептидаз, расщепляющих пептиды по карбоксильной группе остатков пролина, – пролилэндопептидазы (PEP) и дипептидилпептидазы IV (DPP4) – наблюдались у пациентов с тревожными расстройствами. PEP участвует в созревании и деградации нейропептидов и пептидных гормонов, связана с регуляцией кровяного давления, различными расстройствами центральной нервной системы. DPP4 участвует во многих физиологических процессах, в частности в гомеостазе глюкозы при диабете II типа и иммунном ответе. При изучении метаболизма N-ацильного производного ингибитора PEP аминоацил-2-цианопирролидина мы обнаружили снижение активности DPP4 в начальный момент времени. Этот неожиданный эффект наблюдался для ингибиторов общей формулы X-Y-2-S-цианопирролидин, где X – защитная группа, Y – любая аминокислота, отличная от глицина и пролина. Молекулярно-динамическое моделирование комплексов ингибиторов с протеазами показало возможность связывания ингибитора PEP в активном центре DPP4 посредством водородных связей и гидрофобных взаимодействий, допускающего сшивание нитрильной группы с остатком серина в активном центре DPP4. Проведенное исследование открывает перспективу для создания новых фармакологически активных лигандов PEP и DPP4.

Ключевые слова: пролилэндопептидаза, дипептидилпептидаза, нейропептиды, моделирование, аминоацил-2-цианопирролидин, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0132342324060082, **EDN:** NFIUSC

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известна регуляторная роль протеолитических ферментов, контролирующих в организме функции эндогенных пептидов. Считается, что эти ферменты управляют деградацией белков, активацией зиомогенов, синтезом активных пептидов из неактивных предшественников, а также инактивацией нейропептидов. Множество пептидаз содержится в мозге, равно как и в других тка-

нях. Пептидазы, участвующие в белковом обмене, необходимы для нормальной жизни клеток, но некоторые пептидазы головного мозга могут быть вовлечены в процессы, специфичные для нейронов или глиальных клеток. Даже незначительные нарушения функционирования этих ферментов вызывают развитие ряда патологических состояний центральной нервной системы (ЦНС): деменции, паркинсонизм, болезнь Альцгеймера и др. [1]. Производя, модифицируя и инактивируя нейропептиды,

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342324060082 для авторизованных пользователей. Сокращения: PEP – пролилэндопептидаза; DPP4 – дипептидилпептидаза IV типа.

Автор для связи: (эл. почта: makarovgi@susu.ru).

протеазы и пептидазы контролируют концентрацию этих биологических регуляторов.

Эндо- и экзопептидазы головного мозга играют решающую роль в инактивации множества мощных нейропептидов. Пролилэндопептидаза (ЕС 3.4.21.26, РЕР), широко распространенная в тканях млекопитающих, специфически расщепляет пептидные связи на карбоксильном конце остатка пролина в пролинсодержащих эндогенных пептидах. РЕР гидролизует тиролиберин, вазопрессин, нейротензин, вещество Р, ангиотензины и другие нейропептиды, регулирующие память. Активность РЕР изменяется у больных болезнью Альцгеймера, синдромом Паркинсона, мышечными дистрофиями и другими нейродегенеративными заболеваниями. Ди-пептидилпептидаза IV типа (ЕС 3.4.14.5, DPP4) расщепляет пептиды с незамещенных *N*-концов. Этот фермент участвует в расщеплении, например, вещества Р и гонадолиберина. DPP4 также инактивирует нейропептид Y, проявляющий анксиолитическую и нейропротекторную активность [2]. В ряде патентов показано, что психотропные препараты на основе нейропептида Y можно применять в сочетании с ингибиторами DPP4, хорошо известными как препараты для терапии инсулиннезависимого диабета II типа – ситаглиптином (Merck) и вилдаглиптином (Novartis) [3]. Другие ингибиторы DPP4 используются в качестве противоопухолевых, противоревматических, анти-ВИЧ и нейропротекторных средств. Предыдущие исследования установили участие DPP4 в механизмах развития тревоги и депрессии [4].

Роль пролинспецифических ферментов в патогенезе психических заболеваний, в том числе тревожных расстройств и депрессии, изучается уже более 20 лет. В клинической картине большой депрессии наблюдают экспрессию РЕР и подавление активности DPP4 [5]. В наших исследованиях была выявлена высокая антидепрессивная и анксиолитическая активность ингибиторов РЕР, в 5–10 раз превышающая активность таких классических психотропных препаратов, как амитриптилин и диазепам [6]. Данные об изменениях активности пролинспецифических ферментов в клинике большой депрессии послужили основой для разработки лабораторной модели тревожно-депрессивного состояния у крыс [7, 8] и исследований активности РЕР и DPP4 у боль-

ных с тревожными расстройствами при терапии феназепамом и фабомотизолом [9]. Было показано, что активность DPP4 в сыворотке крови здоровых матерей до и после родов выше, чем у небеременных здоровых женщин и повышается по мере приближения родов. Также установлено, что DPP4 участвует в процессах воспаления и нейродегенерации при ишемическом поражении ЦНС [10]. Все вышесказанное определяет перспективность целенаправленного синтеза, биохимического исследования *in vitro* и изучения фармакологических эффектов новых ингибиторов РЕР и DPP4.

Эксперименты показали, что синтезированные нами оригинальные низкомолекулярные ингибиторы РЕР и DPP4 (рис. 1) обладали выраженным ноотропными, антидепрессантными, анксиолитическими и геропротекторными свойствами [11]. Исследуя метаболизм нового ингибитора РЕР сукцинилаланил-2-цианопирролидина, мы обнаружили его способность подавлять и активность DPP4. Этот феномен был исследован также на других ингибиторах РЕР методами ферментативной кинетики, и некоторые *N*-защищенные производные 2-S-цианопирролидина ингибировали DPP4.

Но субстрат DPP4, как и аналогичный ингибитор, такой как глицил-2-цианопирролидин, должен иметь протонированный и заряженный *N*-конец, чтобы связываться с этой пептидазой. Крупные защитные группы на *N*-конце ингибиторов РЕР, активных в отношении DPP4, казалось бы, должны препятствовать их связыванию с активным центром DPP4. Поэтому мы решили исследовать взаимодействия аминокислотных производных 2-S-цианопирролидина с РЕР и DPP4, моделируя структуры соответствующих комплексов методами классической молекулярной динамики. При этом мы преследовали следующие цели: во-первых, выявить особенности взаимодействия этих веществ с активным центром РЕР, и, во-вторых, составить структурно обоснованное представление об их взаимодействии с активным центром DPP4, чтобы объяснить их неожиданную активность в ингибировании этого фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антиамнестические свойства ингибиторов РЕР хорошо известны и изучались на модели скополаминовой амнезии [12]. Наши исследо-

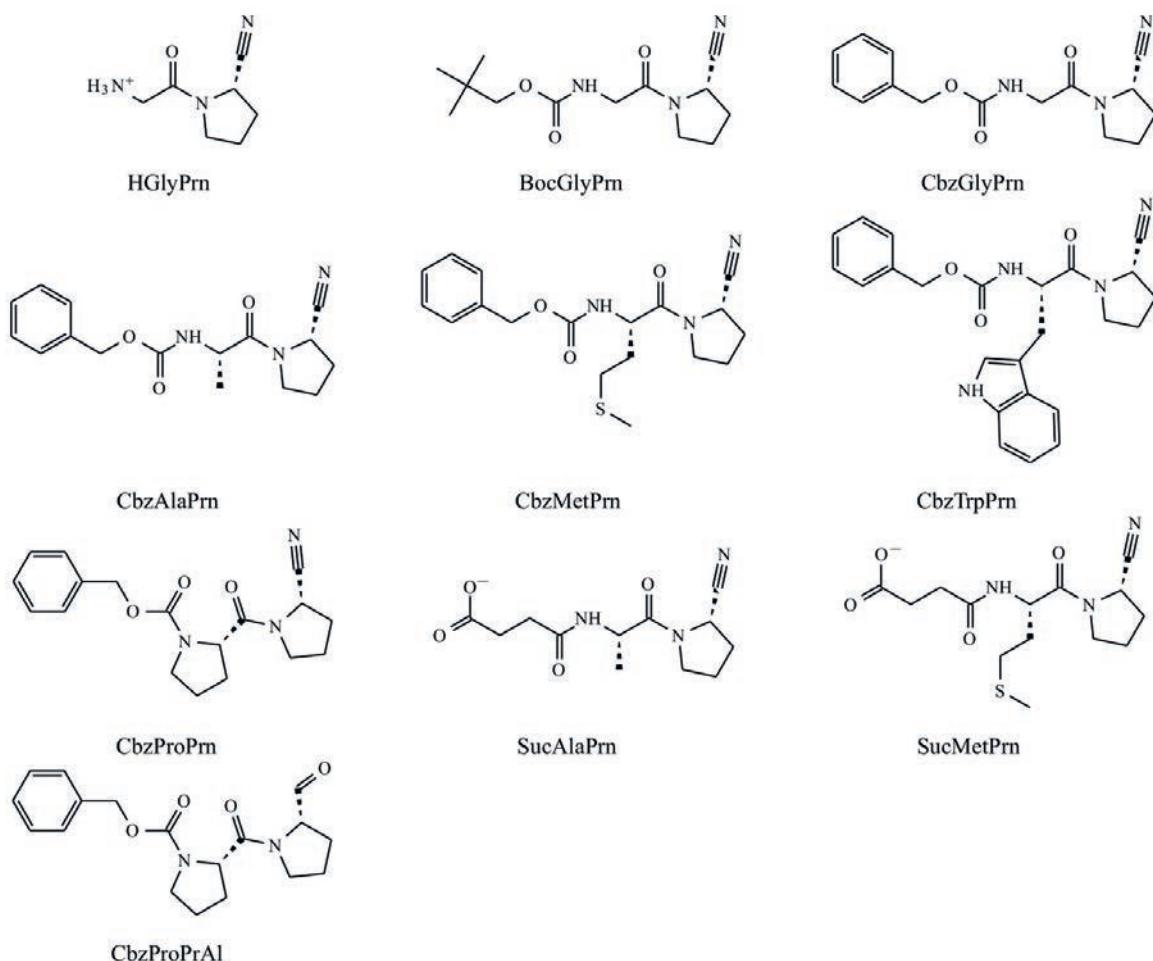


Рис. 1. Структуры ингибиторов пептидаз, исследуемых в настоящей работе.

вания антиамнестического действия цианопирролидиновых ингибиторов PEP на скополаминовую амнезию CPAR показали, что CbzMetPrn (1 мг/кг) обладает высокой активностью, снижая активность PEP в лобной коре крыс на 17% и увеличивая латентное время на 256%. Явные признаки антиамнестической активности наблюдаются и для CbzTrpPrn, однако из-за значительного разброса показателей у отдельных животных различия не достигают достоверного уровня. Более того, в условиях скополаминовой амнезии цианопирролидиновые ингибиторы PEP оказались более активными, чем такие стандартные ноотропы, как пирацетам (300 мг/кг) и пиритинол (100 мг/кг).

При изучении метаболизма *N*-ацильных производных аминоацил-2-цианопирролидиновых ингибиторов PEP мы обнаружили снижение активности ДПП-4 на начальном отрезке времени. Этот неожиданный эффект был примерно в 100 раз

слабее, чем у PEP, и наблюдался для ингибиторов общей формулы X-Y-2-S-цианопирролидина, где X – защитная группа, а Y – любая аминокислота кроме глицина. Наши последующие измерения IC₅₀ показали, что X-Y-2-S-пирролидиновые ингибиторы PEP могут ингибировать DPP4, если X представляет собой бензилоксикарбонильную или сукцинильную защитную группу, а Y не является остатком глицина или пролина, т.е. представляют собой L-аминокислотные остатки с боковыми цепями (табл. 1). Чтобы понять это явление, было проведено молекулярно-динамическое моделирование исследуемых соединений с PEP и DPP4. Структуры PEP и DPP4 были стабильными на всех полученных траекториях: RMSD пептидного остава не превышало 0.3 нм для каждой из них (см. рис. S2 в дополнительных материалах). Элементы вторичной структуры моделируемых белков сохранялись на всей траектории для каждого

Таблица 1. Константы ингибирования PEP и DPP4

Соединение	$K_i, \text{ нМ}$	
	PEP	DPP4
HGlyPrn	—	2.5 ± 0.09
BocGlyPrn	10.0 ± 0.36	—
CbzGlyPrn	3.2 ± 0.12	—
CbzAlaPrn	4.2 ± 0.15	1917 ± 69
CbzMetPrn	1.7 ± 0.06	1917 ± 33
CbzTrpPrn	7.5 ± 0.27	2917 ± 105
CbzProPrn	0.8 ± 0.03	—
CbzProPrAl	0.8 ± 0.04	—
SucAlaPrn	2.5 ± 0.09	1583 ± 57
SucMetPrn	1.7 ± 0.07	1083 ± 39

моделируемого комплекса пептидаза–ингибитор. Анализ полученных данных показывает, что цианопирролидиновые ингибиторы PEP могут устанавливаться в активном центре DPP4 с помощью водородных связей и гидрофобных взаимодействий, а различия в ингибирующей активности в отношении этих ферментов связаны со структурными особенностями их активных центров.

Активный центр PEP состоит из четырех основных элементов, каждый из которых определенным образом участвует в связывании ингибитора. Во-первых, это каталитическая триада сериновой протеазы, состоящая из остатков Ser554, His680 и Asp641, – ее серин может взаимодействовать с нитрильной группой пролилнитрила, образуя имидат и, таким образом, ковалентно связывая ингибитор. Во-вторых, это непосредственно примыкающая к нему гидрофобная полость (далее – ближняя гидрофобная полость), связывающая

пятичленный цикл пролилнитрила. Она состоит из остатков Phe476, Val644, Val580 и Trp595; на индольный фрагмент последнего и ложится пятичленный цикл пролилнитрила, направляя нитрильную группу к каталитическому серину. Индольный фрагмент Trp595 также образует водородную связь с карбонильным кислородом *N*-концевой защитной группы ингибитора, соответствующей –2 от пролина остатку в расщепляемом пептиде (рис. 2). В-третьих, это остаток Arg643, образующий водородную связь с карбонильной группой аминокислотного остатка ингибитора (соответствующего –1 от пролина остатку в расщепляемом пептиде). В-четвертых, это остатки Phe173, Ile591 и Met235, составляющие гидрофобную зону (далее – дальняя гидрофобная зона), которая связывает гидрофобную группу *N*-концевой защиты ингибитора.

Активный центр DPP4 построен иначе. Он содержит, во-первых, каталитическую триаду

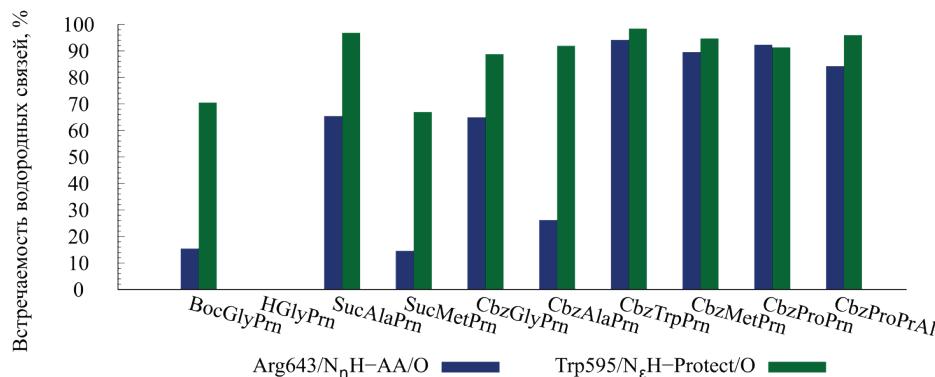


Рис. 2. Водородные связи, образуемые ингибиторами с активным центром PEP. AA – соответствующий аминокислотный остаток ингибитора, Protect – защитная группа. См. также табл. S1 в дополнительных материалах.

Ser630, His740 и Asp708, во-вторых, ближнюю гидрофобную полость, состоящую из остатков Тир547, Тир631, Тир662, Тир666, Вал656 и Тир659, чьи роли в связывании ингибитора аналогичны соответствующим элементам активного центра PEP с той разницей, что в DPP4 место Тир595 PEP занимает Тир662, не образующий водородных связей с карбонильным кислородом *N*-концевой защитной группы ингибитора. Его конформация также не позволяет пятичленному циклу пролилнитрила лежать на плоскость бензольного кольца. В-третьих, активный центр DPP4 включает в себя остатки Глу205 и Глу206 (далее – отрицательный выступ), образующие водородные связи и ионные мостики с положительно заряженным *N*-концом ингибитора, не несущего защитной группы. Также он содержит гидрофобную полость, образуемую ос-

татками Тир201, Вал202 и Вал665, в которую может входить боковая цепь *N*-концевого аминокислотного остатка ингибитора.

Строение активного сайта PEP благоприятствует связыванию ингибиторов, несущих гидрофобную защитную группу на *N*-конце, таких как BocGlyPrn или CbzGlyPrn. Все они образуют устойчивые водородные связи с Тир595 и Арг643, описанные выше (табл. 2), а их *трем-буто-*ксикарбонильные или карбобензоксильные защитные группы взаимодействуют с дальней гидрофобной зоной, что выражается в их прочном связывании с PEP (рис. 3). Бензольное кольцо карбобензоксильной защитной группы дополнительно образует π -стэкинг-взаимодействие с остатком Пhe173 (табл. 2). Сукцинильная защитная группа заряжена отрицательно, что, с одной стороны,

Таблица 2. Встречаемость π -стэкинг-взаимодействий карбобензоксильной защитной группы с активными центрами PEP и DPP4

Соединение	Встречаемость стэкинг-взаимодействий, %	
	PEP Phe173	DPP4 Tyr547
CbzGlyPrn	25	–
CbzAlaPrn	23	22
CbzMetPrn	24	17
CbzTrpPrn	19	–
CbzProPrn	23	15
CbzProPrAl	53	4

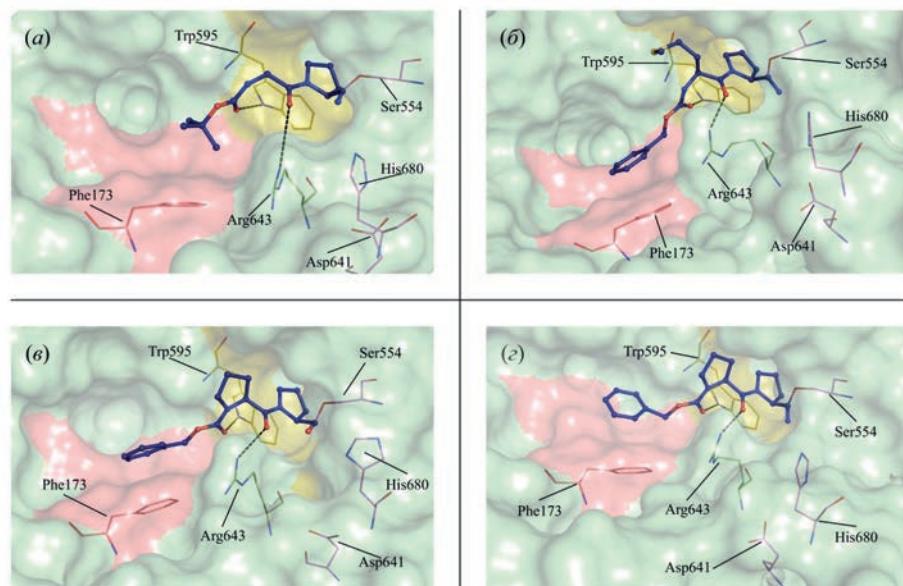


Рис. 3. Конформации пирролидоновых ингибиторов пролилэндопептидазы (показаны темно-синим цветом) в активном центре PEP, полученные молекулярно-динамическим моделированием. Водородные связи показаны черным пунктиром. Желтым цветом изображена ближняя гидрофобная зона, голубым – гидрофобная полость, красным – негативный выступ. (а) – HGlyPrn; (б) – CbzGlyPrn; (в) – CbzMetPrn; (г) – SucMetPrn.

исключает взаимодействие с дальней гидрофобной зоной PEP, но, с другой стороны, создает водородные связи и ионные мостики с остатками Arg643 и Arg252. Если же ингибитор имеет свободный и положительно заряженный *N*-конец, как HGlyPrn, то он лишен возможности взаимодействовать с дальней гидрофобной зоной и не может образовывать водородную связь с Trp595. Более того, это приводит к электростатическому отталкиванию *N*-конца от Arg643, что дестабилизирует водородную связь последнего с карбонильным углеродом. Это объясняет неспособность HGlyPrn подавлять активность PEP.

На активность ингибиторов PEP также положительно влияет конформационная жесткость аминокислотного остатка, наиболее выраженная для CbzProPrn и CbzProPrAl. Конформация остатка пролина благоприятствует стабилизации характерных водородных связей ингибитора с Trp595 и Arg643, так же как и стабилизации π -стэкинг-взаимодействия карбобензоксильной защитной группы с остатком Phe173. Сочетание этих факторов способствует повышенной активности этих ингибиторов.

Строение активного центра DPP4 требует от ингибитора наличия свободного и положительно заряженного *N*-конца, с которым может взаимодействовать отрицательный выступ, что и наблюдается для HGlyPrn. Напротив, BocGlyPrn или CbzGlyPrn и другие ингибиторы, содержащие

N-концевые защитные группы, не только не могут взаимодействовать с отрицательным выступом DPP4, но и вступают с ним в стерическое противоречие: защитная группа не помещается в отводимом ей месте. Все это препятствует связыванию таких соединений с DPP4. Впрочем, в случае CbzAlaPrn и, особенно, CbzMetPrn соединение принимает такую конформацию, в которой карбоксибензоильная защитная группа взаимодействует с остатком Tyr547 (табл. 2), а алифатическая боковая цепь погружается в гидрофобную полость. Это частично компенсирует общую слабость связывания, делая CbzMetPrn в разы более активным ингибитором DPP4, чем CbzAlaPrn и, тем более, CbzTrpPrn (табл. 1). Отрицательно заряженная сукцинильная защитная группа SucAlaPrn и, особенно, SucMetPrn, с одной стороны, отталкивается от отрицательного выступа, но, с другой стороны, может образовывать водородные связи с остатком Arg125, входящим в состав отрицательного выступа. Сольватация сукцинильной защитной группы и формирование ею водородных связей в сочетании с погружением боковой цепи остатка метионина в гидрофобную полость аналогичным SucMetPrn образом упрочняет связывание SucMetPrn относительно SucAlaPrn. Но кулоновское отталкивание сукцинильной защитной группы и отрицательного выступа делает SucMetPrn менее активным ингибитором DPP4, нежели CbzMetPrn (рис. 4).

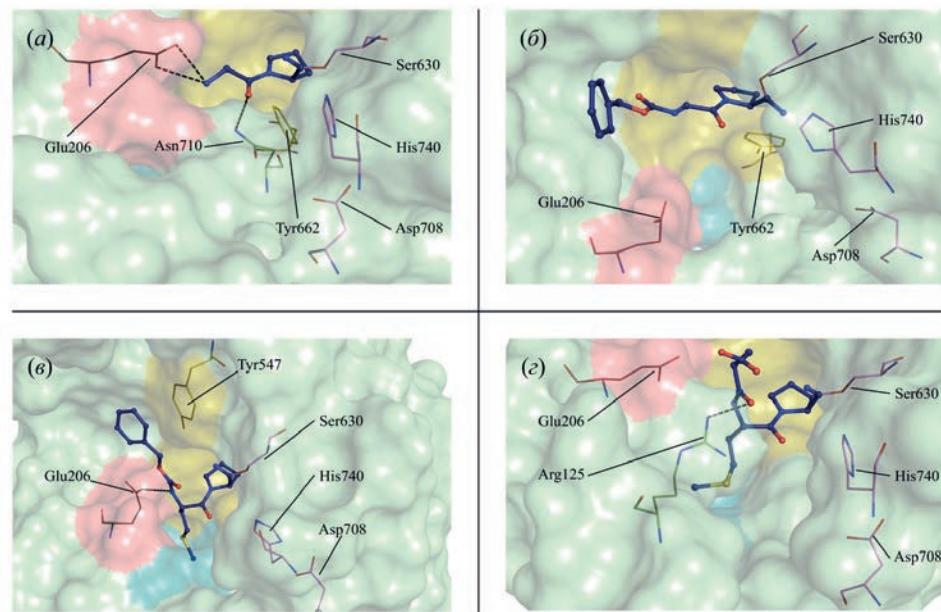


Рис. 4. Конформации пирролидоновых ингибиторов пролилэндепептидазы (показаны темно-синим цветом) в активном центре DPP4, полученные молекулярно-динамическим моделированием. Водородные связи показаны черным пунктиром. Желтым цветом изображена ближняя гидрофобная зона, голубым – гидрофобная полость, красным – негативный выступ. (а) – HGlyPrn; (б) – CbzGlyPrn; (в) – CbzMetPrn; (г) – SucMetPrn.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез производных 2-S-цианопирролидина (общие сведения). Все реагенты лабораторного качества и *N*-бензилоксикарбонил-L-пролил-L-пролиналь (CbzProPrAl) были получены от Sigma-Aldrich (США). Температуры плавления определяли на автоматическом приборе EZ-Melt (Stanford Research Systems, США) без поправки.

Протекание всех реакций отслеживали с помощью тонкослойной хроматографии, проводившейся на предварительно покрытых пластинах Merck (силикагель 60 F254, 0.25 мм) и визуализированной путем гашения флуоресценции в УФ-свете (254 нм). Оптическое вращение определяли с использованием поляриметра DIP-1000 (Jasco, Япония) при 25°C и длине волн 589 нм. Спектры ^1H -ЯМР получены на ЯМР-спектрометрах Bruker Avance II (400 МГц) и Bruker Fourier 300 (300 МГц) (Bruker, Германия). Масс-спектры получены на масс-спектрометре HP GS/MS 5890/5972 (Hewlett-Packard, США).

Все синтезированные соединения были очищены до хроматографической чистоты посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе LC20AD (Shimadzu, Япония), длина волны 214 нм, колонка Waters Symmetry C18, 3.5 мкМ, 2.1 × 150 мм, скорость потока 0.4 мл/мин. В качестве элюентов использовали 0,1%-ный раствор ТФУ в воде (A) и 0,1%-ный раствор трифтормукусной кислоты в

ацетонитриле (B) при градиенте 5–95% элюента B за 15 мин.

Общая процедура синтеза *N*-защищенных карбонитрилов дипептидов. *N*-защищенные карбонитрилы дипептидов использовались в настоящей работе как сами по себе, так и в качестве предшественников для синтеза других исследуемых соединений. Общая процедура синтеза этих соединений показана на рис. 5.

Суспензию 1.3 г (11 ммоль) пролина, 1.6 г (11 ммоль) K_2CO_3 и 0.1 г тетрабутиламмоний-гидроксида в 10 мл диоксана перемешивали 15 мин, добавляли 10 ммоль *N*-оксисукцинимидного эфира *N*-защищенной L-аминокислоты и перемешивали в течение 10 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой (25 мл), перемешивали 1 ч и экстрагировали этилацетатом с эфиром (1 : 1, 15 мл), водный раствор подкисляли 1 М HCl до pH 2–3 и экстрагировали этилацетатом (сначала 50 мл, затем 20 мл). Полученные экстракти объединяли и промывали насыщенным раствором NaCl , высушивали над MgSO_4 и упаривали, получая *N*-защищенный аминоацилпролин.

Суспензию 10 ммоль *N*-защищенного аминоацилпролина, 1 г (13 ммоль) гидрокарбоната аммония, 0.3 мл пиридиния и 3 мл (13 ммоль) дитрет-бутилпирокарбоната в 10 мл ацетонитрила перемешивали в течение 16 ч, затем разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали последовательно смесью эфира с гексаном (1 : 1, 20 мл) и этилацетатом (сначала 50 мл, затем 20 мл). Этил-

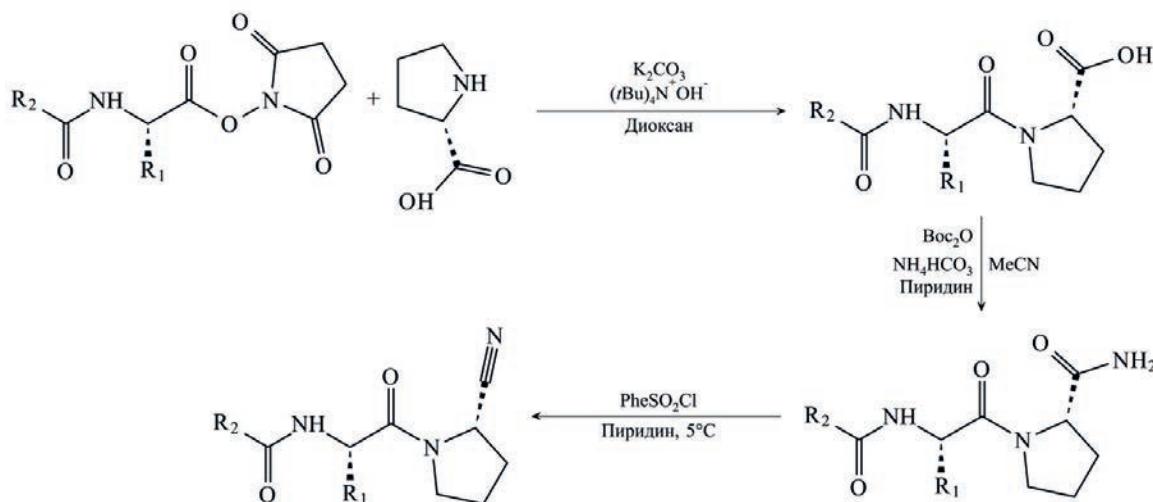


Рис. 5. Общая процедура синтеза *N*-защищенных карбонитрилов дипептидов. R_1 – боковая цепь аминокислоты, R_2 – *трет*-бутил или бензил.

ацетатные экстракты объединяли, промывали насыщенным раствором NaCl и высушивали над MgSO_4 . Растворитель упаривали, а остаток растирали в смеси эфира с гексаном, получая амид *N*-защищенного аминоацилпролина в виде кристаллического порошка [13].

К охлажденному до 5°C раствору 6.5 ммоль амида *N*-защищенного аминоацилпролина в 10 мл пиридина добавляли порциями 1.7 мл (13 ммоль) бензолсульфохлорида. Реакционную смесь перемешивали при 15–17°C в течение 16 ч, затем растворитель упаривали в вакууме, а остаток растворяли в этилацетате. Полученный раствор последовательно промывали водой, 5%-ным раствором H_2SO_4 , водой, насыщенным раствором NaCl и высушивали над MgSO_4 . Растворитель упаривали, а остаток кристаллизовали из эфира, получая целевой нитрил *N*-защищенного аминоацилпролина в виде белого кристаллического порошка [14].

***N*-трет-Бутилоксикарбониламино-глицил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (BocGlyPrn).** Белый порошок (2.1 г, 87%); т. пл. 62°C; $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ (*c* 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

***N*-Бензилоксикарбониламино-глицил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (CbzGlyPrn).** Белый порошок (2.4 г, 83%); т. пл. 60°C; $[\alpha]_D^{20} = -108^\circ$ (*c* 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$); MS (ESI $^+$): m/z 288.1 [$M + \text{H}$] $^+$.

***N*-Бензилоксикарбониламино-L-аланил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (CbzAlaPrn).** Белый порошок (2.4 г, 80%); т. пл. 59°C; $[\alpha]_D^{20} = -182^\circ$ (*c* 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

***N*-Бензилоксикарбониламино-L-метионил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (CbzMetPrn).** Белый порошок (2.8 г, 78%); т. пл. 73°C; $[\alpha]_D^{20} = -95^\circ$ (*c* 0.5, CH_3OH); ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 250 МГц): 7.35 (с, 5H), 5.84 (д, 1H), 5.08 (м, 2H), 4.72 (м, 1H), 4.66 (м, 1H), 3.77 (д, 2H), 2.56 (м, 2H), 2.20 (м, 2H), 2.12 (с, 3H), 2.06–1.82 (м, 2H); MS (ESI $^+$): m/z 362.1 [$M + \text{H}$] $^+$.

***N*-Бензилоксикарбониламино-L-триптофил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (CbzTrpPrn).** Белый порошок (3.4 г, 81%); т. пл. 70°C; $[\alpha]_D^{20} = -3.5^\circ$ (*c* 1, DMF).

***N*-Бензилоксикарбониламино-L-пролил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (CbzProPrn).** Белый порошок (2.7 г, 81%); т. пл. 135°C; $[\alpha]_D^{20} = -72^\circ$ (*c* 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$); MS (ESI $^+$): m/z 328.1 [$M + \text{H}$] $^+$.

L-Глицил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (HGlyPrn). К раствору 1.3 г (5 ммоль Вос-GlyPrn) в 5 мл дихлорметана приливали 5 мл трифторуксусной кислоты и выдерживали при комнатной температуре до исчезновения пятна исходного продукта на ТСХ (~1 ч). Затем раствор выдерживали в вакууме до прекращения отгонки трифторуксусной кислоты, к остатку приливали 10 мл 1 М раствора HCl в уксусной кислоте и снова упаривали досуха. Остаток кристаллизовали растиранием в эфире, полученный порошок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали в вакууме. Белый порошок (0.7 г, 79%); т. пл. 149°C; $[\alpha]_D^{20} = -139^\circ$ (*c* 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

Синтез *N*-сукцинилированных карбонитрилов дипептидов (общая процедура). К раствору 5 ммоль *N*-трет-бутилоксикарбонилированного аминоацилпролина в 5 мл дихлорметана приливали 5 мл трифторуксусной кислоты и выдерживали при комнатной температуре до исчезновения пятна исходного продукта на ТСХ (~1 ч). Затем раствор выдерживали в вакууме до прекращения отгонки трифторуксусной кислоты, к остатку приливали 10 мл 1 М раствора HCl в уксусной кислоте и снова упаривали досуха. Остаток кристаллизовали растиранием в эфире, полученный порошок гидрохлорида L-аланилпролилнитрила отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали в вакууме. К раствору 0.41 г (2 ммоль) гидрохлорида L-аланилпролилнитрила в 3 мл дихлорметана приливали раствор 0.22 г (2.2 ммоль) янтарного ангидрида в 3 мл дихлорметана, добавляли 0.25 мл триэтиламина. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре 3–5 ч, контролируя по ТСХ, затем последовательно промывали 5%-ным раствором лимонной кислоты, водой, насыщенным раствором NaCl , высушивали над MgSO_4 и упаривали. Получали целевой продукт в виде смолы. Смолу растирали в эфире, после чего эфир декантировали и кристаллизовали оставшуюся смолу из смеси этилацетата с гексаном.

***N*-Сукцинил-L-аланил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (SucAlaPrn).** Белый порошок (1.1 г, 81%); т. пл. 124°C; $[\alpha]_D^{20} = -178^\circ$ (*c* 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$); MS (ESI $^+$): m/z 290.1 [$M + \text{Na}$] $^+$.

***N*-Сукцинил-L-метионил-2*S*-пирролидин-2-карбонитрил (SucMetPrn).** Белый порошок (1.1 г, 80%); т. пл. 135°C; $[\alpha]_D^{20} = -72^\circ$ (*c* 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

Ингибирующая активность производных 2-S-цианопирролидина. В работе использовали препараты PEP и DPP-IV, выделенные из мозга крысы, как описано ранее [15], с модификациями. Вкратце, гомогенат мозга крысы осаждали сульфатом аммония, затем проводили ионообменную хроматографию на DEAE-Sephadex A-50, гель-хроматографию на Sephadex G75 и высокоэффективную жидкостную хроматографию на колонке MonoQ с использованием FPLC. По данным электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия полученные препараты ферментов представляли собой гомогенные мономеры с молекулярными массами 75 кДа (PEP) и 110 кДа (DPP4) соответственно. Очищенные ферменты концентрировали ультрафильтрацией и хранили при 80°C.

Активность ферментов измеряли по гидролизу синтетических субстратов, при котором высвобождался 7-амино-4-метилкумарин (AMC), определяемый флуорометрически: спектр флуоресценции свободного AMC отличается от такового для AMC, ацилированного пептидом. Концентрацию AMC определяли после 30 мин инкубации при 37°C по величине флуоресценции на спектрофлуорометре LS-5B (Perkin-Elmer, США) с параметрами: возбуждение при 380 нм, флуоресценция при 460 нм, щель 2.5 нм. Удельную активность пептидаз А рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{E - C}{S - B} \cdot \frac{1}{tV}$$

где E – флуоресценция пробы (380/460 нм); C – флуоресценция смеси, содержащей по 0.05 мл субстрата и фермента, 1.9 мл Tris-HCl-буфера и 1 мл ацетатного буфера (pH 4.0); S – флуоресценция смеси, содержащей 0.05 мл субстрата, 1.93 мл Tris-HCl-буфера, 1 мл ацетатного буфера (pH 4.0) и 0.02 мл раствора AMC концентрации 2 нМ; B – флуоресценция смеси, содержащей 0.05 мл субстрата, 1.95 мл Tris-HCl-буфера и 1 мл ацетатного буфера (pH 4.0); t – время инкубации, V – объем образца в мл.

Ферментативную реакцию останавливали добавлением в инкубационную смесь 1 мл ацетатного буфера (pH 4.0). Инкубационную смесь составляли из 0.05 мл ферментного препарата в 0.02 M Tris-HCl-буфере (pH 7.5) соответствующего типа, 0.05 мл раствора субстрата в DMSO концентрации 1 мг/мл и 1.9 мл Tris-HCl-буфера. Активность PEP измеряли по гидролизу Z-Ala-Pro-AMC. При этом использовали Tris-HCl-буфер (pH 8.0), содержащий по 1 мМ ЭДТА-Na₂, дитиотреитола и NP-40. Активность DPP4 из-

меряли по гидролизу Gly-Pro-AMC. При этом использовали Tris-HCl-буфер (pH 7.5). Обработку результатов выполняли в пакете GraphPad PRISM 4.0, полученные активности ингибиторов представлены в табл. 1.

Антиамнестическая активность производных 2-S-цианопирролидина. Исследования выполняли на 42 самцах беспородных белых крыс массой 180–220 г возраста 2 мес, полученных из питомника лабораторных животных филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА. В качестве модели обучения использовали условный рефлекс пассивного избегания (CPAR). Во время обучения крысу помещали на небольшую платформу перед входом в темную камеру установки Lafayette Instrument USP (США), состоящей из двух соединенных между собой ярко освещенной и темной камер. Камеры разделяет дверца, через которую животное может свободно перемещаться из освещенной камеры в темную. В темной камере пол представляет собой металлическую сетку, по которой пропускаются импульсы электрического тока. Сразу после входа в темную камеру крыса получала болезненную стимуляцию электрическим током силой 0.5 мА через напольный электрод длительностью 10 с или до тех пор, пока крыса не выбежала из камеры. Крысу считали обученной, если она не заходила в темную камеру в течение следующих 30 с. В случае входа в темную камеру обучение повторяли. Через 24 ч проводили тест на рефлекторное воспроизведение. В этом случае крысу помещали на освещенное место и регистрировали латентное время (LT) ее входа в темную камеру. Время наблюдения составляло 3 мин. Критерием рефлекторного воспроизведения считали LT входа в темную камеру; также подсчитывали количество особей, не заходящих в темную камеру в течение 3 мин. Амнезию моделировали внутрибрюшинным введением крысам 1 мг/кг скополамина, блокатора M-холинорецепторов, за 15 мин до вызывания CPAR. Исследуемый ингибитор PEP вводили внутрибрюшинно за 30 мин до начала исследования CPAR в соответствующих дозах. В каждую экспериментальную группу животных входило от 8 до 16 крыс.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 (TIBCO Software, США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка с последующей оценкой однородности дисперсий по критерию Левена. В случае нормального распределения в экспериментальных группах и соблюдения однородности дисперсий

между группами дальнейшую обработку проводили с использованием метода параметрической статистики *t*-критерия Стьюдента.

Животных содержали в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к проектированию, оборудованию и содержанию экспериментальных биологических клиник (вивариев)”. Перед декапитацией крыс анестезировали уретаном (1500 мг/кг внутрибрюшинно).

Молекулярно-динамическое моделирование. В молекулярно-динамическом моделировании использовали структуру пролилэндопептидазы человека (PEP), извлеченную из полученной методом рентгеноструктурного анализа структуры с разрешением 1.56 Å (PDB ID: 3DDU) [16], и структуру дипептидилпептидазы 4 типа человека (DPP4), извлеченную из полученной тем же методом структуры с разрешением 1.76 Å (PDB ID: 5T4B) [17], причем для моделирования каждого фермента было взято по одной субъединице, а содержащиеся в них лиганды были изъяты. В выбранных таким образом структурах ферментов устанавливали докингом структуры моделируемых соединений, применяя пакет rDock [18] с 1000 запусков оптимизационного процесса так, чтобы расположение остатка пролилнитрила относительно остатков серина, гистидина и аспарагиновой кислоты каталитической триады и в PEP, и в DPP4 было таким же, как для остатка пролина тетрапептида GFRP, образовавшего комплекс с мутантной PEP свиньи, структура которой с разрешением 2.35 Å (PDB ID: 1UOO) была получена в работе [19]. Полученные конформации были отсортированы по их сродству к мишени, оцененному программой rDock. Положения и конформации ингибиторов с наивысшими предсказанными сродствами были установлены в описанных выше структурах PEP и DPP4. В ходе моделирования остаток пролилнитрила был ковалентно связан с каталитическим остатком серина с образованием имидата [20], как и остаток пролиналя, образующего полуацеталь [21] (рис. 2).

