

ISSN 0132-3423

Том 49, Номер 2

Март - Апрель 2023



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 49, номер 2, 2023

Статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в журнале "Russian Journal of Bioorganic Chemistry" ISSN 1068-1620, ©Pleiades Publishing, Ltd.

Как меняются общепринятые подходы к применению полимерсодержащих композитов в молекулярной диагностике (обзорная статья)

Д. В. Капустин 113

Платформа мРНК-вакцин: особенности получения и доставки мРНК (обзорная статья)

В. Р. Литвинова, А. П. Рудомётов, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв 134

Синтез и биологическая активность эфиров на основе циклоалкендикарбоновых кислот

А. А. Фирстова, Е. Р. Кофанов, М. И. Ковалева 153

Синтез и трансфицирующая активность дисульфидных поликатионных амфифилов

И. А. Петухов, П. А. Пучков, Н. Г. Морозова, М. А. Зенкова, М. А. Маслов 165

Гибридные органоминеральные носители для терапевтических белков

*П. В. Зеленихин, А. Г. Галеева, Р. Р. Исламова, О. Н. Лопатин,
Р. С. Яруллин, О. Н. Ильинская* 178

Дизайн, синтез и изучение анксиолитической активности новых пирроло[1,2-*a*]пиазин-содержащих лигандов TSPO

*Г. В. Мокров, А. С. Пантеев, М. А. Яркова, И. В. Рыбина, Т. А. Гудашева,
Ю. В. Вахитова, С. Б. Середенин* 188

Влияние гуанидиновых производных хиназолина на Na^+/H^+ -обменник и внутриглазное давление у крыс

*А. С. Таран, Л. В. Науменко, Ю. А. Говорова, Н. А. Гурова, А. А. Спасов,
А. А. Озеров, Д. В. Мережкина* 207

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Способ получения ионизируемого липида ALC-0315 — ключевого компонента липидной матрицы мРНК-вакцины

И. А. Болдырев, В. П. Шендриков, А. Г. Вострова, Е. Л. Водовозова 216



УДК 543.054:543.544:577.213.3:66.021.2.081.3:66.095.2

КАК МЕНЯЮТСЯ ОБЩЕПРИНЯТЫЕ ПОДХОДЫ К ПРИМЕНЕНИЮ ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

© 2023 г. Д. В. Капустин[#]

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

Поступила в редакцию 28.07.2022 г.

После доработки 10.08.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Известные подходы к выделению биополимеров, в частности нуклеиновых кислот (НК), из биологических проб основаны на связывании молекул с сорбентом (“позитивная селекция”) с их последующей элюцией с использованием подходящего элюента. В обзорной статье обсуждаются физико-химические процессы, положенные в основу разработки способов выделения НК из биологических образцов. Показано, что методы, включающие твердофазную селективную экстракцию (т.е. обратимую сорбцию), обеспечивают возможность миниатюризации и автоматизации соответствующих процессов. В обзоре обсуждаются преимущества альтернативного подхода к выделению НК, основанного на использовании специальных сорбентов, связывающих белки и другие компоненты биологических проб, в то время как эти сорбенты проявляют сорбционную инертность по отношению к НК (“негативная селекция”). Рассмотрены подходы к созданию таких композитных полимерсодержащих сорбентов, используемых в пробоподготовке при проведении молекулярной диагностики, и способы их эффективного применения. Продемонстрировано, что благодаря междисциплинарному подходу с использованием комплекса синтетических и аналитических методов удается объединить в качестве единого объекта исследования такие весьма разные по структуре и свойствам материалы, как наноструктурированные композиты (на основе пористых кремнеземов, синтетических мембран, стеклянных мультикапилляров), содержащие фторполимеры и полианилины. Обсуждаются результаты использования таких композитов при селективном выделении НК и/или белков из биологических образцов. Рассмотрены альтернативные области применения таких композитов в молекулярной диагностике, в частности в масс-спектрометрии. Обрисованы направления расширения области применения полимерсодержащих композитов благодаря одновременному использованию сорбционных качеств поверхности получаемых композитов и свойств молекул сорбата. Показано, что для технологичного получения таких композитов пригодны как полимерные, так и низкомолекулярные модификаторы одинаковой химической природы.

Ключевые слова: фторполимеры, полианилины, композиционные сорбенты, выделение биополимеров, молекулярная диагностика, ПЦР

DOI: 10.31857/S0132342323020112, **EDN:** PDBAWW

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	114
СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ФТОРПОЛИМЕР- И ПОЛИАНИЛИНСОДЕРЖАЩИХ КОМ-	

Сокращения: AAl — аллиловый спирт; AAm — аллиламин; 3-ABA — 3-аминобензойная кислота; EB — эмеральдиновое основание; FP — фторопласт; HFP — гексафторпропилен; HBV — вирус гепатита В; PANI — полианилин; LEB — лейко-эмеральдиновое основание; PSA — полисульфокислота; *изо*-PSA — поли(*n,n'*-(2,2'-дисульфокислоты)дифениленизофталамид; PTFE — политетрафторэтилен; TANi — тетраанилин; днДНК — двухнитевая ДНК; НК — нуклеиновые кислоты; онДНК — однонитевая ДНК; СКИ — спектрально-корреляционная интерферометрия.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-06-00; эл. почта: kapustin@ibch.ru).

ПОЗИЦИОННЫХ СОРБЕНТОВ В ОТНОШЕНИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ.....	114
ТЕХНОЛОГИЧНЫЕ СПОСОБЫ СИНТЕЗА ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ.....	122
ПРИМЕНЕНИЕ FP- И PANI-СОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ В СОСТАВЕ БИОСЕПАРИРУЮЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ.....	126
<i>Применение в пробоподготовке при проведении молекулярной диагностики.....</i>	126
<i>Другие области применения FP- и PANI- содержащих композитов.....</i>	127

ПРОЯВЛЯЮТ ЛИ ПОЛИМЕРНЫЕ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ ОДИНАКОВОЙ ПРИРОДЫ СХОДНЫЕ СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА?.....	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131

ВВЕДЕНИЕ

Большинство известных способов выделения биополимеров, в частности нуклеиновых кислот (НК), из биологических проб основано на связывании молекул с поверхностью специального сорбента (“позитивная селекция”) с их последующей элюцией с использованием подходящего элюента. В силу многостадийности соответствующих протоколов не всегда обеспечивается требуемая чистота выделяемого компонента биологической смеси, а сам процесс нередко сопровождается потерями выделяемого биополимера на каждой стадии. Тем не менее методы, основанные на твердофазной селективной экстракции (т.е. на обратимой сорбции), продолжают развиваться и совершенствоваться, поскольку обеспечивают возможность миниатюризации и автоматизации протоколов выделения.

Альтернативный подход к выделению НК, основанный на использовании специальных композитных полимерсодержащих сорбентов, связывающих белки и другие компоненты биологических проб, в то время как эти композиты проявляют сорбционную инертность по отношению к НК (“негативная селекция”), демонстрирует определенные преимущества. Прежде всего, удастся выделять НК из пробы в одну стадию, за счет чего значительно сокращается продолжительность пробоподготовки. Подобранные оптимальные условия выделения обеспечивают минимизацию потерь и получение высокочистых препаратов биополимеров, непосредственно пригодных к использованию без дополнительной очистки и концентрирования.

Предлагаемая вниманию читателей обзорная статья преследует несколько взаимосвязанных целей. Прежде всего, представляется важным продемонстрировать, что благодаря междисциплинарному подходу с применением комплекса современных синтетических и аналитических методов удастся объединить в качестве объекта исследования такие разные по структуре и свойствам материалы, как фторсодержащие полимеры и полианилины. В частности, речь пойдет об использовании указанных полимеров в качестве модификаторов поверхности твердых носителей

при получении сорбентов, позволяющих селективно выделять НК и/или белки из биологических образцов. Во-вторых, следует показать, что благодаря использованию междисциплинарного подхода удастся расширить области применения получаемых композитов за счет одновременного использования выявляемых свойств носителей, их модификаторов и молекул сорбата. И наконец, не менее интересно рассмотреть результаты недавних работ, подтверждающих, что для технологичного получения таких сорбентов пригодны как полимерные, так и низкомолекулярные модификаторы одинаковой природы.

СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ФТОРПОЛИМЕР- И ПОИАНИЛИНСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИЦИОННЫХ СОРБЕНТОВ В ОТНОШЕНИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ

Методы выделения и очистки НК и белков весьма разнообразны, поскольку реализуются с применением различных сорбентов, водных, органических и смешанных сред, хаотропных агентов, ферментов, поверхностно-активных веществ и т.д. Некоторые методы отличаются простотой и выполняются вручную, реализация других требует применения сложного оборудования. Такие методы основаны на известных физико-химических процессах, включающих экстракцию выделяемого компонента [1–3] или его осаждение (физическое осаждение или хемосорбцию) [1, 4, 5]. Отдельную группу представляют способы выделения биополимеров из смеси водных полимерных растворов, т.е. в двухфазной системе [6]. При разделении смесей белков и/или НК также нередко используют хроматографические методы, основанные на различиях в скоростях перемещения молекул в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз [7, 8]. Эти методы реализуются благодаря различной растворимости НК, белков и полисахаридов, а также их различному родству с поверхностью используемого сорбента.

Как правило, методы выделения НК с использованием сорбентов многостадийны и, как следствие, трудоемки и времязатратны. Дело в том, что эти методы основаны на концепции “улавливания” и удерживания выделяемой НК сорбентом из смеси на первом этапе выделения. Вслед за этим необходимо удалить примеси, а затем элюировать выделяемый компонент с поверхности или из объема частиц сорбента. Таким образом, подобные системы выделения основаны на реа-

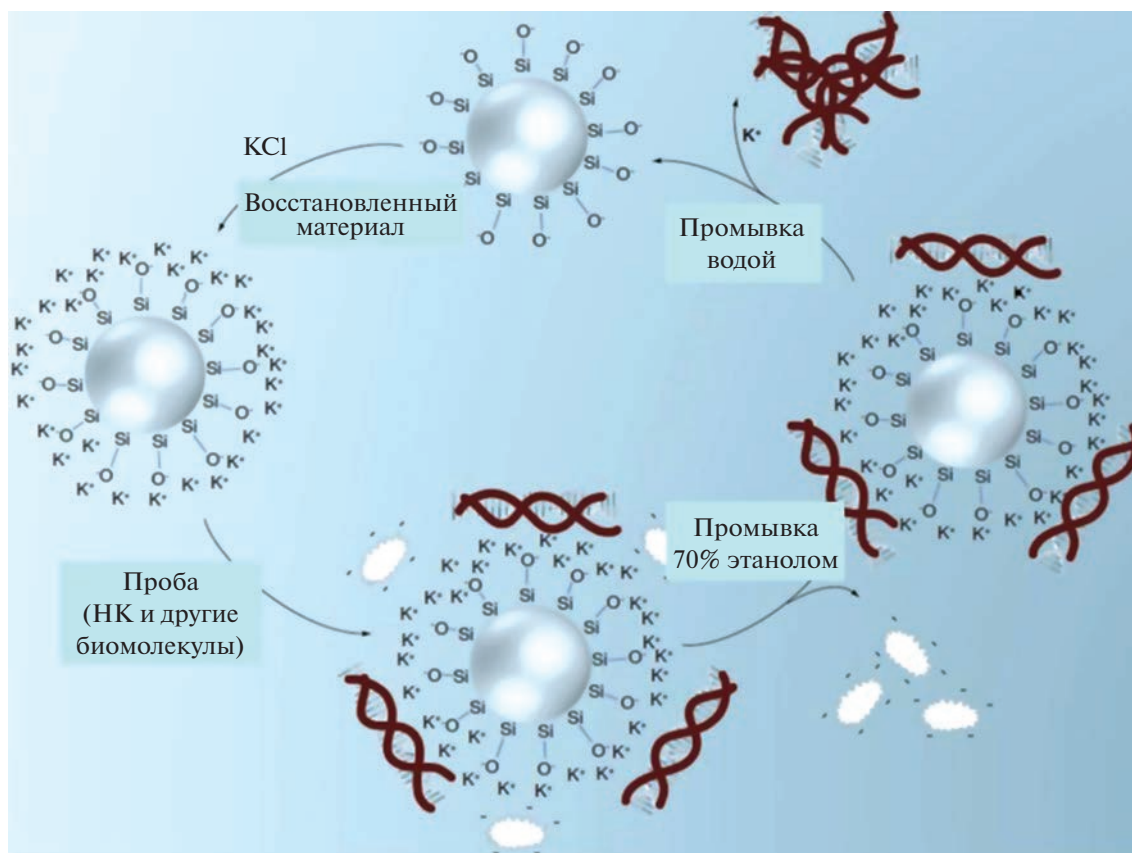


Рис. 1. Механизм выделения ДНК на немодифицированных кремнеземах [9].

лизации эффекта “*позитивной селекции*” в отношении выделяемой НК, что определяет многостадийность процесса выделения и неизбежные потери выделяемой НК на каждой стадии. При выделении НК из биологических образцов чаще всего используют твердые носители, селективно и обратимо удерживающие НК, такие как нативные или химически модифицированные кремнеземы, стекла, полимерные монолиты, а также композитные мембраны.

Принцип “*позитивной селекции*”, положенный в основу классического способа выделения НК из биологических образцов, базируется на специфическом взаимодействии молекул НК с поверхностью частиц кремнезема в присутствии хаотропной соли при щелочных значениях pH [1, 9]. В этих условиях происходит денатурация большинства биомолекул за исключением молекул ДНК, которые устойчивы к денатурации и эффективно связываются с положительно заряженной поверхностью кремнезема. Образовавшийся комплекс “ДНК–кремнезем” отмывают от несвязавшихся примесей, а очищенную ДНК элюируют с сорбента буферным раствором с низким содержанием солей или водой [10] (рис. 1). Такой

многостадийный механизм выделения НК обеспечивает всего 40–50%-ный выход ДНК [11].

Не вдаваясь в детали проблем, связанных с получением и применением перечисленных носителей и сорбентов, следует отметить, что существует необходимость в разработке альтернативных технологий, позволяющих получать композитные материалы, демонстрирующие эффект “*негативной селекции*” в отношении НК. Использование таких материалов должно обеспечивать реализацию принципиально более простой одностадийной схемы выделения целевого компонента смеси (НК), в результате чего выделяемый (и одновременно очищаемый) биополимер после контакта биологического образца с сорбентом, не удерживаясь, выходит в исключенном объеме (“*негативная селекция*”), а прочие компоненты (примеси) удерживаются сорбентом (“*позитивная селекция*”). Понятия “*негативная селекция*” и “*позитивная селекция*” в данном контексте впервые были введены в работе Yagudaeva et al. [12].

Принципиальное различие в принципах выделения НК на основе “*позитивной*” и “*негативной селекции*” наглядно выявляется уже при сравне-

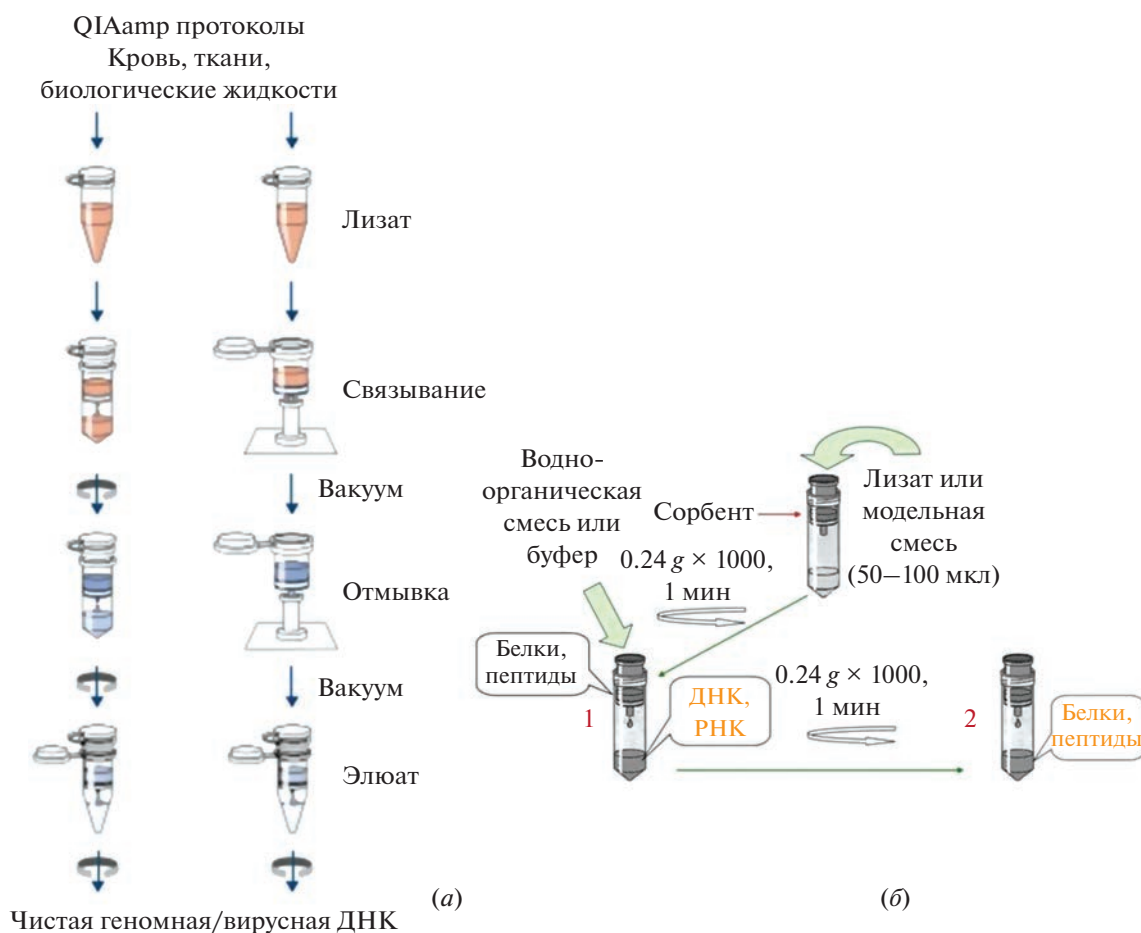


Рис. 2. Схемы многостадийного выделения НК с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) [13] на основе принципа “позитивной селекции” (а) и одностадийного выделения НК на основе принципа “негативной селекции” [14] (б).

нии соответствующих схем, представленных в литературе [13, 14] (рис. 2).

В известных работах проблемы получения композитов для выделения НК решены с использованием междисциплинарного подхода с комплексным применением химико-технологических, физико-химических и молекулярно-биологических методов. Разработан ряд технологий, обеспечивающих формирование нанотолщинных покрытий фтор- и анилинсодержащих полимеров на поверхности твердых носителей различной природы. Также разработаны специальные биосепарирующие элементы, включающие полученные сорбенты, и соответствующие протоколы пробоподготовки, обеспечивающие достижение заданных параметров выделения НК из биологических источников. Наиболее интересные свойства таких материалов и особенности методик, в которых они используются, рассмотрены ниже.

Еще в 1978–1980 гг. Hjerten показал, что перфторполимеры обладают уникальной способностью обратимо сорбировать белковые молекулы, но при этом не удерживать (или слабо удерживать) НК [15, 16]. Позже был разработан ряд кремнеземных сорбентов, модифицированных нанопокрывтиями политетрафторэтилена (PTFE), демонстрирующих обнаруженный эффект, и применяемых, например, в качестве эффективных гемосорбентов [17, 18]. Эти материалы получали методом радиационной постполимеризации тетрафторэтилена в присутствии частиц объемно-пористого кремнезема [19]. Повсеместное применение таких материалов ограничено сложностью технологии их получения (ввиду необходимости использования источника γ -излучения, вакуумной и криогенной техники, а также поддержания строго определенных условий синтеза).

Также было известно, что в результате полимеризации анилина в присутствии твердых подложек на их поверхности формируются устойчивые

полианилиновые (PANI) покрытия, селективные в отношении сорбции различных заряженных ионов и молекул. Однако первые работы по применению PANI-модифицированных материалов для разделения компонентов смесей биополимеров стали появляться только с начала 2000-х гг. [20].

Эффект “*негативной селекции*” в отношении НК неоднократно проиллюстрирован результатами использования ВЭЖХ-колонок с PTFE- и PANI-содержащими кремнеземными сорбентами при разделении смеси плазмиды pBR322 из *Escherichia coli*, РНК и сопутствующих белков [21, 22]. Молекулы ДНК с PTFE-колонок выходили в первой фракции в исключенном объеме, молекулы РНК слабо удерживались, но также элюировались в составе второй фракции в изократическом режиме. Аналогичный результат достигался при использовании PANI-модифицированного кремнезема. Различия в сорбционном поведении PTFE- и PANI-содержащих сорбентов были выявлены при десорбции удерживаемых сорбентами белков. Удерживаемые молекулы белков полностью десорбировались с PTFE-колонок в обращенно-фазовом режиме по мере увеличения концентрации органического растворителя. Скорость элюирования белков зависела от их гидрофобности. Напротив, удерживаемые PANI-покрытием молекулы белков выходили с колонок в условиях понижающегося градиента pH в зависимости от значения их изоэлектрической точки (pI), но не от молекулярной массы или гидрофобности.

Недавно Капустин и Зубов с соавт. [12, 23, 24] провели сравнительное исследование сорбционных свойств ряда полиамидов и PANI (нанесенных на поверхность объемно-пористых кремнезёмов или стеклянных пластин) в отношении НК и белков, полагая, что эффект “*негативной селекции*” в отношении НК может проявляться при использовании не только перфторированных, но также частично фторированных и не содержащих фтор полимеров, например, PANI, а возможно, и других синтетических полимеров.

Поскольку на сорбционные свойства сорбента могут влиять как химическая структура макромолекул поверхностного слоя, так и особенности его поверхностной морфологии, эти факторы оценивали по отдельности. Статическую сорбцию биополимеров (НК и белков) изучали с использованием компактных спин-картриджей, содержащих исследуемые модельные сорбенты, что обеспечивало низкий расход сорбента (60–150 мг на картридж) и быструю (3–5 мин) биосепарацию (в отличие от методов традиционной колоночной хроматографии), осуществляемую при центрифугировании картриджей ($0.24\text{ g} \times 1000$, 1 мин). Изу-

чая механизмы сорбции биополимеров на полученных материалах и отвечая на вопрос, присущи ли сорбционные свойства перфторполимеров другим классам полимеров, исследовали свойства кремнезёмов, модифицированных полиарамидами, содержащими набор таких “ключевых” элементов, как ароматический азот, фтор, а также донорные и акцепторные фрагменты. При исследовании динамической сорбции биополимеров в режиме реального времени аналогичные полимерные покрытия наносили методом spin-coating на плоские стеклянные подложки. Свойства полученных покрытий сравнивали со свойствами PTFE-, фторопласт- (FP-) и PANI-содержащих сорбентов. Полиарамида наносили на поверхность стеклянных пластин из их растворов в тетрагидрофуране, фторопласт-42Л (FP) — из его раствора в ацетоне. PANI-покрытия получали методом окислительной осадительной полимеризации анилина на поверхности стеклянных пластин.

Морфологию поверхности покрытий, нанесенных на стеклянные пластины, исследовали методом сканирующей зондовой микроскопии. Оказалось, что покрытия неравномерны по толщине, а некоторые имеют сквозные или несквозные поры. По сравнению с полиамидными покрытиями, FP- и PANI-покрытия имели относительно ровную поверхность без сквозных пор. Поверхность покрытий, получаемых химическими методами, оказалась значительно более гладкой по сравнению с покрытиями, полученными методом “кастинга”.

Для подтверждения соответствия реальной химической структуры поверхностных слоев получаемых полимерных нанопокровов их ожидаемому химическому составу покрытия исследовали методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. Установлено, что для всех образцов теоретически рассчитанные и экспериментально определенные атомные доли C, N, S и F совпадают, различаясь в пределах ошибки метода. Эти данные подтвердили, что химические структуры поверхностных слоев соответствуют брутто-формулам использованных модификаторов, а полученные полимерные покрытия пригодны для сравнительного исследования сорбционных свойств в зависимости от химической структуры полимерного модификатора.

В результате определения ξ -потенциалов поверхности частиц полученных сорбентов оказалось, что все исследованные полиамидсодержащие материалы имели слабый положительный заряд (1.5–5 мВ), несколько более сильный у FP-материала (10 мВ) и у PANI-содержащих сорбентов

(30 ± 2 мВ), что предполагало наличие у последних слабо выраженных ионообменных свойств.

Очевидно, что сорбция растворенного вещества на поверхности может происходить в статических или динамических условиях. В результате статической сорбции растворенные в неподвижной жидкой фазе молекулы удерживаются неподвижным слоем частиц сорбента. Статическая сорбционная активность сорбента характеризуется количеством удерживаемого вещества на единицу массы сорбента к моменту достижения равновесия при постоянной температуре. При динамической сорбции молекулы удерживаются при пропускании жидкой фазы (раствора биополимера) над исследуемой полимерной поверхностью. Динамическую сорбционную активность покрытия в первом приближении характеризуют временем насыщения формируемого адсорбционного слоя, скорость формирования и толщина которого зависят от свойств поверхности и от природы сорбата.

В цитируемых работах [12, 23, 24] статическую сорбцию биополимеров на полимерсодержащих кремнеземах исследовали, нанося на картридж с модельным сорбентом аликвоту раствора биополимера или бактериального лизата (использовали клетки *E. coli* и *Agrobacterium tumefaciens* C58). Характеристики исследуемых биополимеров представлены в табл. 1. Отобранные элюаты анализи-

ровали спектрофотометрически, электрофоретически и методом ПЦР. Эффект “негативной селекции” в отношении двухнитевой ДНК (днДНК) отмечен для всех материалов, хотя между ними наблюдали определенные различия. Так, в группе полиамидсодержащих сорбентов выход днДНК в элюатах различался между отдельными образцами (до 15%), а максимальное значение (75% от количества в исходном растворе) отмечено для материалов, одновременно включающих трифторметильные и электроноакцепторные группы.

Высокий выход днДНК (80%) наблюдали при использовании FP-PANI-сорбента. Увеличить выход днДНК до 99.9% удавалось, нанося НК-содержащий раствор на предварительно смоченный водой слой сорбента. Напротив, выход днДНК с FP-материала оказался на 6–18% ниже, чем со всех остальных образцов. Таким образом, выход днДНК достаточно высок при использовании некоторых полиамидов, но ниже, чем при использовании PANI-содержащих сорбентов, что, тем не менее, подтверждает наличие эффекта “негативной селекции” в отношении днДНК. РНК, имеющая в своей структуре как двухнитевые, так и однонитевые последовательности, удерживалась всеми исследованными сорбентами значительно сильнее, чем днДНК (70–93% — полиамидсодержащими материалами, >95% — PANI- и FP-PANI-сорбентами, 98% — PTFE-содержащим материалом). Важно, что при использовании PANI- и FP-PANI-сорбентов удавалось элюировать до 90% удержанной РНК водой или нейтральным буферным раствором.

В работах [12, 23, 24] также показано, что выход удерживаемой ДНК зависит как от химической структуры полимерного модификатора, так и от третичной структуры сорбата, но не от его молекулярной массы (пропорциональной длине цепи макромолекулы, а следовательно, числу возможных точечных контактов с поверхностью сорбента), что служит доказательством отсутствия значимого сорбционного взаимодействия ДНК-молекул с исследуемыми полимерными поверхностями. Наиболее высокую степень очистки ДНК от РНК обеспечивали перфторполимер- и PANI-модифицированные сорбенты (содержание ДНК в элюате более чем в 15 раз превышало содержание РНК, а в случае PTFE-материала — более чем в 30 раз).

Все исследованные сорбенты удерживали белки (65–85% от нанесенного количества). Было установлено, что сорбционная емкость полиамидсодержащих материалов (за исключением материала, содержащего трифторметильные группы) слабо зависит как от молекулярной массы,

Таблица 1. Некоторые характеристики использованных биополимеров

Биополимер	Молекулярная масса, кДа	pI
BSA	~66.5	4.8
Пепсин	~34.6	2.2
Лизоцим	~14.4	11.3
Цитохром С	~12	10.6
тРНК из пекарских дрожжей, тип X	~25	—
ДНК-линейка: смесь фрагментов 75–20000 п.н.	52–13800*	—
днДНК из <i>E. coli</i>	~2760 (4000 п.н.)*	—
днДНК из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	~13800 (20000 п.н.)*	—

* Среднюю молекулярную массу нуклеотида принимали равной 345.

так и от pI белка, однако при использовании PANI-содержащих материалов сорбционная емкость заметно росла с увеличением основности (pI) белка. Наиболее близкие сорбционные свойства по отношению к биополимерам проявляли полиарамиды с электроноакцепторными (сульфонильными) группами и PANI-содержащие материалы. Таким образом, введение в структуру полимерного модификатора функциональных групп, незначительно, на первый взгляд, изменяющих суммарный химический состав, оказывает заметное влияние на сорбционные свойства получаемых полимерных покрытий.

Степень очистки ДНК, выделенной из бактериальных лизатов с помощью PANI-содержащих сорбентов, обеспечивала возможность ее непосредственного использования в ПЦР.

Динамическую сорбцию НК и белков на исследуемых покрытиях в реальном времени изучали методом спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ) [25, 26]. Над поверхностью тонкой стеклянной пластины с нанесенным покрытием исследуемого полимера пропускали растворы биополимеров, измеряя интерференцию между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пластины, и лучом, отраженным от поверхности раздела “адсорбционный слой — вода”. Изменение толщины адсорбированного слоя фиксировали в пикометровом диапазоне.

Исследовали сорбцию днДНК и белков, различающихся значениями pI (BSA, лизоцима и пепсина) в натрий-фосфатном буфере, pH 7.2. Растворы (или смеси) пропускали до “насыщения” сигнала, затем систему промывали чистым буферным раствором. При пропускании раствора ДНК над поверхностью PANI-модифицированной пластины адсорбционный слой не образовывался, что совпадало с результатами исследований удерживания ДНК в режиме статической сорбции. Поскольку сорбционная емкость PANI-покрытия зависит от pH среды, авторы ожидали, что в нейтральных средах белки с более высокими значениями pI будут сильнее удерживаться на PANI-поверхности, что и подтвердилось экспериментально. Макромолекулы пепсина (pI 2.2) в среде с pH 7.2 не образовывали адсорбционного слоя. В случае BSA и лизоцима на PANI-поверхности формировался устойчивый адсорбционный слой, сохранявшийся после прекращения подачи раствора белка и разрушавшийся только в результате заметного понижения pH среды. Устойчивый слой молекул белка, который удерживался на поверхности полимера при промывке буферным раствором с нейтральным pH, формировался только на PANI-покрытии. Сравнение

данных по статической и динамической сорбции белков показало, что кислый белок пепсин удерживается объемно-пористыми сорбентами, в то время как при использовании метода СКИ адсорбционный слой пепсина на всех тестируемых поверхностях не образуется. Авторы предположили, что пепсин удерживается в порах, наличие которых подтверждено для всех исследованных образцов, что в целом усиливает способность разработанных композитов удерживать суммарную белковую фракцию при очистке ДНК от белков.

Полученные в работах [12, 23, 24] данные для наглядности сведены в табл. 2. Проанализировав эти данные, авторы заключили, что сорбционные свойства исследованных материалов определяются суммарным вкладом различных механизмов сорбции, происходящей в результате гидрофобных, диполь-дипольных взаимодействий и обратимого образования водородных связей. Тот факт, что все материалы практически не удерживают отрицательно заряженную гидрофильную днДНК и одновременно более эффективно сорбируют РНК, содержащую гидрофобные участки, указывает на роль гидрофобных взаимодействий между поверхностью сорбента и молекулами сорбата. Присутствие в структуре полиамидов и PANI полярных групп и слабый положительный заряд поверхности соответствующих полимерных покрытий указывают на то, что соответствующие материалы должны обладать анионообменными свойствами. Вместе с тем эти сорбенты (как и фторполимерсодержащие материалы) крайне слабо удерживают молекулы днДНК. По-видимому, ионообменные свойства этих сорбентов выражены слабо не только за счет стерических затруднений, но также за счет делокализации положительных зарядов по макромолекуле или даже между несколькими макромолекулами в составе покрытия [27] и препятствует образованию устойчивой ионной связи, требующей локализации и достаточного сближения противоположных зарядов на соответствующих атомах сорбента и сорбата. Поэтому молекулы днДНК, дополнительно стабилизированные многочисленными водородными связями внутри двухнитевой структуры, на таких поверхностях не удерживаются, а макромолекулы белков, имеющие локализованные заряды на экспонированных в водной среде боковых группах, удерживаются в различной степени в зависимости от значения их pI .

Наиболее вероятный вклад в сорбционные свойства фторполимерсодержащих сорбентов обусловлен преимущественно гидрофобными взаимодействиями. Белковая фракция сорбируется из водной среды на неполярной поверхности

Таблица 2. Характеристики покрытий и сорбционные свойства исследованных сорбентов

Модификатор	РА1	РА7	РА8	РА11	PTFE	FP	PANI	FP-PANI
Характеристики полимерного покрытия								
ξ- Потенциал, мВ	2.1 ± 0.6	2.3 ± 0.5	1.6 ± 0.3	5.3 ± 0.9	H/o	10.2 ± 0.6	32.0 ± 5.0	30.4 ± 1.0
Максимальная толщина покрытия, нм	1321.4	316.8	341.2	55.2	H/o	405.3	319.4	1016.7
Наличие сквозных пор в покрытии*	+/-	+/-	+	-	H/o	-	-	-
Удерживание биополимеров								
Выход ДНК, %	74.0 ± 0.5	75.0 ± 0.5	60.0 ± 0.5	63.0 ± 0.5	67.0 ± 0.5	65.0 ± 0.4	71.0 ± 0.5	80.0 ± 0.8
Выход РНК, %	30.0 ± 0.3	30.0 ± 0.3	7.0 ± 0.2	15.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	7.0 ± 0.2	4.0 ± 0.1	5.0 ± 0.15
Емкость по белку, мг/г сорбента								
BSA	8.0 ± 0.2	8.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	8.0 ± 0.2	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.16
Пепсин	7.0 ± 0.1	6.5 ± 0.1	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.13
Цитохром С	8.0 ± 0.2	8.5 ± 0.1	7.5 ± 0.2	7.5 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.2	9.0 ± 0.2	9.0 ± 0.21
Лизоцим	8.0 ± 0.2	8.4 ± 0.1	7.3 ± 0.2	7.5 ± 0.1	8.0 ± 0.2	8.0 ± 0.1	8.5 ± 0.2	9.0 ± 0.20
Отношение выходов ДНК/РНК	2.5	2.5	8.6	4.2	33.5	9.3	17.8	16.0
A_{260}/A_{280}	1.5	1.7	1.2	1.2	1.5	1.1	1.4	1.9
(смесь ДНК + BSA)**								
Характеристики динамической сорбции биополимеров								
Продолжительность насыщения адсорбционного слоя, мин								
BSA	2.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	H/o	H/o	0.8 ± 0.1	H/o
Лизоцим	7.0 ± 0.3	2.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	H/o	H/o	0.8 ± 0.1	H/o
Пепсин	-	-	-	-	H/o	H/o	-	H/o
днДНК	-	-	-	-	H/o	H/o	-	H/o
Толщина адсорбционного слоя, нм								
BSA	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.2	H/o	H/o	1.7 ± 0.2	H/o
Лизоцим	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	2.5 ± 0.2	H/o	H/o	2.1 ± 0.2	H/o
Пепсин	-	-	-	-	H/o	H/o	-	H/o
днДНК	-	-	-	-	H/o	H/o	-	H/o

Примечание: данные представлены как средние значения ± SD, n = 3. H/o – не определяли.

* Знаком “+” отмечены сквозные поры, знаком “+/-” – несквозные поры.

** A_{260}/A_{280} для смеси (ДНК + BSA) составляет 0.9.

фторполимера, характеризующейся низкой поверхностной энергией, в то время как отрицательно заряженные в широком диапазоне pH молекулы днДНК не удерживаются. РНК удерживается слабо и затем может быть элюирована в изократическом режиме.

Существенный вклад в механизм обратимой сорбции белков на PANI-поверхности, по-видимому, также вносит способность молекулы PANI к образованию водородных связей между атомом водорода вторичной аминогруппы и акцепторами водородной связи в молекуле белка.

Таким образом, одновременное проявление эффектов “негативной селекции” в отношении НК и “позитивной селекции” в отношении белков свойственно широкому кругу полимеров, имеющих в своей структуре атомы фтора и/или азота. Полиарамида оказались удачной моделью для изучения сорбционных свойств фторсодержащих полимеров и PANI, но их применение в качестве эффективных сорбентов для выделения НК неце-

лесообразно. По сравнению с ними FP- и PANI-сорбенты обеспечивают максимальный выход днДНК за счет “негативной селекции”, эффективнее связывают РНК и белки, что делает такие композиты перспективными материалами для одностадийного выделения очищенных препаратов НК из биологических смесей.

В отличие от сорбционных материалов, в определенных условиях удерживающих НК (таких как, например, полиэтиленмин или кремнеземы) и не связывающих белки (например, кремнеземы, полипропилен или полиакриламид), композиты, модифицированные FPs, PANI и некоторыми полиарамидами, ведут себя противоположным образом (рис. 3). Подбирая соответствующий полимерный модификатор, можно решать конкретные задачи по селективному выделению биополимеров из сложных смесей, используя “нулевую” сорбционную способность к удерживанию ДНК и способность к обратимой сорбции белков в зависимости от значения их pI.

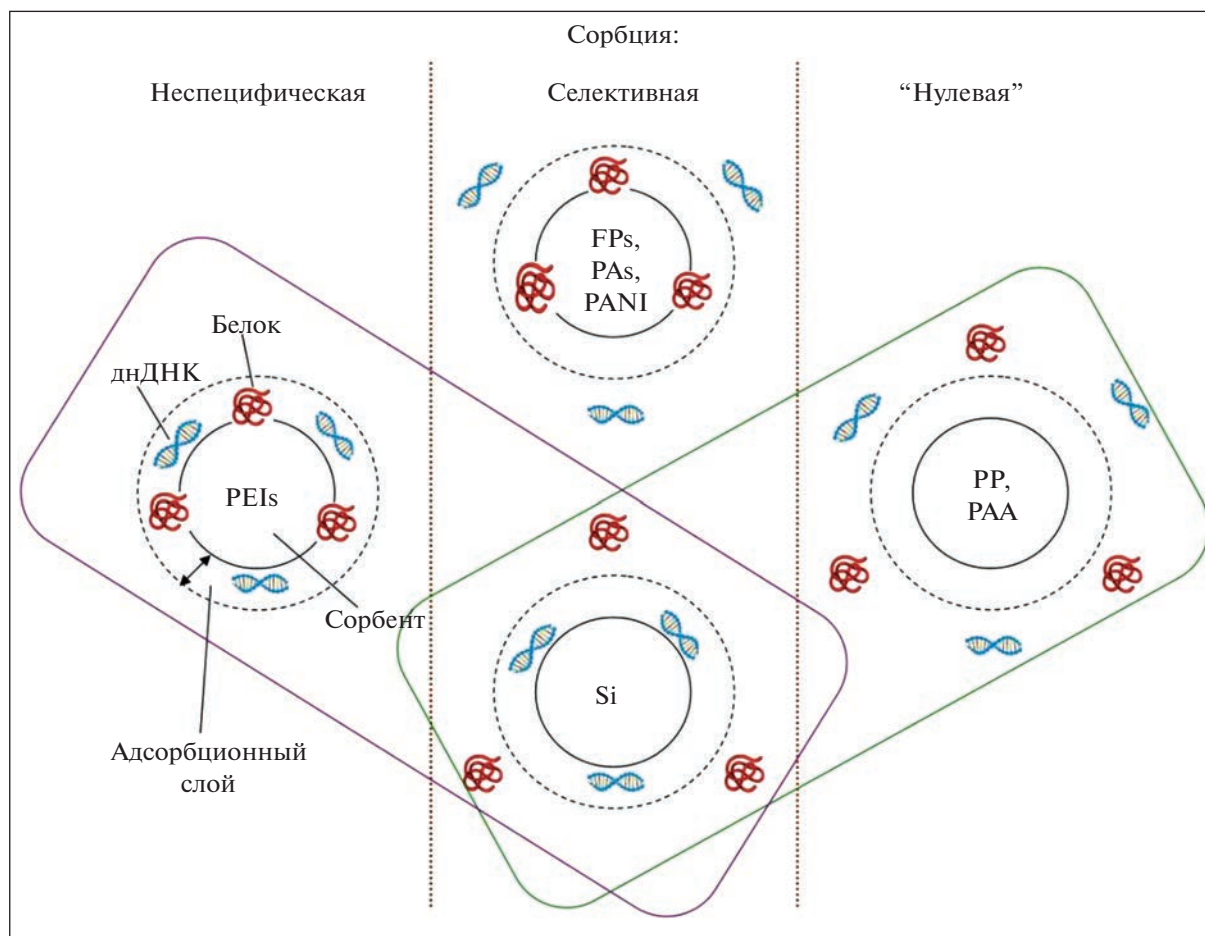


Рис. 3. Возможные типы сорбции НК и белков на различных материалах: PEIs — полиэтиленимины, FPs — фторполимеры, PAs — полиарамида, PANI — полианилины, PP — полипропилен, PAA — полиакриламид, Si — кремнезем [14].

Количественные параметры сорбции при этом зависят как от химической структуры полимерного покрытия в составе сорбента, так и от природы молекул сорбата и в значительно меньшей степени — от морфологии поверхности сорбента.

ТЕХНОЛОГИЧНЫЕ СПОСОБЫ СИНТЕЗА ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Ни PTFE, ни PANI не обладают удовлетворительными механическими и технологическими свойствами, позволяющими изготовить из них качественные пористые сорбенты. Решение этой проблемы заключается в создании композиционных сорбентов — материалов на основе твердых носителей, модифицированных нанослоями соответствующих полимеров (рис. 4). Полимерное покрытие должно быть тонким и равномерно распределенным по поверхности носителя, обеспечивая снижение неспецифической сорбции и повышение химической стабильности композиционного сорбента. При этом значения внутреннего диаметра и объема пор носителя не должны значительно уменьшаться.

Предложенный подход состоит в формировании сплошных равномерно распределенных полимерных нанослоев (толщиной 2–10 нм) требуемой химической структуры на поверхность твердых матриц с получением нанокомпозитного материала, поверхность которого, контактирующая с биологическими молекулами или частицами, будет вести себя как соответствующий полимер, а жесткость и морфология (пористость и удельный объем носителя) определяются свойствами исходной матрицы. В качестве носителей могут использоваться объемно-пористые частицы, синтетические мембраны, капилляры и др. (в зависимости от назначения получаемого композита). Прямой синтез таких нанокомпозитов предполагает, что реакции синтеза макромолекул

будут сопровождаться образованием однородных полимерных нанопокровов, прочно связанных с поверхностью носителя, в том числе с внутренней поверхностью пор [22].

Чтобы синтезировать такой композит, желательно предварительно тем или иным способом активировать поверхность носителя. Структура получаемого материала по сравнению с морфологически менее совершенным композитом того же брутто-состава схематически представлена на рис. 4 на примере объемно-пористой дисперсной частицы. В результате использования неактивированного носителя (рис. 4а) нередко получают неоднородное и неравномерно распределенное по поверхности носителя покрытие (с полимерными “пробками” в просветах пор и с непокрытыми участками), что снижает селективность сорбции, химическую стойкость материала подложки и усиливает нежелательную неспецифическую сорбцию. Напротив, можно ожидать, что использование носителя с активированной поверхностью (рис. 4б) позволит получать химически стойкие высокоселективные композиты с низким уровнем неспецифической сорбции, высокой удельной площадью поверхности и однородным распределением поверхностных функциональных групп, что обеспечит интенсификацию поверхностных сорбционных и/или химических процессов.

Таким образом, наряду с решением “обычных” химических задач, сопровождающих синтез макромолекул, при получении композитов следует обеспечить выполнение дополнительных условий: 1) локализовать реакцию на поверхности носителя (по возможности избегая протекания реакции в объеме реакционной смеси); 2) контролировать толщину (на нанометровом уровне) и морфологию (обеспечивая получение бездефектного слоя) полимерного покрытия; 3) стремиться к разработке “универсального” воспроизводимого метода

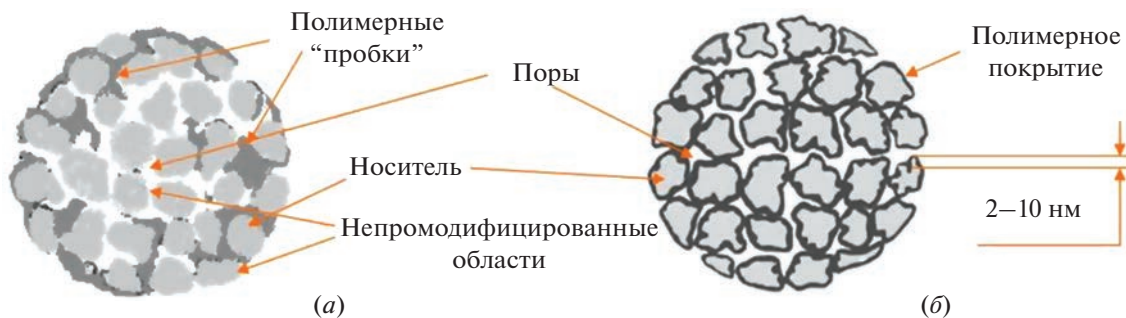


Рис. 4. Морфология композиционных полимерсодержащих сорбентов [21]: (а) — неактивированный носитель, (б) — носитель с активированной поверхностью.

синтеза, пригодного для химически различных систем. В рамках соответствующих исследований также предполагалось показать, что из одной “базовой” матрицы возможно получать широкий набор композитов с различным гидрофильно-липофильным балансом, с различными ионогенными группами, а также материалов, содержащих иммобилизованные биолиганды [22, 28].

В работах [28–33] подробно рассмотрены разработанные подходы к получению серии FP- и PANI-содержащих композитов, демонстрирующих эффект “*негативной селекции*” в отношении НК. Не останавливаясь на деталях, представленных в этих работах, следует отметить, что разработанные подходы к получению композитов со стойкими нанотолщинными полимерными покрытиями удобно формально подразделить на две группы. К первой группе относятся способы, в которых композит с полимерным нанопокрытием получали в результате полимеризации мономера в присутствии неактивированного носителя. К этой группе также следует отнести способы, в которых слой готового прекурсора (олигомера или полимера) предварительно наносили на поверхность носителя методом “кастинга”, а затем прекурсор иммобилизовали на поверхности носителя за счет химического отверждения (в том числе в результате полимераналогичных превращений).

В качестве соответствующих примеров следует привести способы получения PANI-содержащих композитов путем химического осаждения полимерного нанопокрытия [20]. Процесс отличается наличием индукционного периода, автокаталитическим характером и нередко сопровождается завершением реакции до полного исчерпания мономера. При этом важно получить первый слой PANI, а образование последующих слоев будет катализироваться предыдущими слоями. В присутствии кремнеземной поверхности полимеризация параллельно протекает на поверхности и в объеме реакционной смеси, и до 60% мономера расходуется на образование взвеси полимерных частиц в объеме реакционной смеси. Эти частицы оседают на поверхность PANI-модифицированного носителя, слабо удерживаясь на ней и загрязняя сорбент (особенно поверхность пор), что весьма существенно усложняет процедуру отмывки материала. Напротив, при использовании поверхностей, представляющих собой поликислоты, мономер расходуется преимущественно на образование PANI-покрытия, а не взвеси полимерных частиц в объеме реакционной среды. Таким образом, существует по крайней мере один путь для локализации процесса формирования

PANI-покрытия на поверхности носителя — использование носителей с кислотными поверхностными группами.

В качестве другого примера можно привести способы получения композиционных полимерсодержащих сорбентов методом “кастинга” с ультразвуковой обработкой для улучшения равномерности распределения покрытий на объемно-пористых носителях. Так, в работе Капустина с соавт. [30] описано получение полифторбутиленсодержащего сорбента методом “кастинга” с последующим фторированием. На первом этапе получали прекурсор — кремнеземный материал с олигобутиadiеновым покрытием, который затем обрабатывали *in situ* парами XeF_2 в атмосфере аргона в режиме псевдоожижения. Фторирование сопровождалось химическим структурированием полимера за счет рекомбинации макрорадикалов и взаимодействия радикалов с кратными связями с образованием поперечно-сшитого фторированного полимерного покрытия. Благодаря замещению атомов водорода атомами фтора модифицировались поверхностные свойства полимерного покрытия (без изменения его объемных свойств). Использование XeF_2 в качестве фторирующего агента значительно упростило технологию фторирования по сравнению с обработкой смесью фтора с азотом.

Вторая группа методов включает способы синтеза композитов, основанные на локализации процесса полимеризации на активированной поверхности носителя, т.е. когда полимеризация инициируется определенными поверхностными функциональными группами в составе носителя и протекает на его поверхности. В качестве примера такого подхода можно привести способ получения PANI-содержащих сорбентов на основе кремнеземов, модифицированных сульфированным сополимером стирола с дивинилбензолом. При окислительной полимеризации анилина на первой стадии образуется катион-радикал анилина. Yagudaeva et al. [32] предполагали, что эффективными матрицами, одновременно обеспечивающими протонирование анилина и локализацию процесса полимеризации на поверхности носителя, могут служить твердые нерастворимые поликислоты (кислые катионообменники). Для получения такой матрицы поверхность кремнезема сначала модифицировали политетрафторэтиленом методом пострадиационной прививочной полимеризации. На полученное покрытие методом пострадиационной блоксополимеризации прививали сополимер стирола с дивинилбензолом (PSt-DVB). Затем полученный PSt-DVB-кремнезем сульфировали разбавленной серной

кислотой, варьируя продолжительность обработки. В результате получали материалы с различным содержанием поверхностных сульфогрупп. При полимеризации анилина на поверхности таких носителей практически отсутствовал индукционный период полимеризации. Образование частиц PANI в объеме реакционной системы не наблюдали, конверсия мономера повышалась пропорционально увеличению содержания поверхностных сульфогрупп.

Локализовать процесс формирования PANI-покрытия на поверхности носителя также удалось в результате проведения матричной полимеризации, протекающей с образованием полимерных комплексов, состоящих из растворенных макромолекул “матрицы” и синтезируемого на них PANI. В отличие от осадительной полимеризации анилина в присутствии низкомолекулярной кислоты, в процессе матричной полимеризации система остается фазово-гомогенной. Поликомплексы проявляют свойства, отличные от свойств образующих их полимеров. Этот принцип был положен в основу получения новых композитов, в которых предварительно силаминированный 3-аминопропилтриэтоксисиланом кремнезем модифицировали продуктами матричной окислительной полимеризации анилина на ароматических полисульфокислотах (PSAs), в частности с использованием поли(*n,n'*-(2,2'-дисульфокислоты)дифениленизофталамида (*изо*-PSA). Проводили модификацию силаминированного стекла готовыми комплексами *изо*-PSA–PANI либо полимеризовали анилин в присутствии силаминированного стекла, предварительно покрытого *изо*-PSA. PSA полностью сорбируется на силаминированном кремнеземе. При соотношении *изо*-PSA : анилин, равном 1 : 1 (исходя из числа звеньев в цепи PSA), наблюдали максимально достижимую конверсию анилина [33].

Использование интерполимерных комплексов *изо*-PSA–PANI в качестве модификаторов облегчает масштабирование технологии благодаря стойкости модификатора при хранении (в виде раствора или порошка). Полученные в форме порошка комплексы не растворяются в органических растворителях (кроме TGF и DMFA), однако хорошо растворимы в воде. Такие комплексы можно использовать по мере необходимости для приготовления водных растворов требуемой концентрации (в зависимости от пористости используемого носителя и от желаемой толщины полимерного покрытия), применяемых в качестве полимерного реагента для модифицирования поверхности силаминированных кремнезёмов.

Еще один способ синтеза композитов основан на проведении озон-индуцированной полимеризации на поверхности твердых носителей. Kapustin et al. [34] подтвердили, что поверхность кремнезёмного носителя может быть активирована в результате обработки озоном с образованием активных центров различной природы. Кремнезем (диоксид кремния) не реагирует с озоном, однако кремнеземы, как правило, содержат примеси оксидов железа или алюминия (0.5–3.5 мас. %), которые под действием озона образуют ион-радикальные и/или пероксидные группы, способные инициировать полимеризацию различных мономеров. Присутствие таких групп подтверждается спектрами ПМР [35]. Активированный озоном кремнезем можно использовать в качестве гетерогенного инициатора полимеризации мономеров, полимеризующихся по различным механизмам (фторомономеры, анилин, стирол и др.). Обработку носителя озоново-воздушной смесью (вместо чистого кислорода) в течение 1–4 ч и последующую (со)полимеризацию мономеров на активированной поверхности носителя проводили на специальной установке с озонатором. Получены сорбенты, модифицированные PTFE (с использованием образующихся поверхностных радикалов без добавления инициатора) и PANI (с использованием поверхностных пероксидов без добавления окислителя). В систему дополнительно вводили гексафторпропилен (HFP) во избежание образования концевых заряженных кислородсодержащих групп с целью уменьшения неспецифической сорбции биополимеров либо аллиламин (AAm) или аллиловый спирт (AAl) с целью введения дополнительных функциональных групп для повышения гидрофильности поверхности и селективности получаемых материалов в процессах разделения смесей одно- и двухнитевых НК. Сомономеры вводили одновременно с тетрафторэтиленом (TFE) в режиме постполимеризации либо после исчерпания TFE на первом этапе, обеспечивая повышенное содержание поверхностных амино- или гидроксигрупп соответственно. Озонированный кремнезем также оказался эффективным в качестве гетерогенного инициатора окислительной полимеризации анилина в отсутствие низкомолекулярного окислителя. В этом случае PANI-покрытие образуется на поверхности частиц носителя, а взвесь полимерных частиц в реакционном объеме отсутствует.

С помощью такого подхода удалось разработать относительно безопасный и воспроизводимый способ получения PANI- и FP-содержащих композитов с дополнительными функциональными группами на поверхности.