Все расчеты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий проводили с использованием пакета GROMACS [22, 23] версий 5.0.4 и 5.1.4. Аминокислотные остатки и производные пролилнитрила моделировали с использованием силового поля parm99sb [24]. При этом оптимизированные трехмерные структуры и молекулярные электростатические потенциалы вновь параметризуемых остатков и соединений получали квантово-химическими расчетами методом Хартри-Фока с базисом 6-31G*. Точечные заряды вычисляли в модели RESP [25].

Все моделирования выполняли при температуре 300 К с периодом привязки 0.1 пс под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [26] и периодических граничных условиях с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Беренсена [27] с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывали посредством сети частиц Эвальда [28] с шагом сетки 0.125 нм и четвертым порядком интерполяции. Моделируемые системы были центрированы в тетрагональных ячейках соответствующих размеров ($8.4 \times 7.5 \times 7.5$ нм для PEP и $8.4 \times 8.4 \times 8.4$ нм для DPP4), заполненных молекулами воды TIP4P_{EW} [29]. Остаточный отрицательный заряд системы был компенсирован ионами калия с оптимизированными параметрами [30], которыми случайным образом заменяли молекулы воды. Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывали в файл траектории каждые 25 пс. Для ограничения длин связей с атомами водорода использовали алгоритм LINCS [31]. Протяженность траектории для каждой смоделированной системы составляла 200 нс.

Анализ траекторий включал в себя анализ водородных связей и стэкинг-взаимодействий, которые выполняли так же, как в работе [32]. При выполнении анализа кадры полученных молекулярно-динамических траекторий были кластеризованы методом GROMOS [33] с отсечкой 1 нм по конформации ингибитора пептидазы и аминокислотных остатков белка, удаленных от него не более чем на 1 нм, причем атомы водорода не учитывали. Центроид наиболее населенного кластера, выделенного из множества кадров, использовали для описания конформации соответствующего ингибитора в сайте связывания и визуализации. Стабильность структур пептидаз отслеживали посредством расчета среднеквадратического отклонения (RMSD) атомов пептидного остова (N, C_α, C, O) от исходной структуры и выявления элементов вторичной структуры в каждом кадре каждой полученной траектории с помощью программы DSSP [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеолиз включен во все процессы, связанные с превращением белка с момента его синтеза и до полного гидролиза. Все без исключения структурные и функциональные белки, ферменты, гормоны пептидной природы, многочисленные по строению и функциям регуляторные пептиды находятся под контролем пептидгидролаз, что ставит в зависимость клеточный метаболизм и организм в целом от состояния протеолитических ферментов.

PEP и DPP4 – наиболее изученные пролинспецифические ферменты, участвующие в патогенезе ряда заболеваний. Они расщепляют пептидные связи, образованные карбоксильной группой остатка пролина и другой аминокислотой. Обе пептидазы способны с гораздо меньшей эффективностью гидролизовать связь после остатка аланина. Для PEP и DPP4, по сравнению с другими ферментами, известно наибольшее количество разнообразных специфических ингибиторов. Большой интерес к поиску ингибиторов этих ферментов объясняется исключительной ролью последних в регуляции метаболизма. К таким ингибиторам относятся альдегидные и нитрильные аналоги субстратов пептидаз, обладающие потенциалом для медицинского применения. Так, нитрильные аналоги субстратов PEP и DPP4 успешно используются в лечении болезни Альцгеймера и диабета.

В настоящей работе мы объяснили выявленную способность нитрильных ингибиторов PEP подавлять активность DPP4, применяя методы докинга и молекулярно-динамического моделирования. Приложение этих методов позволило нам смоделировать структуры комплексов изучаемых соединений с активными центрами PEP и DPP4 и, основываясь на сравнении полученных структур, показать, каким образом некоторые *N*-защищенные пептидоподобные ингибиторы PEP способны подавлять активность DPP4, хотя пептидоподобным ингибиторам аминопептидаз необходима свободная *N*-концевая аминогруппа. Этот феномен также может объяснить и данные по снижению активности DPP4 после введения животным ингибиторов PEP. Используемый нами подход может быть использован для прогнозирования структуры новых перспективных ингибиторов PEP и DPP4, обладающих высокой фармакологической активностью. Применение аминокислотных производных 2-*S*-цианопирролидина открывает перспективу создания новых эффективных препаратов, действующих на пептидергическое звено регуляции функциональных систем в норме и при различных патологических процессах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Вычислительному центру МГУ им. М.В. Ломоносова за предоставленную возможность провести расчеты молекулярной динамики на суперкомпьютере “Ломоносов-II”.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Российской Федерации (Постановление № 211 от 16.03.2013 г.), соглашение № 02.A03.21.0011.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проводили в соответствии с международными и российскими нормативными документами: приказом Минздрава РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. и директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза о защите животных, используемых в научных целях.

Эксперименты одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института фармакологии им. В.В. Закусова (протокол № 1 от 20 января 2017 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор ВФП синтезировал и охарактеризовал все изученные соединения. Автор ННЗ провел исследования по кинетике взаимодействия ингибиторов с ферментами и внес вклад в подготовку текста статьи. Автор ГИМ провел все вычислительные исследования и подготовил текст статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Role of Proteases in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases / Eds. Lajtha A., Banik N. New York: Kluwer Academic, 2002. <https://doi.org/10.1007/b111075>
2. Holmes A., Heilig M., Rupniak N.M., Steckler T., Griebel G. // Trends Pharmacol. Sci. 2003. V. 24. P. 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.09.011>
3. Thornberry N., Weber A. // Curr. Top. Med. Chem. 2007. V. 7. P. 557–568. <https://doi.org/10.2174/156802607780091028>
4. Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Orlova I.N., Grafová V.N., Smirnova V.S., Rodina V.I., Kukushkin M.L., Kryzhanovsky G.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 2010. V. 149. P. 479–484. <https://doi.org/10.1007/s10517-010-0975-3>
5. Maes M., Goossens F., Scharpé S., Meltzer H.Y., D'Hondt P., Cosyns P. // Biol. Psychiatry. 1994. V. 35. P. 545–552. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0006-3223(94)90101-5)
6. Krupina N., Khlebnikova N., Zolotov N., Kushnareva E., Bogdanova N., Orlova I. // In: Encyclopedia of Pharmacology Research / Eds. Cheng D., Liu G. New York: Nova Science Publ., 2013. P. 137–156. <https://novapublishers.com/shop/encyclopedia-of-pharmacology-research-2-volume-set/>

7. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Bogdanova N.G., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. V. 147. P. 26–30.
<https://doi.org/10.1007/s10517-009-0458-6>
8. Krupina N.A., Kushnareva E.Y., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. V. 147. P. 285–290.
<https://doi.org/10.1007/s10517-009-0493-3>
9. Syunyaakov T., Zolotov N., Neznamov G. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2017. V. 27. P. S985.
[https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(17\)31734-0](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(17)31734-0)
10. Yakovleva A., Zolotov N., Sokolov O., Kost N., Kolyasnikova K., Mikheeva I.G. // Neuropeptides. 2015. V. 52. P. 113–117.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.05.001>
11. Krupina N.A., Bogdanova N.G., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. V. 154. P. 606–609.
<https://doi.org/10.1007/s10517-013-2010-y>
12. Yoshimoto T., Kado K., Matsubara F., Koriyama N., Kaneto H., Tsuru D. // J. Pharmacobiodyn. 1987. V. 10. P. 730–735.
<https://doi.org/10.1248/bpb1978.10.730>
13. Pozdnev V.F. // Tetrahedron Lett. 1995. V. 36. P. 7115–7118.
[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)01412-B](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)01412-B)
14. Cobb A.J.A., Shaw D.M., Longbottom D.A., Gold J.B., Ley S.V. // Org. Biomol. Chem. 2005. V. 3. P. 84–96.
<https://doi.org/10.1039/b414742a>
15. Cummins P.M., Dowling O., O'Connor B.F. // In: Methods in Molecular Biology / Eds. Walls D., Loughran S.T. New York: Humana Press. 2011. P. 215–228.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_12
16. Haffner C.D., Diaz C.J., Miller A.B., Reid R.A., Madauss K.P., Hassell A., Hanlon M.H., Porter D.J., Becherer J.D., Carter L.H. // Bioorg. Med. Chem. Letters. 2008. V. 18. P. 4360–4363.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.06.067>
17. Pisarnitski D.A., Zhao Z., Cole D., Wu W.-L., Domalski M., Clader J.W., Scapin G., Voigt J., Soriano A., Kelly T., Powles M.A., Yao Z., Burnett D.A. // Bioorg. Med. Chem. 2016. V. 24. P. 5534–5545.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.007>
18. Ruiz-Carmona S., Alvarez-Garcia D., Foloppe N., Garmendia-Doval A.B., Juhos S., Schmidtke P., Barril X., Hubbard R.E., Morley S.D. // PLoS Comput. Biol. 2014. V. 10. P. e1003571.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003571>
19. Szeltner Z., Rea D., Renner V., Juliano L., Fulop V., Polgar L. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 48786–48793.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M309555200>
20. Venalainen J.I., Garcia-Horsman J.A., Forsberg M.M., Jalkanen A., Wallen E.A., Jarho E.M., Christiaans J.A., Gynther J., Mannisto P.T. // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 71. P. 683–692.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.11.029>
21. Cunningham D.F., O'Connor B. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1343. P. 160–186.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(97\)00134-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(97)00134-9)
22. van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A., Berendsen H. // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1701–1718.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
23. van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Kutzner C. // J. Chem. Theory Comput. 2008. V. 4. P. 435–447.
<https://doi.org/10.1021/ct700301q>
24. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. // Proteins. 2006. V. 65. P. 712–725.
<https://doi.org/10.1002/prot.21123>
25. Bayly C.I., Cieplak P., Cornell W., Kollman P.A. // J. Phys. Chem. 1993. V. 97. P. 10269–10280.
<https://doi.org/10.1021/j100142a004>
26. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. // J. Chem. Phys. 2007. V. 126. P. 014107–014106.
<https://doi.org/10.1063/1.2408420>
27. Berendsen H., Postma J., van Gunsteren W., DiNola A., Haak J. // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. P. 3684–3690.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
28. Darden T., York D., Pedersen L. // J. Chemical Physics. 1993. V. 98. P. 10089–10092.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
29. Horn H.W., Swope W.C., Pitera J.W., Madura J.D., Dick T.J., Hura G.L., Head-Gordon T. // J. Chem. Phys. 2004. V. 120. P. 9665–9678.
<https://doi.org/10.1063/1.1683075>
30. Joung I.S., Cheatham T.E. // J. Phys. Chem. B. 2008. V. 112. P. 9020–9041.
<https://doi.org/10.1021/jp8001614>
31. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. // J. Comput. Chem. 1997. V. 18. P. 1463–1472.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
32. Makarov G.I., Sumbatyan N.V., Bogdanov A.A. // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 925–932.
<https://doi.org/10.1134/S0006297917080077>
33. Daura X., Gademann K., Jaun B., Seebach D., van Gunsteren W.F., Mark A.E. // Ang. Chem. Int. Ed. 1999. V. 38. P. 236–240.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990115\)38:1/2<236::AID-ANIE236>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990115)38:1/2<236::AID-ANIE236>3.0.CO;2-M)
34. Kabsch W., Sander C. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 2577–2637.
<https://doi.org/10.1002/bip.360221211>

Inhibition of Dipeptidylpeptidase-IV by 2-S-Cyanopyrrolidine Inhibitors of Prolyl Endopeptidase

G. I. Makarov*, #, N. N. Zolotov**, and V. F. Pozdnev***

E-mail: makarovgi@susu.ru

* South Ural State University, prospr. Lenina 76, Chelyabinsk, 454080 Russia

** Research Zakusov Institute of Pharmacology, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315 Russia

*** Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10/8, Moscow, 119121 Russia

Many regulatory neuropeptides contain a large amount of proline residues. The unique proline peptide bond conformation protects these peptides from enzymatic degradation; therefore enzymes cleaving the proline peptide bonds in neuropeptides are of particular interest. The abnormal activity of serine peptidases that cleave peptides at the carboxyl group of proline residues prolyl endopeptidase (PEP) and dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) were observed in patients with anxiety disorders. PEP is involved in the maturation and degradation of neuropeptides and peptide hormones, it also is associated with the regulation of blood pressure and various disorders of the central nervous system. DPP-IV is involved in many physiological processes, in particular in glucose homeostasis in type II diabetes and immunity. When studying the metabolism of the *N*-acyl derivative of the aminoacyl-2-cyanopyrrolidine PEP inhibitor a decreasing in the activity of DPP-IV at the initial time was detected. This was an unexpected effect observed for inhibitors of the general formula X-Y-2-S-cyanopyrrolidine, where X represents the *N*-protective group and Y represents the amino acid (any besides glycine and proline). Molecular dynamics simulations of inhibitor complexes with proteases revealed the possibility of PEP inhibitors binding in the DPP-IV active site with hydrogen bonds and hydrophobic interactions that allow linkage of the nitrile group with the catalytic serine residue in the DPP-IV active site. The present study opens the prospect of creating new pharmacologically active ligands of PEP and DPP-IV.

Keywords: prolyl endopeptidase, dipeptidyl peptidase, simulation, neuropeptides, aminoacyl-2-cyanopyrrolidine, molecular dynamics



УДК 547.426:547.415.5:547.918:547.963.32

НОВЫЕ КАТИОННЫЕ УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИЕ АМФИФИЛЫ И ЛИПОСОМЫ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДОСТАВКИ КОРОТКИХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

© 2024 г. Е. В. Шмендель*, #, А. О. Буянова*, О. В. Марков**, Н. Г. Морозова*, М. А. Зенкова**, М. А. Маслов*

* Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова,
МИРЭА – Российский технологический университет,
Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

** Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 12.02.2024 г.

После доработки 22.02.2024 г.

Принята к публикации 23.02.2024 г.

Синтезированы новые катионные амфифилы, содержащие остатки лактозы или D-маннозы, и получены катионные липосомы с 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламином (DOPE). Изучены цитотоксичность и трансфицирующая активность новых углеводсодержащих амфифилов и катионных липосом в отношении клеток HEK 293, BHK и BHK IR-780. Показано, что катионные амфифилы эффективно доставляют в эукариотические клетки только короткий олигодезоксирибонуклеотид, меченный флуоресцеином, в то время как катионные липосомы, сформированные амфифилом с остатком лактозы и DOPE, эффективно опосредуют транспорт короткого олигонуклеотида и малой интерферирующей РНК и нетоксичны для клеток. Полученные катионные амфифилы могут быть использованы в качестве средств доставки нуклеиновых кислот как в индивидуальном состоянии, так и в составе катионных липосом.

Ключевые слова: манноза, лактоза, галактоза, катионный амфифил, генная терапия, катионные липосомы, нуклеиновые кислоты, цитотоксичность, трансфекция

DOI: 10.31857/S0132342324060098, **EDN:** NEYHXP

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – способ устранения причин возникновения и развития различных заболеваний, а не только сопровождающих их симптомов [1]. Для целей генной терапии используются различные терапевтические нуклеиновые кислоты (НК) (синтетические антисенсオリгонуклеотиды,

аптамеры, siРНК, мРНК, siРНК-мимики, плазмидные векторы и т.д.), которые в большинстве случаев представляют собой полианионы и не могут попасть в клетки без средств, обеспечивающих их доставку и защиту от деградации нуклеазами [2]. В качестве систем доставки НК наиболее широкое распространение получили вирусные векторы, обеспечивающие

Сокращения: BHK – фибробlastы почки хомячка; BHK-IR780 – трансгенные клетки BHK, экспрессирующие EGFP; DMAP – *N,N*-диметил-4-аминопиридин; DOPE – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин; EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; FITC-ODN – флуоресцеин-меченный олигодезоксирибонуклеотид; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; HBTU – *O*-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуроний гексафторфосфат; HEK 293 – клетки почки эмбриона человека; IC₅₀ – концентрация, при которой происходит ингибирование роста 50% клеток; Lf2000 – Lipofectamine 2000; N/P – отношение количества аминогрупп катионного амфифила к количеству фосфатных групп нуклеиновой кислоты; PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.6; siРНК – малая интерферирующая РНК; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; НК – нуклеиновая кислота; пДНК – плазмидная ДНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 600-80-80, эл. почта: elena_shmendel@mail.ru).

высокую эффективность трансдукции клеток и внутриклеточную экспрессию НК [3]. Недостатки таких векторов – ограничение размера переносимой НК, иммуногенность и высокая стоимость [4]. Для целей генной терапии разрабатываются разнообразные невирусные системы доставки, такие как катионные липосомы [5–7], полимеросомы [8], дендримеры [9], углеродные нанотрубки, неорганические наночастицы на основе оксида железа, оксида кремния, золота, квантовые точки [10, 11] и экзосомы [12]. Среди невирусных систем доставки широкое распространение получили катионные липосомы и другие липидные наночастицы благодаря их низкой иммуногенности, отсутствию ограничений в размере переносимых терапевтических НК, относительной простоте получения и возможности варьировать состав и модифицировать липидные компоненты в зависимости от природы доставляемой НК и свойств клеток в тканях-мишениях [13, 14].

Для обеспечения направленной доставки НК в состав катионных липосом могут быть включены различные адресные лиганды [15]. Так, модификация поверхности липосом остатками фолиевой кислоты [16, 17] или пептидами с RGD-мотивом [18, 19] используется для адресной доставки НК в опухолевые клетки; модификация остатками D-галактозы, специфически связывающейся с асialogликопротеиновыми рецепторами клеток печени, обеспечивает адресную доставку НК в гепатоциты [20–22]; остатки D-маннозы специфически взаимодействуют с лектинаами дендритных клеток и макрофагов [23–25], открывая новые возможности для воздействия на иммунную систему организма. Одна из стратегий создания систем направленной доставки НК в клетки-мишени – дизайн катионных амфифилов, ковалентно связанных с адресным лигандом, что одновременно обеспечивает и связывание НК, и ее доставку в клетки-мишени [26, 27]. Ранее нами был синтезирован галактозилсодержащий катионный амфи菲尔 D1 (рис. 1), который обладал низкой цитотоксичностью и обеспечивал эффективную доставку коротких и протяженных НК в эукариотические клетки без участия липида-хэлпера – 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина (DOPE) [26].

С целью создания структурных аналогов катионного амфифила D1 в данной работе нами осуществлен синтез углеводсодержащих амфифилов D2 и D3 (рис. 1), содержащих остаток спермина, необходимый для компактизации и связывания НК, диглицерид, участвующий в

формировании липидных агрегатов, а в качестве остатка углевода, улучшающего гидрофильно-липофильный баланс молекулы, – остаток лактозы или D-маннозы. Кроме того, остаток лактозы может служить адресным лигандом для доставки НК в гепатоциты печени [28], а остаток маннозы – для специфического взаимодействия с лектиновыми рецепторами дендритных клеток и макрофагов [29]. Для оценки потенциала новых катионных амфифилов были сформированы их водные дисперсии и катионные липосомы, изучена их цитотоксичность и проведена оценка способности доставлять различные НК в эукариотические клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез углеводсодержащих катионных амфифилов и получение их водных дисперсий и катионных липосом. Углеводсодержащие катионные амфифилы D2, D3 имеют разветвленную компоновку основных структурных элементов (рис. 1), которая достигалась, как описано ранее [26], путем присоединения углеводной составляющей к гидрофобному домену – 1,2-ди-*O*-тетрадецил-*rac*-глицерину, модифицированному в положении C3 бифункциональным линкером, и последующего введения региоселективно защищенного спермина через сукцинильный спейсер с дальнейшим удалением всех защитных групп (схема 1).

Гликозилирование соединения (II) [26] 2,3,6,2',-3',4',6'-гепта-*O*-ацетил- α -лактозил- и 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -D-маннозилбромидами проводили в условиях модифицированного метода Кенигса–Кнорра в аппарате Сокслета, используя в качестве промотора реакции карбонат кадмия. Реакция протекала с эффектом “соучастия” ацетильной группы при C2-атоме углеводного цикла, что приводило к преимущественному образованию 1,2-транс-гликозидов. В результате гликозилирования были получены β -аномер ((IIIa), 58%) и α -аномер ((IIIb), 45%).

Аномерная конфигурация продуктов реакции гликозилирования (IIIa) и (IIIb) была установлена с помощью ЯМР-спектроскопии. В спектрах ^1H -ЯМР присутствуют сигналы аномерных протонов с химическими сдвигами 4.37 м.д. для соединения (IIIa) и 4.73 м.д. для соединения (IIIb) и константами спин-спинового взаимодействия $J_{1,2} = 7.8$ Гц и $J_{1,2} = 1.6$ Гц соответственно. В спектре ^{13}C -ЯМР сигнал аномерного углерода имел химический сдвиг 101.22 м.д. для соединения (IIIa) и 97.68 м.д. для соединения (IIIb).

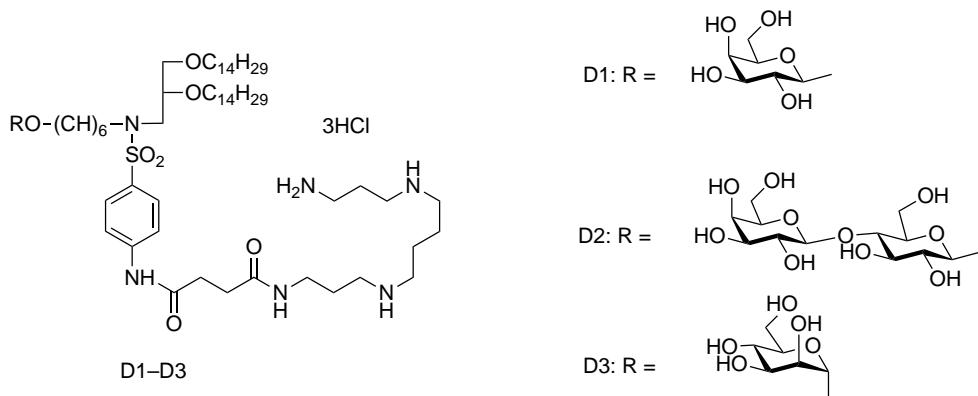


Рис. 1. Углеводсодержащие катионные амфилилы D1–D3.

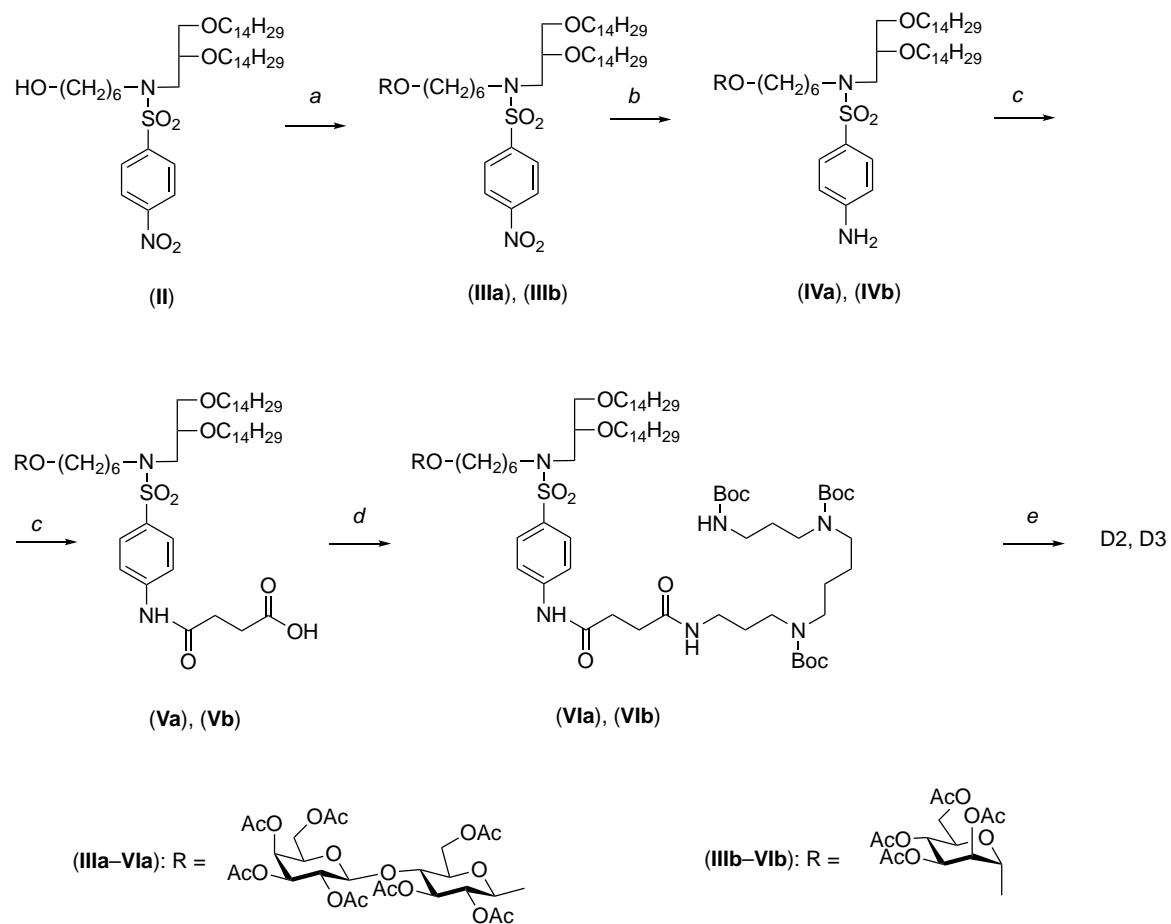


Схема 1. Синтез новых катионных амфилилов, содержащих остатки лактозы или D-маннозы. *a* – 7AcLacBr/4AcManBr, CdCO₃; *b* – Pd/C, NH₄⁺CHOО[–]; *c* – янтарный ангидрид, DMAP, Et₃N; *d* – N¹,N⁴,N⁹-три-*tert*-бутоксикарбонил-1,12-диамино-4,9-диазадодекан, HBTU, N,N-дизопропилэтиламин; *e* – 1) TFA, 2) 0.04 н. MeONa/MeOH, 3) 4 н. HCl в диоксане.

Для введения спермина в молекулу амфилила предварительно проводили каталитическое восстановление нитрогруппы в соединениях (IIIa) и (IIIb) до аминогруппы в присутствии Pd/C, используя в качестве источника водорода формиат

аммония. В результате ацилирования соединений (IVa) и (IVb) янтарным ангидридом в присутствии N,N-диметил-4-аминопиридин (DMAP) были получены карбоксипроизводные (Va) и (Vb), которые конденсировали с региоселективно за-

шищенным спермином – N^1,N^4,N^9 -три-*трет*-бутиксикарбонил-1,12-диамино-4,9-диазадеканом [30] – в присутствии *O*-(1*H*-бензо-триазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуруроний гексафторфосфата (NBUT) при 4°C и получили соединения (**VIa**) и (**VIb**) с выходами 69 и 50% соответственно.

На завершающем этапе синтеза осуществляли удаление защитных групп в соединениях (**VIa**), (**VIb**), используя опережающее деблокирование аминогрупп, действием трифтормукусной кислоты. Во избежание деструкции ключевых амфилинов D2 и D3 удаление ацетильных групп осуществляли действием 0.04 н. раствора метилата натрия в метаноле с последующей обработкой реакционной смеси раствором 4 н. HCl в диоксане. Выделение углеводсодержащих катионных амфилинов D2 и D3 проводили с использованием обращенно-фазовой хроматографии на силикагеле (LiChroprep® RP-18 для D2 и YMC-Pack ODS-AQ 12S50 для D3) и дополнительного диализа против воды, что привело к получению амфилинов D2 и D3 с выходами 64 и 55% соответственно. Структура полученных целевых амфилинов D2 и D3 была подтверждена с помощью спектроскопии (^1H - и ^{13}C -ЯМР) и масс-спектрометрии.

Ранее нами было показано, что катионный галактозосодержащий амфи菲尔 D1 (рис. 1) эффективно доставлял различные НК в эукариотические клетки [26]. Для изучения влияния структуры синтезированных углеводсодержащих катионных амфилинов на эффективность доставки НК в эукариотические клетки были получены дисперсии катионных амфилинов D2 и D3 в воде

с использованием ультразвуковой обработки. Следует отметить, что введение в структуру амфилила углеводных остатков увеличивает гидрофильность молекулы и, как следствие, ее растворимость в воде.

Известно, что введение нейтрального липида-хелпера DOPE в состав катионных липосом может улучшить эффективность трансфекции клеток [31]. На основе углеводсодержащих катионных амфилилов D1–D3 и DOPE (соотношение 1 : 1 мольн.) были получены катионные липосомы D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE с использованием метода гидратации липидной пленки с последующей обработкой ультразвуком, как описано ранее [32].

Цитотоксичность углеводсодержащих катионных амфилилов и катионных липосом. Изучение цитотоксичности катионных амфилилов D2, D3 и катионных липосом D1-DOPE, D3-DOPE проводили с помощью MTT-теста на клетках линий HEK 293 и BHK в отсутствие эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) в ростовой среде DMEM (Sigma-Aldrich, США). Значения IC_{50} для катионных амфилилов D2 и D3 составили, соответственно, 65.5 и 59.2 мкМ для клеток HEK 293, 35.4 и 17.2 мкМ для клеточной линии BHK. Значения IC_{50} для катионного амфилила D1 с остатком D-галактозы находились в пределах 20 мкМ для клеток линий HEK 293 и BHK [26].

Катионные липосомы D1-DOPE и D3-DOPE оказались нетоксичными для клеток HEK 293 вплоть до концентрации 80 мкМ. На рис. 2 в качестве примера приведен анализ цитотоксичности катионных липосом D2-DOPE, содержащих амфи-

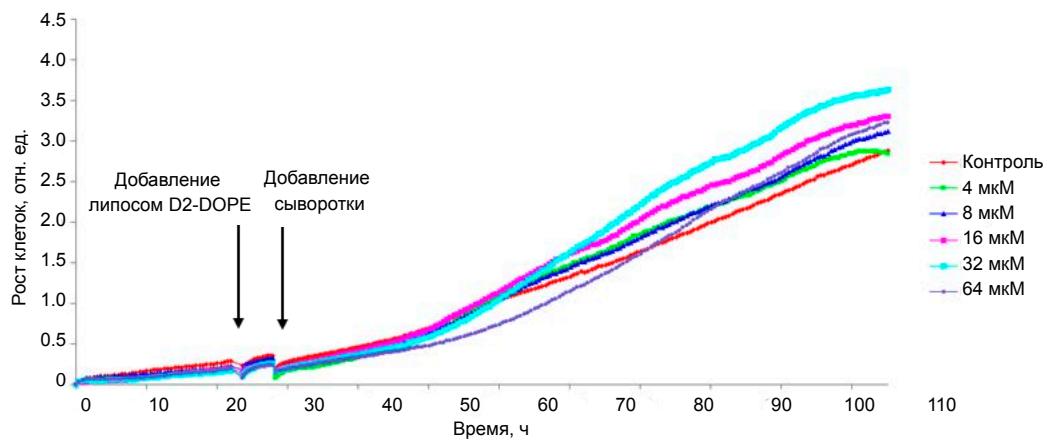


Рис. 2. Анализ цитотоксичности липосом D2-DOPE. Выживаемость клеток HEK 293 оценивали в реальном времени с помощью прибора xCELLigence. Клетки HEK 293 высаживали в 16-луночные планшеты с плотностью 5×10^3 кл./лунку. После 24 ч к клеткам добавляли катионные липосомы D2-DOPE в концентрации от 4 до 64 мкМ, после 4 ч инкубации с катионными липосомами в среду добавляли FBS до концентрации 10%.

фил с остатком лактозы, в отношении клеток HEK 293. Цитотоксичность липосом оценивали по изменению жизнеспособности клеток в реальном времени на приборе xCELLigence (ACEA Biosciences, США) в присутствии 10% FBS после 4 ч инкубации. Липосомы D2-DOPE не только не оказывали токсического действия на клетки HEK 293 во всем диапазоне использованных концентраций, но и стимулировали рост клеток (наибольший клеточный индекс наблюдался при концентрации липосом D2-DOPE 32 мкМ, рис. 2, голубая линия). Таким образом, катионные липосомы на основе углеводсодержащих амфилипов D1–D3 и DOPE, а не их водные дисперсии, обладают уникально низкой цитотоксичностью в отношении клеток HEK 293. Амфилипы D1–D3 – это поверхностно-активные вещества, которые могут воздействовать на клеточную мембрану, дестабилизируя ее и нарушая целостность липидного бислоя, тем самым проявляя большую цитотоксичность по сравнению с катионными липосомами, которые представляют структурно организованные ансамбли, состоящие из смеси амфилипов D1–D3 и фосфолипидов. В то же время цитотоксичность самих амфилипов D2 и D3 достаточно низкая в диапазоне используемых для трансфекции рабочих концентраций, которые обычно не превышают 10 мкМ.

Клетки BHK были более чувствительными к действию катионных липосом: композиция D1-DOPE, содержащая амфилип с остатком D-галактозы, обладала умеренной токсичностью ($IC_{50} = 62.3$ мкМ), тогда как липосомы D3-DOPE, содержащие амфилип с остатком D-маннозы, оказались токсичными в отношении этого типа клеток ($IC_{50} = 7.6$ мкМ).

Эффективность доставки коротких и протяженных нуклеиновых кислот *in vitro*. Катионные амфилипы D1–D3 и катионные липосомы D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE использовали для доставки короткого 25-звенного олигодезоксирибонуклеотида, меченного по 5'-концу флуоресцеином (FITC-ODN), и плазмидной ДНК pEGFP-C2 (4700 п.н.), кодирующую зеленый флуоресцентный белок (EGFP), в клетки HEK 293, а также малой интерферирующей РНК (siPHK), направленной против мРНК EGFP трансгенных клеток BHK IR-780. Трансфицирующую активность амфилипов и липосом сравнивали с активностью коммерческого препарата Lipofectamine 2000 (Lf 2000, Invitrogen, США).

Комплексы FITC-ODN с катионными амфилилами или липосомами формировали при различных соотношениях N/P (отношение количества аминогрупп катионного амфилипа D1–D3 к количеству фосфатных групп НК). Оценку эффективности трансфекции клеток HEK 293 в отсутствие (–S, рис. 4a, 4б) и в присутствии (+S, рис. 3a, 3б, 4в, 4г) 10% FBS проводили методом проточной цитометрии путем измерения количества FITC-положительных клеток (рис. 3a, 4a, 4в) и средней интенсивности флуоресценции клеток в популяции (рис. 3б, 4б, 4г).

Катионные амфилипы D1–D3 эффективно доставляли FITC-ODN, трансфицируя ~100% клеток (рис. 3a). Средняя интенсивность флуоресценции (рис. 3б), которая отражает уровень накопления FITC-ODN в клетках, увеличивалась с увеличением соотношения N/P, достигая 57–61 отн. ед. при N/P = 1.25/1, что превышает в ~7 раз значения Lf 2000.

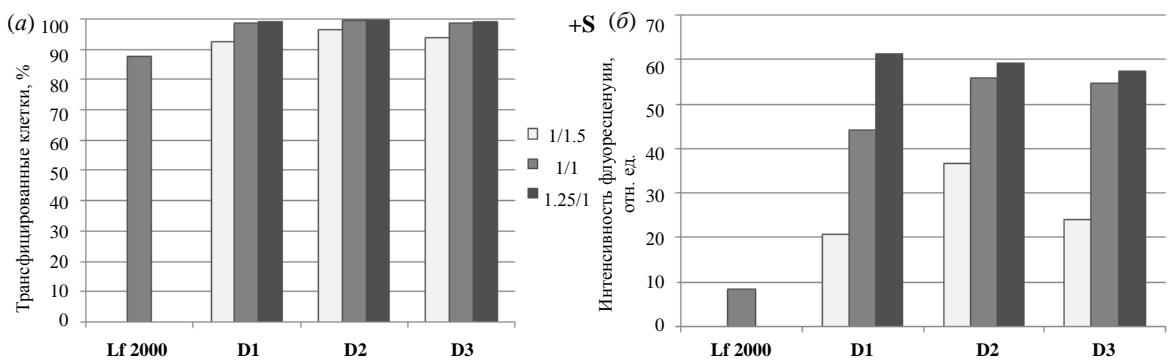


Рис. 3. Накопление комплексов FITC-ODN с катионными амфилилами D1–D3 в клетках HEK 293 в присутствии 10% FBS. Комплексы FITC-ODN/катионные амфилилы D1–D3 формировали при соотношениях N/P = 1/1.5, 1/1 и 1.25/1. Процент FITC-положительных клеток (a) и уровень средней интенсивности флуоресценции клеток в популяции (б) определяли методом проточной цитометрии через 4 ч инкубации клеток с комплексами. Стандартное отклонение не превышает 8%.

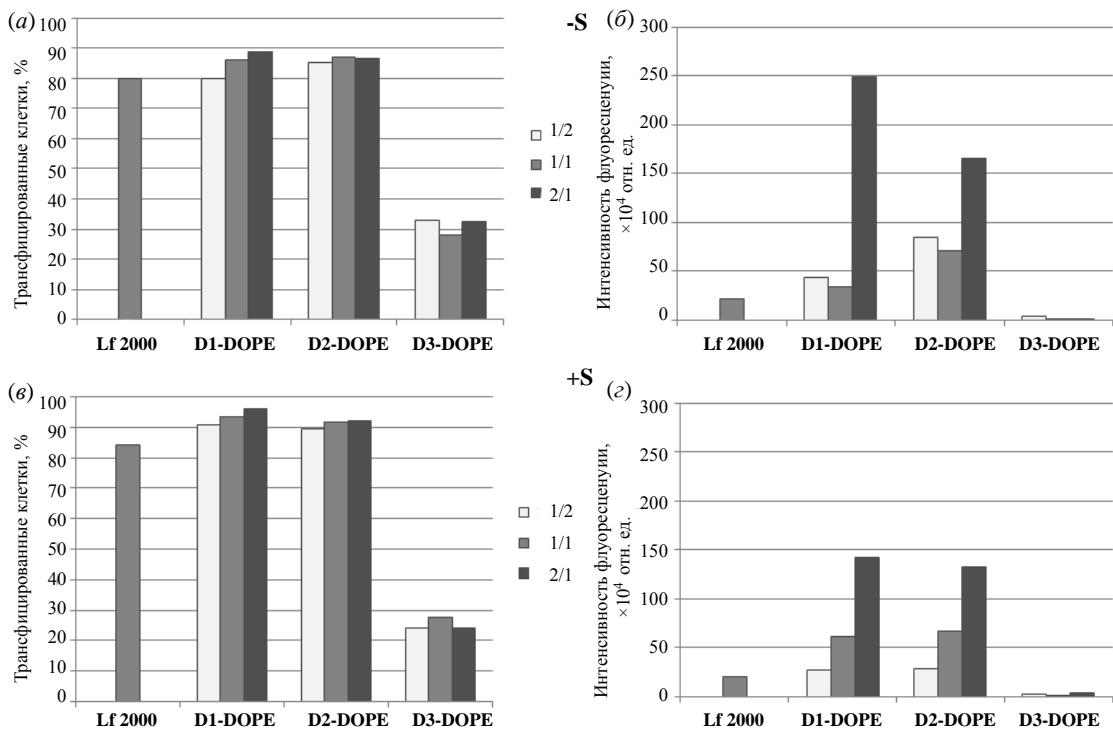


Рис. 4. Накопление комплексов FITC-ODN с катионными липосомами D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE в клетках HEK 293. Комплексы FITC-ODN/катионные липосомы D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE формировали при соотношениях N/P = 1/2, 1/1 и 2/1. Трансфекцию проводили в отсутствие (a, б) или в присутствии 10% FBS (в, г) в клеточной среде. Процент трансфицированных клеток (а, в) и уровень средней интенсивности флуоресценции клеток в популяции (б, г) измеряли с помощью проточной цитометрии через 4 ч инкубации клеток с комплексами. Стандартное отклонение не превышает 9%.

Трансфицирующая активность катионных липосом D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE в случае доставки FITC-ODN существенно отличалась от активности амфифилов D1–D3 (рис. 4). Если разница между липосомами D1-DOPE, D2-DOPE и Lf 2000 по проценту трансфицированных клеток была незначительной, то для липосом D3-DOPE, содержащих маннозилированный амфи菲尔, FITC-ODN проникал в ~30% клеток HEK 293 как в отсутствие, так и в присутствии FBS (рис. 4а, 4в). По интенсивности накопления FITC-ODN в клетках наиболее эффективными трансфектантами оказались липосомы D1-DOPE и D2-DOPE, содержащие амфи菲尔ы D1 с остатком D-галактозы и D2 с остатком лактозы. Они превосходили Lf 2000 в 7–11 раз по интенсивности флуоресценции при соотношении N/P = 2/1 в отсутствие (рис. 4б) и в 6 раз – в присутствии 10% FBS (рис. 4г). Согласно полученным данным, наличие 10% FBS не влияло на количество трансфицированных клеток (рис. 4а, 4в), однако несколько снижало накопление FITC-ODN (рис. 4б, 4г).

Таким образом, катионные липосомы D1-DOPE и D2-DOPE при N/P = 2/1 обеспечивали эффективное накопление короткого FITC-ODN в клетках HEK 293, превосходя в ~2 раза по эффективности сами амфи菲尔ы D1 и D2.

Эффективность доставки плазмидной ДНК pEGFP-C2 в клетки HEK 293 анализировали через 48 ч после добавления к клеткам комплексов пДНК с катионными амфи菲尔ами или липосомами, анализируя количество трансфицированных клеток и уровень экспрессии трансгена (EGFP) с помощью проточной цитометрии. Комплексы pEGFP-C2 с амфи菲尔ами D1–D3 и липосомами формировали при соотношениях N/P = 4/1, 6/1, 8/1, 10/1 и вносили к клеткам в отсутствие или в присутствии 10% FBS в среде (рис. 5, 6).

Для катионных амфи菲尔ов D1–D3 в бессывороточной среде с ростом соотношения N/P наблюдалось увеличение как количества EGFP-экспрессирующих клеток, которое достигало 58–71% при N/P = 10/1 (рис. 5а), так и увеличение значений интенсивности флуоресценции, кото-

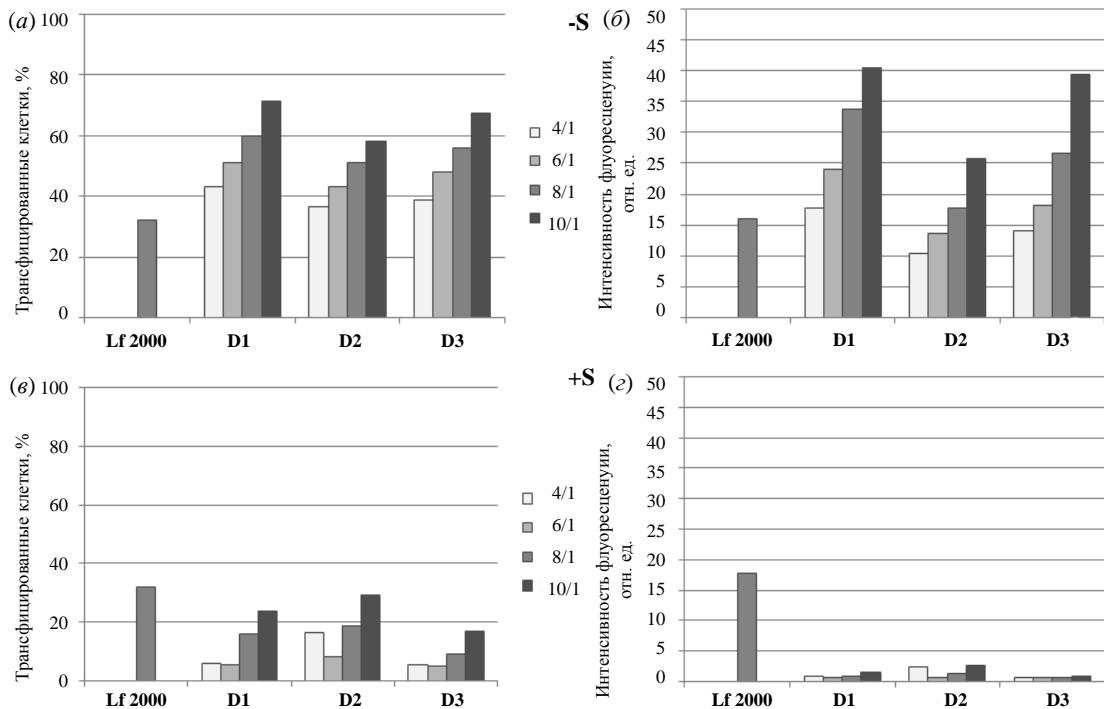


Рис. 5. Доставка плазмидной ДНК pEGFP-C2 с помощью катионных амифилов D1–D3 в клетки HEK 293 в отсутствие (a, б) или присутствии 10% FBS (в, г) в клеточной среде. Процент EGFP-положительных клеток (а, в) и уровень средней интенсивности флуоресценции (экспрессии EGFP) клеток в популяции (б, г) измеряли с помощью проточной цитометрии через 48 ч после инкубации клеток с комплексами. Стандартное отклонение не превышает 8%.

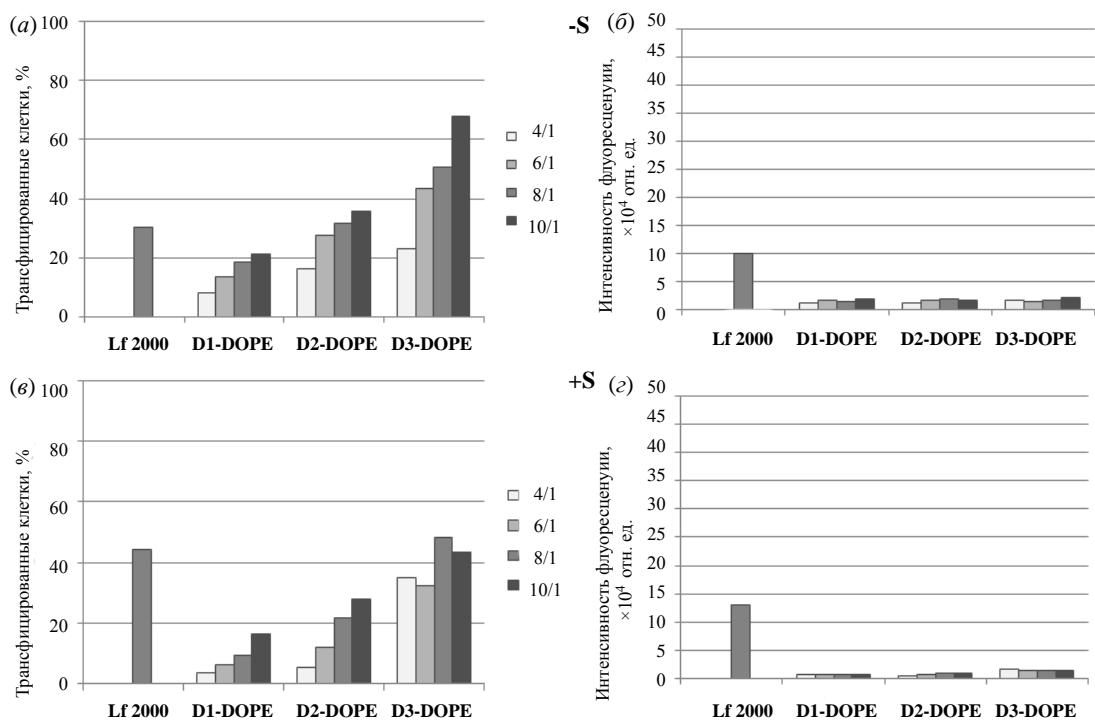


Рис. 6. Доставка плазмидной ДНК pEGFP-C2 в комплексе с катионными липосомами D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE в клетки HEK 293 в отсутствие (а, б) или присутствии 10% FBS (в, г) в клеточной среде. Процент EGFP-экспрессирующих клеток (а, в) и уровень средней интенсивности флуоресценции (экспрессии EGFP) клеток в популяции (б, г) измеряли с помощью проточной цитометрии через 48 ч после инкубации клеток с комплексами. Стандартное отклонение не превышает 7%.

рые превосходили в 1.6–2.5 раз (N/P = 10/1) значения, полученные для Lf 2000 (рис. 5б). Известно, что снижение эффективности доставки НК может быть связано с взаимодействием положительно заряженных липоплексов с отрицательно заряженными белками [33] или с липидами или липид-связанными белками сыворотки крови [34], которое может приводить к уменьшению коллоидной стабильности комплексов, преждевременному высвобождению НК [35]. Присутствие 10% FBS многократно снижало эффективность доставки пДНК: по количеству трансфицированных клеток в 2–4 раза, а по средней интенсивности флуоресценции – в 9–47 раз (рис. 5б, 5г).

Катионные липосомы D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE продемонстрировали низкую эффективность доставки протяженной пДНК в клетки HEK 293 (рис. 6). Если количество EGFP-экспрессирующих клеток было достаточно высоким, особенно в случае липосом D3-DOPE, которые при соотношении N/P = 10/1 в отсутствие FBS доставляли пДНК в ~70% клеток в популяции, что превосходит значения для Lf 2000 в 2 раза (рис. 6а), то значения средней интенсивности флуоресценции лишь немного превышали фоновые значения ($1-3 \times 10^4$ отн. ед). (рис. 6б, 6г).

Возможно, пДНК, проникая в клетку в комплексе с кationными липосомами D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE, не способна эффективно высвобождаться не только из комплекса из-за сильных электростатических взаимодействий, но и из эндосом, и, следовательно, не достигает своей дальнейшей цели – ядерной мембранны, через которую она должна проникнуть для дальнейшей экспрессии белка.

Среди терапевтических НК все большую популярность набирают молекулы РНК, используемые, например, для лечения хронического миелоидного лейкоза [36], вакцинации против COVID-19 [37], иммунотерапии рака [38]. Нами была изучена возможность доставки малой интерферирующей РНК (siPHK), направленной против мРНК EGFP, с помощью кationных амфилилов D1–D3 и липосом D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE в клетки BHK IR-780, экспрессирующие EGFP (рис. 7). Эффективность трансфекции siPHK определяли по подавлению экспрессии белка EGFP в клетках BHK IR-780 с помощью проточной цитометрии.

Катионные амфилилы D1–D3 доставляли siPHK в клетки BHK IR-780 с низкой эффективностью (рис. 7а, 7б): подавление экспрессии EGFP практически не наблюдалось даже при высоких

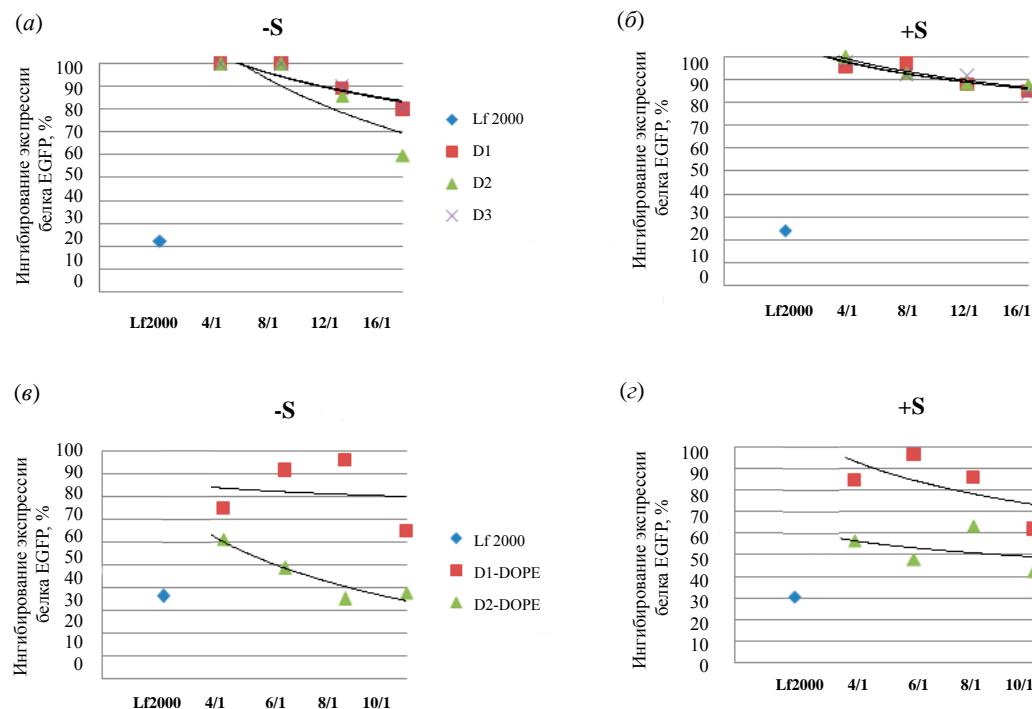


Рис. 7. Ингибирование экспрессии белка EGFP в трансгенных клетках BHK IR-780 после доставки siPHK с помощью кationных амфилилов D1–D3 (а, б) или кationных липосом D1-DOPE и D2-DOPE (в, г) в отсутствие (а, в) или в присутствии 10% FBS (б, г) в клеточной среде.

значениях N/P = 16/1. Только лактозосодержащий амфи菲尔 D2 в отсутствие FBS (при N/P = 16/1) способствовал переносу siPHK и снижению экспрессии EGFP на 40% (рис. 7a).

Катионные липосомы D1-DOPE, D2-DOPE более эффективно доставляли siPHK в клетки BHK IR-780 по сравнению с амфи菲尔ами D1–D3 (рис. 7). При соотношениях N/P = 8/1 и 10/1 липосомы D2-DOPE, содержащие амфи菲尔 с остатком лактозы, наиболее эффективно способствовали подавлению экспрессии EGFP (на 70%), аналогично коммерческому трансфектанту Lf 2000 (рис. 7b). Однако добавление 10% FBS в клеточную среду снижало эффективность доставки, в этом случае подавление экспрессии белка EGFP не превышало 50%. Ввиду того, что липосомы D3-DOPE были токсичны для клеток BHK, при трансфекции клеток BHK IR-780 также наблюдалась их гибель, что делало невозможным изучение доставки siPHK с помощью этих липосом.

Таким образом, было показано, что состав катионных липосом оказывает большое влияние на эффективность доставки siPHK. Липосомы должны содержать не только катионный амфи菲尔, но и липид-хелпер DOPE, обеспечивающий, с одной стороны, более эффективное проникновение коротких НК внутрь клетки, а с другой – эндосомальное высвобождение в цитоплазму, что критически важно для осуществления биологического действия siPHK.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали перегнанные растворители отечественного и зарубежного производства, *O*-(1Н-бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуроний гексафторфосфат, Pd/C (Aldrich, США), янтарный ангидрид (Fluka, Германия) и DIPEA, Et₃N (Merck, Германия). Бензол кипятили с металлическим натрием и перегоняли непосредственно перед реакцией; CH₂Cl₂ и Et₃N кипятили с CaH₂ и перегоняли непосредственно перед реакцией. Соединение (II) – катионный амфи菲尔 D1 – получали согласно известной методике [26], *N¹,N⁴,N⁹-три-трем-бутоксикарбонил-1,12-диамино-4,9-диазадодекан* – согласно методике [30].

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия), RP – 18 F_{254S} (Merck, Германия). Обнаружение пятен на хроматограммах осуществляли раствором фосформолибеновая кислота–сульфат церия(IV) с последующим прогреванием, реактивом Драгендорфа, раствором перманганата ка-

лия и с помощью УФ-лампы (254 нм). Колончную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (0.040–0.063 мм), Kieselgel 60 (0.063–0.200 мм), LiChroprep® RP-18 (0.040–0.063 мм, Merck, Германия), YMC-Pack ODS-AQ 12S50 (3 мкМ, YMC, Япония).

Спектры ¹Н- и ¹³С-ЯМР регистрировали на импульсном Фурье-спектрометрах DPX-300 и AMX-400 (Bruker, Германия) в CDCl₃, смеси CDCl₃–CD₃OD и Py-d5 (внутренний стандарт – тетраметилсилан). Значения химических сдвигов (δ) приведены в миллионных долях (м.д.), константы спин-спинового взаимодействия (J) – в герцах (Гц). Масс-спектры регистрировали на времязадерживающем масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия) методом матриксной лазерно-десорбционной ионизации на матрице с использованием в качестве матрицы 2,5-дигидроксибензойной кислоты.

N-[6-(2,3,6,2',3',4',6'-гепта-*O*-Ацетил-β-лактозилокси)гексил]-*N*-(*rac*-2,3-дигидрагидро-2-оксипроп-1-ил)амид 4-нитробензольсульфокислоты (IIIa). К раствору 0.797 г (1.036 ммоль) соединения (II) в 50 мл безводного бензола добавляли 0.613 г (3.448 ммоль) прокаленного CdCO₃. Реакционную смесь выдерживали при 110°C в аппарате Сокслета, после 4-кратного обращения паров бензола через прокаленный гранулированный силикагель к реакционной массе в течение 1.5 ч добавляли по каплям раствор 2.219 г (3.188 ммоль) 2,3,6,2',3',4',6'-гепта-*O*-ацетил- α -лактозилбромида в 25 мл безводного бензола и кипятили 8 ч. Реакционную смесь охлаждали до 24°C, фильтровали через Celite® 545, промывали CHCl₃, удаляли растворители в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя системой толуол–этилацетат (10 : 1). Выход соединения (IIIa) составил 0.795 г (58%). ¹Н-ЯМР: 0.84 (т, 6 H, *J* 6.8, 2 CH₂CH₃), 1.12–1.37 (м, 48 H, 2 (CH₂)₁₁, (CH₂)₂), 1.37–1.41 (м, 2 H, CH₂CH₂N), 1.41–1.55 (м, 6 H, 2 OCH₂CH₂, OCH₂CH₂), 1.91 (с, 3 H), 1.96 (с, 3 H), 1.98 (с, 3 H), 1.99 (с, 3 H), 2.06 (с, 3 H), 2.08 (с, 3 H), 2.1 (с, 3 H, 7 CH₃CO), 3.05–3.57 (м, 12 H, 2 NCH₂, 4 CH₂O, CH₂CH₂CH₂), 3.65–3.85 (м, 3 H, H^{5'}-Lac, H_{ab}6'-Lac), 3.95–4.12 (м, 4 H, H^{5'}-Lac, H_{ab}6'-Lac), 4.37 (д, 1 H, *J* 7.8, H-1' Lac), 4.39–4.45 (м, 1 H, H-4 Lac), 4.43 (д, 1 H, *J* 7.8, H-1 Lac), 4.79 (дд, 1 H, *J* 7.8, 9.4, H-2 Lac), 4.89 (дд, 1 H, *J* 3.4, 10.3, H-3' Lac), 5.03 (дд, 1 H, *J* 7.8, 10.3, H-2' Lac), 5.12 (т, 1 H, *J* 9.4, H-3 Lac), 5.26–5.29 (м, 1 H, H-4' Lac), 7.89–8.02 (м, 2 H, Ar), 8.21–8.35 (м, 2 H, Ar). ¹³С-ЯМР: 14.27, 20.66, 20.78, 20.96, 21.02, 22.83, 25.56, 26.20, 26.26, 26.43, 28.11, 29.50, 29.62, 29.81, 30.19, 32.05, 49.54, 49.72, 60.91, 62.12, 66.72, 69.21, 70.02, 70.25,

70.56, 70.77, 71.12, 71.82, 71.91, 72.74, 72.93, 76.43, 77.75, 100.71, 101.22, 124.35, 128.54, 146.27, 149.92, 169.22, 169.70, 169.95, 170.21. Масс-спектр MALDI, m/z : 1412.031 [$M + Na + 2H$]⁺, вычислено для $C_{69}H_{116}N_2NaO_{24}S$: 1411.754.

***N*-[6-*O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-Ацетил- α -D-маннопиранозилокси)гексил]-*N*-(*rac*-2,3-дитетрадецилоксипроп-1-ил)амид 4-нитробензолсульфокислоты (IIIb). Соединение (IIIb) получали аналогично соединению (IIIa), исходя из 0.569 г (0.739 ммоль) соединения (II) в 13 мл безводного бензола, 0.383 г (2.219 ммоль) прокаленного CdCO₃, раствора 0.912 г (2.219 ммоль) 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -D-маннопиранозилбромида в 15 мл безводного бензола. Время кипячения 3 ч. Система для колоночной хроматографии толуол–этилацетат (12 : 1). Выход соединения (IIIb) составил 0.370 г (45%). ¹Н-ЯМР: 0.81 (т, 6 H, J 6.7, 2 CH₂CH₃), 1.11–1.30 (м, 48 H, 2 (CH₂)₁₁, CH₂CH₂), 1.31–1.41 (м, 2 H, CH₂CH₂N), 1.42–1.57 (м, 6 H, 3 CH₂CH₂O), 1.91 (с, 3 H), 1.96 (с, 3 H), 2.02 (с, 3 H), 2.08 (с, 3 H, 4 CH₃CO), 3.07–3.28 (м, 4 H, CH₂NCH₂), 3.29–3.53 (м, 8 H, 2 CH₂CH₂O, CH₂CH, CHH_aO), 3.61 (дт, J 9.6, 6.4, 1 H, CHH_bO), 3.87–3.93 (м, 1 H, H5-Man), 4.04 (дд, 1 H, J 2.4, 12.2, H_a6-Man), 4.23 (дд, 1 H, J 5.2, 12.2, H_b6-Man), 4.73 (д, 1 H, J 1.6, H1-Man), 5.16 (дд, 1 H, J 1.6, 3.1, H2-Man), 5.19 (дд, 1 H, J 9.2, 9.8, H4-Man), 5.28 (дд, 1 H, J 3.1, 9.8, H3-Man), 7.93–7.98 (м, 2 H, Ar), 8.25–8.31 (м, 2 H, Ar). ¹³С-ЯМР: 14.26, 20.84, 20.90, 22.82, 25.91, 26.21, 26.27, 26.56, 28.16, 29.33, 29.49, 29.60, 29.64, 29.80, 29.83, 30.21, 32.05, 49.57, 49.75, 62.61, 66.33, 68.35, 68.54, 69.25, 69.80, 70.28, 70.57, 71.91, 97.68, 124.36, 128.56, 146.27, 149.94, 169.88, 170.05, 170.08, 170.09. Масс-спектр MALDI, m/z : 1123.384 [$M + Na + H$]⁺, вычислено для $C_{57}H_{99}N_2NaO_{16}S$: 1122.661.**

***N*-[6-*O*-(2,3,6,2',3',4',6'-гепта-*O*-Ацетил- β -лактозилокси)гексил]-*N*-(*rac*-2,3-дитетрадецилоксипроп-1-ил)амид 4-аминобензолсульфокислоты (IVa). К раствору 0.685 г (0.449 ммоль) соединения (IIIa) в 14 мл смеси метанол : ТГФ (2.5 : 1, v/v) добавляли 0.126 г (1.796 ммоль) формиата аммония и нагревали при перемешивании до 60°C, после чего вносили 5% мольн. Pd/C. Через 1 ч реакционную смесь фильтровали через Celite® 545, промывали метанолом, растворители удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя системой толуол–этилацетат (4 : 1). Выход соединения (IVa) составил 0.464 г (77%). ¹Н-ЯМР: 0.87 (т, 6 H, J 6.8, 2 CH₂CH₃), 1.07–1.30 (м, 48 H, 2 (CH₂)₁₁, CH₂CH₂), 1.31–1.55 (м, 8 H, CH₂CH₂N, 2 OCH₂CH₂, OCH₂CH₂), 1.89 (с, 3 H), 1.91 (с, 3 H), 1.97 (с, 6 H),**

2.03 (с, 3 H), 2.07 (с, 3 H), 2.10 (с, 3 H, 7 CH₃CO), 2.87–3.18 (м, 4 H, 2NCH₂), 3.18–3.62 (м, 9 H, 4 CH₂O, CH₂CH₂CH₂), 3.63–3.87 (м, 3 H, H5'-Lac, H_{ab}6'-Lac), 3.97–4.12 (м, 3 H, H5-Lac, H_{ab}6-Lac), 4.37 (д, 1 H, J 7.8, H-1' Lac), 4.39–4.42 (м, 1 H, H-4 Lac), 4.43 (д, 1 H, J 7.8, H-1 Lac), 4.80 (дд, 1 H, J 7.8, 9.4, H-2 Lac), 4.89 (дд, 1 H, J 3.4, 10.3, H-3' Lac), 5.03 (дд, 1 H, J 7.8, 10.3, H-2' Lac), 5.12 (т, 1 H, J 9.4, H-3 Lac), 5.29 (м, 1 H, H-4' Lac), 6.59–6.71 (м, 2 H) и 7.45–7.55 (м, 2 H, Ar). ¹³С-ЯМР: 14.25, 20.84, 20.94, 22.84, 25.56, 26.31, 26.63, 28.15, 29.52, 29.69, 29.82, 30.30, 32.07, 49.75, 49.89, 61.44, 67.26, 69.16, 70.24, 70.80, 71.14, 71.70, 71.88, 78.41, 101.52, 116.27, 129.46, 145.01, 150.33, 169.42, 169.95, 170.25, 170.34, 170.36, 170.44, 170.56, 170.58. Масс-спектр MALDI, m/z : 1380.253 [$M + Na + H$]⁺, вычислено для $C_{69}H_{117}N_2NaO_{22}S$: 1380.772.

***N*-[6-*O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-Ацетил- α -D-маннопиранозилокси)гексил]-*N*-(*rac*-2,3-дитетрадецилоксипроп-1-ил)амид 4-аминобензолсульфокислоты (IVb). Соединение (IVb) получали аналогично соединению (IVa), исходя из 0.327 г (0.298 ммоль) соединения (IIIb) в 7 мл смеси метанол : ТГФ (2.5 : 2, v/v), 0.080 г (1.274 ммоль) формиата аммония. Время реакции 2.5 ч. Система для колоночной хроматографии толуол–этилацетат (6 : 1). Выход соединения (IVb) составил 0.280 г (82%). ¹Н-ЯМР: 0.81 (т, 6 H, J 6.7, 2 CH₂CH₃), 1.17–1.30 (м, 48 H, 2 (CH₂)₁₁, CH₂CH₂), 1.31–1.57 (м, 8 H, CH₂CH₂N, 2 OCH₂CH₂, OCH₂CH₂), 1.91 (с, 3 H), 1.96 (с, 3 H), 2.02 (с, 3 H), 2.08 (с, 3 H, 4 CH₃CO), 3.07–3.28 (м, 4 H, CH₂NCH₂), 3.29–3.39 (м, 6 H, 2 CH₂CH₂O, CH₂O), 3.41–3.53 (м, 2 H, CHH_aO, CH₂CH₂CH₂), 3.61 (дт, J 9.6, 6.4, 1 H, CHH_bO), 3.87–3.93 (м, 1 H, H5-Man), 4.04 (дд, 1 H, J 2.4, 12.2, H_a6-Man), 4.23 (дд, 1 H, J 5.2, 12.2, H_b6-Man), 4.73 (д, 1 H, J 1.6, H1-Man), 5.16 (дд, 1 H, J 1.6, 3.1, H2-Man), 5.19 (дд, 1 H, J 9.2, 9.8, H4-Man), 5.28 (дд, 1 H, J 3.1, 9.8, H3-Man), 6.59–6.62 (м, 2 H, Ar), 7.48–7.55 (м, 2 H, Ar). ¹³С-ЯМР: 14.45, 21.07, 21.09, 21.26, 23.01, 25.99, 26.44, 26.47, 26.80, 28.00, 29.51, 29.69, 29.85, 29.99, 30.03, 30.46, 32.24, 49.75, 49.96, 62.82, 66.52, 68.66, 68.69, 69.55, 69.99, 70.96, 72.01, 76.93, 77.36, 77.78, 78.61, 78.64, 114.67, 125.61, 129.35, 129.59, 142.27, 170.09, 170.37, 170.48, 171.01. Масс-спектр MALDI, m/z : 1091.950 [$M + Na$]⁺, вычислено для $C_{57}H_{100}N_2NaO_{14}S$: 1091.679.**

***N*-[6-*O*-(2,3,6,2',3',4',6'-гепта-*O*-ацетил- β -лактозилокси)гексил]-*N*-(*rac*-2,3-дитетрадецилоксипроп-1-ил)амид 4-(3-карбоксипропионамидо)бензолсульфокислоты (Va). К раствору 0.393 г (0.293 ммоль) соединения (IVa)**

в 5 мл безводного CH_2Cl_2 при перемешивании добавляли 0.2936 г (2.930 ммоль) янтарного ангидрида, 7.4 мг N,N -диметил-4-аминопиридина и 83 мкл Et_3N . Через 96 ч реакционную смесь промывали 0.3%-ным водным раствором HCl . Органическую фазу сушили (Na_2SO_4), фильтровали, растворители удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя системой толуол-этилацетат (1 : 1). Выход соединения (**Va**) составил 0.382 г (78%). ^1H -ЯМР: 0.81 (т, 6 H, J 6.8, 2 CH_2CH_3), 0.95–1.31 (м, 48 H, 2 $(\text{CH}_2)_{11}$, $(\text{CH}_2)_2$), 1.32–1.53 (м, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, 2 OCH_2CH_2 , OCH_2CH_2), 1.91 (с, 3 H), 1.96 (с, 3 H), 1.98 (с, 3 H), 1.99 (с, 3 H), 2.06 (с, 3 H), 2.08 (с, 3 H), 2.1 (с, 3 H, 7 CH_3CO), 2.58–2.74 (м, 4 H, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.95–3.57 (м, 13 H, 2 NCH_2 , 4 CH_2O , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{HCH}_2$), 3.66–3.78 (м, 2 H, $\text{H}_{ab6'}$ -Lac), 3.78–3.86 (м, 1 H, $\text{H}_{5'}$ -Lac), 3.91–4.12 (м, 3 H, H_5 -Lac, $\text{H}_{ab6'}$ -Lac), 4.37 (д, 1 H, J 7.8, H_1' -Lac), 4.39–4.41 (м, 1 H, H_4 -Lac), 4.43 (д, 1 H, J 7.8, H_1 -Lac), 4.79 (дд, 1 H, J 7.8, 9.4, H_2 -Lac), 4.89 (дд, 1 H, J 3.4, 10.3, H_3' -Lac), 5.03 (дд, 1 H, J 7.8, 10.3, H_2' -Lac), 5.12 (т, 1 H, J 9.4, H_3 -Lac), 5.29–5.31 (м, 1 H, H_4' -Lac), 7.45–7.55 (м, 4 H, Ar). ^{13}C -ЯМР: 14.19, 20.58, 20.69, 20.78, 20.92, 22.79, 25.46, 26.24, 26.48, 27.70, 29.10, 29.39, 29.47, 29.62, 29.78, 29.81, 30.25, 32.05, 49.54, 49.68, 49.88, 61.00, 62.28, 66.88, 69.38, 70.11, 70.78, 71.20, 71.90, 72.00, 72.78, 73.09, 76.41, 78.50, 100.68, 101.15, 119.37, 123.56, 128.46, 142.20, 169.41, 169.57, 169.84, 170.08, 170.18, 170.20, 170.25. Масс-спектр, m/z : 1496.028 [$M + \text{K}$]⁺, вычислено для $\text{C}_{75}\text{H}_{120}\text{KN}_2\text{O}_{25}\text{S}$: 1495.754.

N-[6-O-(2,3,4,6-тетра-O-Ацетил- α -D-маннозилокси)гексил]-N-(*rac*-2,3-дигидратадецилоксипроп-1-ил)амид 4-(3-карбоксипропионамидо)бензолсульфокислоты (Vb**). Соединение (**Vb**) получали аналогично соединению (**Va**), исходя из 0.245 г (0.223 ммоль) соединения (**IVb**) в 4 мл безводного CH_2Cl_2 , 0.223 г (2.230 ммоль) янтарного ангидрида, 5.4 мг N,N -диметил-4-аминопиридина и 45 мкл Et_3N . Система для колоночной хроматографии толуол-этилацетат (4 : 1). Выход соединения (**Vb**) составил 0.205 г (78%). ^1H -ЯМР: 0.81 (т, 6 H, J 6.7, 2 CH_2CH_3), 1.07–1.30 (м, 48 H, 2 $(\text{CH}_2)_{11}$, CH_2CH_2), 1.31–1.57 (м, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, 2 OCH_2CH_2 , OCH_2CH_2), 1.91 (с, 3 H), 1.96 (с, 3 H), 2.02 (с, 3 H), 2.08 (с, 3 H, 4 CH_3CO), 2.58–2.74 (м, 4 H, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.96–3.28 (м, 4 H, CH_2NCH_2), 3.29–3.39 (м, 6 H, 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2O), 3.41–3.53 (м, 2 H, CHH_aO , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{HCH}_2$), 3.60 (дт, J 9.6, 6.4, 1 H, CHH_bO), 3.88–3.93 (м, 1 H, H_5 -Man), 4.05 (дд, 1 H, J 2.4, 12.2, H_a -Man), 4.22 (дд, 1 H, J 5.2, 12.2, H_b -Man), 4.73 (д, 1 H, J 1.6, H_1 -Man), 5.16 (дд, 1 H, J 1.6, 3.1, H_2 -Man),**

5.19 (дд, 1 H, J 9.2, 9.8, H_4 -Man), 5.28 (дд, 1 H, J 3.1, 9.8, H_3 -Man), 7.58–7.72 (м, 4 H, Ar), 8.22 (ущ с, 1 H, NH). ^{13}C -ЯМР: 14.25, 20.90, 20.95, 22.80, 25.71, 26.23, 26.45, 27.31, 28.81, 29.00, 29.22, 29.48, 29.63, 29.72, 30.24, 32.04, 49.25, 49.35, 49.51, 52.07, 62.64, 66.22, 68.37, 68.49, 69.63, 69.72, 70.62, 70.67, 70.77, 70.80, 71.87, 76.73, 77.16, 77.36, 77.58, 78.49, 78.61, 97.60, 119.31, 128.46, 134.89, 134.94, 142.07, 169.92, 170.47, 170.64, 170.70, 170.72. Масс-спектр MALDI, m/z : 1191.423 [$M + \text{Na}$]⁺, вычислено для $\text{C}_{61}\text{H}_{104}\text{N}_2\text{NaO}_{17}\text{S}$: 1191.695.

(N-{6-O-(2,3,6,2',3',4',6'-тетра-O-Ацетил- β -лактозилокси)гексил}-N-(*rac*-2,3-дигидратадецилоксипроп-1-ил)амид) 4-{3-[$(N^4,N^9,N^{12}$ -три-*трем*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодекиламинокарбонил]пропионамидо}-бензолсульфокислоты (VIa**). К охлажденному до 4°C раствору 0.080 г (0.0535 ммоль) соединения (**Va**) и 0.017 г (0.0342 ммоль) N^1,N^4,N^9 -три-*трем*-бутоксикарбонил-1,12-диамино-4,9-диазадодекана в 6 мл ДМФА добавляли последовательно 20 мкл (0.120 ммоль) N,N -дизопропилэтамина, а через 10 мин по каплям вносили раствор 0.045 г (0.120 ммоль) НВТУ в 2 мл ДМФА в течение 1 ч. Через 2 ч к реакционной смеси добавляли 8 мл CHCl_3 и экстрагировали 3%-ным водным раствором HCl (3×5 мл). Органическую фазу сушили (Na_2SO_4), фильтровали, растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя системой CHCl_3 – CH_3OH (50 : 1). Выход соединения (**VIa**) составил 0.072 г (69%). ^1H -ЯМР: 0.81 (т, 6 H, J 6.8, 2 CH_2CH_3), 1.11–1.28 (м, 48 H, 2 $(\text{CH}_2)_{11}$, $(\text{CH}_2)_2$, 1.28–1.66 (м, 47 H, 3 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, 9 CH_3), 1.89 (с, 3 H), 1.91 (с, 3 H), 1.97 (с, 6 H), 2.03 (с, 3 H), 2.07 (с, 3 H), 2.10 (с, 3 H, 7 CH_3CO), 2.56–2.75 (м, 4 H, $\text{NC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N}$), 2.92–3.65 (м, 25 H, 6 CH_2N , 2 CH_2NH , 3 CH_2O , CH_2CH), 3.68–3.75 (м, 2 H, $\text{H}_{ab6'}$ -Lac), 3.78–3.86 (м, 1 H, H_5 -Lac), 3.91–4.12 (м, 3 H, H_5 -Lac, $\text{H}_{ab6'}$ -Lac), 4.37 (д, 1 H, J 7.8, H_1' -Lac), 4.41 (м, 1 H, H_4 -Lac), 4.43 (д, 1 H, J 7.8, H_1 -Lac), 4.79 (дд, 1 H, J 7.8, 9.4, H_2 -Lac), 4.89 (дд, 1 H, J 3.4, 10.3, H_3' -Lac), 5.03 (дд, 1 H, J 7.8, 10.3, H_2' -Lac), 5.12 (т, 1 H, J 9.4, H_3 -Lac), 5.29 (м, 1 H, H_4' -Lac), 7.55–7.71 (м, 4 H, Ar). ^{13}C -ЯМР: 14.19, 20.58, 20.70, 22.76, 25.50, 25.87, 25.96, 26.21, 26.51, 28.21, 28.54, 29.18, 29.43, 29.59, 29.74, 30.21, 32.00, 49.75, 49.86, 50.03, 60.93, 62.21, 62.49, 63.94, 64.58, 66.79, 69.28, 70.05, 70.68, 70.78, 71.13, 71.82, 72.73, 73.00, 76.45, 78.29, 100.67, 101.15, 110.84, 119.38, 128.43, 142.20, 169.25, 170.18, 170.22, 170.44, 170.51, 171.22, 171.95, 172.95. Масс-спектр MALDI, m/z : 1964.790 [$M + \text{Na}$]⁺, вычислено для $\text{C}_{98}\text{H}_{168}\text{N}_6\text{NaO}_{30}\text{S}$: 1964.142.**

(N-{6-O-(2,3,4,6-тетра-O-Ацетил-*α*-D-маннопиранозилокси)гексил}-N-(*rac*-2,3-дитетрадецилоксипроп-1-ил)амид) 4-{3-[(*N⁴,N⁹,N¹²*-трип-*трем*-бутоксикарбонил])-12-амино-4,9-диазадодециламинокарбонил]пропионамидо}бензолсульфокислоты (VIb). Соединение (VIb) получали аналогично соединению (VIa), исходя из 0.177 г (0.151 ммоль) соединения (Vb) и 0.161 г (0.32 ммоль) *N¹,N⁴,N⁹*-три-*трем*-бутоксикарбонил-1,12-диамино-4,9-диазадодекана в 9.5 мл ДМФА, 37 мкл (0.32 ммоль) *N,N*-дизопропилиамина, раствора 161 мг (0.32 ммоль) НВТУ в 2 мл ДМФА. Время реакции 5 ч. Система для колоночной хроматографии толуол–ацетон (20 : 1). Выход соединения (VIb) составил 0.126 г (50%). ¹Н-ЯМР: 0.81 (т, 6 Н, *J* 6.7, 2 CH_2CH_3), 1.15–1.30 (м, 48 Н, 2 $(\text{CH}_2)_{11}$, CH_2CH_2), 1.30–1.66 (м, 47 Н, 3 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, 9 CH_3), 1.91 (с, 3 Н), 1.96 (с, 3 Н), 2.02 (с, 3 Н), 2.08 (с, 3 Н, 4 CH_3CO), 2.58–2.74 (м, 4 Н, $\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 2.96–3.28 (м, 4 Н, CH_2NCH_2), 3.29–3.39 (м, 6 Н, 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2O), 3.41–3.53 (м, 2 Н, CHH_aO , CH_2CHCH_2), 3.61 (дт, *J* 9.6, 6.4, 1 Н, CHH_bO), 3.87–3.93 (м, 1 Н, H5-Man), 4.04 (дд, 1 Н, *J* 2.4, 12.2, $\text{H}_a\text{6-Man}$), 4.22 (дд, 1 Н, *J* 5.2, 12.2, $\text{H}_b\text{6-Man}$), 4.73 (д, 1 Н, *J* 1.6, H1-Man), 5.16 (дд, 1 Н, *J* 1.6, 3.1, H2-Man), 5.19 (дд, 1 Н, *J* 9.2, 9.8, H4-Man), 5.28 (дд, 1 Н, *J* 3.1, 9.8, H3-Man), 7.62–7.66 (м, 4 Н, Ar), 8.22 (ущ с, 1 Н, NH). ¹³С-ЯМР: 14.25, 20.88, 22.80, 25.80, 26.58, 27.45, 27.71, 28.05, 29.13, 29.33, 30.24, 31.62, 33.43, 36.02, 37.57, 38.73, 43.37, 43.99, 44.42, 46.40, 46.95, 49.77, 49.99, 62.62, 66.30, 68.44, 68.48, 69.39, 69.76, 70.73, 71.84, 76.77, 77.58, 78.33, 78.58, 80.15, 97.66, 111.05, 117.72, 119.26, 126.16, 126.97, 128.45, 134.12, 142.52, 145.46, 156.22, 170.25, 170.82. Масс-спектр, *m/z*: 1675.528 [*M* + Na]⁺, вычислено для $\text{C}_{86}\text{H}_{152}\text{N}_6\text{NaO}_{22}\text{S}$: 1676.058.

(N-{6-O-Лактозилокси)гексил}-N-(*rac*-2,3-дитетрадецилоксипроп-1-ил)амид)-4-{3-(12-амино-4,9-диазадодециламинокарбонил)-пропионамидо}бензолсульфокислоты тригидрохлорид (D2). К раствору 0.053 г (0.0272 ммоль) соединения (VIa) в 1.7 мл CH_2Cl_2 добавляли 0.162 мл (2.181 ммоль) трифторуксусной кислоты. Через 3 ч к реакционной смеси добавляли диэтиловый эфир, растворители удаляли в вакууме. К остатку добавляли 11.7 мл 0.04 н. раствора метилата натрия в метаноле и выдерживали 4 ч. К реакционной смеси добавляли раствор 4 н. HCl в диоксане, пока значение pH смеси не достигнет 5. Растворители удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с обращенно-фазовым силикагелем LiChroprer[®]RP-18 (Merck), элюируя системой

метанол–0.1% водн. HCl (100 : 1). Выход соединения составил 0.103 г (64 %). ¹Н-ЯМР (Py-d5): 0.79 (т, 6 Н, *J* 6.8, 2 CH_2CH_3), 1.02–1.41 (м, 48 Н, 2 $(\text{CH}_2)_{11}$, $(\text{CH}_2)_2$), 1.41–1.61 (м, 16 Н, 3 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.81–2.31 (м, 4 Н, $\text{NC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N}$), 2.51–3.61 (м, 25 Н, 3 OCH_2 , 2 NCH_2 , 5 NHCH_2 , NH_2CH_2 , CH_2CH), 3.61–4.44 (м, 12 Н, H5-Lac, H5'-Lac, $\text{H}_{ab}\text{6-Lac}$, $\text{H}_{ab}\text{6}'\text{-Lac}$, H-1' Lac, H-4 Lac, H-1 Lac, H-2 Lac, H-3' Lac, H-3 Lac), 4.55–4.67 (м, 1 Н, H-2' Lac), 4.81–4.99 (м, 1 Н, H-4' Lac), 7.75–7.82 и 8.10–8.21 (м, 4 Н, Ar). ¹³С-ЯМР: 14.84, 23.48, 24.28, 25.50, 26.40, 27.29, 28.54, 30.16, 30.55, 30.72, 30.72, 31.23, 33.63, 38.47, 46.04, 46.47, 48.05, 50.46, 62.32, 62.49, 70.27, 70.40, 71.24, 72.28, 72.88, 75.25, 76.79, 77.49, 78.72, 79.52, 82.04, 104.51, 105.80, 120.28, 129.27, 134.58, 144.82, 172.96, 174.35. Масс-спектр MALDI, *m/z*: 1348.117 [*M* + H – 3HCl]⁺ вычислено для $\text{C}_{69}\text{H}_{131}\text{N}_6\text{O}_{17}\text{S}$: 1347.929.