Следует также рассмотреть способы получения PANI-содержащих сорбентов на основе гидрофобизованного носителя. Поскольку на стадии индукционного периода при полимеризации анилина образуются гидрофобные феназинсодержащие олигомерные продукты, разумно предположить, что синтез PANI можно локализовать на поверхности гидрофобизованной матрицы, например, покрытого фторполимером кремнезема. В работе Karustin et al. [36] кремнезем обрабатывали раствором фторопласта-42Л (FP), после удаления растворителя на поверхности носителя получали нанотолщинное гидрофобное FP-покрытие. При полимеризации анилина в присутствии полученного носителя, низкомолекулярной кислоты и окислителя образующиеся гидрофобные олигомеры прочно сорбировались на гидрофобизованной поверхности, служащей в данном случае “матрицей”, удерживающей растущие макромолекулы PANI. Полученный технологический эффект определялся тем, что локализация полимеризации анилина на поверхности носителя достигалась в отсутствие сомодификаторов PANI и без предварительной химической активации поверхности носителя. Кроме того, отпала необходимость в обработке полученного материала водным аммиаком для предотвращения образования взвеси полимерных частиц в реакционном объеме, что необходимо при синтезе PANI-содержащих композитов в присутствии неактивированных носителей. Морфологические характеристики всех полученных материалов получали с использованием ртутной порометрии, сравнивая их стойкость в условиях щелочного гидролиза с немодифицированными носителями.

В литературе также описаны способы получения PANI-содержащих композитов на основе некремнеземных носителей. При формировании PANI-покрытий на неорганических или органических носителях (свойства которых определяют механические и морфологические характеристики получаемых материалов) важно учитывать особенности конструкции биосепарирующего элемента, в состав которого будет включен получаемый композит.

Так, использование мультикапиллярных (МК) систем в качестве носителей при получении PANI-модифицированных сорбентов обеспечило возможность контролировать точный объем анализируемой пробы (что особенно важно при количественном выделении). Модифицировать поверхность МК-систем анилинсодержащими покрытиями можно двумя путями. Во-первых, заполняя объем МК реакционной смесью и проводя полимеризацию анилина, протекающую как

на внутренней поверхности стенок капилляров, так и в их объеме. Частицы полимера, слабо связанные с покрытием, легко удаляются промывкой. Во-вторых, в качестве полимерного модификатора можно использовать растворы сополимеров анилина с замещенными анилинами подходящего состава. Для выделения биополимеров из биологических образцов оптимальны МК-структуры шириной 4 мм и длиной 60 мм, с капиллярами диаметром 40 мкм, которые могут быть впаяны в стандартные пластиковые наконечники для ручных или автоматических дозаторов. Для работы с наконечниками не требуется дополнительное оборудование (центрифуги, насосы и др.). Эти наконечники также можно присоединять к шприцам, обеспечивая работу с большими объемами образца. Разработанная технология запатентована [37].

При получении PANI-содержащих сорбентов в качестве носителей также пригодны синтетические мембраны. Полимерные мембраны имеют жесткий каркас, развитую поверхность, они стойки к воздействию агрессивных сред, не набухают. Их структурные характеристики (удельную поверхность, структуру и размер пор) можно изменять в широких пределах. В качестве подложек при получении PANI-модифицированных сорбентов использовали отечественные синтетические мембраны МФФК (фторопластовая гидрофобная), МФФК-Г (фторопластовая гидрофилизованная), ММК (микрофльтрационная полиамидная), МКМ (капроновая), ММПА+ (нейлоновая с положительным поверхностным зарядом), ПА-66 (полигексаметиленадипинамидная) и МПС (полиэфирсульфоновая). Разработаны технологические способы получения мембранных PANI-сорбентов. Важно подчеркнуть, что модифицированную PANI-покрытием мембрану в составе биосепарирующего элемента (картриджа) использовали не в качестве фильтра, а как селективный сорбент (в скрученном особом образе виде), благодаря чему не происходила фильтрация образца через мембрану, но обеспечивался максимальный контакт образца с поверхностью мембраны. Способ получения такого мембранного сорбента описан, например, в патенте Капустина с соавт. [38].

Таким образом, разработанные технологические приемы обеспечили получение полимерсодержащих композитов с сохранением пористости исходных носителей различной природы и с равномерно распределенным по поверхности носителей полимерным покрытием.

ПРИМЕНЕНИЕ FP- И PANI-СОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ В СОСТАВЕ БИОСЕПАРИРУЮЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Ниже рассмотрены примеры применения FP- и PANI-содержащих композитов, демонстрирующих эффект “негативной селекции” в отношении НК, в молекулярной диагностике. Разработанная в этой области методология позволила получать нанотолщинные полимерные покрытия на разнообразных твердых матрицах (дисперсные носители, синтетические мембраны, мультикапилляры и др.), оптимальных для решения конкретных задач.

На рис. 5 [14] представлена линейка устройств, из которых легко выбрать наиболее подходящий вариант для эффективного выделения биополимеров из конкретного биологического объекта.

Применение в пробоподготовке при проведении молекулярной диагностики

В литературе достаточно широко представлены примеры использования FP- и PANI-содержащих сорбентов в пробоподготовке при проведении ПЦР-анализа. Так, за счет высокой сорбционной емкости и селективности FP- и PANI-содержащих сорбентов удается в одну стадию разделять смеси НК и белков, не изменяя состав элюента (и даже в отсутствие такового). Это позволило провести одностадийное выделение ДНК из биологических образцов, содержащих вирусы [36], из лизатов культур грамположительных и грамотрицательных бактерий [28, 34], лизатов растительной ткани [14, 31, 33], крови человека и животных [28, 30, 31], пищевых продуктов [14] и др. Аналогичная пробоподготовка с применением коммерческих наборов включает, как правило, ~20 манипуляций (и занимает от одного до нескольких часов), в то время как процедура с применением FP-PANI-сорбентов – всего восемь

манипуляций (с учетом времени, затрачиваемого на проведение лизиса, на проведение процедуры требуется ~30 мин).

Пробоподготовка с использованием PANI-сорбентов оказалась весьма эффективной в клинической ПЦР-диагностике, например, при одновременном определении в мазках пациентов двух групп микроорганизмов, включающих *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans*, а также *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma genitalium* [34].

Высокая эффективность применения FP-PANI-сорбентов в диагностике патогенов человека подтверждена результатами выделения ДНК из *Mycobacterium tuberculosis complex*. В работе Kapustin et al. [39] сравнивали количество ДНК, выделенной из образцов мокроты больных туберкулезом на сорбентах и с помощью роботизированной станции для выделения и амплификации Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария). Количество копий ДНК при выделении с помощью FP-PANI-сорбента значительно превышало количество копий при автоматическом выделении (максимально в 33 раза), притом что для автоматического выделения брали в 10 раз больше материала. После разведения образца эффективность автоматической амплификации была сопоставима по сравнению с образцами, прошедшими очистку на картриджах, однако даже в этом случае количество копий ДНК при автоматическом выделении составило всего 70% по сравнению с выделением на FP-PANI-сорбенте. Таким образом, протокол ручного выделения с использованием FP-PANI-сорбента предотвращает потери ДНК и обеспечивает эффективную очистку от ингибиторов полимеразы.

FP-PANI-сорбент эффективен при выделении ДНК палочковидной агробактерии *A. tumefaciens* C58, инфицирующей клетки растений (а в ряде случаев опасной для ВИЧ-инфицированных па-

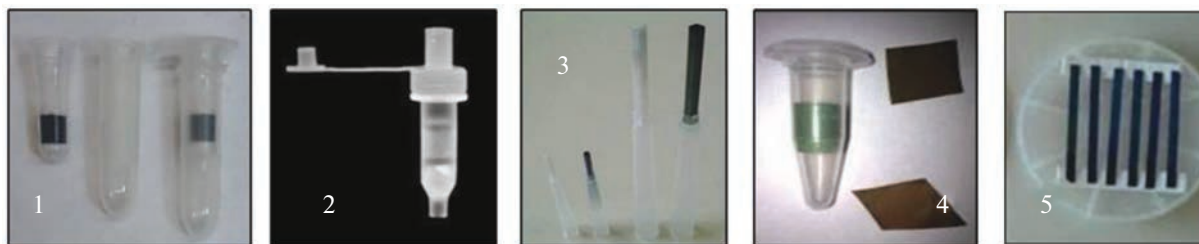


Рис. 5. Примеры разработанных биосепарирующих элементов: 1 – спин-картриджи с PANI-сорбентом; 2 – двухслойная концентрирующая спин-колонка (верхний очищающий слой – FP-сорбент, нижний концентрирующий слой – гранулы сшитого полиакриламида); 3 – стеклянные мультикапилляры, покрытые нанослоем PANI, впаянные в накопчик для механического дозатора; 4 – PANI-модифицированная мембрана MMK-2, размещенная в картридже; 5 – кремниевые пластины с 3-ABA-PANI-покрытием для масс-спектрометрии [14].

циентов). Показано, что одностадийная процедура выделения с использованием FP-PANI-сорбента по сравнению с коммерческими наборами обеспечивает значительно более высокий выход ДНК с одновременным отсутствием РНК в получаемых элюатах [35].

FP-PANI-сорбент также эффективен при одновременном выделении ДНК из тканей растений и грибов, что доказано результатами одностадийного выделения ДНК фитопатогенного гриба (*Fusarium graminearum*) как из зараженных семян пшеницы, так и непосредственно из мицелия гриба [35].

В работе Zybin et al. [40] описан двухкомпонентный биосепарирующий элемент (БЭ), содержащий FP-PANI-сорбент и полиальгинатные частицы. Это устройство продемонстрировало высокую эффективность при удерживании гуминовых веществ (мощный ингибитор полимеразы) из почвенных экстрактов. Гидрофобная фракция гуминовых веществ была полностью удержана сорбентом, а эффективность сорбции гидрофильной фракции составила ~95%. Выход суммарной почвенной ДНК, выделяемой за счет эффекта “*негативной селекции*”, составил не менее 94%.

В литературе представлены примеры эффективного применения FP-PANI-содержащего сорбента в пробоподготовке клинических образцов сыворотки крови человека, содержащих вирусную ДНК, для ПЦР-диагностики. Так, в работе Kapustin et al. [36] показано, что при помощи указанного сорбента ДНК вируса гепатита В (HBV) в крови четырех групп пациентов (с хроническим гепатитом, у доноров с высокой и низкой концентрацией ДНК HBV, а также у возвратных доноров) определяется одинаково эффективно (в результате выделения в течение 3–5 мин), в отличие от вариантов с использованием коммерческих наборов, основанных на эффекте “*положительной селекции*” (анализ занимает 20–30 мин). ДНК HBV представлена в основном двухнитевой макромолекулой. Для подтверждения эффективности использования разработанного материала для выделения одонитевой ДНК из реальных клинических образцов была проведена успешная ПЦР-детекция вируса TTV (transfusion transmitted virus или torque teno virus), содержащего одонитевую кольцевую молекулу ДНК [36].

В недавних работах [41–43] показано, что порошки полисопряженных полимеров в определенных условиях связывают вирусы (безоболочечные и оболочечные), а также бактериальные клетки. В работе [14] оценивали степень удерживания ряда РНК-содержащих оболочечных виру-

сов (вирус лихорадки Синдбис 1383 клон 3, вирус западного энцефаломиелита лошадей, вирус гриппа В/Colorado/06/2017, подобный вирусу В/Victoria/2/87) на картриджах с мембранными сорбентами, модифицированными PANI. Мембрану в картриджи вставляли особым образом (когда скрученная мембрана используется не как фильтр, а в качестве сорбента). Показано, что использование таких мембранных сорбентов позволяет быстро, как правило, на порядки (от 2 до более чем в 3000 раз), снижать вирусную нагрузку в вирусосодержащих жидкостях.

Таким образом, PANI-содержащие композиты полезны не только при селективном разделении смесей биомакромолекул (НК и белков), но также эффективно взаимодействуют с надмолекулярными структурами (вирусные частицы). Такие материалы могут найти применение при деконтаминации вирусосодержащих сред (например, для обеззараживания воды и воздуха), а также в качестве материала лицевых повязок с целью защиты медицинского персонала и пациентов от распространения вирусных инфекций, передающихся воздушно-капельным путем.

Другие области применения FP- и PANI-содержащих композитов

Как следует из приведенных выше примеров, сорбционные свойства FP- и PANI-содержащих сорбентов в отношении биополимеров могут проявляться в различной степени в зависимости от химического состава полимерных модификаторов, использованных при получении сорбентов. Поэтому, например, можно ожидать, что степень удерживания НК, различающихся вторичной структурой (от “нулевой” сорбции до полного удерживания), будет зависеть от присутствия на поверхности полимерных покрытий дополнительно вводимых функциональных групп, что может быть использовано при разработке эффективных протоколов разделения смесей таких НК (либо для дополнительной очистки отдельных фракций НК). В работе Kapustin et al. [28] приведены результаты удерживания днДНК, РНК и олигонуклеотидов (онДНК) сорбентами, полученными на основе обработанного озоном кремнезема и модифицированными сополимерами TFE с HFP, AAm и AAl. Действительно, выход НК изменялся в зависимости от полярности поверхности сорбента. Удерживание онДНК и РНК возрастало в ряду PTFE-HFP – PTFE-AAI – PTFE-AAm. В то же время выход днДНК повышался при использовании сорбента, содержащего гидроксильные группы, по сравнению с мате-

риалом, модифицированным сополимером, содержащим звенья ААм.

FP-PANI-сорбент оказался эффективен при очистке ПЦР-фрагментов (ампликонов) от примесей, присутствующих в реакционной смеси после проведения ПЦР, таких как *Taq*-полимераза (сорбентом удерживается >95%), dNTP (до 84%), олигонуклеотиды (до 100%) и флуорофоры (до 100%). Для оценки эффективности очистки применяли спектрофотометрию, электрофорез и методы с использованием радиоактивной метки. Очищенные ампликоны можно использовать для клонирования генов, секвенирования НК и т.д. [14].

В работе Kapustin et al. [28] показано, что использование частично фторированных полимеров с активными функциональными группами в качестве модификаторов поверхности позволяет проводить иммобилизацию биополимеров. Разработан носитель для твердофазного синтеза олигонуклеотидов на основе пористого кремнезема, предварительно покрытого нанотолщинным слоем сополимера этилена с метил-3-(1-(дифтор-((трифторэтил)-окси)-метил)-1,2,2,2-тетрафторэтоксид)-2,2,3,3-тетрафторпропаном (EVE). Этот сополимер содержит активные эфирные группы, что позволяет использовать их в качестве “якоря” для иммобилизации биополимеров. Наличие фторированных групп снижает неспецифическую сорбцию синтезируемых олигонуклеотидов на поверхности носителя (благодаря эффекту “негативной селекции”). На поверхности EVE-модифицированного кремнезема иммобилизовали остатки нуклеотида DMT-dT-SNPE за счет взаимодействия с якорными группами. Поверхностная концентрация нуклеотидных остатков составила ~40 мкмоль/г сорбента. На полученном носителе синтезировали олигонуклеотид dT₂₀ с выходом ~30 ОЕ/мл (~6 пмоль/мкл). Материал сохранял свои свойства при длительном хранении при комнатной температуре. В течение 9 месяцев содержание доступных нуклеотидных остатков снизилось всего на 0.86%.

Интересное применение FP-сорбентов описано в работах [14, 44]. Авторы полагали, что кремнеземные носители, поверхностно модифицированные FP, проявляют себя как мягкие обращенно-фазовые сорбенты (как с олео-, так и с гидрофобными свойствами в зависимости от состава используемого элюента). Таким образом, их можно использовать для выделения не только биополимеров, но и низкомолекулярных биологически активных веществ (БАВ), различающихся гидрофильно-липофильным балансом. Эффективность применения картриджей с FP-сорбентом для выделения БАВ продемонстрирована

при совместном выделении водо- и жирорастворимых витаминов из крови человека. Разработан воспроизводимый метод одновременного выделения производных пяти водорастворимых (С, В₁, В₅, В₆, В₁₂) и четырех жирорастворимых (А, D₃, Е, К) производных витаминов (витамеров) из одной пробы крови (5–10 мл). Из образца крови получали и концентрировали сыворотку, затем проводили жидкофазную экстракцию неполярным растворителем. Органическую фазу упаривали, а сухой остаток растворяли в метаноле. Полученный раствор, как и предварительно сконцентрированную водную фазу, независимо пропускали через картриджи с FP-сорбентом, получая элюаты, содержащие, соответственно, смесь жирорастворимых и смесь водорастворимых витаминных соединений. Элюаты анализировали с помощью ВЭЖХ. Соотнесение пиков на хроматограмме с конкретными компонентами пробы проводили, одновременно регистрируя времена удерживания компонентов и спектры поглощения каждого пика, сравнивая результаты со значениями, полученными в тех же условиях для стандартов определяемых витаминов. Разработанный способ обеспечивал высокую чувствительность (пределы обнаружения различных компонентов варьировались в диапазоне 0.001–0.1 мкг/мл), а также воспроизводимость ВЭЖХ-анализа производных витаминов, выделенных из крови с помощью FP-сорбента.

Весьма интересными оказались результаты применения разработанных PANI-модифицированных композитов в масс-спектрометрии. Введение дополнительных функциональных групп в PANI-покрытия открыло новые возможности для использования таких композитов в биоаналитике. В работе Vaczine-Shlosser et al. [45] показано, что разделение смесей белков (пептидов) с различными *pI* можно проводить непосредственно на кремниевой пластине (чипе), покрытой нанослоем сополимера анилина с 3-аминобензойной кислотой (3-ABA-PANI). Предварительно получали конъюгаты белков, различающихся значениями *pI*, с люминесцентными (с эмиссией при 546, 581 и 610 нм) полупроводниковыми нанокристаллами (CdSe)ZnS. Смесь конъюгатов наносили на поверхность модифицированного чипа, систему промывали раствором с определенным pH, удерживание белков на пластине визуализировали в УФ-свете. На пластине удерживались белки с *pI* > pH отмывочного раствора.

Параллельно было обнаружено, что анилинсодержащее покрытие абсорбирует энергию лазерного источника, что позволяет использовать чипы с таким покрытием в масс-спектрометрии в формате SELDI-TOF-MS (временн

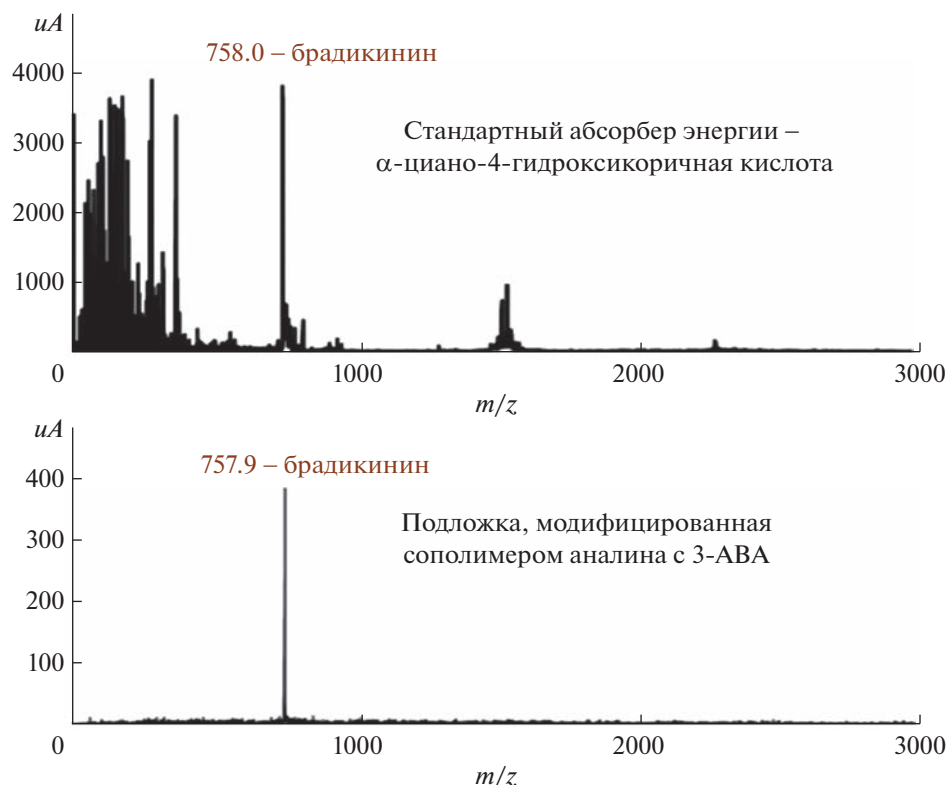


Рис. 6. Определение брадикинина методом SELDI-TOF-MS на кремниевых чипах, модифицированных сополимером 3-ABA-PANI (адаптированный рисунок из патента Vaczine-Shlosser et al. [45]).

спектрометрия с использованием поверхностно-усиленной лазерной десорбции/ионизации) без добавления к пробе “веществ-матриц” (например, ароматических кислот), поглощающих энергию и способствующих переводу анализата в газовую фазу. Присутствие “вещества-матрицы” приводит к появлению значительного фонового сигнала в низкомолекулярной части масс-спектра. Напротив, при использовании чипов, покрытых сополимером 3-ABA-PANI, для анализа пептидов (брадикинина и др.) фоновые пики в масс-спектре не наблюдали. Добавление “матрицы” (α-циано-4-гидроксикоричной или горчиной кислот) приводило к появлению интенсивного фона, маскирующего пики низкомолекулярных анализатов, что продемонстрировано на рис. 6 на примере определения брадикинина.

Из рис. 6 следует, что разработанное покрытие обладает высокой “матричной” активностью и обеспечивает образование протонированных молекулярных ионов ($[M + H]^+$) [45]. Таким образом, разработана эффективная аналитическая система для масс-спектрометрии, обеспечивающая удаление примесей из пробы и одновременно по-

вышающая информативность анализа за счет существенного упрощения структуры масс-спектра.

ПРОЯВЛЯЮТ ЛИ ПОЛИМЕРНЫЕ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ ОДИНАКОВОЙ ПРИРОДЫ СХОДНЫЕ СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА?

Как известно, многочисленная группа хроматографических материалов, применяемых при разделении смесей биополимеров, представлена кремнеземами, поверхностно модифицированными низкомолекулярными соединениями (силанами, металлсодержащими фрагментами молекул, остатками нуклеозидов, антител и т.д.) [7, 8]. Напротив, в цитируемых выше работах обсуждались примеры применения в молекулярной диагностике композитов, полученных в результате модифицирования поверхностей твердых носителей полимерными нанопокровками. С целью получения таких материалов был разработан ряд технологичных способов синтеза. Также было показано, что введение дополнительной функциональности как во фтор-, так и в анилинсодержащие полимерные модификаторы, используемые

при синтезе композиционных сорбентов, позволяет расширить область их практического применения.

Однако остается открытым вопрос, возможно ли при использовании низкомолекулярных модификаторов, сходных по химическому составу с соответствующими макромолекулами, разрабатывать технологичные способы получения композиционных сорбентов, демонстрирующих аналогичные сорбционные свойства. Из представленных выше данных следует, что PANI-покрытия, как правило, получают в результате проведения окислительной осадительной полимеризации анилина в присутствии твердого носителя, т.е. в результате прямого синтеза сорбента [29, 31], поскольку PANI нерастворим в обычных растворителях (за исключением высококипящего *N*-метил-2-пирролидона и смеси концентрированных кислот). Сложность механизма полимеризации анилина и разнообразие факторов, влияющих на эту реакцию, часто приводят к образованию полимерных продуктов, различающихся по химической структуре и морфологии, что может сказаться на сорбционных свойствах поверхности PANI.

В этом отношении интересно исследование Yagudaeva et al. [46], в котором в качестве аналога и альтернативы PANI предложено использовать олигомерные молекулы тетраанилина (TANI). Этому способствовал ряд причин. Во-первых, олигомеры анилина, как и макромолекулы PANI, представляют собой полисопряженные системы, структурно близкие PANI [47]. Эти молекулы могут существовать в трех различных окисленных состояниях: в полностью восстановленной форме “лейкоэмеральдина”, в полностью окисленной форме “пернигранилина” и в форме “эмеральдина” с соотношением окисленных и восстановленных фрагментов 1 : 1 [48]. Олигомеры имеют определенную молекулярную структуру, и они (что особенно важно) растворимы в органических растворителях, таких как толуол, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид, диоксан, ацетон, ацетонитрил, *N*-метил-2-пирролидон. Поскольку приготовление покрытий на основе олигомеров анилина осуществляется из их растворов, предполагалось, что это позволит лучше контролировать надмолекулярную организацию получаемого покрытия по сравнению с покрытиями PANI и получать бездефектные пленки с улучшенной структурой, которые определяют сорбционные свойства таких покрытий.

Известно большое количество структур олигомеров анилина [49–53]. Для приготовления нанопокрывтий был выбран TANI с концевыми фе-

нильными группами, поскольку он выступает наиболее стабильным соединением среди олигомеров PANI, а также самым коротким олигомером, имеющим три степени окисления.

TANI в форме лейкоэмеральдинового основания (LEB) и в форме эмеральдинового основания (EB) (TANI-LEB и TANI-EB соответственно) синтезировали в соответствии с методикой Wang et al. [54]. Полученные соединения были охарактеризованы методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, ИК-, ¹H-ЯМР- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, результаты которых подтвердили соответствие их реального химического состава брутто-формулам.

Авторы предположили, что оценка сорбционных свойств покрытий TANI по отношению к биополимерам методом СКИ позволит адекватно ответить на вопрос о пригодности TANI в качестве альтернативы модификатору поверхности PANI при приготовлении сорбентов, демонстрирующих эффект “*негативной селекции*” по отношению к НК. С этой целью методом Ленгмюра формировали пленки, нанося растворы TANI-EB в смеси DMSO с толуолом, взятых в равных объемах, на водную субфазу. Качество получаемых покрытий дополнительно контролировали методом сканирующей зондовой микроскопии, нанося пленки на стеклянные пластины методом Ленгмюра–Шеффера. Оптимальную морфологию имели покрытия, полученные после последовательного нанесения двух пленок.

В качестве объектов для изучения сорбции биополимеров на поверхности получаемых покрытий использовали днДНК из *E. coli*, тРНК дрожжей и белки, различающиеся значениями *pI* и молекулярными массами (лизоцим, BSA, овальбумин, гемоглобин и пепсин). Сравнение сорбционных свойств TANI- и PANI-покрытий методом СКИ подтвердило, что механизм сорбции белков поверхностью TANI-EB определяется их структурой и значением *pI*, по аналогии с механизмом удерживания биополимеров на поверхности PANI. НК не удерживались обеими поверхностями.

Обнаруженные свойства полученных покрытий TANI-EB позволяют рассматривать их как перспективную альтернативу PANI-содержащим материалам для создания хроматографических субстратов с контролируемыми сорбционными свойствами по отношению к биомacroмолекулам, а именно к НК и белкам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первый взгляд, объединение таких различных материалов, как FP- и PANI-содержащие композиты, в качестве единого объекта исследования может показаться неожиданным. Тем не менее в определенных условиях даже столь различные материалы можно эффективно применять в процессах разделения компонентов смесей биополимеров, поскольку входящие в состав этих композитов полимерные модификаторы демонстрируют весьма близкие сорбционные свойства в отношении биомакромолекул, таких как белки, пептиды и нуклеиновые кислоты.

Использование нетрадиционных полимерных модификаторов с комплексом особых свойств позволило изменить сам принцип выделения биополимеров из биологических смесей сложного состава. Иными словами, произошел переход от использования материалов, демонстрирующих эффект “*позитивной селекции*” в отношении НК, к применению материалов и методов, основанных на использовании эффекта “*негативной селекции*”. В результате стало возможным проводить выделение биополимеров (в частности, НК) из биологических смесей в одну стадию (в отличие от традиционных многостадийных методов).

Использование FP- и PANI-содержащих сорбентов не только обеспечивает одностадийное выделение НК из разнообразных биологических объектов в процессе пробоподготовки в молекулярной диагностике, но с их помощью также удается решать особые задачи, такие как иммобилизация биополимеров, выделение низкомолекулярных биологически активных соединений, разделение смесей НК, различающихся третичной структурой, очистка ПЦР-фрагментов. Наконец, композиты с нанопокровками на основе сополимеров анилина с замещенными анилинами эффективны в качестве “рабочих тел” в масс-спектрометрии.

Таким образом, полимерсодержащие композиты – полезный и эффективный инструмент молекулярной биотехнологии, область их применения постоянно расширяется. Новым перспективным шагом в этом направлении может стать использование низкомолекулярных (олигомерных) модификаторов, демонстрирующих близкие сорбционные свойства по сравнению со свойствами макромолекул PANI.

Следует признать, что поступательное развитие молекулярной диагностики было бы невозможным без комплексных исследований свойств носителей, их модификаторов и биомакромолекул, проводимых на стыке материаловедения и бионанотехнологии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sambrook J., Russel D.W.* // Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edition / Ed. Russel D.W. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.
2. *Marko M.A., Chipperfield R., Birnboim H.C.* // Anal. Biochem. 1982. V. 121. P. 382–387.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90497-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90497-3)
3. *Chomczynski P., Sacchi N.* // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 581–585.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
4. *Carr S.M., Griffith O.M.* // Biochem. Genet. 1987. V. 25. P. 385–390.
<https://doi.org/10.1007/BF00554547>
5. *Janson J.-Ch.* // Protein purification: principles, high resolution methods, and applications. 3rd edition / Ed. Janson J.-Ch. Hoboken. NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2011. 548 p.
6. *Albertson P.-A.* // Partition of cell and macromolecules. separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cell in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3rd edition / Ed. Albertson P.-A. NY: John Wiley & Sons, Inc., 1986. 346 p.
7. *Остерман Л.А.* // Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Отв. ред. Георгиев Г.П. М.: Наука, 1985. 536 с.
8. *Snyder L.R., Kirkland J.J.* // Introduction to modern liquid chromatography. 2nd edition / NY, Chichester, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons, Inc., 1979. 863 p.
9. *Rother D., Sen T., East D., Bruce I.J.* // Nanomedicine (Lond). 2011. V. 6. P. 281–300.
<https://doi.org/10.2217/nnm.10.159>
10. *Melzak K.A., Sherwood C.S., Turner R.F.B., Haynes C.A.* // J. Colloid Interface Sci. 1996. V. 181. P. 635–644.
<https://doi.org/10.1006/JCIS.1996.0421>
11. *Beld M., Sol C., Goudsmit J., Boom R.* // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 2618–2619.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2618>
12. *Yagudaeva E.Yu., Zybin D.I., Vikhrov A.A., Prostya-kova A.I., Ischenko A.A., Zubov V.P., Kapustin D.V.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2018. V. 163. P. 83–90.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.025>
13. *QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook* // Qiagen, 2003.
https://depts.washington.edu/kellylab/wordpress/wp-content/uploads/2019/03/QIAGEN_protocol.pdf
14. *Капустин Д.В.* // Фторполимер- и полианилинсодержащие композиты как эффективный инструмент молекулярной биотехнологии. Дис. докт.

- хим. наук, ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 2020.
15. Hjerten S. // J. Chromatogr. A. 1978. V. 159. P. 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)98545-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)98545-5)
 16. Hjerten S., Hellman U. // J. Chromatogr. A. 1980. V. 202. P. 391–395. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)91823-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)91823-5)
 17. Муйдинов М.Р. // Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева). 2008. Т. LII. № 3. С. 81–89.
 18. Муйдинов М.Р. // Патент RU 2104695 C1, 1998.
 19. Сабуров В.В., Муйдинов М.Р., Гурьянов С.А., Катаев А.Д., Туркин С.И., Zubov V.P. // Журнал физической химии. 1991. Т. 65. № 10. С. 2692–2698.
 20. Капустин Д.В., Ягудаева Е.Ю., Завада Л.Л., Жигис Л.С., Zubov V.P., Ярошевская Е.М., Плюбнер Л., Лайзер Р.-М., Брем Г. // Биоорг. химия. 2003. Т. 29. С. 310–315. [Kapustin D.V., Yagudaeva E.Yu., Zavada L.L., Zhigis L.S., Zubov V.P., Yaroshevskaya E.M., Plobner L., Leiser R.-M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2003. V. 29. P. 281–285.] <https://doi.org/10.1023/a:1023992701568>
 21. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.V. // Advances in Polymer Science. 1992. V. 104. P. 134–175. https://doi.org/10.1007/3-540-55109-3_4
 22. Zubov V.P., Kapustin D.V., Generalova A.N., Yagudaeva E.Yu., Vikhrov A.A., Sizova S.V., Muiyudinov M.R. // Polymer Science Series A. 2007. V. 49. P. 1247–1264. <https://doi.org/10.1134/S0965545X07120036>
 23. Liaw D.-J., Yagudaeva E.Yu., Prostyakova A.I., Lazov M.A., Zybin D.I., Ischenko A.A., Zubov V.P., Chang C.-H., Huang Y.-C., Kapustin D.V. // Colloids Surf. B. 2016. V. 145. P. 912–921. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.068>
 24. Льяо Д.-Дж., Зыбин Д.И., Простякова А.И., Ягудаева Е.Ю., Вихров А.А., Ищенко А.А., Zubov V.P., Капустин Д.В. // Известия ВУЗов. Химия и химическая технология. 2018. Т. 61. С. 4–22. <https://doi.org/10.6060/tcct.2018610>
 25. Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Nikitin E.P., Ksenevich T.I. // Sensors Actuators B. 2005. V. 111. P. 500–504. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2005.03.043>
 26. Orlov A.V., Pushkarev A.V., Znoyko S.L., Novichikhin D.O., Bragina V.A., Gorshkov B.G., Nikitin P.I. // Biosensors and Bioelectronics. 2020. V. 159. P. 112187. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112187>
 27. Walter W., Focke G.E., Wnek Y.W. // J. Phys. Chem. 1987. V. 91. P. 5813–5818. <https://doi.org/10.1021/J100306A059>
 28. Kapustin D., Prostyakova A., Bryk Ya., Yagudaeva E., Zubov V. // In: Nanocomposites and polymers with analytical methods / Ed. Cuppoletti J. Croatia: Intech, 2011. P. 83–106. <https://doi.org/10.5772/18081>
 29. Капустин Д.В., Zubov V.B. // Вестник МИТХТ. 2011. Т. 6. № 5. С. 21–46.
 30. Капустин Д.В., Сабуров В.В., Завада Л.Л., Евстратов А.В., Барсамян Г.Б., Zubov V.P. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 868–876. [Kapustin D.V., Saburov V.V., Zavada L.L., Evstratov A.V., Barsamyan G.B., Zubov V.P. // Russ. J. Bioorg. Chem. 1998. V. 24. P. 770–777.]
 31. Kapustin D.V., Yagudaeva E.Y., Zubov V.P., Muiyudinov M.R., Yaroshevskaya E.M., Plobner L., Leiser R.-M., Brem G. // In: Frontiers in DNA Research / Ed. Woods C.R. NY: Nova Science Publishers, 2006. P. 113–136.
 32. Yagudaeva E.Yu., Muiyudinov M.R., Kapustin D.V., Zubov V.P. // Russ. Chem. Bull. Int. Ed. 2007. V. 56. P. 1166–1173. <https://doi.org/10.1007/S11172-007-0177-Y>
 33. Yagudaeva E.Yu., Bukina Ya.A., Prostyakova A.I., Zubov V.P., Tverskoy V.A., Kapustin D.V. // Polymer Sci. Ser. A. 2009. V. 51. P. 675–682. <https://doi.org/10.1134/S0965545X09060121>
 34. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Ryazantsev D.Yu., Zubov V.P. // Nanomedicine (Lond). 2011. V. 6. P. 241–255. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.6>
 35. Простякова А.И. // Синтез полимерсодержащих сорбентов и их использование для одностадийного выделения ДНК. Дис. канд. хим. наук, ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 2013.
 36. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Zubov V.P. // Bioanalysis. 2014. V. 6. P. 957–966. <https://doi.org/10.4155/bio.13.332>
 37. Скибина Ю.С., Белоглазов В.И., Тучин В.В., Капустин Д.В., Простякова А.И. // Патент RU 2547597 C1, 2015.
 38. Капустин Д.В., Тарасов А.В., Простякова А.И., Лепешин С.А. // Патент RU 2631934 C1, 2017.
 39. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Alexeev Ya.I., Varlatov D.A., Zubov V.P., Zavriev S.K. // Acta Naturae. 2014. V. 6. С. 6–10. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-2-48-52>
 40. Zybin D.I., Prostyakova A.I., Kapustin D.V. // Microchem. J. 2021. V. 166. P. 106225. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106225>
 41. Иванова В.Т., Иванов В.Ф., Грибокова О.Л., Курочкина Я.Е., Матюшина Р.О., Ванников А.В. // Патент RU 2372951 C2, 2009.
 42. Морозова Е.О. // Сорбционное взаимодействие микропатогенов с полимерными материалами на основе полипиррола. Дис. канд. биол. наук, ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи”, Москва, 2018.
 43. Ivanova V.T., Garina E.O., Burtseva E.I., Kirillova E.S., Ivanova M.V., Stejskal J., Sapurina I.Yu. // Chem. Papers. 2017. V. 71. P. 495–503.
 44. Зайцева И.П., Серебрянский Е.П., Скальная М.Г., Капустин Д.В. // Вестник восстановительной медицины. 2014. № 2 (60). С. 62–65.
 45. Vaccine-Shlosser G., Ribbing C., Bachman P.K., Zubov V.P., Kapustin D.V. // Int. Application WO 2011004308 A1, 2011.
 46. Yagudaeva E., Vikhrov A., Malakhova Yu., Iskandiarova Yu., Firsova M., Prostyakova A., Korovin A., Malakhov S., Nichugovskiy A., Zubov V., Kapustin D. // Synthetic Metals. 2021. V. 274. P. 116712. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2021.116712>

47. Wang Y., Tran H.D., Liao L., Duan X., Kaner R. // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. P. 10365–10373. <https://doi.org/10.1021/ja1014184>
48. MacDiarmid A.G., Zhou Y., Feng J. // Synthetic Metals. 1999. V. 100. P. 131–140. [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(98\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(98)00164-7)
49. Yopez G., Poyil A.N., Bugarin A. // Synthesis. 2019. V. 51. P. 3611–3616. <https://doi.org/10.1055/S-0037-1611889>
50. Chu J.W.-F., Hsu Sh.-Ch., Lu Y., Yu Y., Santiago K.S., Yeh J. // Polymer. 2017. V. 128. P. 218–228. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2017.09.034>
51. Liu Y., Li J., Zhu J., Lyu W., Xu H., Feng J., Yan W. // Colloid Polym. Sci. 2018. V. 296. P. 1777–1786. <https://doi.org/10.1007/s00396-018-4401-0>
52. Ding Y., Liang J., Liu G., Ni W., Shen L. // Coatings. 2019. V. 9. P. 399–411. <https://doi.org/10.3390/COATINGS9060399>
53. Wei Z., Faul C. // Macromol. Rapid Commun. 2008. V. 29. P. 280–292. <https://doi.org/10.1002/MARC.200700741>
54. Wang W., MacDiarmid A.G. // Synthetic Metals. 2002. V. 129. P. 199–205. [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(02\)00053-X](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(02)00053-X)

How Conventional Approaches to the Use of Polymer-Containing Composites in Molecular Diagnostics Are Changing

D. V. Kapustin[#]

[#]Phone: +7 (916) 277-60-94; e-mail: kapustin@ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Known approaches to the isolation of biopolymers, in particular nucleic acids (NAs), from biological samples are based on the binding of molecules to a sorbent (“positive selection”) with their subsequent elution using a suitable eluent. The review article discusses the physicochemical processes underlying the development of methods for isolating of NAs from biological samples. It has been shown that methods including the selective solid-phase extraction (i.e., reversible sorption) provide the possibility of miniaturization and automation of the corresponding processes. The review discusses the advantages of an alternative approach to NAs isolation based on the use of special sorbents that bind proteins and other components of biological samples, while these sorbents exhibit sorption inertness with respect to NAs (“negative selection”). Approaches providing the creation of such composite polymer-containing sorbents, which are designed for the sample preparation during molecular diagnostics, as well as the methods of their effective use are considered. It has been demonstrated that due to an interdisciplinary approach using a complex of synthetic and analytical methods, it is possible to combine as a single object of study the composite materials that are very different in structure and properties. Such nanostructured composites (based on porous silica, synthetic membranes, glass multicapillaries) contain fluoropolymers and polyanilines. The results of the use of such composites for selective isolation of NAs and/or proteins from biological samples are discussed. Alternative applications of such composites in molecular diagnostics, in particular, in mass spectrometry, are considered. Directions for expanding of the field of application of polymer-containing composites due to simultaneous use of the sorption properties of the obtained composites surface and the properties of sorbate molecules are outlined. It has been shown that both polymeric and low molecular weight modifiers of the same chemical nature are suitable for the technological preparation of such composites.

Keywords: fluoropolymers, polyanilines, composite sorbents, isolation of biopolymers, molecular diagnostics, PCR



УДК 577.214.5

ПЛАТФОРМА мРНК-ВАКЦИН: ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ И ДОСТАВКИ мРНК

© 2023 г. В. Р. Литвинова*, #, А. П. Рудомётов*, Л. И. Карпенко*, А. А. Ильичёв*

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Россия, 630559 Новосибирская область, р.п. Кольцово

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 21.09.2022 г.

Вакцинация — наиболее эффективный метод предотвращения инфекционных заболеваний. Один из новых подходов к созданию вакцин — это вакцины на основе мРНК, которые обладают рядом весьма полезных преимуществ по сравнению с другими типами вакцин. Поскольку мРНК кодирует только целевой антиген, отсутствует потенциальный риск инфицирования, как это может произойти в случае аттенуированного или инактивированного патогена. Принцип действия мРНК-вакцин заключается в том, что их генетическая информация реализуется только в цитозоле клетки, благодаря этому крайне мала вероятность интеграции мРНК в геном организма-хозяина. мРНК-вакцины способны индуцировать специфический клеточный и гуморальный иммунные ответы, но не вызывают антивекторный иммунный ответ. Платформа мРНК-вакцин позволяет легко проводить замену целевого гена, не изменяя технологию производства, что важно для решения проблемы временного разрыва между началом эпидемии и производством вакцины. В обзоре рассмотрены история мРНК-вакцин, технология их получения, способы повышения стабильности мРНК, описание модификаций кэпа, поли(А)-хвоста, кодирующей и не кодирующей частей мРНК, очистка целевой мРНК-вакцины от побочных продуктов, а также различные способы доставки.

Ключевые слова: РНК, мРНК-вакцины, химически модифицированные нуклеотиды, нетранслируемые 5'- и 3'-области, способы доставки мРНК

DOI: 10.31857/S01323423202015X, EDN: PGBVWC

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	135
ИСТОРИЯ мРНК-ВАКЦИН.....	135
ТИПЫ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ РНК.....	136
СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ мРНК.....	137

Сокращения: 3'-UTR — 3'-нетранслируемая область гена; 5'-UTR — 5'-нетранслируемая область гена; ARCA — анти-реверсивный аналог кэпа; CBP — кэп-связывающие белки; COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года; CPP — пептиды, проникающие в клетки; IVT — транскрибированный *in vitro*; LNP — липидные наночастицы; ORF — открытая рамка считывания; PAMAM — полиамидамин; PEI — полиэтиленимин; PGS — конъюгат полиглюкин–спермидин (спермидин — N1-(3-аминопропил)бутан-1,4-диамин); PRR — рецепторы распознавания образов; PABP — поли(А)-связывающие белки; RIG-I — белок I, индуцируемый ретиновой кислотой; SARS-CoV-2 — коронавирус-2 тяжелого острого респираторного синдрома; TLR — Toll-подобные рецепторы; дцРНК — двухцепочечная РНК; ОФ ВЭЖХ — обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ПЭГ — полиэтиленгликоль (поли(оксиэтилен)); саРНК — самоамплифицирующаяся РНК.

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-47-10, 22-29; эл. почта: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru).

Структура кэпа.....	137
Последовательность поли(А) на 3'-конце мРНК — поли(А)-хвост.....	140
Некодирующие области в составе мРНК.....	141
Оптимизация кодирующей последовательности в составе мРНК.....	142
Модифицированные нуклеозиды в составе мРНК.....	142
ОЧИСТКА мРНК-IVT ОТ дцРНК.....	143
ДОСТАВКА мРНК <i>in vivo</i>	144
Липидные наночастицы.....	144
Поликатионные полимеры.....	147
Физические способы доставки.....	148
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	149

ВВЕДЕНИЕ

Вакцинация — наиболее эффективный метод предотвращения инфекционных заболеваний.

Один из новых подходов к созданию вакцин — это вакцины на основе мРНК. мРНК-вакцины имеют ряд весьма полезных преимуществ по сравнению с другими типами вакцин. Во-первых, мРНК-вакцины отличаются безопасностью: мРНК кодирует только целевой антиген, вследствие этого отсутствует потенциальный риск инфицирования, как это может произойти в случае применения аттенуированных и инактивированных вакцин, и уменьшается нагрузка на иммунную систему. Во-вторых, принцип действия мРНК-вакцин заключается в том, что их генетическая информация реализуется только в цитозоле клетки, ядерная локализация не требуется, поэтому вероятность интеграции мРНК в геном организма-хозяина крайне низка. Кроме того, мРНК-вакцины, как и ДНК-вакцины, способны индуцировать клеточный и гуморальный иммунные ответы. И наконец, мРНК — минимальный генетический вектор, поэтому иммунизация не вызывает антивекторного иммунного ответа, и мРНК-вакцины можно вводить повторно. Также мРНК легко выводится из организма, а ее период полужизни *in vivo* можно регулировать с помощью различных модификаций структурных элементов мРНК и способов доставки в клетки [1].

Производство вакцин на основе мРНК при развитой инфраструктуре — это быстрое, недорогое, масштабируемое и однотипное производство. Платформа мРНК-вакцин позволяет легко проводить замену целевого гена, не изменяя технологию производства. Вышеперечисленные преимущества мРНК-вакцин позволяют решить весьма важную проблему вакцинопрофилактики ряда вирусных заболеваний, а именно проблему временного разрыва между началом эпидемии и производством вакцины.

Обзор посвящен технологии получения мРНК-вакцин, в том числе истории мРНК-вакцин, способам повышения стабильности мРНК, описанию модификаций кэпа, поли(А)-хвоста, кодирующей и не кодирующей частей мРНК, очистке целевой мРНК-вакцины от побочных продуктов, а также различным способам доставки.

ИСТОРИЯ мРНК-ВАКЦИН

Первые статьи по получению биологически активной мРНК были опубликованы в 1984 г. Кригом, Мелтоном, Маниатисом и Грином, которые использовали T7 РНК-полимеразу для получения биологически активной мРНК — метод, который по своей сути используется и сегодня. В их число входит статья Крига с соавт., которые ввели полученную мРНК в яйцеклетки лягушек и

показали, что она работает точно так же, как природная мРНК [2]. В 1987 г. Мелтон обнаружил, что мРНК можно использовать как для активации, так и для подавления синтеза белка. И Мелтон, и Криг рассматривали синтетическую мРНК главным образом как исследовательский инструмент для изучения функций и активности генов, т.е. не рассматривали мРНК как платформу для вакцин.

В 1990 г. Вулф с соавт. показали возможность экспрессии синтетической мРНК в организме животных [3]. В своей работе авторы вводили мРНК репортерных генов хлорамфениколацетилтрансферазы, люциферазы и β -галактозидазы мышам и показали образование соответствующих белковых продуктов в организме животных. Последующее исследование, проведенное в 1992 г., продемонстрировало, что введение в гипоталамус мРНК, кодирующей вазопрессин, вызывает физиологический эффект у крыс [4]. После того, как была продемонстрирована способность синтетических мРНК обеспечивать синтез белка в организме, начали появляться публикации об их изучении в качестве средств профилактики и терапии. Однако исследователи столкнулись с рядом проблем — физической нестабильностью мРНК, ее иммуностимулирующими свойствами и трудностями прохождения через клеточную мембрану [5]. Поэтому многие ученые сконцентрировали основное внимание на работе с ДНК ввиду ее высокой природной стабильности и простого получения *in vitro*. В то же время у ДНК-вакцин имеется ряд недостатков, таких как низкая иммуногенность при введении в организм и опасность интеграции в геном клетки-хозяина. мРНК-вакцины этих недостатков лишены, поэтому работы с мРНК также продолжались [6, 7].

В 2000 г. вышла публикация Хорра с соавт., которые сообщили, что прямые инъекции мРНК могут вызывать иммунный ответ у мышей [8]. В этом же году Хорром была основана компания CureVac, где прошли первые испытания мРНК на людях. Главный научный сотрудник компании Стив Пасколо был первым субъектом исследования: он ввел себе мРНК [9].

Неоценимый вклад в развитие мРНК-вакцин как платформы внесла Каталин Карико. В 1999 г. вышла публикация в соавторстве с Дрю Вайсманом, в которой описывалась работа по созданию вакцины против ВИЧ-1 на основе мРНК. К сожалению, синтезированные мРНК при введении мышам вызвали массивные воспалительные реакции [10]. Вскоре авторы выяснили природу этого явления. Оказалось, что синтетическая мРНК активировала ряд клеточных рецепторов, извест-

ных как Toll-подобные рецепторы, которые первыми реагируют на проникновение РНК патогена [11]. В 2005 г. Карико с соавт. сообщили, что включение в состав мРНК аналога уридина — псевдоуридина — не позволяло иммунной системе организма идентифицировать экспериментальную мРНК как чужеродную [12].

Немногие ученые в то время понимали терапевтическую ценность этих модифицированных нуклеотидов, но вскоре научный мир осознал их потенциал [13]. В 2008 г. крупные фармацевтические компании Novartis и Shire создали подразделения по исследованию мРНК: первая сосредоточилась на вакцинах, вторая — на средствах терапии. В это же время к разработкам по созданию на основе мРНК-технологий подключились такие компании, как BioNTech и Moderna. К 2019 г. Moderna разработала девять кандидатных мРНК-вакцин от инфекционных заболеваний, вызываемых такими вирусами, как коронавирус, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, цитомегаловирус, вирусы гриппа, Эпштейна—Барр, иммунодефицита человека, Зика, Нипах. Примерно такой же спектр вакцин разрабатывался немецкой компанией BioNTech. Ни одна из разрабатываемых вакцин не была лицензирована [14].

Прорыв с внедрением вакцин на основе мРНК произошел в начале 2020 г. после возникновения пандемии COVID-19. Так, американские разработчики мРНК-вакцины против коронавируса-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) — компания Moderna Inc. совместно с Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) — создали прототип вакцины mRNA-1273 в беспрецедентно короткие сроки. Потребовалось всего 63 дня от выбора вирусной последовательности для создания вакцины до проведения первой фазы клинических испытаний. Примерно в этих же временных рамках BioNTech в партнерстве с фармацевтической компанией Pfizer также создали мРНК-вакцину от COVID-19 [15].

В результате исследований, проведенных за последние десятилетия, стабильность мРНК и эффективность ее доставки были значительно улучшены. Комбинируя различные модификации структурных элементов мРНК и способы ее доставки в клетки, можно значительно повысить иммуногенность молекул мРНК, что сделало такой подход перспективным для создания вакцин.

ТИПЫ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ РНК

В настоящее время существует два типа РНК-вакцин: на основе нереплицирующейся мРНК и на основе самоамплифицирующейся РНК.

Нереплицирующаяся мРНК-вакцина представляет собой молекулу мРНК, которую получают путем транскрипции *in vitro* с использованием в качестве матрицы плазмидной ДНК, кодирующей целевой иммуноген. Синтезированная мРНК помимо кодирующей последовательности содержит кэп на 5'-конце, нетранслируемые области (UTR) и последовательность поли-А (поли(А)-хвост) на 3'-конце, необходимые для эффективной трансляции, защиты мРНК от экзонуклеаз и правильного сплайсинга транскрипта. Именно на основе нереплицирующихся мРНК были созданы первые разрешенные для человека вакцины против SARS-CoV-2 [16, 17]. Однако проблемы, связанные с нестабильностью мРНК и неэффективностью ее доставки, еще не полностью решены.

Самоамплифицирующиеся РНК (саРНК) представляют собой репликоны, которые включают в себя ген целевого иммуногена, а также элементы генома вируса, обеспечивающие репликацию целевой РНК. Как правило, вирусы, несущие ДНК или РНК, после проникновения в клетку могут копировать ДНК в цитозоле и проникать в ядро. При этом было показано, что для некоторых вирусов характерны репликация и экспрессия в цитозоле [18]. Получаемые репликоны не способны образовывать инфекционные вирусные частицы после инфицирования клетки-хозяина, однако РНК, кодирующая целевой иммуноген, способна к амплификации [19]. Таким образом, увеличивается продукция кодируемого иммуногена по сравнению с нереплицирующимися мРНК. Благодаря устойчивому продуцированию кодируемого иммуногена саРНК при более низкой дозе демонстрируют такой же уровень иммуногенности, как и нереплицирующиеся мРНК. Большинство саРНК получают из одноцепочечных альфа-вирусов с положительной цепью, таких как вирус венозного энцефалита лошадей, вирус Синдбис и вирус леса Семлики [20, 21]. Следует отметить ряд проблем, связанных с использованием вирусных векторов для вакцин. К ним относится иммуногенность самого вектора, которая может вызывать нежелательный иммунный ответ и помешать последующим бустерным введениям вакцины при использовании того же вирусного репликона. Как и в случае с живыми аттенуированными вакцинами, способные к

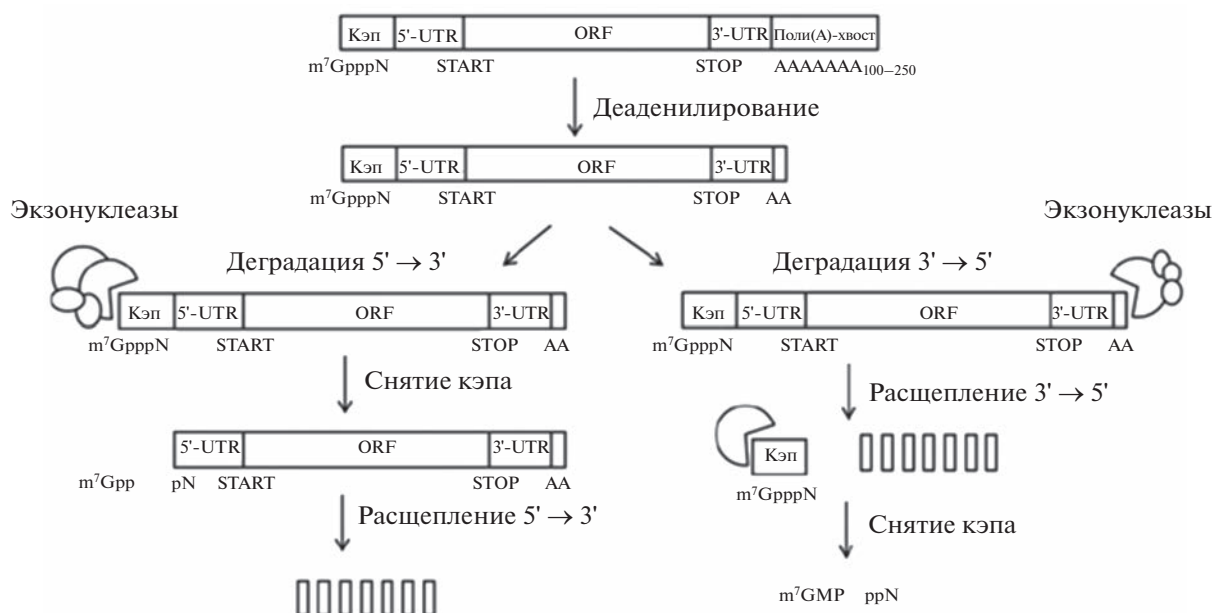


Рис. 1. Схема деградации мРНК. Деградация мРНК происходит в цитоплазме в рибонуклеиновых комплексах, называемых Р-тельцами, которые содержат 5'-3'-экзонуклеазы, декэпирующие и деаденилирующие ферменты. Как только поли(А)-хвост укорачивается до 12 остатков и менее, происходит деградация мРНК путем расщепления кэпа вместе с расщеплением 5' → 3' или 3' → 5' [21]. Также в деградации мРНК могут принимать участие эндонуклеазы (не показаны на рисунке).