(N-{6-O-*α*-D-Маннопиранозилокси)гексил}-N-(*rac*-2,3-дитетрадецилоксипроп-1-ил)амид)-4-{3-(12-амино-4,9-диазадодециламинокарбонил)пропионамидо}бензолсульфокислоты тригидрохлорид (D3). Соединение (D3) получали аналогично соединению (D2), исходя из 0.110 г (0.0666 ммоль) соединения (VIb) в 3.5 мл CH_2Cl_2 , 0.400 мл (7.270 ммоль) трифторуксусной кислоты, времени реакции 4.5 ч, 23 мл 0.04 н. раствора метилата натрия в метаноле, времени реакции 5.5 ч. Растворители удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с обращенно-фазовым силикагелем YMC-Gel ODS-AQ 12S50 (YMC), элюируя системой метанол–вода (1 : 1 → 5 : 1). Растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в 5 мл дистиллированной воды и проводили диализ против воды с использованием диализной мембраны Spectra/Por[®] 6 (Repligen, США). Выход соединения составил 0.041 г (55%). ¹Н-ЯМР (Py-d5): 0.67 (т, 6 Н, *J* 6.7, 2 CH_2CH_3), 1.10 (с, 44 Н, 2 $(\text{CH}_2)_{11}$), 1.15–1.25 (м, 4 Н, CH_2CH_2), 1.34–1.61 (м, 16 Н, 3 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, 4 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1.81–2.31 (м, 4 Н, $\text{NC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N}$), 2.51–3.61 (м, 25 Н, 3 OCH_2 , 2 NCH_2 , 5 NHCH_2 , NH_2CH_2 , CH_2CH), 3.61–4.57 (м, 1 Н, H5-Man, H_6Man , H_2Man , H_4Man , H_3Man), 5.22 (д, 1 Н, $\text{H}(1)\text{Man}$, *J* 1.2), 7.75–7.91 (м, 2 Н) и 8.05–8.15 (м, 2 Н, Ar), 8.95–9.02 (м, 1 Н, NH), 11.05–11.45 (м, 1 Н, NH). ¹³С-ЯМР: 24.67, 25.75, 26.33, 27.65, 29.39, 29.62, 29.71, 29.77, 30.46, 31.24, 31.89, 45.32, 46.75, 47.19, 61.93, 66.91, 67.11, 67.99, 70.46, 71.50, 71.78, 72.32, 78.81, 100.77, 119.43, 122.56, 123.92, 128.50, 134.00, 135.98, 143.97, 148.84, 172.21, 173.78. Масс-спектр

MALDI, m/z : 1185.499 [$M + H - 3\text{HCl}$]⁺, вычислено для $\text{C}_{63}\text{H}_{121}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}$: 1185.876.

Водные дисперсии катионных амфи필ов. Водные дисперсии углеводсодержащих катионных амфи필ов D1–D3 были получены в деионизированной воде (MilliQ) с концентрацией 1 мМ путем озвучивания на ультразвуковой бане (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия) в течение 5 мин при 24°C.

Катионные липосомы. Катионные липосомы D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE получали методом гидратации липидной пленки и последующей обработки ультразвуком [32]. Навески соединений D1–D3 и липида-хелпера DOPE (Avanti Polar Lipids, США) растворяли в CHCl_3 . Полученные растворы смешивали в соотношении 1 : 1 (моль/н.). Растворитель удаляли в вакууме водоструйного насоса, образовавшуюся липидную пленку сушили 4 ч в вакууме масляного насоса (0.01 Торр). К сухой пленке добавляли необходимое количество деионизированной воды (MilliQ) (концентрация по амфиfilам D1–D3 1 мМ) и диспергировали при 60°C до полного отслоения пленки со стенок колбы. Образовавшуюся дисперсию обрабатывали на ультразвуковой бане (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия) в течение 15 мин при 70°C для получения катионных липосом D1-DOPE, D2-DOPE и D3-DOPE, которые фильтровали через стерильный фильтр Chromafil CA-45/25 (S) (Macherey-Nagel, Германия) с размером пор 450 нм и хранили при 4°C.

Нуклеиновые кислоты. 25-Звенный олигодезоксирибонуклеотид 5'-TACAGTGGAAATTGTA-TGCCTATTAT-3', содержащий на 5'-конце остаток FITC, синтезировали твердофазным фосфитамидным методом и выделяли с помощью ВЭЖХ (ИХБФМ СО РАН). Чистота олигонуклеотида, проанализированная электрофорезом в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях, составляла 95–98%. Концентрацию олигонуклеотида определяли на спектрофотометре BioMate 3 (Thermo Electron Corporation, США). В экспериментах использовали пДНК pEGFP-C2 (Clontech, Германия), кодирующую зеленый флуоресцентный белок, и siPHK, направленную на мРНК EGFP, с последовательностью: 5'-GAACGGC-AUCAAGGUGAACTT-3' (смысловая цепь) и 5'-GUUCACCUUGAUGCCTGUUCTT-3' (антисмысловая цепь), полученную в ИХБФМ СО РАН.

Комплексы нуклеиновых кислот с катионными амфиfilами и катионными липосомами. Для трансфекции клеток HEK 293 и ВНК IR-780 растворы водных дисперсий D1–D3 или катионных липосом (25 мкл) и нуклеиновых кислот

(25 мкл) в концентрациях, соответствующих необходимым соотношениям N/P, смешивали в среде Opti-MEM® (ThermoFisher Scientific, США) и инкубировали в течение 20 мин при 24°C.

Клеточные культуры. Клетки почки эмбриона человека HEK 293, фибробласты почки хомячка ВНК были получены из банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Генетически модифицированные клетки ВНК IR-780, экспрессирующие EGFP, любезно предоставлены проф. В.С. Прасоловым (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва).

Клетки HEK 293, ВНК и ВНК IR-780 культивировали в среде DMEM в присутствии 10% FBS, 1%-ного раствора антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина) в атмосфере 5% CO_2 при 37°C и регулярно пассировали для поддержания экспоненциального роста.

Цитотоксичность. Относительное количество живых клеток после инкубации с катионными амфиfilами или липосомами определяли с помощью МТТ-теста [39]. Клетки HEK 293 и ВНК высаживали в 96-луночные планшеты (при плотности посадки 7.5×10^3 кл./лунку для HEK 293 и 3×10^3 кл./лунку для ВНК), инкубировали с катионными амфиfilами или липосомами (конечная концентрация в лунке 1–80 мкМ) в течение 4 ч в бессывороточных условиях. Затем добавляли FBS (до 10%) и инкубировали еще 20 ч, добавляли раствор МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) до конечной концентрации 0.5 мг/мл и дополнительно инкубировали клетки 3 ч. Культуральную среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО на лунку и измеряли разницу оптической плотности раствора при 570 и 620 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan RC (Labsystems, Финляндия).

Жизнеспособность клеток HEK 293 (при плотности посадки 5×10^3 клеток на лунку) в присутствии 4, 8, 16, 32 и 64 мкМ липосом D2-DOPE контролировали в режиме реального времени на приборе xCELLigence (ACEA Biosciences, США) в течение 90 ч.

Трансфекция клеток. Клетки HEK 293 и ВНК IR-780 высаживали в 24-луночные планшеты (при плотности посадки 2×10^5 кл./лунку HEK 293 для доставки FITC-ODN, 1.2×10^5 кл./лунку HEK 293 для доставки пДНК и 0.1×10^5 кл./лунку для ВНК IR-780 для доставки siPHK) и инкубировали в течение 24 ч. В день трансфекции культуральную среду заменяли на среду DMEM (200 мкл) с 10%

FBS (без антибиотиков). К клеткам добавляли комплексы FITC-ODN (1 мкМ в лунке), пДНК (2 мкг/мл в лунке) или siPHK (50 нМ в лунке) с амфилилами или катионными липосомами, сформированные при различных соотношениях N/P, и инкубировали в стандартных условиях 4 ч. В случае доставки FITC-ODN клетки анализировали сразу после инкубации. В случае пДНК и siPHK культуральную среду заменяли на свежую DMEM с 10% FBS (500 мкл) и дополнительно инкубировали клетки при 37°C в течение 44 или 68 ч соответственно.

Проточная цитометрия. Для оценки эффективности доставки FITC-ODN, пДНК и siPHK клетки HEK 293 и ВНК IR-780 дважды промывали PBS, обрабатывали раствором трипсина в PBS (0.5 мг/мл) в течение 2 мин при 37°C для открепления клеток с поверхности лунки. Открепившиеся клетки сусpendировали в среде DMEM с 10% FBS для ингибиования дальнейшего действия трипсина, переносили в пробирки и осаждали центрифугированием (Eppendorf MiniSpin, Eppendorf, Германия) при 200 g в течение 10 мин. Супернатант убирали, клетки дважды промывали PBS и фиксировали 2%-ным раствором формальдегида в PBS (600 мкл). Количество трансфицированных клеток и среднее значение интенсивности флуоресценции в клеточной популяции измеряли на цитофлуориметре NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США) и Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 20 тыс. клеток. Все экспериментальные точки были получены в результате трех независимых экспериментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы новые катионные амфилилы, содержащие остатки лактозы или D-маннозы. На основе полученных соединений и липида-хелпера DOPE были сформированы катионные липосомы, изучена их цитотоксичность и проведена оценка способности доставлять различные нуклеиновые кислоты в эукариотические клетки.

Углеводсодержащие катионные амфилилы D1–D3 независимо от структуры углеводного фрагмента эффективно доставляли короткий флуоресцеин-меченный олигонуклеотид (FITC-ODN) в клетки HEK 293 в присутствии сыворотки крови (рис. 3), в то время как эффективная доставка плазмидной ДНК достигалась только в бессывороточных условиях (рис. 5а, 5б). Доставка короткой siPHK амфилилами D1–D3 также была малоэффективной, снижение уровня экспрессии белка на 40% наблюдалось только для

лактозилсодержащего амфилила D2 в отсутствие сыворотки в клеточной среде (рис. 7а). Добавление 10% FBS приводило к резкому снижению эффективности доставки плазмидной ДНК и siPHK (рис. 5 и 7). Известно, что некоторые липосомальные системы доставки неэффективны при проведении трансфекции клеток в присутствии сыворотки крови, что связано с взаимодействием липоплексов с ее компонентами [33, 34], увеличением их размера [40], перезарядкой поверхностного потенциала и, как следствие, снижением взаимодействия с отрицательно заряженной клеточной мембраной. Белковая “корона” [41] может по-разному влиять на эффективность трансфекции. Так, было показано, что она не изменяет эффективность наночастиц на основе ионизируемых липидов, но увеличивает время трансфекции Lipofectamine 2000 и снижает его эффективность [42].

Среди катионных липосом, полученных на основе углеводсодержащих катионных амфилилов, наиболее перспективной следует считать композицию D2-DOPE, содержащую амфилил D2 с остатком лактозы, которая оказалась нетоксичной для клеток HEK 293 и ВНК. При этом данные липосомы не подходят для трансфекции клеток плазмидной ДНК (рис. 6), однако эффективно доставляют короткие НК (FITC-ODN и siPHK) как в отсутствие, так и в присутствии сыворотки в культуральной среде (рис. 4, 7б, 7г).

Таким образом, полученные углевод-содержащие катионные амфилилы, как в индивидуальном состоянии, так и в составе катионных липосом, являются перспективными средствами доставки коротких нуклеиновых кислот для дальнейшей разработки генно-терапевтических препаратов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 23-73-10168 с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА при поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-689 от 01.09.2021), работа О.В. Маркова и М.А. Зенковой поддержана за счет бюджета Российской Федерации (проект № 121031300044-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы ЕВШ и АОБ – подготовка и характеристика соединений. Авторы ЕВШ и ОВМ провели биологические исследования. Авторы ЕВШ, ОВМ, НГМ, МАЗ и МАМ – подготовка текста статьи. Авторы ЕВШ, МАЗ и МАМ – подготовка финального варианта текста статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bulaklak K., Gersbach C.A.* // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 11–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19505-2>
2. *Mendes B.B., Connio J., Avital A., Yao D., Jiang X., Zhou X., Sharf-Pauker N., Xiao Y., Adir O., Liang H., Shi J., Schroeder A., Conde J.* // *Nat. Rev. Methods Prim.* 2022. V. 2. P. 24. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00104-y>
3. *Lundstrom K.* // *Viruses.* 2023. V. 15. P. 698. <https://doi.org/10.3390/v15030698>
4. *Wang C., Pan C., Yong H., Wang F., Bo T., Zhao Y., Ma B., He W., Li M.* // *J. Nanobiotechnology.* 2023. V. 21. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02044-5>
5. *Tseu G.Y.W., Kamaruzaman K.A.* // *Molecules.* 2023. V. 28. P. 1498. <https://doi.org/10.3390/molecules28031498>
6. *Nsairat H., Alshaer W., Odeh F., Esawi E., Khater D., Bawab A.A., El-Tanani M., Awidi A., Mubarak M.S.* // *OpenNano.* 2023. V. 11. P. 100132. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2023.100132>
7. *Gao Y., Liu X., Chen N., Yang X., Tang F.* // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. P. 178. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010178>
8. *Iqbal S., Blenner M., Alexander-Bryant A., Larsen J.* // *Biomacromolecules.* 2020. V. 21. P. 1327–1350. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01754>
9. *Rai D.B., Pooja D., Kulhari H.* // In: *Pharmaceutical Applications of Dendrimers*, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814527-2.00009-3>
10. *Jiang Y., Fan M., Yang Z., Liu X., Xu Z., Liu S., Feng G., Tang S., Li Z., Zhang Y., Chen S., Yang C., Law W.C., Dong B., Xu G., Yong K.T.* // *Biomater. Sci.* 2022. V. 10. P. 6862–6892. <https://doi.org/10.1039/D2BM01001A>
11. *Mirza Z., Karim S.* // In: *Recent Advancements and Future Challenges*, Elsevier Ltd., 2021. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2019.10.020>
12. *Duan L., Xu L., Xu X., Qin Z., Zhou X., Xiao Y., Liang Y., Xia J.* // *Nanoscale.* 2021. V. 13. P. 1387–1397. <https://doi.org/10.1039/d0nr07622h>
13. *Ponti F., Campolungo M., Melchiori C., Bono N., Candiani G.* // *Chem. Phys. Lipids.* 2021. V. 235. P. 105032. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105032>
14. *Belhadj Z., Qie Y., Carney R.P., Li Y., Nie G.* // *BMEMat.* 2023. V. 1. P. e12018. <https://doi.org/10.1002/bmm2.12018>
15. *Liu C., Zhang L., Zhu W., Guo R., Sun H., Chen X., Deng N.* // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020. V. 18. P. 751–764. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.07.015>
16. *Gangopadhyay S., Nikam R.R., Gore K.R.* // *Nucleic Acid Ther.* 2021. V. 31. P. 245–270. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0882>
17. *Shmendel E.V., Puchkov P.A., Maslov M.A.* // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. P. 1400. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051400>
18. *Jain A., Jain S.K.* // *Curr. Mol. Med.* 2018. V. 18. P. 44–57. <https://doi.org/10.2174/1566524018666180416101522>
19. *Fu S., Xu X., Ma Y., Zhang S., Zhang S.* // *J. Drug Target.* 2019. V. 27. P. 1–11. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1455841>
20. *Battisegola C., Billi C., Molaro M.C., Schiano M.E., Nieddu M., Failla M., Marini E., Albrizio S., Sodano F., Rimoli M.G.* // *Pharmaceutics.* 2024. V. 17. P. 308. <https://doi.org/10.3390/ph17030308>
21. *Fatima M., Karwasra R., Almalki W.H., Sahebkar A., Kesharwani P.* // *Eur. Polym. J.* 2023. V. 183. P. 111759. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111759>
22. *Jain A., Jain A., Parajuli P., Mishra V., Ghoshal G., Singh B., Shihhare U.S., Katare O.P., Kesharwani P.* // *Drug Discov. Today.* 2018. V. 23. P. 960–973. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.003>
23. *Paurević M., Šrajer Gajdošik M., Ribić R.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. P. 1370. <https://doi.org/10.3390/ijms25031370>
24. *Goswami R., O'Hagan D.T., Adamo R., Baudner B.C.* // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020240>
25. *Goswami R., Chatzikleanthous D., Lou G., Giusti F., Bonci A., Taccone M., Brazzoli M., Gallorini S., Ferlenghi I., Berti F., O'Hagan D.T., Pergola C., Baudner B.C., Adamo R.* // *ACS Infect. Dis.* 2019. V. 5. P. 1546–1558. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00084>
26. *Maslov M.A., Medvedeva D.A., Rapoport D.A., Serikov R.N., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21. P. 2937–2940. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.056>
27. *Liu K., Jiang X., Hunziker P.* // *Nanoscale.* 2016. V. 8. P. 16091–16156. <https://doi.org/10.1039/C6NR04489A>
28. *Hayashi Y., Higashi T., Motoyama K., Jono H., Ando Y., Onodera R., Arima H.* // *Biol. Pharm. Bull.* 2019. V. 42. P. 1679–1688. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00278>

29. *Gadekar A., Bhowmick S., Pandit A.* // *Adv. Funct. Mater.* 2020. V. 30. P. 1910031. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910031>
30. *Miller K.A., Kumar E.V.K.S., Wood S.J., Cromer J.R., Datta A., David S.A.* // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. P. 2589–2599. <https://doi.org/10.1021/jm049449j>
31. *Kim B.K., Hwang G.B., Seu Y.B., Choi J.S., Jin K.S., Doh K.O.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2015. V. 1848. P. 1996–2001. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.02027>
32. *Luneva A.S., Puchkov P.A., Shmendel E.V., Zenkova M.A., Kuzevanova A.Yu., Alimov A.A., Karpukhin A.V., Maslov M.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 724–731. <https://doi.org/10.1134/S1068162019010084>
33. *Yang J.P., Huang L.* // *Gene Ther.* 1997. V. 4. P. 950–960. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300485>
34. *Allen M.C., Gale P.A., Hunter A.C., Lloyd A., Hardy S.P.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1509. P. 229–236. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00297-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00297-2)
35. *Li S., Tseng W.C., Stoltz D.B., Wu S.P., Watkins S.C., Huang L.* // *Gene Ther.* 1999. V. 6. P. 585–594. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300865>
36. *Landry B., Valencia-Serna J., Gul-Uludag H., Jiang X., Janowska-Wieczorek A., Brandwein J., Uludag H.* // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2015. V. 4. P. e240. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.13>
37. *Baghban R., Ghasemian A., Mahmoodi S.* // *Arch. Microbiol.* 2023. V. 205. P. 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03480-5>
38. *Lin Y.X., Wang Y., Blake S., Yu M., Mei L., Wang H., Shi J.* // *Theranostics.* 2020. V. 10. P. 281–299. <https://doi.org/10.7150/thno.35568>
39. *Carmichael J., Degraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B.* // *AACR.* 1987. V. 47. P. 936–942.
40. *Audouy S., Molema G., de Leij L., Hoekstra D.* // *J. Gene Med.* 2000. V. 2. P. 465–476. [https://doi.org/10.1002/1521-2254\(200011/12\)2:6<465::AID-JGM141>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-2254(200011/12)2:6<465::AID-JGM141>3.0.CO;2-Z)
41. *Wang F., Yu L., Monopoli M.P., Sandin P., Mahon E., Salvati A., Dawson K.A.* // *Nanomedicine.* 2013. V. 9. P. 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.04.010>
42. *Reiser A., Woschée D., Mehrotra N., Krzysztoń R., Strey H.H., Rädler J.O.* // *Integr. Biol. (Camb).* 2019. V. 11. P. 362–371. <https://doi.org/10.1093/intbio/zyz030>

New Cationic Carbohydrate-Containing Amphiphiles and Liposomes Based on them for Effective Delivery of Short Nucleic Acids into Eukaryotic Cells

E. V. Shmendel^{*, #}, A. O. Buyanova^{*}, O. V. Markov^{}, N. G. Morozova^{*},
M. A. Zenkova^{**}, and M. A. Maslov^{*}**

[#]Phone: +7 (499) 600-80-80; e-mail: elena_shmendel@mail.ru

^{*}*Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University,
prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia*

^{**}*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
prosp. ak. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

New cationic amphiphiles containing lactose or D-mannose residues were synthesized and cationic liposomes with 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE) were obtained. The cytotoxicity and transfection activity of new carbohydrate-containing amphiphiles and cationic liposomes against HEK 293, BHK and BHK IR-780 cells were studied. It has been shown that cationic amphiphiles effectively deliver only short fluorescein-labeled oligodeoxyribonucleotide into eukaryotic cells, while cationic liposomes formed by lactose containing amphiphile and DOPE effectively mediate the transport of short oligonucleotide and small interfering RNA and were non-toxic to cells. The resulting cationic amphiphiles can be used for intracellular delivering of nucleic acids both individually and part of cationic liposomes.

Keywords: mannose, lactose, galactose, cationic amphiphiles, gene therapy, cationic liposomes, nucleic acids, cytotoxicity, transfection



УДК 616-097;615.917;616.248

СТИМУЛИРУЮЩЕ ВЛИЯНИЕ БЕНЗО(*а*)ПИРЕНА НА ПРОДУКЦИЮ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE СВЯЗАНО С ФОРМИРОВАНИЕМ ГЕРМИНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ И ЭКСТРАФОЛЛИКУЛЯРНОЙ АКТИВАЦИЕЙ В-ЛИМФОЦИТОВ В ТКАНИ ЛЕГКИХ

© 2024 г. Д. Б. Чудаков*,#, О. А. Шустова*, М. А. Стрельцова*, А. А. Генералов*,
Р. А. Величинский*, О. Д. Коцарева*, Г. В. Фаттахова*

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 08.01.2024 г.

После доработки 20.01.2024 г.

Принята к публикации 21.01.2024 г.

Несмотря на достаточно большое количество работ, посвященных поиску механизмов формирования IgE-продуцирующих В-лимфоцитов, вопрос об относительном вкладе В-лимфоцитов герминальных центров и экстрафолликулярных фокусов в этот процесс еще остается дискуссионным. Особенно актуально изучение механизмов стимуляции аллергического иммунного ответа под действием аэрополлютантов. Целью работы было изучить связь адьювантного воздействия аэрополлютента бензо(*а*)пирена (BaP) на продукцию специфического IgE в новой низкодозовой модели аллергии с изменением субпопуляционного состава В-лимфоцитов в ткани места иммунизации и вторичных лимфоидных органах. Мышей линии BALB/c иммунизировали интраназально в течение 9 недель низкой (0.3 мкг) дозой антигена овальбумина. Части животных вместе с антигеном вводили BaP в дозе 4 нг. Животных забивали на разные сроки (3 и 9 недель), проводили забор крови и анализировали субпопуляционный состав В-лимфоцитов и плазматических клеток методом проточной цитометрии. BaP достоверно стимулировал продукцию аллерген-специфического IgG₁ на раннем (3 недели) сроке и аллерген-специфического IgE на позднем (9 недель) сроке, а также повышал содержание В-лимфоцитов фенотипа герминальных центров CD19⁺CD38⁻CD95⁺B220⁺ и их предшественников CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ в селезенке на раннем и позднем сроках, но не в легких и не в региональных лимфатических узлах. Под действием BaP также повышалось содержание экстрафолликулярных плазмабластов фенотипов CD19⁺CD38⁻CD95⁺B220⁻ и CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ в селезенке на раннем сроке и в ткани легких на позднем сроке. В селезенке BaP повышал содержание CD138⁺CD19⁻B220⁺ и CD138⁺CD19⁻B220⁻ зрелых плазматических клеток, а в региональных лимфоузлах – содержание CD138⁺CD19⁺B220⁻ незрелых плазматических клеток на позднем сроке. Адьювантное действие BaP на продукцию специфического IgE был в большей степени связан со стимуляцией формирования герминальных центров в селезенке и с экстрафолликулярной активацией В-лимфоцитов в ткани легких.

Ключевые слова: IgE, бензо(*а*)пирен, гуморальный ответ, герминальные центры, экстрафолликулярный ответ, плазматические клетки

DOI: 10.31857/S0132342324060106, **EDN:** NEWCLK

ВВЕДЕНИЕ

В качестве одной из главных причин повсеместного роста в последние десятилетия частоты встречаемости заболеваний, связанных с продукцией IgE на безвредные антигены, на-

зывают рост содержания аэрополлютантов в воздухе мегаполисов и промышленно развитых регионов [1]. Наибольшее внимание при этом уделяют частицам – продуктам неполного сгорания дизельного топлива [2–4]. Данные час-

Сокращения: ПАУ – поликлинические ароматические углеводороды; ЧДТ – частицы дизельного топлива; BaP – бензо(*а*)-пирен; OVA – овальбумин.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-40-11; эл. почта: boris-chudakov@yandex.ru).

тицы обычно имеют размер ~0.1–2.5 мкм и состоят из углеродного ядра, на котором адсорбированы различные углеводороды, в том числе полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), их полихлорированные и нитропроизводные, тяжелые металлы и т.д. [2, 5]. Именно ПАУ – один из основных действующих токсических компонентов подобных частиц, обуславливающих их сильный адьювантное действие на формирование 2-го типа иммунного ответа и аллергического воспаления [6–10]. Было установлено, что введение животным прототипного ПАУ бензо(*a*)пирена способно запускать формирование аллергического воспаления, причем в этих работах было достаточно пикомолярного количества данного поллютанта [11–13].

Для разработки новых методов этиотропной терапии IgE-зависимых патологий, в том числе вызываемых аэрополлютантами, необходимо точное знание о связи формирования продукции специфического IgE с активацией различных субпопуляций В-лимфоцитов. К сожалению, несмотря на достаточно большое количество работ, посвященных этому вопросу, он еще остается дискуссионным. Результаты сильно зависят от дизайна клинического исследования и используемой модели лабораторных животных. Согласно классической точке зрения, формирование В-лимфоцитов и плазматических клеток, экспрессирующих В-клеточный рецептор и(или) секретирующих антитела, отличные от изотипов IgM и IgD, происходит в герминальных центрах [14]. Однако в работах начала 2010-х гг. выяснилось, что IgE⁺ В-лимфоциты, появляющиеся в герминальных центрах на ранних стадиях формирования данных структур, быстро исчезают оттуда по мере их созревания, поскольку происходит быстрая дифференцировка подобных клеток в плазматические клетки [15] либо их апоптоз [16]. Действительно, мастер-регулятором развития герминальных центров и фактором, обеспечивающим выживаемость В-лимфоцитов в этих структурах, является транскрипционный репрессор Bcl6 [17]. Однако этот фактор одновременно подавляет переключение на IgE, в особенности прямое, с изотипа IgM [18]. Вследствие неравногого распределения этого фактора между разными дочерними клетками при делении центробластов герминального центра некоторые клетки могут получать меньшее количество

этого фактора [19]. Однако они, очевидно, будут также подвержены апоптозу или выходу из реакции герминального центра. Ряд работ показывает, что хотя герминальные центры и нужны для получения высокоаффинных антител в ходе соматического гипермутагенеза, само переключение изотипов может происходить и в клетках-предшественниках герминальных центров или в экстрафолликулярных фокусах [20, 21]. Действительно, большинство последних клинических данных показывает, что локальное переключение изотипов на IgE связано именно с экстрафолликулярным В-клеточным ответом [22–24]. Кроме того, исследование клеточного транскриптома IgE⁺ плазматических клеток показало их сходство в большей степени с не полностью зрелыми короткоживущими плазмабластами экстрафолликулярного ответа [25]. Длительную персистенцию IgE в организме больных объясняют в таких случаях постоянным появлением новых IgE⁺-клеток из IgG₁⁺-клеток (IgG₄ у человека) в ходе последовательного переключения изотипов [26, 27], которое может и не сопровождаться появлением новых герминальных центров.

С другой стороны, имеются и прямо противоположные данные, например, на клетках *ex vivo*, согласно которым именно клетки герминальных центров склонны к переключению на синтез IgE [28, 29]. Клонирование В-клеточного рецептора изотипа IgE из клеток, выделенных из организма больных пищевой аллергией, показало их высокую аффинность [30], что указывает в пользу их происхождения в реакции герминального центра. Некоторые новые данные на модели с использованием лабораторных животных показали, что формирование высокоаффинных анафилактогенных IgE-антител происходит в ходе реакции герминального центра [31]. Также показана возможность формирования длительно персистирующих плазматических клеток при хроническом попадании антигена в организм через барьерный эпителий [32]. Это может свидетельствовать о роли герминальных центров в процессе, поскольку именно эти структуры связывают с формированием долгоживущих плазматических клеток [30].

Прямое изучение IgE⁺ В-лимфоцитов затруднено как в связи с их малочисленностью, так и с наличием на поверхности большинства IgE⁺ В-лимфоцитов рецептора к растворимому IgE,

что затрудняет детекцию “истинных” IgE⁺ В-лимфоцитов [26]. В этой связи важную роль приобретают косвенные методики, например, анализ связи продукции IgE с содержанием разных В-клеточных субпопуляций.

На сегодняшний день в литературе нет информации об исследованиях, в которых анализировалась бы связь продукции IgE, индуцируемой аэрополлютантами, с содержанием разных В-лимфоцитарных субпопуляций локально, в месте попадания аллергена, и системно, во вторичных лимфоидных органах. Целью настоящей работы было по возможности устранить данный пробел и определить связь адьювантного эффекта BaP с содержанием различных В-клеточных субпопуляций в месте попадания аллергена (ткани легких), лимфатических узлах и селезенке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, BaP как основной действующий компонент ЧДТ способен самостоятельно вызывать индукцию локального аллергического воспаления и продукцию аллера-

ген-специфических антител [11–13]. В ходе данной работы нами было произведено многократное, дважды в неделю в течение 9 недель, интраназальное введение модельного антигена OVA в низкой (0.3 мкг) дозе в отсутствие и в присутствии 4 нг BaP. Действительно, согласно представленным на рис. 1 и табл. 1 данным, продукция OVA-специфических антител достоверно усиливалась под воздействием BaP. Продукция аллерген-специфических IgE формировалась только на позднем сроке (63-и сутки) и только при совместном введении антигена и BaP. В отсутствие поллютанта формирование продукции специфического IgE не отмечалось при сравнении с интактной группой (рис. 1a). В то же время продукция специфического IgG₁ под действием BaP на позднем сроке формировалась со схожей интенсивностью в группах, иммунизированных как в присутствии BaP, так и без него. Однако на раннем сроке было отмечено достоверное стимулирующее воздействие BaP на продукцию антител данного субкласса (рис. 1b).

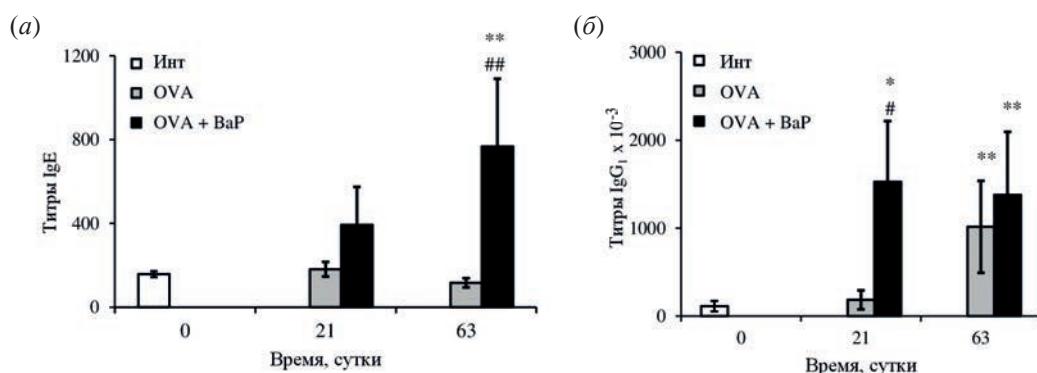


Рис. 1. Гуморальный ответ у мышей линии BALB/c на ранний и поздний срок. Титры специфических антител класса IgE (a) и IgG₁ (b) у мышей линии BALB/c – интактных (Инт) или иммунизированных интраназально антигеном овальбумином (OVA) без бензо(a)пирена либо овальбумином с бензо(a)пиреном (OVA + BaP) в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности отличий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

Таблица 1. Титры специфических IgE и IgG₁ антител у животных после иммунизации антигеном OVA в отсутствии стимулов и в присутствии бензо(a)пирена

Срок иммунизации, дни	Группа, протокол	Титры IgE	Титры IgG ₁
0	Интактные	150 ± 15	110 ± 60
21	OVA	180 ± 30	180 ± 110
	OVA + BaP	390 ± 180	1500 ± 700*, #
63	OVA	120 ± 20	1000 ± 500**
	OVA + BaP	800 ± 300**, ##	1400 ± 700**

**/## $p < 0.05/0.01$ (достоверности отличий между указанной группой и интактными животными).

#/#/## $p < 0.05/0.01$ (достоверности отличий между указанной группой, иммунизируемой с BaP, и аналогичной группой без BaP).

Для выявления связи адьювантного эффекта поллютанта с различными механизмами В-лимфоцитарной активации (герминальные центры или экстрафолликулярный ответ) была проведена проточная цитометрия образцов клеток, взятых из ткани легких, региональных лимфатических узлов и селезенки. Анализ субпопуляций осуществляли по схеме, представленной на рис. 2. Согласно полученным данным, интраназальное введение антигена увеличивало содержание клеток $B220^+CD38^+CD95^+$ в $CD19^+$ В-лимфоцитах легких на позднем сроке (63-и сутки) (рис. 3а). Эти клетки представляли собой предшественников герминальных центров [33]. Несмотря на это, содержание В-лимфоцитов герминальных центров фенотипа $B220^+CD38^-CD95^+$ в В-лимфоцитах легких, напротив, снижалось. BaP не оказывал влияния на процентное соотношение данных субпопуляций В-лимфоцитов в легких. Содержание В-лимфоцитов – предшественников герминальных центров – достоверно возрастало под действием

антигена также на раннем сроке (21-е сутки) в региональных лимфатических узлах. При этом BaP достоверно оказывал сильный стимулирующее воздействие на накопление В-лимфоцитов – предшественников герминальных центров в селезенке на раннем и позднем сроках, но не в региональных лимфатических узлах (рис. 3б, 3в). В региональных лимфатических узлах отмечали небольшое, но достоверное, снижение содержания В-лимфоцитов фенотипа герминального центра на раннем сроке в группе, иммунизированной с BaP (рис. 3д). Интраназальное введение антигена без BaP стимулировало небольшое достоверное накопление В-лимфоцитов фенотипа герминальных центров в селезенке. Однако введение BaP с антигеном значительно усиливало это накопление (рис. 3е). Хотя наибольшей интенсивности эффект BaP⁺ достигал на позднем сроке (содержание В-лимфоцитов фенотипа герминальных центров под действием поллютанта увеличивалось приблизительно на порядок),

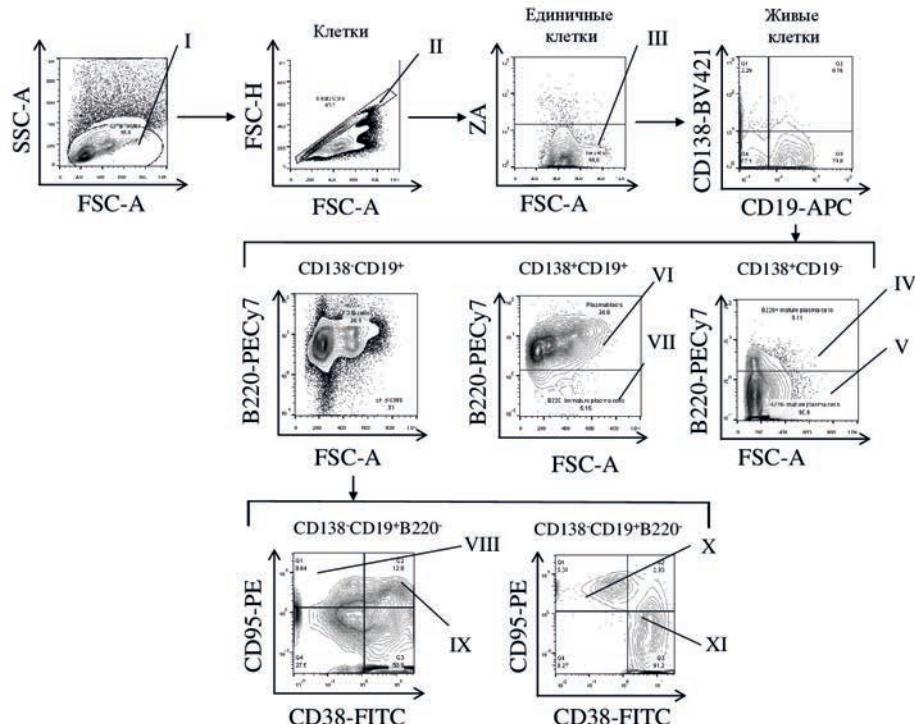


Рис. 2. Стратегия анализа субпопуляций В-лимфоцитов и плазматических клеток. Цифрами обозначены следующие субпопуляции, упомянутые в статье: I – лимфоидные клетки в целом; II – единичные клетки; III – живые клетки; IV – $CD138^+CD19^+B220^+$ зрелые плазматические клетки; V – $CD138^+CD19^+B220^-$ зрелые плазматические клетки; VI – $CD138^+CD19^+B220^+$ плазмабласты; VII – $CD138^+CD19^+B220^-CD19^+$ незрелые плазматические клетки; VIII – $CD38^-CD95^+B220^-CD19^+$ активированные плазмабласты экстрафолликулярного ответа; IX – $CD38^+CD95^+B220^-CD19^+$ активированные плазмабласты экстрафолликулярного ответа; X – $CD38^-CD95^+B220^+CD19^+$ В-лимфоциты герминальных центров; XI – $CD38^+CD95^+B220^+CD19^+$ предшественники В-лимфоцитов герминального центра.

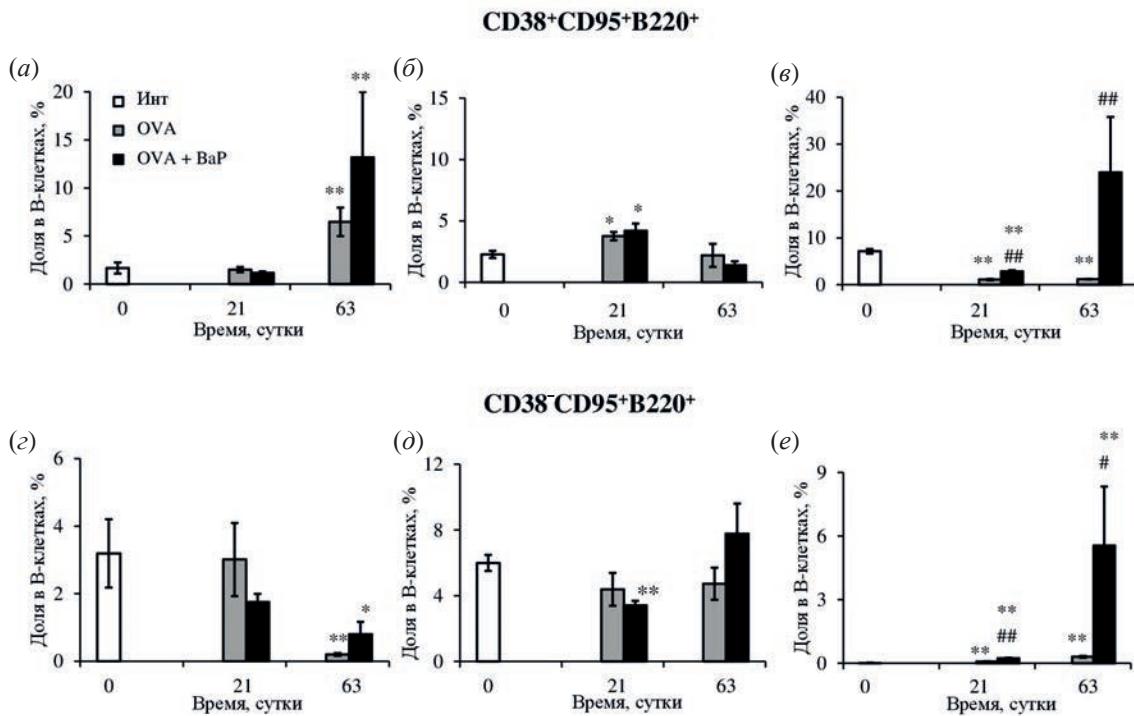


Рис. 3. Содержание субпопуляций фолликулярно активированных В-лимфоцитов у мышей на разные сроки. Доля В-лимфоцитов – предшественников клеток герминалного центра $CD38^+CD95^+B220^+CD19^+$ (a–e) и собственно В-лимфоцитов герминалного центра $CD38^-CD95^+B220^+CD19^+$ (e–e) в $CD19^+$ В-лимфоцитах ткани легких (a, e), региональных лимфатических узлов (b, d) и селезенки (c, e) у иммунизированных мышей в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности отличий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

эффект был достоверен и в образцах, взятых от мышей на раннем сроке. Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае В-лимфоцитов – предшественников герминалных центров, отличавшихся сохранявшейся экспрессией CD38 (рис. 3в, 3е). Таким образом, имеется связь между влиянием BaP на продукцию антител и накоплением клеток герминалных центров и их предшественников в региональных лимфоузлах и легких.