репликации альфа-вирусные векторы могут представлять угрозу реактивации вируса [22–24].

В данном обзоре мы рассмотрим особенности получения и доставки нереплицирующихся мРНК-вакцин.

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ мРНК

Известно, что зрелая мРНК эукариот состоит из пяти значимых частей, которые включают в себя кэп на 5'-конце (m^7GpppN (N – любой нуклеотид)), 5'-нетранслируемую область (5'-UTR), открытую рамку считывания (ORF), 3'-нетранслируемую область (3'-UTR) и 3'-хвост из 100–250 адениловых остатков (поли(А)-хвост), длина которого варьирует в различных типах клеток организма [25]. Основная причина нестабильности мРНК по сравнению с ДНК – наличие гидроксильной группы у 2'-углеродного атома рибозы, что способствует гидролитической деградации молекул РНК. Система врожденного иммунитета способна распознавать чужеродную РНК, тем самым запуская механизмы ее деградации. Основной путь деградации мРНК в клетках эукариот представлен на рис. 1.

Таким образом, в классическом варианте экзогенная мРНК нестабильна и низкоиммуногенна, поэтому для мРНК-вакцин применяют раз-

личные модификации каждого элемента мРНК. На рис. 2 схематично показаны основные структурные элементы мРНК, полученной *in vitro* (IVT), которые могут подвергаться модификациям. Известно, что определенные химические модификации могут увеличивать эффективность трансляции мРНК в клетках. Например, для получения мРНК *in vitro* часто используют модифицированные аналоги 5'-кэпа, такие как антиреверсивный аналог кэпа (ARCA) и CleanCap[®], которые обеспечивают правильное присоединение кэпа. Модификации каждого из данных элементов более подробно рассматриваются ниже [5].

Структура кэпа

Нативная мРНК эукариот обладает 5'-кэп-структурой (рис. 3). Кэп представляет собой структуру m^7GpppN , содержащую модифицированный нуклеозид N7-метилгуанозин (m^7G) и связанную 5'-5'-трифосфатным мостиком с первым транскрибированным нуклеотидом. Кэп играет важную роль в нормальном функционировании мРНК, в том числе в стабилизации мРНК в процессах трансляции, сплайсинга, полиаденилирования и ядерного экспорта, а также в защите мРНК от экзонуклеаз. Кэпирование происходит в ядре, когда транскрибируются первые 20–30 нуклеотидов мРНК в результате трех последова-

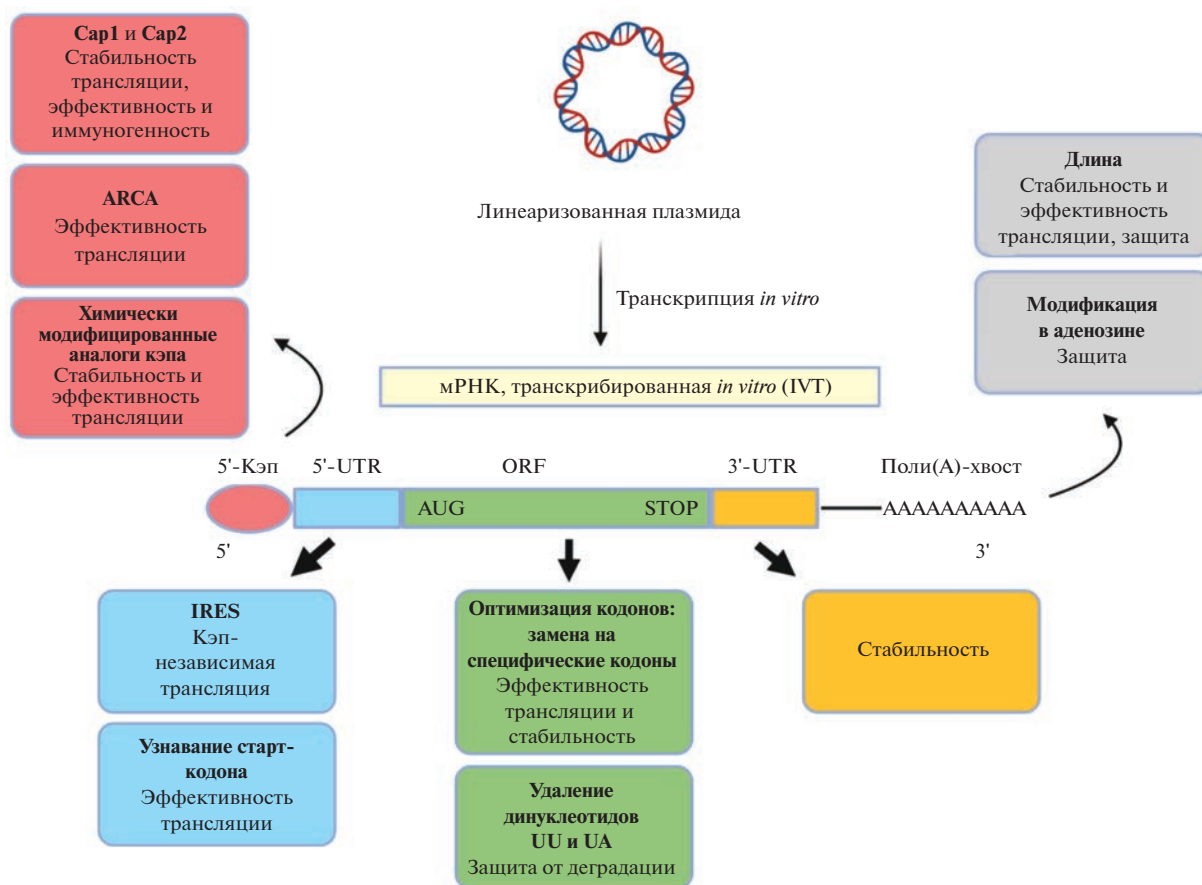


Рис. 2. Схема получения модифицированных мРНК, транскрибированных *in vitro* (IVT). 5'-UTR – 5'-нетранслируемая область, 3'-UTR – 3'-нетранслируемая область, ORF – открытая рамка считывания, ARCA – антиреверсивный аналог кэпа, IRES – участок внутренней посадки рибосомы, AUG – старт-кодон, STOP – стоп-кодон [5].

N7-Метилгуанозин (m7GpppN)

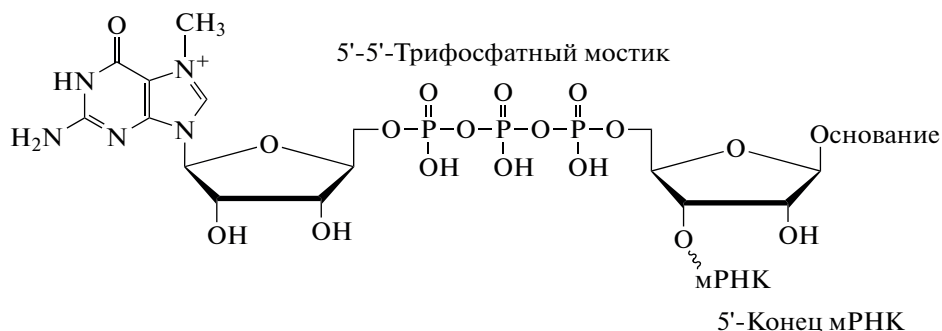


Рис. 3. Структура кэпа (сар0). Кэп – это рибонуклеотид N7-метилгуанозин, соединенный 5'-5'-трифосфатным мостиком с первым нуклеотидным остатком транскрипта.

тельных ферментативных реакций – отщепление фосфатной группы от 5'-концевого нуклеотида транскрипта РНК-трифосфатазой, далее перенос

остатка гуанозинмонофосфата (GMP) на фосфатную группу 5'-концевого нуклеотида гуанил-трансферазой и метилирование остатка гуанина в

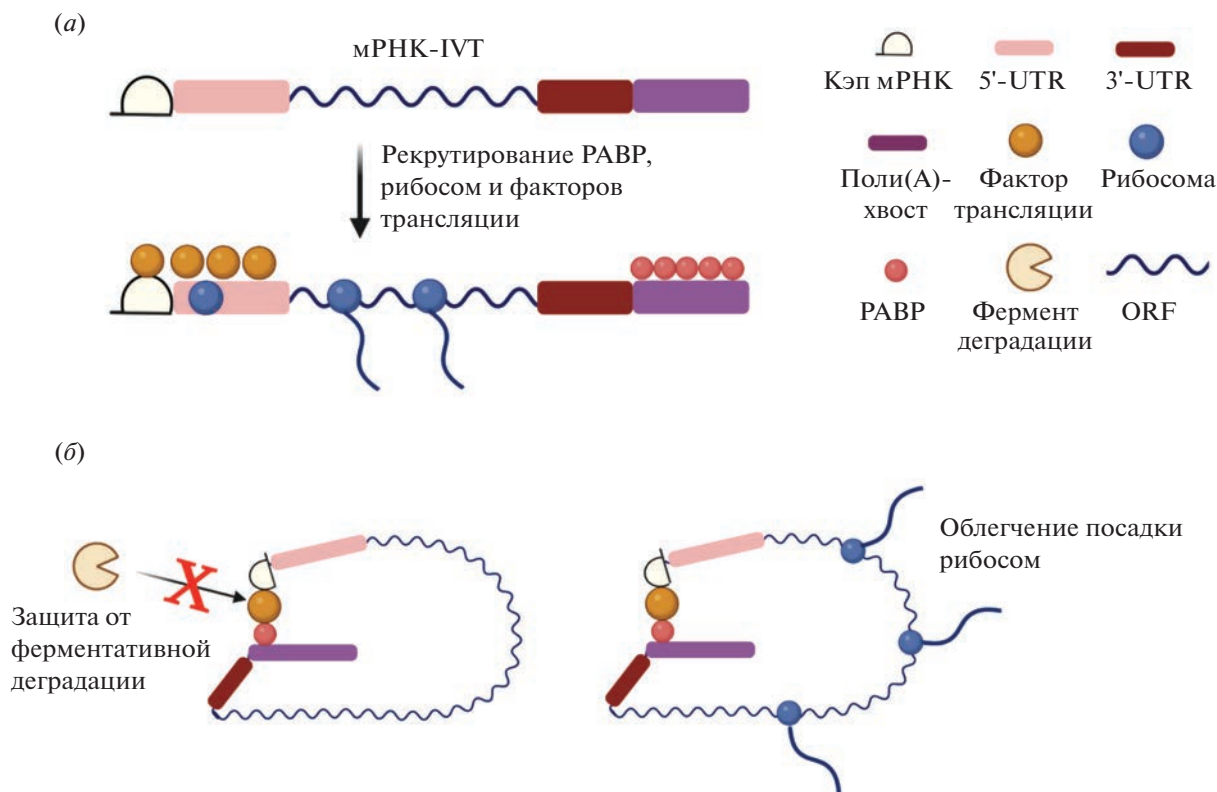


Рис. 4. Модель замкнутой петли мРНК. (а) – мРНК, транскрибируемая *in vitro* (мРНК-IVT), может рекрутировать факторы инициации трансляции, которые связываются с 5'-кэпом и 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR), обеспечивая вход в рибосомы и трансляцию, а также рекрутировать поли(А)-связывающий белок (РАВР) в поли(А)-хвосте; (б) – в модели замкнутой петли сильное взаимодействие между факторами трансляции с обеих сторон мРНК индуцирует образование стабильной петли, которая защищает транскрипты от ферментов, разрушающих РНК, и облегчает повторный вход в рибосомы, тем самым усиливая трансляцию [22].

составе гуанозинтрифосфата (GTP) с образованием N7-метилгуанозина гуанил-N7-метилтрансферазой.

Кэп-структура участвует в трансляции мРНК посредством рекрутирования факторов инициации трансляции (например, 4E (eIF4E), критически важного для инициации трансляции), а также посредством формирования модели замкнутой петли мРНК (рис. 4). Кроме того, кэп взаимодействует с кэп-связывающими белками (СВР), необходимыми для ядерного экспорта мРНК [26].

Помимо сар0 в последние годы были идентифицированы две новые структуры 5'-кэпа, сар1 и сар2, и ферменты, участвующие в их синтезе. В этих случаях m7G-специфическая 2'-O-метилтрансфераза (2'-O-МТаза) метилирует второй или третий рибонуклеотид в положении 2'-O-рибоз, генерируя структуры сар1 или сар2 соответственно. Было показано, что сар1 маскирует мРНК от цитозольных сенсоров RIG-I и MDA5, которые вызывают активацию сигнального пути интерферона типа I, что приводит к деградации мРНК.

Таким образом, мРНК с сар1 меньше подвержена воздействию врожденного иммунного ответа. Соответственно, трансляция мРНК с сар1 и наработка целевого белка в организме происходят более эффективно, чем в случае мРНК с сар0 [27].

Важно заметить, что иммунная система организма распознает некэпированную РНК как чужеродную, т.к. наличие кэпа отличает клеточную мРНК от вирусной [5]. Неправильно кэпированные или некэпированные (5'-ppp или 5'-pp) мРНК распознаются рецепторами распознавания образов (PRR), такими как RIG-I и IFIT, которые запускают синтез интерферонов типа I, что, в конечном счете, приводит к деградации РНК. Поэтому для того, чтобы соответствовать химической структуре мРНК эукариот, синтетические транскрипты РНК должны быть кэпированы. В случае вакцины важно достичь максимальной эффективности кэпирования мРНК (в том числе с помощью очистки конечного продукта), чтобы избежать гиперактивации врожденного иммунитета за счет оставшихся некэпированных или неправильно кэпированных продук-

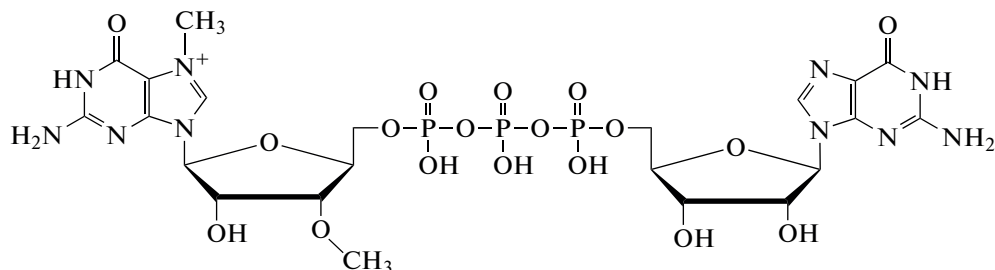


Рис. 5. Структура антиреверсивного аналога кэпа (ARCA).

тов [28]. Кэпирование может быть проведено или после завершения транскрипции — посттранскрипционно (например, с помощью рекомбинантного фермента из вируса осповакцины) или во время транскрипции — котранскрипционно (при введении в общую реакционную смесь аналогов кэпа, таких как ARCA и CleanCap®).

С практической точки зрения при котранскрипционном кэпировании снижается количество этапов при получении мРНК и уменьшается количество ферментов, используемых в работе. Эти факторы имеют решающее значение для снижения стоимости производства мРНК [29]. При этом котранскрипционное кэпирование также имеет ряд ограничений. С одной стороны, не все полученные молекулы мРНК кэпируются из-за конкуренции между аналогом кэпа и гуанозинтрифосфатом (GTP), который выступает инициаторным нуклеотидом. Как следствие, некэпированные РНК могут вызывать нежелательный иммунный ответ. Стратегия снижения такого иммунного ответа заключается в удалении трифосфатов с 5'-конца некэпированной РНК-IVT с помощью фосфатазы. С другой стороны, существует риск встройки аналогов кэпа в обратной ориентации, что препятствует связыванию мРНК с кэп-связывающими белками (СВР) и последующей трансляции [30].

Для решения этих проблем и повышения эффективности трансляции мРНК, транскрибируемой *in vitro*, можно вводить химические модификации (например, присоединение метильных групп) в 3'- или 2'-положение аналогов кэпа. Данные модификации предотвращают появление обратной ориентации кэпа и повышают качество получаемой мРНК. Так, был предложен антиреверсивный аналог кэпа (ARCA), который содержит модифицированную кэп-структуру, представляющую собой динуклеотид $m^{7,3'-O}GpppG$ (рис. 5) [31]. ARCA содержит метильную группу, присоединенную к 3'-ОН нуклеотида m^7G , с по-

мощью которой в ходе синтеза РНК обеспечивается правильное присоединение кэпа [5].

Кроме того, сообщалось, что введение дополнительных модификаций кэпа и удлиненные 5'-5'-фосфатные мостики в ARCA также повышают эффективность трансляции и стабильность мРНК. Принцип действия ARCA представлен на рис. 6 [32].

К настоящему времени структура ARCA была усовершенствована, и был разработан антиреверсивный аналог кэпа второго поколения CleanCap®, с помощью которого можно включить в состав мРНК структуру cap1. Его использование приводит к большим выходам кэпированной мРНК (до 95%) по сравнению с использованием аналогов кэпа первого поколения ARCA. Структура аналога кэпа второго поколения CleanCap® представлена на рис. 7 [29]. CleanCap® используется при получении мРНК-вакцин BNT162b1 и BNT162b2 компании BioNTech/Pfizer [33, 34].

Последовательность поли(А) на 3'-конце мРНК — поли(А)-хвост

Поли(А)-хвост — один из ключевых элементов эффективной трансляции и повышения стабильности мРНК [35]. В клетках млекопитающих наиболее активно транслируемые мРНК содержат 100–250 остатков аденозина [36]. Минимальная длина, при которой начинается трансляция экзогенной мРНК, составляет 20 остатков аденозина [37]. Участие поли(А)-хвоста в процессе трансляции состоит в том, что он связывается с многочисленными полиаденозил-связывающими белками (РАВР), которые в свою очередь связываются с эукариотическим фактором инициации трансляции 4G (eIF4G). Как было сказано выше, образуется кольцевая структура с замкнутой петлей кэп-eIF4E-eIF4G-РАВР-поли(А), которая облегчает присоединение рибосом и защищает мРНК от нуклеазной дегградации [38].

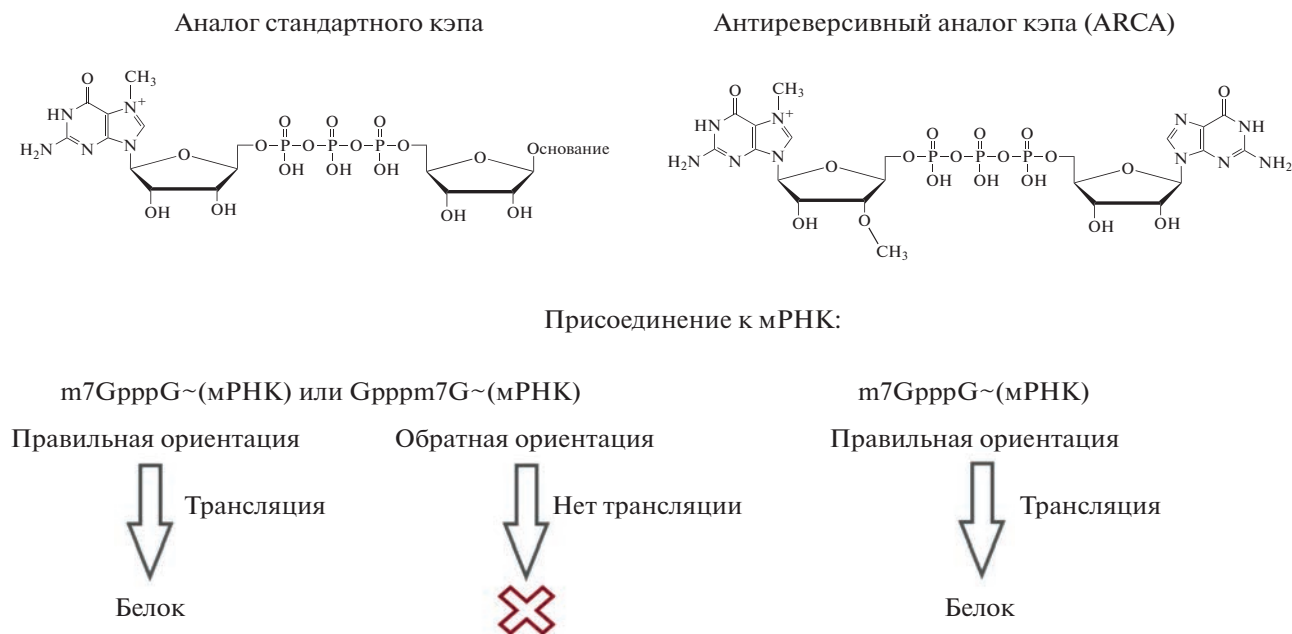


Рис. 6. Схема действия антиреверсивного аналога кэпа (ARCA).

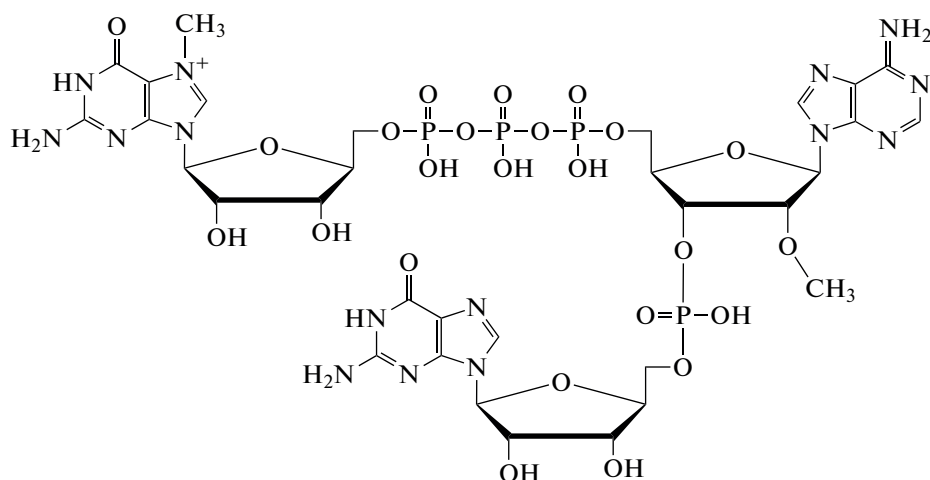


Рис. 7. Структура аналога кэпа второго поколения CleanCap®.

Для мРНК, транскрибируемой *in vitro*, поли(А)-хвост можно получить двумя способами. Первый способ — присоединение остатков аденозина к 3'-концу с помощью ферментативного синтеза с использованием поли(А)-полимеразы, которая позволяет присоединить до 200 остатков аденозина к молекуле мРНК, однако при этом получается гетерогенный продукт. Второй способ — присоединение поли(А)-хвоста с помощью матричного синтеза. В этом случае в ДНК-матрицу закладывается фрагмент с определенным количеством остатков тимидина. Как правило, из-за нестабильности поли(А)-последовательности в

матрице с помощью матричного синтеза удастся добавить не более 120 остатков аденозина [39].

Некодирующие области в составе мРНК

Кодирующая область фланкирована некодирующими областями (UTR) как с 5'-, так и с 3'-конца. Эти области не кодируют белок, но их последовательности, длина и вторичные структуры важны для регуляции трансляции мРНК. Известно, что 5'-UTR участвует в инициации трансляции, тогда как 3'-UTR влияет на стабильность мРНК и эффективность ее элонгации [5].

Большинство мРНК эукариот содержат сигналы распада в 3'-нетранслируемых областях (3'-UTR), которые влияют на их стабильность. Сообщалось, что различные AU-богатые последовательности в 3'-UTR участвуют в удалении поли(А)-хвоста. Время полужизни мРНК увеличивается, когда AU-богатые последовательности заменяются последовательностями 3'-UTR из стабильной мРНК [39]. Например, наличие специфических последовательностей мРНК α -глобина или β -глобина человека (или двух копий 3'-UTR гена β -глобина человека [40]) в этой области увеличивает стабильность мРНК-IVT и продолжительность продукции белка соответственно.

Консенсусная последовательность Козак, расположенная в 5'-UTR, также играет важную роль в инициации процесса трансляции. Последовательность Козак, определяемая как RCCAUGG, где R представляет собой пурин (А или G), считается предпочтительной последовательностью для инициации трансляции. В этой последовательности некоторые нуклеотиды более важные, в частности позиции -3 и $+4$ относительно аденозина стартового кодона AUG. Для повышения эффективности распознавания стартового кодона AUG нуклеотид G должен находиться в положении $+4$, а нуклеотиды А или G – в положении -3 [5].

Оптимизация кодирующей последовательности в составе мРНК

Кодонный состав области, кодирующей последовательность белка, также может влиять на эффективность трансляции и стабильность мРНК. Открытую рамку считывания (ORF) можно модифицировать на уровне кодонов, регулируя скорость элонгации трансляции, либо путем подбора оптимальной вторичной структуры мРНК [28]. Существуют разные стратегии оптимизации кодонов, например, замена нескольких редких кодонов более частыми, кодирующими ту же аминокислоту. Другая стратегия – оптимизация использования дикодонов, другими словами, использование пар кодонов, которые вместе обеспечивают оптимальную трансляцию. Было показано, что уменьшение количества динуклеотидов UU и UA в ORF защищает мРНК-IVT от действия декэпирующих ферментов [41, 42]. Третья стратегия заключается в использовании последовательности ORF с такими же соотношениями кодонов, как во встречающихся в природе высокоэкспрессируемых генах [5].

Оптимальные кодоны рядом с иницирующим кодоном увеличивают скорость элонгации, что приводит к более высокому уровню трансля-

ции мРНК. Напротив, редкие кодоны обеспечивают низкую скорость элонгации, что способствует скоплению рибосом на молекуле мРНК. Это нарушение элонгации позволяет связывать DEAD-Box РНК-геликазу с транскриптом и ускоряет распад мРНК после 5'-декэпирования. В то же время высокая скорость элонгации не всегда желательна. Иногда она может препятствовать правильной укладке кодируемого белка, как это было показано на оптимизированной по кодонному составу мРНК люциферазы светлячка, которая потеряла 50% своей активности [43]. В таких случаях редкие кодоны могут обеспечить более низкую скорость трансляции и, следовательно, нужную укладку белка, что важно для достижения правильной конформации антигена. Следовательно, в зависимости от целевого антигена необходимо использовать разные стратегии оптимизации кодонного состава целевой мРНК. Оптимизация всех кодонов подходит в случае мРНК-вакцин на основе линейных эпитопов. Напротив, сложные антигены могут требовать медленной скорости трансляции для нормальной укладки белковых доменов и получения правильной конформации эпитопов. В любом случае рекомендуется избегать использования редких кодонов в обеих стратегиях для оптимизации биосинтеза белка [28].

Также оптимизацию часто осуществляют путем перекодирования концевых кодонов с U на C. Все U-нуклеотиды в мРНК-вакцинах чаще всего заменяют на N1-метилпсевдоуридин или псевдоуридин, что более подробно описано в следующем разделе. Эти модифицированные нуклеотиды могут быть комплементарны всем остальным нуклеотидам, что в некоторых случаях может приводить к неканоническому спариванию оснований и нарушению первичной структуры кодируемого белка. Например, GAΨ, кодирующий Asp, может спариваться с антикодоном тРНК^{Glu}, что приводит к несинонимичным заменам. Для кодонов с концевым цитозином такой проблемы нет [44].

Модифицированные нуклеозиды в составе мРНК

При введении мРНК в организм следует учитывать, что она может восприниматься как чужеродная и вызывать нежелательный врожденный иммунный ответ, что приводит к деградации мРНК и воспалительным реакциям. И ДНК, и РНК стимулируют врожденный иммунитет млекопитающих путем взаимодействия с рецепторами распознавания образов (PRR), включая Toll-подобные рецепторы (TLR) и сенсоры цитоплазматиче-

ской РНК, такие как белок I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I). Известно, что остатки уридина активируют TLR7, а богатые GU и AU цепи РНК активируют TLR7 и TLR8 [5]. Было идентифицировано 13 TLR, четыре из которых (TLR3 для двухцепочечной РНК (дцРНК), TLR7 и TLR8 для U-богатой одноцепочечной РНК, TLR9 для мотива ДНК CpG) участвуют в распознавании нуклеиновых кислот. Сообщалось, что препараты мРНК-IVT вызывают сильный TNF- α -ответ в дендритных клетках (DC) [45].

Считается, что использование модифицированных нуклеозидов (рис. 8) для транскрипции *in vitro* приводит к значительному подавлению TLR-опосредованной активации дендритных клеток (DC), однако влияние модифицированных нуклеозидов на TLR-независимый иммунный ответ еще не изучено. Модифицированные нуклеозиды могут повышать эффективность мРНК-вакцины двумя разными способами. Во-первых, они предотвращают образование дцРНК во время транскрипции *in vitro*, во-вторых, предотвращают активацию рецепторов распознавания образов (PRR) при введении мРНК в организм [28]. Поскольку многие модифицированные нуклеозиды, такие как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин, 2-тиоуридин, 5-метилцитидин, 6-метиладенозин, инозин, и 2'-O-метилированные нуклеозиды на 5'-концевом экзоне присутствуют в РНК млекопитающих, эти нуклеозиды могут использоваться для снижения нежелательной иммунной реакции на вводимую мРНК [46]. В одобренных вакцинах mRNA-1273 (Moderna) и BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) используется N1-метилпсевдоуридин [16, 17].

В то же время существует другой подход к созданию мРНК-вакцин — без использования модифицированных нуклеозидов. CureVac применила свою технологию получения мРНК для разработки вакцины против SARS-CoV-2, предназначенной для максимальной продукции белка и сбалансированной активации иммунитета. Технология CureVac включает в себя оптимизацию кодирующей части по кодонному составу, нетранслируемых областей в составе мРНК и модификации поли(А)-хвоста: было увеличено GC-содержание в кодирующей части, в состав мРНК включены нетранслируемые области из высокоэкспрессируемых и стабильных мРНК известных генов, вместо классического поли(А)-хвоста использована последовательность “гистоновый ствол—петля”. Так, были разработаны мРНК-вакцины CVnCoV и CV2CoV против SARS-CoV-2. Они состоят из инкапсулированной в липидные наночастицы мРНК, кодирующей полноразмерный S-белок с двумя мутациями пролина (S-2P) [47, 48]. Однако при испытаниях данных вакцин выяснилось, что их эффективность гораздо ниже, чем у мРНК-вакцин с модифицированными нуклеозидами [49].

ОЧИСТКА мРНК-IVT ОТ дцРНК

Одной из причин активации врожденного иммунитета при введении мРНК, полученной *in vitro*, могут быть примеси дцРНК, которые образуются в процессе транскрипции. Было показано, что T7-полимераза часто продуцирует побочные продукты — дцРНК, которые могут активировать цитозольные сенсоры RIG-I и MDA5. дцРНК образуются путем гибридизации смыслового транс-

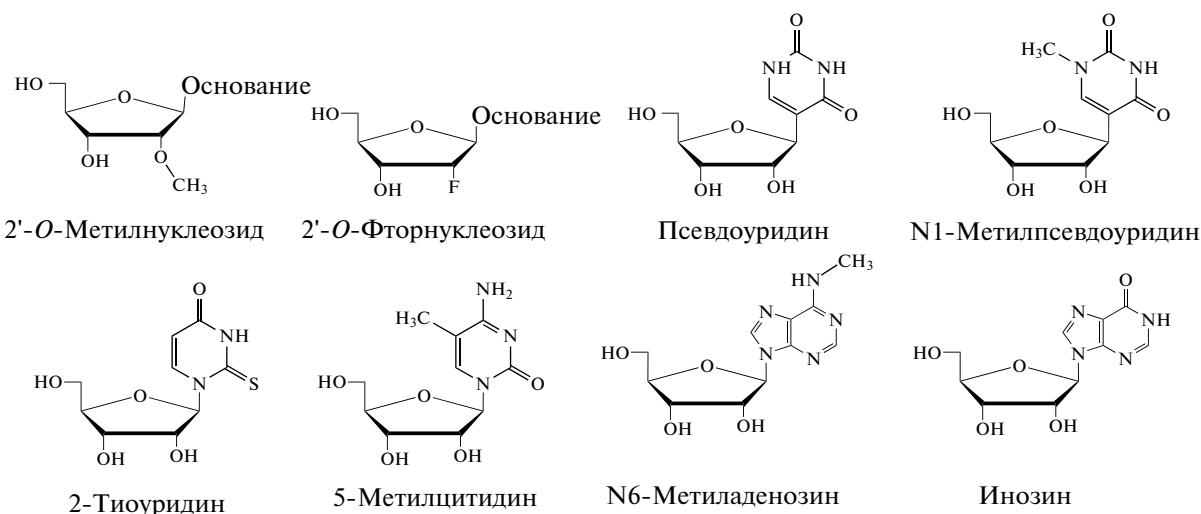


Рис. 8. Структуры модифицированных нуклеозидов.

крипта с его полностью комплементарным антисмысловым транскриптом. Антисмысловая РНК продуцируется путем независимой от промотора инициации транскрипции с 3'-конца (–) ДНК-матрицы [42].

Было показано, что очистка мРНК от примесей дцРНК может привести более чем к 100-кратному увеличению продукции белка в дендритных клетках человека [50].

Очисткой с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) можно удалить из конечного продукта дцРНК, образующуюся в результате транскрипции *in vitro*. Это предотвращает активацию врожденного иммунитета и деградацию мРНК в организме, что, в конечном счете, увеличивает продукцию целевого белка. Однако очистка с использованием ОФ ВЭЖХ имеет очень высокую стоимость, требует сложного оборудования и расходных материалов, характеризуется трудностью масштабирования процесса и необходимостью утилизации опасных отходов [51].

Известен метод очистки, который позволяет избежать проблем, связанных с ОФ ВЭЖХ, и позволяет устранять до 90% дцРНК. Предполагается, что дцРНК селективно связывается с целлюлозой в буфере, содержащем этанол. Этот метод – дешевый, быстрый и масштабируемый, он подходит для очистки большого количества мРНК с использованием быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) без образования токсичных или опасных отходов. Важно, что после внутри-

венной инъекции мышам наблюдаются сравнимые уровни трансляции мРНК, очищенной с помощью ОФ ВЭЖХ и с помощью целлюлозы [50].

ДОСТАВКА мРНК *in vivo*

Для полноценного функционирования мРНК должна избежать внеклеточной деградации нуклеазами, остаться интактной и проникнуть в клетку. Поскольку поглощение индивидуальных нуклеиновых кислот клетками неэффективно, были предложены различные варианты их доставки с использованием как вирусных, так и невирусных систем доставки.

Для невирусной доставки мРНК используются подходы, которые можно разделить на две группы: 1) доставка мРНК, инкапсулированной в липосомы или в различные поликатионные полимеры; 2) доставка мРНК через клеточную мембрану за счет физических воздействий, с использованием электропорации, генных пушек, ультразвука или инъекции под высоким давлением [52]. Эти методы могут использоваться как *in vivo*, так и *in vitro*.

Липидные наночастицы

Липидные наночастицы (LNP) – одна из наиболее часто используемых систем доставки мРНК. LNP часто состоят из четырех компонентов (рис. 9): 1) ионизируемого катионного липида, который обеспечивает самосборку частиц и способствует эндосомному высвобождению мРНК в цитоплазму; 2) липид-связанного полиэтиленгликоля

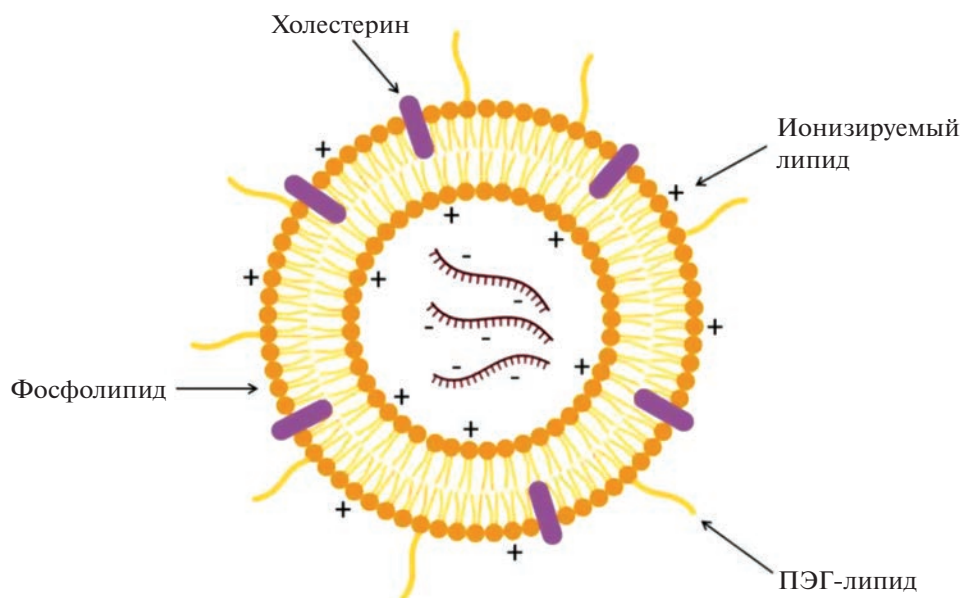


Рис. 9. Структура липидной наночастицы.

(ПЭГ); 3) холестерина, стабилизирующего агента; 4) фосфолипидов, которые поддерживают двухслойную липидную структуру [53, 54]. Уровень и продолжительность трансляции мРНК-LNP-вакцин *in vivo* можно частично контролировать, изменяя способ введения. Было показано, что внутривенное, внутримышечное и подкожное введение комплексов мРНК-LNP вызывает пролонгированную продукцию белка в месте инъекции [55].

Как показано на рис. 10, система доставки мРНК должна взаимодействовать с клеткой-мишенью и проникнуть через цитоплазматическую мембрану в цитоплазму, а после — обеспечить высвобождение мРНК в цитоплазму, чтобы далее она могла достичь рибосом.

Прикрепление компонентов доставки к поверхности клетки может происходить за счет электростатических взаимодействий между компонентами и поверхностью мембраны. Связывание можно улучшить путем включения в системы доставки лигандов, способных взаимодействовать со специфическими рецепторами на клеточной поверхности [56].

Основной механизм проникновения системы доставки мРНК в клетку — эндоцитоз. Он включает множество сложных процессов, которые определяют внутриклеточную локализацию мРНК. мРНК попадают в эндосомы за счет инвагинации клеточной мембраны. Эндосомы созревают и сливаются с лизосомами, где кислая среда и присутствие гидролитических ферментов могут разрушать систему доставки и нуклеиновую кислоту. Следовательно, компоненты доставки должны обеспечивать оптимальный временной промежуток от выхода мРНК из эндосом до деградации нуклеиновой кислоты, т.к. он выступает решающим для успешного действия мРНК [5].

Механизмы высвобождения мРНК из искусственных липидных наночастиц в цитоплазму изучены не полностью. Было показано, что LNP интернализируются по механизму, включающему как клатрин-зависимый эндоцитоз, так и макропиноцитоз [57].

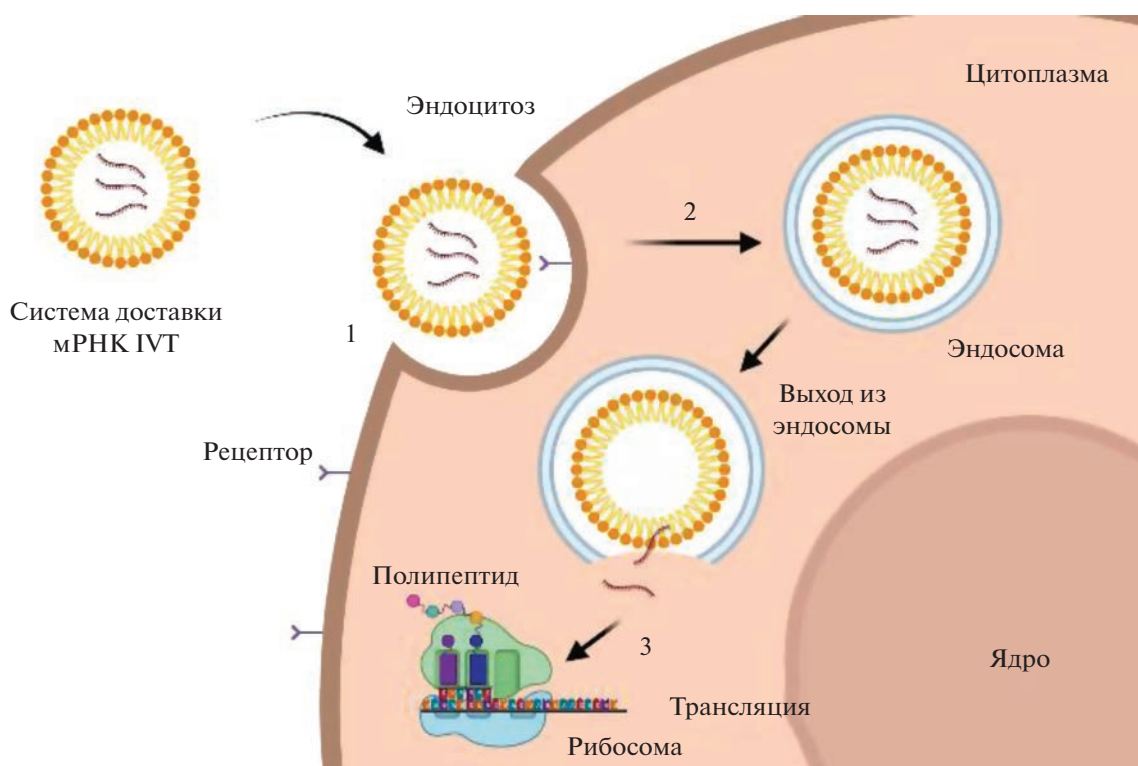


Рис. 10. Внутриклеточные барьеры для доставки мРНК, транскрибированной *in vitro* (IVT): 1 — взаимодействие между системой доставки и клеточной мембраной, 2 — эндоцитоз, 3 — эндосомный выход и высвобождение мРНК для запуска процесса трансляции. Эндоцитоз — механизм интернализации внеклеточных компонентов и фрагментов плазматической мембраны, которая формирует эндоцитозный пузырек. В этом процессе участвуют везикулы, известные как эндосомы, с внутренним pH ~ 5, которые созревают от ранних эндосом к поздним эндосомам перед слиянием с внутриклеточными органеллами — лизосомами. Таким образом, частицы, проникающие в клетки посредством эндоцитоза, захватываются эндосомами и в конечном итоге попадают в лизосомы, где происходят активные процессы ферментативной деградации [5, 46].

В настоящее время существуют одобренные мРНК-вакцины против COVID-19, которые доставляют мРНК, кодирующую S-белок SARS-CoV-2, с помощью LNP. К ним относятся вакцины mRNA-1273 (Moderna) и BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) [58]. Состав LNP этих вакцин представлен в табл. 1. Структурные формулы компонентов, входящих в состав LNP, представлены на рис. 11.

Для доставки кандидатных мРНК-вакцин CVnCoV (CureVac) и ARCoV (Walvax), которые проходят клинические испытания, используются LNP другого состава (табл. 2) [59, 60].

Основная проблема доставки мРНК с помощью липидных наночастиц связана с природой липидов [61]. В частности, положительно заряженные липидные частицы могут связываться с отрицательно заряженными белками и нуклеино-

выми кислотами и прилипать к поверхности клеток, что дестабилизирует плазматическую мембрану и приводит к развитию побочных эффектов у вакцинируемого пациента [62, 63]. Липидные компоненты могут вызывать иммунные реакции организма-хозяина после системного или местного введения; например, ПЭГ-липиды могут стимулировать систему комплемента. Кроме того, антитела против ПЭГ могут привести к быстрому выведению ПЭГилированных наночастиц из организма. Это может изменить биодоступность и биораспределение препарата, инкапсулированного в ПЭГилированные наночастицы, и, таким образом, вызывать побочные эффекты. Также сообщалось, что катионные и ионизируемые липиды стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода.

Таблица 1. Состав липидных наночастиц в вакцинах mRNA-1273 (Moderna) и BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) [58]

Вакцина	mRNA-1273	BNT162b2
Производитель	Moderna	BioNTech/Pfizer
Доза мРНК, мкг	100	30
Компоненты	SM-102 Дистеароилфосфатидилхолин Холестерин DMG-PEG2000	ALC-0315 Дистеароилфосфатидилхолин Холестерин ALC-0159
Ионизируемые катионные липиды : нейтральные липиды : холестерин : ПЭГ-липиды (молярное соотношение, %)	50 : 10 : 38.5 : 1.5	46.3 : 9.4 : 42.7 : 1.6

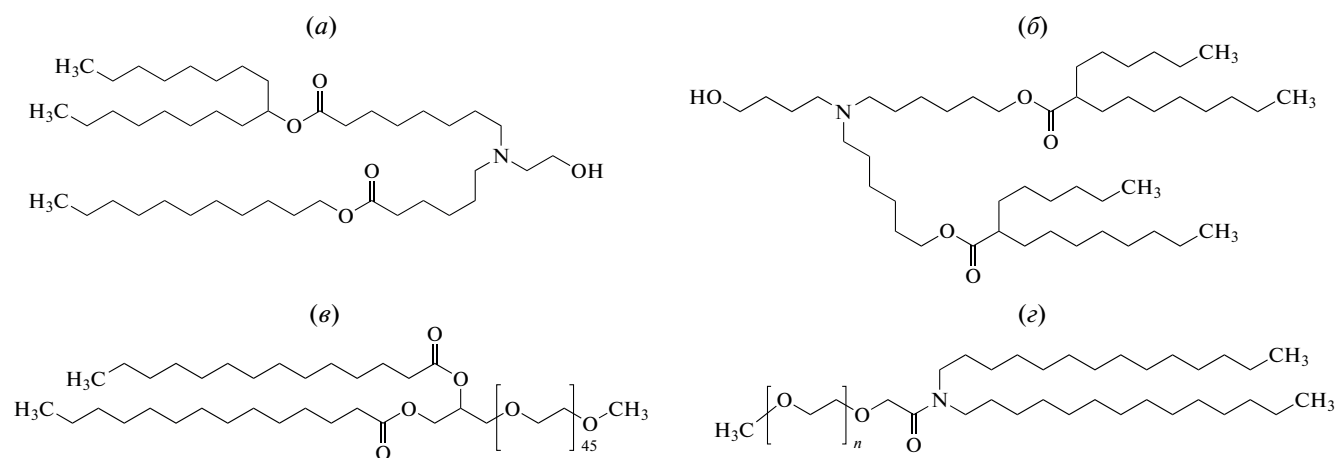


Рис. 11. Структуры компонентов, входящих в состав LNP: (а) – SM-102 – (гептадекан-9-ил-8-((2-гидроксиэтил)(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил)амино)октаноат)); (б) – ALC-0315 – ((4-гидроксibuтил)азанедиил)бис(гексан-6,1-ди-ил)бис(2-гексилдеcanoат); (в) – DMG-PEG2000 – 1-монометоксиполиэтиленгликоль-2,3-димиристилглицерин с полиэтиленгликолем средней молекулярной массы 2000; (г) – ALC-0159 – 2-[(полиэтиленгликоль)-2000]-N,N-дитетра-децилацетамид.

Таблица 2. Состав липидных наночастиц в вакцинах CVnCoV (CureVac) и ARCoV (Walvax) [59, 60]

Вакцина	CVnCoV	ARCoV
Производитель	CureVac	Walvax
Доза мРНК, мкг	12	5, 10, 15, 20 и 25
Компоненты	Катионный липид (Acuitas Therapeutics) Фосфолипид Холестерин Конъюгат ПЭГ-липид	Катионный липид (нет данных) Дистеароилфосфатидилхолин Холестерин Конъюгат ПЭГ-липид
Ионизируемые катионные липиды : нейтральные липиды : холестерин : ПЭГ-липиды (молярное соотношение, %)	50 : 10 : 38.5 : 1.5	50 : 10 : 38.5 : 1.5

Хотя иммуногенность этих липидов еще полностью не изучена, система комплемента и Toll-подобные рецепторы могут участвовать в активации врожденного иммунитета. Цитотоксичность липидных материалов также представляет проблему. Сообщалось, что применение липидных наночастиц *in vivo* вызывает повреждение печени и легких у грызунов, что может быть связано с цитотоксичностью и индукцией провоспалительных факторов [64].

Данные проблемы решают с помощью различных модифицированных компонентов липидных наночастиц [65], однако это увеличивает стоимость их производства и усложняет состав. Другая проблема липидных наночастиц заключается в том, что они чувствительны к замораживанию и оттаиванию, хранение и перевозку необходимо осуществлять при -80°C , что затрудняет их использование для массовой вакцинации [66, 67].

Поликатионные полимеры

Полимерные материалы не так широко применяются для доставки нуклеиновых кислот, как липиды. По сравнению с липидами, при использовании полимерных материалов возникает ряд дополнительных проблем, например, трудности биоразложения полимеров с большой молекулярной массой. Тем не менее проводятся исследования, посвященные решению этих проблем. Например, низкомолекулярный поли(иминоэтилен) (PEI), модифицированный цепями жирных кислот, используется для доставки мРНК для снижения токсичности высокомолекулярного PEI. Полимеры поли(гликоамидамина), модифицированные цепями жирных кислот, такие как TarN3C10, который содержит тартратный остов (состоящий из эфиров и солей винной кислоты),

показали свою эффективность в доставке мРНК эритропоэтина у мышей [68].

Полиметакрилаты с боковыми цепями, несущими амин, полиаспартамиды с олигоаминоэтиленовыми боковыми цепями и полиакриловые кислоты, амидированные тетрамином с чередующимися этилпропилэтиловыми спейсерами, также могут доставлять мРНК в клетки. Были получены данные о саморазлагающихся эфирах, которых авторы называли высвобождаемыми переносчиками с изменяющимся зарядом (CART). Эти полимеры способны высвобождать мРНК после перегруппировки с последующей деградацией при pH 7.4. Известны биоразлагаемые аминополиэферы (APE), способные селективно доставлять мРНК в ткани [69].

Также интересным объектом для исследования служит хитозан – биоразлагаемый биосовместимый полимер, который представляет собой производное хитина, полученное путем удаления ацетатной части хитина. Хитозан имеет химические функциональные группы, которые можно модифицировать для достижения конкретных целей, что делает его полимером с огромным спектром потенциальных применений. Наночастицы на основе хитозана и его производных, обычно обладают положительным поверхностным зарядом и мукоадгезивными свойствами, поэтому они могут прикрепляться к слизистым оболочкам и высвобождать лекарственное средство [70].

Дендримеры, такие как полиамидамин (РАМАМ) или производные полипропиленимина, исследуются для доставки нуклеиновых кислот. Были синтезированы дендримеры РАМАМ, модифицированные цепями жирных кислот, для доставки малых интерферирующих РНК, которые впоследствии были использованы для разра-

ботки внутримышечно доставляемой самореплицирующейся платформы мРНК-вакцин для экспрессии антигенов вируса Эбола, гриппа H1N1, *Toxoplasma gondii* и вируса Зика [71]. Дендримеры РАМАМ могут улучшать растворимость в воде, стабильность, нацеливание и фармакокинетику различных лекарств. Дендримеры благодаря своей многофункциональности могут быть использованы в качестве альтернативной платформы для доставки лекарств следующего поколения [72]. Однако при использовании данной платформы доставки возникает ряд проблем. Поскольку повторяющиеся дендримерные единицы разветвляются в виде древовидной формы, их ферментативное биоразложение может быть затруднено из-за стерических факторов, что приводит к токсичности, связанной с накоплением этих материалов в тканях [73].

Наряду с известными агентами, разрабатываются и другие материалы для доставки мРНК, которые могут обеспечить безопасность и эффективность вакцины, а также облегчить ее хранение и транспортировку. В частности, в ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” был разработан конъюгат полиглюкин–спермидин (PGS) в качестве носителя вакцины мРНК-RBD, кодирующей рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка SARS-CoV-2 [74].

PGS содержит только два компонента, полиглюкин и спермидин, и позволяет лиофилизировать нуклеиновую кислоту и хранить ее в течение длительного времени при положительных температурах. Было продемонстрировано, что ДНК-вакцина, инкапсулированная в PGS, сохраняется без потери специфической активности не менее двух лет при 4°C. Конъюгат PGS — компонент ДНК-вакцины против ВИЧ-1, и его безопасность подтверждена доклиническими исследованиями и клиническими испытаниями фазы I [75, 76].