Инtranазальное введение антигена в отсутствие дополнительных стимулов не оказывало влияния на изменение субпопуляционного состава и содержания активированных $CD38^-CD95^+B220^-$ и $CD38^+CD95^+B220^-$ плазмабластов [34] в общем пуле В-лимфоцитов легких (рис. 4а, 4г). Введение OVA достоверно повышало содержание этих клеток в региональных лимфатических узлах в образцах, взятых от животных на раннем сроке (рис. 4б, 4д). Кроме того, наблюдали достоверное увеличение содержания $CD38^-CD95^+B220^-$ плазмабластов на раннем и позднем сроках им-

мунизации в селезенке под действием антигена. В отношении $CD38^+CD95^+B220^+$ плазмабластов селезенки подобное наблюдало на раннем сроке (рис. 4в, 4е). Введение BaP достоверно и заметно (в ~2–3 раза) повышало содержание субпопуляций активированных плазмабластов в селезенке, но не региональных лимфатических узлах, на раннем сроке (рис. 4в, 4е). В образцах легких, взятых у мышей на позднем сроке, когда происходило формирование продукции IgE, наблюдали повышение содержания активированных плазмабластов в ткани легких, которое было достоверно для $CD38^-CD95^+B220^-$ субпопуляции (рис. 4а, 4г). Хотя поллютант не оказал значительного влияния на накопление субпопуляций $CD38^+CD95^+B220^-$ плазмабластов в региональных лимфоузлах по сравнению с группами мышей, иммунизированных без него, именно в группах с поллютантом сохранилось их повышенное содержание, наблюдавшееся на всех сроках иммунизации по сравнению с интактными животными (рис. 4б). Полученные данные указывают на

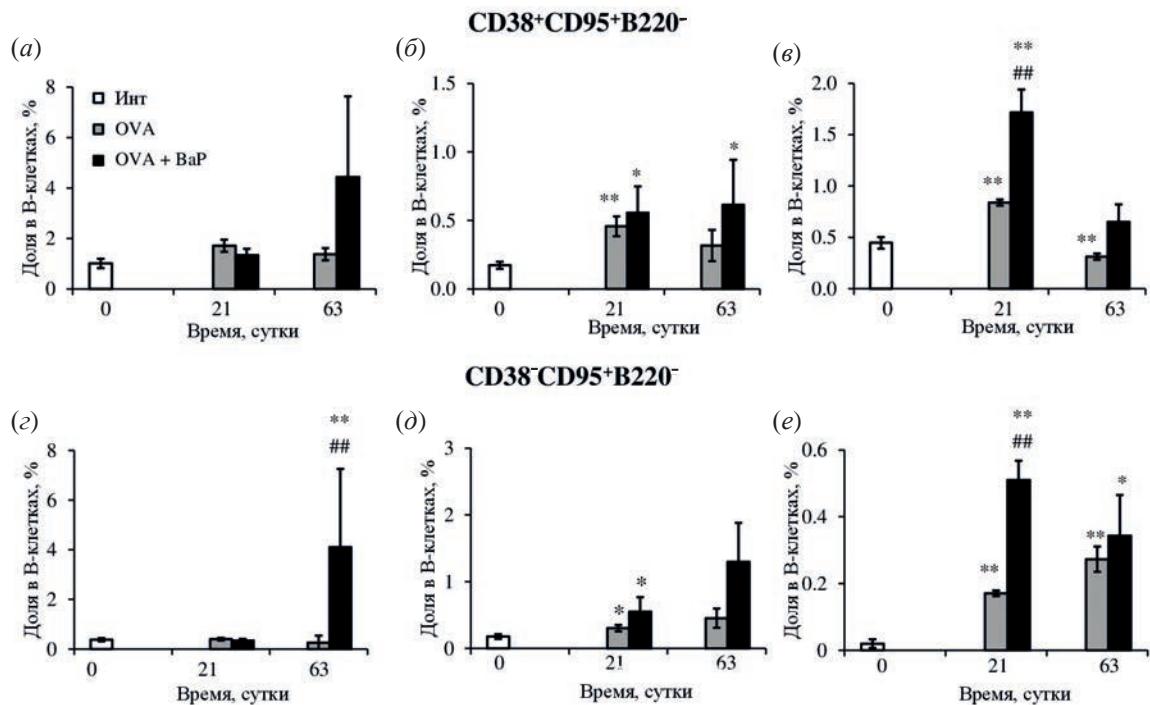


Рис. 4. Содержание субпопуляций экстрафолликулярно активированных В-лимфоцитов у мышей на разные сроки. Доля различных субпопуляций экстрафолликулярно активированных В-лимфоцитов – $CD38^+CD95^+B220^+CD19^+$ (a–c) и $CD38^-CD95^+B220^-CD19^+$ (d–f) в $CD19^+$ В-лимфоцитах ткани легких (a, d), региональных лимфатических узлов (b, e) и селезенки (c, f) у иммунизированных мышей в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности различий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

связь адьюванного воздействия BaP на продукцию специфического IgE, сформировавшуюся на позднем сроке, с накоплением экстрафолликулярно активированных плазмабластов локально, в ткани легких. Также существовала связь между адьювантыным влиянием на продукцию специфического IgG₁ на раннем сроке иммунизации с усилением накопления под влиянием BaP экстрафолликулярно активированных плазмабластов в селезенке на том же сроке.

Часть субпопуляции плазматических клеток даже после “созревания” и утраты экспрессии CD19 продолжает экспрессировать маркер B220, отличия плазматических клеток B220⁺ от B220⁻ пока не полностью понятны [35]. По ряду данных, фракция B220⁻CD138⁺ плазматических клеток включает в себя больше долгоживущих плазматических клеток, чем B220⁺ [36]. Под действием антигена происходило снижение содержания CD19⁻CD138⁺B220⁺ зрелых плазматических клеток в ткани легких и в региональных лимфатических узлах на позднем сроке (рис. 5a, 5b). На-

против, антиген индуцировал накопление этой субпопуляции зрелых плазматических клеток в селезенке на обоих сроках, причем на позднем сроке процесс стимулировался BaP (рис. 5c). В отношении субпопуляции CD19⁻CD138⁺B220⁻, которую с осторожностью можно назвать более долгоживущей субпопуляцией зрелых плазматических клеток, чем предыдущая, закономерности были во многом сходны. Антиген уменьшал их содержание на позднем сроке в ткани легких и региональных лимфоузлах. Однако на раннем сроке в этих органах наблюдали рост их содержания (рис. 5d, 5e). Как и в прошлом случае, антиген стимулировал накопление данных субпопуляций в селезенке на раннем сроке, а на позднем сроке BaP усиливал этот процесс (рис. 5e).

Лимфоциты фенотипа CD138⁺CD19⁺B220⁺ соответствуют по фенотипу терминально дифференцированным, но способным к делению короткоживущим плазмабластам, формируемым в экстрафолликулярных фокусах [37]. Согласно полученным данным, под воздействием антигена

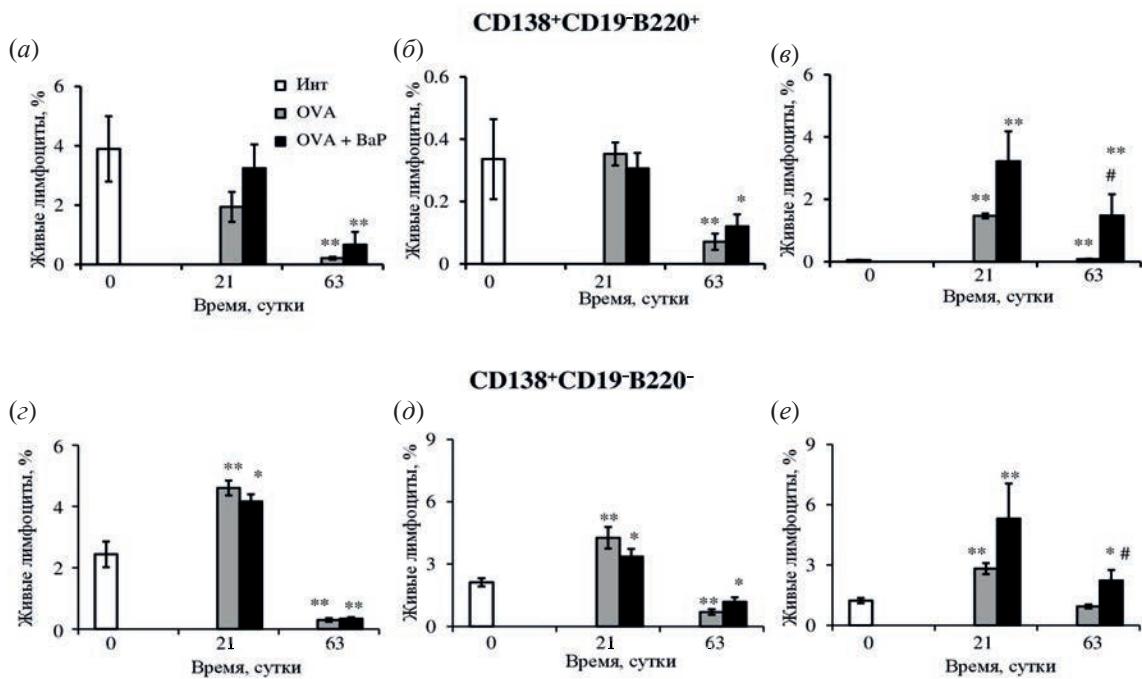


Рис. 5. Содержание субпопуляций зрелых плазматических клеток у мышей на разные сроки. Доля субпопуляций зрелых CD138⁺CD19⁻ плазматических клеток, имеющих высокий (а-в) и низкий (г-е) уровень экспрессии B220 в живых лимфоидных клетках ткани легких (а, г), региональных лимфатических узлов (б, д) и селезенки (в, е) у иммунизированных мышей в указанные сроки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверности отличий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

происходит увеличение содержания плазмабластов фенотипа CD138⁺CD19⁺B220⁺ в клетках региональных лимфатических узлов и селезенки на раннем сроке, которое при более длительной иммунизации снижается, оставаясь выше уровня у интактных мышей, в случае с селезенкой (рис. 6 α), или ниже, в случае с региональными лимфоузлами (рис. 6 δ). Подобного роста не наблюдается в случае с образцами ткани легких (рис. 6 α , 6 γ). Интересно, что нами была также обнаружена субпопуляция CD138⁺CD19⁺B220⁻ незрелых плазматических клеток. Введение антигена усиливает их накопление в региональных лимфатических узлах и селезенке в основном на раннем сроке (рис. 6 ϵ). Введение BaP несколько снижало антиген-индуцированное накопление плазмобластов и в селезенке, и в лимфоузлах. При этом на позднем сроке BaP усиливал накопление данной субпопуляции только в региональных лимфатических узлах (рис. 6 δ , 6 ϵ). В ткани легких в группе, иммунизированной антигеном и BaP, наблюдали содержание этих клеток на раннем сроке, а в группе, иммунизированной антигеном без BaP, – на позднем сроке

(рис. 6 γ). Воздействие BaP на продукцию специфического IgE, таким образом, было связано как с влиянием на накопление к позднему сроку субпопуляций зрелых CD19⁻CD138⁺ плазматических клеток в селезенке, так и с накоплением незрелых плазматических клеток фенотипа CD19⁺CD138⁺B220⁻ региональных лимфоузлов.

В нашей прошлой работе нами было установлено, что ЧДТ способны индуцировать продукцию специфического IgE при введении как с высокими, так и с низкими дозами антигена [38]. В настоящей работе нами получены данные, согласно которым BaP, прототипный ПАУ, также стимулировал продукцию специфического IgE (на позднем сроке) и IgG1 (на более раннем сроке) при интраназальном введении с антигеном. Это вполне согласуется с работами, согласно которым именно ПАУ – основные действующие компоненты ЧДТ (частиц дизельного топлива) [6–10], и их введение самих по себе способно стимулировать локальное аллергическое воспаление [11–13].

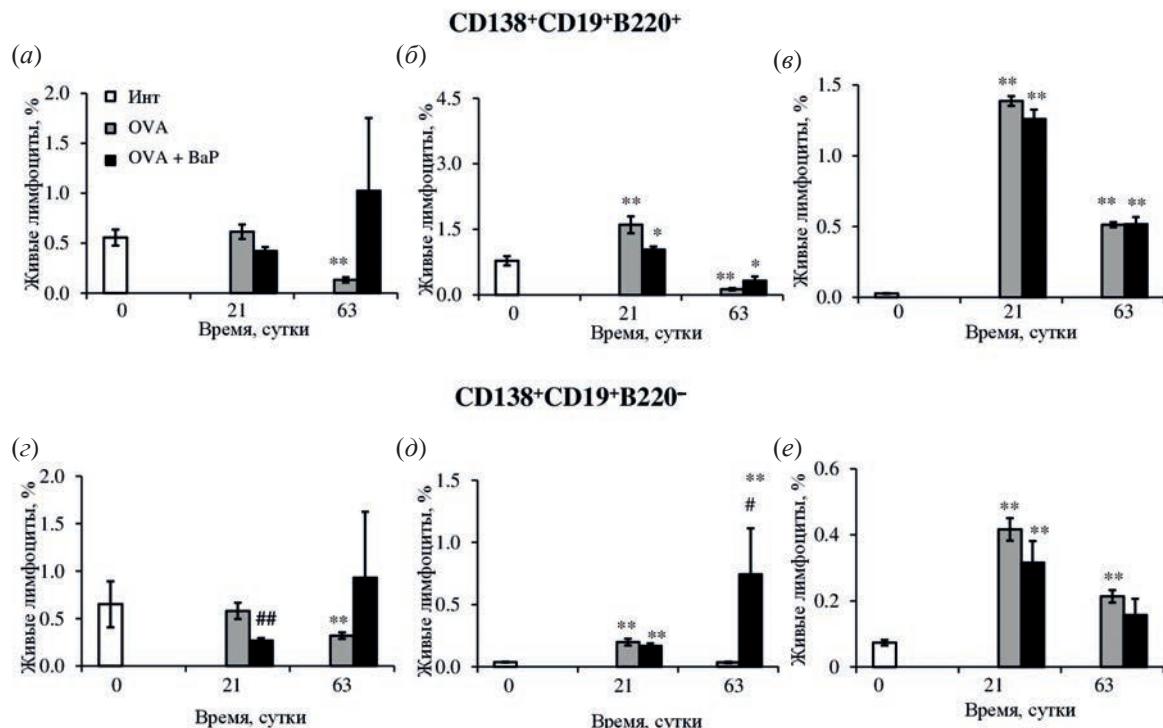


Рис. 6. Содержание субпопуляций незрелых плазматических клеток у мышей на разные сроки. Доля субпопуляций незрелых CD138⁺CD19⁺ плазматических клеток, имеющих высокий (*а*–*в*) и низкий (*г*–*е*) уровень экспрессии B220 в живых лимфоидных клетках (*а*, *г*), региональных лимфатических узлов (*б*, *д*) и селезенки (*в*, *е*) у иммунизированных мышей в указанные сроки. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 – достоверности отличий указанной группы от интактной группы; # *p* < 0.05, ## *p* < 0.01 – достоверности отличий между группами, иммунизированными с BaP и без него.

В ряде работ [22–24, 39] была показана важная роль локального переключения изотипов в продукции специфического IgE у больных с астмой и аллергическим ринитом. В данной работе удалось установить, что под действием BaP наблюдается накопление на позднем сроке CD38[–]CD95⁺B220⁺CD19⁺ экстрафолликулярно активированных В-лимфоцитов в легких, но не во вторичных лимфоидных органах. В нашей прошлой работе [40] было выдвинуто предположение, что эти лимфоциты, напоминающие своим фенотипом клетки герминального центра, представляют собой экстрафолликулярно активированные плазмабласты, взаимодействующие с экстрафолликулярными Т-хеллерами. В результате активации CD40-рецептора на В-лимфоцитах происходит подъем уровня экспрессии CD95 [41], а снижение уровня экспрессии CD38 может свидетельствовать об их дифференцировке в зрелые плазматические клетки [42]. Сочетание поверхностной экспрессии CD19 с отсутствием поверхностной экспрессии B220 и CD138 указывает тем не менее на природу этих клеток как ранних плазмаблас-

тов [33]. Однако в данном случае связь продукции специфического IgE этой субпопуляцией экстрафолликулярно активированных плазмабластов вызывает сомнение, поскольку продукция специфического IgE на позднем сроке не была связана с накоплением в ткани легких зрелых CD138⁺CD19[–] плазматических клеток, что может свидетельствовать о неблагоприятных условиях для их формирования в ткани. Несмотря на то что антиген индуцировал накопление в ткани легких CD38⁺CD95⁺B220⁺CD19⁺ В-лимфоцитов, являющихся по фенотипу предшественниками герминальных центров [34], накопление В-клеток собственно герминальных центров (CD38[–]CD95⁺B220⁺CD19⁺) не происходило, и BaP никак не влиял на этот процесс. Это согласуется с данными нашей прошлой работы, в которой BaP стимулировал локальное переключение в легких, активируя экстрафолликулярный иммунный ответ, но не формирование герминальных центров [38].

Согласно данным настоящей работы, влияние BaP на субпопуляционный состав В-лимфоцитов проявляется в основном в селезенке. Введе-

ние антигена стимулировало накопление В-лимфоцитов фенотипа герминального центра $CD38^-CD95^+B220^+CD19^+$ в селезенке. Аэрополлютант BaP значительно и достоверно увеличивал их содержание как на раннем, так и на позднем сроке, а также увеличивал содержание предшественников В-лимфоцитов фенотипа герминального центра $CD38^+CD95^+B220^+CD19^+$. Именно в селезенке происходило увеличение процентного содержания $CD138^+CD19^-$ зрелых плазматических клеток, в региональных лимфатических узлах происходило только накопление одной из субпопуляций незрелых плазматических клеток ($CD138^+CD19^+B220^-$). Данные о накоплении зрелых плазматических клеток параллельно с накоплением В-лимфоцитов герминального центра позволяют предположить, что основные события, связанные с адьювантным влиянием поллютанта на продукцию IgE, происходят в селезенке (а не в ткани легких, где усиление накопления плазматических клеток под действием BaP не наблюдалось). Хотя введение антигена приводило к накоплению в региональных лимфоузлах некоторых субпопуляций активированных В-лимфоцитов, этот процесс не был связан с адьювантным эффектом BaP. Полученные данные находятся в противоречии с рядом литературных данных, согласно которым вводимый интраназально антиген сначала транспортируется в лимфатические узлы и лишь затем переносится в селезенку как с помощью дендритных клеток [43, 44], так и В-лимфоцитов [45]. С другой стороны, наши данные согласуются с результатами работы, в которой В-клетки переносили антиген из легких одновременно как в дренирующие легкие лимфатические узлы, так и в селезенку [46]. Это происходит в том случае, если В-лимфоциты переносят антиген на своих В-клеточных рецепторах, имеющих к нему низкое сродство [46]. В таком случае должна иметь место миграция В-лимфоцитов из ткани легких в селезенку. Косвенно это подтверждается уменьшением под действием антигена содержания в легких В-лимфоцитов фенотипа герминального центра. Действительно, можно предположить, что именно В-лимфоциты играют основную роль на ранних стадиях как клетки, первые воспринимающие антиген [47] и иногда переносящие его из легких в другие органы, что было отмечено в ряде работ [45, 46, 48], особенно если использовали низкие дозы антигена [47]. Другое объяснение селективности эффекта поллютанта в отношении накопления

зрелых плазматических клеток и клеток фенотипа герминальных центров именно в селезенке может объясняться наличием там особых субпопуляций цитокин-продуцирующих и антиген-презентирующих клеток. Так, в условиях воспалительной реакции в селезенке могут формироваться особые $CD11b^+Gr1^+$ миелоидные клетки, которые стимулируют формирование долгоживущих плазматических клеток [49], в свою очередь, способных стимулировать дифференцировку Т-фолликулярных хелперов [50] и, следовательно, герминальных центров. Однако пока это описано только в условиях аутоиммунной патологии. Имеют ли данные процессы место в настоящей модели, предстоит выяснить в дальнейших работах.

С другой стороны, имеются также данные о том, что антиген из легких в селезенку могут доставлять и дендритные клетки [51]. Роль В-лимфоцитов и дендритных клеток в переносе антигена в селезенку также еще предстоит выяснить в следующих работах.

Исходя из данных нашей работы, эффект BaP мог быть связан как с накоплением В-лимфоцитов фенотипа герминальных центров (селезенка), так и с экстрафолликулярной активацией (легкие). Однако, поскольку эффект BaP в первом случае проявлялся как на раннем, так и на позднем сроке и имел место в отношении двух субпопуляций, а не одной, первое предположение более достоверно. Под действием антигена в отсутствие BaP происходило накопление как $CD38^-CD95^+B220^-$, так и $CD38^+CD95^+B220^+$ плазмабластов, а BaP на 21-е сутки усиливал их содержание в селезенке. Все же влияние на их количество на позднем сроке (63-и сутки) в центральных лимфоидных органах, когда непосредственно происходила достоверная продукция IgE, поллютант не оказывал. Поэтому исходя из кинетики продукции антител логичнее предположить, что действие BaP на экстрафолликулярную активацию В-лимфоцитов было скорее связано с его адьювантным воздействием на продукцию специфического IgG₁ на раннем сроке. Такая точка зрения косвенно подтверждалась стимулирующим влиянием BaP преимущественно на накопление зрелых плазматических клеток, формирующихся в герминальном центре [14], но не незрелых плазмабластов экстрафолликулярного ответа. Связь BaP с некоторым накоплением на позднем сроке экстра-

фолликулярно активированных плазмабластов в легких, но не в других органах, выглядит сомнительно еще и в связи с отсутствием связанного с этим накопления в ткани легких плазматических клеток. Надо полагать, что условия для их формирования и(или) персистенции в легких были неблагоприятны.

Полученные результаты согласуются с рядом литературных данных, согласно которым формирование продукции IgE так или иначе связано с реакцией герминальных центров [28, 29, 31], и вступают в противоречие с рядом клинических работ и с нашими собственными данными, полученными ранее на модели с использованием иммунизации в область холки, подкожная жировая клетчатка которой богата тканеассоциированными лимфоидными кластерами [22–24]. В той работе нами был показан преимущественно локальный характер ранних стадий аллергического иммунного ответа и его связь с экстрафолликулярной В- и Т-клеточной активацией [40]. Однако, поскольку модели в этих двух работах были существенно разные как по методике (в настоящей работе интраназально, в предыдущей подкожно), так и по использованию адьюванта (в настоящей работе BaP, в прошлой – без адьюванта), прямого противоречия между этими двумя работами нет. Различия легко объяснить, принимая во внимание особое адьюванное воздействие BaP на иммунный ответ [11–13]. Также важно, что именно при интраназальном, но не подкожном, способе введения, уже на ранних этапах осуществляется доставка антигена в селезенку [46], что, вероятно, обусловлено особыми свойствами легочных В-лимфоцитов и свойствами самого альвеолярного барьера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали самок мышей линии BALB/c 7–8-недельного возраста, вес 18–22 г. Животные были получены из питомника Научного центра биомедицинских технологий (Андреевка, Россия). Животных содержали при 12-часовом цикле свет–темнота и кормили *ad libitum*, в качестве подстилки использовали древесные опилки. Общее число животных составило 30, по 6 в опытных группах и интактной.

Иммунизация и забор образцов. В качестве модельного антигена использовали овальбумин, OVA (>98% чистоты, Art. A5503, фракция V; Sigma-

Aldrich, Германия). Содержание LPS в пересчете на 10 мкг антигена составляло 0.04 EU согласно LAL-тесту. Антиген вводили интраназально в физиологическом растворе в объеме 50 мкл, в количестве 0.3 мкг на введение. Части животным также вводили BaP в дозе 4 нг в смеси с антигеном интраназально в общем объеме 50 мкл. В опыте участвовало по две группы животных, забитых на разные сроки, которым вводили антиген без BaP, и две группы животных, которым вводили антиген и BaP, *n* = 6 в каждой группе. Результаты сопоставляли с параметрами интактной группы неиммунизированных мышей. Введение OVA и BaP осуществляли под изофлурановой анестезией 3 раза в неделю в течение первых двух недель и по 2 раза в неделю в течение последующих 7 недель. Максимальная продолжительность протокола составляла 9 недель (63 дня). Часть животных умерщвляли через 3 недели (21 день) после начала иммунизации, оставшуюся часть – в конце протокола.

У животных брали образцы крови для получения сыворотки из подглазничного синуса. Полученные образцы инкубировали при 20°C, затем центрифугировали при 600 *g* для отделения тромба и хранили при –20°C до дальнейшего использования.

Для взятия органов – ткани легких, региональных лимфатических узлов, селезенки – животных забивали методом цервикальной дислокации. Порезанные на небольшие кусочки образцы ткани легких инкубировали 30 мин с раствором, содержащим 1% коллагеназы D и 0.1 ед. ДНКазы I (Sigma-Aldrich, Германия). Далее осуществляли гомогенизацию перетиранием с помощью пестика в лунке 24-луночного планшета. Образцы региональных лимфоузлов и селезенки гомогенизировали без использования ферментов.

Иммуноферментный анализ. Для иммуноферментного анализа использовали 96-луночные планшеты (Costrar, США). Для формирования подложки при определении продукции специфического IgE в лунки вносили раствор OVA в PBS (рН 7.2) в концентрации 20 мкг/мл, далее инкубировали планшет в течение ночи при 4°C. Между стадиями осуществляли трехкратную отмыкку буфером PBS, содержащим в составе 0.05% Tween-20. Блокирование осуществляли в течение часа 5%-ным раствором BCA в PBS, который вносили в объеме 100 мкл. Затем на-

носили сыворотки в разных разведениях в том же блокирующем буфере. Инкубацию с сыворотками осуществляли в течение суток при 4°C. На следующей стадии наносили конъюгат антител к мышевым IgE (клон 23G3, Abcam, США), меченный пероксидазой хрина (ПХ), в разведении 1 : 2000. Реакцию проявляли с использованием субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в концентрации 1 мМ и перекиси водорода в концентрации 4 мМ. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм, вычитая из нее значение оптической плотности при 620 нм как фоновое. В качестве отрицательного контроля в каждом планшете в восемь лунок не вносили сыворотки (фон). За титр сыворотки принимали то ее наибольшее разведение, при котором соответствующая ей оптическая плотность в реакции становилась равной фоновой плюс три стандартных отклонения.

Продукцию специфического IgG₁ оценивали в целом аналогично, но со следующими отличиями: при формировании подложки вносили раствор OVA с концентрацией 5 мкг/мл, для детекции использовали первичный конъюгат – антитела к мышевым IgG₁ (клон RMG1-1, BioLegend, США) в разведении 1 : 5000 и вторичный конъюгат стрептавидин-ПХ (BioLegend, США) в разведении 1 : 7000.

Проточная цитометрия. Гомогенизированные образцы органов и тканей использовали для проточной цитометрии. Образцы вначале отмывали в PBS центрифугированием при 300 g. Полученный клеточный осадок ресуспендировали и окрашивали красителем Zombie Aqua (BioLegend, США) в разведении 1 : 1000 согласно рекомендации производителя (20 мин при комнатной температуре). Краситель селективно окрашивал мертвые клетки, что было необходимо для их отсечки в процессе последующего анализа. Затем образцы вновь центрифугировали и ресуспендировали в FACS-буфере (PBS с добавлением 0.5% БСА и 0.01% азива натрия). Сусpenзию клеток пропускали через фильтр с диаметром пор 80 мкм, затем окрашивали антителами (BioLegend, США) в разведениях, рекомендованных производителем. Использовали следующие антитела: антитела к мышевым CD138, меченные BV421 (клон 281-2); антитела к мышевым CD38, меченные FITC (клон 90); антитела к мышевым CD95,

меченные PE (клон SA367H8); антитела к мышевым B220, меченные PECy7 (клон RA3-6B2); антитела к мышевым CD19, меченные APC (клон 6B5). Проточную цитометрию проводили на приборе MACS Quant Tyto (Miltenyi Biotech, Гладбах, Германия). Данные обрабатывали в программе FlowJo V10 (BD Biosciences, США).

Анализ клеточных субпопуляций осуществляли так, как показано на рис. 2. В-лимфоциты определяли как CD19⁺CD138⁻, зрелые плазматические клетки как CD19⁻CD138⁺, незрелые плазматические как CD19⁺CD138⁺. Плазмабласты экстрафоллилярного ответа определяли как CD19⁺B220⁻ [33], они различались по экспрессии CD38 и CD95. В-лимфоциты типичных герминальных центров определяли как CD19⁺B220⁺CD38⁻ CD95⁺ [34], В-лимфоциты – предшественники герминального центра – как CD19⁺B220⁺CD38⁺ CD95⁺ [35].

Статистическая обработка полученных данных. Все результаты представлены в виде средних значений и соответствующих величин стандартного отклонения. Статистическую значимость различий между группами определяли с использованием ANOVA-теста с поправкой на множественное сравнение. Значения *p* по данному тесту, эквивалентные *p* < 0.05 с поправкой на множественное сравнение, считали статистически достоверными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адьювантное воздействие BaP на синтез IgE в низкодозовой модели аллергии оказалось связанным со стимуляцией дифференцировки В-лимфоцитов в сторону В-клеток фенотипа герминального центра в селезенке, но не в региональных лимфатических узлах или ткани легких. Локальная активация В-лимфоцитов в легких была со-пряжена с индукцией экстрафоллилярного ответа под действием поллютанта в ткани легких. При этом происходила стимуляция формирования зрелых плазматических клеток, но не незрелых плазмабластов, в селезенке. Механизмы, связанные с продукцией IgE в данной модели, таким образом, существенно отличаются от механизмов, описанных нами ранее для безадьювантной модели с подкожным введением антигена.

Таким образом, в настоящей работе была продемонстрирована модель аллергического воспаления, индуцируемого BaP, которую можно ис-

пользовать для дальнейшего изучения механизмов действия аэрополлютантов на иммунную систему. Практическая значимость результатов настоящей работы заключается в том, что они показывают необходимость разработки таких лекарственных средств для предотвращения формирования IgE-продуцирующих В-лимфоцитов, которые блокировали бы переключение на синтез IgE как в В-лимфоцитах экстрафолликулярных фокусов, так и в В-лимфоцитах герминальных центров.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность научному сотруднику лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН за помощь при работе на приборе – проточном цитометре MACS Quant Tyto.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-10044) за 2023–2024 гг. и поддержке бюджета города Москвы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящей работе использовали лабораторных животных – самок мышей линии BALB/c. Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC) Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол № 147/2021).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы ДБЧ, МАС участвовали в проведении экспериментов с лабораторными животными, ИФА и измерениях методом проточной цитометрии; авторы ОАШ, ГВФ и ААГ участвовали в отборе проб и подготовке клеток для проточной цитометрии; авторы РАВ и ОДК участвовали в анализе исходных данных, статистической обработке данных; автор ДБЧ также участвовал в подготовке гистограмм и рисунков данных, общем планировании работы, подготовке исходного варианта статьи; автор ГВФ участвовал в редактировании и корректировке окончательного варианта статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Poulsen L.K., Hummelshoj L.* // Ann. Med. 2007. V. 39. P. 440–456.
<https://doi.org/10.1080/07853890701449354>
2. *Pandya R.J., Solomon G., Kinner A., Balmes J.R.* // Environ. Health Prospect. 2002. V. 10 (S1). P. 103–112.
<https://doi.org/10.1289/ehp.02110s1103>
3. *Munoz X., Barreiro E., Bustamante V., Lopez-Campos J.L., Gonzalez-Barcala F.J., Cruz M.J.* // Sci. Total Environ. 2019. V. 652. P. 1129–1138.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.188>
4. *Грачев В.А., Ишков А.Г., Романов К.В., Курышева Н.И.* // Вестник НИЦ МИСИ. Актуальные вопросы современной науки. 2019. № 18. С. 142–155.
5. *Wang X., Wang Y., Bai Y., Wang P., Zhao Y.* // J. Energy Inst. 2019. V. 92. P. 1864–1888.
<https://doi.org/10.1016/j.joei.2018.11.006>
6. *Balmes J.R.* // Thorax. 2011. V. 66. P. 4–6.
<https://doi.org/10.1136/thx.2010.145391>
7. *Yanagisawa R., Takano H., Inoue K.-I., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yamaki K., Yoshikawa T., Hayakawa K.* // Clin. Exp. Allergy. 2006. V. 36. P. 386–395.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02452.x>
8. *Канило П.М., Костенко К.В.* // Проблемы машиностроения. 2011. Т. 14. № 6. С. 73–80.
9. *Ткачева М.В.* // Сб. матер. конф. “Актуальные вопросы радиационной и экологической медицины, лучевой диагностики и лучевой терапии”, Гродно, 2022. С. 349–354.
10. *Малыгина Д.А., Роговская Н.Ю., Бельтиков П.П., Бабаков В.Н.* // Токсикологич. вестник. 2022. Т. 30. № 3. С. 158–166.
11. *Yanagisawa R., Koike E., Win-Shwe T.-T., Ichinose T., Takano H.* // J. Appl. Toxicol. 2016. V. 36. P. 1496–1504.
<https://doi.org/10.1002/jat.3308>
12. *Yanagisawa R., Koike E., Win-Shwe T.-T., Ichinose T., Takano H.* // J. Immunotoxicol. 2018. V. 15. P. 31–40.
<https://doi.org/10.1080/1547691X.2018.1442379>
13. *Wang E., Liu X., Tu W., Do D.C., Yu H., Yang L., Zhou Y., Xu D., Huang S.-K., Yang P., Ran P., Gao P.-S., Liu Z.* // Allergy. 2019. V. 74. P. 1675–1690.
<https://doi.org/10.1111/all.13784>
14. *Gatto D., Brink R.* // J. Allergy Clin. Immunol. 2010. V. 126. P. 898–907.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.007>
15. *Talay O., Yan D., Brightbill H.D., Straney E.E.M., Zhou M., Ladi E., Lee W.P., Egen J.G., Austin C.D., Xu M., Wu L.C.* // Nat. Immunol. 2012. V. 13. P. 396–404.
<https://doi.org/10.1038/ni.2256>
16. *Yang Z., Sullivan B.M., Allen C.D.C.* // Immunity. 2012. V. 36. P. 857–872.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.009>

17. Basso K., Dalla-Favera R. // *Immunol. Rev.* 2012. V. 247. P. 172–183.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01112.x>
18. Kitayama D., Sakamoto A., Arima M., Hatano M., Miyazaki M., Tokuhisa T. // *Mol. Immunol.* 2008. V. 45. P. 1337–1345.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.007>
19. Barnett B.E., Ciocca M.L., Goenka R., Barnett L.G., Wu J., Laufer T.M., Burkhardt J.K., Cancro M.P., Reinherz S.L. // *Science*. 2012. V. 335. P. 342–344.
<https://doi.org/10.1126/science.1213495>
20. Roco J.A., Mesin L., Binder S.C., Nefzger C., Gonzalez-Figueroa P., Canete P.F., Ellyard J., Shen Q., Robert P.A., Cappello J., Vohra H., Zhang Y., Nowosad C.R., Schiepers A., Corcoran L.M., Toellner K.-M., Polo J.M., Meyer-Hermann M., Victoria G.D., Vinuesa C.G. // *Immunity*. 2019. V. 51. P. 337–350.
<https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2019.07.001>
21. Marshall J.R., Zhang Y., Pallan L., Hsu M.-C., Khan M., Cunningham A.F., MacLennan I.C.M., Toellner K.M. // *Eur. J. Immunol.* 2011. V. 41. P. 3506–3512.
<https://doi.org/10.1002/eji.201141762>
22. Feldman S., Kasjanski R., Poposki J., Hernandez D., Chen J.N., Norton J.E., Suh L., Carter R.G., Stevens W.W., Peters A.T., Kern R.C., Conley D.B., Tan B.K., Shintani-Smith S., Welch K.C., Grammer L.C., Harris K.E., Kato A., Schleimer R.P., Husle K.E. // *Clin. Exp. Allergy*. 2017. V. 47. P. 457–466.
<https://doi.org/10.1111/cea.12878>
23. Corrado A., Ramonell R.P., Woodruff M.C., Tipton C., Wise S., Levy J., DelGaudio J., Kuruvilla M.E., Magliocca K.R., Tomar D., Garimalla S., Scherer C.D., Boss J.M., Wu H., Gumber S., Fulice C., Gibson G., Rosenberg A., Sanz I., Lee F.E.-H. // *Mucosal Immunol.* 2021. V. 14. P. 1144–1159.
<https://doi.org/10.1038/s41385-021-00410-w>
24. Wang Z.-C., Yao Y., Chen C.-L., Guo C.-L., Ding H.-X., Song J., Wang Z.-Z., Wang N., Li X.-L., Liao B., Yang Y., Yu D., Liu Z. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2022. V. 149. P. 610–623.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.06.023>
25. Ramadani F., Bowen H., Gould H.J., Fear D.J. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 402.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00402>
26. Wu L.C., Zarrin A.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. V. 14. P. 247–259.
<https://doi.org/10.1038/nri3632>
27. He S.-J., Subramaniam S., Narang V., Srinivasan K., Saunders S.P., Carboja D., Wen-Shan T., Hamadee N.H., Lurn J., Lee A., Chen J., Poidinger M., Zolezzi F., Lafaille J.J., de Lafaille M.A.C. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 641.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00723-0>
28. Ramadani F., Upton N., Hobson P., Chan Y.-C., Mzinza D., Bowen H., Kerridge C., Sutton B.J., Fear D.J., Gould H.J. // *Allergy*. 2015. V. 70. P. 1269–1277.
<https://doi.org/10.1111/all.12679>
29. Chen Q., Liu H., Luling N., Reinke J., Dent A.L. // *J. Immunol.* 2023. V. 210. P. 905–915.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200521>
30. Croote D., Darmanis S., Nadeau K.C., Quake S.R. // *Science*. 2018. V. 362. P. 1306–1309.
<https://doi.org/10.1126/science.aau2599>
31. Gowthaman U., Chen J.S., Zhang B., Flynn W.F., Lu Y., Song W., Joseph J., Gertie J.A., Xu L., Collet M.A., Grassmann J.D.S., Simoneau T., Chiang D., Beirin M.C., Craft J.E., Weinstein J.S., Williams A., Eisenbarth S.C. // *Science*. 2019. V. 365. P. eaaw6433.
<https://doi.org/10.1126/science.aaw6433>
32. Asrat S., Kaur N., Liu X., Ben L.-H., Kajimura D., Murphy A.J., Sleeman M.A., Limnander A., Orengo J.M. // *Sci. Immunol.* 2020. V. 5. P. eaav8402.
<https://doi.org/10.1126/scimmunol.aav8402>
33. Robinson M.J., Ding Z., Pitt C., Brodie E.J., Quast I., Tarlinton D.M., Zotos D. // *Cell Rep.* 2020. V. 30. P. 1530–1541.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.009>
34. Ardevin C., Martin P., Ferrero I., Azcoitia I., Anjuere F., Diggelmann H., Luthi F., Luther S., Acha-Orbea H. // *J. Immunol.* 1999. V. 162. P. 2538–2545.
35. Underhill G.H., Kolji K.P., Kansas G.S. // *Blood*. 2003. V. 102. P. 4076–4083.
<https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0947>
36. Koike T., Fujii K., Kometani K., Butler N.S., Funakoshi K., Yari S., Kikuta J., Ishii M., Kurosaki T., Ise W. // *J. Exp. Med.* 2023. V. 220. P. e20221717.
<https://doi.org/10.1084/jem.20221717>
37. Pracht K., Meizinger J., Daum P., Schulz S.R., Reimer D., Hauke M., Roth E., Meilenz D., Berek C., Corte-Real J., Jack H.-M., Schuh W. // *Eur. J. Immunol.* 2017. V. 47. P. 1389–1392.
<https://doi.org/10.1002/eji.201747019>
38. Chudakov D.B., Konovalova M.V., Kashirina E.I., Kotsareva O.D., Schevchenko M.A., Tsaregorodtseva D.S., Fattakhova G.V. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022. V. 19. P. 13063.
<https://doi.org/10.3390/ijerph192013063>
39. Блоцкий А.А., Валова Н.В., Чапленко Т.Н. // *Российская ринология*. Т. 21. № 2. С. 71–72.
40. Chudakov D.B., Kotsareva O.D., Konovalova M.V., Tsaregorodtseva D.S., Schevchenko M.A., Sergeev A.A., Fattakhova G.V. // *Vaccines* (Basel). 2022. V. 10. P. 969.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10060969>
41. de Totero D., Montera M., Rosoo O., Clavio M., Balleari E., Foa R., Gobbi M. // *Hematol. J.* 2004. V. 5. P. 152–160.
<https://doi.org/10.1038/sj.thj.6200362>
42. Vences-Catalan F., Santos-Argumedo L. // *IUBMB Life*. 2010. V. 63. P. 840–856.
<https://doi.org/10.1002/iub.549>
43. Freitag T.L., Fagerlund R., Karam N.L., Leppanen V.-M., Ugurlu H., Kant R., Makinen P., Tawfek A., Jha S.K., Strandin T., Leskinen K., Hepojoki J., Kesti T., Kareinen L., Kuiyanen S., Koivulehto E., Sormunen A., Laidinen S., Khattab A., Saavalainen P., Meri S., Kipar A., Sironen T., Vapalahti O., Alitalo K., Yla-Herttuala S., Saksella K. // *Vaccine*. 2023. V. 41. P. 3233–3246.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.020>

44. Ciabattini A., Pettini E., Fiorino F., Prota G., Pozzi G., Medaglioni D. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e19346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019346>
45. Rayamajhi M., Delgado C., Condon T.V., Riches D.W., Lenz L.L. // Mucosal Immunol. 2012. V. 5. P. 444–454. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.21>
46. Bessa J., Zabel F., Link A., Jegerlehner A., Hinton H.J., Schmitz N., Bauer M., Kundig T.M., Saudan P., Bachmann M.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 20566–20571. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206970109>
47. Dullaers M., Schuijs M.J., Willart M., Fierens K., van Moorleghem J., Hammad H., Lambrecht B.N. // J. Allergy Clin. Immunol. 2017. V. 140. P. 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.020>
48. Samitas K., Malmhall C., Radinger M., Ramos-Ramirez P., Lu Y., Deak T., Semitekolou M., Gaga M., Sjostrand M., Lotvall J., Bossios A. // PLoS One. 2016. V. 11. P. e0161161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161161>
49. Jang E., Cho S., Pyo S., Nam J.-W., Youn J. // Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 631472. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631472>
50. Jang E., Cho W.S., Oh Y.-K., Cho M.-L., Kim J.M., Paik D.-J., Youn J. // J. Immunol. 2016. V. 196. P. 1026–1032. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401059>
51. Jenkins M.M., Bachus H., Botta D., Schultz M.D., Rosenberg A.F., Leon B., Ballesteros-Tato A. // Sci. Immunol. 2021. V. 6. P. eabg6895. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abg6895>

The Adjuvant Effect of Benzo(*a*)pyrene on Specific IgE Production is Linked with the Accumulation of Germinal Center B Cells within the Spleen and Extrafollicular B-Cells Ativation within the Lungs

D. B. Chudakov*, #, O. A. Shustova*, M. A. Streletsova*, A. A. Generalov*, R. A. Velichinskii*, O. D. Kotsareva*, and G. V. Fattakhova*

Phone: +7 (495) 330-40-11; e-mail: boris-chudakov@yandex.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Despite a large number of works focused on the search for the mechanisms of formation of IgE-producing B cells, the question of the relative contribution of germinal centers and extrafollicular foci B cells in this process still remains controversial. Of particular interest is the study of the mechanisms of stimulation of the allergic immune response under the influence of air pollutants. The aim of the work was to study the connection between the adjuvant effect of benzo(*a*)pyrene (BaP) on the production of specific IgE in a novel low-dose allergy model with changes in the subpopulation composition of B-cells in the tissue of the immunization site and secondary lymphoid organs. Antigen without any stimuli was administrated to one group of BALB/c mice for 9 weeks in a low (0.3 μ g) dose. BaP was administrated to another group of mice along with antigens at a dose of 4 ng. B-cell subpopulations were analyzed by flow cytometry. BaP significantly stimulated the production of allergen-specific IgG₁ at early (3 weeks) time point, and allergen-specific IgE at late (9 weeks) time point. The aeropollutant increased the content of CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ germinal center B-cells with the phenotype and their precursors (CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺) with the phenotype in the spleen at early and late time points, but not in the lungs or regional lymph nodes. Under its influence, the content of CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ and CD19⁺CD38⁺CD95⁺B220⁺ extrafollicular plasmablasts in the spleen at an early time point and in lung tissue at a later time point also increases. In the spleen, BaP increased the content of CD138⁺CD19⁺B220⁺ and CD138⁺CD19⁺B220⁺ mature plasma cells, and in regional lymph nodes the content of CD138⁺CD19⁺B220⁺ immature plasma cells at a later time point. The adjuvant effect of BaP on the production of specific IgE was largely associated with stimulation of the formation of germinal centers in the spleen and with extrafollicular activation of B cells in lung tissue.

Keywords: IgE, benzo(*a*)pyrene, humoral immune response, germinal centers, extrafollicular foci, plasma cells



УДК 615.099.092:547.821.2

ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПИРИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3,4-ДИГИДРОХИНОКСАЛИН-2-ОНА И 3,4-ДИГИДРО-2Н-1,4-БЕНЗОКСАЗИН-2-ОНА

© 2024 г. С. А. Терновская*, #, В. С. Власенко**, #, А. Н. Новиков**, Н. А. Денгис**, А. Л. Сталинская***, И. В. Кулаков***, #

* ФГБОУ “Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина”,

Россия, 644008 Омск, Институтская пл., 1

** ФГБНУ “Омский аграрный научный центр”, Россия, 644012 Омск, просп. Королева, 26

*** Школа естественных наук, Тюменский государственный университет,
Россия, 625003 Тюмень, ул. Перекопская, 15а

Поступила в редакцию 17.04.2024 г.

После доработки 22.04.2024 г.

Принята к публикации 23.04.2024 г.

Изучена острая токсичность синтезированных на основе 3,5-диацетил-2,6-диметилпиридина производных бис(3,4-дигидрохиноксалин-2-она) и бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-она) при однократном внутрибрюшинном введении морским свинкам. Установлено, что по классификации К.К. Сидорова производное пиридина – бис(3,4-дигидрохиноксалин-2-он) – обладало малой токсичностью, о чем свидетельствовало отсутствие летальных исходов при его введении животным в диапазоне 100–400 мкг/кг, но сопровождалось признаками нервного расстройства независимо от дозы соединения, которые исчезали в течение суток. При введении морским свинкам другого производного пиридина – бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-она) – наблюдали более выраженные и длительные признаки интоксикации, проявляющиеся судорожными подергиваниями задних конечностей, снижением подвижности и замедленной реакцией на окружающие раздражители, с последующей гибелью 33% особей при введении соединения в дозе 100 мг/кг, 66% – в дозе 200 мг/кг и 100% животных в дозе 400 мг/кг. Анализ гематологических и биохимических исследований, проведенный на 15-е сутки после введения изучаемых соединений, показал отсутствие выраженных изменений относительно нормативных физиологических значений, несмотря на наличие достоверной разницы отдельных показателей по сравнению с контрольной группой. Таким образом, параметры острой токсичности у изучаемых соединений носили неодинаковый характер и были более выражены у пиридинового производного бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-она), тем не менее оба соединения могут быть рекомендованы для последующего изучения антибактериальной и противовирусной активности на морских свинках.

Ключевые слова: производные пиридина, 3,4-дигидрохиноксалин-2-он, 3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-он, морские свинки, острая токсичность, гематологические показатели, биохимические параметры

DOI: 10.31857/S0132342324060115, **EDN:** NEFJDD

ВВЕДЕНИЕ

У соединений, содержащих ядро хиноксалина и оксазина, выявлен разнообразный спектр биологической активности, в частности показаны их антибактериальные [1–4], противовирусные [5], противоопухолевые [6], противотуберкулезные [7–9], противовоспалительные [10] и другие свойства [11, 12].

Усилить биохимическую активность и метаболическую стабильность лекарственного средства, повысить проницаемость клеток, устранить проблемы со связыванием с белками и тем самым в значительной степени улучшить фармакокинетические и фармакодинамические свойства молекул позволяет пиридиновая составляющая, присутствующая в соединении [13]. В этой связи заслуживают внимания структурные модификации

[#] Автор для связи: (эл. почта: sa.ternovskaya2306@omgau.org; vvs-76@list.ru; i.v.kulakov@utmn.ru).

производных 3,5-диацетил-2,6-диметилпиридина до соединений (I–IV) (рис. 1), приведенные нами в работах [14–18].

У ряда производных (соединения (I), (II)) в опытах *in vitro* были выявлены выраженные и умеренные противотуберкулезные, антибактериальные и противогрибковые свойства [14, 15]. Одно из производных с линкерным 3,4-дигидрохиноксалин-2-оновым заместителем (II) в тестах *in vitro* проявило выраженную противовирусную активность, подавляя рост микобактерий и репликацию вируса SARS-CoV-2 [16]. Кроме того, синтезированные на основе 3,5-диацетил-2,6-диметилпиридина (IIIa) производные бис(3,4-дигидрохиноксалин-2-она) (IVa) и бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-она) (IVb) (схема 1) в результате биоскрининга *in vivo* на модели уксусных корчей показали анальгетическую активность, превосходящую активность препарата сравнения – анальгина [17, 18]. Для дальнейшего исследования биологической активности наиболее перспективных биспроизводных (IVa) и (IVb) необходимо изучить их токсичность.

Цель данной работы состояла в оценке острой токсичности биспроизводных (IVa) и (IVb) при внутрибрюшинном введении морским свинкам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка острой токсичности. Для оценки острой токсичности 42 морские свинки были разделены на 7 равных групп ($n = 6$). Животным 1–3-й групп вводили однократно внутрибрюшинно соединение (IVa) соответственно в дозах 100, 200 и 400 мг/кг, 4–6-й групп – соединение

(IVb) тем же способом в тех же дозах, 7-й группы – однократно внутрибрюшинно физиологический раствор в объеме 1 мл. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 сут.

Непосредственно после внутрибрюшинного введения соединения (IVa) независимо от дозы отмечались судорожные подергивания задних конечностей, снижение подвижности, замедленная реакция на окружающие раздражители. В единичных случаях регистрировали снижение температуры тела до 36,6°C и диарею. Эти симптомы в течение первых суток исчезали, в последующие дни общее состояние восстанавливалось и не отличалось от контрольных особей. Гибели животных не наблюдалось.

Результаты исследования острой токсичности соединений (IVa) и (IVb) представлены в табл. 1.

После введения морским свинкам соединения (IVb) аналогичные признаки интоксикации обнаруживались более длительное время, которые заканчивались гибелю на 2–3-е сутки 100% животных, которым вводили препарат в дозе 400 мг/кг, а также одной особи – в дозе 100 мг/кг. Отдаленную гибель фиксировали у четырех особей после введения соединения в дозе 200 мг/кг, а также у одной – в дозе 100 мг/кг на 13-е и 14-е сутки после введения препарата. При патологоанатомическом исследовании макроскопических признаков повреждения внутренних органов не наблюдалось, отмечали лишь гиперемию печени, селезенки и почек.

Гематологические и биохимические исследования. На следующем этапе через 15 сут после внутрибрюшинного введения соединений (IVa) и (IVb), а также у морских свинок контрольной группы проводили забор крови для гематоло-

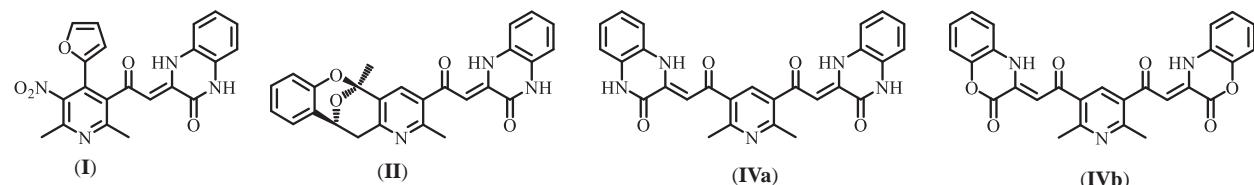


Рис. 1. Структуры производных пиридина.

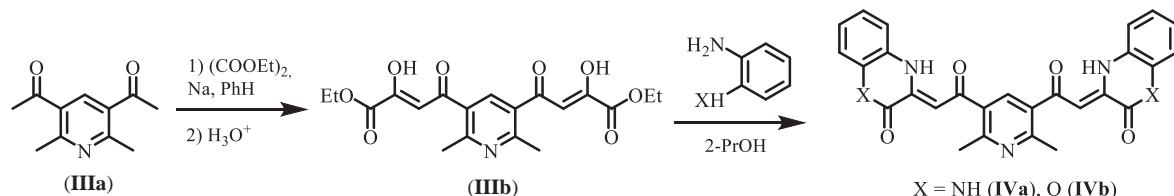


Схема 1. Синтез производных бис(3,4-дигидрохиноксалин-2-она) (IVa) и бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-она) (IVb).

Таблица 1. Острая токсичность производных бис(3,4-дигидрохиноксалин-2-она) (**IVa**) и бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-она) (**IVb**) при однократном внутрибрюшинном введении морским свинкам линии агутi

Группа животных	Соединение	Доза препарата, мг/кг	Число погибших/общее число животных	Сроки гибели, сут
Контроль	—	—	0/6	—
1-я группа	(IVa)	100	0/6	—
2-я группа		200	0/6	—
3-я группа		400	0/6	—
4-я группа	(IVb)	100	2/6	3, 13
5-я группа		200	4/6	13, 13, 14, 14
6-я группа		400	6/6	2, 2, 2, 2, 3, 3

гических и биохимических исследований. Результаты представлены в табл. 2 и 3.

У морских свинок на 15-е сутки от начала эксперимента при введении соединения (**IVa**) в дозах 100 и 200 мг/кг относительно контрольной группы зарегистрировано снижение числа лимфоцитов в 1.4 раза ($p < 0.01$) и 1.17 раза ($p < 0.05$) соответственно при одновременном увеличении процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов в 1.33 раза ($p < 0.01$) и 1.14 раза. Изменения остальных гематологических параметров не достигали статистически достоверной разницы по сравнению с показателями контроля и не выходили за пределы нормальных физиологических значений, за исключением умеренного повышения концентрации эритроцитов при инокуляции препарата в дозах 100 и 200 мг/кг.

Анализ данных биохимических исследований, проведенных на 15-е сутки после введения морским свинкам соединения (**IVa**), показал, что концентрация аланинаминотрансферазы (ALT) достоверно ($p < 0.05$) возрастала при введении препарата в дозах 100 и 200 мг/кг в 1.72 и в 1.40 раза

соответственно относительно контрольной группы, а уровень щелочной фосфатазы, напротив, был достоверно снижен ($p < 0.05$), но только при инокуляции животным химического соединения в дозе 100 мг/кг. Изменения остальных параметров химического состава сыворотки крови не достигали статистически достоверных отличий от контрольной группы. Следует отметить, что все анализируемые параметры находились в пределах нормальных физиологических колебаний, за исключением альбумина и общего билирубина, концентрация которых была незначительно выше нормы как в опытных, так и контрольной группах.

У морских свинок, выживших после введения соединения (**IVb**) в дозе 100 мг/кг, гематологические параметры, показатели ферментной активности печени, а также липидного обмена находились в пределах допустимых физиологических колебаний. Отмечено лишь умеренное снижение концентрации общего белка при одновременном увеличении уровня альбумина. В то же время относительно контрольной группы наблюдалось достоверное ($p < 0.05$) снижение

Таблица 2. Гематологические показатели крови морских свинок через 15 сут после однократного внутрибрюшинного введения соединения (**IVa**)

Показатель	Норма [#]	Контроль	Доза, мг/кг		
			100	200	400
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	4.5–6.4	6.4 \pm 0.4	7.0 \pm 0.1	7.4 \pm 0.6	6.1 \pm 0.1
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	7–13	9.2 \pm 1.0	10.7 \pm 1.1	12.9 \pm 1.9	11.8 \pm 1.1
Эозинофилы, %	1–13	3.3 \pm 0.3	4.3 \pm 0.3	4.3 \pm 0.3	3.3 \pm 0.3
Базофилы, %	0–2	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3
Лимфоциты, %	36–54	53.0 \pm 1.5	37.7 \pm 1.2**	45.0 \pm 2.3*	52.7 \pm 2.2
Сегментоядерные нейтрофилы, %	30–45	38.7 \pm 1.7	51.3 \pm 1.2**	44.3 \pm 1.5	37.7 \pm 2.9
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1–5	1.3 \pm 0.3	2.0 \pm 0.6	1.7 \pm 0.7	1.0 \pm 0.0
Моноциты, %	3–8	3.3 \pm 0.3	4.3 \pm 0.7	3.3 \pm 0.3	5.0 \pm 0.6

Примечание: данные представлены в виде $M \pm m$.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

[#] Референтные интервалы приведены в соответствии с данными А.А. Кудрявцева и Л.А. Кудрявцевой (1974) [21].

Таблица 3. Биохимические показатели крови морских свинок через 15 сут после однократного внутрибрюшинного введения соединения (IVa)

Показатель	Норма [#]	Контроль	Доза, мг/кг		
			100	200	400
ALT, Ед/л	28–103	39.0 ± 4.2	67.1 ± 7.0*	54.4 ± 3.9*	42.6 ± 5.9
AST, Ед/л	38–150	53.7 ± 9.2	50.2 ± 5.4	89.1 ± 31.1	46.6 ± 7.4
ALP, Ед/л	39–162	140.4 ± 19.1	72.0 ± 3.6*	125.4 ± 10.7	136.9 ± 13.6
Общий билирубин, мкмоль/л	0.1–1.8	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.1
Общий холестерин, ммоль/л	0.8–2.5	1.4 ± 0.2	2.7 ± 0.7	2.4 ± 0.9	1.3 ± 0.1
Креатинин, мкмоль/л	47–87	78.3 ± 8.6	62.1 ± 2.4	72.6 ± 2.4	75.4 ± 3.6
Мочевина, ммоль/л	5–12	10.7 ± 1.1	9.5 ± 0.2	9.9 ± 0.2	10.6 ± 0.7
Общий белок, г/л	45–66	49.6 ± 1.6	49.4 ± 0.9	50.9 ± 0.8	49.7 ± 2.1
Альбумин, г/л	17–30	30.1 ± 1.8	31.5 ± 1.2	34.7 ± 1.0	34.6 ± 1.9

Примечание: данные представлены в виде $M \pm m$. ALT – аланинаминотрансфераза, AST – аспартатаминотрансфераза, ALP – щелочная фосфатаза (alkaline phosphatase).

* $p < 0.05$.

[#] Референтные интервалы приведены в соответствии с данными М.В. Мирошникова с соавт. (2022) [22].

концентрации щелочной фосфатазы в 1.80 раза, общего билирубина в 1.18 раза и общего белка в 1.15 раза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Диэтил-(2Z,2'Z)-4,4'-(2,6-диметилпиридин-3,5-диил)-бис(2-гидрокси-4-оксобут-2-еноат) (IIIb) [17]. К раствору 5.0 г (26 ммоль) 3,5-диацетил-2,6-диметилпиридина (IIIa) в 60 мл бензола приливали 15.3 г (105 ммоль) диэтилоксалата и при перемешивании вносили 1.5 г (65 ммоль) натрия. После растворения натрия перемешивали еще 2 ч. Затем осадок натриевой соли отфильтровывали, промывали бензолом и сушили на воздухе. Далее осадок растворяли в теплой воде, фильтровали через бумажный фильтр и подкисляли разбавленной соляной кислотой до появления хлопьевидного осадка. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе. Перекристаллизовывали из смеси гексан–хлороформ (2 : 1). Выход 70%, красно-оранжевые игольчатые кристаллы, т. пл. 105–106°C (гексан–хлороформ, 2 : 1).

Общая методика синтеза исследуемых соединений (IVa) и (IVb) [17]. Смесь 2.5 г (6.5 ммоль) диэтил-(2Z,2'Z)-4,4'-(2,6-диметилпиридин-3,5-диил)-бис(2-гидрокси-4-оксобут-2-еноата) (IIIb) и 1.4 г (13 ммоль) *o*-фенилендиамина или *o*-аминофенола в 50 мл 2-пропанола кипятили при перемешивании в течение 3 ч. Раствор с выпавшим осадком охлаждали, отфильтровывали, осадок промывали 2-пропанолом и перекристаллизовывали из смеси 2-пропанол–хлороформ.

(3Z,3'Z)-3,3'-(2,6-Диметилпиридин-3,5-диил)бис(2-оксоэтан-2-ил-1-илиден)]бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-он) (IVa). Выход 82%,

ярко-желтые кристаллы, т. пл. >330°C (2-пропанол–диоксан).

(3Z,3'Z)-3,3'-(2,6-Диметилпиридин-3,5-диил)бис(2-оксоэтан-2-ил-1-илиден)]бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-он) (IVb). Выход 93%, оранжевые кристаллы, т. пл. 266–268°C (2-пропанол–диоксан).

Физико-химические и спектральные характеристики соединений (IIIb), (IVa) и (IVb) приведены нами в работе [17].

Экспериментальные животные. Исследования проводили на 42 морских свинках линии агути, выращенных и содержавшихся в условиях специализированного вивария отдела ветеринарии Омского аграрного научного центра. Группы экспериментальных животных подбирали по принципу аналогов (масса 400–500 г, возраст 4–5 месяцев). Были сформированы 6 опытных групп по 6 особей в каждой группе, за которыми вели наблюдения в течение 14 сут. Испытуемое соединение (IVa) вводили внутрибрюшинно морским свинкам 1-й, 2-й и 3-й групп в дозах 100, 200 и 300 мг/кг соответственно, соединение (IVb) – морским свинкам 4-й, 5-й и 6-й групп тем же способом и в тех же дозах. Еще 6 особей служили в качестве контроля, им вводили однократно внутрибрюшинно физиологический раствор (1 мл).

Острая токсичность соединений. Оценку острой токсичности проводили в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [19]. Степень токсичности определяли в соответствии с классификацией К.К. Сидорова [20].

Гематологические и биохимические исследования. На 15-е сутки после внутрибрюшинного введения соединений производили отбор проб

крови из ретроорбитального венозного сплетения с помощью микропипетки.

Подсчет эритроцитов, лейкоцитов и лейкограммы производили в соответствии с общепринятыми методиками.

Биохимический анализ сыворотки крови осуществляли по показателям ферментной активности печени (ALT, AST, ALP), белкового (общий белок, альбумин, мочевина, креатинин) и липидного (общий холестерин, общий билирубин) обменов. Исследования проведены на полуавтоматическом биохимическом анализаторе EMP-168 Vet (Emperor, Китай) в соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов (Hospitex Diagnostics, Италия страна).

Статистический анализ. Математическая обработка полученных данных включала в себя определение средних арифметических (M) и расчет ошибок средних арифметических (m). При оценке достоверности различий (p) между двумя средними величинами M_x и M_y использовали t -критерий Стьюдента. Различия результатов считали статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена острая токсичность производных бис(3,4-дигидрохиноксалин-2-она) и бис(3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазин-2-она) при однократном внутрибрюшинном введении морским свинкам. Введение морским свинкам препарата (**IVa**) в диапазоне 100–400 мкг/кг не приводило к летальному исходу, что свидетельствовало о его малой токсичности. Соединение (**IVb**) проявляло умеренную токсичность, вызывая гибель 33% особей в дозе 100 мг/кг, 66% – в дозе 200 мг/кг и 100% животных в дозе 400 мг/кг. Токсическое действие соединений проявлялось нервными расстройствами (судороги, заторможенность) при отсутствии выраженных изменений гематологических и биохимических показателей относительно физиологической нормы.

Соединения (**IVa**) и (**IVb**) могут быть рекомендованы для изучения антибактериальной и противовирусной активности на морских свинках.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки Омского аграрного научного центра по теме: FNUN-2022-0035 “Разработать эффективную систему обеспечения продовольственной и биологической безопасности на основе создания новых биологических препаратов для диагностики и профилактики социально-значимых болезней животных, оптимизации технологии кормопроизводства и анализа селекции племенного дела” (№ государственной регистрации 122070700055-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования на морских свинках проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986).

Исследования одобрены локальным независимым этическим комитетом организации по уходу и использованию лабораторных животных (протокол № 2 от 20.02.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы САТ, АНН и НАД провели биологические исследования. Авторы АЛС и ИВК – подготовка и характеристика соединений. Автор ВСВ – подготовка оригинального текста и его финальное редактирование.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Badran M.M., Abonzid K.A., Hussein M.H. // Arch. Pharm. Res. 2003. V. 26. P. 107–113. <https://doi.org/10.1007/BF02976653>
2. Vayas D.A., Chauhan N.A., Parikh A.R. // Ind. J. Chem. 2007. V. 46. P. 1699–1702.
3. Gein V.L., Rassudikhina N.A., Shepelina N.V., Vakhrin M.I., Babushkina E.B., Voronina E.V. // Pharm. Chem. J. 2008. 42. P. 529–532. <https://doi.org/10.1007/s11094-009-0175-5>
4. Singh D.P., Deivedi S.K., Hashim S.R., Singhal R. // Pharmaceuticals (Basel). 2010. V. 3. P. 2416–2425. <https://doi.org/10.3390/ph3082416>
5. Zhong Q.F., Liu R., Liu G. // Mol. Divers. 2015. V. 19. P. 829–853. <https://doi.org/10.1007/s11030-015-9610-6>
6. Rezaei Z., Mahdi Didehvar M., Mahdavi M., Azizian H., Hamedifar H., Mohammed E.H.M., Ostad S., Amini M. // Bioorg. Chem. 2019. V. 90. P. 103055. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103055>
7. Nandikolla A., Khetmalis Y.M., Naidu K.M., Kumar B.K., Muriugesan S., Sekhar K.V.G.C. // Toxicol In Vitro. 2022. V. 82. P. 105370. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105370>
8. Zarranz B., Jaso A., Aldana I., Monge A. // Bioorg. Med. Chem. 2003. V. 11. P. 2149–2156. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(03\)00119-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(03)00119-6)
9. Ramalingam P., Ganapathy S., Rao C.B. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. V. 20. P. 406–408. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.026>

10. *Wagle S., Adhikari A.V., Kumari N.S.* // *Ind. J. Chem.* 2008. V. 47. P. 439–448.
11. *Pereira J.A., Pessoa A.M., Cordeiro M.N.D., Fernandes R., Prudencio C., Noronha J.P., Vieira M., Cordeiro M.N.D.S.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. V. 97. P. 664–672.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.058>
12. *Petronijević J., Janković N., Stanojković T.P., Joksimović N., Grozdanović N.D., Vraneš M., Tot A., Bugarčić Z.* // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 2018. V. 351. P. e1700308.
<https://doi.org/10.1002/ardp.201700308>
13. *De S., Kumar S.K.A., Shah S.K., Kazi S., Sarkas N., Bunerjee S., Dey S.* // *RSC Adv.* 2022. V. 12. P. 15385–15406.
<https://doi.org/10.1039/d2ra01571d>
14. *Stalinskaya A.L., Martynenko N.V., Alkhimova L.E., Dilbaryan D.S., Vasilchenko A.S., Dengis N.A., Vlasenko V.S., Kulakov I.V.* // *J. Mol. Structure.* 2023. V. 1275. P. 134689.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134689>
15. *Oleshchuk A.L., Shulgau Z.T., Seilkhanov T.M., Vasilchenko A.S., Talipov S.A., Kulakov I.V.* // *Synlett.* 2020. V. 31. P. 165–170.
<https://doi.org/10.1055/s-0037-1610738>
16. *Stalinskaya A.L., Martynenko N.V., Shulgau Z.T., Shustov A.V., Keyer V.V., Kulakov I.V.* // *Molecules.* 2022. V. 27. P. 3701.
<https://doi.org/10.3390/molecules27123701>
17. *Kulakov I.V., Karbainova A.A., Shulgau Z.T., Seilkhanov T.M., Gatilov Y.V., Fisyuk A.S.* // *Chem. Heterocycl. Comp.* 2017. V. 53. P. 1094–1097.
<https://doi.org/10.1007/s10593-017-2178-6>
18. *Кулаков И.В., Карбайнова А.А., Шульгау З.Т., Фисюк А.С.* // Патент RU 2688217 C1, опубл. 21.05.2019.
19. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
20. *Сидоров К.К.* // Токсикология новых промышленных химических веществ. Вып. 13. М., 1973. С. 47–51.
21. *Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А.* // Клиническая гематология животных. М.: Колос, 1974. 399 с.
22. *Мирошников М.В., Султанова К.Т., Ковалева М.А., Макарова М.Н.* // Лаб. животные для научных исследований. 2022. № 3. С. 4–15.
<https://doi.org/10.57034/2618723X-2022-03-01>

Pyridine Derivatives of 3,4-Dihydroquinoxalin-2-One and 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-Benzoxazin-2-One Acute Toxicity Evaluation

S. A. Ternovskaya*, #, V. S. Vlasenko**, #, A. N. Novikov**, N. A. Dengis**,
A. L. Stalinskaya***, and I. V. Kulakov***, #

E-mail: sa.ternovskaya2306@omgau.org; vvs-76@list.ru; i.v.kulakov@utmn.ru

* *Federal State Budgetary Educational Institution “Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin”,
Institutskaya pl. 1, Omsk, 644008 Russia*

** *Federal State Budgetary Scientific Institution “Omsk Agrarian Scientific Center”,
prosp. Koroleva 26, Omsk, 644012 Russia*

*** *School of Natural Sciences, Tyumen University, ul. Perekopskaya 15a, Tyumen, 625003 Russia*

An acute toxicity test was conducted on derivatives of bis(3,4-dihydroquinoxalin-2-one) and bis(3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-2-one) synthesized based on 3,5-diacetyl-2,6-dimethylpyridine by single intraperitoneal injection in guinea pigs. It was found that according to K.K. Sidorov's classification, one of the pyridine derivatives, bis(3,4-dihydroquinoxalin-2-one), exhibited low toxicity, as evidenced by the absence of lethal outcomes when administered to animals in the range of 100 to 400 μ g/kg. However, it was accompanied by signs of neurological disorders regardless of the compound dose, which disappeared within a day. When guinea pigs were inoculated with another pyridine derivative, bis(3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-2-one), more pronounced and prolonged intoxication symptoms were observed, including convulsive movements of the hind limbs, decreased mobility, and delayed reaction to stimuli, leading to the death of 33% of subjects at a dose of 100 mg/kg, 66% at a dose of 200 mg/kg, and 100% of animals at a dose of 400 mg/kg. Analysis of hematological and biochemical studies conducted on the 15th day after the administration of the test compounds showed no significant deviations from normal physiological values, despite some individual parameters showing differences compared to the control group. Thus, the acute toxicity parameters of the studied compounds were not the same and were more pronounced in the pyridine derivative bis(3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-2-one); however, both compounds can be recommended for subsequent study of antibacterial and antiviral activity in guinea pigs.

Keywords: *pyridine derivatives, 3,4-dihydroquinoxalin-2-one, 3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin-2-one, guinea pigs, acute toxicity, hematological indicators, biochemical parameters*



УДК 577.113.6:546.824-31+578.825.1:578.282

НЕАГЛОМЕРИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИД-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА

© 2024 г. М. Н. Репкова*, О. Ю. Мазурков**, Е. И. Филиппова**, Н. А. Мазуркова**, Ю. Е. Полетаева*, Е. И. Рябчикова*, В. Ф. Зарытова*, А. С. Левина*, #

* Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

** ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”,
Россия, 630559 Новосибирская обл., р.п. Кольцово

Поступила в редакцию 05.04.2024 г.

После доработки 13.04.2024 г.

Принята к публикации 14.04.2024 г.

Стабильность и монодисперсность – важные характеристики наночастиц и нанокомпозитов, обеспечивающие надежность их применения в биологических системах и воспроизводимость результатов. Целью данной работы было получение неагломерированных олигонуклеотид-содержащих нанокомпозитов на основе наночастиц диоксида титана в форме антаза (Ans~ODN). При иммобилизации олигонуклеотидов на наночастицах в воде образуются монодисперсные частицы небольшого размера, в то время как в присутствии NaCl происходит агломерация наночастиц и нанокомпозитов. Сравнение биологической активности нанокомпозитов, полученных в воде и солевом растворе, проведено на примере ингибирования репликации вируса простого герпеса первого типа в культуре клеток VERO. Исследованный нанокомпозит подавлял репликацию вируса на 4.5 порядка независимо от способа приготовления (в воде или в 0.9% NaCl), если он был использован через сутки после получения. Через 10 суток хранения активность образца, приготовленного в солевом растворе, была на два порядка ниже, чем у сохранившего свою активность образца, приготовленного в воде. Таким образом, показано, что в отличие от нанокомпозитов, приготовленных в присутствии соли и теряющих свою эффективность при хранении, нанокомпозиты, не склонные к агломерации, могут быть получены в воде и храниться в течение длительного времени для будущего использования.

Ключевые слова: наночастицы антаза, олигонуклеотид-содержащие нанокомпозиты, противовирусная активность, вирус простого герпеса

DOI: 10.31857/S0132342324060128, **EDN:** NDZVCX

ВВЕДЕНИЕ

Фрагменты нуклеиновых кислот (НК) и их аналоги рассматриваются как перспективные агенты для избирательного воздействия на внутриклеточный генетический материал. Для широкого использования в терапии необходимы эффективные методы доставки препаратов на основе нуклеиновых кислот. Известно, что олигонуклеотиды (ODN, фрагменты НК) обладают

очень низкой эффективностью проникновения, в первую очередь из-за гидрофобной природы плазматической мембранны клеток. Преодоление этого барьера позволяет использовать препараты НК при лечении различных заболеваний, связанных с появлением в организме чужеродных или поврежденных нуклеиновых кислот. Для создания эффективных систем доставки фрагментов нуклеиновых кислот применяют различные методы, например, включение в

Сокращения: ВПГ – вирус простого герпеса; ДСР – динамическое светорассеяние; ИПП – индекс подавления продукции вируса; НК – нуклеиновые кислоты; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; Ans – наночастицы диоксида титана в форме антаза; ODN – олигодезоксирибонуклеотид; PL – полилизин; Ans/PL-ODN и Ans/PL•ODN – олигонуклеотид-содержащие нанокомпозиты на основе наночастиц антаза соответственно с ковалентной или ионной связью между PL и ODN; Ans~ODN – Ans/PL-ODN или Ans/PL•ODN; pdi – индекс полидисперсности.

Автор для связи: (тел.: +7 (913) 756-76-93; эл. почта: asl1032@yandex.ru).

липосомы, конъюгацию с полимерами различной природы и т.д. [1]. Стремительно развивающаяся нанобиотехнология внесла свой вклад в решение проблемы доставки НК с использованием широкого спектра наночастиц [2–4]. Одно из преимуществ использования для доставки НК-фрагментов наночастиц – их способность защищать НК от действия внутриклеточных нуклеаз [2, 3].

Наночастицы диоксида титана привлекают внимание как потенциальные носители фрагментов НК благодаря способности проникать через плазматическую мембрану, стабильности и возможности модификации поверхности для иммобилизации различных соединений [5–8]. Показано, что TiO_2 -наночастицы защищают иммобилизованные на них олигонуклеотиды от деградации в клеточной среде [9–10].

Известно, что наночастицы, в частности наночастицы диоксида титана, имеют склонность к агломерации [11–14], что ограничивает их применение в биологических системах. Стабильность и монодисперсность – важные характеристики наночастиц и нанокомпозитов, которые обеспечивают надежность их применения *in vitro* или *in vivo* и воспроизводимость результатов.

Целью данной работы было получение неагломерированных олигонуклеотид-содержащих нанокомпозитов на основе наночастиц диоксида титана в форме анатаза (Ans~ODN) для воздействия на внутриклеточные нуклеиновые кислоты-мишени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение нанокомпозитов Ans~ODN. ODN-содержащие нанокомпозиты на основе наночастиц диоксида титана в кристаллической форме анатаза готовили двумя способами [15, 16]: 1) нанокомпозит Ans/PL•ODN с ионной связью между ODN и PL (полиизином) синтезировали путем иммобилизации ODN на наночастицах,

предварительно связанных с PL; 2) нанокомпозит Ans/PL-ODN с ковалентной связью между PL и ODN получали при иммобилизации на наночастицах анатаза предварительно синтезированного конъюгата PL-ODN.

Ранее нанокомпозиты Ans/PL•ODN и Ans/PL-ODN готовили в солевых растворах (0.9% NaCl). Полученные таким образом нанокомпозиты проявляли высокую противовирусную активность в отношении разных субтипов вируса гриппа A *in vitro* [17–19] и *in vivo* [9, 20] и эффективно корректировали гипертензию на модели крыс НИСАГ (крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией) [21].

Влияние NaCl на агломерацию наночастиц и нанокомпозитов. Для характеристики наночастиц анатаза и нанокомпозитов на их основе использовали метод динамического светорассеяния (DCP), который позволяет оценить размер и поверхностный заряд наночастиц. На первом этапе мы показали влияние NaCl на агломерацию наночастиц и нанокомпозитов (табл. 1). Размер нанокомпозитов Ans/PL•ODN, образованных после электростатического присоединения ODN к наночастицам, предварительно покрытым полизином, незначительно отличается от размера нанокомпозитов Ans/PL-ODN с ковалентной связью между PL и ODN, поэтому в табл. 1 и 2 приведены усредненные значения для обоих типов нанокомпозитов, обозначенных как Ans~ODN.

Состояние наночастиц Ans зависит от концентрации соли, и уже при 0.02 M NaCl частицы образуют скопления размером до микрометров. Наличие на наночастицах иммобилизованных PL и ODN предотвращает их агломерацию до концентрации NaCl 0.05 M. При увеличении концентрации NaCl в смеси появляются частицы разного размера, т.е. образец становится более гетерогенным, что отражается на увеличении индекса гетерогенности или полидисперсности

Таблица 1. Гидродинамический диаметр (d) и величина индекса полидисперсности (pdi) исследованных образцов в зависимости от концентрации NaCl

Образец	Параметр	Концентрация NaCl, M					
		0	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2
Ans	d, нм	22.2 \pm 9.2	73.1 \pm 16.8	2087 \pm 164	2534 \pm 405	3360 \pm 904	–
	pdi	0.237 \pm 0.009	0.609 \pm 0.042	0.409 \pm 0.036	0.439 \pm 0.091	0.449 \pm 0.055	–
Ans/PL	d, нм	27.5 \pm 1.8	27.2 \pm 1.4	28.4 \pm 1.0	50.9 \pm 15.4	110 \pm 43.3	2229 \pm 569
	pdi	0.250 \pm 0.004	0.313 \pm 0.009	0.319 \pm 0.010	0.348 \pm 0.030	0.530 \pm 0.038	0.338 \pm 0.058
Ans~ODN ₁	d, нм	28.0 \pm 3.8	32.7 \pm 2.6	34.5 \pm 7.9	33.3 \pm 7.9	827 \pm 193	2625 \pm 265
	pdi	0.286 \pm 0.041	0.353 \pm 0.012	0.388 \pm 0.001	0.395 \pm 0.001	0.319 \pm 0.098	0.295 \pm 0.035

Примечание: поскольку значения показателей для нанокомпозитов Ans/PL•ODN и Ans/PL-ODN с ионной или с ковалентной связью между PL и ODN незначительно отличаются, в таблице приведены усредненные значения для обоих типов нанокомпозитов, обозначенных как Ans~ODN.

Таблица 2. Гидродинамический диаметр (d) и ξ -потенциал исследованных образцов в воде

№	Образец	d, нм	pdi	ξ -потенциал, мВ
1	Ans	21.1 ± 2.5	0.371 ± 0.017	-30.6 ± 0.5
2	Ans/PL	28.6 ± 2.0	0.239 ± 0.012	53.2 ± 0.2
3	Ans~ODN ₁ (21-мер)	32.8 ± 0.6	0.282 ± 0.065	30.4 ± 0.2
4	Ans~ODN ₂ (33-мер)	37.4 ± 10.0	0.257 ± 0.062	11.4 ± 0.6
5	PL-ODN ₁ (21-мер)	70.0 ± 2.6	0.166 ± 0.018	57.6 ± 0.9
6	PL-ODN ₂ (33-мер)	75.2 ± 10.5	0.208 ± 0.017	—

(pdi) (табл. 1; данные для нанокомпозита с участием ODN₁ приведены в качестве примера). Индекс полидисперсности (pdi) отражает возможное присутствие агрегатов. Значение pdi для монодисперсных образцов не должно превышать 0.5 [22]. Принимая во внимание значения pdi и размер частиц, образец Ans удовлетворяет критериям качества только в отсутствие NaCl. Подобное влияние NaCl на агломерацию наночастиц анатаза отмечено в работе [23]. Образцы Ans/PL и Ans~ODN₁ удовлетворяют критериям качества в диапазоне концентраций NaCl 0–0.05 М.

При получении нанокомпозитов Ans/PL•ODN и Ans/PL-ODN в 0.9% растворе NaCl образуются агломераты наночастиц с размерами до микрометров. Мы попытались решить проблему агломерации путем иммобилизации конъюгатов PL-ODN на наночастицах Ans или ODN на Ans/PL в водных растворах. При этом следовало показать возможность иммобилизации олигонуклеотидов на наночастицах, т.е. формирования нанокомпозитов, в отсутствие NaCl.