Важное преимущество — биоразлагаемость компонентов PGS и их безопасность для человека. Полиглюкин (полимер глюкозы с молекулярной массой 40000) нетоксичен для человека и выступает лицензированным плазмозамещающим препаратом гемодинамического действия, восстанавливающим объем циркулирующей крови. Показано, что оболочка из полиглюкина защищает дрожжевую дцРНК от деградации под действием нуклеаз сыворотки [77]. Спермидин — это встречающийся в природе полиамин, обнаруженный во всех живых организмах; он важен для поддержания клеточного гомеостаза и участвует во многих биологических процессах, включая рост и пролиферацию клеток, стабилизацию ДНК и РНК и регуляцию трансляции [78, 79]. Кроме того, низкая стоимость компонентов, возможность

лиофилизации и хранения конъюгата PGS при 4°C обеспечивают дополнительные технологические преимущества при производстве и транспортировке вакцин.

Предполагается, что комплекс мРНК–PGS попадает в антиген-презентирующие клетки путем эндоцитоза благодаря своему размеру, сопоставимому со средним размером вирусных частиц (100–200 нм). Кроме того, упаковка в PGS защищает мРНК от деградации нуклеазами, что в конечном итоге приводит к увеличению иммунного ответа. Исследования показали, что предложенный поликатионный конъюгат полиглюкин–спермидин можно рассматривать как многообещающее и безопасное средство доставки мРНК-вакцин, в частности мРНК-вакцин против SARS-CoV-2 [80].

Физические способы доставки

Для повышения эффективности прямой трансфекции используют различные физические манипуляции [52, 81]. Для прямой доставки нуклеиновых кислот в клетки как *in vivo*, так и *in vitro* могут применяться методы с использованием электропорации, генных пушек, ультразвука или инъекции под высоким давлением. Один из наиболее эффективных методов доставки мРНК — электропорация. Поскольку мРНК не требует ядерной локализации, можно применять мягкие электрические импульсы для снижения клеточной токсичности. Еще одно преимущество электропорации — это прямая доставка мРНК в цитозоль, которая может предотвратить нежелательный иммунный ответ [82].

В настоящее время исследуются и другие способы доставки, кроме представленных выше. Хотя в данной области удалось добиться большого успеха, есть предположение, что наиболее эффективным будет сочетание различных систем доставки мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

мРНК-вакцины стали перспективной платформой для создания средств профилактики инфекционных заболеваний, поскольку они обладают существенными преимуществами по сравнению с другими типами вакцин. В первую очередь это безопасность: мРНК, в отличие от классических вирусных вакцин, неинфекционны и обладают низкой реактогенностью. мРНК-вакцины способны эффективно активизировать специфический клеточный и гуморальный иммунные ответы, но не вызывают антивекторный иммунный ответ. Существенное преимущество

мРНК-вакцин – быстрое недорогое масштабируемое и однотипное производство, обеспечивающее высокие выходы желаемого продукта в условиях *in vitro*. Платформа мРНК-вакцин позволяет легко проводить замену целевого гена, не изменяя технологию производства, что важно для решения проблемы временного разрыва между началом эпидемии и производством вакцины.

В данном обзоре описаны основные модификации мРНК-вакцин, направленные на повышение эффективности их действия, и особенности доставки. Для повышения стабильности применяя модификации кэпа, поли(А)-хвоста, кодирующей и некодирующей частей мРНК. Кроме того, важный этап – очистка целевой мРНК-вакцины от побочных продуктов (дцРНК). Для доставки мРНК в клетки используют как вирусные, так и невирусные системы доставки. Среди невирусных систем доставки выделяют инкапсуляцию мРНК в липосомы (LNP) и различные поликатионные полимеры, а также доставку мРНК через клеточную мембрану за счет физических воздействий, с использованием электропорации, генных пушек, ультразвука или инъекции под высоким давлением.

Благодаря достижениям в области повышения стабильности и эффективности трансляции мРНК-вакцин, увеличения эффективности доставки мРНК в клетки мРНК-вакцины стали перспективными средствами для широкого применения против вирусных заболеваний, вызванных такими вирусами, как коронавирус, вирусы гриппа, иммунодефицита человека и др.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии “Вектор” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований, выполненных авторами данной работы, с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pardi N., Hogan M.J., Porter F.W., Weissman D. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018. V. 17. P. 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
2. Melton D.A., Krieg P.A., Rebagliati M.R., Maniatis T., Zinn K., Green M.R. // *Nucleic Acids Res.* 1984. V. 12. P. 7035–7056. <https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7035>
3. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. // *Science.* 1990. V. 247. P. 1465–1468. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>
4. Jirikowski G.F., Sanna P.P., Maciejewski-Lenoir D., Bloom F.E. // *Science.* 1992. V. 255. P. 996–998. <https://doi.org/10.1126/science.1546298>
5. Gómez-Aguado I., Rodríguez-Castejón J., Vicente-Pascual M., Rodríguez-Gascón A., Solinís M.Á., Pozo-Rodríguez A. // *Nanomaterials.* 2020. V. 10. P. 364. <https://doi.org/10.3390/nano10020364>
6. Kwon H., Kim M., Seo Y., Moon Y.S., Lee H.J., Lee K., Lee H. // *Biomaterials.* 2018. V. 156. P. 172–193. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.034>
7. Горяев А.А., Савкина М.В., Обухов Ю.И., Меркулов В.А., Олефир Ю.В. // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019. Т. 19. С. 72–80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-72-80>
8. Hoerr I., Obst R., Rammensee H.-G., Jung G. // *Eur. J. Immunol.* 2000. V. 30. P. 1–7. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200001\)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200001)30:1<1::AID-IMMU1>3.0.CO;2-%23)
9. Probst J., Weide B., Scheel B., Pichler B.J., Hoerr I., Rammensee H.-G., Pascolo S. // *Gene Ther.* 2007. V. 14. P. 1175–1180. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302964>
10. Kariko K., Kuo A., Barnathan E.S. // *Gene Ther.* 1999. V. 6. P. 1092–1100. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300930>
11. Karikó K., Ni H., Capodici J., Lamphier M., Weissman D. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 12542–12550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310175200>
12. Karikó K., Buckstein M., Ni H., Weissman D. // *Immunity.* 2005. V. 23. P. 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
13. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., Daley G.Q., Brack A.S., Collins J.J., Cowan C., Schläeger T.M., Rossi D.J. // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 7. P. 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
14. Moderna. Product Pipeline. <https://www.modernatx.com/pipeline>
15. Dolgin E. // *Nature.* 2021. V. 597. P. 318–324. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02483-w>
16. Corbett K.S., Edwards D.K., Leist S.R., Abiona O.M. // *Nature.* 2020. V. 586. P. 567–571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
17. Vogel A.B., Kanevsky I., Che Y., Swanson K.A., Muik A. // *Nature.* 2021. V. 592. P. 283–289. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03275-y>

18. Bitzer M., Armeanu S., Lauer U.M., Neubert W.J. // *J. Gene Med.* 2003. V. 5. P. 543–553.
<https://doi.org/10.1002/jgm.426>
19. Bloom K., van den Berg F., Arbuthnot P. // *Gene Ther.* 2021. V. 28. P. 117–129.
<https://doi.org/10.1038/s41434-020-00204-y>
20. Mu Z., Haynes B.F., Cain D.W. // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 134.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9020134>
21. Melo M., Porter E., Zhang Y., Silva M., Li N., Dobosh B., Liguori A., Skog P., Landais E., Menis S., Sok D., Nemaee D., Schief W.R., Weiss R., Irvine D.J. // *Mol. Ther.* 2019. V. 27. P. 2080–2090.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.007>
22. Lundstrom K. // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 317.
<https://doi.org/10.3390/v13020317>
23. Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G. // *Sig. Transduct Target Ther.* 2021. V. 6. P. 1–24.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
24. Ghosh S., Brown A.M., Jenkins C., Campbell K. // *Appl. Biosaf.* 2020. V. 25. P. 7–18.
<https://doi.org/10.1177/1535676019899502>
25. Youn H., Chung J.K. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015. V. 15. P. 1337–1348.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1057563>
26. Ogino T., Green T.J. // *Viruses.* 2019. V. 11. P. 504.
<https://doi.org/10.3390/v11060504>
27. Ramanathan A., Robb G.B., Chan S.H. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 7511–7526.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
28. Linares-Fernández S., Lacroix C., Exposito J.Y., Verrier B. // *Trends Mol. Med.* 2020. V. 26. P. 311–323.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.10.002>
29. Henderson J.M., Ujita A., Hill E., Yousif-Rosales S., Smith C., Ko N., McReynolds T., Cabral C.R., Escamilla-Powers J.R., Houston M.E. // *Curr. Protoc.* 2021. V. 1. P. e39.
<https://doi.org/10.1002/cpz1.39>
30. Pasquinelli A.E., Dahlberg J.E., Lund E. // *RNA.* 1995. V. 1. P. 957–967.
31. Stepinski J., Wandell C., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. // *RNA.* 2001. V. 7. P. 1486–1495.
<https://doi.org/undefined>
32. Strenkowska M., Kowalska J., Lukaszewicz M., Zuberek J., Su W., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E., Jemielity J. // *New J. Chem.* 2010. V. 34. P. 993–1007.
<https://doi.org/10.1039/b9nj00644c>
33. Sahin U., Muik A., Derhovanessian E., Vogler I., Kranz L.M. // *Nature.* 2020. V. 586. P. 594–599.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>
34. Pascolo S. // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 270.
<https://doi.org/10.3390/v13020270>
35. Chang H., Lim J., Ha M., Kim V.N. // *Mol. Cell.* 2014. V. 53. P. 1044–1052.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.007>
36. Li B., Zhang X., Dong Y. // *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019. V. 11. P. e1530.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1530>
37. Jalkanen A.L., Coleman S.J., Wilusz J. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014. V. 34. P. 24–32.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.05.018>
38. Newbury S.F. // *Biochem. Soc. Trans.* 2006. V. 34. P. 30–34.
<https://doi.org/10.1042/bst20060030>
39. Klausner R.D., Rouault T.A., Harford J.B. // *Cell.* 1993. V. 72. P. 19–25.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90046-S](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90046-S)
40. Linares-Fernández S., Moreno J., Lambert E. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2021. V. 26. P. 945–956.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.10.007>
41. Al-Saif M., Khabar K.S.A. // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. P. 954–959.
<https://doi.org/10.1038/mt.2012.29>
42. Mauro V.P., Chappell S.A. // *Trends Mol. Med.* 2014. V. 20. P. 604–613.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.09.003>
43. Spencer P.S., Siller E., Anderson J.F., Barral J.M. // *J. Mol. Biol.* 2012. V. 422. P. 328–335.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.010>
44. Xia X. // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 734.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9070734>
45. Yamamoto A., Kormann M., Rosenecker J., Rudolph C. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009. V. 71. P. 484–489.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.016>
46. Mu X., Greenwald E., Ahmad S., Hur S. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 5239–5249.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky177>
47. Rauch S., Roth N., Schwendt K., Fotin-Mleczek M., Mueller S.O., Petsch B. // *Vaccines.* 2021. V. 6. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41541-021-00311-w>
48. Gebre M.S., Rauch S., Roth N., Yu J., Chandrashekar A., Mercado N.B., He X., Liu J., McMahan K., Martinot A., Martinez D.R., Giffin V., Hope D., Patel S., Sellers D., Sanborn O., Barrett J., Liu X., Cole A.C., Pessaint L., Valentin D., Flinchbaugh Z., Yalley-Ogunro J., Muench J., Brown R., Cook A., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Boon A.C.M., Baric R.S., Mueller S.O., Petsch B., Barouch D.H. // *Nature.* 2022. V. 601. P. 410–414.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04231-6>
49. CureVac. RNA – Revolution für das Leben.
<https://www.curevac.com/en/2021/06/16/curevac-provides-update-on-phase-2b-3-trial-of-first-generation-covid-19-vaccine-candidate-cvncov/>
50. Kariko K., Muramatsu H., Ludwig J., Weissman D. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. P. e142.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr695>
51. Baidersdorfer M., Boros G., Muramatsu H., Mahiny A., Vlatkovic I., Sahin U., Karikó K. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2019. V. 15. P. 26–35.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.018>
52. Li S., Ma Z. // *Curr. Gene Ther.* 2001. V. 1. P. 201–226.
<https://doi.org/10.2174/1566523013348814>
53. Guan S., Rosenecker J. // *Gene Ther.* 2017. V. 24. P. 133–143.
<https://doi.org/10.1038/gt.2017.5>

54. Reichmuth A.M., Oberli M.A., Jaklenec A., Langer R., Blankschtein D. // *Ther. Deliv.* 2016. V. 7. P. 319–334. <https://doi.org/10.4155/tde-2016-0006>
55. Bahl K., Senn J.J., Yuzhakov O., Bulychev A., Brito L.A., Hassett K.J., Laska M.E., Smith M., Almarsson Ö., Thompson J., Ribeiro A., Watson M., Zaks T., Ciaramella G. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. P. 1316–1327. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.035>
56. Varkouhi A.K., Scholte M., Storm G., Haisma H.J. // *J. Control. Release.* 2011. V. 151. P. 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.004>
57. Gilleron J., Querbes W., Zeigerer A., Borodovsky A., Marsico G., Schubert U., Manygoats K., Seifert S., Andree C., Stöter M., Epstein-Barash H., Zhang L., Kotliansky V., Fitzgerald K., Fava E., Bickle M., Kalaidzidis Y., Akinc A., Maier M., Zerial M. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 638–646. <https://doi.org/10.1038/nbt.2612>
58. Li M., Li Y., Li S., Jia L., Wang H., Li M., Deng J., Zhu A., Ma L., Li W., Yu P., Zhu T. // *Eur. J. Med. Chem.* 2022. V. 227. P. 113910. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113910>
59. Schoenmaker L., Witzigmann D., Kulkarni J.A., Verbeked R., Kersten G., Jiskootae W., Crommelin D.J.A. // *Int. J. Pharm.* 2021. V. 601. P. 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
60. Chen G.L., Li X.F., Dai X.H., Li N., Cheng M.L., Huang Z. // *The Lancet Microbe.* 2022. V. 3. P. E193–E202. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00280-9](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00280-9)
61. Pardi N., Tuyishime S., Muramatsu H., Kariko K., Mui B.L., Tam Y.K., Madden T.D., Hope M.J., Weissman D. // *J. Control. Release.* 2015. V. 217. P. 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>
62. Yi Xue H., Guo P., Wen W.-C., Lun Wong H. // *Curr. Pharm. Des.* 2015. V. 21. P. 3140–3147. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150531164540>
63. Sedic M., Senn J.J., Lynn A., Laska M., Smith M., Platz S.J., Bolen J., Hoge S., Bulychev A., Jacquinet E., Bartlett V., Smith P.F. // *Vet. Pathol.* 2018. V. 55. P. 341–354. <https://doi.org/10.1177/0300985817738095>
64. Hou X., Zaks T., Langer R., Dong Y. // *Nat. Rev. Mater.* 2021. V. 6. P. 1078–1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
65. Zhuang X., Qi Y., Wang M., Yu N., Nan F., Zhang H., Tian M., Li C., Lu H., Jin N. // *Vaccines.* 2020. V. 8. P. 123. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010123>
66. Chang H.I., Yeh M.K. // *Int. J. Nanomed.* 2012. V. 7. P. 49. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26766>
67. Ball R.L., Bajaj P., Whitehead K.A. // *Int. J. Nanomed.* 2017. V. 12. P. 305. <https://doi.org/10.2147/IJN.S123062>
68. Dong Y., Dorkin J.R., Wang W., Chang P.H., Webber M.J., Tang B.C., Yang J., Abutbul-Ionita I., Danino D., DeRosa F., Heartlein M., Langer R., Anderson D.G. // *Nano Lett.* 2016. V. 16. P. 842–848. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02428>
69. Kowalski P.S., Palmiero U.C., Huang Y., Rudra A., Langer R., Anderson D.G. // *Adv. Mater.* 2018. V. 30. P. 1801151. <https://doi.org/10.1002/adma.201801151>
70. Mohammed M.A., Syeda J.T.M., Wasan K.M., Wasan E.K. // *Pharmaceutics.* 2017. V. 9. P. 53. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>
71. Moura L.I.F., Malfanti A., Peres C., Matos A.I., Guegain E., Sainz V., Zloh M., Vicent M.J., Florindo H.F. // *Mater. Horiz.* 2019. V. 6. P. 1956–1973. <https://doi.org/10.1039/c9mh00628a>
72. Chauhan A.S. // *Molecules.* 2018. V. 23. P. 938. <https://doi.org/10.3390/molecules23040938>
73. Islam M.A., Xu Y., Tao W., Ubellacker J.M., Lim M. // *Nat. Biomed. Eng.* 2018. V. 2. P. 850–864. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0284-0>
74. Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Starostina E.V., Zadorozhny A.M., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Baranov K.O., Volkova N.V., Zaitsev B.N., Orlova L.A., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Danilenko E.D., Bazhan S.I., Shcherbakov D.N., Taranin A.V., Ilyichev A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 2188. <https://doi.org/10.3390/ijms23042188>
75. Lebedev L.R., Karpenko L.I., Poryvaeva V.A., Azaev M.S., Ryabchikova E.I., Gileva I.P., Ilyichev A.A. // *Mol. Biol.* 2000. V. 34. P. 413–417. <https://doi.org/10.1007/BF02759674>
76. Karpenko L.I., Bazhan S.I., Bogryantseva M.P., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Kuzubov V.I., Lebedev L.R., Kaplina O.N., Reguzova A.Yu., Ryzhikov A.B., Usova S.V., Oreshkova S.F., Nechaeva E.A., Danilenko E.D., Ilyichev A.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 170–182. <https://doi.org/10.1134/S1068162016020060>
77. Singh D.V., Singh R., Sodhi S.P.S. // *Vet. Res. Commun.* 2005. V. 29. P. 421–430. <https://doi.org/10.1007/s11259-005-1434-x>
78. Perepelytsya S., Uličný J., Laaksonen A., Mocci F. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. 6084–6097. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz434>
79. Lightfoot H.L., Hall J. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 11275–11290. <https://doi.org/10.1093/nar/gku837>
80. Karpenko L.I., Rudometov A.P., Sharabrin S.V., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Bazhan S.I., Volosnikova E.A., Rudometova N.B., Orlova L.A., Pyshnaya I.A., Zaitsev B.N., Volkova N.V., Azaev M.Sh., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Ilyichev A.A. // *Vaccines.* 2021. V. 9. P. 76. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020076>
81. Ponsaerts P., Der Sar S.V., Van Tendeloo V.F.I., Jorens P.G., Berneman Z.N., Singh P.B. // *Cloning Stem Cells.* 2004. V. 6. P. 211–216. <https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.211>
82. Campillo-Davo D., De Laere M., Roex G., Versteven M., Flumens D., Berneman Z.N., Van Tendeloo V.F.I., Anguille S., Lion E. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. P. 396. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030396>

mRNA-Vaccine Platform: Features of Obtaining and Delivery of mRNA

V. R. Litvinova^{*, #}, A. P. Rudometov^{*}, L. I. Karpenko^{*}, and A. A. Ilyichev^{*}

[#]Phone: +7 (383) 363-47-10, 22-29; e-mail: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

^{*}State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirskaya oblast, 630559 Russia

Vaccination is the most effective way to prevent infectious diseases. One new approach to vaccine development is mRNA-based vaccines, which have a number of very useful advantages over other types of vaccines. As the mRNA only encodes the target antigen, there is no potential risk of infection, as would be the case with an attenuated or inactivated pathogen. The principle of mRNA vaccines' action is function in the cytosol of the cell; due to this the probability of mRNA integration into the host genome is extremely low. mRNA vaccines are able to induce specific cellular and humoral immune responses, but do not induce an anti-vector immune response. The mRNA vaccine platform makes it easy to replace the target gene without changing the production technology, which is important for solving the problem of a time gap between the start of an epidemic and vaccine production. The review focuses on the history of mRNA vaccines, the technology of their production, methods for increasing the stability of mRNA, description of modifications of the cap, poly(A) tail, coding and noncoding parts of mRNA, purification of the target mRNA vaccine from by-products, and various delivery methods.

Keywords: RNA, mRNA vaccines, chemically modified nucleotides, untranslated 5'- and 3'-regions, mRNA delivery methods



СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРОВ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОАЛКЕНДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

© 2023 г. А. А. Фирстова*, #, Е. Р. Кофанов*, М. И. Ковалева**

*Ярославский государственный технический университет,
Россия, 150023 Ярославль, Московский просп., 88

**Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова,
Россия, 150003 Ярославль, ул. Советская, 14

Поступила в редакцию 01.06.2022 г.

После доработки 16.06.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Синтезированы неописанные ранее эфиры на основе *N*-замещенных иминов циклоалифатических карбоновых кислот с высокими выходами, представлены эффективные методы их получения. Проведены токсикологические исследования полученных соединений с использованием различных тест-объектов (*Chlorella vulgaris*, *Allium cepa*, *Drosophila melanogaster*). Показано, что исследованные соединения не активны по отношению к *D. melanogaster*, увеличивают частоту мутаций у *C. vulgaris* и обладают способностью индуцировать хромосомные перестройки у *A. cepa*. Синтезированные соединения могут использоваться при разработке препаратов с противоопухолевым эффектом.

Ключевые слова: *N*-замещенные иминов карбоновых кислот, сложные эфиры, циклоалкенильные фрагменты, *L*-аминокислота, цитотоксичность, биологическая активность, мутагенность

DOI: 10.31857/S0132342323010086, EDN: GH1OTR

ВВЕДЕНИЕ

Одно из перспективных направлений синтеза биологически активных веществ — образование эфирной или сложноэфирной группы, что позволяет конструировать соединения, содержащие в молекулах одновременно с фармакофорными фрагментами соответствующих карбоновых кислот структурные элементы спиртов. Достаточно высокая химическая устойчивость этих групп к гидролизу, алкоголизу и аммонолизу при нейтральных значениях pH, а также к воздействию биологических сред позволяет обоснованно считать их эффективным инструментом в области создания перспективных лекарственных препаратов.

В научной литературе приводятся многочисленные примеры применения эфиров карбоновых кислот. Описаны способы получения противоопухолевых препаратов, которые показали положительную динамику терапии в исследованиях [1, 2]. В настоящее время актуален поиск принципиально новых подходов к противоопухолевой терапии. Стабилизация опухолевого процесса

или поддержание “дремлющего” состояния опухоли могут представлять многообещающие возможности для достижения цели лечения. Так, в статьях [3–5] приведены примеры применения иминов карбоновых кислот в качестве противоопухолевых препаратов.

Известны исследования влияния эфиров карбоновых кислот на глюкокортикоиды [6]. Глюкокортикоиды регулируют глюконеогенез в печени, их содержание в крови увеличивается при синдроме Кушинга, который вызывает метаболические нарушения, такие как висцеральное ожирение, нарушение толерантности к глюкозе, атеросклероз, дислипидемия и гипергликемия [7, 8]. Нормализация уровня глюкокортикоидов может изменить особенности метаболических синдромов [9]. Подавление действия глюкокортикоидов может быть осуществлено ингибиторами, описанными в статьях [10–14].

Одной из интересных областей применения иминов карбоновых кислот в последние годы стало проектирование миметиков вторичной структуры, имеющих конформационно жесткие непеитидные структурные каркасы, которые служат идеальными каркасами для поддержки боковой цепи функциональных элементов с желаемой геометрией [15, 16]. В статье [17] продемонстрировано использование эндо-*цис*-(2*S*,3*R*)-бицик-

Сокращения: ЧАС — четвертичная аммониевая соль; ДЛМ — доминантные летальные мутации; ХА — хромосомные aberrации.

Автор для связи: (тел.: +7 (960) 528-25-77; эл. почта: firstova.a.a@mail.ru).

ло[2.2.1]гепт-5-ена, имеющего непептидный молекулярный каркас, для создания аналогов пептидов.

Еще одно интересное применение имидов карбоновых кислот и их производных — использование в качестве регуляторов роста растений. Так, описаны препараты [18], имитирующие действие гормона растений гиббереллина, который представляет собой тетрациклический дитерпеноид, регулирующий прорастание семян, удлинение стеблей, расширение листьев и развитие цветков растений. Миметики гиббереллина, в частности некоторые имиды карбоновых кислот, способны формировать связь с рецептором так же, как и сам гормон [19–24].

Исходя из литературных данных, нами была поставлена цель работы — синтез *N*-замещенных имидов циклоалкендикарбоновых кислот, их дальнейшая модификация в сложные эфиры различными способами и исследование биологической активности этих соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез эфиров карбоновых кислот на основе циклоалкендикарбоновых кислот. Нами был проведен поиск наиболее удобного метода получения эфиров на основе *N*-замещенных имидов карбоновых кислот, позволяющего получать продукты

с высоким выходом и имеющего минимальное количество стадий. Это необходимо для увеличения эффективности по сравнению методами, описанными в литературе.

Ранее в научных статьях упоминались некоторые структуры ((XIV), (XVI), (XVIII)). Однако способы, предлагаемые авторами, экономически и энергозатратны. Так, например, в работе [25] был проведен синтез имидов кипячением в уксусной кислоте, и затем синтезированы эфиры с использованием дициклогексилкарбодиимид (DCC), 4-диметиламинопиридина (DMAP) в хлористом метиле в течение 12 ч.

В статье [26] приведен способ получения *N*-малеилпроизводных взаимодействием малеинового ангидрида и аминокислоты в ледяной уксусной кислоте и последующей циклизации *N*-малеиламинокислот в толуоле с добавлением триэтиламина, полученные продукты очищали хроматографическими методами.

В статьях [27–29] в качестве субстратов применяли эфиры аминокислот — более дорогостоящие по сравнению с аминокислотами.

В результате анализа литературы нами были разработаны методы, позволяющие синтезировать предложенные соединения из доступного сырья и без применения особых условий (схема 1).

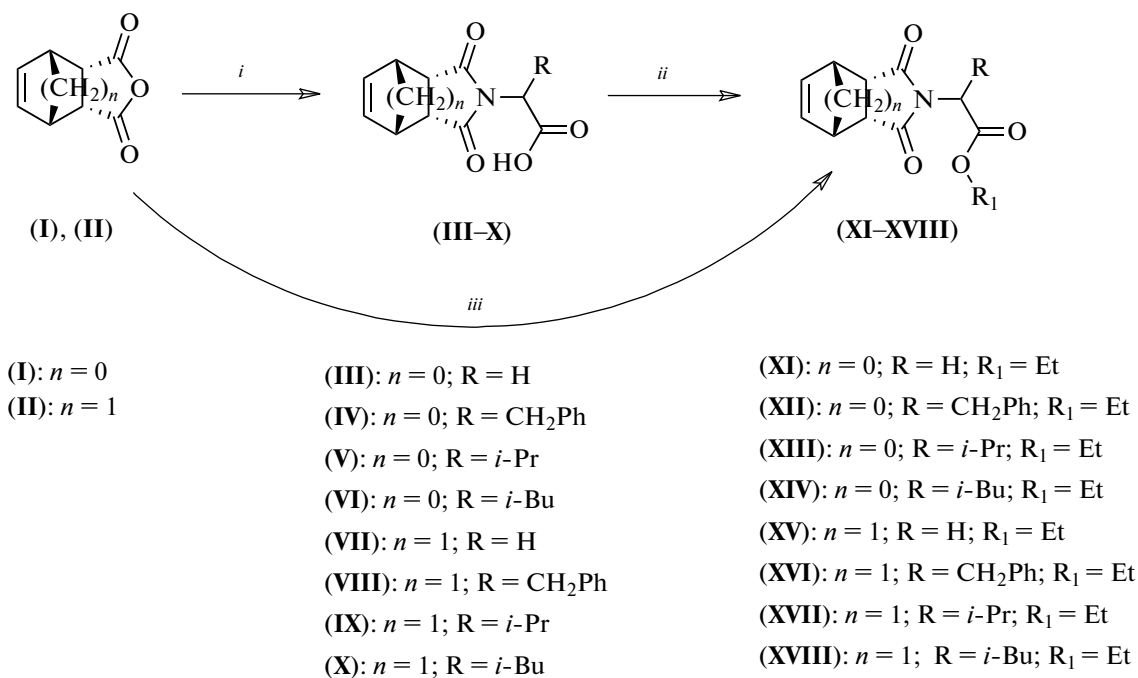


Схема 1. Синтез *N*-замещенных имидов циклоалкендикарбоновых кислот (III–X) и эфиров (XI–XVIII) на их основе: *i* — аминокислота, АсОН, кипячение; *ii* — H_2SO_4 , EtOH; *iii* — 1) аминокислота, $CHCl_3$, кипячение; 2) $TolSO_2Cl$, K_2CO_3 , тетрабутиламмоний иодид, EtOH.

На первом этапе работы применяли двухстадийный синтез эфиров, предполагающий получение *N*-замещенного имида циклоалкендикарбоновой кислоты и далее этерификацию карбоксильной группы. По нашему мнению, наиболее перспективный метод получения *N*-замещенных имидов карбоновых кислот — взаимодействие ангидридов дикарбоновых кислот (I) и (II) с различными хиральными α -аминокислотами (в работе использовали Gly, L-Val, L-Phe, L-Ala, L-Ile) в уксусной кислоте при кипячении [30]. Данная методика позволяет получать продукты с высоким выходом и не требует дополнительных манипуляций по очистке.

На втором этапе было предложено несколько способов образования сложных эфиров *N*-замещенных циклоалкендикарбоновых кислот. Один из традиционных методов — взаимодействие карбоновых кислот и спиртов, протекающее в условиях кислотного катализа (например, с использованием серной кислоты) [31]. Применяемая методика известная и легко воспроизводимая, но имеет ряд недостатков: 1) необходимо использовать спирт в 10-кратном избытке (как реагент и растворитель); 2) требуется отводить выделяющуюся воду из-за обратимости реакции и возможного гидролиза; 3) длительность реакции и невысокий выход.

Поэтому применяли альтернативный способ, в котором использовали в качестве растворителя хлороформ при активном перемешивании. Таким образом, реакция шла на межфазном пространстве, однако высокого выхода целевых соединений достичь не удалось. Это объясняется низкой скоростью химической реакции, которая в данном методе определялась скоростью диффузии реагентов через границу раздела фаз (в нашем случае вода—хлороформ).

Для упрощения метода синтеза и решения проблемы низкой скорости реакции был предложен метод одnoreакторного синтеза с использованием катализатора межфазного переноса [32]. Известно, что реакция взаимодействия ангидридов карбоновых кислот и аминокислот идет при кипячении в растворителе. В методе одnoreакторного синтеза в качестве растворителя использовали хлороформ. Таким образом, на первой стадии получали имид карбоновой кислоты и далее без выделения вводили четвертичную аммонийную соль в качестве катализатора межфазного переноса [33, 34]. В данном случае выбор каталитической системы основывался на следующих утверждениях: эффективность больших четвертичных катионов доказана и в сравнении с ионами меньшего размера существенно выше; наличие в четвертичной аммониевой соли алкильного фрагмента также увеличивает каталитическую активность [33]. Данный метод позволял полу-

чать эфиры в мягких условиях и с высоким выходом [34]. Таким образом, метод межфазного катализа позволяет простым и удобным способом решить проблему растворимости и реакционной способности в синтезе эфиров карбоновых кислот.

Биологическая активность соединений. Нами были отобраны синтезированные соединения с предположительной высокой биологической активностью, селективностью и структурным разнообразием. Для этих структур проведена первичная оценка биологических эффектов.

В настоящее время разработано более 200 методов оценки генотоксикантов, но не существует универсального. Несмотря на высокую чувствительность, экономичность и эффективность, один метод позволяет регистрировать только один тип генетических нарушений. Поэтому для исследования генетических эффектов необходимо использовать систему токсикогенетических методов [35].

Для исследования были выбраны следующие токсикогенетические методы: тест учета мутагенности, митотоксичности и токсичности у лука *Allium cepa* (L.), тест учета выживаемости и видимых мутаций у *Chlorella vulgaris* (Bejer) и тест учета доминантных летальных мутаций (ДЛМ) у *Drosophila melanogaster* (Meigen). Каждый из методов позволяет регистрировать различные типы нарушений: нарушение пролиферации (*A. cepa*, *C. vulgaris*), любые летальные мутации в половых клетках (дрозофила), хромосомные aberrации в соматических клетках (*A. cepa*). Этот набор методов позволяет регистрировать широкий спектр нарушений.

Для биологического тестирования использовали соединения (XI), (XIV), (XV), (XVII) и (XVIII) в виде растворов в 0.25%-ном водном этаноле. Данный растворитель был выбран ввиду лучшей растворимости соединений. В качестве контролей использовали воду и 0.25%-ный водный этанол. Предварительная оценка токсичности растворителя показала, что его использование не приводит к увеличению митотического индекса, а снижение пролиферативной активности выражено в незначительной степени и, следовательно, не оказывает отрицательного воздействия на тест-системы.

Для оценки общей токсичности соединений проводили исследование с использованием тест-объекта *A. cepa*. В данном методе определяли отклонения средней длины корней *A. cepa* и сравнивали контрольные и опытный варианты (рис. 1). Также определяли способность препарата модифицировать пролиферативную активность. Для этого оценивали митотический индекс (рис. 2) и соотношение средних фазных индексов (рис. 3).

При сравнении контрольного варианта с растворителем (0.25%-ный водный раствор этанола)

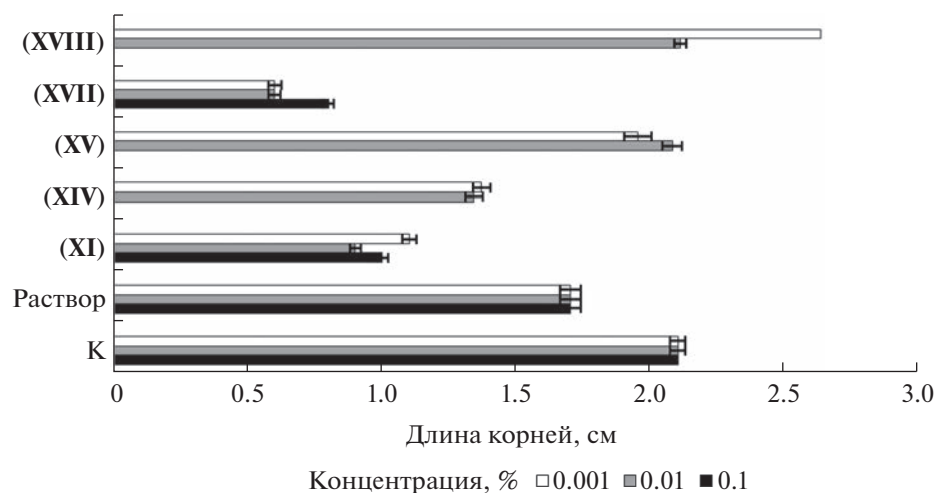


Рис. 1. Влияние концентрации исследуемых соединений на длину корней *Allium cepa* в опыте по оценке общей токсичности. Обозначения на рис. 1–6: К — контроль (дистиллированная вода), Раствор — 0.25%-ный водный этанол.

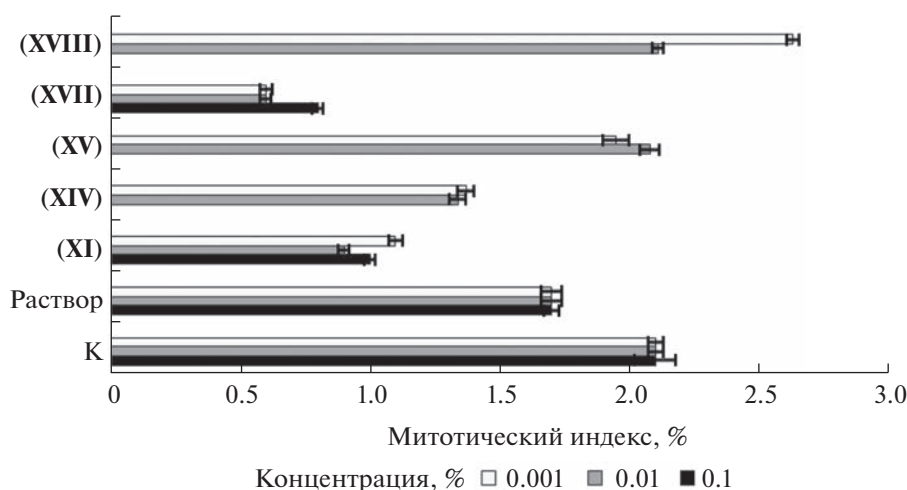


Рис. 2. Влияние концентрации исследуемых соединений на митотический индекс (%) в меристеме *Allium cepa* в опыте по оценке общей токсичности.

было выявлено снижение пролиферативной активности.

При оценке влияния различных концентраций исследуемых препаратов показано, что для соединений (XI) и (XVII) длина корней и митотический индекс уменьшаются по сравнению с контролем. Высокие концентрации соединений (XIV), (XV) и (XVIII) приводят к гибели корней, при этом низкие концентрации этих препаратов не влияют на митотический индекс, стимулируется рост длины корней.

Анализ фазных индексов позволяет выявить механизм нарушения пролиферации, данные представлены на рис. 3. Фазные индексы отражают соотношение клеток, находящихся на данной стадии, к сумме делящихся клеток. Можно отметить, что профазный индекс составляет >40%, следовательно, профаза — самая длительная фаза

митоза в меристеме корней лука, что согласуется с литературными данными [35]. В профазе происходит подготовка к делению, компактизация хроматина и пр. При воздействии соединений (XIV), (XV) и (XVIII) с концентрацией 0.1% наблюдается полная задержка роста, что говорит о их токсичности. В остальных случаях заметных изменений фазных индексов по сравнению с контрольными вариантами не обнаружено.

На следующем этапе анализировали мутагенную активность препарата. Хромосомные aberrации выявляли с помощью анателофазного метода. Регистрировали такие нарушения, как отставший от полюсов хромосомный материал (фрагменты, мосты, отставшие хромосомы). На рис. 4 видно, что для каждого препарата прослеживается способность индуцировать хромосомные aberrации. При этом линейной зависимости частоты хромо-

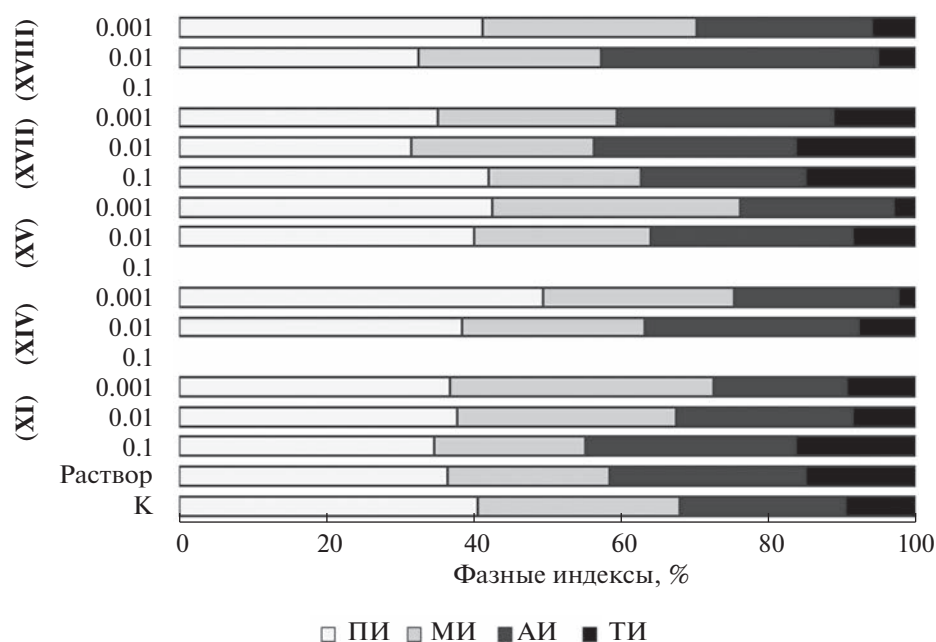


Рис. 3. Влияние концентрации препаратов на фазные индексы в меристеме *Allium cepa* в опыте по оценке токсичности.

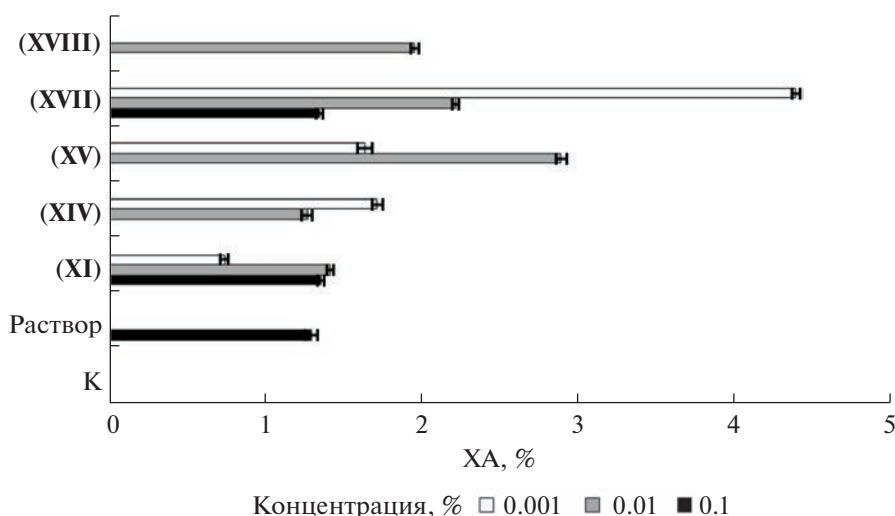


Рис. 4. Влияние концентрации препаратов на частоту хромосомных aberrаций в меристеме *Allium cepa* в опыте по оценке мутагенности.

сомных aberrаций (ХА) от концентрации исследуемых соединений не отмечено, необходимы дополнительные исследования.

Далее была проведена оценка токсичности соединений с использованием в качестве тест-объекта одноклеточной водоросли *C. vulgaris*. С одной стороны, *C. vulgaris* — растительный тест-объект, поэтому она имеет преимущества растительных тест-систем. С другой стороны, *C. vulgaris* относится к микроорганизмам и обладает высокой чувствительностью, экономичностью и высокой скоростью размножения, что

позволяет в короткие сроки получить результаты токсикогенетических экспериментов. Данным методом можно оценивать не только мутагенность препаратов (учет частоты мутантных макроколоний), но и митотоксичность (определение выживаемости колоний). При этом метод не дает возможность дифференцировать цитотоксический (гибель клеток) и цитостатический (нарушение деления клеток) эффекты.

Результаты исследования представлены на рис. 5 и 6. По полученным данным можно сделать вывод, что исследованные препараты повышают

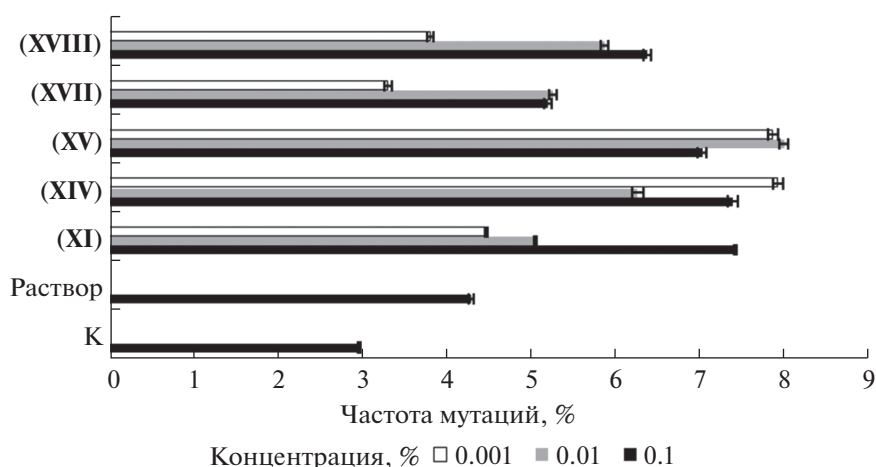


Рис. 5. Влияние концентраций препаратов на частоту мутаций *Chlorella vulgaris* в опыте по оценке мутагенности.

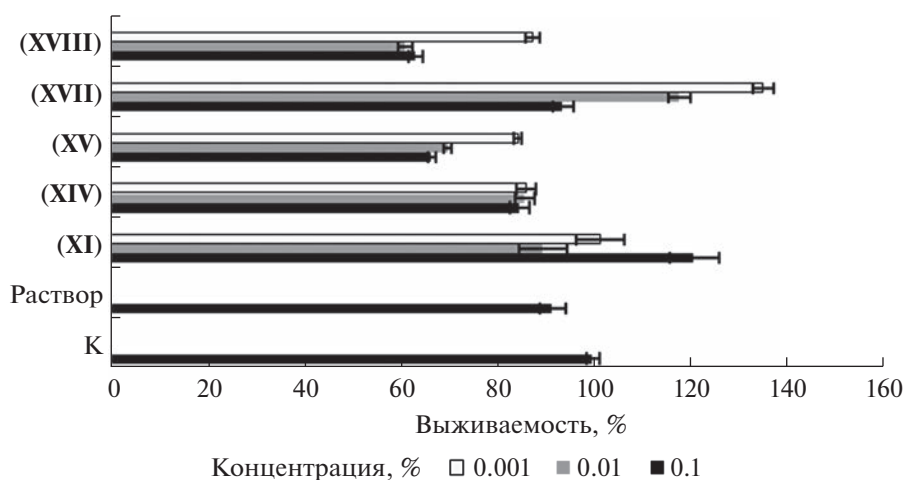


Рис. 6. Влияние концентраций препаратов на выживаемость *Chlorella vulgaris* в опыте по оценке токсичности.

частоту мутаций в среднем в 1.5 раза по сравнению с контролем. При этом исследуемые препараты достоверно не снижают выживаемость колоний *C. vulgaris*.

Плодовая мушка дрозофила — один из самых распространенных объектов, используемых для выявления генотоксического действия различных факторов. Эффективность ее использования для исследований обусловлена такими особенностями, как непродолжительный цикл развития и высокая плодовитость, известно большое число генов с легкоразличимыми признаками, описаны практически все виды мутаций и др. Известно, что дрозофила может использоваться для выявления мутагенов и промутагенов [36].

В исследовании с использованием тест-объекта *D. melanogaster* не наблюдалось увеличения частоты индуцированных доминантных летальных мутаций (ДЛМ), что показывает отсутствие гено-

токсичности соединений (XI), (XIV), (XVII) и (XVIII). Таким образом, исследованные концентрации препаратов (XI), (XIV), (XVII) и (XVIII) не обладают мутагенной активностью (табл. 1). Соединение (XV) незначительно увеличивало частоту индуцированных доминантных летальных мутаций (ДЛМ).

Таблица 1. Исследование генотоксического эффекта методом доминантных летальных мутаций у *Drosophila melanogaster*

Соединение	Кратность по отношению к контролю
Контроль (вода)	1.00
(XI)	0.95
(XIV)	0.94
(XV)	1.42
(XVII)	1.04
(XVIII)	1.02

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованы коммерчески доступные реактивы марки “ч” или “х.ч.” отечественного производства и фирмы Sigma-Aldrich (США). Растворители перед использованием осушали и перегоняли по известным методикам [37].

Спектроскопия. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на приборе MSL300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 и 75.5 МГц соответственно. Спектры записывали для растворов анализируемых соединений в DMSO- d_6 относительно остаточных протонов растворителя.

ИК-спектры (ν , см^{-1}) регистрировали на приборе ИК-Фурье Spectrum RX1 (Perkin Elmer, Великобритания) на пластинах KBr в вазелиновом масле.

Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе MicroTOF-II (Bruker Daltonics, Германия), метод ионизации — электро-распыление (ESI), температура источника ионизации — 180°C. Элюент ацетонитрил.

ТСХ осуществляли на пластинках Sulifol 201S в системе петролейный эфир—толуол—ацетон—уксусная кислота, 100 : 60 : 100 : 2 (об.).

Температуру плавления соединений определяли на приборе Electrothermal IA 9300 Series (Electrothermal Engineering Ltd., Великобритания).

N-Замещенные имиды алициклических дикарбонových кислот (III–X) (общая методика) [30]. В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, помещали 50 ммоль алициклического ангидрида (I) или (II), 55 ммоль аминокислоты (Gly, L-Val, L-Phe, L-Ala, L-Ile) и 15 мл уксусной кислоты, кипятили в течение 4 ч. Затем реакционную смесь выливали в воду (100 мл). Полученный осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили при 40°C.

(1,3-Диоксо-1,3,3а,4,7,7а-гексагидро-2H-изоиндол-2-ил)уксусная кислота (III). Выход 93%. Т. пл. 69–72°C. ИК: 2724, 2671, 923 (ОН); 1791, 1757, 1684 (C=O, имид); 1633 (C=C); 1178 (C–O). ^1H -ЯМР: 2.37 (4H, м, CH_2), 3.22 (2H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 4.04 (2H, с, NCH_2), 5.87 (2H, м, $\text{HC}=\text{CH}$), 13.07 (1H, с, COOH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено: $[M + \text{H}]^+$ 210.076. Вычислено для $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$: 210.068.

(3,5-Диоксо-4-азатрицикло[5.2.1.0 2,6]дец-8-ен-4-ил)уксусная кислота (IV). Выход 83%. Т. пл. 139–143°C. ИК: 2725, 2669, 920 (ОН); 1791, 1758, 1680 (C=O, имид); 1643 (C=C); 1128 (C–O). ^1H -ЯМР: 1.58 (2H, м, CH_2 -мостик), 2.51 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.26 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.44 (2H, м, CH), 3.89 (2H, м, NCH_2), 6.02 (2H, м, $\text{HC}=\text{CH}$), 12.95 (1H, с, COOH). Масс-спектр (ИЭР), m/z :

найдено: $[M + \text{H}]^+$ 222.088. Вычислено для $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_4$: 222.068.

2-(1,3-Диоксо-3а,4-дигидро-1H-изоиндол-2(3H,7H,7аH)-ил)-3-метилбутановая кислота (V). Выход 60%. Т. пл. 123–127°C. ИК: 2728, 2661, 2594, 901 (ОН); 1769, 1744, 1673 (C=O, имид); 1192 (C–O). ^1H -ЯМР: 1.20 (3H, м, CH_3), 1.50 (3H, м, CH_3), 1.80 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 2.51 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.42 (2H, м, CH_2), 3.72 (1H, м, CHN), 4.10 (2H, м, CH_2), 4.45 (1H, м, CH), 6.03 (2H, м, $\text{HC}=\text{CH}$), 12.61 (1H, с, COOH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено: $[M + \text{H}]^+$ 252.125. Вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_4$: 252.115.

2-(3,5-Диоксо-4-азатрицикло[5.2.1.0 2,6]дец-8-ен-4-ил)-3-метилбутановая кислота (VI). Выход 73%. Т. пл. 105–108°C. ИК: 2728, 2603, 901 (ОН); 1769, 1706, 1683 (C=O, имид); 1682 (C=C); 1192 (C–O). ^1H -ЯМР: 0.84 (6H, м, CH_3), 1.31 (2H, м, CH_2 -мостик), 1.63 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 1.81 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.37 (1H, м, CHN), 3.42 (2H, м, CH), 4.41 (1H, м, CH), 6.03 (2H, м, $\text{CH}=\text{CH}$), 12.86 (1H, с, COOH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено: $[M + \text{H}]^+$ 264.128. Вычислено для $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_4$: 264.115.

2-(1,3-Диоксо-3а,4-дигидро-1H-изоиндол-2(3H,7H,7аH)-ил)-3-фенилпропановая кислота (VII). Выход 60%. Т. пл. 123–127°C. ИК: 2728, 2661, 2594, 901 (ОН); 1769, 1744, 1673 (C=O, имид); 1192 (C–O). ^1H -ЯМР: 2.08 (2H, м, CH_2 -Ph), 2.33 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.18 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.43 (4H, м, CH_2), 4.85 (1H, м, CHN), 5.57 (2H, м, $\text{HC}=\text{CH}$), 7.12 (2H, д, J 7.0, Ar), 7.27 (1H, д, J 7.5, Ar), 7.29 (2H, т, J 14.2, Ar), 13.01 (1H, с, COOH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено: $[M + \text{H}]^+$ 300.124. Вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_4$: 300.115.

2-(3,5-Диоксо-4-азатрицикло[5.2.1.0 2,6]дец-8-ен-4-ил)-3-фенилпропановая кислота (VIII). Выход 74%. Т. пл. 136–139°C. ИК: 2721, 2661, 929 (ОН); 1769, 1751 (C=O, имид); 1684 (C=C); 1603, 1398 (Ar); 1169 (C–O). ^1H -ЯМР: 1.42 (2H, м, CH_2 -Ph), 2.49 (2H, м, CH_2 -мостик), 3.11 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.19 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.33 (2H, м, CH), 4.86 (1H, м, CHN), 5.24 (1H, м, $\text{HC}=\text{CH}$), 5.67 (1H, м, $\text{HC}=\text{CH}$), 7.12 (2H, д, J 7.0, Ar), 7.20 (1H, д, J 7.5, Ar), 7.26 (2H, т, J 14.2, Ar), 13.02 (1H, с, COOH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено: $[M + \text{H}]^+$ 312.123. Вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_4$: 312.115.

2-(1,3-Диоксо-3а,4-дигидро-1H-изоиндол-2(3H,7H,7аH)-ил)-3-метилпентановая кислота (IX). Выход 80%. Т. пл. 132–134°C. ИК: 2591, 950 (ОН); 1701 (C=O, имид); 1616 (C=C); 1263 (C–O). ^1H -ЯМР: 0.79 (6H, м, CH_3), 1.28 (1H, м, CH), 1.67 (2H, м, CH_2), 1.97 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 2.22 (1H, м, $\text{HC}=\text{C}=\text{O}$), 3.17 (4H, м, CH_2), 4.49 (1H, м, CHN), 5.84 (2H, м, $\text{HC}=\text{CH}$), 12.77 (1H, с, COOH). Масс-

спектр (ИЭР), m/z : найдено: $[M + H]^+$ 266.139. Вычислено для $C_{14}H_{19}NO_4$: 266.131.

2-(3,5-Диоксо-4-азатрицикло[5.2.1.0^{2,6}]дец-8-ен-4-ил)-3-метилпентановая кислота (X). Выход 93%. Т. пл. 103–105°C. ИК: 2723, 2656, 2597, 904 (ОН); 1746, 1706 (C=O, имид); 1677 (C=C); 1190 (C–O). ¹H-ЯМР: 0.71 (3H, м, CH₃), 0.93 (3H, м, CH₃), 1.56 (2H, м, CH₂-мостик), 2.23 (1H, м, CH), 2.34 (2H, м, CH₂), 3.37 (2H, м, HC–C=O), 3.45 (2H, м, CH), 4.07 (1H, м, CHN), 6.01 (2H, м, HC=CH), 11.95 (1H, с, COOH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено: $[M + H]^+$ 278.135. Вычислено для $C_{15}H_{19}NO_4$: 278.131.

Сложные эфиры *N*-замещенных циклоалкендикарбоновых кислот (XI–XVIII). **Метод 1. Синтез сложных эфиров *N*-замещенных циклоалкендикарбоновых кислот с использованием кислотного катализатора.** В колбу, снабженную мешалкой и обратным холодильником, помещали 100 ммоль этилового спирта и 10 ммоль *N*-замещенной циклоалкендикарбоновой кислоты (III–X). Затем к полученному раствору добавляли каталитические количества серной кислоты. Реакционную смесь при перемешивании кипятили в течение 4 ч. Полученный раствор выливали в холодную воду, эфир экстрагировали хлороформом.

Метод 2. Одноректорный синтез сложных эфиров *N*-замещенных циклоалкендикарбоновых кислот. В колбе, снабженной мешалкой и обратным холодильником, растворяли в хлороформе 50 ммоль алициклического ангидрида (I) или (II). После полного растворения добавляли 55 ммоль аминокислоты (Gly, L-Val, L-Phe, L-Ala, L-Ile) и кипятили в течение 2 ч. Далее в реакционную смесь вносили 5 ммоль четвертичной аммониевой соли, а затем 5 ммоль 4-метилбензол-1-сульфонилхлорида и 20 ммоль карбоната калия, кипятили в течение 40 мин. По истечении времени реакции добавляли этиловый спирт (50 ммоль) и выдерживали массу еще 45 мин. Осадок отфильтровывали, фильтрат отгоняли.

Этиловый эфир (1,3-диоксо-1,3,3а,4,7,7а-гексагидро-изоиндол-2-ил)уксусной кислоты (XI). $C_{12}H_{15}NO_4$. Выход 38%. Масло. ИК: 1748 (C=O, сложный эфир); 1709 (C=O, имид); 1210 (C–O–). ¹H-ЯМР: 1.20 (2H, м, CH₂–O), 1.51 (3H, м, CH₃), 2.26 (2H, м, CH₂), 3.10 (2H, м, HC–C=O), 4.16 (2H, м, NCH₂), 4.76 (2H, м, CH₂), 5.93 (2H, м, HC=CH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено для $C_{12}H_{15}NO_4$: 237.100. Вычислено для $C_{12}H_{15}NO_4$: 237.100.

Этиловый эфир (3,5-диоксо-4-азатрицикло[5.2.1.0^{2,6}]дец-8-ен-4-ил)уксусной кислоты (XII). $C_{13}H_{15}NO_4$. Выход 55%. Масло. ИК: 1748 (C=O, сложный эфир); 1707 (C=O, имид); 1240 (C–O). ¹H-ЯМР: 1.25 (2H, м, CH₂–O), 1.45 (3H, м, CH₃),

1.62 (2H, м, CH₂-мостик), 3.11 (1H, м, HC–C=O), 3.30 (1H, м, HC–C=O), 3.67 (2H, м, CH), 4.02 (2H, м, NCH₂), 6.10 (2H, м, HC=CH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено для $C_{13}H_{15}NO_4$: 249.100. Вычислено для $C_{13}H_{15}NO_4$: 249.100.

Этиловый эфир 2-(1,3-диоксо-3а,4-дигидро-1H-изоиндол-2(3H,7H,7aH)-ил)-3-метилбутановой кислоты (XIII). $C_{15}H_{21}NO_4$. Выход 89%. Масло. ИК: 1768 (C=O, сложный эфир); 1719 (C=O, имид); 1210 (C–O–). ¹H-ЯМР: 1.03 (3H, м, CH₃), 1.08 (2H, м, O–CH₂), 1.34 (3H, м, CH₃), 2.29 (1H, м, HC–C=O), 2.37 (1H, м, HC–C=O), 3.03 (3H, м, CH₃-эфир), 3.14 (4H, м, CH₂), 4.20 (1H, м, CHN), 4.39 (1H, м, CH), 5.89 (1H, м, HC=CH), 5.67 (1H, м, HC=CH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено для $C_{15}H_{21}NO_4$: 279.147. Вычислено для $C_{15}H_{21}NO_4$: 279.147.

Этиловый эфир 2-(3,5-диоксо-4-азатрицикло[5.2.1.0^{2,6}]дец-8-ен-4-ил)-3-метилбутановой кислоты (XIV). $C_{16}H_{21}NO_4$. Выход 36%. Масло. ИК: 1746 (C=O, сложный эфир); 1710 (C=O, имид); 1214 (C–O–). ¹H-ЯМР: 0.84 (6H, м, CH₃), 1.21 (2H, м, O–CH₂), 1.39 (2H, м, CH₂-мостик), 1.53 (1H, м, HC–C=O), 1.81 (1H, м, HC–C=O), 3.24 (3H, м, CH₃-эфир), 3.38 (1H, м, CHN), 3.55 (2H, м, CH), 4.55 (1H, м, CH), 6.02 (2H, м, HC=CH). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено для $C_{16}H_{21}NO_4$: 291.147. Вычислено для $C_{16}H_{21}NO_4$: 291.148.

Этиловый эфир 2-(1,3-диоксо-3а,4-дигидро-1H-изоиндол-2(3H,7H,7aH)-ил)-3-фенилпропановой кислоты (XV). $C_{19}H_{21}NO_4$. Выход 56%. Масло. ИК: 1758 (C=O, сложный эфир); 1715 (C=O, имид); 1212 (C–O–). ¹H-ЯМР: 1.30 (3H, м, CH₃), 1.55 (2H, м, CH₂-Ph), 2.43 (1H, м, HC–C=O), 3.28 (1H, м, HC–C=O), 3.55 (4H, м, CH₂), 4.30 (2H, м, O–CH₂), 4.85 (1H, м, CHN), 6.05 (2H, м, HC=CH), 7.12 (2H, д, *J* 7.2, Ar), 7.29 (3H, м, Ar). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено для $C_{19}H_{21}NO_4$: 327.146. Вычислено для $C_{19}H_{21}NO_4$: 327.147.

Этиловый эфир 2-(3,5-диоксо-4-азатрицикло[5.2.1.0^{2,6}]дец-8-ен-4-ил)-3-фенилпропановой кислоты (XVI). $C_{20}H_{21}NO_4$. Выход 75%. Масло. ИК: 1748 (C=O, сложный эфир); 1709 (C=O, имид); 1603 (Ar); 1210 (C–O–). ¹H-ЯМР: 1.24 (3H, м, CH₃), 1.43 (2H, м, CH₂-Ph), 3.16 (1H, м, HC–C=O), 3.24 (1H, м, HC–C=O), 3.44 (2H, м, CH₂-мостик), 3.46 (1H, м, CHN), 3.48 (1H, м, CH), 4.22 (2H, м, O–CH₂), 4.94 (1H, м, CH), 5.73 (1H, д, CH=CH), 5.76 (1H, д, CH=CH), 7.23 (2H, д, *J* 7.0, Ar), 7.26 (3H, м, Ar). Масс-спектр (ИЭР), m/z : найдено для $C_{20}H_{21}NO_4$: 339.147. Вычислено для $C_{20}H_{21}NO_4$: 339.147.

Этиловый эфир 2-(1,3-диоксо-3а,4-дигидро-1H-изоиндол-2(3H,7H,7aH)-ил)-3-метилпентановой кислоты (XVII). $C_{16}H_{23}NO_4$. Выход 45%. Мас-

ло. ИК: 1758 (C=O, сложный эфир); 1715 (C=O, имид); 1211 (C—O—). ¹H-ЯМР: 0.79 (6H, м, CH₃), 1.34 (1H, м, CH), 1.52 (3H, м, CH₃-эфир), 1.67 (2H, м, CH₂), 2.26 (2H, м, O—CH₂), 2.61 (2H, м, HC—C=O), 3.10 (2H, м, CH₂), 4.16 (2H, м, CH₂), 4.75 (1H, м, CHN), 5.90 (2H, м, HC=CH). Масс-спектр (ИЭР), *m/z*: найдено для C₁₆H₂₃NO₄: 293.1625. Вычислено для C₁₆H₂₃NO₄: 293.1627.

Этиловый эфир 2-(3,5-диоксо-4-азатрицикло-[5.2.1.0^{2,6}]дец-8-ен-4-ил)-3-метилпентановой кислоты (XVIII). C₁₇H₂₃NO₄. Выход 82%. Масло. ИК: 1758 (C=O, сложный эфир); 1705 (C=O, имид); 1209 (C—O—). ¹H-ЯМР: 0.71 (6H, м, CH₃), 1.41 (2H, м, O—CH₂), 1.62 (2H, м, CH₂-мостик), 2.33 (1H, м, CH), 2.40 (2H, м, CH₂), 3.35 (3H, м, CH₃-эфир), 3.40 (2H, м, HC—C=O), 3.45 (2H, м, CH), 4.10 (1H, м, CHN), 6.01 (2H, м, HC=CH). Масс-спектр (ИЭР), *m/z*: найдено для C₁₇H₂₃NO₄: 305.163. Вычислено для C₁₇H₂₃NO₄: 305.162.

Исследование генотоксичности с использованием *Allium*-теста [35]. В качестве объекта исследования использовали лук репчатый *Allium cepa* (L.) сорта Штуттгартен Ризен (ООО “Лукамор”, Россия). Для проведения опытов отбирали выровненный материал — типичные для используемого сорта луковицы одинакового размера. Луковицы помещали в емкости с растворами исследуемых соединений (в концентрациях 0.1, 0.01 и 0.001%) и контрольными растворами — дистиллированной водой и 0.25%-ным водным этанолом. Материал проращивали на свету в течение 3 сут. Далее с каждой луковицы срезали корни и промывали их водой. Затем определяли прорастание корней и их длину. Для каждой концентрации растворов исследуемых соединений проводили пять опытов. Ошибка при определении длины корней растений составляла 1.1–2.2%. Полученный материал (корни) фиксировали при помощи фиксатора Кларка (96%-ный этиловый спирт с ледяной уксусной кислотой, 3 : 1) в течение 3 сут. Перед окрашиванием корни отмывали от спирта в воде для лучшего прокрашивания препарата, а затем помещали в краситель — 2%-ный ацетоорсеин. Тигель с красителем и корни нагревали в пламени спиртовки до появления паров на покровном стекле. Окрашивание производили минимум 40 мин. Далее готовили давленные препараты корневой меристемы. Корни отмывали от красителя в 45%-ной уксусной кислоте. От корней отрезали кончик длиной 2–3 мм, помещали на предметное стекло в каплю 45%-ной уксусной кислоты, накрывали покровным стеклом и производили давление препарата до образования монослоя клеток. Препараты анализировали с использованием микроскопа МИКРОМЕД-1 (Микромед, Россия; увеличение 400×). На препаратах наблюдали мелкие меристематические клетки с хорошо прокра-

шенными ядрами. Учитывали делящиеся клетки на всех фазах митоза, отдельно регистрировали нормальные клетки на стадиях анафазы и телофазы, а также клетки на этих фазах с хромосомными aberrациями. Далее рассчитывали митотический индекс, частоту ХА и проводили статистическую обработку результатов. Для определения достоверности различий между средними значениями контрольных (дистиллированная вода и 0.25%-ный водный этанол) и опытного вариантов использовали *t*-критерий Стьюдента. Отклонение считали достоверным при *p* < 0.05. На рис. 1–6 все отклонения между контрольными и опытными вариантами достоверные.

Исследование частоты видимых мутаций с использованием *Chlorella vulgaris*. Для изучения генотоксического влияния использовали одноклеточную зеленую водоросль *Chlorella vulgaris* (Beijer.) штамма ЛАРГ-1, полученного из Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Штамм ЛАРГ-1 — термофильный мутант, полученный из штамма Б-45, выделенного из озера Байкал. Готовили суспензию клеток хлореллы на дистиллированной воде. Осуществляли серию разведений для достижения плотности клеток 10⁵ кл./мл. Клетки подсчитывали в камере Горяева. Затем в сухую пробирку вносили 1 мл рабочей суспензии хлореллы и 1 мл исследуемого раствора соединения с концентрациями 0.1, 0.01 и 0.001%. Пробирку оставляли на 2 ч для контакта с соединением, периодически перемешивая содержимое пробирки путем встряхивания. После этого в чашки Петри высевали по 0.1 мл суспензии, равномерно распределяли клетки на поверхности среды шпателем. В контрольном варианте суспензия хлореллы взаимодействовала с 1 мл дистиллированной воды. Во всех вариантах опыт проводили в трехкратной повторности. Инкубацию культуры осуществляли в люминестате (Флора-1, Россия) в течение 10 сут при 25°C. Учет видимых мутаций проводили с использованием стереомикроскопа Альтаи СМ07 (Альтаи, Россия) с увеличением от 15× до 40×. Регистрировали все выросшие колонии. Колонии, измененные по форме, цвету или размерам, учитывали как мутантные [35].

Исследование генотоксического эффекта методом доминантных летальных мутаций у *Drosophila melanogaster*. Для исследования использовали линию дикого типа D-32 *Drosophila melanogaster* (Meigen) из коллекции Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Москва, Россия). Постановку эксперимента проводили по стандартной методике. Самцы получали изучаемые препараты перорально. Воздействию изучаемых соединений (в концентрациях 0.1, 0.01 и 0.001%) подвергали 3-дневных самцов, которых помещали в стаканчики на стеклянные фильтры, опущенные в растворы изучаемых концентраций препаратов в 5%-ном растворе сахарозы. Время

экспозиции — 3 сут. Изучаемые препараты обновляли ежедневно. Параллельно с опытом ставили контрольный эксперимент — самцов поили 5%-ным раствором сахарозы. Далее подопытных самцов скрещивали с виргинными самками. Затем самцов отбирали. Оплодотворенных самок помещали в колбы с голодным агаром, который меняли каждые 12 ч. Проводили учет отложенных яиц, через 48 ч инкубации подсчитывали число яиц с невылупившимися личинками. Определяли частоту ДЛМ (D, %) [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны методы синтеза эфиров карбоновых кислот на основе циклоалкендикарбоновых кислот, позволяющие получать продукты в мягких условиях и с высоким выходом. Данными методами получены восемь новых эфиров карбоновых кислот с циклоалкенильным фрагментом.

Анализ генотоксической активности полученных соединений, проведенный с использованием системы токсикогенетических методов, показал, что исследованные соединения по-разному влияют на различные тест-объекты (тест учета мутагенности, митотоксичности и токсичности у лука *Allium cepa* (L.), тест учета доминантных летальных мутаций (ДЛМ) у *Drosophila melanogaster* (Meigen) и тест учета выживаемости и видимых мутаций у *Chlorella vulgaris* (Bejer)). Изученные эфиры не увеличивали частоту ДЛМ у дрозофилы, но при этом достоверно увеличивали частоту мутаций у одноклеточной зеленой водоросли хлореллы. *A. cepa* чувствителен к исследуемым соединениям, при 0.1%-ной концентрации соединений зарегистрирована острая токсичность; при 0.01%-ной и 0.001%-ной концентрациях наблюдался нормальный рост корневой системы, несмотря на некоторое снижение пролиферативной активности. При этом частота ХА достоверно увеличивалась, т.е. исследуемые соединения не активны по отношению к многоклеточному животному — дрозофиле и обладают способностью индуцировать хромосомные перестройки у растений. Таким образом, исследованные соединения обладают специфическим действием в различных тест-системах. Поэтому при оценке генотоксической активности вновь синтезированных соединений необходимо всегда использовать систему методов, регистрирующих различные типы генетических нарушений.

С начала развития лекарственной противоопухолевой терапии (40-е гг. XX века) и по настоящее время главным образом используются агенты, механизм действия которых основан на ингибировании пролиферации опухолевых клеток путем

нарушения целостности молекул ДНК или блокирования процессов транскрипции и митоза [38]. Несмотря на существование в клинической практике более 100 противоопухолевых препаратов, эффективность большинства из них недостаточна, и спектр онкологических заболеваний, чувствительных к химиотерапии, ограничен. Поэтому остается актуальным вопрос о разработке новых более активных препаратов, а также поиск соединений, эффективных при опухолях с первичной и приобретенной резистентностью к лекарственной терапии. Представленные в статье соединения могут найти применение в качестве препаратов с противоопухолевым действием, но необходимы доклинические исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yabuno T., Konishi N., Nakamura M., Tsuzuki T., Tsunoda S., Sakaki T., Hiasa Y. // J. Neurooncol. 1998. V. 36. P. 105–112.
<https://doi.org/10.1023/a:1005878402133>
2. Perez-Tomas R. // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. P. 1859–1876.
<https://doi.org/10.2174/092986706777585077>
3. Fu X., Palomar A.J., Hong E.P. // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. P. 1415–1418.
<https://doi.org/10.1021/np0499620>
4. Bailly C., Carrasco C., Joubert A. // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 4136–4150.
<https://doi.org/10.1021/bi027415c>
5. Richardson M.B., Gabriel K.N., Garcia J.A. // Bioconjugate Chem. 2020. V. 31. P. 1449–1462.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00143>
6. Yang H., Dou W., Lou J., Leng Y., Shen J. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 1340–1345.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.01.020>
7. Arnaldi G., Angeli A., Atkinson A.B., Bertagna X., Cavagnini F., Chrousos G.P., Fava G.A., Findling J.W., Gailard R.C., Grossman A.B., Kola B., Lacroix A., Mancini T., Mantero F., Newell-Price J., Nieman L. K., Sonino N., Vance M.L., Giustina A., Boscaro M.J. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. V. 88. P. 5593–5602.
<https://doi.org/10.1210/jc.2003-030871>
8. Grundy S.M., Brewer H.B., Cleeman J.I., Smith S.C., Lenfant C. // Circulation. 2004. V. 109. P. 433–438.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6>

9. Inagaki K., Otsuka F., Miyoshi T., Watanabe N., Suzuki J., Ogura T., Makino H. // *Endocr. J.* 2004. V. 51. P. 201–206.
<https://doi.org/10.1507/endocrj.51.201>
10. Diederich S., Grossmann C., Hanke B., Quinkler M., Herrmann M., Bahr V., Oelkers W. // *Eur. J. Endocrinol.* 2000. V. 142. P. 200–207.
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1420200>
11. Alberts P., Nilsson C., Selen G., Engblom L.O.M., Edling N.H.M., Norling S., Klingstrom G., Larsson C., Forsgren M., Ashkzari M., Nilsson C.E., Fiedler M., Bergqvist E., Ohman B., Bjorkstrand E., Abrahmsen L.B. // *Endocrinology.* 2003. V. 144. P. 4755–4762.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-0344>
12. Gu X., Dragovic J., Koo G.C., Koprak S.L., LeGrand C., Mundt S.S., Shah K., Springer M.S., Tan E.Y., Thieringer R., Hermanowski-Vosatka A., Zokian H.J., Balkovec J.M., Waddell S.T. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. V. 17. P. 2838–2843.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.08.052>
13. Miguet L., Zhang Z., Barbier M., Grigorov M.G. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2006. V. 20. P. 67–81.
<https://doi.org/10.1007/s10822-006-9037-3>
14. Schuster D., Maurer E.M., Laggner C., Nashev L.G., Wilckens T., Langer T., Odermatt A. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. 3454–3466.
<https://doi.org/10.1021/jm0600794>
15. Gierasch L.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1992. V. 61. P. 387–418.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.002131>
16. Liskamp R.M. // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* 1994. V. 113. P. 1–19.
<https://doi.org/10.1002/recl.19941130102>
17. Gante J. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994. V. 33. P. 1699–1720.
<https://doi.org/10.1002/anie.199416991>
18. Jiang K., Shimotakahara H., Luo M., Otani M., Nakamura H., Moselhy S.S., Abualnaja K.O., Labeed Al-Malki A., Kumosani T.A., Kitahata N., Takeshi N., Nakajima M., Asami T. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017. V. 27. P. 3678–3682.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.07.012>
19. Jiang K., Otani M., Shimotakahara H., Yoon J.-M., Park S.-H., Miyaji T., Nakano T., Nakamura H., Nakajima M., Asami T. // *Plant Physiology.* 2017. V. 173. P. 825–835.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.00937>
20. Gupta R., Chakrabarty S.K. // *Plant Signal Behav.* 2013. V. 8. P. 255–264.
<https://doi.org/10.4161/psb.25504>
21. Rodaway S.J., Gates D.W., Brindle C. // *Plant Growth Regul.* 1991. V. 10. P. 243–259.
<https://doi.org/10.1007/BF00024415>
22. Gallego-Giraldo C., Hu J., Urbez C., Gomez M.D., Sun T.-P., Perez-Amador M.A. // *Plant J.* 2014. V. 79. P. 1020–1032.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12603>
23. Chandler P.M., Harding C.A., Ashton A.R., Mulcair M.D., Dixon N.E., Mander L.N. // *Mol. Plant.* 2008. V. 1. P. 285–294.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssn002>
24. Sukiran N.A., Pollastri S., Steel P.G., Knight M.R. // *Plant Direct.* 2022. V. 26. P. 394–398.
<https://doi.org/10.1002/pld3.398>
25. Wang X., Baloch S.K., Ma L., Wang X., Shi J., Zhu Y., Wu F., Pang Y., Lu G., Qi J., Gu H., Yang Y. // *RSC Adv.* 2015. V. 5. P. 31759–31767.
<https://doi.org/10.1039/C5RA01872B>
26. Yang J., Sun W., He Z., Yu Ch., Bao G., Li Y., Hong L., Wang R. // *Org. Lett.* 2018. V. 20. P. 7080–7084.
<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b03020>
27. Verma S.M., Singh R.M. // *J. Org. Chem.* 1975. V. 40. P. 897–901.
<https://doi.org/10.1021/jo00895a019>
28. Bodtke A., Otto H.-H. // *Pharmazie.* 2005. V. 60. P. 803–813.
29. Ranganathan D., Haridas V., Kurur S., Thomas A., Madhusudanan K.P., Nagaraj R., Kunwar A.C., Sarma A.V.S., Karle I.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. P. 8448–8460.
<https://doi.org/10.1021/ja980143+>
30. Фирстова А.А., Кофанов Е.Р., Закшевская В.М., Ковалева М.И. // *Биоорг. химия.* 2019. Т. 45. С. 204–213. [Firstova A.A., Kofanov E.R., Zakshevskaya V.M., Kovaleva M.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 204–213.]
<https://doi.org/10.1134/S0132342319030023>
31. Травень В.Ф. // *Органическая химия: учебник для вузов; в 2 т.* Москва: ИКЦ “Академкнига”, 2004.
32. Островский В.А. // *Соросовский образовательный журнал.* 2000. Т. 6. № 11. С. 30–34.
33. Межфазный катализ: химия, катализаторы и применение / Под ред. Старкс Ч.М. Москва: Химия, 1991. 157 с.
34. Jaszay Z.M., Petnehazy I., Tokke L. // *Synthesis.* 1989. P. 745–747.
<https://doi.org/10.1055/s-1989-27380>
35. Прохорова И.М., Ковалева М.И., Фомичева А.Н. // *Генетическая токсикология: учебное пособие.* Ярославль, 2005. 132 с.
36. Легостаева Т.Б., Ингель Ф.И., Антипанова Н.А., Юрченко В.В., Юрцева Н.А., Котляр Н.Н. // *Гигиена и санитария.* 2010. № 4. С. 47–52.
37. Груммитт О. // *Синтезы органических препаратов.* Москва: Издательство иностранной литературы, 1952.
38. Безбородова О.А., Панкратов А.А., Немцова Е.Р., Венедиктова Ю.Б., Воронцова М.С., Енгальцева Г.Н., Сюбаев Р.Д. // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2020. Т. 10. № 2. С. 96–110.

Synthesis and Biological Activity of Esters Based on Cycloalkenedicarboxylic Acids

A. A. Firstova^{*, #}, E. R. Kofanov^{*}, and M. I. Kovaleva^{**}

[#]Phone: +7 (960) 528-25-77; e-mail: firstova.a.a@mail.ru

^{*}Yaroslavl State Technical University, Moskovsky prosp. 88, Yaroslavl, 150023 Russia

^{**}Yaroslavl State University named after P.G. Demidov, ul. Sovetskaya 14, Yaroslavl, 150003 Russia

Previously undescribed esters based on *N*-substituted imides of cycloaliphatic carboxylic acids have been synthesized in high yields and efficient methods for their preparation have been presented. Toxicological studies of the obtained compounds were carried out using various test objects (*Chlorella vulgaris*, *Allium cepa*, *Drosophila melanogaster*). It was shown that the studied compounds are not active against *D. melanogaster*, increase the frequency of mutations in *C. vulgaris* and have the ability to induce chromosomal rearrangements in *A. cepa*. The synthesized compounds can be used in the development of antitumor drugs.

Keywords: *N*-substituted imides of carboxylic acids, esters, cycloalkenyl fragments, *L*-aminoacid, cytotoxicity, biological activity, mutagenicity



СИНТЕЗ И ТРАНСФИЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ДИСУЛЬФИДНЫХ ПОЛИКАТИОННЫХ АМФИФИЛОВ

© 2023 г. И. А. Петухов*, П. А. Пучков*., 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. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 18.07.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Осуществлен синтез новых поликатионных амфифилов, содержащих в своей структуре дисульфидную группу. На основе полученных соединений и липида-хелпера 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина сформированы катионные липосомы, которые продемонстрировали отсутствие токсичности для клеток НЕК293 и HeLa и высокую эффективность доставки флуоресцентно-меченого олигонуклеотида. Эффективность доставки плазмидной ДНК pEGFP-C2 зависела от клеточной линии и структуры амфифила, при этом липосомы на основе тетракатионных амфифилов оказались наиболее эффективными трансфектантами, которые могут быть использованы для трансфекции эукариотических клеток *in vitro*, а также для проведения дальнейших биологических испытаний *in vivo*.

Ключевые слова: поликатионные амфифилы, катионные липосомы, трансфекция, дисульфидные связи

DOI: 10.31857/S0132342323010232, **EDN:** GHNSNO

ВВЕДЕНИЕ

Быстрое развитие технологии рекомбинантных ДНК, методов переноса плазмидных ДНК в клетку и выяснение молекулярных основ многих заболеваний привело к возникновению новой области медицины — генной терапии. Этот метод лечения наследственных и приобретенных заболеваний основан на введении в клетки терапевтических нуклеиновых кислот (НК) с целью направленного устранения генетических дефектов или придания клеткам новых функций [1]. Главное условие успешного применения генной терапии — эффективная доставка НК в клетки-мишени и создание условий для ее длительного функционирования внутри клеток.

В настоящее время наиболее эффективными системами доставки НК считаются вирусные век-

торы [2], однако они имеют ряд серьезных недостатков. Это стимулирует разработку альтернативных подходов, одним из которых выступает липофекция — метод доставки НК с помощью катионных липосом (КЛ). К преимуществам катионных липосом относятся неинфекционность, способность переносить НК разного размера и защищать их от действия клеточных ферментов, а также стабильность при хранении и экономическая доступность [3]. В настоящее время КЛ, составляющие основу фармацевтических композиций, включающих НК, проходят клинические испытания для лечения ряда заболеваний [4], более того, КЛ используются в качестве платформ при создании мРНК-вакцин против COVID-19 [5]. Существенный недостаток известных на сегодняшний день систем доставки НК на основе липосом — их низкая эффективность, обусловленная наличием внеклеточных и внутриклеточных биологических барьеров [6], которые должен преодолеть НК-липидный комплекс (липоплекс), прежде чем НК проявит свою биологическую активность. К внеклеточным барьерам можно отнести неспецифическое взаимодействие липоплексов с компонентами крови и белками иммунной системы, в результате которых возможны дестабилизация липоплекса и преждевременное вы-

Сокращения: КЛ — катионные липосомы; НК — нуклеиновые кислоты; пДНК — плазмидная ДНК; CDI — 1,1'-карбонилдимидазол; DOPE — 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин; EGFP — усиленный зеленый флуоресцентный белок; FBS — эмбриональная бычья сыворотка; FITC-ODN — олигонуклеотид, меченый флуоресцеином; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; TBUTU — 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурион тетрафторборат.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 246-05-55 доб. 835; эл. почта: puchkov_pa@mail.ru, mamaslov@mail.ru).

свобождение НК, а основными внутриклеточными барьерами, приводящими к снижению эффективности доставки, выступают эндосомальная и ядерная мембраны.

Трансфицирующую активность катионного амфифила, а также его стабильность в биологических системах и токсичность определяет тип связывания гидрофобного и гидрофильного доменов. Устойчивые липиды с простой эфирной связью более токсичны по сравнению с ацильными липидами, которые легко гидролизуются в клетке эндогенными эстеразами. Наиболее удачное сочетание стабильности и токсичности амфифила обеспечивает карбамоильный линкер [7]. Кроме того, для увеличения эффективности высвобождения НК из эндосом и липоплекса в структуру катионных амфифилов вводят лабильные структурные модули, которые разрушаются под действием внутриклеточных факторов и агентов, приводя к дестабилизации липоплекса [8, 9]. Один из типов таких катионных амфифилов — липиды с дисульфидными связями, разрушаемые под действием внутриклеточных восстановителей (NADPH, глутатион, редуктазы) [10, 11].

Ранее в нашей лаборатории был синтезирован поликатионный амфифил **X2**, в структуре которого остаток холестерина был присоединен к первичной аминогруппе спермина через карбамоильный линкер [12]. Целью данной работы стал синтез новых поликатионных амфифилов **S1–S3** — аналогов амфифила **X2**, содержащих в своей структуре дисульфидную группу. Амфифилы **S1–S3** различаются линкером, связывающим спер-

мин и гидрофобный домен (сложноэфирный, карбамоильный), длиной спейсера, а также количеством катионных аммонийных групп (трикатионные и тетракатионные амфифилы). В работе проведена предварительная оценка способности катионных липосом, сформированных из амфифилов **S1–S3** и липида-хелпера 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина (DOPE), доставлять в эукариотические клетки короткие и протяженные нуклеиновые кислоты — синтетический олигонуклеотид и плазмидную ДНК (пДНК).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания поликатионных амфифилов в качестве основных структурных компонентов были выбраны природные соединения — холестерин и спермин (рис. 1). Известно, что катионные амфифилы, содержащие в качестве гидрофобного остатка холестерин, обладают высокой трансфицирующей активностью, низкой токсичностью и применяются для исследования механизмов слияния искусственных мембран и структурно-функционального изучения сформированных на их основе липоплексов [13]. Природные полиамины, в том числе спермин, способны упаковывать ДНК в тороидальные и стержневые структуры, при этом метиленовые фрагменты, разделяющие атомы азота, играют важную роль во взаимодействии полиамина с двойной спиралью ДНК. Среди липофильных полиаминов производные спермина наиболее эффективно связывают и упаковывают ДНК и поэтому лучше переносят ее в клетки. На

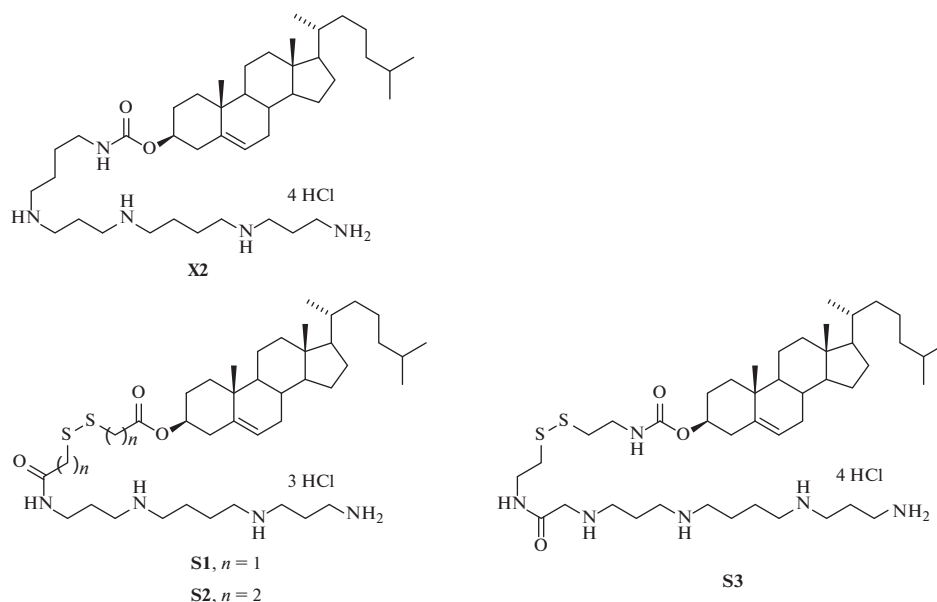


Рис. 1. Поликатионные амфифилы **X2** и **S1–S3** на основе спермина и холестерина.

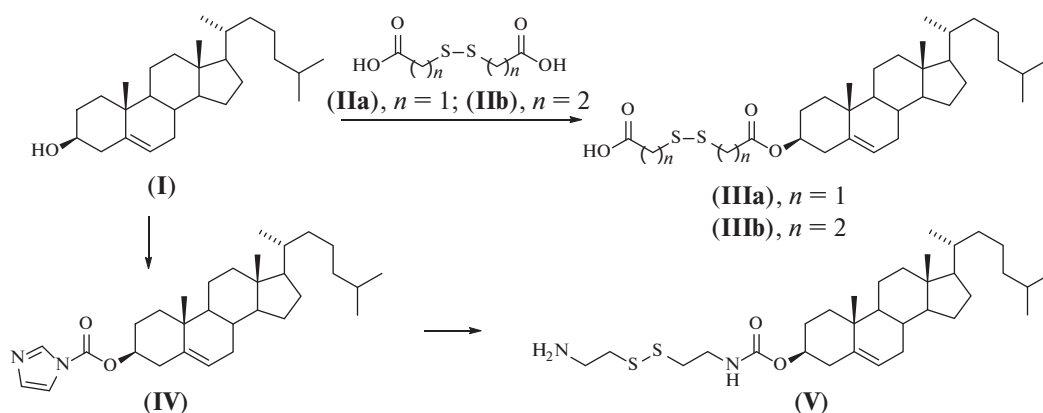


Рис. 2. Схема синтеза аминокпроизводного холестерина (V).

основе спермина были созданы некоторые коммерческие препараты для трансфекции [14–16].

Один из наиболее простых способов получения амфифилов с дисульфидной связью заключается в присоединении к молекуле холестерина спейсера, содержащего дисульфидную группу. Такие спейсеры (IIa, b) были получены с количественными выходами окислением перекисью водорода 2-меркаптоуксусной и 3-меркаптопропионовой кислот соответственно [17].

Ацилирование холестерина (I) дитиодиуксусной (IIa) и дитиодипропионовой кислотами (IIb) с использованием в качестве конденсирующего агента *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (DCC) в присутствии *N,N*-диметиламинопиридина (DMAP) приводило к получению производных холестерина (IIIa, b) со сложноэфирной связью между стероидным остатком и спейсером (рис. 2). Варьирование соотношениями реагентов показало, что использование двухкратного избытка дикарбоновых кислот (IIa, b) и 0.5 экв. DMAP приводит к образованию соединений (IIIa, b) с выходом 67 и 45% соответственно, тогда как при использовании других конденсирующих агентов (BOP, CDI, Wsc_2O) выход соединений (IIIa, b) не превышал 10%.

Для создания амфифила с карбамоильным линкером холестерин (I) обрабатывали 1.1-кратным избытком 1,1'-карбонилдиимидазола (CDI), получая имидазolid (IV) [12], дальнейшее взаимодействие которого с избытком цистамина приводило к получению соединения (V) с выходом 59%.

Синтез дисульфидных трикатионных амфифилов (S1 и S2) осуществляли конденсацией три-*Wsc*-защитенного спермина (VI) [18] и карбоксипроизводных холестерина (IIIa, b) с использованием различных активирующих агентов (рис. 3, табл. 1). Наибольший выход соединений (VIIa, b) был достигнут при использовании TBTU (2-(1*H*-

бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуриония тетрафторборат). После удаления *Wsc*-защитных групп действием 4 н. хлористого водорода в диоксане получали трикатионные амфифилы (S1 и S2) с количественным выходом.

Для синтеза тетракатионного амфифила (S3) на первом этапе было получено карбоксипроизводное спермина (IX). Для этого проводили *N*-сульфонирование соединения (VI) под действием 1.2-кратного избытка 2-нитробензолсульфонилхлорида в присутствии триэтиламина, получая соответствующий амид, в результате последующего алкилирования которого метиловым эфиром бромуксусной кислоты получали соединение (VIII) с выходом 77% на две стадии. Последовательное удаление 2-нитробензолсульфонильной группы под действием 10-кратного избытка тиофенола в присутствии карбоната цезия и омыление метилового эфира раствором гидроксида натрия приводило к образованию соединения (IX) с выходом 85% (рис. 3).

Целевой тетракатионный амфифил (S3) получали конденсацией полиаминного синтона (IX) и аминокпроизводного холестерина (V) в присутствии TBTU. После хроматографической очистки на силикагеле соединение (X) было выделено с выходом 92%. В результате последующего удаления *Wsc*-групп получали целевой амфифил S3 с выходом 81%.

Изучение свойств полученного ряда соединений позволяет оценить влияние структуры дисульфидных катионных амфифилов на их цитотоксичность и трансфицирующую активность. Для этого методом гидратации липидной пленки [19] были получены КЛ, состоящие из поликатионных амфифилов S1, S2 или S3 и липида-хелпера DOPE в соотношении 1 : 1 (мольн.). Описанные ранее катионные липосомы X2-DOPE [20],

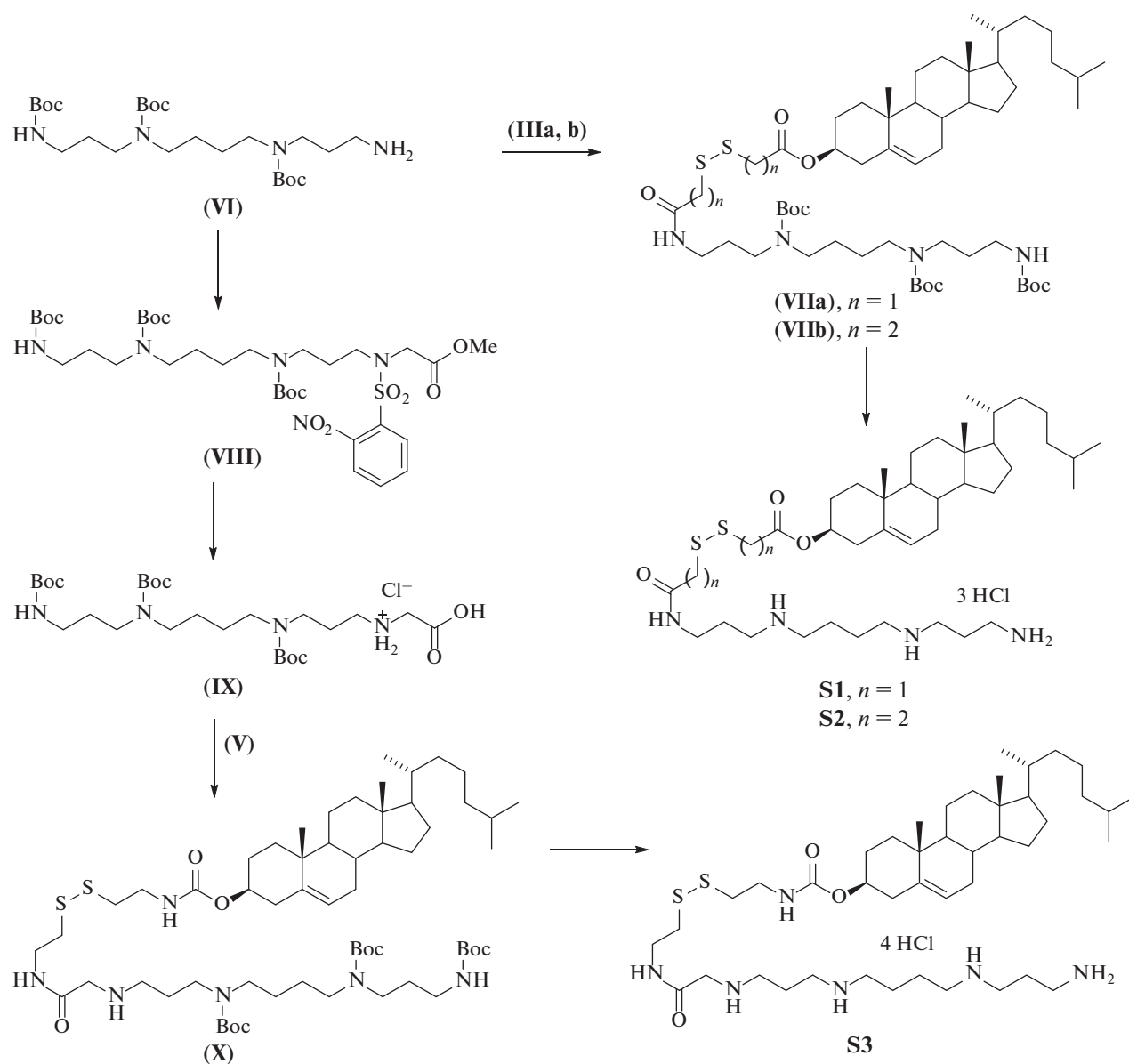


Рис. 3. Схема синтеза дисульфидных поликатионных амфифилов.

не содержащие дисульфидную связь, использовали во всех экспериментах для сравнения.

Цитотоксичность КЛ оценивали с помощью МТТ-теста на трех линиях эукариотических клеток (НЕК293, HeLa и ВНК21). Клетки инкубировали с КЛ в диапазоне концентраций 2.5–40.0 мкМ в течение 24 ч в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS). Для клеток НЕК293 и HeLa значение IC_{50} (концентрация КЛ, при которой наблюдается гибель 50% клеток в популяции) было достигнуто только для липосом X2-DOPE (табл. 2). Клетки ВНК21 оказались более чувствительны к цитотоксическому действию КЛ, особенно S1-DOPE и S3-DOPE, тогда как наимень-

Таблица 1. Оптимизация условий синтеза соединений (VIIa, b)

Карбоксильная компонента	Конденсирующий агент	Выход соединений (VIIa, b), %
(IIIa)	BOP	28
	DCC/DMAP	27
	TBTU	60
(IIIb)	TBTU	82

шей цитотоксичностью в отношении всех использованных линий клеток обладали липосомы S2-DOPE, содержащие трикатионный амфирил с более длинным спейсером.

Способность КЛ образовывать липоплексы при различных соотношениях N/P (отношение количества аминогрупп катионного амфирила к количеству фосфатных групп НК) — это важная характеристика, которая может оказывать значительное влияние на эффективность трансфекции. Для изучения эффективности связывания КЛ с НК был использован метод задержки в геле [21]. Для всех КЛ при соотношении N/P 2/1 наблюдалось неполное включение плазмидной ДНК рEGFP-C2, кодирующей усиленный зеленый флуоресцентный белок, в состав липоплекса, о чем свидетельствует наличие полосы свободной ДНК, мигрирующей в геле (рис. 4). При увеличении соотношения N/P до 4/1 для липосом X2-DOPE и S3-DOPE наблюдалось полное связывание пДНК, тогда как для липосом S1-DOPE и S2-DOPE полное связывание пДНК происходило при соотношениях N/P 6/1 и 8/1 соответственно. Таким образом, наименьшей эффективностью связывания обладают липосомы S2-DOPE: для этих КЛ полное связывание пДНК происходило только при N/P 8/1.

В качестве объектов для доставки в эукариотические клетки были выбраны неспецифичный короткий 25-звенный олигонуклеотид меченный флуоресцеином по 5'-концу (FITC-ODN), и пДНК рEGFP-C2. Липоплексы формировали при разных соотношениях N/P, а эффективность накопления/доставки НК в клетках анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии, определяя и количество трансфицированных клеток, и уровень интенсивности флуоресценции клеток в популяции. Эксперименты проводили в присутствии 10% FBS в ростовой среде, поскольку известно, что наличие FBS в среде может влиять и на стабильность липоплек-

Таблица 2. Цитотоксичность катионных липосом

КЛ	IC ₅₀ , мкМ		
	HEK293	HeLa	BHK21
X2-DOPE	37.8 ± 0.1	29.6 ± 2.0	18.8 ± 1.3
S1-DOPE	н.д.	н.д.	2.9 ± 0.3
S2-DOPE	н.д.	н.д.	31.1 ± 5.5
S3-DOPE	н.д.	н.д.	9.4 ± 0.5

Примечание: н.д. — значение IC₅₀ не было достигнуто в диапазоне концентраций 2.5–40.0 мкМ.

сов, образованных липосомами, и на их взаимодействие с клетками [22]. Эффективность доставки НК в клетки сравнивали с коммерческим препаратом Липофектаминоном 2000 (Lf2000).

В случае доставки FITC-ODN увеличение соотношения N/P приводило к увеличению числа трансфицированных клеток: наибольшую эффективность трансфекции проявляли липосомы S2-DOPE и S3-DOPE при соотношении N/P 3/1 (рис. 5). Следует отметить, что процент клеток, трансфицированных FITC-ODN, и в случае дисульфидных липосом (S2-DOPE и S3-DOPE), и в случае липосом X2-DOPE, нечувствительных к восстановлению, был примерно одинаковым, а средняя интенсивность флуоресценции в случае липосом S3-DOPE была существенно выше по сравнению со всеми остальными композициями, что говорит о более эффективном накоплении FITC-ODN в клетках.

Результаты трансфекции клеток HEK293 пДНК показали, что КЛ на основе дисульфидных трикатионных амфирилов S1 и S2 неэффективно доставляют пДНК в клетки (рис. 6а, 6б). Наибольшая трансфицирующая активность наблюдалась для липосом S3-DOPE и X2-DOPE при N/P 6/1, а дальнейшее увеличение количества ам-

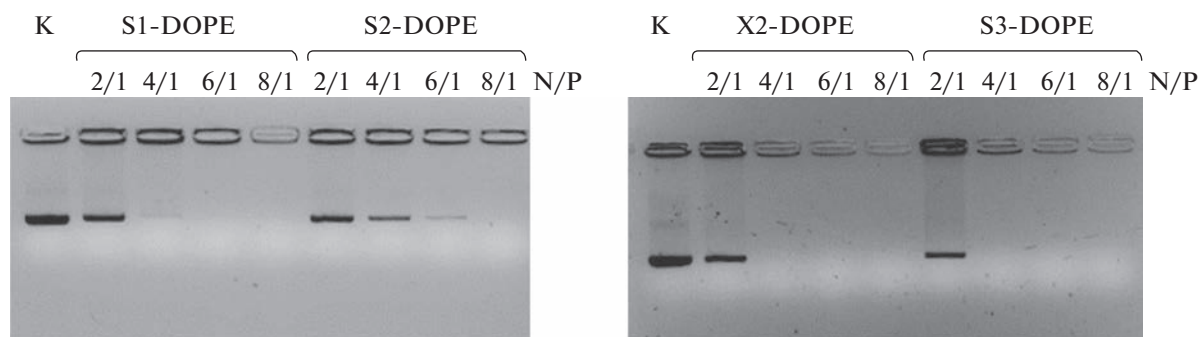


Рис. 4. Связывание катионных липосом с пДНК при разных соотношениях N/P, определенное методом задержки в геле. Электрофореграмма 1.5%-ного агарозного геля после разделения комплексов липосом с пДНК. Окрашивание бромистым этидием. К — свободная пДНК.

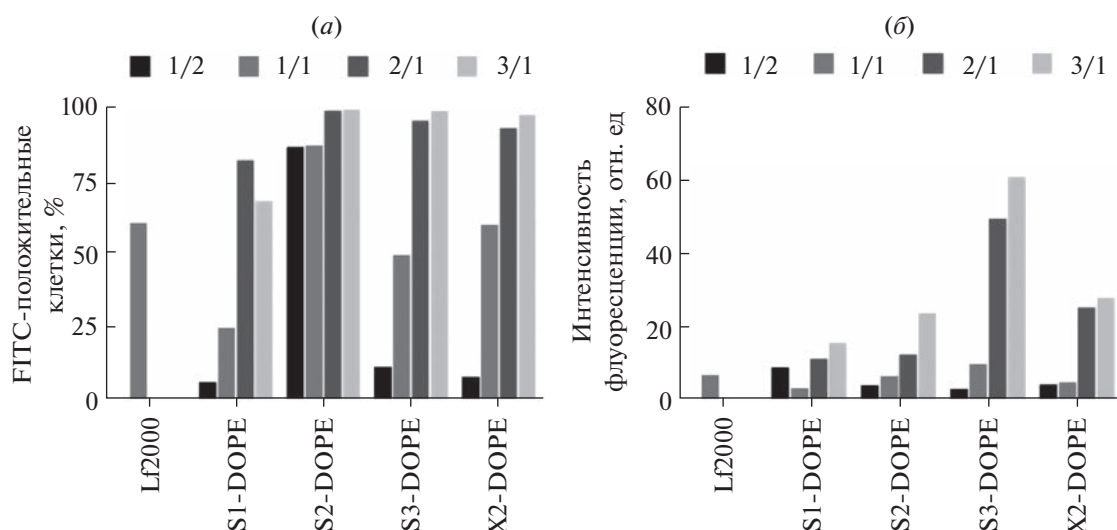


Рис. 5. Накопление флуоресцентно-меченого олигонуклеотида в клетках HEK293 в составе комплексов с катионными липосомами при различных соотношениях N/P в присутствии сыворотки крови в ростовой среде. Процент трансфицированных клеток (а) и средняя интенсивность флуоресценции клеток в популяции (б) определяли методом проточной цитометрии. Стандартное отклонение не превышало 7–9%.

фифила в липоплексе приводило к снижению эффективности доставки.

Аналогичный эксперимент по трансфекции клеток HeLa показал схожие результаты — наиболее эффективными были липосомы S3-DOPE и X2-DOPE на основе тетракационных амфифилов, причем эффективность доставки пДНК возрастала с увеличением количества катионных липосом в липоплексе. Тем не менее трансфицирующая активность КЛ S3-DOPE и X2-DOPE была ниже таковой для Липофектамина 2000. Доставка пДНК в клетки ВНК21 была менее эффективной. Возможно, это связано с меньшей скоростью деления клеток ВНК21 по сравнению с клетками HEK293 и HeLa [23]. В случае клеток ВНК21 только липосомы S3-DOPE обеспечивали сопоставимый с Липофектамином 2000 уровень трансфекции по числу EGFP-положительных клеток, но меньшую среднюю интенсивность флуоресценции клеточной популяции.

Влияние длины спейсера (амфифилов S1 и S2) на эффективность доставки пДНК не было однозначно установлено. Различия в эффективности доставки разных типов НК обусловлены тем, что для FITC-ODN фиксируется сигнал флуоресценции после его проникновения в составе комплексов через плазматическую мембрану, тогда как для пДНК регистрируется интенсивность флуоресценции экспрессированного клетками белка EGFP после проникновения комплекса в цитозоль, высвобождения из эндосом и транспорта пДНК в ядро клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растворители отечественного производства, а также DMF, карбонат калия, метиловый эфир бромуксусной кислоты, 2-нитробензолсульфонилхлорид, триэтиламин, 4 н. раствор HCl в диоксане (Aldrich, США); TBUT, карбонат цезия (Fluka, США); тиофенол (Merck, Германия). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в следующих системах: CHCl₃–MeOH, 10 : 0.6 (А), 40 : 1 (Б), 10 : 1 (В); CHCl₃–MeOH–PrⁱNH₂, 4 : 1 : 2 (Г); CHCl₃–MeOH–CH₃COOH, 200 : 1 : 0.3 (Д); CHCl₃–MeOH–CH₃COOH, 1 : 0.16 : 0.05 (Е); 1 : 0.12 : 0.05 (Ж). Пятна на хроматограммах обнаруживали с использованием раствора фосформolibденовая кислота–сульфат церия(IV) с последующим прогреванием при 120°C, паров хлора с последующим опрыскиванием раствором *o*-толуидина или при УФ-облучении (254 нм). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (0.040–0.063 мм; Merck, Германия). Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали на импульсном Фурье-спектрометре DPX-300 (Bruker, Германия) в CDCl₃, если не указано иное (внутренний стандарт — тетраметилсилан). Значения химических сдвигов (δ) приведены в миллионных долях (м.д.), КССВ (J) — в герцах (Гц). Масс-спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия) методом лазерной десорбции/ионизации с использованием в качестве матрицы 2,5-дигидроксibenзойной кислоты.