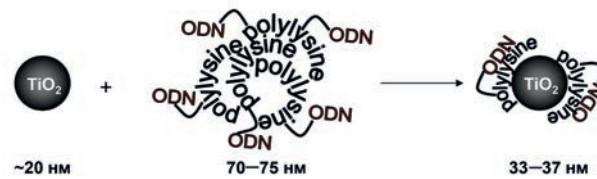
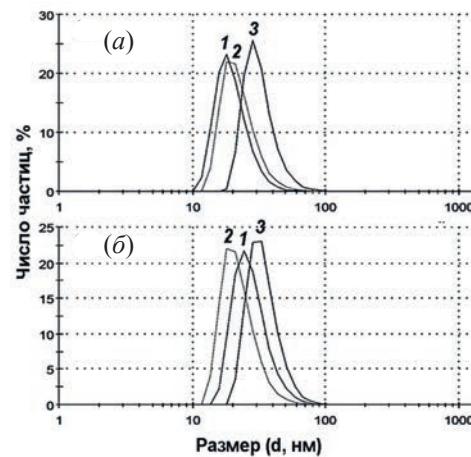
Оценка размера и ξ -потенциала наночастиц и нанокомпозитов. Иммобилизацию олигонуклеотидов в воде на наночастицах Ans исследовали методом ДСР. Были измерены гидродинамические диаметры (d) исходных наночастиц Ans, конъюгатов PL-ODN и нанокомпозитов после иммобилизации PL-ODN на Ans или ODN на Ans/PL (табл. 2). Гидродинамический диаметр исходных наночастиц в воде составлял ~20 нм. После связывания с PL размер наночастиц увеличивался до 28.6 нм, а после связывания с конъюгатом PL-ODN – до 32.8 и 37.4 нм, в зависимости от длины олигонуклеотида (табл. 2).

Интересно отметить, что размер нанокомпозитов Ans/PL-ODN меньше, чем размер конъюгатов PL-ODN (рис. 1), что может быть обусловлено преобразованием рыхлой структуры конгломератов PL-ODN в более компактную при “обволакивании” наночастицы.

Значения pdi в табл. 2 для наночастиц анатаза и нанокомпозитов на их основе свидетельствуют об относительной монодисперсности образцов. По данным ДСР полученные результаты удов-

летворяют критериям качества для каждого образца (Results meet quality criteria according to size quality report).

Мы проверили, насколько стабильны частицы Ans и нанокомпозиты на их основе при длительном хранении в воде при 4°C. На рис. 2 приведены данные для Ans, Ans/PL и Ans/PL-ODN. Размер наночастиц Ans несколько увеличился через три месяца с ~20 до ~28 нм, т.е. эти наночастицы имеют тенденцию к агломерации, однако в значительно меньшей степени по сравнению с таковой в солевых растворах (табл. 1). В отличие от наночастиц Ans, нанокомпозиты Ans/PL и Ans/PL-ODN за этот период не изменили свой гидродинамический диаметр и дисперсность, вероятно, из-за того, что

**Рис. 1.** Схема образования нанокомпозитов Ans/PL-ODN.**Рис. 2.** Распределение частиц по размерам по данным ДСР через 1–2 ч (а) и через 3 месяца (б) после приготовления образцов. 1 – Ans, 2 – Ans/PL, 3 – Ans/PL-ODN. Концентрация частиц и нанокомпозитов – 0.1 мг/мл в расчете на Ans.

слой PL или PL-ODN предотвращает агломерацию. Аналогичный эффект наблюдался в работе [24] при защите наночастиц Ans белковыми слоями. Следует отметить, что замораживание супензий наночастиц и нанокомпозитов на основе анатаза приводит к их заметной агломерации (размеры увеличиваются до 400–600 нм).

Присоединение PL и PL-содержащих олигонуклеотидных коньюгатов в основном обусловлено электростатическим взаимодействием положительно заряженных аминогрупп с отрицательно заряженной поверхностью Ans при нейтральном pH [8]. Это предположение подтверждается значениями ξ -потенциала исследуемых образцов (табл. 2). Величины ξ -потенциала изменяются с отрицательных на положительные значения, когда исходные наночастицы Ans связывают PL (ср. строки 1 и 2) или PL-ODN (ср. строки 1 и 3 или 4), причем в первом случае (присоединение PL) это изменение более выражено, чем в случае присоединения PL-ODN, т.к. отрицательно заряженные межнуклеотидные фосфатные группы олигонуклеотида вносят свой вклад в суммарный заряд нанокомпозита (уменьшают “положительное” влияние PL). Разница между величинами ξ -потенциала для нанокомпозитов, содержащих ODN₁ (21-мер) и ODN₂ (33-мер) (табл. 2, строки 3 и 4) объясняется большим вкладом отрицательного заряда более протяженного олигонуклеотида, что приводит к уменьшению положительного заряда на частицах в случае 33-мера.

Уменьшение положительного заряда нанокомпозита An/PL-ODN₁ по сравнению с PL-ODN₁ (табл. 2, строки 3 и 5) можно объяснить вкладом отрицательно заряженных наночастиц.

Данные о размерах и значениях ξ -потенциала нанокомпозитов Ans/PL•ODN по сравнению с данными для исходных наночастиц Ans и коньюгатов Ans/PL однозначно показывают, что эти нанокомпозиты могут быть сформированы в водном растворе в отсутствие NaCl, т.е. PL и ODN могут успешно связываться, соответственно, с наночастицами Ans и Ans/PL в водных растворах.

Исследование наночастиц и нанокомпозитов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Исследование наночастиц методом ПЭМ позволяет определить их форму и физические размеры, а также визуализировать их пространственную организацию. В образцах водной супензии наночастиц Ans наблюдаются округлые частицы (2.5–4.0 нм) средней или высокой электронной плотности (4.0–6.5 нм) (рис. 3a). Основную долю составляют первые, организованные в “цепочки” и “веточки”, лежащие на сеточке по отдельности или в виде рыхлых скоплений разного размера. “Цепочки” частиц иногда замыкались в замкнутые округлые профили (рис. 3a). Подобная организация округлых частиц Ans в цепочки была показана методом сканирующей электронной микроскопии [25]. Электронно-плотные частицы располагались случайным образом. Следует отметить, что прак-

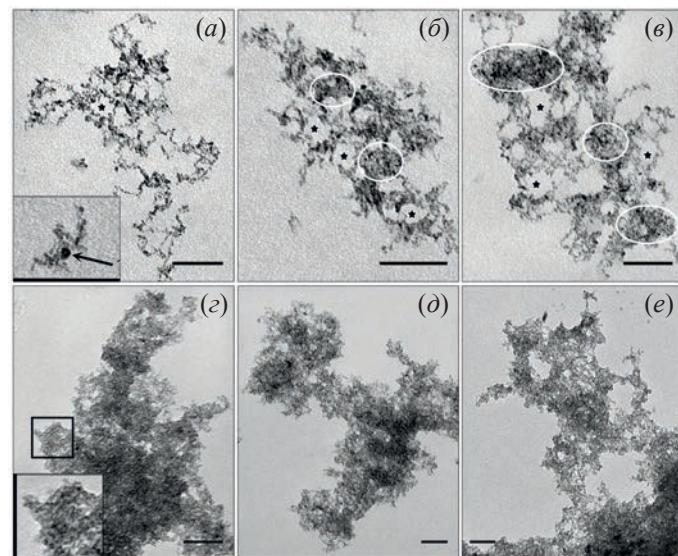


Рис. 3. Ультраструктура супензий наночастиц Ans, Ans/PL и Ans/PL•ODN, полученных методом ПЭМ: (a) – водная супензия наночастиц Ans. На врезке – частицы средней электронной плотности, округлая электронно-плотная частица показана стрелкой; (b) и (c) – водные супензии наночастиц Ans/PL и Ans/PL•ODN. Звездочками показаны полости замкнутых округлых профилей. Участки плотного расположения наночастиц выделены окружностями; (d) – супензия наночастиц Ans в 0.9%-ном растворе NaCl. На врезке представлен увеличенный участок скопления, видны “склеенные” частицы; (e) – супензии наночастиц Ans/PL и Ans/PL•ODN. Сорбция супензии на сеточку. Длина масштабных отрезков – 100 нм.

тически все наночастицы Ans были организованы в рыхлые скопления, отдельные частицы наблюдались крайне редко; аналогичная картина была отмечена во всех препаратах водных суспензий. Округлые электронно-плотные структуры (7–10 нм) встречались в образцах водной суспензии наночастиц Ans (рис. 3а, врезка), а также во всех остальных образцах частиц в водной суспензии.

В водной суспензии структура и размеры наночастиц Ans/PL не отличались от структуры исходных наночастиц Ans, однако несколько менялась пространственная организация их скоплений: наряду с “цепочками” и “веточками” появились многочисленные электронно-плотные локусы, в которых наночастицы плотно прилегали друг к другу (рис. 3б). Формирование локусов указывает на изменения поверхностных свойств наночастиц Ans при обработке полилизином, приводящие к их неупорядоченному “слипанию”.

Добавление олигонуклеотида не привело к заметным изменениям морфологии наночастиц Ans/PL•ODN в водной суспензии по сравнению с наночастицами Ans/PL. В рыхлых скоплениях наночастиц Ans/PL•ODN заметно возрастала доля электронно-плотных локусов по сравнению с наночастицами Ans/PL (рис. 3в).

Полученные результаты показывают выраженное сродство наночастиц Ans друг к другу: в свежеприготовленной водной суспензии они объединяются в разветвленные линейные структуры, формирующие рыхлые скопления. Модификация Ans полилизином приводит к уплотнению скоплений за счет неупорядоченного “слипания” наночастиц, формирующих электронно-плотные локусы. Визуально величина скоплений уменьшается по сравнению с исходными наночастицами Ans. Модификация олигонуклеотидом наночастиц Ans/PL усиливает их связывание друг с другом, что отражается на пространственной организации их скоплений, в которых возрастает доля “плотных” локусов и сокращается длина линейных компонентов.

В отличие от водной суспензии, в 0.9%-ном растворе NaCl наночастицы Ans формировали плотные комковатые скопления различного размера и формы (рис. 3г). Отдельные наночастицы и “цепочки” наночастиц просматривались лишь

на периферии скоплений. Структура скоплений наночастиц Ans/PL и Ans/PL•ODN в 0.9%-ном растворе NaCl визуально не отличалась от наблюдаемой в образцах наночастиц Ans: модифицированные наночастицы формировали плотные комковатые скопления различного размера и формы (рис. 3г–е).

Инкубация водных суспензий наночастиц Ans, Ans/PL и Ans/PL•ODN в течение суток при 4°C не привела к заметным изменениям морфологии наночастиц, характера сорбции на сеточку и пространственной организации скоплений. Суспензия содержала рыхлые разветвленные скопления разного размера, “цепочки” и “веточки” наночастиц Ans, как и свежеприготовленные образцы. Морфология скоплений наночастиц Ans, Ans/PL и Ans/PL•ODN через 24 ч инкубации в 0.9%-ном растворе NaCl при 4°C также заметно не изменялась по сравнению со свежеприготовленными образцами.

Таким образом, результаты ПЭМ иллюстрируют связывание наночастиц анатаза с полилизином и олигонуклеотидом, а также показывают различия между суспензиями наночастиц и нанокомпозитов в воде и в растворе NaCl.

Противовирусная активность нанокомпозитов в отношении ВПГ-1. Мы сравнили биологическую активность нанокомпозитов, полученных в воде и 0.9%-ном NaCl, на примере ингибирования репликации вируса простого герпеса первого типа в зараженных клетках VERO. В качестве действующего агента в составе нанокомпозитов мы использовали олигонуклеотид GCCGAGGTCCATGTCGTACGC (ODN₁), направленный на определенный участок генома вируса простого герпеса первого типа (ВПГ-1), а именно на сайт инициации трансляции мРНК белка UL13 [26].

Нанокомпозит Ans/PL•ODN₁ подавлял репликацию ВПГ-1 на 4.5 порядка независимо от способа приготовления (в воде или в 0.9% NaCl), если он был использован через сутки после получения (табл. 3). Через 10 суток хранения активность образца Ans/PL•ODN₁, приготовленного в солевом растворе, была на два порядка ниже, чем у сохранившего свою активность образца, приготовленного в воде.

Таблица 3. Противовирусная активность образцов Ans/PL•ODN в клетках VERO, зараженных ВПГ-1

Образец	Способ приготовления	ИПП вируса, Ig
Ans/PL•ODN ₁	H ₂ O, сутки	4.5
	0.9% NaCl, сутки	4.5
	H ₂ O, 10 суток	4.5
	0.9% NaCl, 10 суток	2.5

Примечание: ИПП – индекс подавления продукции вируса; ИПП = Титр вируса в контроле – Титр вируса в опыте (lg).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез наночастиц. Наночастицы TiO_2 в кристаллической форме (анатаз) (Ans) синтезировали, как описано в работе [15]. Ans получали добавлением смеси тетраизопропоксида титана и 2-изопропанола (6 : 1, v/v) в водный раствор HNO_3 при интенсивном перемешивании, соблюдая соотношение $[\text{H}^+] : [\text{Ti}] = 0.5$ и $[\text{H}_2\text{O}] : [\text{Ti}] = 200$. Золь перемешивали в течение 7 ч при 70°C и затем охлаждали до комнатной температуры. Затем золь дialisировали против воды при 3–4°C до pH 3.3–3.5, разбавляли раствор до концентрации 5 мг/мл, добавляли равный объем изопропилглицидилового эфира и 0.2 М водный раствор LiOH до pH 7.2. Полученную реакционную смесь дialisировали против воды.

Синтез олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) из синтонов (Glen Research, США). В работе использовали следующие олигонуклеотиды: ODN₁ 5'-GCCGAGGTCCATGTCGTACGC_p (21-мер), ODN₂ 5'-GAAATAAGAGGCTA-GCTACAAACGACCTTCATT_p (33-мер). Концентрацию олигонуклеотидов и их коньюгатов с полилизином определяли по оптическому поглощению на 260 нм, измеренному на спектрофотометре U-1800 (Shimadzu, Япония).

Синтез нанокомпозитов Ans/PL, Ans/PL-ODN и Ans/PL•ODN. В работе использовали поли-L-лизин гидробромид (PL, MW 15000–30000, Sigma-Aldrich, США). Полилизин-содержащие олигонуклеотиды (PL-ODN) синтезированы, как описано в работе [27], с использованием растворенного в воде полилизина при молярном отношении аминогрупп в полилизине к олигонуклеотиду 100 : 1. Коньюгаты PL-ODN дialisировали против воды для удаления остаточных количеств диметилсульфоксида и непрореагировавших олигонуклеотидов. Водные растворы PL-ODN (50–80 мМ) хранили при 4°C перед использованием.

Ans/PL получали, как описано в работе [15], добавляя 20 мкл 0.1 М водного раствора полилизина (в расчете на мономерное звено) к 1 мл супензии наночастиц (1 мг). Таким образом, при полном связывании полилизина с наночастицами емкость препарата Ans/PL по аминогруппам составляла 2 мкмоль/мг.

Нанокомпозиты Ans/PL-ODN получали, как описано в работе [16], смешивая супензию наночастиц Ans (0.1 мг) в 100 мкл воды с 10 мкл 0.1 мМ раствора PL-ODN. Нанокомпозиты Ans/

PL•ODN получали, как описано в работе [16], при смешивании наночастиц, покрытых полилизином (Ans/PL) (0.1 мг по Ans-наночастицам, 2 мкмоль/мг по NH_2 -группам), с ODN (10 мкл 0.1 мМ) в 100 мкл воды или 140 мМ раствора NaCl . Емкость нанокомпозитов по олигонуклеотиду составляла 20 нмоль/мг в обоих случаях.

Все манипуляции с наночастицами и нанокомпозитами проводили после обработки ультразвуком (90 Вт, 25°C) в течение 30 с.

Размер частиц и значения ξ -потенциала. Размер (гидродинамический диаметр, d) и ξ -потенциал исследуемых образцов измеряли методами динамического рассеяния света и фазового анализа рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZS Plus (Malvern, Великобритания) в водной среде. Ans, Ans/PL, Ans/PL-ODN и Ans/PL•ODN использовали в концентрации 0.1 мг/мл в расчете на наночастицы с содержанием полилизина 2 мкмоль/мг и олигонуклеотидов 20 нмоль/мг. Значения ξ -потенциала образцов измеряли с использованием кюветы DTS1070. Каждый образец готовили по меньшей мере в трех экземплярах, измерения каждого из них проводили в трех повторах при комнатной температуре. Значения размера частиц и ξ -потенциала усредняли по этим экспериментам. Влияние соли на агломерацию наночастиц и нанокомпозитов исследовали, добавляя к супензии 1 М раствор NaCl до соответствующей концентрации соли (50–100 мМ). Результаты представлены в табл. 1 и 2.

Противовирусная активность нанокомпозитов. Противовирусную активность образцов изучали на клетках VERO (ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия), инфицированных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) штамма VR-3 в “профилактическом” режиме. Титры ВПГ-1 в вирусодержащей жидкости (ВСЖ) в контроле (без образца) и опыте (с образцом) рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в мл ($\text{lg TCD}_{50}/\text{мл}$) по методу Спирмена–Кербера [28]. Клетки VERO в логарифмической фазе (10^5 кл./мл) высевали в питательной среде DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium), содержащей 10%-ную фетальную телячью сыворотку (Gibco, США), в 96-луночные планшеты (100 мкл/лунка) и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 и влажности 100%. После достижения ~80% монослоя среду удаляли, в лунки добавляли исследуемые образцы Ans/PL•ODN (5 мкМ по ODN) в 100 мкл среды DMEM, содержащей 2%-ную фетальную телячью сыворотку. В качестве контроля использовали 100 мкл среды DMEM. Клетки инкубировали при 37°C,

5% CO₂ и влажности 100% в течение 4 ч с последующим добавлением раствора ВПГ-1, множественность инфицирования 0.001 ТЦД₅₀/кл. (тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток). Клетки инкубировали в течение 48 ч в тех же условиях.

Вирус-ингибирующий эффект исследуемых образцов рассчитывали по формуле: ИПП = Титр вируса в контроле – Титр вируса в опыте (lg). В контрольном образце значение титра вируса было равно 7.0 ± 0.3 lg ТЦД₅₀/мл.

Электронная микроскопия. Свежеприготовленные суспензии Ans, Ans/PL и Ans/PL•ODN (0.1 мг/мл в расчете на Ans; 2 мкмоль PL и 20 нмоль ODN на 1 мг Ans) в воде или 0.9%-ном растворе NaCl, а также суспензии этих частиц после инкубации в течение 24 ч при 4°C, обрабатывали ультразвуком (90 Вт, 25°C) в течение 30 с. Суспензии каждого образца (10 мкл) сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой в течение 30 с, избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой, сетки высушивали на воздухе. Препараты изучали в просвечивающем электронном микроскопе Jem-1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Образцы изучали при аппаратном увеличении микроскопа 50–150 тыс. раз. Снимки получали с помощью цифровой камеры бокового ввода Veleta (SIS, Германия). Ультраструктуры суспензий приведены на рис. 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены неагломерированные олигонуклеотид-содержащие нанокомпозиты на основе наночастиц анатаза (Ans/PL•ODN, и Ans/PL-ODN). При иммобилизации олигонуклеотидов на наночастицах в воде образуются монодисперсные частицы небольшого размера, в то время как в присутствии NaCl происходит агломерация наночастиц и нанокомпозитов. Исследование биологической активности нанокомпозитов на примере подавления репликации вируса простого герпеса первого типа показало, что нанокомпозит Ans/PL•ODN₁, полученный в воде, проявил высокую противогерпетическую активность в культуре клеток (подавление репликации ВПГ-1 на 4.5 порядка), которая сохранялась по крайней мере в течение 10 суток. Активность того же нанокомпозита, полученного в солевом растворе, уменьшалась на два порядка за это время. Таким образом, продемонстрировано, что полученные нанокомпозиты могут храниться в воде при 4°C в течение длительного времени без падения их эффективности. Это упрощает и расширяет воз-

можность применения предложенных нанокомпозитов в качестве биологически активных агентов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00184).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор АСЛ руководитель. Авторы МНР, ОЮМ, ЕИФ, НАМ, ЮЕП, ЕИР и ВФЗ внесли равный вклад в исследование и подготовку текста статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ming X, Laing B.* // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2015. V. 87. P. 81–89.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.002>
2. *Samanta, A. Medintz I.L.* // *Nanoscale.* 2016. V. 17. P. 9037–9095.
<https://doi.org/10.1039/c5nr08465b>
3. *Weng Y, Huang Q., Li C., Yang Y, Wang X., Yu J., Huang Y, Liang X.J.* // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2020. V. 19. P. 581–601.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.004>
4. *Zhang X., Wang F., Liu B., Kelly E.Y., Servos M.R., Liu J.* // *Langmuir.* 2014. V. 30. P. 839–845.
<https://doi.org/10.1021/la404633p>
5. *Haghghi F.H., Mercurio M., Cerra S., Salamone T.A., Bianymotlagh R., Palocci C., Spica V.R., Fratoddi I.* // *J. Mater. Chem. B.* 2023. V. 11. P. 2334–2366.
<https://doi.org/10.1039/d2tb02576k>
6. *Thurn K.T., Arora H., Paunesku T., Wu A., Brown E.M., Doty C., Kremer J., Woloschak G.* // *Nanomedicine.* 2011. V. 7. P. 123–130.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.09.004>
7. *Челобанов Б.П., Репкова М.Н., Байгородин С.И., Рябчикова Е.И., Стеценко Д.А.* // *Мол. биол.* 2017. Т. 51. С. 695–704.
<https://doi.org/10.1134/S0026893317050065>

8. Beutner R., Michael J., Schwenzer B., Scharnweber D. // J. R. Soc. Interface. 2010. V. 7. S93–S105. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0418.focus>
9. Levina A., Repkova M., Shikina N., Ismagilov Z., Kupryushkin M., Pavlova A., Mazurkova N., Pyshnyi D., Zarytova V. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2021. V. 162. P. 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.006>
10. Thurn K.T., Paunesku T., Wu A., Brown E.M.B., Lai B., Vogt S., Maser J., Aslam M., Dravid V., Bergan R., Woloschak G.E. // Small. 2009. V. 5. P. 1318–1325. <https://doi.org/10.1002/smll.200801458>
11. Vollath D. // Beilstein J. Nanotechnol. 2020. V. 11. P. 854–857. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.70>
12. Li G., Lv L., Fan H., Ma J., Li Y., Wan Y., Zhao X.S. // J. Coll. Interface Sci. 2010. V. 348. P. 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.04.045>
13. Pellegrino F., Pellutiè L., Pellutiè L., Sordello F., Sordello F., Minero C., Ortel E., Hodoroaba V.D., Maurino V. // Appl. Catal. B Environ. 2017. V. 216. P. 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.05.046>
14. Kätelhön E., Sokolov S.V., Bartlett T.R., Compton R.G. // Chemphyschem. 2017. V. 18. P. 51–54. <https://doi.org/10.1002/cphc.201601130>
15. Levina A., Ismagilov Z., Repkova M., Shatskaya N., Shikina N., Tusikov F., Zarytova V. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2012. V. 12. P. 1812–1820. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5190>
16. Levina A.S., Ismagilov Z.R., Repkova M.N., Shikina N.V., Bayborodin C.I., Shatskaya N.V., Zagrebelny S.N., Zarytova V.F. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 87–98. <https://doi.org/10.1134/S1068162013010068>
17. Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. V. 40. P. 196–202. <https://doi.org/10.1134/s1068162014020095>
18. Repkova M.N., Levina A.S., Chelobanov B.P., Mazurkova N.A., Ismagilov Z.R., N.V. Shatskaya, S.V. Bayborodin, Filippova E.I., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2017. V. 49. P. 703–708. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.026>
19. Levina A.S., Repkova M.N., Bessudnova E.V., Filippova E.I., Zarytova V.F. // Beilstein J. Nanotechnol. 2016. V. 7. P. 1166–1173. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.108>
20. Repkova M.N., Levina A.S., Ismagilov Z.R., Mazurkova N.A., Mazurkova O.Ju., Zarytova V.F. // Nucleic Acid Ther. 2021. V. 31. P. 436–442. <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0061>
21. Repkova M.N., Levina A.S., Seryapina A.A., Shikina N.V., Bessudnova E.V., Zarytova V.F., Markel A.L. // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 454–457. <https://doi.org/10.1134/S000629791704006X>
22. Любинский С.Л., Люблинская И.Н., Колоскова Е.М., Азизов А.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Канюев А.В., Агельдинов Р.А., Герасимов В.Н., Гриценко Д.В. // Биомедицина. 2021. Т. 17. С. 18–37. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-18-37>
23. Shih Y.H., Liu W.S., Su Y.F. // Env. Toxicol. Chem. 2012. V. 31. P. 1693–1698. <https://doi.org/10.1002/etc.1898>
24. Patel S., Patel P., Bakshi S.R. // Cytotechnology. 2017. V. 69. P. 245–263. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-0054-3>
25. Theissmann R., Drury Ch., Rohe M., Koch T., Winkler J., Pikal P. // Beilstein J. Nanotechnol. 2024. V. 15. P. 317–332.
26. Levina A.S., Repkova M.N., Zarytova V.F. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 1243–1262. <https://doi.org/10.1134/S1068162023060067>
27. Levina A.S., Mikhaleva E.A., Repkova M.N., Zarytova V.F. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 34. P. 89–95. <https://doi.org/10.1134/s1068162008010111>
28. Mahy B.W.J., Kangro H.O. // Virology Methods Manual. London: Academic Press, 1996. 374 p.

Non-Agglomerated Oligonucleotide-Containing Nanocomposites Based on Titanium Dioxide Nanoparticles

M. N. Repkova*, O. Yu. Mazurkov, E. I. Filippova**, N. A. Mazurkova**,
Yu. E. Poletaeva*, E. I. Ryabchikova*, B. F. Zarytova*, and A. S. Levina*,#**

[#]Phone +7 (913) 756-76-93; e-mail: as11032@yandex.ru

** Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
prosp. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

*** FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector",
Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia*

Stability and monodispersity are important properties of nanoparticles and nanocomposites that ensure the reliability of their application in biological systems and the reproducibility of results. The preparation of non-agglomerated oligonucleotide-containing nanocomposites based on anatase titanium dioxide nanoparticles (Ans~ODN) is the aim of this work. The immobilization of oligodeoxynucleotides on TiO₂ nanoparticles has been studied by the dynamic light scattering and transmission electron microscopy. The antiviral activity of the synthesized samples has been performed on VERO cells infected with herpes simplex virus of the first type. The effect of NaCl on the agglomeration of nanoparticles and nanocomposites in aqueous solutions has been studied. The presence of NaCl leads to agglomeration of nanoparticles and nanocomposites. It has been shown that nanocomposites are formed in an aqueous solution in the absence of NaCl. A comparison of the biological activity of nanocomposites prepared in water and saline solution has been carried out with an example of inhibition of replication of the herpes simplex virus of the first type in the cell culture. The studied nanocomposite, regardless of the preparation method (in water or 0.9% NaCl), inhibited virus replication by 4.5 orders of magnitude when used 1 day after preparation. After 10 days of storage, the activity of the sample prepared in saline solution was two orders of magnitude lower than that of the active sample prepared in water. We have developed the method for the preparation of non-agglomerated oligonucleotide-containing nanocomposites based on anatase nanoparticles and demonstrated their potential use for the study of their biological activity. Unlike nanocomposites prepared in the presence of salt, which lose their efficacy during storage, nanocomposites that are not prone to agglomeration can be obtained in water for future use.

Keywords: *anatase nanoparticles, oligonucleotide-containing nanocomposites, antiviral activity, herpes simplex virus*



УДК 571.27

ЭКСПРЕССИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ФРАГМЕНТА PD-L1 МЫШИ И ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К PD-L1

М. С. Горюнова*, Д. Ю. Рязанцев*, Е. Э. Петрова*, В. В. Костенко*, **,
А. О. Макарова*, **, Р. В. Холodenко*, Е. В. Рябухина*, Д. В. Калиновский*,
О. Д. Коцарева*, Е. В. Свищевская*

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** ФГБУО ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 19.03.2024 г.

Ряд молекул, экспрессированных на клетках млекопитающих, вовлечен в формирование аутотолерантности. К ним, в первую очередь, относятся CTLA-4/B7 и PD1-PD-L1 сигнальные пути. Блокаторы этих сигнальных путей, называемые ингибиторами контрольных точек (ИКТ) иммунитета, используются в клинике для терапии разных форм рака. Антитела к CTLA-4 вызывают системную токсичность и одобрены только для терапии некоторых форм рака. Антитела против PD1 или PD-L1 успешно применяются для терапии разных типов рака и характеризуются незначительной токсичностью. Однако ответ на терапию с использованием ИКТ наблюдается не во всех случаях. Разработка более эффективных подходов к терапии рака на основе PD1/PD-L1 ингибиторов требует дополнительных исследований. Целью данной работы была экспрессия внеклеточной части белка PD-L1 мыши (exPD-L1) и получение антител к PD-L1. В бактериальной системе экспрессии был получен и охарактеризован белок exPD-L1 мыши. Белок exPD-L1 использовали для иммунизации мышей с целью получения продуцентов анти-PD-L1 антител. С помощью гибридомной технологии получено 5 клонов, экспрессирующих антитела к exPD-L1. Антитела клона B12 были наработаны в асцитной жидкости мышей линии BALB/c и очищены методом аффинной хроматографии. Методом ИФА для очищенных антител было показано специфичное связывание с белком exPD-L1 и коммерческим белком внеклеточной части мышного PD-L1. Эксперименты методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии показали, что полученные антитела связывают внутриклеточную форму белка PD-L1, в отличие от коммерческих антител, связывающих мембранный форму.

Ключевые слова: CTLA-4/B7, PD1-PD-L1 сигнальные пути, ингибиторами контрольных точек, моноклональные антитела, мышиные модели

DOI: 10.31857/S0132342324060136, **EDN:** NDZLKD

ВВЕДЕНИЕ

В значительной степени иммунная система млекопитающих регулируется соотношением стимулирующих и подавляющих сигналов, направленных на иммунные контрольные точки, чем обеспечивается контролируемый иммунный ответ на внешнюю угрозу. В отсутствии подавляющих сигналов Т-клетки способны активироваться на незначимую угрозу, с которой вполне

может справиться врожденный иммунитет и что приводит к “шуму” системы, расходу энергии, аутоиммунитету. При значительной патогенной нагрузке Т-клетки в отсутствии супрессорной регуляции могут убить организм. К основным молекулам, контролирующими активацию Т-клеток, относятся гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA-4) и белки программируемой гибели PD1/PD-L1 [1, 2].

Сокращения: CTLA-4/B7 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4; PD1/PD-L1 – рецептор программируемый смерти 1/лиганд программируемой смерти 1; exPD-L1 – рекомбинантный белок, соответствующий внеклеточной части PD-L1 мыши; IFN- γ – интерферон гамма; ПЦР – полимеразная цепная реакция; АПК – антиген-представляющие клетки; ИФА – иммуно-ферментный анализ; ПААГ – полиакриламидный гель; мАт – моноклональные антитела; PBS – фосфатный буфер; BSA – бычий сывороточный альбумин.

Автор для связи: (эл. почта: esvir@mail.ibch.ru).

Сигнальные пути контрольных точек (КТ) иммунитета представляют собой негативные регуляторы иммунной системы, которые опосредуют толерантность, предотвращая аутоиммунитет и защищая ткани от иммунной атаки. Ингибиторы КТ (ИКТ) иммунитета нашли применение в терапии рака различных типов [3–5].

CTLA-4 гомологичен Т-лимфоцитарному стимулирующему белку CD28; оба связываются с молекулами B7-1, B7-2 на антиген-представляющих клетках (АПК). Ингибитор PD-1 экспрессируется преимущественно на активированных Т-клетках. Связывание с лигандами PD-L1 или PD-L2, экспрессированными на различных клетках, приводит к торможению функции и программированной смерти Т-клеток [6, 7].

PD-L1 и PD-L2 имеют различные паттерны экспрессии. Низкий уровень PD-L1 конститутивно экспрессируется на АПК (В-клетки, дендритные клетки, макрофаги), тучных клетках, Т-клетках, а также на широком спектре негематопоэтических клеток [8].

PD-L2 экспрессируется преимущественно на профессиональных АПК [8]. PD-L1 и PD-L2 могут экспрессироваться опухолевыми клетками и стромой опухоли, причем PD-L1 чаще обнаруживается на этих клетках. В клинических исследованиях показано, что антитела к PD1 и PD-L1 проявляют сравнимую эффективность в терапии рака [9].

Экспрессия PD-L1 значительно повышается в раковых тканях, подвергающихся иммунной атаке. Активированные Т-клетки продуцируют цитокины, стимулирующие экспрессию PD-L1, причем IFN- γ выступает одним из наиболее мощных стимуляторов. Считается, что PD-L1 может использоваться опухолевыми клетками в качестве защитного механизма от атаки Т-клеток [10, 11].

Антитела к PD1 и PD-L1 используются в клинике (атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб и др.) [9, 12–15]. В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании 3-ей фазы оценивали эффективность поддерживающей терапии атезолизумабом (анти-PD-L1 антитело) у 201 пациента с мелкоклеточным раком легкого после курса карбоплатина и этопозида. При наблюдении 14 месяцев выживаемость составила 12.3 месяца в группе атезолизумаба и 10.3 месяца в группе плацебо [12]. Оценку эффективности проводили по системе RECIST1.1. Показали, что в группе анти-PD-L1 адъювантной терапии частичную или полную ремиссию наблюдали у 121 пациента из 201 (60%), при этом в группе плацебо по системе RECIST1.1 ремиссия наблюдалась у 64% [12].

В рамках исследования 2-ой фазы 116 ранее нелеченых больных с метастатической карци-

номой Меркеля, редкого и агрессивного рака кожи, получали авелумаб в качестве первой линии терапии в дозе 10 мг/кг внутривенно каждые 2 недели. У 35% пациентов ответ регистрировался более 6 месяцев, что оценивалось по динамике изменения опухолевой массы по системе RECIST1.1 [13]. Частота ответа была выше у пациентов с опухолями PD-L1+ и опухолями с повышенной внутриопухолевой плотностью CD8+ Т-клеток [13].

Аналогичные данные получены и для других антител как против PD1, так и против PD-L1 [9, 14, 15]. Мета-анализ восьми исследований у пациентов, получавших ингибиторы PD1/PDL1 в схеме адъювантной иммунотерапии (6347 пациентов), показал, что иммунотерапия значительно снижает риск рецидива после резекции опухоли. Так, относительный риск (hazard ratio, HR) составил по 6-ти исследованиям от 0.56 до 0.89, что означает снижение риска рецидива на 11–44% [9]. Однако результаты выживаемости показали отсутствие статистической разницы между группой ИКТ и группой плацебо при адъювантной терапии [9]. При этом частота возникновения усталости, тошноты и зуда у пациентов, получавших ингибиторы, была достоверно выше, чем в контрольной группе [9].

Приведенные данные показывают, что терапия эффективна только у части пациентов, но может быть эффективна как терапия первой линии, так и в режиме адъювантной терапии. Терапия ингибиторами PD1/PDL1 не удлиняет продолжительность жизни и имеет побочные эффекты [9, 13–15].

Для улучшения эффективности терапии ингибиторами PD1/PDL1 требуется более детальное понимание процессов участия белков PD1/PDL1 в регуляции роста опухоли и иммунного ответа на антигены опухоли. На настоящий момент эффект ингибиторов PD1/PDL1 во многом остается “черным ящиком”, что требует дополнительных исследований.

В мышиных моделях эффект ингибиторов PD1/PDL1 также неоднозначен. Показано, что при подкожных опухолях наблюдается снижение объема опухоли на 30–35%, но не отторжение, лучшие результаты, до 95%, получены для ортоптических моделей [16].

Использование мышиных моделей позволяет разобраться в механизмах резистентности к PD1/PDL1 терапии [17], проанализировать роль различных факторов, например, липидов, оценить эффективность комбинированной терапии и др. [18–20]. В связи с этим моноклональные антитела к мышьенным PD1/PDL1 – важный инструмент оценки эффективности как монотерапии опухолей мышей с применением ИКТ, так и ком-

бинированной терапии в сочетании с препаратами других классов.

Цель данной работы – экспрессия белка внеклеточной части мышиного PD-L1 в бактериальной системе, а также получение гибридом с использованием полученного белка, продуцирующих моноклональные антитела (мАт), специфичные к мышенному белку PD-L1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование и экспрессия гена, кодирующего внеклеточный фрагмент PD-L1 мыши. Для клонирования гена, кодирующего внеклеточных фрагмент PD-L1 мыши (exPD-L1), провели скрининг клеточных линий мыши методом количественной ПЦР с использованием подобранных праймеров (табл. 1). Все линии экспрессировали PD-L1, максимальная экспрессия гена *PD-L1* наблюдалась в клетках тимомы мышь EL-4 (рис. 1а). По этой причине клетки EL-4 использовали для амплификации фрагмента гена *PD-L1*, кодирующего белок exPD-L1. Ожидаемый размер продукта ПЦР составил 665 п.о. После подтверждения размера ампликона в агарозном геле (рис. 1в), мы клонировали целевую последовательность в промежуточный вектор pTZ57R/T и проверяли наличие вставки методом ПЦР и секвенированием по Сэнгеру с использованием праймеров M13 (рис. 1г). Вставки из клонов, не содержащих ошибок, были

встроены в экспрессионный вектор pQE30 по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Kpn*I и *Hind*III (рис. 1б), после чего мы трансформировали получившейся генетической конструкцией штамм *E. coli* XL1 Blue. После повторного подтверждения корректности вставки аналогичными методами мы трансформировали выделенной из отобранных клонов плазмидой экспрессионный штамм *E. coli* M15.

Белок экспрессировался в значительном количестве (30–50 мг/л), но при экспрессии откладывался в тельцах включения; нам не удалось подобрать условия (концентрация ИПТГ, температура, время инкубации), чтобы этого избежать. Для получения растворимого в физиологических растворителях белка мы проводили процедуру рефолдинга. Таким образом, очистка включала в себя лизис клеток и получение осветленного лизата, металл-аффинную хроматографию, обессоливание на обратной фазе, рефолдирование и диализ. После всех процедур очистки был получен чистый препарат (рис. 1г, одна полоса при анализе методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях) водорастворимого exPD-L1 в количестве 5–10 мг/л. Несмотря на рефолдинг, белок был нестабильным и при длительном хранении при +4°C постепенно выпадал в осадок.

В результате экспрессии был получен белок exPD-L1 с молекулярной массой (ММ) около 27 кДа, что соответствует внеклеточному домену

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованные в работе

Последовательность 5'-3'		
Праймеры для введения сайтов рестрикции		
PD-L1	Прямой	ATGCGGT <u>AC</u> CTTACTATCACGGCTCCAAAGGAC*
	Обратный	GCATAAG <u>CTT</u> CAGTGAGTCCTGTTCTGTGGAGGAT
Праймеры для анализа экспрессии		
PD-L1	Прямой	GAGAAGTGTCA <u>CC</u> ACTTCCCGGAC
	Обратный	GAG <u>CTT</u> GATCTCAACGCCACATTCT
GAPDH	Прямой	GGC CTA CAT GGC CTC CAA GGA GT
	Обратный	GGA TGG AAA TTG TGA GGG AGA TGC T
Гидролизуемые зонды для ПЦР в реальном времени		
PD-L1	[BHQ1]ATgCTTCTCAA[FAM-dT]gTgACCAgCAGTCTgAgggTCA[P]	
GAPDH	[FAM]CCCACCCCAgCAA <u>gg</u> ACACTgAgCAA[BHQ1]	
Праймеры для секвенирования плазмида pQE30 со вставкой		
pqe30r	TAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGA	
qe30f	AGAGGATCGCATCACCAC	

* Подчеркнуты сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

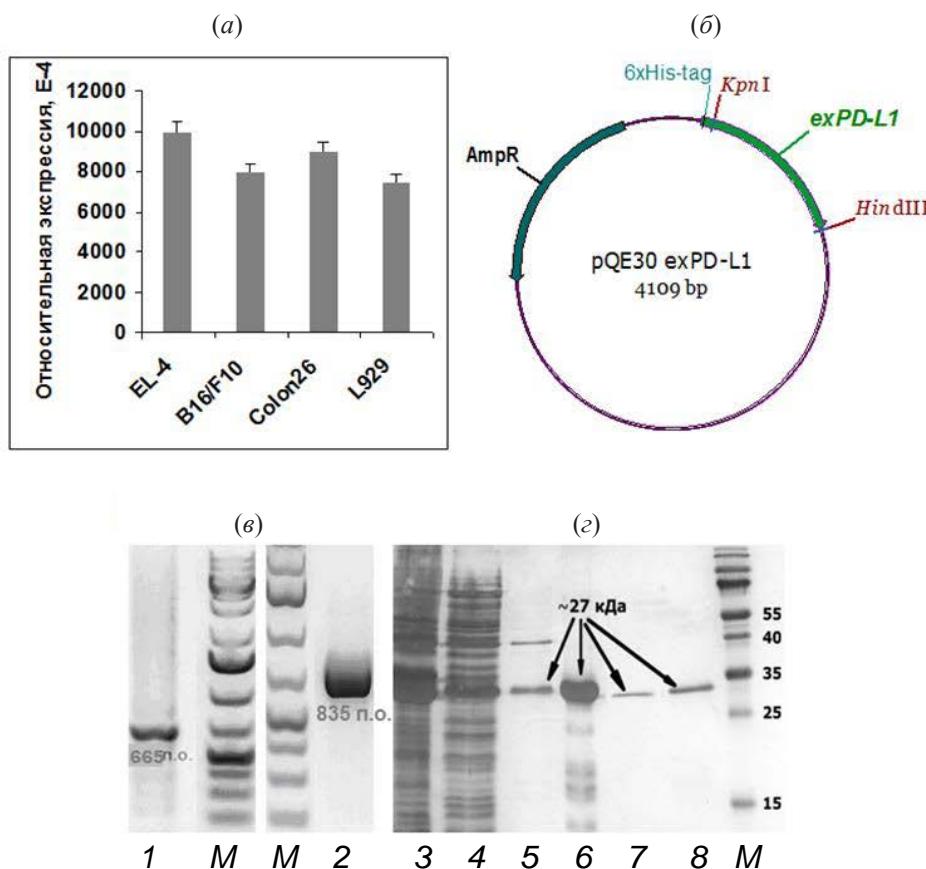


Рис. 1. Экспрессия белка exPD-L1. (а) – Анализ экспрессии гена *exPD-L1* в линиях клеток мышей; (б) – схема экспрессионного вектора pQE30, включающего ген белка exPD-L1; (в) – электрофорограмма результатов ПЦР фрагмента гена, кодирующего exPD-L1 до клонирования (1) и после встраивания в промежуточную плазмиду pTZ57R/T (2); (г) – электрофорограмма результатов выделения и очистки белка exPD-L1. (3) – лизат *E. coli*, который наносили на колонку с Ni-NTA агарозой; (4) – проксок с колонки; (5) – фракция промывки колонки от неспецифично связавшихся белков; (6) – фракция элюции (помимо целевого белка видны продукты его деградации); (7) – образец раствора белка после проведения обращенно-фазовой хроматографии; (8) – образец раствора белка после проведения рефолдинга белка и его диализа; М – маркер молекулярного веса белков и ДНК.