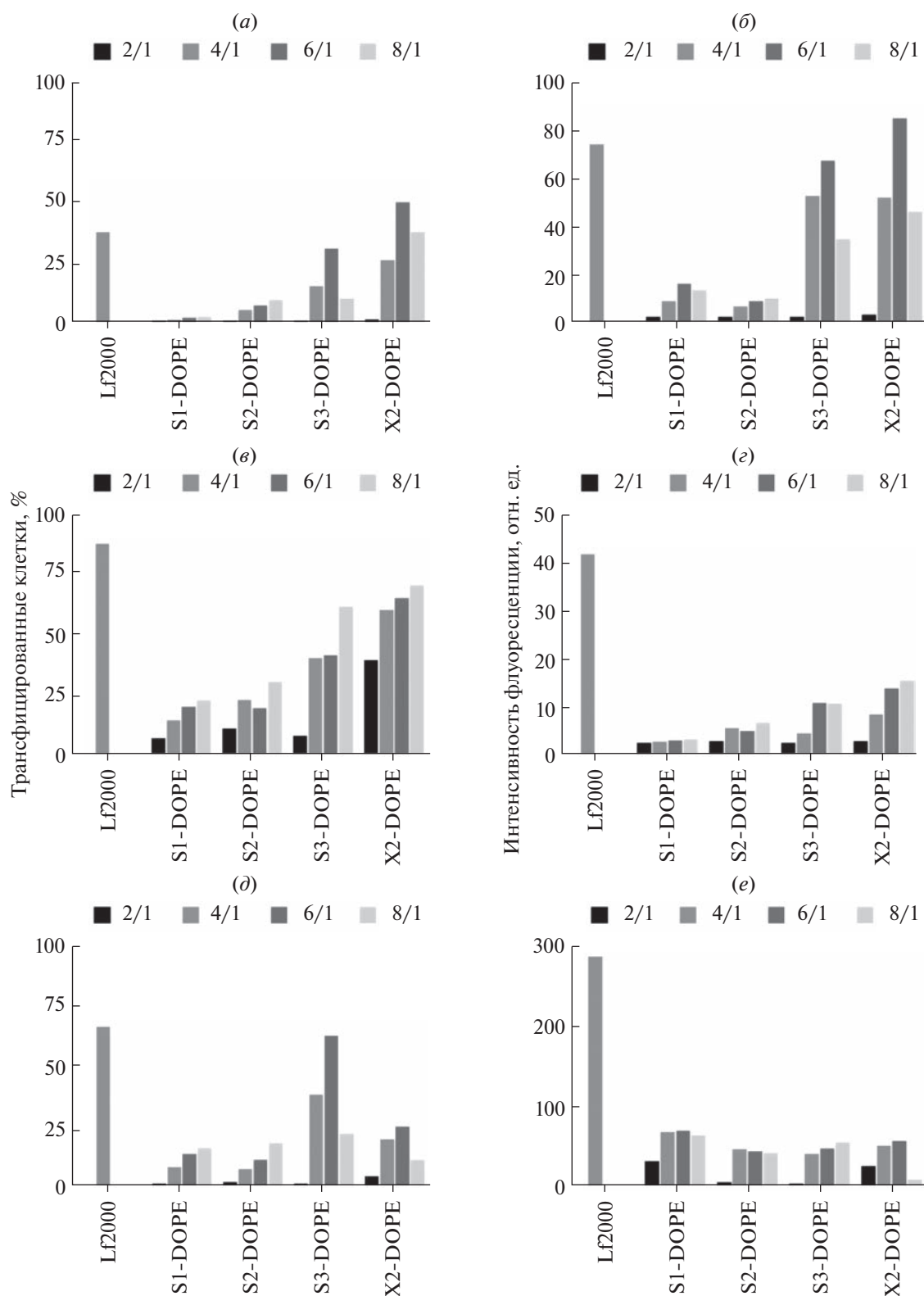


Рис. 6. Трансфекция клеток HEK293 (а, б), HeLa (в, г) и ВНК21 (д, е) комплексами катионных липосом с пДНК (pEGFP-C2) при различных соотношениях N/P. Процент трансфицированных клеток (а, в, д) и среднюю интенсивность флуоресценции клеток в популяции (б, г, е) определяли методом проточной цитометрии через 44 ч после трансфекции клеток по уровню экспрессии EGFP. Стандартное отклонение не превышало 7–9%.

Синтез имидазолида (IV) [12], N^1, N^4, N^9 -трет-бутоксикарбонил-1,12-диамино-4,9-диаза-додекана (VI) [18], соединения (IIIa) [24] и амфи-фила X2 [12] осуществляли согласно описанным ранее методам.

3-[3-(Холест-5-ен-3 β -илоксикарбонил)пропил]дитиопропионовая кислота (IIIb). К раствору холестерина (I) (1.0 г, 2.59 ммоль) в безводном этилацетате (40 мл), охлажденному до 0°C, добавляли в атмосфере аргона дитиодипропионовую кислоту (1.09 г, 5.17 ммоль), DCC (1.067 мг, 5.17 ммоль), а затем DMAP (0.158 мл, 1.29 ммоль) и Et₃N (0.54 мл, 3.88 ммоль). Через 12 ч реакционную массу фильтровали, промывали 3%-ным водным раствором соляной кислоты (3 $\times$ 30 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали, растворители удаляли в вакууме. После хроматографии на силикагеле (CHCl₃–MeOH–CH₃COOH, 25 : 0.1 : 0.03) получили соединение (IIIb) в виде кристаллов белого цвета (0.681 г, 45%). R_f 0.40 (Д). Масс-спектр, m/z : 601.217 [$M + Na$]⁺, вычислено для C₃₃H₅₄O₄S₂ 578.346 [M]⁺. Спектр ¹H-ЯМР: 0.67 (с, 3H, C(13)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.86 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.91 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.01 (с, 3H, C(10)Me), 0.95–1.70 (м, 21H, протоны Chol), 1.75–2.10 (м, 5H, протоны Chol), 2.26–2.40 (м, 2H, H₂C(4)), 2.70 (т, 2H, J 7.1, CH₂COOChol), 2.79 (т, 2H, J 7.5, CH₂COOH), 2.92 (т, 2H, J 7.1, CH₂S), 2.92 (т, 3H, J 7.5, CH₂S), 4.52–4.78 (м, 1H, H(3)), 5.30–5.45 (м, 1H, H(6)). Спектр ¹³C-ЯМР: 11.83, 18.69, 19.28, 21.00, 22.54, 22.80, 23.81, 24.26, 27.73, 27.98, 28.20, 31.82, 31.87, 32.70, 33.31, 33.86, 34.42, 35.76, 36.16, 36.54, 36.92, 38.04, 39.49, 39.69, 49.98, 56.11, 56.65, 74.54, 122.74, 139.45, 171.08, 177.59.

(Холест-5-ен-3 β -ил)-N-{2-[(2-аминоэтил)дитио]этил}карбамата гидрохлорид (V). К суспензии цистамина (1.98 г, 13.00 ммоль) в безводной смеси растворителей CH₂Cl₂–Et₃N–диоксан (30 : 10 : 10 мл) добавляли имидазолид (IV) (0.782 г, 1.63 ммоль) и перемешивали при кипении в течение 35 ч. Реакционную смесь фильтровали, промывали 3%-ным водным раствором HCl (3 $\times$ 30 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали, растворители удаляли в вакууме. После хроматографии на силикагеле (CHCl₃–MeOH, 10 : 1) получили соединение (V) в виде кристаллов светло коричневого цвета (0.580 г, 59%). R_f 0.30 (В). Масс-спектр, m/z : 565.456 [$M - Cl$]⁺, вычислено для C₃₂H₅₇N₂O₂S₂: 565.386 [$M - Cl$]⁺. Спектр ¹H-ЯМР: 0.61 (с, 3H, C(13)Me), 0.79 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.80 (д, 3H, J 6.6, C(25)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.2, C(20)Me), 0.94 (с, 3H, C(10)Me), 0.87–1.62 (м, 21H, протоны Chol), 1.65–2.07 (м, 5H, протоны Chol), 2.17–2.40 (м, 2H, H₂C(4)), 2.70–2.90 (м, 2H, CH₂NH₂), 2.79

(т, 2H, J 7.5, CH₂COOH), 2.92 (т, 2H, J 7.1, CH₂S), 2.92 (т, 3H, J 7.5, CH₂S), 2.90–3.17 (м, 2H, CH₂NHCOOChol), 3.17–3.60 (м, 4H, 2 CH₂S), 4.20–4.58 (м, 1H, H(3)), 5.22–5.40 (м, 1H, H(6)), 5.43–5.70 (м, 1H, NHCO), 7.00–7.50 (м, 3H, NH₂). Спектр ¹³C-ЯМР: 11.98, 18.84, 19.49, 21.19, 22.65, 22.90, 24.06, 24.41, 28.09, 28.35, 32.00, 35.81, 35.95, 36.34, 36.68, 37.14, 38.21, 38.75, 39.29, 39.63, 39.89, 50.11, 56.39, 56.81, 74.69, 122.65, 139.89, 156.44.

(Холест-5-ен-3 β -ил)-N¹¹, N¹⁶, N¹⁹-три-(трет-бутилоксикарбонил)-19-амино-6-оксо-3,4-дитиа-7,11,16-триазадодеканоат (VIIa). К раствору соединения (VI) (99 мг, 0.198 ммоль) в ДМФА (2.5 мл) последовательно добавляли соединение (IIIa) (0.131 г, 0.238 ммоль), TBUTU (0.076 мг, 0.238 ммоль) и Et₃N (0.033 мл, 0.238 ммоль). Через 1 ч растворители удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью CHCl₃–MeOH, 100 : 1. Получили соединение (VIIa) в виде кристаллизующегося бесцветного масла (0.122 г, 60%). R_f 0.35 (Б). Спектр ¹H-ЯМР: 0.68 (с, 3H, C(13)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.86 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.91 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.02 (с, 3H, C(10)Me), 0.90–2.10 (м, 34H, протоны Chol, 2 NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂(CH₂)₂CH₂N), 1.43 (с, 9H), 1.45 (с, 9H) и 1.50 (с, 9H, 3 C(CH₃)₃), 2.29–2.40 (м, 2H, H₂C(4)), 3.02–3.35 (м, 12H, 6 CH₂N), 3.47 (с, 2H, SCH₂COOChol), 3.54 (с, 2H, SCH₂CONH), 4.35–4.75 (м, 1H, H(3)), 5.27–5.40 (м, 1H, H(6)). Спектр ¹³C-ЯМР: 11.85, 18.72, 19.27, 21.05, 22.53, 22.77, 23.83, 24.27, 25.91, 27.70, 27.99, 28.19, 28.44, 28.47, 29.67, 31.88, 31.91, 33.94, 35.77, 36.20, 36.60, 36.95, 37.68, 38.00, 39.52, 39.75, 41.04, 41.71, 42.67, 44.11, 46.85, 49.14, 50.08, 56.20, 56.72, 75.76, 79.64, 122.99, 139.31, 156.01, 167.95, 169.08.

(Холест-5-ен-3 β -ил)-N¹³, N¹⁸, N²¹-три-(трет-бутилоксикарбонил)-21-амино-8-оксо-4,5-дитиа-9,13,18-триазагенэйкозаноат (VIIb). Получали как соединение (VIIa), исходя из соединения (VI) (0.158 г, 0.314 ммоль), соединения (IIIb) (0.218 г, 0.377 ммоль), TBUTU (0.121 г, 0.377 ммоль) и Et₃N (0.053 мл, 0.377 ммоль). Получили соединение (VIIb) в виде кристаллизующегося бесцветного масла (0.178 г, 82%). R_f 0.4 (Б). Спектр ¹H-ЯМР: 0.68 (с, 3H, C(13)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.86 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.91 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.02 (с, 3H, C(10)Me), 0.91–2.05 (м, 34H, протоны Chol, 2 NCH₂CH₂CH₂N, NCH₂(CH₂)₂CH₂N), 1.46 (уш. с, 27H, 3 C(CH₃)₃), 2.27–2.37 (м, 2H, H₂C(4)), 2.58 (т, 2H, J 7.1, SCH₂CH₂COOChol), 2.70 (т, 2H, J 7.1, SCH₂CH₂CONH), 2.87–3.00 (м, 4H, 2 SCH₂), 3.07–3.40 (м, 12H, 6 CH₂N), 4.55–4.72 (м, 1H, H(3)), 5.33–5.40 (м, 1H, H(6)). Спектр ¹³C-ЯМР: 11.82, 18.67, 19.28, 20.98, 22.54, 22.80, 23.78, 24.24, 25.94, 27.17,

27.64, 27.72, 27.98, 28.19, 28.33, 28.41, 31.79, 31.86, 33.11, 33.82, 34.40, 35.75, 35.97, 36.13, 36.54, 36.91, 38.05, 39.47, 39.66, 42.94, 43.31, 46.66, 46.81, 49.95, 56.06, 56.63, 74.46, 79.92, 80.33, 122.74, 139.46, 157.02, 157.51, 170.66, 171.13.

(Холест-5-ен-3 β -ил)-19-амино-6-оксо-3,4-дигидро-7,11,16-триазадодеканоат тригидрохлорид (S1). К раствору соединения (VIIa) (0.055 г, 0.053 ммоль) в 3 мл CH_2Cl_2 добавляли 4 н. HCl в диоксане (1 мл) и перемешивали 1 ч при 24°C. Растворители удаляли в вакууме, остаток промывали CHCl_3 . Получили соединение **S1** в виде аморфных бежевых кристаллов (0.030 г, 67%). R_f 0.85 (Г). Масс-спектр, m/z : 735.623 $[M - 3\text{HCl} + \text{H}]^+$, вычислено для $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$: 735.528 $[M - 3\text{HCl} + \text{H}]^+$. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 — CD_3OD , 1 : 5): 0.67 (с, 3H, C(13)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.86 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.92 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.03 (с, 3H, C(10)Me), 0.91–2.05 (м, 34H, протоны Chol, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.30–2.41 (м, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4)$), 2.91–3.21 (м, 12H, 6 CH_2N), 3.46 (с, 2H, $\text{SCH}_2\text{COOChol}$), 3.55 (с, 2H, SCH_2CONH), 4.36–4.76 (м, 1H, H(3)), 5.28–5.41 (м, 1H, H(6)).

(Холест-5-ен-3 β -ил)-21-амино-8-оксо-4,5-дигидро-9,13,18-триазагенэйкозаноат тригидрохлорид (S2). Получали как соединение **S1**, исходя из соединения (VIIb) (0.05 г, 0.073 ммоль). Получили соединение **S2** в виде аморфных белых кристаллов (0.048 г, 76%). R_f 0.86 (Г). Масс-спектр, m/z : 763.725 $[M - 3\text{HCl} + \text{H}]^+$, вычислено для $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$: 763.560 $[M - 3\text{HCl} + \text{H}]^+$. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 — CD_3OD , 1 : 5): 0.68 (с, 3H, C(13)Me), 0.84 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.85 (д, 3H, J 6.5, C(25)Me), 0.90 (д, 3H, J 6.5, C(20)Me), 1.01 (с, 3H, C(10)Me), 0.90–2.06 (м, 34H, протоны Chol, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.27–2.37 (м, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4)$), 2.59 (т, 2H, J 7.1, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{COOChol}$), 2.71 (т, 2H, J 7.1, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.88–3.21 (м, 16H, 2 SCH_2 , 6 CH_2N), 4.55–4.72 (м, 1H, H(3)), 5.33–5.40 (м, 1H, H(6)).

Метил- N' -[N^4, N^9, N^{12} -три-(*трет*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодец-1-ил]- N' -(2-нитрофенилсульфонил)аминоацетат (VIII). К охлажденному до 0°C раствору соединения (VI) (0.431 г, 0.858 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (5 мл) добавляли молекулярные сита 4 Å (1.0 г) Et_3N (0.239 мл, 1.716 ммоль) и 2-нитробензолсульфонилхлорид (0.228 г, 1.02 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 24°C. Молекулярные сита отфильтровывали, промывали CH_2Cl_2 , растворители удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью CHCl_3 — MeOH (50 : 1). Получили N^4, N^9, N^{12} -три-

(*трет*-бутоксикарбонил)- N' -(2-нитрофенилсульфонил)-1,12-диамино-4,9-диазадодекан в виде кристаллизующегося масла (0.507 г, 88%). Масс-спектр, m/z : 710.295 $[M + \text{Na}]^+$, вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{NaO}_{10}\text{S}$: 710.341 $[M + \text{Na}]^+$. Спектр ^1H -ЯМР: 1.27 (уш. с, 3H, 3 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ и $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.52–1.71 (м, 4H, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.92–3.11 (м, 8H, 4 NCH_2), 3.11–3.30 (м, 4H, 2 NHCH_2), 7.59–7.71 (м, 2H), 7.71–8.89 (м, 1H) и 8.00–8.11 (м, 1H, C_6H_4). Спектр ^{13}C -ЯМР: 25.96, 28.54, 28.59, 28.93, 37.91, 41.03, 43.78, 44.23, 46.82, 47.05, 79.16, 79.74, 80.02, 125.25, 130.93, 132.68, 133.51, 148.29, 156.17.

К раствору N^4, N^9, N^{12} -три-(*трет*-бутоксикарбонил)- N' -(2-нитрофенилсульфонил)-1,12-диамино-4,9-диазадодекана (0.271 г, 0.394 ммоль) в безводном ДМФА (3 мл) последовательно добавляли Cs_2CO_3 (0.128 г, 0.394 ммоль) и метиловый эфир бромуксусной кислоты (0.149 мл, 1.58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 75°C. К реакционной смеси добавляли 15 мл CH_2Cl_2 , промывали 5%-ной лимонной кислотой (3 $\times$ 20 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью CHCl_3 — MeOH (175 : 1). Получили соединение (VIII) в виде кристаллизующегося масла желтоватого цвета (0.270 г, 90%). R_f 0.51 (Б). Спектр ^1H -ЯМР: 1.26–1.46 (м, 4H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.32 (с, 18H), 1.35 (с, 9H, 3 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.46–1.60 (м, 2H), 1.60–1.75 (м, 2H, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.90–3.23 (м, 10H, 2 CH_2NCH_2 , NHCH_2), 3.23–3.37 (м, 2H, NCH_2CH_2), 3.54 (с, 3H, OCH_3), 4.10 (с, 2H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2$), 7.46–7.68 (м, 3H), 7.87–8.02 (м, 1H, C_6H_4). Спектр ^{13}C -ЯМР: 25.87, 26.92, 28.46, 28.48, 37.63, 43.96, 44.49, 46.42, 46.75, 47.81, 52.27, 78.96, 79.59, 124.20, 130.86, 131.74, 133.13, 133.70, 148.04, 155.46, 156.07, 169.14.

2-[N^4, N^9, N^{12} -Три-(*трет*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодец-1-ил]аминоуксусной кислоты гидрохлорид (IX). К раствору соединения (VIII) (0.178 г, 0.235 ммоль) в ДМФА (2 мл) при перемешивании добавляли K_2CO_3 (0.036 г, 0.258 ммоль), а затем PhSH (0.241 мл, 2.35 ммоль). Через 1 ч к реакционной массе добавляли 10 мл CH_2Cl_2 , промывали водой (15 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали. После хроматографии на силикагеле CHCl_3 — MeOH —25%-ный водный NH_3 (5 : 0.1 : 0.01) получили метил- N' -[N^4, N^9, N^{12} -три-(*трет*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодец-1-ил]аминоацетат в виде кристаллизующегося масла (0.116 г, 86%). R_f 0.33 (А). Масс-спектр, m/z : 575.456 $[M + \text{H}]^+$, вычислено для $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_8$: 575.404 $[M + \text{H}]^+$. Спектр ^1H -ЯМР: 1.25–1.48 (м,

4H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.34 (с, 9H), 1.35 (с, 9H), 1.36 (с, 9 H, 3 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.48–1.70 (м, 4H, $2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.51 (т, 2H, J 7.0, NHCH_2CH_2), 2.91–3.25 (м, 10H, 2 CH_2NCH_2 , NHCH_2), 3.31 (с, 2H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2$), 3.63 (с, 3H, OCH_3). Спектр ^{13}C -ЯМР: 25.52, 25.93, 28.39, 28.93, 37.36, 43.75, 44.10, 44.82, 46.80, 50.73, 51.66, 78.77, 79.20, 79.43, 155.51, 155.99, 172.79.

К раствору метил- N^4, N^9, N^{12} -три-(*трет*-бутоксикарбонил)-12-амино-4,9-диазадодец-1-ил]аминоацетата (0.100 г, 0.174 ммоль) в MeOH (3 мл) при перемешивании добавляли NaOH (0.031 г, 0.783 ммоль) в 0.5 мл воды. Через 2 ч к реакционной массе добавляли 10 мл CH_2Cl_2 , промывали 3%-ным водным раствором HCl (15 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали. Получили соединение (IX) в виде кристаллов белого цвета (105 мг, 100%). R_f 0.33 (E). Масс-спектр, m/z : 561.476 $[M - \text{Cl}]^+$, вычислено для $\text{C}_{27}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_8$: 561.386 $[M - \text{Cl}]^+$. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$, 1 : 5): 1.17–1.40 (уш. с, 31H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$, 3 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.40–1.60 (м, 2H), 1.70–1.93 (м, 2H, 2 $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.63–2.82 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.83–3.18 (м, 10H, 2 CH_2NCH_2 , NHCH_2), 3.30 (с, 2H, $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2$). Спектр ^{13}C -ЯМР: 24.21, 25.10, 27.59, 27.64, 28.16, 36.74, 42.78, 43.29, 43.67, 44.19, 45.79, 46.29, 49.07, 78.47, 79.18, 79.60, 155.73, 155.80, 155.85, 169.73.

N^{14}, N^{19}, N^{22} -Три-(*трет*-бутоксикарбонил)- N^1 -(холест-5-ен-3 β -илоксикарбонил)-1,22-диамино-8-оксо-3,4-дитиа-7,10,14,19-тетраазадокозан (X). К охлажденному до 0°C раствору соединения (IX) (100 мг, 0.167 ммоль) в ДМФА (5 мл) последовательно добавляли ТВТУ (0.134 мг, 419 ммоль), раствор соединения (V) (0.302 мг, 0.502 ммоль), DIEA (0.146 мл, 0.837 ммоль) в ДМФА (2.5 мл). Через 2 ч к реакционной массе добавляли 20 мл CH_2Cl_2 , промывали 3%-ным водным раствором HCl (2 $\times$ 15 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали. После хроматографии на силикагеле CHCl_3 –MeOH (80 : 1) получили соединение (X) в виде кристаллизующегося масла (0.176 г, 92%). R_f 0.57 (Ж). Масс-спектр, m/z : 1107.867 $[M - \text{Cl}]^+$, вычислено для $\text{C}_{59}\text{H}_{107}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}_2$: 1107.754 $[M - \text{Cl}]^+$. Спектр ^1H -ЯМР: 0.64 (с, 3H, $\text{C}(13)\text{Me}$), 0.83 (д, 3H, J 6.6, $\text{C}(25)\text{Me}$), 0.84 (д, 3H, J 6.6, $\text{C}(25)\text{Me}$), 0.88 (д, 3H, J 6.5, $\text{C}(20)\text{Me}$), 0.97 (с, 3H, $\text{C}(10)\text{Me}$), 0.85–1.70 (м, 36H, протоны Chol, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.40 (с, 9H), 1.41 (с, 9H) и 1.42 (с, 9H, 3 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.70–2.07 (м, 7H, протоны Chol, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.20–2.39 (м, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4)$), 2.55 (т, 2H, J 6.5, $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.76–2.84 (м, 4H, 2 CH_2S), 3.01–3.32 (м, 10H, 2 CH_2NCH_2 ,

NHCH_2), 3.21 (с, 2H, $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.44 (кв, J 6.2, 2H, $\text{CH}_2\text{NHCOOChol}$), 3.57 (кв, J 6.3, 2H, $\text{CH}_2\text{OCONHCH}_2$), 4.30–4.58 (м, 1H, H(3)), 5.25–5.50 (м, 1H, H(6)). Спектр ^{13}C -ЯМР: 11.93, 18.80, 19.40, 21.12, 22.63, 22.88, 23.91, 24.36, 25.98, 28.06, 28.25, 28.29, 28.52, 28.54, 28.56, 31.97, 31.98, 35.85, 36.27, 36.64, 37.08, 37.82, 37.94, 38.51, 38.64, 39.59, 39.83, 44.11, 46.73, 47.07, 50.12, 56.24, 56.78, 74.57, 79.07, 79.53, 79.64, 122.56, 139.87, 156.17, 156.18, 156.19.

1,22-Диамино- N^1 -(холест-5-ен-3 β -илоксикарбонил)-8-оксо-3,4-дитиа-7,10,14,19-тетраазадокозан (S3). К раствору соединения (X) (0.200 г, 0.146 ммоль) в 4 мл THF добавляли 4 н. HCl в диоксане (3 мл) и перемешивали 3 ч при 24°C. Растворители удаляли в вакууме, остаток промывали MeOH. Получили соединение S3 в виде белых кристаллов (0.155 г, 81%). R_f 0.35 (Г). Масс-спектр, m/z : 807.654 $[M - 4\text{HCl} + \text{H}]^+$, вычислено для $\text{C}_{44}\text{H}_{86}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2$: 807.597 $[M - 4\text{HCl} + \text{H}]^+$. Спектр ^1H -ЯМР (D_2O): 0.65 (с, 3H, $\text{C}(13)\text{Me}$), 0.84 (д, 3H, J 6.6, $\text{C}(25)\text{Me}$), 0.85 (д, 3H, J 6.6, $\text{C}(25)\text{Me}$), 0.87 (д, 3H, J 6.5, $\text{C}(20)\text{Me}$), 0.96 (с, 3H, $\text{C}(10)\text{Me}$), 0.85–1.70 (м, 38H, протоны Chol, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.70–2.07 (м, 5H, протоны Chol), 2.21–2.40 (м, 2H, $\text{H}_2\text{C}(4)$), 2.54 (т, 2H, J 6.5, $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.77–2.84 (м, 4H, 2 CH_2S), 2.94–3.25 (м, 14H, 7 CH_2N), 3.45 (кв, J 6.2, 2H, $\text{CH}_2\text{NHCOOChol}$), 3.56 (кв, J 6.3, 2H, $\text{CH}_2\text{OCONHCH}_2$), 4.31–4.59 (м, 1H, H(3)), 5.24–5.49 (м, 1H, H(6)).

Катионные липосомы. К раствору поликатионного амфифила в смеси растворителей CHCl_3 –MeOH (4 : 1 об.) добавляли раствор 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина (DOPE, Avanti Polar Lipids, США) в хлороформе в соотношении поликатионный амфирил–DOPE 1 : 1 (мольн.). Растворители удаляли в вакууме водоструйного насоса, образовавшуюся липидную пленку сушили 3 ч в вакууме масляного насоса (0.01 Торр), после чего добавляли деионизированную воду и гидратировали 4 ч при 24°C (концентрация по поликатионному амфирилу составляла 1 мМ). Образовавшуюся дисперсию обрабатывали на ультразвуковой бане (Bandelin Sonorex Digitec DT 52H, Германия) 15 мин при 60–65°C. Полученные катионные липосомы хранили при 4°C в атмосфере аргона.

Нуклеиновые кислоты. 25-Звенный олигонуклеотид с аминоксильным линкером на 5'-конце (5'-TACAGTGGGAATTGTATG-CCTATTAT-3') синтезировали фосфорамидатным методом и очищали с помощью ВЭЖХ (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск). Чи-

стоту олигонуклеотида проверяли с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ с 8 М мочевиной, она составляла 95–98%. FITC-мечение олигонуклеотида проводили, как описано ранее [25]. FITC-ODN выделяли с помощью ВЭЖХ (Alliance, США), используя колонку Waters XTerra и линейный градиент концентрации ацетонитрила (0–30%) в 50 mM NaClO₄. Чистоту FITC-ODN проверяли с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ с 8 М мочевиной, она составляла 95–98%. Концентрацию олигонуклеотида измеряли с помощью спектрофотометра BioMate 3 (Thermo Electron Corporation, США). Раствор FITC-ODN хранили при –20°C.

В экспериментах по доставке плазмидной ДНК использовали плазмиду pEGFP-C2 (Clontech, Германия), кодирующую усиленный зеленый флуоресцентный белок.

Комплексы катионных липосом с нуклеиновыми кислотами. Для проведения трансфекции эукариотических клеток комплексы получали следующим образом: растворы катионных липосом (25 мкл) и нуклеиновых кислот (25 мкл) с концентрацией, соответствующей определенному соотношению N/P, смешивали в среде Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 20 мин при 24°C.

Образование комплексов с ДНК исследовали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле в нативных условиях при напряжении электрического поля 20 В/см в течение 30–45 мин. Гель окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете (254 нм).

Клеточные культуры. Клетки почки эмбриона человека HEK293 и цервикальной аденокарциномы HeLa были получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки почки эмбриона хомячка ВНК21 были любезно предоставлены профессором В.С. Прасоловым (Институт молекулярной биологии РАН, Москва). Клеточные линии HEK293, HeLa и ВНК21 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина, в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37°C. Клетки высаживали в 96-луночные (HeLa и ВНК21 – по 3×10^3 клеток на лунку, HEK293 – по 1×10^4 клеток на лунку) или 24-луночные планшеты (HeLa и ВНК21 – по 10^5 клеток на лунку, HEK293 – по $1.2\text{--}1.7 \times 10^5$ клеток на лунку) и давали им прикрепиться в течение 24 ч.

Цитотоксичность катионных липосом (МТТ-тест). Клетки HEK293, HeLa и ВНК21 культивировали в 96-луночных планшетах, как описано выше. Через 24 ч клеточную среду заменяли рас-

творами липосом в DMEM (150 мкл) в отсутствие сыворотки и инкубировали в атмосфере 5%-ного CO₂ в течение 4 ч при 37°C, после чего в лунки добавляли по 16 мкл FBS и дополнительно инкубировали 20 ч при 37°C. По окончании инкубации к клеткам без смены среды добавляли раствор МТТ (Sigma, США) до концентрации 0.5 мг/мл. Через 4 ч культуральную среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в DMSO (100 мкл на лунку), определяли разницу между оптической плотностью при 620 и 570 нм (Multiscan RC, Labsystems, Финляндия). Поглощение в контроле (инкубация клеток в отсутствие КЛ) принимали за 100% живых клеток, количество живых клеток определяли относительно контроля. Значения IC₅₀ (концентрация липосом, при которой наблюдается гибель 50% клеток) определяли путем экстраполяции концентрационной зависимости. Результаты представлены как средние значения для трех независимых экспериментов.

Трансфекция клеток липоплексами, сформированными катионными липосомами и нуклеиновыми кислотами. Клетки высаживали в 24-луночные планшеты, как описано выше, и давали им прикрепиться в течение 24 ч. В день трансфекции культуральную среду заменяли на среду DMEM (200 мкл) с 10%-ной сывороткой крови (без антибиотиков). К клеткам добавляли комплексы пДНК (конечная концентрация 2 мкг/мл) или FITC-ODN (конечная концентрация 1 мкМ) с катионными липосомами, сформированными при различных соотношениях N/P, в 50 мкл Opti-MEM и инкубировали в атмосфере 5%-ного CO₂ в течение 4 ч при 37°C. В случае FITC-ODN клетки анализировали сразу, в случае пДНК через 4 ч среду заменяли на DMEM с 10%-ной FBS (500 мкл) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 44 ч. Доставку нуклеиновых кислот с помощью Липофектамина 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) осуществляли согласно протоколу производителя (www.thermofisher.com).

Проточная цитометрия. Эффективность трансфекции клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. После инкубации клетки промывали фосфатно-солевым буфером, обрабатывали раствором трипсина в этом же буфере (0.5 мг/мл) в течение 2 мин при 37°C для открепления с поверхности лунки и суспендировали в среде с сывороткой для ингибирования действия трипсина. Затем клетки переносили в пробирки, осаждали центрифугированием (Contron T42K, Centricon Instruments, Италия) при 1000 об/мин (200 g) в течение 10 мин, удаляли среду и дважды промывали фосфатно-солевым буфером. Затем клетки фиксировали в 600 мкл 2%-ного раствора формальдегида. Количество трансфицированных клеток и

среднее значение интенсивности флуоресценции в клеточной популяции измеряли на цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием программы CXP Analysis (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 20 тыс. клеток. Все экспериментальные точки были получены в результате трех независимых экспериментов. Стандартное отклонение не превышало 7–9%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы новые дисульфидные амфифилы на основе холестерина и спермина, отличающиеся способом присоединения спермина к гидрофобному домену (сложноэфирный или карбамоильный линкер), длиной спейсера, а также количеством катионных аммонийных групп. Катионные липосомы на основе полученных соединений оказались нетоксичными для клеток НЕК293 и HeLa и полностью связывали плазмидную ДНК в НК-липидном комплексе. Липосомы S3-DOPE, содержащие тетракаатионный дисульфидный амфифил, продемонстрировали высокую трансфицирующую активность, которая в зависимости от клеточной линии была сопоставима с эффективностью Липофектамина 2000 и липосом X2-DOPE, нечувствительных к восстановлению, или превышала таковую. Липосомы S3-DOPE могут быть использованы для трансфекции эукариотических клеток *in vitro*, а также проведения дальнейших биологических испытаний *in vivo*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования РТУ МИРЭА в рамках Соглашения № 075-15-2021-689 от 01.09.2021.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (проект № 0706-2020-0019) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-03-00995а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sung Y.K., Kim S.W.* // Biomater. Res. 2019. V. 23. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1186/S40824-019-0156-z>
2. *Ni R., Zhou J., Hossain N., Chau Y.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2016. V. 106. P. 3–26.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.07.005>
3. *Lan T., Que H., Luo M., Zhao X., Wei X.* // Mol. Cancer. 2021. V. 21. P. 71.
<https://doi.org/10.1186/s12943-022-01550-8>
4. *Beltrán-Gracia E., López-Camacho A., Higuera-Ciampara I., Velázquez-Fernández J.B., Vallejo-Cardona A.A.* // Cancer Nanotechnol. 2019. V. 10. P. 1–40.
<https://doi.org/10.1186/S12645-019-0055-Y>
5. *Patel R., Kaki M., Potluri V.S., Kahar P., Khanna D.* // Hum. Vaccin. Immunother. 2022. V. 18. P. 2002083.
<https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>
6. *Gottfried L.F., Dean D.A.* // Extracellular and Intracellular Barriers to Non-Viral Gene Transfer. In: Novel Gene Therapy Approaches / Ed. Wei M. London: Intech, 2013. P. 75–88.
7. *Puchkov P.A., Maslov M.A.* // Pharmaceutics. 2021. V. 13. P. 920.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060920>
8. *Yu C., Li L., Hu P., Yang Y., Wei W., Deng X., Wang L., Tay F.R., Ma J.* // Adv. Sci. 2021. V. 8. P. 2100540.
9. *Zhang X.X., McIntosh T.J., Grinstaff M.W.* // Biochimie. 2012. V. 94. P. 42–58.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.005>
10. *Chen X., Yang J., Liang H., Jiang Q., Ke B., Nie Y.* // J. Mater. Chem. B. 2017. V. 5. P. 1482–1497.
<https://doi.org/10.1039/C6TB02945K>
11. *Liu J., Chang J., Jiang Y., Meng X., Sun T., Mao L., Xu Q., Wang M.* // Adv. Mater. 2019. V. 31. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1002/adma.201902575>
12. *Петухов И.А., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А.* // Известия Академии наук. Серия химическая. 2010. № 1. С. 254–261.
13. *Sebyakin Y.L., Budanova U.A., Guryeva L.Y.* // Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2007. V. 1. P. 212–218.
<https://doi.org/10.1134/S1990747807030038>
14. *Goyal P., Goyal K., Kumar S.G.V., Singh A., Katore O.P., Mishra D.N.* // Acta Pharm. 2005. V. 55. P. 1–25.
15. *Masotti A., Mossa G., Cametti C., Ortaggi G., Bianco A., Grosso N.D., Malizia D., Esposito C.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2009. V. 68. P. 136–144.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2008.09.017>
16. *Byk T., Haddada H., Vainchenker W., Louache F.* // Hum. Gene Ther. 1998. V. 9. P. 2493–2502.
<https://doi.org/10.1089/hum.1998.9.17-2493>
17. *Shen G., Rajan R., Zhu J., Bell C.E., Pei D.* // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 3003–3011.
<https://doi.org/10.1021/jm060047g>
18. *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>
19. *Elsana H., Olusanya T.O.B., Carr-Wilkinson J., Darby S., Faheem A., Elkordy A.A.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51065-4>
 20. *Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A.* // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. P. 182–193.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.11.023>
 21. *Aljaberi A., Spelios M., Kearns M., Selvi B., Savva M.* // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2007. V. 57. P. 108–117.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.012>
 22. *Sebastiani F., Yanez Arteta M., Lindfors L., Cárdenas M.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2022. V. 610. P. 766–774.
<https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2021.11.117>
 23. *Ivanković M., Čukušić A., Gotić I., Škrobot N., Matijašić M., Polančec D., Rubelj I.* // *Biogerontology.* 2007. V. 8. P. 163–172.
<https://doi.org/10.1007/s10522-006-9043-9>
 24. *Tang F., Hughes J.A.* // *Bioconjug. Chem.* 1999. V. 10. P. 791–796.
<https://doi.org/10.1021/BC990016I>
 25. *Yong-Hee K., You Han Bae, Sung Wan Kim* // *J. Control. Release* 1994. V. 28. P. 143–152.
[https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90161-9](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90161-9)

Synthesis and Transfection Efficiency of Disulfide Policationic Amphiphiles

I. A. Petukhov*, P. A. Puchkov*, #, N. G. Morozova*, M. A. Zenkova**, and M. A. Maslov*, #

#Phone: +7 (499) 246-05-55 ad. 835; e-mail: puchkov_pa@mail.ru, mamaslov@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 SB RAS,
 prosp. Akad. Lavrentyeva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The synthesis of new polycationic amphiphiles containing a disulfide group in their structure has been carried out. Cationic liposomes were formed on the basis of the obtained compounds and helper lipid 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine, which demonstrated the absence of toxicity to HEK293 and HeLa cells and high delivery efficiency of fluorescently labeled oligodeoxyribonucleotide. The efficiency of plasmid DNA delivery depended on the cell line and structure of the amphiphile, with liposomes based on tetracationic amphiphiles being the most effective transfectants. These liposomes may be used for *in vitro* transfection of eukaryotic cells as well as for further *in vivo* biological tests.

Keywords: polycationic amphiphiles, cationic liposomes, transfection, disulfide bonds



ГИБРИДНЫЕ ОРГАНОМИНЕРАЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

© 2023 г. П. В. Зеленихин^{*, #}, А. Г. Галеева^{*, **}, Р. Р. Исламова^{*}, О. Н. Лопатин^{*},
Р. С. Яруллин^{***}, О. Н. Ильинская^{*}

^{*}Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, 420008 Казань, Кремлевская, 18

^{**}ФГБНУ “Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности”
 (“ФЦТРБ-ВНИВИ”), Россия, 420075 Казань, Научный городок-2

^{***}ОАО “Татнефтехиминвест-холдинг”, Россия, 420061 Казань, ул. Николая Ершова, 29А

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 27.08.2022 г.

Системы доставки лекарственных средств разрабатываются для обеспечения необходимой концентрации и пролонгированного эффекта действующего вещества в организме. Перорально применяемые белковые препараты требуют защиты от протеолиза в желудочно-кишечном тракте. Биосовместимые гидрофильные полисахариды в составе матрицы особенно перспективны, поскольку не раздражают кишечник и постепенно расщепляются специфическими гликозидазами, высвобождая терапевтический агент. Введение в состав носителя нерастворимой пористой минеральной матрицы дает возможность повысить концентрацию терапевтического средства в матрице без значительного увеличения объема таблетированной формы препарата. В данной работе создан новый оригинальный органоминеральный носитель на основе термообработанного измельченного цеолита клиноптилолита в сочетании с природными полисахаридами красных морских водорослей — агар-агара, агарозы и каррагинана. Гранулярный и мелкодисперсный клиноптилолиты в составе матрикса загружены перспективным терапевтическим агентом — рибонуклеазой *Bacillus pumilus* (биназой), проявляющей селективную цитотоксичность к опухолевым клеткам. Установлено, что как гранулярный, так и мелкодисперсный цеолиты в комплексе с полисахаридами лучше удерживают белок по сравнению с чистыми цеолитами и обеспечивают постепенный полный выход фермента за 18 ч, при этом биназа сохраняет каталитическую активность и вызывает апоптоз до 23.8% популяции клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu80. Полученные данные обосновывают перспективность конструирования лекарственных форм на основе исследованных органоминеральных носителей.

Ключевые слова: цеолит, клиноптилолит, полисахаридные гели, гибридные органоминеральные носители, биназа, загрузка и выгрузка белка, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки, апоптоз

DOI: 10.31857/S0132342323020239, **EDN:** GHXBZ1

ВВЕДЕНИЕ

В роли носителей терапевтических агентов и пробиотиков активно используются сорбенты на основе полимеров синтетического и природного происхождения, угля и минералов, после очистки и переработки которых получают так называемые медицинские глины [1]. Перспективное минеральное сырье — цеолиты, сочетающие в себе свойства адсорбента и “молекулярного сита” за счет пористой структуры. Кроме того, цеолиты выступают источником макро- и микроэлементов,

что обуславливает их использование в качестве биологически активных пищевых добавок [2].

Разрабатываются также носители терапевтических средств на основе биodeградируемых полисахаридных гидрогелей [3, 4], которые могут быть введены в организм оральным [5] и инъекционным путями [6]. Биосовместимость гидрогелей с межклеточным матриксом человека, обусловленная сходством их структуры и физико-химических свойств, определяет перспективность использования подобных агентов в медицине. Наиболее технологичные гидрогели организованы в трехмерную сеть за счет механического переплетения молекул полимера и межмолекулярных взаимодействий, включая ионные, водородные и

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (919) 644-73-87; эл. почта: pasha_mic@mail.ru).

гидрофобные связи. Создание гибридных органо-минеральных носителей особенно актуально, поскольку может значительно повысить их эффективность как безопасных сорбентов с регулируемым выходом терапевтических средств в месте доставки [7].

Известно ~80 видов цеолитов, различающихся по размеру так называемых окон (система каналов и полостей) и морфологии (фибриллярной, ламеллярной либо сферической) [8]. Некоторые цеолиты небезопасны. К таковым относятся прежде всего фибриллярные и тонкоиглольчатые: например, эрионит способен индуцировать развитие мезотелиомы легких человека [9], натролит проявляет токсичность к клеткам эукариот [10]. Клиноптилолит сферической морфологии наименее токсичен и поэтому широко используется как сорбент при очистке воды, почвы, в разнообразных процессах детоксикации. На российском рынке представлен порошковый цеолит клиноптилолит (ZeoDetox, Россия), капсулы Метабалакс® (КРАФТ, Россия), содержащие цеолит и метаболиты *Bacillus subtilis*. Все больше внимания уделяется использованию клиноптилолита в ветеринарии и медицине [11, 12]. Измельчение и термическая обработка клиноптилолита повышает его адсорбционную емкость, при этом устранение свободной и связанной воды из кристаллической решетки облегчает впоследствии активное насыщение цеолита раствором адсорбатов за счет регидратации. Ранее нами установлено, что природный клиноптилолит способен к сорбции белков с различной молекулярной массой, причем как анионных (сывороточный альбумин) [13, 14], так и катионных (бациллярная РНКазы) [10], и обеспечивает пролонгированный выход белков с целевой активностью в среду культивирования раковых клеток.

Секретируемая гуанил-предпочитающая РНКазы *Bacillus pumilus* (биназа) — одна из ряда цитотоксичных РНКаз, избирательно поражающих злокачественные клетки. В отличие от РНКаз млекопитающих, ингибируемых цитоплазматическим ингибитором в клетках эукариот, биназа нечувствительна к ингибитору, устойчива к протеолизу и способна проникать в цитоплазму и ядро опухолевых клеток, где проявляет каталитическую активность по отношению к доступным молекулам РНК, индуцируя апоптоз как *in vitro*, так и *in vivo* [15–17]. Недавно нами было установлено, что биназа, загруженная в гидрогелевые микросферы на основе альгината и желатина, укрепленные ионами кальция, постепенно выходит из них, вызывая

апоптоз клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu80 [18].

Исходя из наших предыдущих результатов, подтверждающих терапевтический потенциал биназы как альтернативного химиотерапевтического агента и ее возможности доставки на минеральных носителях [10, 19] и в составе гидрогелей [18], мы подошли к постановке задачи создания гибридных органо-минеральных носителей для этого фермента.

В связи с этим целью настоящей работы явилось получение гранулярной и мелкодисперсной фракций термически обработанного клиноптилолита, их модификация различными полисахаридными гелями и выявление адсорбционной емкости гибридных образцов в отношении терапевтического белка биназы с последующим анализом цитотоксического потенциала данного белка к опухолевым клеткам рака кишечника человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Адсорбция биназы цеолитами. Татарско-Шатрашанское месторождение в центральной европейской части России содержит миллионы тонн клиноптилолита, минерала цеолитной группы гейландита. Структура клиноптилолита представлена трехмерной отрицательно заряженной открытой каркасно-полостной решеткой, состоящей из кремнекислых тетраэдров $(\text{SiO}_4)^{4-}$, соединенных атомами кислорода, причем часть атомов кремния замещена атомами алюминия $(\text{AlO}_4)^{5-}$. Окна клиноптилолита размером 2–15 Å и общим объемом 24–32% позволяют сорбировать разнообразные вещества.

Экспериментальный гидродинамический радиус биназы, определенный нами ранее методом ЯМР, составляет 2.1 нм [20], что не позволяет белку находиться внутри этих окон, хотя биназа относится к малым глобулярным белкам: для сравнения, гидродинамический радиус геликазы человека RecQ1, имеющей молекулярную массу 158 кДа, составляет 5.4 ± 0.6 нм [21], а фибриногена с молекулярной массой 340 кДа — уже 10.95 нм [22]. Таким образом, белки не могут проникнуть внутрь цеолитов и реагируют только с внешней поверхностью кристаллов, где расположена часть активных центров, к которым ведут большие транспортные поры. Однако не только крупные органические молекулы, но и бактерии плотно сорбируются на цеолитах, что находит применение при биологической очистке сточных вод [23].

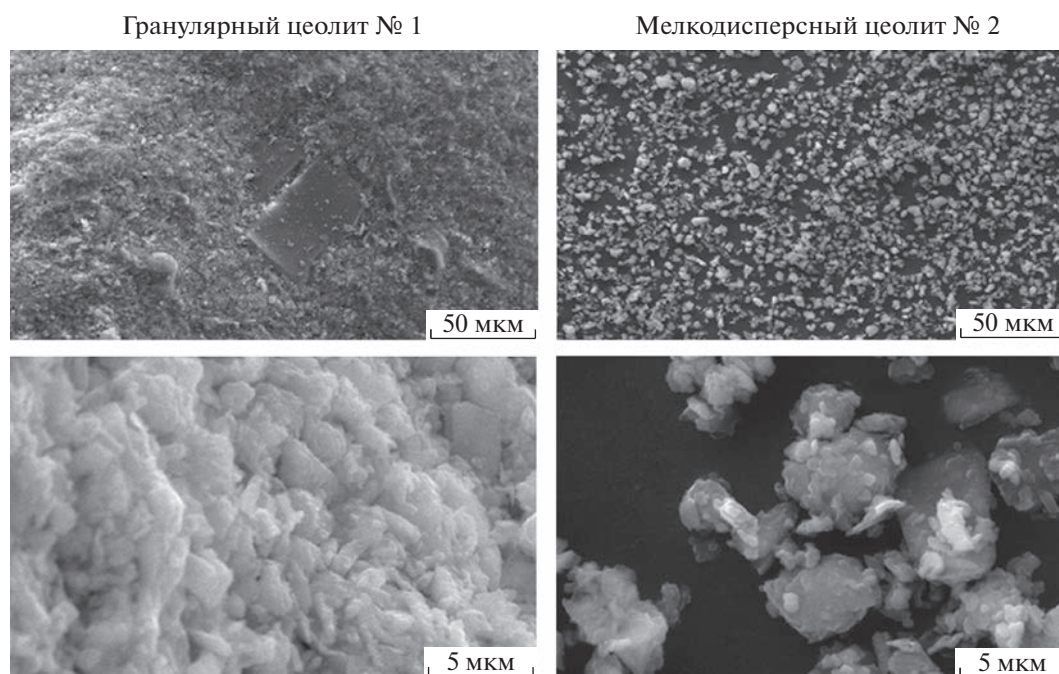


Рис. 1. Микрофотографии образцов термообработанных цеолитов различной гранулярности, использованных в работе.

Мы сравнили сорбционную способность двух образцов термообработанного измельченного цеолита, различающихся по размерам частиц: образец № 1 с частицами ~200–800 мкм (гранулярный) и образец № 2 (мелкодисперсный), в котором размер частиц был <40 мкм (рис. 1). Проведенный анализ количественных показателей загрузки биназы в цеолиты выявил, что за 2 ч биназа ими практически полностью адсорбируется, при этом мелкодисперсный образец № 2 обладал несколько меньшей сорбционной способностью (адсорбционная емкость 0.175 ± 0.001 ед.) по сравнению с гранулярным образцом № 1 (адсорбционная емкость 0.168 ± 0.001 ед.), т.е. в условиях эксперимента из 1 мг/мл раствора биназы грану-

лярный цеолит № 1 сорбировал 0.87 мг, а мелкодисперсный № 2 — 0.84 мг белка (табл. 1).

Выход биназы из мелкодисперсного образца (№ 2) за 6 ч был практически полным, гранулярный цеолит (№ 1) лучше удерживал фермент и обеспечил за это время выход лишь около половины белка (табл. 2).

Параметры входа и выхода биназы, определенные по каталитической активности, подтвердили тенденцию, зафиксированную при определении содержания белка, хотя абсолютные цифры вследствие более точного метода определения каталитической активности по сравнению с определением содержания белка были несколько выше.

Таблица 1. Количество белка и каталитическая активность биназы в спиртовом растворе до и после загрузки фермента в образцы цеолитов

Содержание белка, мг/мл (%)			РНКазная активность, ед./мл (%)		
биназа, 1 мг/мл	цеолит		биназа, 1 мг/мл	цеолит	
	№ 1	№ 2		№ 1	№ 2
1.00 ± 0.04 (100)	0.13 ± 0.02 (12.60 $\pm$ 0.15)	0.16 ± 0.01 (16.00 $\pm$ 0.14)	1102500 ± 11726 (100)	47222 ± 4055 (4.28 $\pm$ 0.36)	124222 ± 7934 (11.26 $\pm$ 0.72)
Загруженная биназа, % от содержания в исходном растворе					
	87.4 ± 1.5	84.0 ± 1.4		95.7 ± 0.4	88.7 ± 0.7

Таблица 2. Динамика выхода биназы из цеолитов после 6 ч инкубации в mQ-воде при комнатной температуре

Цеолит	Время, ч	РНКазная активность, %	Количество белка, %
№ 1	2	7.30 ± 0.09	15.00 ± 0.06
	4	18.10 ± 0.14	23.10 ± 0.02
	6	60.85 ± 0.61	52.85 ± 0.16
№ 2	2	28.72 ± 0.23	27.70 ± 0.12
	4	81.01 ± 0.22	52.40 ± 0.32
	6	98.42 ± 0.25	80.20 ± 0.28

Примечание: за 100% принято количество загруженной в цеолиты биназы, измеренное по каталитической активности и по содержанию белка.

Выход биназы из гибридного матрикса. Гибридные органоминеральные носители, кроме цеолитов включавшие агар-агар, агарозу либо каррагинан, обеспечили более медленный выход биназы по сравнению с выходом из собственно цеолитов. Так, за 6 ч из образца цеолита № 1 высвобождалось 6.7×10^5 ед. активности биназы, а из цеолита № 2 — 10.9×10^5 ед. активности, что составляет 60.85 и 98.42% от загруженного количества фермента соответственно (табл. 2). Каждый диск гибридного носителя, расположенного в лунке пластикового планшета, содержал 115 и 111 мкг биназы соответственно для образцов № 1 и 2, что

составляло $\sim 2.2 \times 10^5$ ед. активности фермента и было принято за 100%. За те же 6 ч из импрегнированных цеолитом № 1 гелей вышло $\sim 0.79 \times 10^5$ ед. активности фермента, а из импрегнированных цеолитом № 2 гелей — 0.83×10^5 ед. активности биназы, т.е. 36.01 и 37.88% от загруженной величины. Полный выход биназы был зафиксирован только спустя 18 ч (рис. 2). Достоверных различий скорости высвобождения фермента из органоминеральных носителей с разными полисахаридными матрицами не зафиксировано.

Отметим, что агар-агар, агароза и каррагинан содержат в своем составе D- и L-галактозы и 3,6-ангидрогалактозы и производятся из красных морских водорослей. В агар-агаре присутствуют еще и пентозы, D-глюкуроновая и пировиноградная кислоты, а в каррагинане — сульфатированные остатки галактоз. Однако эти различия в структуре используемых нами полисахаридов не влияли на динамические и количественные показатели выхода биназы из импрегнированных цеолитами гелей.

Полученные данные подтверждают, что как гранулярный, так и мелкодисперсный цеолиты в комплексе с полисахаридами лучше удерживают белок по сравнению с чистыми цеолитами. За 6–8 ч из сконструированных нами гибридных органоминеральных носителей высвобождается 36–38% загруженного фермента, полностью биназа выходит за 18 ч. Известно, что время транзита пищи через желудок составляет 0.5–2 ч, в тонкой кишке пища находится 1–4 ч, в толстой кишке она может оставаться более суток. Это означает, что импрегнированные цеолитами гели

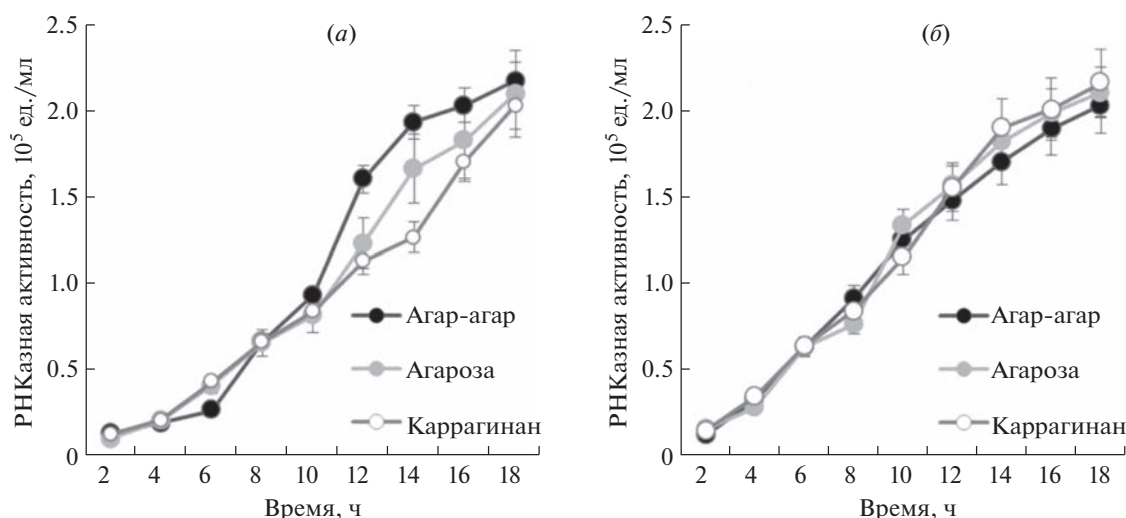


Рис. 2. Динамика выхода биназы из полисахаридных гелей, импрегнированных гранулярным цеолитом № 1 (а) и мелкодисперсным цеолитом № 2 (б).

после предполагаемого однократного перорального приема обеспечат выход биназы на протяжении всего желудочно-кишечного тракта, где в случае наличия опухолей фермент может оказывать свое терапевтическое действие.

Индукция апоптоза биназой в составе органоминеральных носителей. Прежде всего, мы проверили, насколько сам органоминеральный матрикс, не содержащий биназу, обладает цитотоксичностью. Растворимые компоненты гибридных носителей потенциально способны индуцировать апоптоз. Однако установлено, что клетки аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека NuTu80 под действием незагруженных носителей переходят в апоптоз в незначительном количестве: не более 3% за 24 ч и не более 7% за 48 ч. Эта часть клеток состоит из примерно вдвое меньшей доли раннеапоптотических клеток по сравнению с позднеапоптотическими (рис. 3).

Определение доли апоптотических клеток, индуцированных органоминеральными носителями с биназой, показало, что она возрастает максимум до 7.2% (цеолит № 2 + агароза) и 23.8% (цеолит № 1 + каррагинан) за 24 и 48 ч соответственно. При этом доля позднеапоптотических клеток в популяции при обработке не иммобилизованной на носителях биназой достигает 17.9% за 24 ч; за 48 ч этот показатель возрастает незначительно (до 21.1%) в связи с динамической фрагментацией клеток, переходящих в дебрис. Апоптоз-индуцирующее действие биназы, выходящей из носителей, проявляется более медленно, на что указывает появление в популяции прежде всего раннеапоптотических клеток. Отметим, что наиболее эффективными носителями биназы можно считать каррагинановый и агарозный гели, импрегнированные гранулярным цеолитом (цеолит № 1), выходя из которых, биназа индуцирует переход к апоптозу за 48 ч 23.8 и 21.8% клеток соответственно (рис. 4).

Таким образом, нами установлена возможность конструирования носителей белков с потенциальной терапевтической активностью на основе комплексов цеолита клиноптилолита и природных полисахаридов. Полученные системы пролонгировали высвобождение и биологическую активность модельного терапевтического агента — бациллярной рибонуклеазы с противоопухолевой активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Белок биназа. В работе использовали гуанил-специфичную РНКазу биназу (ЕС 3.1.27.3; молекулярная масса 12.2 кДа, 109 а.о., pI 9.5), выделен-

ную как гомогенный белок из культуральной жидкости штамма *Bacillus pumilus* 7Р дикого типа (ВКПМ В-3073) по методу, описанному ранее [24]. Каталитическую активность биназы в отношении субстрата — дрожжевой РНК — определяли модифицированным методом Анфинсена [25].

Клиноптилолит. Использовали цеолит с первой пачки Татарско-Шатрашанского месторождения (глубина 7–25 м). Цеолит подвергали высокотемпературной обработке в течение 6 мин при 1250°C (муфельная печь ЭКПС 50 модель 5007, Россия). Образцы раздробленного до гранул и мелкодисперсного порошка цеолита промывали 96%-ным этанолом, затем обрабатывали ультразвуком для дезинтеграции агрегатов (10 мин, 35 кГц, 130 В; Sapphire, Россия) и высушивали при комнатной температуре. Каплю разбавленных образцов цеолита помещали на решетку с углеродным покрытием и оставляли испаряться. Образцы анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа HT7700 Exalens (Hitachi High-Tech Science Corporation, Япония) при разрешении 1.4 Å. Светлопольные изображения получали при ускоряющем напряжении 100 кВ с помощью камеры АМТ XR-81.

Загрузка/выгрузка белка из цеолита. Навески цеолитов (по 5 мг) предварительно отмывали трижды mQ-водой и высушивали при 160°C в течение 30 мин. Для загрузки каждую навеску цеолитов ресуспендировали в 1 мл спиртового (96%) раствора биназы (концентрация — 1 мг/мл, исходная РНКазная активность — $1.102 \pm 0.010 \times 10^6$ ед./мг), гомогенизировали на вортексе и подвергали ультразвуковой обработке на льду (5 мин, 35 кГц, 120 В), после чего перемешивали на шейкере в течение 2 ч и осаждали при 4300 g в течение 5 мин. Для определения загрузочной способности цеолитов в полученных супернатантах измеряли остаточное количество белка по поглощению при 280 нм и РНКазную активность. За 100% принимали значения данных показателей для исходного спиртового раствора биназы.

Осадки после отделения первичных супернатантов высушивали при 50°C в течение 30–40 мин, после чего ресуспендировали в 1 мл mQ-воды и инкубировали при комнатной температуре в течение 6 ч, отбирая по 25 мкл супернатанта каждые 2 ч для определения количества выгружаемого белка и РНКазной активности.

Адсорбционную емкость цеолитов в условных единицах рассчитывали по формуле [26]:

$$A = [(C_n - C_k)/m]V,$$

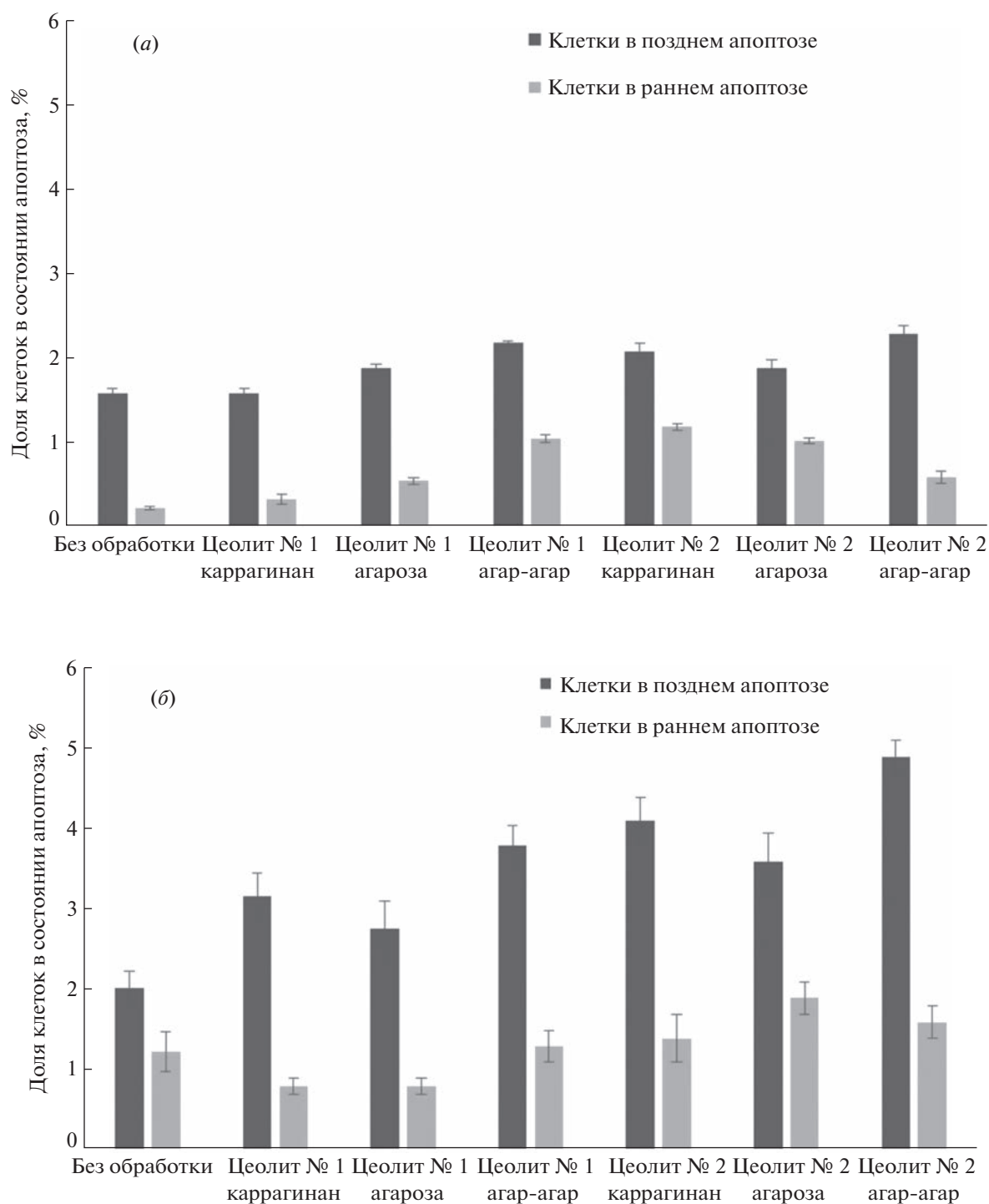


Рис. 3. Индукция апоптоза клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека NuTu80 контрольными полисахаридными гелями, импрегнированными цеолитами без биназы: (а) — через 24 ч, (б) — через 48 ч инкубации. В качестве положительного контроля индукции апоптоза использовали неиммобилизованную биназу. За 100% принято общее число клеток в популяции.

где C_n — начальное содержание белка в растворе, мкг/мл; C_k — конечное содержание белка в растворе, мкг/мл; m — навеска сорбента, мкг; V — объем раствора белка, мл.

Гибридные гели. Навески агар-агара (Merck, США), агарозы (AppliChem, Германия) и каррагинана (Sigma-Aldrich, США) по 45 мг суспендировали в 1455 мкл дистиллированной воды (для

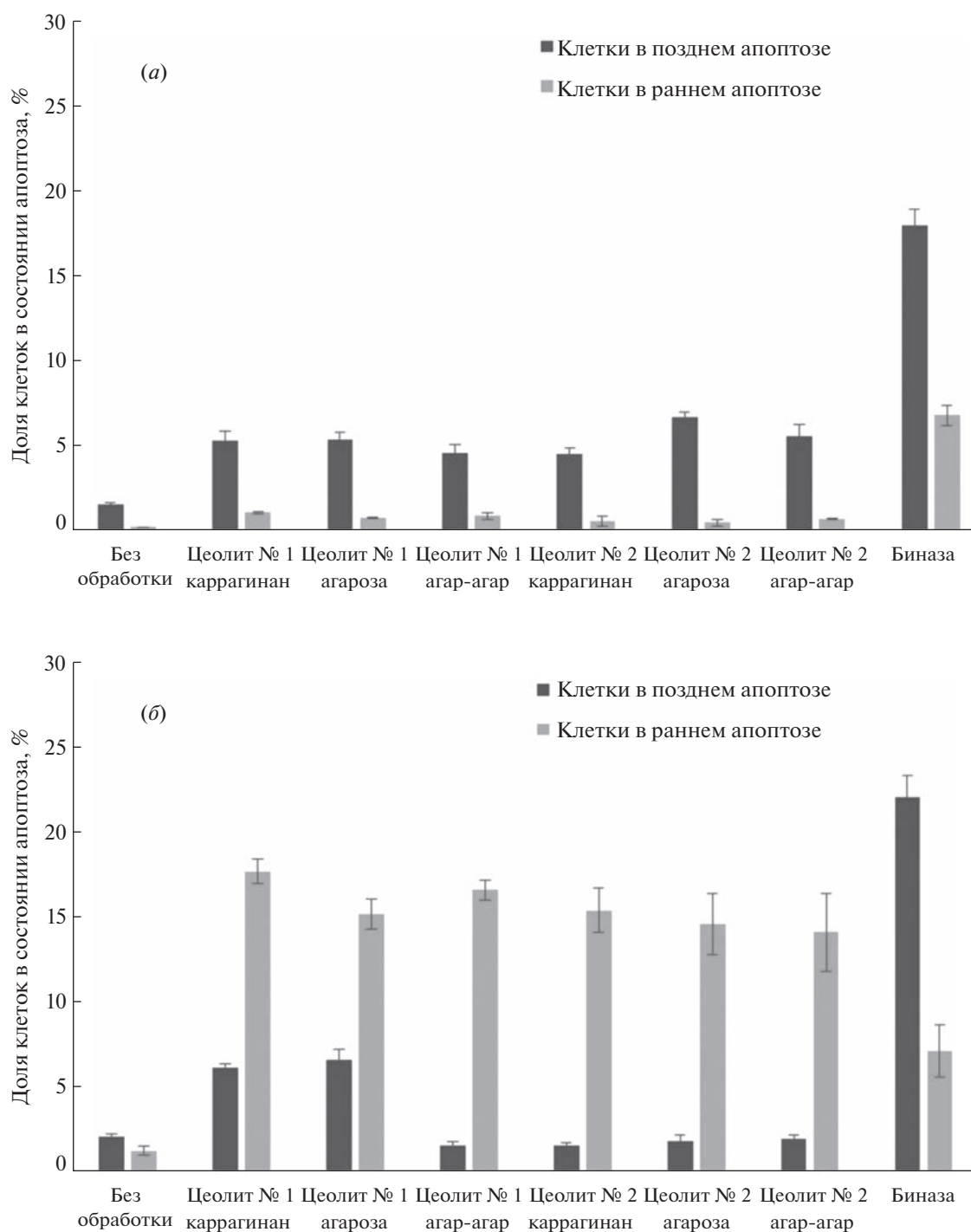


Рис. 4. Индукция апоптоза клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека NuTu80 гибридными органо-минеральными носителями, загруженными биназой: (а) — через 24 ч, (б) — через 48 ч инкубации. В качестве положительного контроля индукции апоптоза использовали неиммобилизованную биназу. За 100% принято общее число клеток в популяции.

формирования 3%-ных гелей), гомогенизировали на вортексе, подогревали на водяной бане до расплавления — до 60°C (каррагинан и агарозу) и до 100°C (агар-агар), дожидались частичного остывания в течение 5–7 с и вносили в гелевые

стоки гомогенизированные навески загруженных биназой цеолитов. Для определения динамики выхода биназы пластины гибридных гелей (высота 3 мм, объем 263 мкл) помещали в лунки 48-луночного планшета до окончательного застыва-

ния, сверху вносили по 1 мл дистиллированной воды и инкубировали при комнатной температуре в течение 14 ч, отбирая по 25 мкл супернатанта каждые 2 ч для измерения содержания белка и РНКазной активности.

Для определения выхода биназы в среду культивирования клеток гомогенизированные гибридные гели стерильно заливали во вставки, размещенные в пустом планшете-держателе. После застывания гелей вставки при помощи пинцета вносили в лунки с клетками, куда предварительно было внесено по 0.7 мл свежей среды, и наносили сверху на пластины по 0.2 мл среды. Планшеты инкубировали в течение 24 и 48 ч; в эти временные точки проводили цитометрический анализ.

Клетки. Линию клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu80 (ATCC, США) культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM с добавлением пенициллина/стрептомицина (по 100 ед./мл) и 10% FBS до состояния монослоя, после чего клетки трипсинизировали и высевали в 24-луночные планшеты из расчета не менее 2×10^5 клеток на лунку. Непосредственно в планшете клетки выращивали до 80%-ной конфлюэнтности монослоя, после чего вводили в лунки матрицы-вставки для мультилуночных планшетов с диаметром пор 0.4 мкм (Thermo Scientific, США), содержащие исследуемые носители, загруженные и не загруженные биназой. Количество РНКазы на лунку в составе органоминеральной матрицы или в растворенном виде составляло 100 мкг, объем среды в каждой лунке — 1 мл. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 48 ч.

Цитометрия. Для цитофлуориметрической детекции параметров апоптоза использовали двойное окрашивание иодидом пропидия (PI) (Sigma, США) и потенциал-зависимым красителем иодидом 3,3'-дигексилосакарбоцианин (DiOC₆) (Molecular Probes, США) на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). По окончании срока инкубации клеток среду культивирования отбирали и вносили в центрифужные пробирки для предотвращения потерь клеток, сохранивших целостность, но уже потерявших способность к адгезии. Снятие клеток с культуральных планшетов осуществляли трипсинизацией (0.25%-ный трипсин-ЭДТА; ПанЭко, Россия). Объединенные образцы центрифугировали 5 мин (300 g при комнатной температуре), осадок ресуспендировали в 1 мл 0.01 М фосфатно-солевого буфера (pH 7.2). Затем вносили в суспензию клеток DiOC₆ в конечной концен-

трации 50 нМ и выдерживали 20 мин в темноте при 37°C. За 2 мин до начала измерений добавляли PI до конечной концентрации 5 мкг/мл. При анализе цитометрических данных обсчитывали характеристики флуоресцентного сигнала не менее чем для 2×10^4 клеток для каждого образца в пяти повторях в каждом из трех независимых экспериментов.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных осуществляли в программном пакете Statistica 7.0 (StatSoft, США). Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторях. В качестве критерия достоверности различий использовали критерий Манна–Уитни ($p \leq 0.05$). При визуализации полученных результатов данные представляли в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе термообработанного измельченного цеолита клиноптилолита в сочетании с природными полисахаридами красных морских водорослей — агар-агара, агарозы и каррагинана — создан новый оригинальный органоминеральный носитель для доставки перспективного терапевтического агента — рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы) — к опухолям, локализованным в желудочно-кишечном тракте. Матрикс носителя состоял из гранулярного либо мелкодисперсного клиноптилолита, укрепленного биосовместимыми полисахаридами. Гранулярный и мелкодисперсный клиноптилолиты обладали сходной сорбционной емкостью, обеспечивая загрузку более 80% биназы за 2 ч. Выход биназы из мелкодисперсного образца за 6 ч был практически полным; гранулярный цеолит лучше удерживал фермент, высвобождая за это время выход лишь около половины белка; в то же время выход фермента из комплексного органоминерального носителя составил, соответственно, 36 и 38% от загруженного. Полный постепенный выход целевого белка из органоминерального матрикса пролонгирован до 18 ч, при этом фермент сохранял каталитическую активность и вызывал апоптоз до 23.8% популяции клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu80. Различия в структуре используемых полисахаридов не оказывали значительного влияния на динамические и количественные показатели выхода биназы из импрегнированных цеолитами гелей.

Полученные результаты обосновывают возможность создания потенциальных лекарственных форм на основе подобных систем, где тера-

пептически активный белок будет удерживаться и стабилизироваться в структуре гибридной органино-минеральной матрицы и пролонгированно высвобождаться из нее.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания выполненных кем-либо из авторов исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондарев А.В., Жиякова Е.Т. // Фармация и фармакология. 2019. Т. 7. С. 4–12.
<https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-1-4-12>
2. Бондарев А.В., Жиякова Е.Т., Демина Н.Б., Размахнин К.К. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021. Т. 10. С. 65–71.
<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-65-71>
3. Chirani N., Yahia L'H., Gritsch L., Motta F.L., Chirani S., Fare S. // J. Biomed. Sci. 2015. V. 4. P. 1–23.
<https://doi.org/10.4172/2254-609X.100013>
4. Kouser R., Vashist A., Zafaryab M., Rizvi M.A., Ahmad S. // ACS Appl. Bio Mater. 2018. V. 1. P. 1810–1822.
<https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00260>
5. Liu X., Steiger C., Lin S., Parada G.A., Liu J., Chan H.F., Yuk H., Phan N.V., Collins J., Tamang S., Traverso G., Zhao X. // Nat. Commun. 2019. V. 1. P. 493.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08355-2>
6. Norouzi M., Nazari B., Miller D.W. // Drug Discov. Today. 2016. V. 21. P. 1835–1849.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.07.006>
7. Gao W., Zhang Y., Zhang Q., Zhang L. // Ann. Biomed. Eng. 2016. V. 44. P. 2049–2061.
<https://doi.org/10.1007/s10439-016-1583-9>
8. Ivanova I.I., Knyazeva E.E. // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42. P. 3671–3688.
<https://doi.org/10.1039/c2cs35341e>
9. Attanoos R.L., Churg A., Galateau-Salle F., Gibbs A.R., Roggli V.L. // Arch. Path. Lab. 2018. V. 142. P. 753–760.
<https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0365-RA>
10. Khojaewa V., Lopatin O., Zelenikhin P., Ilinskaya O. // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 442.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00442>
11. Mastinu A., Kumar A., Maccarinelli G., Bonini S.A., Premoli M., Aria F., Gianoncelli A., Memo M. // Molecules. 2019. V. 24. P. 1517.
<https://doi.org/10.3390/molecules24081517>
12. Kraljević Pavelić S., Simović Medica J., Gumbarević D., Filošević A., Pržulj N., Pavelić K. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1350.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01350>
13. Исламова Р.Р., Яковлева Г.Ю., Ильинская О.Н., Лопатин О.Н. // Матер. междунаро. науч. конфер. “Проблемы геологии и расширение минерально-сырьевой базы стран Евразии”, Алматы. 2019. С. 317–322. ISBN 978-601-332-416-6.
14. Исламова Р.Р., Яковлева Г.И., Тюрин А.Н., Ильинская О.Н., Лопатин О.Н. // Записки российского минералогического общества. 2022. Т. 151. С. 105–113.
15. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // BioEssays. 2008. V. 30. P. 781–790.
<https://doi.org/10.1002/bies.20789>
16. Garipov A.R., Nesmelov A.A., Cabrera-Fuentes H.A., Ilinskaya O.N. // Toxicol. 2014. V. 92. P. 54–59.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2014.09.014>
17. Mohamed I.S.E., Sen'kova A.V., Nadyrova A.I., Savin I.A., Markov A.V., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Ilinskaya O.N., Mironova N.L., Zenkova M.A. // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 1509.
<https://doi.org/10.3390/biom10111>
18. Bogdanova L.R., Zelenikhin P.V., Makarova A.O., Zueva O.S., Salnikov V.V., Zuev Y.F., Ilinskaya O.N. // Polymers (Basel). 2022. V. 14. P. 2461.
<https://doi.org/10.3390/polym14122461>
19. Khodzhaeva V., Makeeva A., Ulyanova V., Zelenikhin P., Evtugyn V., Hardt M., Rozhina E., Lvov Y., Fakhrullin R., Ilinskaya O. // Front. Pharmacol. 2017. V. 8. P. 631.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00631>
20. Ilinskaya O., Ulyanova V., Lisevich I., Dudkina E., Zakharchenko N., Kusova A., Faizullin D., Zuev Y. // Biomed. Res. Int. 2018. P. 4837623.
<https://doi.org/10.1155/2018/4837623>
21. Cui S., Arosio D., Doherty K.M., Brosh R.M., Jr., Falaschi A., Vindigni A. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. 2158–2170.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh540>
22. Wasilewska M., Adamczyk Z., Jachimska B. // Langmuir. 2009. V. 25. P. 3698–3704.
<https://doi.org/10.1021/la803662a>
23. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. // FEBS Open Biol. 2016. V. 6. P. 24–32.
<https://doi.org/10.1002/feb4.12023>
24. Foglar L., Sipos L., Bolf N. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 1595–1603.
<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9405-8>
25. Колпаков А.И., Ильинская О.Н. // Клиническая и лабораторная диагностика. 1999. № 5. С. 14–16.
26. Пирузян А.В., Боковикова Т.Н., Найденов Ю.В. // Электронный научно-технический журнал “Физико-химический анализ свойств многокомпонентных систем”. 2008. № 6.
<https://fh.kubstu.ru/fams/issues/issue06/st0630.pdf>

Hybrid Organomineral Carriers for Therapeutic Proteins

P. V. Zelenikhin^{*, #}, A. G. Galeeva^{*, **}, R. R. Islamova^{*}, O. N. Lopatin^{*},
R. S. Yarullin^{***}, and O. N. Ilinskaya^{*}

[#]Phone +7 (919) 644-73-87; e-mail: pasha_mic@mail.ru

^{*}Kazan (Volga Region) Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia

^{**}Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchny gorodok-2, Kazan, 420075 Russia

^{***}JSC "Tatneftekhiminvest-Holding", ul. Nikolay Ershov 29A, Kazan, 420061 Russia

Drug delivery systems are designed to provide the necessary concentration and prolonged effect of the active substance in the body. Orally administered protein preparations require protection from proteolysis in the gastrointestinal tract. Biocompatible hydrophilic polysaccharides in the matrix are especially promising, since they do not irritate the intestines and are gradually cleaved by specific glycosidases, releasing the therapeutic agent. The introduction of an insoluble porous mineral matrix into composition of carrier makes it possible to increase the concentration of therapeutic in matrix without a significant increase in the volume of drug tablet form. In this work, a new original organic mineral carrier based on heat-treated crushed clinoptilolite zeolite in combination with natural polysaccharides from red seaweeds – agar-agar, agarose, and carrageenan was created. Granular and finely dispersed clinoptilolites in the matrix are loaded with a promising therapeutic agent, *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase), which exhibits selective cytotoxicity to tumor cells. It has been established that both granular and finely dispersed zeolites in combination with polysaccharides retain protein better than pure zeolites and provide a gradual complete release of enzyme in 18 hours. At the same time, the enzyme retains its catalytic activity and induces apoptosis up to 23.8% cells of the human duodenal adenocarcinoma HuTu80. The data obtained substantiate the prospects of dosage forms based on the used organomineral carriers designing.

Keywords: zeolite, clinoptilolite, polysaccharide gels, hybrid organomineral carriers, binase, protein loading and release, duodenal adenocarcinoma, apoptosis



ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПИРРОЛО[1,2-*a*]ПИРАЗИН-СОДЕРЖАЩИХ ЛИГАНДОВ TSPO

© 2023 г. Г. В. Мокров*,[#], А. С. Пантеев*, М. А. Яркова*, И. В. Рыбина*, Т. А. Гудашева*, Ю. В. Вахитова*, С. Б. Середенин*

*ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”, Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Получена новая группа 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидов, в которых заместителями при амидном атоме азота выступают алкильные, бензильные или алкоксифенилалкильные группы, остатки аминокислот или их производные. Синтезированные соединения имеют высокие теоретические значения аффинности по отношению к транслокаторному белку 18 кДа (TSPO) и благоприятный профиль ADMET-характеристик, что обуславливает их перспективность для разработки в качестве лекарственных средств. У восьми соединений в дозах 0.1–5.0 мг/кг при внутривенном введении в условиях эмоционально-стрессового воздействия в тесте “открытое поле” у мышей линии Balb/c и в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” у мышей ICR выявлена анксиолитическая активность. Для дальнейшей разработки в качестве потенциального анксиолитического средства было отобрано соединение-лидер *N*-бензгидрил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамид, показавший наличие противотревожной активности в широком интервале доз в обоих используемых тестах.

Ключевые слова: лиганды TSPO, пирроло[1,2-*a*]пиразины, молекулярное моделирование, анксиолитическая активность, животные модели

DOI: 10.31857/S0132342323020173, **EDN:** PGKDNM

ВВЕДЕНИЕ

Современная стратегия фармакологической регуляции транслокаторного белка 18 кДа (TSPO) рассматривается как научная основа для создания анксиолитиков, обладающих существенным превосходством над бензодиазепинами, действие которых сопровождается седативным влиянием, миорелаксацией и побочными эффектами в виде атаксии, нарушений памяти, синдрома отмены и зависимости [1, 2].

TSPO – белок-переносчик массой 18 кДа с пятью трансмембранными доменами, локализованный на внешней митохондриальной мембране

стероид-продуцирующих клеток нервной системы. Основная функция TSPO – транспорт холестерина на внутреннюю мембрану митохондрий, что обеспечивает биосинтез нейростероидов [3]. Известно, что нейростероиды имеют специфический сайт связывания на ГАМК_A-рецепторе [4], взаимодействие с которым увеличивает частоту открытия хлорного канала, что усиливает торможение передачи нервного возбуждения [5]. Установлено, что анксиолитический эффект нейростероидов свободен от нежелательных эффектов бензодиазепинов [6]. Механизм фармакологической регуляции TSPO включает аллостерическую модуляцию белка, приводящую к активации переноса холестерина и усилению биосинтеза нейростероидов [7]. Следовательно, лигандная активация TSPO включает эндогенные физиологические механизмы контроля ангиогенеза.

Недавние обзоры демонстрируют неослабевающий интерес к поиску новых лигандов TSPO в качестве потенциальных нейропсихотропных агентов [1, 8]. В ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” с 2014 г. проводился синтез новых лигандов TSPO с целью создания препаратов

Сокращения: ADMET – расчетные характеристики всасывания, распределения, метаболизма, выведения и токсичности соединений; DS – Docking score (скоринг-функция); hERG-канал – калиевый канал, кодируемый геном human Ether-a-go-go Related Gene; LogBB – уровень проникновения веществ через гематоэнцефалический барьер; LogP – показатель липофильности на разделе фаз октанол/вода; TSPO – транслокаторный белок 18 кДа; ГАМК_A-рецептор – рецептор гамма-аминомасляной кислоты подтипа A; ОП – тест “открытое поле”; ПКЛ – тест “приподнятый крестообразный лабиринт”.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (926) 185-68-46; эл. почта: g.mokrov@gmail.com).

с нейропсихотропной активностью в группах гетероциклических [9, 10] и пептидных соединений [11, 12]. На основе ядра пирроло[1,2-*a*]пиазина сконструирована группа новых гетероциклических TSPO-лигандов, среди которых получены высокоаффинные и TSPO-селективные соединения. В патенте RU 2572076 C2 описан класс лигандов TSPO, который относится к группе 1-арилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамидов [13]. Соединения ГМЛ-1 (*N*-бензил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид) и ГМЛ-3 (*N*-бутил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид) из этой группы проявили выраженную анксиолитическую активность в стандартных тестах, при этом было доказано, что их эффекты обусловлены взаимодействием с сайтом связывания белка TSPO. Методом радиолигандных исследований установлено, что ГМЛ-1 и ГМЛ-3 обладают высоким сродством к TSPO ($K_i = 52$ и 530 нМ соответственно) [9]. В продолжении фармакологических исследований выявлено, что соединения ГМЛ-1 и ГМЛ-3 обладают антидепрессивной и ноотропной активностью [14], что позволяет рассматривать их как новую группу веществ с оригинальным фармакологическим спектром.

В патенте RU 2734240 C2 представлена группа *N*,1-дифенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамидов, в которой также были выявлены соединения, обладающие анксиолитическими свойствами [15]. Наиболее активные соединения ГМЛ-11 (*N*-бензил-*N*,1-дифенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид) и ГМЛ-21 (*N*-метил-*N*,1-дифенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид) обладали анксиолитическим действием в очень низких дозах (0.001 – 0.1 и 0.05 – 1.0 мг/кг соответственно).

Цель настоящего исследования – дальнейший поиск соединений с анксиолитической активностью в ряду новых лигандов TSPO с пирроло[1,2-*a*]пиазиновым ядром, обладающих высоким теоретическим сродством к белку TSPO, высокой эффективностью и безопасностью и имеющих благоприятный профиль расчетных ADMET-параметров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн новых лигандов TSPO с пирроло[1,2-*a*]пиазиновым ядром. Для дизайна новых потенциальных лигандов TSPO было осуществлено несколько этапов молекулярного моделирования. На первом этапе была собрана библиотека наиболее перспективных известных лигандов TSPO, обладающих как наилучшими характеристиками связывания с рецептором, так и наиболее привле-

кательным спектром биологической активности (рис. 1). Среди них производные имидазопиридина YL-IPA08 и CB-34, бензоксазин Этифоксин, пиридоиндол ONO-2952, производное индола FGIN-1-27, арилоксианилид DAA-1106, производные пирролопиазина GML-1 и GML-3, бензодиазепин Ro5-4864, изохинолин PK-11195 и производные пурина XBD-173 и ZBD-2.

С использованием библиотеки и программного обеспечения Phase (Schrödinger) была сгенерирована уточненная фармакофорная модель лигандов TSPO (рис. 2). Алгоритм программы создает суперпозицию набора пространственных и электронных признаков молекул, включая гидрофобные области и ароматические ядра, доноры и акцепторы водородной связи, анионные и катионные центры и их векторное расположение. Согласно визуализации расчетов, полученная модель имеет следующие компоненты: 1) две ароматические группы, одна из которых, как правило, гетероциклическая (R7 и R8); 2) алифатическую или ароматическую гидрофобную группу (H5); 3) группу акцептора электронов (A1), в большинстве молекул находится между группами H5 и R7/R8.

Для скрининга *in silico* использовали различные производные 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамидов, содержащие при амидном атоме азота линейные и циклические алкильные, арильные, гетарильные, бензильные или арилалкильные группы с различными заместителями в ароматических кольцах, остатки аминокислот или их производные по карбоксильной группе.

Молекулярный докинг проводили с использованием структуры TSPO мыши в комплексе с селективным лигандом PK-11195 (PDB ID: 2MGY) в программе Glide v8.1 [16]. Параметры ADMET рассчитывали в программе QikProp v6.8 (Schrödinger) [17]. Среди ключевых оценивали следующие характеристики: молекулярный вес, дипольный момент, молекулярный объем, количество доноров и акцепторов водородных связей, ионизационный потенциал, параметры липофильности в различных системах, степень связываемости с белками плазмы крови, параметр проникновения через гематоэнцефалический барьер, аффинность к hERG-инному каналу, уровень проникновения через мембраны, соответствие “правилу 5” Липинского и “правилу 3” Йоргенсена, оральную биодоступность и ряд других. Токсикологические параметры оценивали с использованием программы ADMETlab 2.0 [18]. Рассчитывали токсикологический риск соединений в тесте Эймса, острую токсичность у крыс, канцерогенный потенциал,

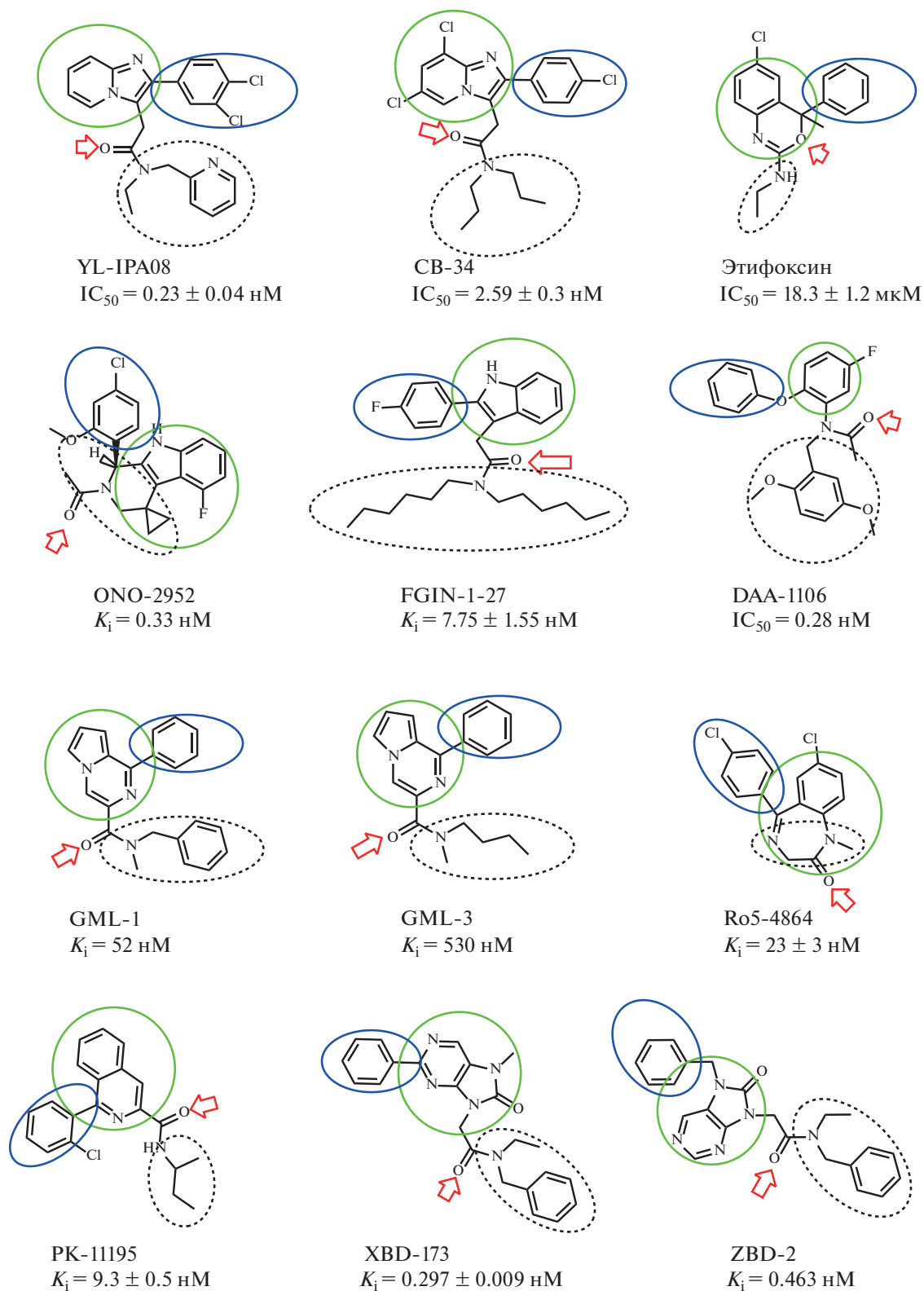


Рис. 1. Классические синтетические лиганды TSPO с экспериментальными константами ингибирования. Ароматические ядра обведены зелеными окружностями, арильные заместители — синими окружностями, гидрофобные группы — черными пунктирными окружностями, электроноакцепторные группы показаны красными стрелками.

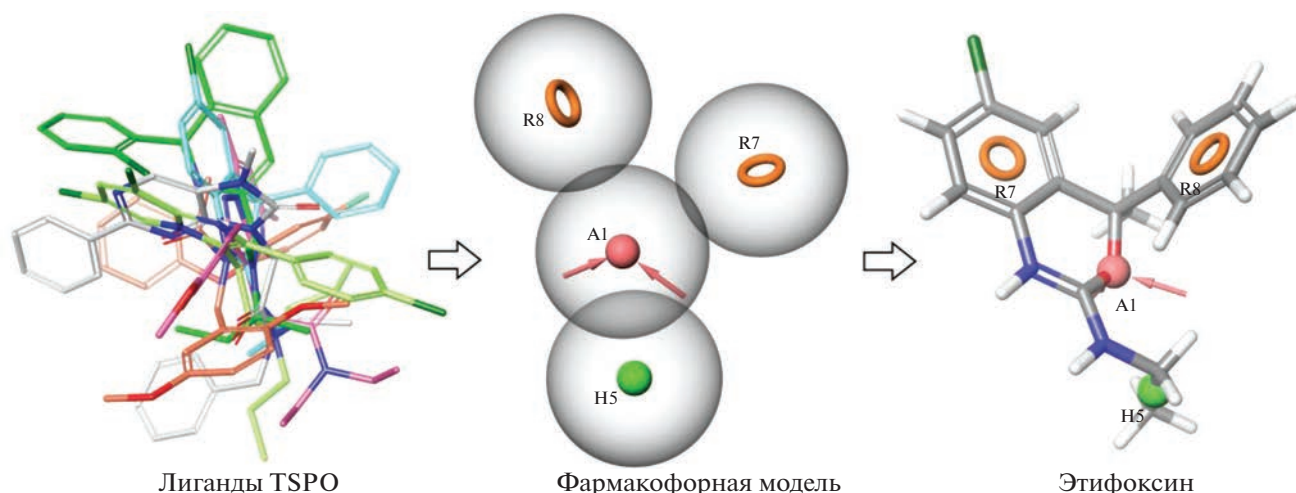


Рис. 2. Фармакофорная модель лигандов TSPO, сгенерированная с использованием программы Phase (<https://www.schrodinger.com/products/phase>). Оранжевые кольца R7 и R8 соответствуют ароматическим/гетероароматическим группам, розовая сфера A1 представляет электроноакцепторную группу, зеленая сфера H5 — алифатическую или ароматическую гидрофобную группу. В качестве примера представлено соответствие фармакофорной модели молекулы этифоксина.

воспалительные свойства по отношению к различным тканям и ряд других параметров.

Отобранные по результатам молекулярного моделирования и результатам оценки расчетных параметров наиболее перспективные соединения представлены в табл. 1 и 2. Все эти молекулы продемонстрировали высокую теоретическую аффинность по отношению к активному центру TSPO. Скоринг-функция DS (Docking score), определяющая энергию взаимодействия “лиганд–рецептор”, для всех веществ была ниже значения -8 (табл. 1). Среди ключевых наблюдали следующие взаимодействия “лиганд–рецептор” (табл. 1, рис. 3 и 4): подавляющее большинство соединений имели π – π -стэкинговое взаимодействие пиррольного или фенильного кольца с Trp143 (исключение — ГМЛ-101) и гидрофобное взаимодействие с последовательностью Leu49–Trp53 (исключение — ГМЛ-12). Около половины отобранных соединений имели гидрофобные взаимодействия с последовательностями Trp107–Leu114 и Ser41–Arg46. У ГМЛ-12 и ГМЛ-110 наблюдали π – π -стэкинговое взаимодействие с Trp107. У ГМЛ-101 фиксировали π -катионное взаимодействие фенильной группы с His43, а у ГМЛ-103 — дополнительное π – π -стэкинговое взаимодействие с Phe146. У диметоксипроизводного ГМЛ-104 наблюдалось π -катионное взаимодействие арильного цикла с His43, π – π -стэкинг фенильной группы с Trp95 и водородная связь атома кислорода метоксигруппы с Lys39. Среди дополнительных взаимодействий соединений

ГМЛ-106 и ГМЛ-110 фиксировалось полярное взаимодействие с последовательностью Lys39–Arg46. Наконец, у тирозин-содержащего соединения ГМЛ-112 была выявлена водородная связь гидроксигруппы с Ser41.

Результаты оценки основных ADMET-параметров отобранных соединений представлены в табл. 2. Значения молекулярного веса находились для всех соединений в пределах 319–452 г/моль, что попадает в интервал 130–725 г/моль, соответствующий 95% известных лекарственных препаратов. Дипольные моменты соединений составляли 4.1–8.4, что вписывается в рекомендуемые параметры для потенциальных лекарственных средств (1.0–12.5). Липофильность соединений оценивали путем расчета прежде всего параметра Log P (липофильность на разделе фаз октанол/вода). Известно, что лиганды TSPO, как правило, обладают достаточно высокими значениями липофильности (Log P не менее 3.5). Расчетные значения гидрофобности (Log P) новых соединений находились в диапазоне 3.7–6.5. Следует отметить, что высокий коэффициент липофильности необходим для образования устойчивой π – π -связи с остатками триптофана белка. Уровень проникновения соединений через гематоэнцефалический барьер (Log BB) также находился в рекомендуемых пределах от -3.0 до -1.2 . Все новые соединения соответствовали правилам Липинского и Йоргенсена, определяющим необходимые требования к строению перорально активных лекарственных средств (расчетные значения

Таблица 1. Результаты расчетов теоретических значений аффинности новых потенциальных лигандов TSPO ряда пирроло[1,2-*a*]пиазинов

Соединение	Амидный заместитель	Эфир	Docking score	π - π -стэкинг с Trp107	π - π -стэкинг с Trp143	Гидрофобные взаимодействия			Дополнительные взаимодействия
						Leu49–Trp53	Trp107–Leu114	Ser41–Arg46	
ГМЛ-12	Pr, Pr	–	–8.999	+	+	–	+	+	
ГМЛ-101	Et, Bz	–	–10.144	–	–	+	+	+	“ π -катион” с His43
ГМЛ-102	CHPh ₂	–	–9.551	–	+	+	+	+	
ГМЛ-103	Bz, Bz	–	–9.278	–	+	+	+	–	“ π - π ” с Phe146
ГМЛ-104	(CH ₂) ₂ Ph(OMe) ₂ -3,4	–	–9.404	–	+	+	–	+	“ π -катион” с His43; “ π - π ” с Trp95; Н-связь с Lys39
ГМЛ-105	CH ₂ Ph(OMe) ₃ -3,4,5	–	–9.391	–	+	+	–	+	
ГМЛ-106	L-Phe	Me	–10.208	–	+	+	–	–	Полярное взаимодействие с Lys39–Arg46
ГМЛ-107	–(CH ₂) ₇ –	–	–9.193	–	+	+	–	–	
ГМЛ-108	L-Glu	Et	–9.125	–	+	+	–	–	
ГМЛ-109	L-Asp	Et	–9.603	–	+	+	–	–	
ГМЛ-110	L-Ala	Me	–8.726	+	+	+	–	–	Полярное взаимодействие с Lys39–Arg46
ГМЛ-111	L-Trp	Et	–8.083	–	+	+	+	–	
ГМЛ-112	D-Tyr	Et	–10.119	–	+	+	–	–	Н-связь с Ser41
ГМЛ-113	L-Phe	–	–10.095	–	+	+	+	–	

Таблица 2. Результаты расчетов параметров ADMET новых потенциальных лигандов TSPO ряда пирроло[1,2-*a*]пиразинов

Соединение	Амидный заместитель	Эфир	Молекулярный вес	Дипольный момент	LogP	LogBB	“Правило 5” Липинского	“Правило 3” Йоргенсена	Оральная доступность, %	Тест Эймса	Острая токсичность у крыс
ГМЛ-12	Pr, Pr	—	321.421	5.218	4.826	−0.223	0	0	100	—	—
ГМЛ-101	Et, Bz	—	355.438	4.266	5.433	−0.045	1	1	100	—	—
ГМЛ-102	CHPh ₂	—	403.482	5.183	6.506	−0.209	1	1	100	—	—
ГМЛ-103	Bz, Bz	—	417.509	4.066	5.993	−0.112	1	0	100	—	—
ГМЛ-104	(CH ₂) ₂ Ph(OMe) ₂ -3,4	—	401.464	6.692	5.032	−0.222	1	0	100	+	—
ГМЛ-105	CH ₂ Ph(OMe) ₃ -3,4,5	—	417.463	6.112	4.786	−0.335	0	0	100	—	—
ГМЛ-106	L-Phe	Me	399.448	6.215	5.163	−0.676	1	1	100	—	—
ГМЛ-107	−(CH ₂) ₇ −	—	319.405	4.690	4.398	0.096	0	0	100	—	—
ГМЛ-108	L-Glu	Et	423.468	5.230	4.310	−1.027	0	0	100	—	—
ГМЛ-109	L-Asp	Et	409.441	7.367	4.001	−1.325	0	0	100	—	—
ГМЛ-110	L-Ala	Me	323.351	4.478	3.689	−0.751	0	0	100	—	—
ГМЛ-111	L-Trp	Et	452.512	8.433	5.743	−0.954	1	1	100	—	—
ГМЛ-112	D-Tyr	Et	429.474	4.216	4.874	−1.240	0	1	100	—	—
ГМЛ-113	L-Phe	—	385.421	6.838	5.126	−1.043	1	1	84	—	—

Примечание: LogP — показатель липофильности на разделе фаз октанол/вода; LogBB — уровень проникновения веществ через гематоэнцефалический барьер. По данным теста Эймса и острой токсичности у крыс указан эффект исследуемых соединений: наличие эффекта (+), отсутствие эффекта (—), однозначное отсутствие эффекта (— — —).

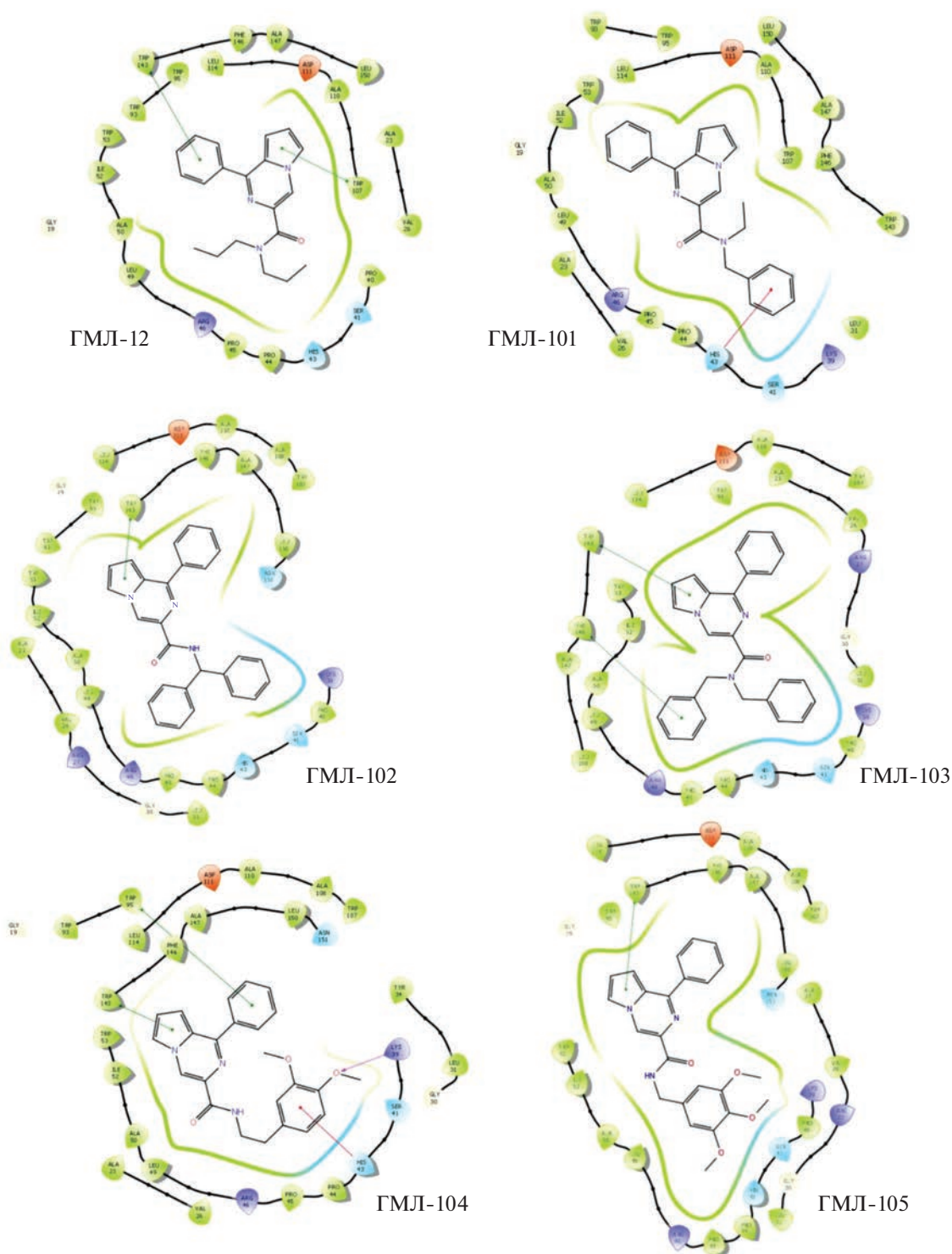


Рис. 3. Результаты молекулярного докинга новых производных 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамидов (ГМЛ-12, ГМЛ-101–ГМЛ-105) в активный сайт рецептора TSPO (PDB ID: 2MGY) в 2D-проекции.

для соединений не должны превышать 4 и 3 баллов соответственно). Оральная биодоступность новых соединений была максимально

высокой (100% для всех соединений), за исключением соединения ГМЛ-113 (84%). Расчетные параметры токсичности отобранных молекул

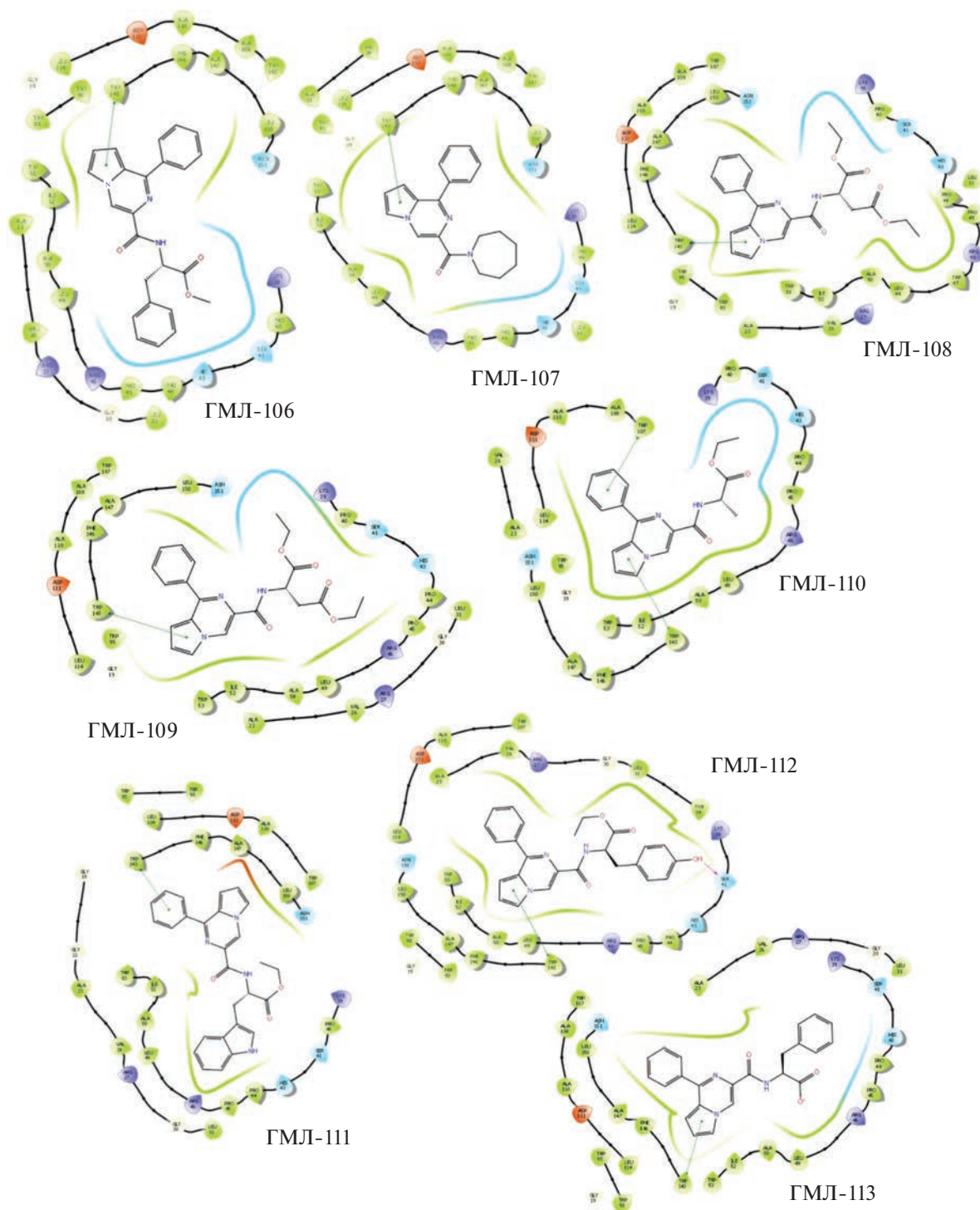


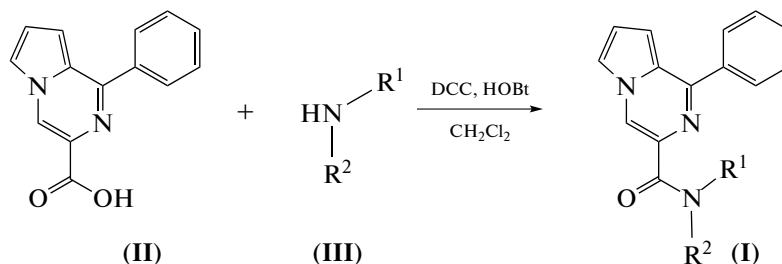
Рис. 4. Результаты молекулярного докинга новых производных 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидов (ГМЛ-106–ГМЛ-112) в активный сайт рецептора TSPO (PDB ID: 2MGY) в 2D-проекции.