белка PD-L1 мыши (табл. 2). При этом белки PD-L1 человека и мыши высоко консервативны (табл. 3).

Получение гибридом, продуцирующих антитела к белку exPD-L1 мыши. Для получения гибридомы мышей BALB/c трижды иммунизировали белком exPD-L1. Перед третьей иммунизацией у мышей забирали кровь, выделяли сыворотку и анализировали титры антител к exPD-L1 методом прямого ИФА. Перед гибридизацией титр специфических антител к PDL-1 в сыворотке крови иммунизированной мыши составлял не менее 1 : 50000. Для гибридизации через 5 дней после последней иммунизации забирали клетки дренирующего место иммунизации лимфатического узла, сливали их с клетками миеломы SP2/0, разносили в селективной среде с НАТ по 96-луночным планшетам с нанесенными за сутки до этого фидерными макрофагами

мыши. В результате гибридизации было отобрано 5 клонов клеток-продуцентов моноклональных антител (мАт): B11, B12, E7, E11 и G7 (рис. 2а). Изотипирование мАт культуральных жидкостей полученных гибридом показало, что все клоны продуцировали мАт с легкими цепями каппа-типа и тяжелыми цепями класса IgG2b (B11, B12, E7) или IgG2a (E11 и G7) (рис. 2б).

Гибридные клетки использовали для получения асцитов. Моноклональные антитела очищали из асцитной жидкости методом аффинной хроматографии на протеин-А-сепарозе. Анализ выделенных антител в ПААГ показал их высокую чистоту, в невосстановливающих условиях четко видна полоса на 150 кДа, соответствующая полноразмерным антителам, а в восстановливающих условиях – 2 полосы на 50 кДа

Таблица 2. Последовательности белков exPD-L1 и RPA788Mu01 (Cloud-Clone, China) мыши*

MRGSHHHHHGSAELGTTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERE**LDLLALVVYWEKEDEQV**
IQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCISYGGADYKRITLKVN
APYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQVSGKRSVTSRTEGMILLNVSSLRV
NATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNRTH
 wvllgsillflivvstvllflrkqvrmldvekcgvedtssknrndtqfeet

* Жирным шрифтом выделена аминокислотная последовательность в составе белка exPD-L1, появившаяся из остатков последовательности полилинкера плазмида pQE30 и 6x-His-тага; желтым цветом выделена последовательность экстрацептюларного домена PD-L1, общая в белках exPD-L1 и RPA788Mu01; строчным текстом показана последовательность белка RPA788Mu01, отсутствующая в белке exPD-L1.

Таблица 3. Гомология белков PD-L1 мыши (mecPD-L1) и человека (hPD-L1)*

	1	50
hPD-L1	(1) MR IFAVFIFMTYWHL LNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDL	
mecPD-L1	(1) MR GSHHHHHGSA LGTFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVEREELDL	
	51	100
hPD-L1	(51) A <u>ALIVYWEMEDKNI</u> IQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQ	
mecPD-L1	(51) <u>LALIVYWEMEDKNI</u> IQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLSLKGNAALQ	
	101	150
hPD-L1	(101) ITDVKLQDAGVYRC <u>MISYGGADYKRITVKVNAPY</u> NKINQRI <u>LVVDPVTSE</u>	
mecPD-L1	(101) ITDVKLQDAGVYCC <u>IISYGGADYKRITLKVNAPY</u> RKINQRI <u>S-VDPATSE</u>	
	151	200
hPD-L1	(151) HELT <u>CQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREEKLF</u> NVTSTLRIN	
mecPD-L1	(150) HELI <u>CQAEGYPKAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTSRTEGMILLNVTS</u> SLRVN	
	201	250
hPD-L1	(201) TTNE <u>IFYCTFRRLDPEENHTAELV</u> IPELPLAHPPNERTH <u>LVILGAILLC</u>	
mecPD-L1	(200) <u>ATANDVFYCTFWRSQPGQ</u> NHTAELIIPELPAT <u>HPPQNRTH</u> <u>-----</u>	
	251	290
hPD-L1	(251) LGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET	
mecPD-L1	(240) <u>-----</u>	

* Желтым цветом отмечены гомологичные аминокислоты; зеленым показаны близкие по свойствам замены; подчеркнут фрагмент последовательности белка exPD-L1. Выравнивание проводили по алгоритму ClustalW в программе AlignX из пакета Vector NTI 9 (Invitrogen).

и 25 кДа, что характерно для тяжёлых и легких цепей IgG, соответственно (рис. 2 σ).

Для оценки антиген-связывающих свойств выделенных антител использовали методы ИФА и конфокальной микроскопии, а также дот-блот. В качестве сравнения с полученным белком exPD-L1 использовали коммерческий белок внеклеточной части PD-L1 мыши RPA788Mu01 (Cloud-Clone, China) с заявленной ММ 31 кДа (табл. 2). По

ПААГ подвижности ММ коммерческого белка составила около 35 кДа (рис. 2 σ), что больше массы белка exPD-L1, которая равна примерно 27 кДа. ИФА (рис. 2 δ) и дот-блот (рис. 2 ϵ) с использованием белка exPD-L1 и коммерческого белка RPA788Mu01 показали распознавание выделенными антителами обоих белков.

Анализ связывания антител к exPD-L1 B12 с белком PD-L1 провели с помощью вестерн-

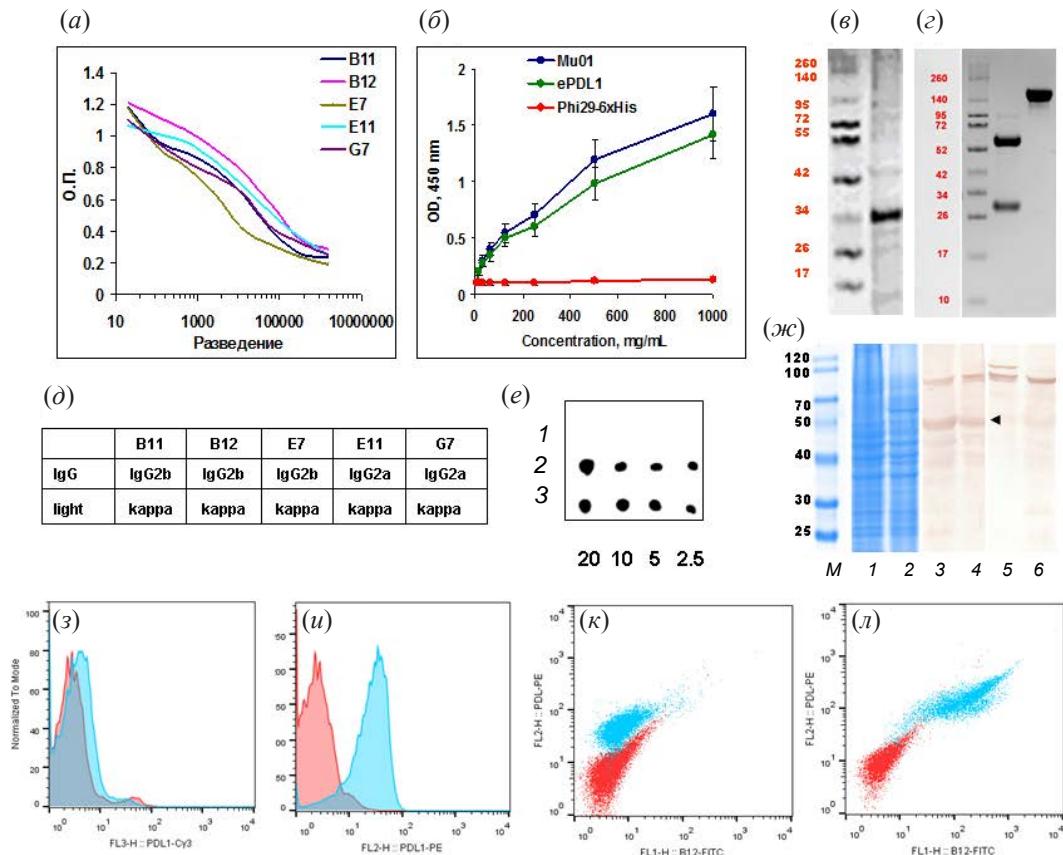


Рис. 2. Характеристика моноклональных антител к exPD-L1, продуцируемых полученными гибридомами. (а) – Связывание белка exPD-L1 антителами из культуральной жидкости полученных гибридом методом ИФА; (б) – распознавание белков внеклеточной части PD-L1 (exPD-L1 и RPA788Mu01) и белка сравнения (ДНК-полимераза фага Phi29 с 6xHis тагом) мАт, выделенными из асцитной жидкости гибридомы B12; (в) – электрофорограммы белка RPA788Mu01 и (г) очищенных мАт B12 в восстанавливающих и невосстанавливающих (слева направо) условиях; (д) – изотипирование мАт, секретируемых полученными гибридомами; (е) – распознавание мАт гибридомы B12 в дот-блоте ДНК-полимеразы фага Phi29-6xHis (1), exPD-L1 (2) и RPA788Mu01 (3) (слева направо уменьшающаяся концентрация белка); (ж) – электрофорограммы и вестерн-блот лизатов клеток мыши B16/F10 (1, 3, 5) и человека SCOV-3 (2, 4, 6), меченные антителами B12 против PD-L1 мыши (3, 4) и против двух форм белка теплового шока 70 (конститутивная и индуцируемая формы) (5, 6); (з) – гистограммы распределения живых клеток EL-4, окрашенных B12-Cy3 и (и) 10F.9G2-PE. Розовым цветом отмечены контрольные гистограммы, голубым отмечены клетки после связывания с антителами; (к) – дот-плоты живых и (л) пермиабилизованных клеток B16/F10, (ж, абсцисса) – меченные B12 или 10F.9G2 (ордината). Розовым цветом отмечены контрольные гистограммы, голубым отмечены клетки после связывания с антителами.

блоттинга с использованием лизата клеток меланомы мыши B16/F10 и рака яичника человека SCOV-3. Показали, что мАт B12 связывали как мышиный, так и человеческий PD-L1 (рис. 2ж, дорожки 3 и 4 соответственно). Антитела распознавали как белок с ММ ~40 кДа, соответствующий ММ полноразмерного PD-L1, так и белок с ММ ~70 кДа (сравнение с белком теплового шока 70, дорожки 5 и 6), предположительно димеры PD-L1.

Для подтверждения связывания полученных антител с клетками мышиных линий получили мАт B12, меченные Су3 и FAM. В качестве

контроля использовали коммерческие анти-PD-L1 антитела, клон 10F.9G2 (Biolegend, USA). Показали, что коммерческие антитела значительно лучше связываются с живыми клетками (рис. 2з–и). Пермиабилизация клеток привела к связыванию как мАт B12, так и 10F.9G2 (рис. 2к–л).

Поскольку методом проточной цитометрии и вестерн-блоттинга нельзя оценить внутриклеточную локализацию PD-L1, провели анализ пермиабилизованных клеток методом конфокальной микроскопии. Показали, что мАт B12 распознают внутриклеточный PD-L1 (рис. 3а), а

10F.9G2 – мембранный белок в перфорированных клетках B16/F10 (рис. 3б). При этом значительная часть белка PD-L1 локализовалась на ядерной мембране (врезка).

В последние годы появилось много работ, показывающих внутриклеточную локализацию PD-L1 и транслокацию его в ядро [21–23]. При этом функция ядерного PD-L1 пока неясна. Показано, что PD-L1 перемещается из плазматической мембраны в ядро посредством взаимодействий с компонентами путей эндоцитоза и цитоплазматического транспорта и регулируется p300-опосредованным ацетилированием и HDAC2-зависимым деацетилированием PD-L1 [21]. Транслокация PD-L1 в ядро клеток стимулирует ангиогенез при злокачественных новообразованиях, играет существенную роль в развитии рака и транскрипции других молекул иммунных контрольных точек, что может выступать основной стратегии борьбы с васкуляризацией путем блокирования транслокации PD-L1 в ядро [22–23].

Известно, что ряд цитокинов, в первую очередь интерфероны I и II типов стимулируют экспрессию PD-L1 [10, 11, 24]. Для анализа эффекта цитокинов на экспрессию PD-L1 использовали 3D культуры, стимулированные интерфероном γ (IFN- γ). Показали, что в перфорированных культурах B16/F10 белок PD-L1 обнаруживался в цитоплазме, на ядерной мембране и в ядре (рис. 3а). Добавление в культуры IFN- γ стимулировало транслокацию белка PD-L1 в ядро (рис. 3б, врезка). При этом антитела 10F.9G2-PE по-прежнему окрашивали мембранный белок, но уровень экспрессии повышался (рис. 3б, в), что соответствует ранее опубликованным данным [10, 11].

Недавние исследования показали, что гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование и другие формы посттрансляционной модификации белков играют важную роль в регуляции стабильности белка PD-L1, транслокации и межбелковых взаимодействиях [25]. Так ингибиторы *N*-, но не *O*-глико-

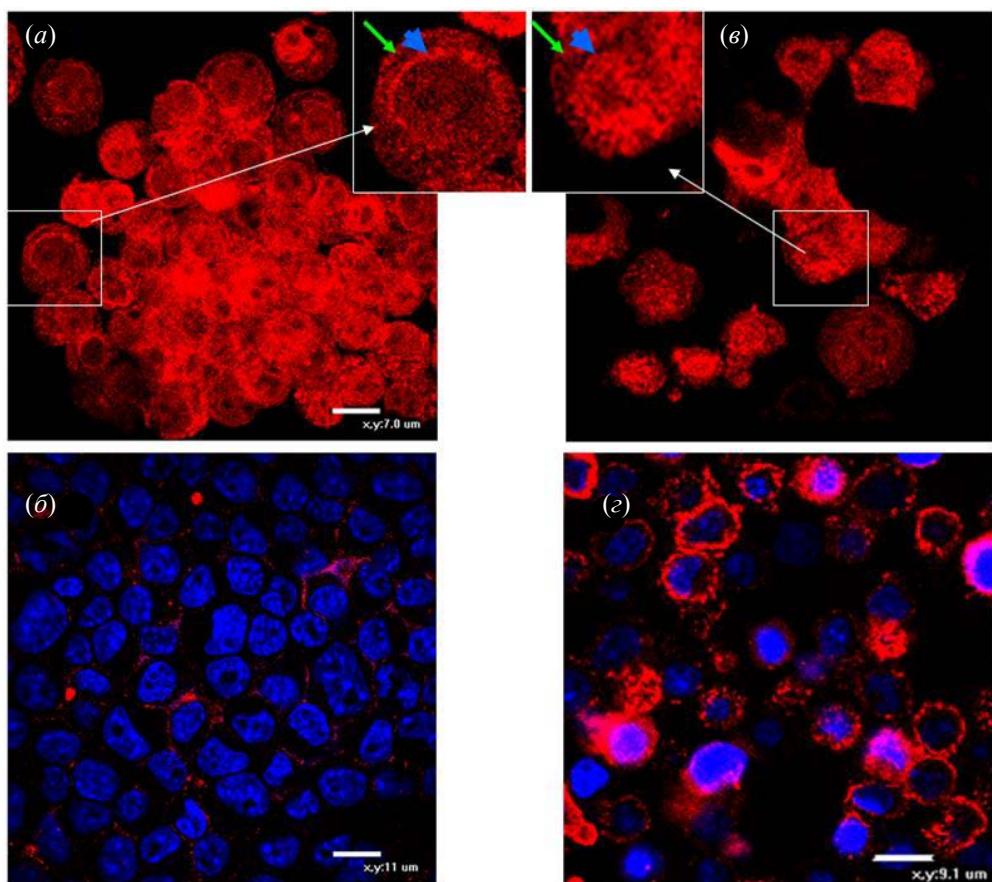


Рис. 3. Анализ локализации PD-L1 в клетках B16/F10, культивированных в 3D условиях. Клетки инкубировали на антиадгезивной подложке 20 ч без (а, б) и с добавлением IFN- γ мыши (в, г), фиксировали, перфорировали и окрашивали антителами B12 (а, в) или 10F.9G2 (б, г). На врезках показаны увеличенные изображения отдельных клеток. Зеленой стрелкой отмечена плазматическая мембрана клеток, синей – ядерная мембрана. Синим окрашены ядра клеток (б, г). Шкала 7–9 мкм.

зилирования меняют миграционный сдвиг PD-L1 на ПААГ, предполагая, что PD-L1 в основном *N*-гликозилирован [26]. Исходя из имеющихся литературных данных, антитела B12 могут распознавать модифицированный PD-L1 белок.

В результате проведенной работы получены белок exPD-L1 и 5 гибридом, секретирующих мАт к этому белку. Антитела B12, наработанные из гибридом и очищенные методом аффинной хроматографии, показали специфическое связывание как с чистым антигеном, представляющим собой внеклеточную часть PD-L1, так и с клетками мышной линии меланомы B16/F10. Полученные антитела распознают внутриклеточную форму белка PD-L1, отличающуюся от мембранный, которая распознается коммерческими антителами 10F.9G2. Получение мАт, распознающих мембранный форму, будет проведено в дальнейшем, что требуется для анализа механизмов терапии рака на основе ингибиторов контрольных точек. Полученные в данной работе антитела будут использованы для анализа внутриклеточных процессов в раковых клетках различных типов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы. Клеточные линии. В работе использовали линии клеток лимфомы мыши EL4, меланомы B16, B16/F10, фибробластов L929, кишечной карциномы Colon26 и рака яичника человека SCOV-3 (коллекция ИБХ РАН). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, L-глутамина и антибиотиков (все из ПанЭко, Россия) при температуре 37°C и 5% CO₂. При пересеве клетки инкубировали в 0.25% растворе трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия) в течение 2–3 мин. Полученные клетки центрифугировали и использовали для выделения РНК.

РНК выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Качество выделенной РНК оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Концентрацию и чистоту выделенной РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм и по отношению D₂₆₀/D₂₈₀ на спектрофотометре NanoDrop (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

Образец РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, USA) по протоколу производителя, а затем проводили обратную транскрипцию с использованием набора ОТ-М-MuLV-RN с использованием набора праймеров произвольного состава по протоколу производителя (Биолабмикс, Россия).

Для проточной цитометрии и конфокальной микроскопии клетки инкубировали как описано

выше. Для получения пермиабилизованных клеток использовали 0.1% тритон X100 в PBS. Для конфокальной микроскопии клетки высевали на покровные стекла, инкубировали 3–4 ч для достижения адгезии, пермиабилизовали и окрашивали антителами.

Амплификация фрагмента гена PD-L1, кодирующего внеклеточный участок белка exPD-L1 мыши. Последовательности праймеров (Евроген, Россия) и гидролизуемых зондов (Lumiprobe, Россия) для количественной ПЦР (кПЦР) приведены в табл. 1. ПЦР проводили на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-Технология, Москва). Фрагмент РНК EL-4 амплифицировали и секвенировали для подтверждения последовательности (рис. 1). С помощью праймеров в последовательность ввели сайты рестрикции (табл. 1). Амплифицированные фрагменты разделяли в 1.5% агарозном геле, вырезали и выделяли из геля с помощью набора QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) согласно протоколу производителя. Выделенный ПЦР-продукт лигировали в вектор pTZ57R/T с использованием набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Полученными генетическими конструкциями трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* XL1 Blue (Евроген, Россия). Одиночные белые колонии высевали на сектора и проверяли методом ПЦР с универсальными праймерами M13f, M13r. Положительные клоны высевали в жидкую среду и выделяли плазмидную ДНК с помощью набора по протоколу производителя (Lumiprobe, Russia). Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически. Секвенирование вставки проводили с праймеров M13f, M13r (Евроген, Россия).

Клоны с последовательностью вставки, идентичной мРНК гена PD-L1 (NM_021893.3), использовали для переклонирования в экспрессионный вектор pQE30 (Qiagen, Germany). Для переклонирования фрагмента гена, кодирующего внеклеточный участок PD-L1, в вектор pQE30, верифицированные клоны pTZ57R/T с вставками exPD-L1 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции KpnI и HindIII (Thermo Fisher Scientific, USA). Дальнейшие этапы клонирования проводили как описано ранее. Одиночные клоны рассевали на сектора и проверяли методом ПЦР с универсальными праймерами к вектору pQE30 (табл. 1). Из положительных по результатам ПЦР клонов выделяли плазмидную ДНК и трансформировали ее штамм *E. coli* M15 по протоколу.

Экспрессия, выделение и очистка белка exPD-L1. Культуру клеток *E. coli* (штамм M15), трансформированных плазмидой pQE30, несущей фрагмент, кодирующий exPD-L1, высевали в среду LB (ампициллин 100 мкг/мл, канамицин

50 мкг/мл, ОАО Биохимик, Россия), растили в течение ночи (14 ч) при 37°C. На следующий день ночную культуру (40 мл) переносили в 1 л свежей среды LB с селективными антибиотиками и растили при 37°C до значения $D_{600} = 0.6$ и затем индуцировали экспрессию путем добавления ИПТГ (1 мМ). Экспрессию белка проводили в течение 4 ч при 37°C. Клетки собирали центрифугированием при 18500 g в течение 3 мин (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Germany).

Очистку белка проводили в денатурирующих условиях. Осадок клеток ресуспендировали в лизис-буфере (100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-Cl, 8 М мочевина, pH 8.0), гомогенизировали на ультразвуковом гомогенизаторе Vibra-Cell VCX 130 (Sonics & Materials, Inc., USA) в течение 30 мин и центрифугировали 10 мин при 18500 g . Для дальнейшей работы использовали супернатант.

Аффинная хроматография белка exPD-L1. Полученный осветленный лизат наносили на колонку с Ni-NTA агарозой (Invitrogen, USA), промывали колонку лизис-буфером, затем промывочным буфером (100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-Cl, 8 М мочевина, pH 6.3) и элюировали с колонки имидазольным буфером (100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-Cl, 8 М мочевина, 250 мМ имидазол, pH 4.5).

Обращенно-фазовая хроматография белка exPD-L1. Обращенно-фазовую хроматографию проводили на колонке Nucleosil 7 C8 (Macherey Nagel SS 250/0.5"/10) с использованием системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии 8800 Series Gradient Liquid Chromatographic System (Du Pont Company, USA). Систему промывали буфером Б (80% ацетонитрил, 0.1% трифтормукусная кислота) и затем переводили на буфер А (5% ацетонитрил, 0.1% трифтормукусная кислота). С помощью инжектора на колонку наносили фракцию белка, полученную при проведении аффинной хроматографии (2 мл/закол). Белок, связавшийся с колонкой, элюировали буфером Б. Полученный раствор белка высушивали на вакуумной центрифуге Speed Vac Concentrator (Bachofer, Germany).

Рефолдинг белка exPD-L1. Лиофилизованный белок растворили в буфере №1 (25 мМ Mes-NaOH pH 6.0, 10 мМ NaEDTA, 1 М мочевина, 6 М гуанидин-HCl, 1 мМ DTT), а затем добавили 15× кратный объем буфера №2 (1 М аргинин-HCl, 100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 0.5 мМ PMSF-HCl, 2 мМ NaEDTA, 0.5 мМ окисленный глутатион). Полученный раствор инкубировали ночь на +4°C. Белок диализировали через мембрану Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO: 6–8.000 (Spectrum Laboratories, Inc., USA) против бикарбонатного буфера (100 мМ NaHCO₃, 0.02% азид натрия) при +4°C в течение ночи и концентрировали с

использованием Vivaspin 20 5.000 MWCO PES (Sartorius Biotech GmbH, Germany).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Образцы образцы разделяли гель-электрофорезом в 12% полиакриламидном геле (толщина 0.75 мм) по Лэммли. В качестве стандартов молекулярных весов использовали PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA).

Вестерн-блоттинг. Общий белок экстрагировали из клеток B16/F10 и SCOV-3 с использованием буфера для лизиса RIPA (Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd.). Концентрацию белка определяли с помощью прибора BioDrop (BioChrome, UK). Белки разделяли в 12% ПААГ, переносили на мембранны PVDF и использовали 5%-ное обезжиренное молоко для блокирования мембран при комнатной температуре в течение 1 ч. Мембранны инкубировали с первичными антителами мАт B12 (мышь) или BTШ70 (мышь, индуцируемая температурой форма) (Sigma) и SPA815 (крыса, конститутивная форма) (Enzo life sciences, Belgium) при температуре 4°C в течение ночи. После отмычки мембранны инкубировали со вторичными антителами против мыши или крысы, коньюгированные с пероксидазой хрина, при комнатной температуре в течение 1 ч. Белковые полосы визуализировали с помощью диаминонензидина (Sigma).

Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле. Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в агарозном геле (VWR International LLC, USA) с добавлением этидия бромида в трис-ацетатном буфере (pH 7.6, трис-ацетат 40 мМ, ЭДТА 1 мМ). Результаты электрофореза анализировали на УФ-трансиллюминаторе ECX-15 M (Vilber Lourmat, France) с максимумом на длине волны 312 нм. Для оценки молекулярного веса разделяемых на геле фрагментов ДНК использовали маркер молекулярного веса ДНК GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

Получение гибридом. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с протоколом IACUC ИБХ РАН. Самки мышей BALB/c (6–8 недель) были получены из питомника Столбовая (Московская область, Россия). Мышей содержали в пластиковых клетках по 10–12 особей на клетку в обычных условиях с минимальным содержанием патогенов. Протокол (№ 325 от 14 апреля 2021 г.) был одобрен Институтским комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Центра исследований животных ИБХ РАН.

Мышей линии BALB/c иммунизировали в подушечки задних лап препаратом рекомбинантного белка exPD-L1 (50 мкг) в смеси с полным адьювантом Фрейнда 1 : 1, через 2 недели повторяли иммунизацию в неполном

адьюванте. Третью иммунизацию проводили еще через 2 недели exPD-L1 в PBS. На пятый день после третьей иммунизации у мышей забирали подколенные лимфоузлы и выделяли из них лимфоциты. В качестве партнеров в гибридизацию использовали клетки мышиной миеломы SP2/0 из банка клеточных культур ИБХ РАН. Гибридизацию проводили в 45% растворе ПЭГ 4000 с 10% DMSO в течение 1 мин при соотношении лимфоцитов и клеток миеломы 3 : 1. После гибридизации клетки разносили по 96-луночным культуральным планшетам, в лунки которых за сутки до этого добавляли мышиные перитонеальные макрофаги. Клетки культивировали в селективной среде DMEM с НАТ и 20% эмбриональная телячья сывороткой (ЭТС). Через 7–10 дней из лунок с активным ростом клеток отбирали среду и тестировали на наличие антител к exPD-L1 методом непрямого ИФА. Из лунок, в которых регистрировали достоверно позитивную реакцию с PD-L1, отбирали клетки и клонировали методом предельных разведений. Изотипирование мАТ проводилось с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши (Thermo Fisher Scientific, USA) по инструкции производителя.

Наработка и очистка моноклональных антител к exPD-L1 из асцитной жидкости аффинной хроматографией на протеин А-сепарозе. Для получения асцитов клетки гибридом (1–2 млн клеток) прививали мышам BALB/c, которым предварительно за 10–12 дней до инокуляции клеток гибридомы вводили внутрибрюшинно по 0.3 мл пристана. После формирования асцитов мышей умерщвляли и собирали перитонеальную жидкость. Клетки удаляли центрифугированием, асцитную жидкость разбавляли в 2 раза стартовым буфером (PBS) и наносили на уравновешенную колонку протеин А-сепарозы. Элюцию мАт проводили 0.1 М раствором глицина pH 3.0. Раствор антител после элюции нейтрализовали 1 М трис-HCL pH 8.0 и дialisировали против буфера PBS.

Непрямой твердофазный ИФА. В лунки планшетов для ИФА сорбировали рекомбинантные белки exPD-L1, RPA788Mu01 или ДНК-полимеразу Phi29-6xHis (5 мкг/мл) в 0.1 М бикарбонатном буфере pH 9.0. В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора антигена в блокирующем буфере (PBS, 1% BSA) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После сорбции лунки планшета блокировали 1% раствором BSA в PBS в течение 1 ч при 37°C. Лунки планшета отмывали 4 раза PBS с 0.05% Tween-20 и вносили образцы антител в различных разведениях. Планшеты инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывали три раза и вносили коньюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрина (SantaCruze, USA), инкубировали 40 мин

при комнатной температуре, отмывали и вносили субстратную смесь для пероксидазы (ТМВ, 1 мг/мл, 50 мМ цитратный буфер pH 4.5, 0.02% перекиси водорода). После развития окраски реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10% серной кислоты. Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически, определяя оптическое поглощение при длине волны 490 нм на спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific, USA).

Мечение антител красителями Су3 и FAM. Выделенные антитела против exPD-L1 метили флуоресцентным красителем sulfo-Су3 или FAM. Для этого смешивали активированный NHS-эфир флуоресцентного красителя sСу3 или FAM (Lumiprobe, Russia) с раствором антител к PD-L1 B12 (100 мкл, 1,3 мг/мл) в соотношении 6 : 1 по молям, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Свободный краситель удаляли на гель-фильтрационной колонке CentriPure Mini PBS Z-50 Column (EMP, Germany).

Проточная цитометрия. Клетки EL-4 и B16/F10 снимали трипсином, промывали в полной питательной среде, переводили в буфер (PBS, 1% BSA, 0.05 % NaN₃) и инкубировали 1 ч с мАт B12-Су3 или B12-FAM. В контроле использовали коммерческие антитела клон 10F.9G2 против PD-L1 мыши, меченные фикоэритрином (PE) (Biolegend, USA). После инкубации клетки отмывали и анализировали методом проточной цитометрии с использованием прибора FACScan (BD, USA). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (USA).

Конфокальная микроскопия. Для анализа методом конфокальной микроскопии клетки B16/F10 инкубировали с мАт B12-Су3 или коммерческими антителами против PD-L1 мыши (BioLegend, USA) фиксировали 1% пароформальдегидом, промывали и наносили на предметные стекла в капле, ожидали 15 мин, затем полимеризовали средой Mowiol 4.88 (Calbiochem, Germany). Слайды анализировали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE2000 (Nikon, Japan).

Обработка данных. Праймеры конструировались с использованием программы Oligo Analyzer, а также интернет-ресурса Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. Для создания моделей векторов на основе плазмида pQE30 и выравнивания последовательностей использовалась программа Vector NTI (Invitrogen, USA). Анализ результатов секвенирования проводили в программе Chromas Lite. Анализ результатов проточной цитометрии проводился в программе FlowJo 10 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

Статистическая обработка данных и построение графиков проводились в программе Excel.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23-14-00277.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с протоколом IACUUC ИБХ РАН № 325 от 14 апреля 2021 г., одобренным Институтским комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Центра исследований животных ИБХ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равный вклад в написание этой статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zhang H., Dai Z., Wu W., Wang Z., Zhang N., Zhang L., Zeng W.J., Liu Z., Cheng Q.* // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2021. V. 40. P. 184. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01987-7>
2. *Murphy T.L., Murphy K.M.* // *Cell. Mol. Immunol.* 2022. V. 19. P. 3–13. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00741-5>
3. *De Felice F., Marchetti C., Tombolini V., Panici P.B.* // *Int. J. Clin. Oncol.* 2019. V. 24. P. 910–916. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01437-7>
4. *De Felice F., Marchetti C., Palaia I., Ostuni R., Muzii L., Tombolini V., Benedetti Panici P.* // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2018. V.129. P. 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.06.006>
5. *De Felice F., Pranno N., Marampon F., Musio D., Salducci M., Polimeni A., Tombolini V.* // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2019. V. 138. P. 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.03.019>
6. *Honda T., Egen J.G., Lämmermann T., Kastenmüller W., Torabi-Parizi P., Germain R.N.* // *Immunity*. 2014. V. 40. P. 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2013.11.017>
7. *Huang G., Wen Q., Zhao Y., Gao Q., Bai Y.* // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e61602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061602>
8. *Boussiottis V.A.* // *N. Engl. J. Med.* 2016. V. 375. P. 1767–1778. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514296>
9. *Jin Y., Wei J., Weng Y., Feng J., Xu Z., Wang P., Cui X., Chen X., Wang J., Peng M.* // *Front Oncol.* 2022. V. 12. P. 732814. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.732814>
10. *Dong H., Strome S.E., Salomao D.R., Tamura H., Hirano F., Flies D.B., Roche P.C., Lu J., Zhu G., Tamada K., Lennon V.A., Celis E., Chen L.* // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>
11. *Sun C., Mezzadra R., Schumacher T.N.* // *Immunity*. 2018. V. 48. P. 434–452. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2018.03.014>
12. *Horn L., Mansfield A.S., Szczęsna A., Havel L., Krzakowski M., Hochmair M.J., Huemer F., Losonczy G., Johnson M.L., Nishio M., Reck M., Mok T., Lam S., Shames D.S., Liu J., Ding B., Lopez-Chavez A., Kabbinavar F., Lin W., Sandler A., Liu S.V., IMpower133 Study Group.* // *N. Engl. J. Med.* 2018. V. 379. P. 2220–2229. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809064>
13. *D'Angelo S.P., Lebbé C., Mortier L., Brohl A.S., Fazio N., Grob J.J., Prinzi N., Hanna G.J., Hassel J.C., Kiecker F., Georges S., Ellers-Lenz B., Shah P., Güzel G., Nghiem P.* // *J. Immunother. Cancer*. 2021. V. 9. P. e002646. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002646>
14. *Ascierto P.A., Del Vecchio M., Mandalá M., Gogas H., Arance A.M., Dalle S., Cowey C.L., Schenker M., Grob J.J., Chiarion-Sileni V., Márquez-Rodas I., Butler M.O., Maio M., Middleton M.R., de la Cruz-Merino L., Arenberger P., Atkinson V., Hill A., Fecher L.A., Millward M., Khushalani N.I., Queirolo P., Lobo M., de Pril V., Loffredo J., Larkin J., Weber J.* // *Lancet Oncol.* 2020. V. 21. P. 465–1477. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30494-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30494-0)
15. *Brooker R.C., Schache A.G., Sacco J.J.* // *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2021. V. 59. P. 959–962. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.08.059>
16. *Li H.Y., McSharry M., Bullock B., Nguyen T.T., Kwak J., Poczobutt J.M., Sippel T.R., Heasley L.E., Weiser-Evans M.C., Clambey E.T., Nemenoff R.A.* // *Cancer Immunol. Res.* 2017. V. 5. P. 767–777. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0365>
17. *Denis M., Grasselly C., Choffour P.A., Wierinckx A., Mathé D., Chettab K., Tourette A., Talhi N., Bourguignon A., Birzele F., Kress E., Jordheim L.P., Klein C., Matera E.L., Dumontet C.* // *Cancer Immunol. Res.* 2022. V. 10. P. 1013–1027. <https://doi.org/10.1158/2326-6066>
18. *Lin H., Wei S., Hurt E.M., Green M.D., Zhao L., Vatan L., Szeliga W., Herbst R., Harms P.W., Fecher L.A., Vats P., Chinnaiyan A.M., Lao C.D., Lawrence T.S., Wicha M., Hamanishi J., Mandai M., Kryczek I., Zou W.* // *J. Clin. Invest.* 2018. V. 128. P. 805–815. <https://doi.org/10.1172/JCI96113>

19. Allen E., Jabouille A., Rivera L.B., Lodewijckx I., Missiaen R., Steri V., Feyen K., Tawney J., Hanahan D., Michael I.P., Bergers G. // *Sci. Transl. Med.* 2017. V. 9. P. eaak9679. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aak9679>
20. Juneja V.R., McGuire K.A., Manguso R.T., LaFleur M.W., Collins N., Haining W.N., Freeman G.J., Sharpe A.H. // *J. Exp. Med.* 2017. V. 214. P. 895–904. <https://doi.org/10.1084/jem.20160801>
21. Gao Y., Nihira N.T., Bu X., Chu C., Zhang J., Kolodziejczyk A., Fan Y., Chan N.T., Ma L., Liu J., Wang D., Dai X., Liu H., Ono M., Nakanishi A., Inuzuka H., North B.J., Huang Y.H., Sharma S., Geng Y., Xu W., Liu X.S., Li L., Miki Y., Sicinski P., Freeman G.J., Wei W. // *Nat. Cell Biol.* 2020. V. 22. P. 1064–1075. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0562-4>
22. Yu J., Zhuang A., Gu X., Hua Y., Yang L., Ge S., Ruan J., Chai P., Jia R., Fan X. // *Cell Discov.* 2023. V. 9. P. 33. <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00521-7>
23. Qu L., Jin J., Lou J., Qian C., Lin J., Xu A., Liu B., Zhang M., Tao H., Yu W. // *Cancer Immunol.* Immunother. 2022. V. 71. P. 2313–2323. <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03176-7>
24. Garcia-Diaz A., Shin D.S., Moreno B.H., Saco J., Escuin-Ordinas H., Rodriguez G.A., Zaretsky J.M., Sun L., Hugo W., Wang X., Parisi G., Saus C.P., Torrejon D.Y., Graeber T.G., Comin-Anduix B., Hu-Lieskov S., Damoiseaux R., Lo R.S., Ribas A. // *Cell Rep.* 2017. V. 19. P. 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>
25. Hsu J.M., Li C.W., Lai Y.J., Hung M.C. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. P. 6349–6353. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1892>
26. Li C.W., Lim S.O., Chung E.M., Kim Y.S., Park A.H., Yao J., Cha J.H., Xia W., Chan L.C., Kim T., Chang S.S., Lee H.H., Chou C.K., Liu Y.L., Yeh H.C., Perillo E.P., Dunn A.K., Kuo C.W., Khoo K.H., Hsu J.L., Wu Y., Hsu J.M., Yamaguchi H., Huang T.H., Sahin A.A., Hortobagyi G.N., Yoo S.S., Hung M.C. // *Cancer Cell.* 2018. V. 33. P. 187.e10–201.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.01.009>

Expression of Extracellular Fragment of Murine PD-L1 and Production of Antibodies to PD-L1

M. S. Goryunova*, D. Yu. Ryazantsev*, E. E. Petrova*, V. V. Kostenko*, **,
A. O. Makarova**, **, R. V. Kholodenko*, E. V. Ryabukhina*, D. V. Kalinovsky*,
O. D. Kotsareva*, and E. V. Svirshchevskaya*, #

E-mail: esvir@mail.ibch.ru

* *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

** *Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia*

A number of molecules expressed on mammalian cells are involved in the formation of autotolerance. These primarily include CTLA-4/B7 and PD1-PD-L1 signaling pathways. Blockers of these signaling pathways, called checkpoint inhibitors (CPIs) of immunity, are used in the clinic for the treatment of various forms of cancer. Antibodies to CTLA-4 cause systemic toxicity and are approved only for some tumors. Antibodies against PD1 or PD-L1 have been successfully used for the treatment of various forms of cancer and are characterized by low toxicity. However, the response to therapy using CPIs is not always observed. The development of more effective approaches to cancer therapy based on PD1/PD-L1 inhibitors requires additional research. The aim of this work was to express the extracellular part of the murine PD-L1 protein (exPD-L1) and obtain antibodies to PD-L1. The mouse exPD-L1 protein was obtained and characterized in the bacterial expression system. exPD-L1 protein was used to immunize mice in order to produce anti-PD-L1 antibodies. Using hybridomic technology, 5 clones expressing antibodies to exPD-L1 were obtained. Antibodies of the B12 clone were developed in the ascitic fluid of BALB/c mice and purified by affinity chromatography. The ELISA method for purified antibodies showed specific binding to the exPD-L1 protein and the commercial protein of the extracellular part of murine PD-L1. Experiments using flow cytometry and confocal microscopy have shown that the antibodies obtained bind the intracellular form of the PD-L1 protein, unlike commercial antibodies binding the membrane form.

Keywords: CTLA-4/B7 and PD1/PD-L1 signaling pathways, checkpoint inhibitors, monoclonal antibodies, mouse models