свидетельствуют об их перспективности для разработки в качестве потенциальных лекарственных соединений. Все они по данным теста Эймса (за исключением соединения ГМЛ-104)

и по расчетам острой токсичности у крыс при пероральном введении показали полное отсутствие этих видов токсичности (значения “— — —” и “— —”).

Синтез 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидов. Сконструированные соединения общей

формулы (I) были получены в соответствии со схемой 1.



ГМЛ-12: $R^1 = R^2 = (CH_2)_2CH_3$

ГМЛ-101: $R^1 = C_2H_5$; $R^2 = CH_2Ph$

ГМЛ-102: $R^1 = H$; $R^2 = CHPh_2$

ГМЛ-103: $R^1 = R^2 = CH_2Ph$

ГМЛ-104: $R^1 = H$; $R^2 = (CH_2)_2Ph(OCH_3)_{2-3,4}$

ГМЛ-105: $R^1 = H$; $R^2 = CH_2Ph(OCH_3)_{3-3,4,5}$

ГМЛ-106: $R^1 = H$; $R^2 = L-Phe-OCH_3$

ГМЛ-107: $R^1 = R^2 = (CH_2)_7$

ГМЛ-108: $R^1 = H$; $R^2 = L-Glu-OC_2H_5$

ГМЛ-109: $R^1 = H$; $R^2 = L-Asp-OC_2H_5$

ГМЛ-110: $R^1 = H$; $R^2 = L-Ala-OCH_3$

ГМЛ-111: $R^1 = H$; $R^2 = L-Trp-OC_2H_5$

ГМЛ-112: $R^1 = H$; $R^2 = D-Tyr-OC_2H_5$

ГМЛ-113: $R^1 = H$; $R^2 = L-Phe-OH$

Схема 1. Синтез 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидов.

Исходную 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновую кислоту (II) получали в соответствии со схемой, представленной в патенте RU 2572076 С2 [13]. Эту кислоту (II) вводили во взаимодействие с аминами (III) в хлористом метиле в присутствии конденсирующих агентов — 1-гидроксibenзотриазола и 1,3-дихлоргексилкарбодиимида, в результате чего были получены целевые 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамиды (I). Структуры синтезированных соединений общей формулы (I) представлены на рис. 3 и 4, а заместители при амидной группе указаны в табл. 1 и 2.

Строение соединений общей формулы (I) подтверждено данными спектров 1H -ЯМР, а их чистота — данными элементного анализа.

Влияние новых соединений на поведение мышей линии Balb/c в условиях эмоционально-стрессового воздействия в тесте “открытое поле”. В работе применена методика освещенного “открытого поля” (ОП), при котором перенос животного из темноты на ярко подсвеченную арену, помимо реакции на новую обстановку, включает дополнительный стрессорный фактор, основанный на естественном стремлении грызунов избегать ярко освещенных мест [19]. В качестве тест-системы были использованы мыши инбредной линии Balb/c, характеризующейся реакцией замиранья в тесте ОП использованной модификации [20]. О наличии анксиолитического действия судили по выявлению активирующего влияния на двигательную активность у животных с реакцией замиранья.

В тесте ОП анализировали активность следующих соединений: ГМЛ-12, ГМЛ-101–ГМЛ-106 (табл. 3).

В условиях эмоционально-стрессового воздействия в тесте ОП при внутрибрюшинном введении соединений ГМЛ-12 (0.1, 0.5 и 1.0 мг/кг), ГМЛ-101 (1.0 мг/кг), ГМЛ-102 (0.1, 0.5 и 1.0 мг/кг) и ГМЛ-106 (1.0 и 5.0 мг/кг) обнаружено статистически значимое повышение общей двигательной активности мышей линии Balb/c по сравнению с контролем, обусловленное, прежде всего, повышением периферической активности и, в некоторых случаях, центральной активности. У соединения ГМЛ-103 в дозах 0.1–5.0 мг/кг статистически значимых изменений двигательной активности не выявлено. В то же время у соединений ГМЛ-101 в дозах 0.1–0.5 и 5.0 мг/кг, ГМЛ-102 в дозе 5.0 мг/кг, ГМЛ-104 (0.1–5.0 мг/кг) и ГМЛ-105 (0.1–1.0 мг/кг) наблюдалась тенденция к увеличению активности.

Таким образом, в ряду изученных потенциальных TSPO-лигандов соединения ГМЛ-12 и ГМЛ-102 в широком диапазоне доз (0.1–1.0 мг/кг) при внутрибрюшинном введении обладают выраженным активирующим действием у мышей Balb/c за счет увеличения периферической и центральной двигательной активности, что характерно для соединений, обладающих анксиолитическим действием. Соединение ГМЛ-101 также проявляло значимую активность в дозе 1.0 мг/кг, а соединение ГМЛ-106 — в дозах 1.0–5.0 мг/кг.

На основании полученных данных в качестве соединения-лидера было отобрано соединение ГМЛ-102, которое дополнительно было исследо-

Таблица 3. Влияние соединений ГМЛ-12 и ГМЛ-101–ГМЛ-106 на поведение мышей линии Balb/c в тесте “открытое поле”

Соединение	Доза, мг/кг	ПА	ЦА	Ц	ВА	ОДА	Д
Контроль для ГМЛ-12	–	11.27 (6.86)	2.00 (2.65)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	13.27 (9.16)	1.64 (1.50)
ГМЛ-12	0.1	22.88 (14.78)*	2.25 (1.58)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	25.13 (13.76)*	2.00 (0.76)
	0.5	20.38 (5.55)*	2.00 (1.69)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	22.38 (6.19)*	2.38 (2.67)
	1.0	34.38 (12.09)*	10.38 (7.48)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	44.75 (15.82)*	1.63 (1.51)
	5.0	20.00 (10.85)	1.88 (2.42)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	21.88 (10.16)	1.75 (1.39)
	<i>p</i> (ANOVA)	0.029	0.021	1	1	0.002	0.854
Контроль для ГМЛ-101–ГМЛ-106	–	22.00 (9.40)	2.13 (2.36)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	24.13 (10.97)	0.63 (0.74)
ГМЛ-101	0.1	34.38 (19.99)	3.88 (2.42)	0.00 (0.00)	0.88 (1.36)	39.13 (21.05)	1.00 (1.31)
	0.5	31.88 (20.79)	3.25 (4.59)	0.13 (0.35)	0.13 (0.35)	35.38 (21.86)	0.50 (0.76)
	1.0	58.88 (14.63)*	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	59.00 (14.62)*	0.63 (0.74)
	5.0	34.75 (27.76)	3.25 (9.19)	0.50 (1.41)	0.00 (0.00)	38.50 (25.07)	0.25 (0.46)
	<i>p</i> (ANOVA)	0.0212	0.0123	0.5445	0.0091	0.0232	0.7131
ГМЛ-102	0.1	41.63 (10.34)*	4.38 (3.66)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	46.00 (13.69)*	1.25 (1.04)
	0.5	48.88 (10.83)*	10.25 (10.53)*	1.00 (2.07)	0.38 (0.52)	60.50 (15.01)*	1.00 (1.07)
	1.0	49.00 (12.33)*	7.38 (6.72)	0.13 (0.35)	1.25 (2.38)	57.75 (16.27)*	1.00 (1.07)
	5.0	27.00 (9.02)	1.13 (2.10)	0.00 (0.00)	0.13 (0.35)	28.25 (9.92)	1.25 (1.04)
	<i>p</i> (ANOVA)	0.0001	0.0062	0.0535	0.0366	0	0.6953
ГМЛ-103	0.1	21.25 (12.52)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	21.38 (12.77)	0.88 (1.13)
	0.5	21.00 (8.64)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	21.13 (8.68)	0.50 (0.76)
	1.0	20.63 (7.95)	0.13 (0.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	20.75 (7.92)	0.88 (0.99)
	5.0	19.50 (7.58)	0.25 (0.46)	0.25 (0.46)	0.00 (0.00)	20.00 (8.04)	0.50 (0.76)
	<i>p</i> (ANOVA)	0.9945	0.0383	0.0842	1	0.9658	0.8721
ГМЛ-104	0.1	27.13 (9.51)	4.75 (3.15)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	31.88 (8.17)	1.50 (1.07)
	0.5	29.75 (11.89)	3.13 (4.19)	0.38 (1.06)	0.50 (1.07)	33.75 (16.39)	1.13 (1.13)
	1.0	25.25 (10.02)	6.25 (9.32)	0.63 (1.19)	0.00 (0.00)	32.13 (18.51)	0.75 (0.89)
	5.0	29.88 (21.80)	3.63 (8.67)	0.00 (0.00)	1.13 (3.18)	34.63 (33.36)	1.00 (1.20)
	<i>p</i> (ANOVA)	0.7003	0.3697	0.2372	0.2446	0.5328	0.502
ГМЛ-105	0.1	32.88 (13.28)	3.13 (3.87)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	36.00 (15.24)	1.38 (1.41)
	0.5	38.88 (21.92)	0.38 (0.74)	0.00 (0.00)	0.25 (0.46)	39.50 (22.54)	2.50 (1.20)*
	1.0	32.63 (14.93)	2.25 (3.81)	0.25 (0.71)	0.00 (0.00)	35.13 (13.05)	1.88 (1.96)
	5.0	23.25 (7.63)	0.50 (0.53)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	23.75 (7.54)	1.88 (1.96)
	<i>p</i> (ANOVA)	0.1779	0.1343	0.406	0.0842	0.1608	0.082
ГМЛ-106	0.1	21.13 (11.01)	0.25 (0.46)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	21.38 (10.76)	1.00 (1.07)
	0.5	27.50 (7.63)	7.63 (9.46)	0.63 (1.06)	0.00 (0.00)	35.75 (14.75)	0.88 (0.83)
	1.0	36.00 (10.61)*	4.13 (3.44)	0.25 (0.46)	0.00 (0.71)	40.63 (13.76)*	2.13 (1.81)
	5.0	39.00 (6.91)*	9.13 (11.80)	0.75 (1.49)	0.00 (0.00)	48.88 (13.21)*	1.63 (1.41)
	<i>p</i> (ANOVA)	0.0041	0.0472	0.2	0.406	0.0024	0.2645

Примечание: данные представлены в виде *M* (SD), где *M* – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, *p* (ANOVA) – *p*-значение по результатам теста Краскела–Уоллеса. Сокращения: ПА – число пересеченных квадратов на периферии, ЦА – число пересеченных квадратов в центральных областях, Ц – число заходов в центр, ВА – число вертикальных стоек, ОДА – общая двигательная активность, Д – количество дефекаций.

* Статистически значимые различия (*p* < 0.05) по сравнению с контрольной группой согласно критерию Манна–Уитни.

вано в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ).

Влияние новых соединений на поведение мышей ICR в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”. В тесте ПКЛ были исследованы следующие соединения: ГМЛ-107–ГМЛ-113 и ГМЛ-102 (табл. 4). Оценку поведения мышей в тесте ПКЛ проводили согласно методике Pellow et al. [21]. Установлено, что в тесте ПКЛ соединение ГМЛ-107 в дозе 0.1 мг/кг при внутрибрюшинном введении статистически значимо увеличивала время пребывания мышей ICR в открытых рукавах лабиринта, время (%) пребывания в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах ($T_{\text{откр}}/T_{\text{общ}}$) и число (%) заходов в открытые рукава по отношению к суммарному числу заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта ($N_{\text{откр}}/N_{\text{общ}}$) по сравнению с контрольной группой, что рассматривается как основной критерий анксиолитической активности. Тенденция к увеличению параметров $T_{\text{откр}}/T_{\text{общ}}$ и $N_{\text{откр}}/N_{\text{общ}}$ наблюдалась для соединения ГМЛ-107 в дозах 0.5–5.0 мг/кг. Соединение ГМЛ-113 также обладало эффектом в дозах 0.5–5.0 мг/кг, достоверно увеличивая значения обоих параметров $T_{\text{откр}}/T_{\text{общ}}$ и $N_{\text{откр}}/N_{\text{общ}}$. Бензгидрильное производное ГМЛ-102, наиболее активное в тесте ОП, было эффективным и в тесте ПКЛ по параметрам $T_{\text{откр}}/T_{\text{общ}}$ и $N_{\text{откр}}/N_{\text{общ}}$ во всех исследуемых дозах (0.1–5.0 мг/кг).

Соединения ГМЛ-108 и ГМЛ-110 ни в одной из изученных доз не влияли на поведение аутбредных мышей ICR в тесте ПКЛ, за исключением того, что в дозе 5.0 мг/кг ГМЛ-108 увеличивало время пребывания мышей в закрытых рукавах лабиринта.

Соединения ГМЛ-109 и ГМЛ-112 в дозе 1.0 мг/кг и соединение ГМЛ-111 в дозе 0.5 мг/кг статистически значимо по сравнению с контрольной группой уменьшали время пребывания мышей ICR в открытых рукавах лабиринта, число заходов в открытые рукава, время (%) пребывания в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах ($T_{\text{откр}}/T_{\text{общ}}$) и число (%) заходов в открытые рукава по отношению к суммарному числу заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта ($N_{\text{откр}}/N_{\text{общ}}$). Снижение двигательной и исследовательской активности мышей в тесте ПКЛ на фоне применения указанных соединений может свидетельствовать о наличии в спектре их фармакологической активности седативного или анксиогенного компонента, что необходимо исследовать с использованием соответствующих методов анализа поведения. Результаты настоящей работы определяют перспективу дальнейшего развернутого фармакологического изучения полученных новых оригинальных соединений.

Анализ связи “структура–активность”. В табл. 5 приведено соотнесение результатов оценки анксиолитической активности новых соединений *in vivo* с основными расчетными параметрами: Docking score (характеристика энергии связывания “лиганд–рецептор” в молекулярном докинге), липофильностью (LogP), общей оценкой ADMET-профиля и показателем проникновения через гематоэнцефалический барьер (LogBB).

Хотя полной корреляции между перечисленными параметрами по результатам исследования не наблюдалось, отмечаются определенные закономерности по взаимосвязи биологической активности *in vivo* с расчетными показателями. Так, в частности, соединения, показавшие наличие анксиолитической активности, обладали в целом более высокими значениями Docking score (DS). Среднее значение DS составляет –9.62 для активных соединений (ГМЛ-12, ГМЛ-101, ГМЛ-102, ГМЛ-104–ГМЛ-107, ГМЛ-113) и –9.15 для неактивных соединений (ГМЛ-103 и ГМЛ-108–ГМЛ-112). Сходная зависимость наблюдается для показателя липофильности (LogP). Среднее значение LogP в ряду активных соединений составляло 5.16, в то время как для соединений, не показавших положительного эффекта, LogP составляло 4.77. Среди ADMET-показателей особую значимость в отношении наличия положительного эффекта *in vivo* показал параметр LogBB, характеризующий способность соединения проникать через гематоэнцефалический барьер. Установлено, что у соединений, проявивших анксиолитическое действие, среднее значение LogBB составило –0.33. У неактивных молекул среднее LogBB составляет –0.90, т.е. их способность проникать через гематоэнцефалический барьер существенно ниже. При исключении из расчетов соединений ГМЛ-103 и ГМЛ-113, выбывающих из общей закономерности, различие в средних значениях LogBB для активных и неактивных соединений еще более выражено (–0.23 против –1.06). Эти результаты хорошо согласуются с тем фактом, что для достижения положительного анксиолитического действия соединение должно иметь способность в достаточной степени проникать через гематоэнцефалический барьер.

Лучшие результаты по биологической активности продемонстрировало бензгидрильное производное ГМЛ-102, показавшее наличие анксиолитического действия в широком интервале доз в обоих используемых тестах (ОП и ПКЛ). Это соединение имеет одни из лучших расчетных параметров: значение $DS = -9.551$; высокую липофильность ($\text{LogP} = 6.506$); подходящее значение $\text{LogBB} = -0.209$. Активным также были диалкильное и циклоалкильное производные ГМЛ-12 и ГМЛ-107 с высокими значениями LogBB (–0.223 и 0.096 соответственно). Для алкоксиарилалкильных соединений ГМЛ-104 и ГМЛ-105 отмечается

Таблица 4. Влияние соединений ГМЛ-102 и ГМЛ-107–ГМЛ-113 на поведение аутистических мышей ICR в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”

Соединение	Доза, мг/кг	Время в открытых лаважах, с	Время в закрытых лаважах, с	Число заходов в открытые лаваги	Число заходов в закрытые лаваги	$T_{откр}/(T_{откр} + T_{закр})$, %	$N_{откр}/(N_{откр} + N_{закр})$, %
Контроль для ГМЛ-107–ГМЛ-112	–	23 (4; 33)	72 (68; 83)	4 (1; 5)	10 (8; 12)	22 (4; 33)	28 (5; 35)
	0.1	46 (29; 55)*	81 (58; 86)	4 (3; 8)	7 (7; 10)	37 (28; 44)*	36 (32; 43)*
	0.5	19 (0; 31)	48 (19; 85)	4 (0; 7)	7 (4; 10)*	17 (2; 38)	33 (6; 41)
	1.0	46 (2; 53)	47 (33; 90)	7 (0; 11)	9 (8; 10)	41 (8; 51)	42 (10; 57)
	5.0	13 (7; 21)	60 (25; 66)*	3 (2; 5)	9 (4; 11)	23 (11; 41)	34 (16; 42)
ГМЛ-108	<i>p</i> (ANOVA)	0.0482	0.1797	0.5636	0.2152	0.1019	0.1974
	0.1	4 (0; 9)	99 (52; 135)	1 (0; 2)	12 (8; 14)	4 (0; 14)	10 (0; 14)
	0.5	10 (1; 28)	86 (72; 111)	2 (0; 5)	12 (8; 14)	10 (1; 24)	22 (3; 29)
	1.0	10 (1; 29)	84 (62; 108)	2 (0; 5)	10 (8; 11)	10 (1; 23)	18 (2; 34)
	5.0	17 (4; 31)	98 (82; 137)*	2 (0; 4)	10 (8; 12)	19 (3; 24)	18 (2; 27)
ГМЛ-109	<i>p</i> (ANOVA)	0.6052	0.3363	0.7266	0.779	0.4242	0.3671
	0.1	6 (1; 31)	56 (45; 68)*	2 (0; 4)	8 (6; 10)	10 (2; 22)	19 (3; 37)
	0.5	0 (0; 9)	73 (32; 105)	0 (0; 3)	11 (6; 14)	0 (0; 18)	0 (0; 27)
	1.0	0 (0; 5)*	97 (71; 125)	0 (0; 1)*	11 (8; 13)	0 (0; 5)*	0 (0; 13)*
	5.0	39 (2; 75)	70 (47; 91)	4 (1; 9)	9 (5; 11)	35 (2; 44)	33 (4; 52)
ГМЛ-110	<i>p</i> (ANOVA)	0.0363	0.0896	0.0646	0.3588	0.0341	0.0648
	0.1	6 (0; 31)	74 (46; 111)	2 (0; 5)	9 (6; 10)	8 (0; 21)	15 (0; 35)
	0.5	5 (0; 35)	95 (44; 109)	1 (0; 5)	13 (3; 15)	11 (0; 33)	14 (0; 33)
	1.0	3 (0; 11)	47 (2; 91)	1 (0; 3)	5 (1; 11)	4 (0; 24)	9 (0; 39)
	5.0	5 (0; 27)	90 (78; 100)	2 (0; 3)	9 (8; 12)	6 (0; 23)	12 (3; 30)
ГМЛ-113	<i>p</i> (ANOVA)	0.7439	0.2865	0.8068	0.236	0.7638	0.8965

Таблица 4. Окончание

Соединение	Доза, мг/кг	Время в открытых рукавах, с	Время в закрытых рукавах, с	Число заходов в открытые рукава	Число заходов в закрытые рукава	$T_{откр}/$ $(T_{откр} + T_{закр})$, %	$N_{откр}/$ $(N_{откр} + N_{закр})$, %
ГМЛ-111	0.1	0 (0; 3)	45 (25; 61)**	0 (0; 1)*	6 (4; 8)**	0 (0; 5)	0 (0; 11)
	0.5	0 (0; 8)*	85 (50; 98)	0 (0; 1)*	10 (6; 11)	0 (0; 7)*	0 (0; 10)*
	1.0	9 (0; 44)	85 (67; 98)	3 (0; 6)	12 (8; 15)	10 (0; 32)	24 (0; 29)
	5.0	10 (0; 50)	86 (59; 113)	2 (0; 7)	11 (7; 14)	8 (0; 44)	14 (2; 44)
	p (ANOVA)	0.0969	0.0291	0.0803	0.0241	0.1029	0.0864
ГМЛ-112	0.1	3 (0; 13)	71 (39; 101)	1 (0; 2)	8 (7; 9)	2 (0; 14)	5 (0; 17)
	0.5	13 (7; 37)	80 (63; 91)	3 (1; 6)	10 (8; 12)	16 (8; 31)	19 (6; 37)
	1.0	0 (0; 2)*	53 (33; 80)	0 (0; 1)*	7 (3; 8)**	0 (0; 3)*	0 (0; 13)*
	5.0	0 (0; 5)	55 (25; 98)	0 (0; 2)	6 (3; 13)	0 (0; 7)	0 (0; 15)
	p (ANOVA)	0.0225	0.3859	0.0582	0.0126	0.0261	0.0961
Контроль для ГМЛ-102 и ГМЛ-113	—	1 (0; 6)	166 (145; 172)	0.5 (0; 1)	11 (9.5; 15)	0.7 (0; 3.7)	4.6 (0; 10)
ГМЛ-102	0.1	48 (31; 57)*	164 (159; 176)	4 (2; 6)*	10 (8; 12)	22 (16; 26)*	23 (18; 42)*
	0.5	21 (18; 34)*	163 (155; 173)	3 (2; 4)*	10 (9; 11)	11 (10; 17)*	21 (16; 28)*
	1.0	50 (37; 60)*	165 (156; 171)	4 (3; 6)*	10 (9; 11)	24 (18; 26)*	30 (20; 35)*
	5.0	18 (14; 30)*	166 (152; 173)	3 (2; 4)*	9 (8; 11)*	10 (8; 15)*	23 (19; 32)*
	p (ANOVA)	0	0.9561	0.0009	0.3831	0.0001	0.002
ГМЛ-113	0.1	0 (0; 2)	186 (171; 197)*	0 (0; 0.5)	12 (11; 14)	0 (0; 0.8)	0 (0; 4)
	0.5	10 (5; 20)*	162 (138; 183)	2 (1; 4)*	12 (10; 12)	5 (3; 10)*	15 (9; 24)*
	1.0	43 (27; 89)*	134 (108; 141)*	4 (3; 5)*	12 (10; 13)	24 (15; 48)*	24 (18; 36)*
	5.0	49 (33; 63)*	146 (123; 163)	4 (3; 6)*	12 (9; 14)	24 (17; 32)*	28 (15; 37)*
	p (ANOVA)	0	0.0021	0.0001	0.8405	0	0.0002

Примечания: данные представлены в виде Me (q_{25} ; q_{75}), где Me — медиана, q_{25} — нижний квартиль, q_{75} — верхний квартиль, p (ANOVA) — p -значение согласно критерию Краскела–Уоллиса; $T_{откр}$ и $T_{закр}$ — время пребывания в открытых и закрытых рукавах; $N_{откр}$ и $N_{закр}$ — число заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта. * $p < 0.05$ (достоверные различия с контролем согласно критерию Манна–Уитни). ** $p < 0.01$ (достоверные различия с контролем согласно критерию Манна–Уитни).

Таблица 5. Соотнесение расчетных характеристик с результатами оценки анксиолитической активности исследованных соединений *in vivo*

Соединение	Амидный заместитель	Эфир	Docking score	LogP	Профиль ADMET	LogBB	Активные дозы в тестах ОП и ПКЛ, мг/кг	Выраженность эффекта
ГМЛ-12	Pr, Pr	–	–8.999	4.826	+	–0.223	0.1–1.0 (ОП)	++
ГМЛ-101	Et, Bz	–	–10.144	5.433	+	–0.045	1.0 (ОП); т.: 0.1–0.5 и 5.0 (ОП)	+
ГМЛ-102	CHPh ₂	–	–9.551	6.506	+	–0.209	0.1–1.0 (ОП); 0.1–5.0 (ПКЛ)	++++
ГМЛ-103	Bz, Bz	–	–9.278	5.993	+	–0.112	– (ОП)	0
ГМЛ-104	(CH ₂) ₂ Ph(OMe) ₂ -3,4	–	–9.404	5.032	+	–0.222	т.: 0.1–5.0 (ОП)	т.+
ГМЛ-105	CH ₂ Ph(OMe) ₃ -3,4,5	–	–9.391	4.786	+	–0.335	т.: 0.1–1.0 (ОП)	т.+
ГМЛ-106	L-Phe	Me	–10.208	5.163	+	–0.676	1.0–5.0 (ОП)	++
ГМЛ-107	–(CH ₂) ₇ –	–	–9.193	4.398	+	0.096	0.1 (ПКЛ); т.: 0.5–5.0 (ПКЛ)	+
ГМЛ-108	L-Glu	Et	–9.125	4.310	+	–1.027	– (ПКЛ)	0
ГМЛ-109	L-Asp	Et	–9.603	4.001	+	–1.325	[1.0] (ПКЛ)	–
ГМЛ-110	L-Ala	Me	–8.726	3.689	+	–0.751	– (ПКЛ)	0
ГМЛ-111	L-Trp	Et	–8.083	5.743	+	–0.954	[0.5] (ПКЛ)	–
ГМЛ-112	D-Tyr	Et	–10.119	4.874	+	–1.240	[1.0] (ПКЛ)	–
ГМЛ-113	L-Phe	–	–10.095	5.126	+	–1.043	0.5–5.0 (ПКЛ)	++

Примечания: Docking score – характеристика энергии связывания “лиганд–рецептор” в молекулярном докинге; LogP – показатель липофильности на разделе фаз октанол/вода; LogBB – величина, характеризующая способность вещества проникать через ГЭБ; ОП – тест “открытое поле”; ПКЛ – тест “приподнятый крестообразный лабиринт”. В квадратных скобках приведена доза, проявляющая обратную активность. Указана выраженность эффекта соединений: тенденции (т.), активность в одной дозе (+), активность в нескольких дозах (++) , активность в нескольких дозах в двух тестах (++++), обратная активность (–), отсутствие эффекта (0).

лишь тенденция к наличию активности. Большинство аминокислотных производных показали отсутствие активности или даже анксиогенное действие. В ряду этих соединений были наименьшие значения LogBB (от -1.325 до -0.676). Исключением стали производные фенилаланина ГМЛ-106 и ГМЛ-113. Оба этих соединения обладали анксиолитическим эффектом в нескольких дозах. Возможно, это обусловлено включением какой-либо дополнительной биологической мишени в механизм их действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Для определения физико-химических характеристик полученных соединений использовали следующее оборудование: температуру плавления определяли на приборе Optimelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) в открытых капиллярах без корректировки; строение целевых и промежуточных соединений устанавливали методами одномерной ^1H - и ^{13}C - и двумерной (COSY – гомоядерная корреляция, HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция) ЯМР-спектроскопии. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР регистрировали в шкале δ , м.д. на спектрометре FOURIER 300 HD (Bruker Corporation, Германия; 300 и 75 МГц для ядер ^1H - и ^{13}C соответственно) в растворах $\text{DMSO}-d_6$ и CDCl_3 , внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.). Константа спин-спинового взаимодействия J , Гц. Для обозначения резонансных сигналов использовали следующие сокращения: с – синглет, д – дублет, т – триплет, м – мультиплет. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) выполняли на стеклянных силикагелевых пластинах DC Kieselgel 60 G/F₂₅₄ (Merck, Германия) с обнаружением в УФ-свете.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг проводили с использованием структуры TSPO в комплексе с селективным лигандом PK-11195 (PDB ID: 2MGY) в программе Glide v8.1 (<https://www.schrodinger.com/products/gleide>).

Пространственную структуру рецептора TSPO подготавливали с помощью Schrodinger Protein Preparation Wizard (<https://www.schrodinger.com/science-articles/protein-preparation-wizard>) с использованием стандартного протокола [17]. Конформации лигандов рассчитывали в программе LigPrep (<https://www.schrodinger.com/products/ligprep>). Координаты сетки (x 5.65; y 4.66; z 5.91; 20 Å) отцентровывали по лиганду. Стыковку выполняли в программе Glide v8.1 с использованием стандартного протокола [16]. Позы визуализировали в Maestro 11.8 (<https://www.schrodinger.com/products/maestro>), LogP рассчитывали в MarvinSketch 20.1 (ChemAxon Ltd., Венгрия). Для проверки протокола докинга рассчитывали среднеквадратичное отклонение положений атомов (RMSD) между исходным лиган-

дом PK-11195 в белке TSPO и повторно состыкованным подготовленным PK-11195 в сетке. Значение RMSD составило 1.97 Å, что позволило использовать этот протокол для прогнозирования связывания новых лигандов TSPO.

Общая методика получения 1-фенил-пирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамидов (I). Раствор 2.2 ммоль (0.2 г) аминокислотного соединения, 2.0 ммоль (0.48 г) 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоновой кислоты и 2.2 ммоль (0.30 г) 1-гидроксibenзотриазола в 20 мл хлористого метилена охлаждали до 0°C. К нему добавляли раствор 2.4 ммоль (0.50 г) 1,3-дициклогексилкарбодиимида в 10 мл хлористого метилена, смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин. Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат промывали 2 раза по 20 мл воды, сушили сульфатом натрия и упаривали досуха. Остаток хроматографировали на силикагеле, используя в качестве элюента смесь этилацетата и гексана (1 : 1). Нужные фракции собирали и упаривали досуха, остаток перекристалizовывали из этанола.

1-Фенил-*N,N*-дипропилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид (ГМЛ-12). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоновой кислоты и дипропиламина. Выход 70%, светло-желтые кристаллы. Т. пл. 104–106°C. Найдено (%): С, 74.88; Н, 7.22; N, 12.90. $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$. Вычислено (%): С, 74.74; Н, 7.21; N, 13.07. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 0.82, 1.00 (два т, по 3H, 2CH₃, J 6.9); 1.76 (м, 4H, 2CH₂CH₃); 3.49, 3.68 (два т, по 2H, CH₂NCH₂, J 7.3); 6.97 (м, 1H, H(8)); 7.00 (м, 1H, H(7)); 7.49–7.59 (м, 4H, 3PhH, H(6)); 7.96–8.03 (м, 2H, 2PhH); 8.45 (с, 1H, H(4)).

***N*-Бензил-*N*-этил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид (ГМЛ-101).** Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоновой кислоты и *N*-бензил-*N*-этиламина. Выход 80%, бледно-серый порошок. Т. пл. 116–118°C. Найдено (%): С, 76.83; Н, 6.12; N, 11.98. $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$. Вычислено (%): С, 77.72; Н, 5.96; N, 11.82. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.27 (два т, по 3H, 2CH₃, 3J 7.1); 3.73 (м, 2H, CH₂–CH₃); 4.95 (два с, 2H, CH₂–Ph); 6.98 (м, 1H, H(8)); 7.01 (м, 1H, H(7)); 7.27–8.01 (м, 11H, 2Ph, H(6)); 8.54 (с, 1H, H(4)).

***N*-Бензгидрил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид (ГМЛ-102).** Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоновой кислоты и бензгидриламина. Выход 85%, желто-серые игольчатые кристаллы. Т. пл. 150–152°C. Найдено (%): С, 80.67; Н, 5.63; N, 10.26. $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$. Вычислено (%): С, 80.37; Н, 5.25; N, 10.41. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 6.53 (м, 1H, CH); 7.00 (м, 1H, H(8)); 7.04 (м, 1H, H(7)); 7.27–7.55 (м, 16H, 3Ph, H(6)); 7.97 (м, 1H, NH); 8.78 (м, 1H, H(4)).

***N,N*-Дибензил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид (ГМЛ-103).** Получали из 1-фенил-

пирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и дибензиламина. Выход 70%, желтый порошок. Т. пл. 115–116°C. Найдено (%): С, 80.52; Н, 5.23; N, 10.12. $C_{28}H_{23}N_3O$. Вычислено (%): С, 80.55; Н, 5.55; N, 10.06. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 4.74 (м, 2H, CH_2); 5.17 (м, 2H, CH_2); 6.99 (м, 1H, H(8)); 7.02 (м, 1H, H(7)); 7.36–7.93 (м, 16H, 3Ph, H(6)); 8.64 (с, 1H, H(4)).

1-Фенил-*N*-(3,4-диметоксифенилэтил)пирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамид (ГМЛ-104). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и 3,4-диметоксифенилэтиламина. Выход 90%, светло-желтый порошок. Т. пл. 160–163°C. Найдено (%): С, 71.85; Н, 5.68; N, 10.52. $C_{24}H_{23}N_3O_3$. Вычислено (%): С, 71.80; Н, 5.77; N, 10.47. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 2.91 (м, 2H, CH_2); 3.74 (м, 2H, CH_2); 3.88 (м, 6H, 2 CH_3); 6.83 (м, 3H, Ph); 6.99 (м, 1H, H(8)); 7.04 (м, 1H, H(7)); 7.27–8.15 (м, 11H, 2Ph, H(6)); 8.74 (с, 1H, H(4)).

1-Фенил-*N*-(3,4,5-триметоксибензил)пирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамид (ГМЛ-105). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и 3,4,5-триметоксибензиламина. Выход 80%, светло-желтый порошок. Т. пл. 180–183°C. Найдено (%): С, 69.27; Н, 5.72; N, 10.19. $C_{24}H_{23}N_3O_4$. Вычислено (%): С, 69.05; Н, 5.55; N, 10.07. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 3.87 (м, 9H, 3 CH_3); 4.65 (м, 2H, CH_2); 6.62 (м, 2H, Ar); 7.02 (м, 1H, H(8)); 7.04 (м, 1H, H(7)); 7.27–8.03 (м, 6H, Ph, H(6)); 8.81 (с, 1H, H(4)).

Метилловый эфир L-3-фенил-2-(1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамид)пропановой кислоты (ГМЛ-106). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и L-фенилаланина. Выход 85%, карамельные кристаллы. Т. пл. 120–121°C. Найдено (%): С, 72.12; Н, 5.42; N, 10.56. $C_{24}H_{21}N_3O_3$. Вычислено (%): С, 72.17; Н, 5.30; N, 10.52. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 3.27 (м, 2H, CH_2); 3.75 (три с, 3H, CH_3); 5.10 (м, 1H, CH); 6.99 (м, 1H, H(8)); 7.06 (м, 1H, H(7)); 7.55–7.95 (м, 11H, 2Ph, H(6)); 8.44 (м, 1H, NH); 8.71 (с, 1H, H(4)).

Азепан-1-ил(1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-ил)метанон (ГМЛ-107). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и азепана. Выход 85%, карамельные кристаллы. Т. пл. 92–93°C. Найдено (%): С, 75.35; Н, 6.72; N, 13.12. $C_{20}H_{21}N_3O$. Вычислено (%): С, 75.21; Н, 6.63; N, 13.16. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.65 (с, 2H, CH_2CH_2); 1.86 (м, 2H, CH_2-CH_2); 3.71 (м, 2H, CH_2-N); 3.86 (м, 2H, CH_2-N); 6.97 (м, 1H, H(8)); 6.99 (м, 1H, H(7)); 7.52–7.97 (м, 6H, Ph, H(6)); 8.4 (с, 1H, H(4)).

Диэтиловый эфир L-2-(1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидо)пентандионовой кисло-

ты (ГМЛ-108). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и диэтилового эфира L-глутаминовой кислоты. Выход 65%, карамельные кристаллы. Т. пл. 59–60°C. Найдено (%): С, 65.30; Н, 5.98; N, 9.83. $C_{23}H_{25}N_3O_5$. Вычислено (%): С, 65.24; Н, 5.95; N, 9.92. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.20–1.30 (м, 6H, 2 CH_3); 2.00–2.40 (м, 4H, 2 CH_2-CH_3); 4.09–4.11 (м, 2H, $CH_2-C(O)$); 4.25–4.27 (м, 2H, CH_2-CH_2); 7.00–7.06 (д, 2H, H(8), H(7), *J* 3.46); 7.55–8.00 (м, 6H, Ph, H(6)); 8.74 (с, 1H, H(4)).

Диэтиловый эфир L-2-(1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидо)бутандионовой кислоты (ГМЛ-109). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и диэтилового эфира L-аспарагиновой кислоты. Выход 78%, желтые кристаллы. Т. пл. 42–43°C. Найдено (%): С, 64.30; Н, 5.74; N, 10.13. $C_{22}H_{23}N_3O_5$. Вычислено (%): С, 64.54; Н, 5.66; N, 10.26. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.24–1.30 (м, 6H, 3 CH_3); 3.01–3.11 (дд, 4H, $CH_2-C(O)$, *J*₁ 6.25, *J*₂ 7.20); 5.09–5.12 (м, 1H, CH–NH), 7.99–7.06 (д, 2H, H(8), H(7), *J* 3.46); 7.53–8.04 (м, 6H, Ph, H(6)); 8.74–8.75 (с, 1H, H(4)).

Метилловый эфир L-2-(1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидо)пропановой кислоты (ГМЛ-110). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и метилового эфира L-аланина. Выход 90%, желтые кристаллы. Т. пл. 128–130°C. Найдено (%): С, 66.79; Н, 5.74; N, 13.14. $C_{18}H_{17}N_3O_3$. Вычислено (%): С, 66.86; Н, 5.30; N, 13.00. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.57 (д, 3H, CH_3 , *J* 6.00); 3.80 (с, 3H, OCH_3); 4.82–4.91 (м, 1H, CH–NH), 7.04–7.00 (м, 2H, H(8), H(7)); 7.55–8.43 (м, 6H, Ph, H(6)); 8.75 (с, 1H, H(4)).

Этиловый эфир L-3-(1*H*-индол-3-ил)-2-(1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидо)пропановой кислоты (ГМЛ-111). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и этилового эфира L-триптофана. Выход 80%, желтые кристаллы. Т. пл. 71–72°C. Найдено (%): С, 71.65; Н, 5.74; N, 12.40. $C_{27}H_{24}N_4O_3$. Вычислено (%): С, 71.67; Н, 5.35; N, 12.38. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.24 (м, 3H, CH_3); 3.45 (м, 2H, CH_2-CH); 3.69 (м, 2H, CH_2-CH_3); 5.16 (м, 2H, CH–N); 7.01–7.84 (м, 13H, H(8), H(7), Indole, Ph); 8.54 (м, H(6)); 8.71 (с, 1H, H(4)).

Этиловый эфир D-3-(4-гидроксифенил)-2-(1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидо)пропановой кислоты (ГМЛ-112). Получали из 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоновой кислоты и этилового эфира D-тирозина. Выход 45%, желтые кристаллы. Т. пл. 174–176°C. Найдено (%): С, 69.95; Н, 5.36; N, 9.75. $C_{25}H_{23}N_3O_4$. Вычислено (%): С, 69.92; Н, 5.40; N, 9.78. Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.26 (м, 3H, CH_3); 3.15–3.17 (м,

2H, CH_2Ph); 3.72–3.75 (м, 1H, CH-N), 4.19–4.22 (м, 2H, CH_2-CH_3), 6.70–7.90 (м, 12H, H(8), H(7), 2Ph); 8.52–8.55 (м, H(6)); 8.67–8.68 (с, 1H, H(4)).

L-3-Фенил-2-(1-фенилпирроло[1,2-а]пиазин-3-карбоксамид)пропановая кислота (ГМЛ-113). Растворяли 8.03 ммоль (3.21 г) метилового эфира L-3-фенил-2-(1-фенилпирроло[1,2-а]пиазин-3-карбоксамид)пропановой кислоты (ГМЛ-106) в смеси этилового и изопропилового спирта, добавляли гидроксид калия в 20 мл воды и кипятили с обратным холодильником 2 ч. Нейтрализовали реакционную смесь лимонной кислотой и экстрагировали хлористым метиленом, затем упаривали досуха на ротаторном испарителе и перекристаллизовывали из этанола. Выход 1.71 г, 53.3%. Желтые кристаллы. Найдено (%): С, 71.45; Н, 5.16; N, 10.99. $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$. Вычислено (%): С, 71.68; Н, 4.97; N, 10.90. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 3.21 (м, 2H, CH_2); 4.52 (м, 1H, CH); 7.06 (м, 2H, H(7), H(8)); 7.20–8.05 (м, 11H, 2Ph, H(6)); 8.53 (м, 1H, NH); 8.97 (с, 1H, H(4)).

Животные. Животные (240 мышей-самцов линии Balb/c массой 19–25 г; 272 аутбредных мышей-самцов ICR массой 23–30 г) получены из питомника лабораторных животных “Пушино” при филиале Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Животных содержали в условиях лабораторного вивария в контролируемых условиях окружающей среды (20–24°C и относительная влажность 45–65%, 12-часовой цикл освещения, 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час) в пластмассовых клетках с верхней крышкой из нержавеющей стали с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки, по 20 мышей в каждой клетке, при постоянном доступе к экструдированному брикетированному корму и питьевой воде. Животных распределяли по группам рандомизированно, по критерию массы тела, с отклонением от среднего значения не более 10%. Перед опытом животных выдерживали в экспериментальной комнате в “домашних” клетках в течение 24 ч.

Тест “открытое поле”. В исследовании использовали мышей-самцов линии Balb/c. Для введения исследуемых соединений готовили их суспензию с Tween-80 и дистиллированной водой (1% Tween-80) в концентрациях от 10 до 500 мкг/мл в зависимости от используемой дозы. Объем введения составлял 0.1 мл на 10 г веса для мышей и рассчитывался в соответствии с массой тела, регистрируемой перед введением препарата. Полученную смесь вводили мышам однократной внутрибрюшинной инъекцией. В каждой исследовательской группе было по 8 животных. Животным контрольных групп вводили 1%-ную суспензию Tween-80 в дистиллированной воде.

Через 30 мин после внутрибрюшинного введения соединения животное сначала помещали на

1 мин в темную камеру, а затем – на один из периферических квадратов “открытого поля” (Open Science, Россия), которое представляет из себя белую круглую арену диаметром 1 м с белыми бортами высотой 50 см. Освещение осуществляли бестеневыми лампами, расположенными на уровне 1 м над поверхностью поля. Уровень освещенности составлял 3000 люкс. Все пространство арены равномерно разделено четырьмя concentрическими окружностями, которые в свою очередь разбиты радиусами на сектора так, что периферическая окружность состоит из 16 одинаковых криволинейных квадратов. Наблюдение за животным проводили в течение 3 мин, отдельно фиксировали число пересеченных квадратов на периферии (ПА), в центральных областях (ЦА), число заходов в центр (Ц), а также число вертикальных стоек (ВА) и количество дефекаций (Д). Суммарное число пересеченных квадратов вместе с числом вертикальных стоек обозначали как общую активность (ОДА).

Тест “приподнятый крестообразный лабиринт”. Установка “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) (Open Science, Россия) для мышей выполнена из поливинилхлорида серого цвета и представляет собой две взаимопересекающиеся под прямым углом горизонтальные дорожки 65×5 см. Два противоположных отсека имеют непрозрачные вертикальные стенки высотой 15 см. Лабиринт приподнят от пола на 40 см. В месте перекрестия плоскостей находится открытая центральная платформа 5×5 см.

Эксперимент проводили в условиях дневного освещения. В начале тестирования животное помещали в центр лабиринта, что давало возможность переместиться в темные либо светлые рукава лабиринта – в зависимости от преобладания тревоги (боязнь высоты, открытого пространства) или исследовательской активности (что побуждало животное выходить из “защищенных” рукавов).

Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно аутбредным мышам-самцам ICR в виде суспензии с Tween-80 и дистиллированной водой (1% Tween-80) в концентрациях от 10 до 500 мкг/мл в зависимости от используемой дозы. Объем введения составлял 0.1 мл на 10 г веса для мышей и рассчитывался в соответствии с массой тела, регистрируемой перед введением препарата. Животным контрольных групп вводили 1%-ную суспензию Tween-80 в дистиллированной воде. В каждой исследовательской группе было по 8 животных.

Оценку поведения мышей в тесте ПКЛ проводили согласно методике Pellow et al. [21] через 30 мин после введения соединений. Фиксировали следующие показатели поведения животных в ПКЛ в течение 300 с: время нахождения в откры-

тых рукавах, время нахождения в закрытых рукавах, число заходов в открытые рукава, число заходов в закрытые рукава, пребывание (в %) животных в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах лабиринта и число заходов (в %) в открытые рукава по отношению к суммарному числу заходов в открытые и закрытые лабиринта.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных в ОП и ПКЛ результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (критерий Краскела—Уоллиса) и непараметрического анализа для независимых переменных (*U*-критерий Манна—Уитни, различия считали значимыми при $p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирована новая группа 1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамидов, в которых заместителями при амидном атоме азота выступают алкильные, бензильные или алкоксифенилалкильные группы, остатки аминокислот или их производные (всего 14 соединений). Показано, что синтезированные соединения имеют высокие теоретические значения аффинности по отношению к белку TSPO и благоприятный профиль ADMET-характеристик, что обуславливает их перспективность для разработки в качестве лекарственных средств.

У некоторых соединений в дозах 0.1–5.0 мг/кг при внутрибрюшинном введении в условиях эмоционально-стрессового воздействия в тесте “открытое поле” у мышей линии Balb/c и в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” у мышей ICR выявлена анксиолитическая активность. Определены некоторые закономерности по взаимосвязи биологической активности *in vivo* с рядом расчетных показателей: более активными были соединения, обладающие большими значениями Docking score, LogP и LogBB, что хорошо согласуется с базовыми принципами медицинской химии в отношении нейропсихотропных средств.

Для дальнейшей разработки в качестве потенциального анксиолитического средства было отобрано соединение-лидер *N*-бензгидрил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиразин-3-карбоксамид (ГМЛ-102), показавший наличие противотревожной активности у мышей в широком интервале доз в обоих используемых поведенческих тестах.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” на 2022–2024 годы № FGFG-2022-0005 “Создание новых химических структур — потенциальных лиган-

дов фармакологических мишеней для лечения нервно-психических и сердечно-сосудистых заболеваний”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Организацию и проведение работ с животными осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами”, ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур”, Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, и правилами, утвержденными комиссией по биоэтике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mokrov G.V., Deeva O.A., Gudasheva T.A. // *Curr. Pharm. Des.* 2020. V. 27. P. 217–237. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200903122025>
2. Sanabria E., Cuenca R.E., Estes M.Á., Maldonado M. // *Toxics*. 2021. V. 9. P. 25. <https://doi.org/10.3390/toxics9020025>
3. Rupprecht R., Papadopoulos V., Rammes G., Baghai T.C., Fan J., Akula N., Groyer G., Adams D., Schumacher M. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. V. 9. P. 971–988. <https://doi.org/10.1038/nrd3295>
4. Sugawara Y., Cheng W.W.L., Bracamontes J.R., Chen Z.W., Wang L., Germann A.L., Pierce S.R., Senneff T.C., Krishnan K., Reichert D.E., Covey D.F., Akk G., Evers A.S. // *Elife*. 2020. V. 9. P. 1–32. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.55331>
5. Guennoun R., Labombarda F., Gonzalez Deniselle M.C., Liere P., De Nicola A.F., Schumacher M. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2015. V. 146. P. 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.001>
6. Rupprecht R., Ranimes G., Eser D., Baghai T.C., Schule C., Nothdurfter C., Troxler T., Gentsch C., Kalkman H.O., Chaperon F., Uzunov V., McAllister K.H., Bertaina-Anglade V., La Rochelle C.D., Tuerck D., Floesser A., Kiese B., Schumacher M., Landgraf R., Holsboer F., Kucher K. // *Science*. 2009. V. 325. P. 490–493. <https://doi.org/10.1126/science.1175055>
7. Da Pozzo E., Costa B., Martini C. // *Curr. Mol. Med.* 2012. V. 12. P. 426–442. <https://doi.org/10.2174/156652412800163451>
8. Barresi E., Robello M., Costa B., Da Pozzo E., Baglini E., Salerno S., Da Settimo F., Martini C., Taliani S. // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 209. P. 112924. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112924>

9. Mokrov G.V., Deeva O.A., Gudasheva T.A., Yarkov S.A., Yarkova M.A., Seredenin S.B. // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. V. 23. P. 3368–3378.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.049>
10. Mokrov G.V., Pantileev A.S., Yarkova M.A., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. // *Med. Chem.* 2022. V. 18. P. 497–508.
<https://doi.org/10.2174/1573406417666210806095051>
11. Gudasheva T.A., Deeva O.A., Mokrov G.V., Dyabina A.S., Yarkova M.A., Seredenin S.B. // *Med. Chem.* 2018. V. 15. P. 383–399.
<https://doi.org/10.2174/1573406415666181119164846>
12. Gudasheva T.A., Deeva O.A., Pantileev A.S., Mokrov G.V., Rybina I.V., Yarkova M.A., Seredenin S.B. // *Molecules.* 2020. V. 25. P. 5132.
<https://doi.org/10.3390/molecules25215132>
13. Середенин С.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., Деева О.А., Ярков С.А., Яркова М.А., Жердев В.П., Алексеев К.В., Дурнев А.Д., Незнамов Г.Г. // Патент RU 2572076 C2, 2015.
14. Середенин С.Б., Яркова М.А., Поварнина П.Ю., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. // Патент RU 2699568 C2, 2019.
15. Середенин С.Б., Мокров Г.В., Яркова М.А., Пантале-ев А.С., Гудашева Т.А., Дурнев А.Д. // Патент RU 2734240 C2, 2020.
16. Schrödinger Release 2015-4: Maestro, Version 10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
<https://www.schrodinger.com/products/maestro>
17. Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
<https://www.schrodinger.com/products/ligprep>
18. ADMETlab 2.0: an Integrated Online Platform for Accurate and Comprehensive Predictions of ADMET Properties, 2021.
<https://admetmesh.scbdd.com/>
19. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. Миронова А.Н. Москва: Гриф и К, 2012. 944 с.
20. Середенин С.Б., Ведерников А.А. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1979. Т. 88. № 7. С. 38–40.
21. Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. // *Neurosci. Meth. J.* 1985. V. 14. P. 149–167.

Design, Synthesis, and Study of the Anxiolytic Activity of New Pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-Containing TSPO Ligands

G. V. Mokrov^{*, #}, A. S. Pantileev^{*}, M. A. Yarkova^{*}, I. V. Rybina^{*}, T. A. Gudasheva^{*},
Yu. V. Vakhitova^{*}, and S. B. Seredenin^{*}

[#]Phone: +7-926-185-68-46; e-mail: g.mokrov@gmail.com

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

A new group of 1-phenylpyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamides, in which substituents at the amide nitrogen atom are alkyl, benzyl or alkoxyphenylalkyl groups, amino acid residues or their derivatives, has been obtained in this work. The synthesized compounds have high theoretical affinities for the 18 kDa translocator protein (TSPO) and a favorable profile of ADMET characteristics, which makes them promising for drug development. Anxiolytic activity was detected for eight compounds at doses of 0.1–5.0 mg/kg when administered intraperitoneally under conditions of emotional stress in the open field test in Balb/c mice and in the elevated plus maze test in ICR mice. *N*-Benzhydryl-1-phenylpyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamide was selected as a lead compound for further development as a potential anxiolytic agent, which showed the presence of anti-anxiety activity in a wide range of doses in both tests used.

Keywords: TSPO ligands, pyrrolo[1,2-*a*]pyrazines, molecular modeling, anxiolytic activity, animal models



ВЛИЯНИЕ ГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛИНА НА Na^+/H^+ -ОБМЕННИК И ВНУТРИГЛАЗНОЕ ДАВЛЕНИЕ У КРЫС

© 2023 г. А. С. Таран*, **, #, Л. В. Наumenко*, Ю. А. Говорова*, Н. А. Гурова*, А. А. Спасов*, **, А. А. Озеров*, **, Д. В. Мережкина*

*ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 400131 Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

**ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», Россия, 400131 Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 10.07.2022 г.

Принята к публикации 12.07.2022 г.

На основании данных о роли Na^+/H^+ -обменника (NHE) в модуляции внутриглазного давления, выступающего основным фактором развития глаукомы, и ранее проведенных разными авторами исследований, доказывающих наличие ингибирующей NHE-1 активности у производных хиначолина, было синтезировано девять новых соединений этого класса. Изучено влияние полученных производных хиначолина на ингибирование Na^+/H^+ -обменника и внутриглазное давление (ВГД) крыс в сравнении с зонипоридом (ингибитор NHE) и тимололом (препарат для снижения ВГД, используемый в клинической практике). Среди исследованных соединений *in vitro* все производные хиначолина в концентрации 1 нМ угнетали активность NHE-1, наиболее активным было производное хиначолинацетилгуанидина. Однако не все соединения проявили ВГД-снижающую активность *in vivo* на крысах. Так, наиболее активными из хиначолиновых производных выступают 4-оксохиначолинацетилгуанидин, его бромированное в положении С6 производное и хиначолинпропионилгуанидин. Анализ структура–активность показал, что наличие атома Вг в положении С6 производного 4-оксохиначолинацетилгуанидина приводит к максимальному снижению ВГД при инстилляции раствора исследуемого соединения.

Ключевые слова: Na^+/H^+ -обменник (NHE), внутриглазное давление (ВГД), глаукома, хиначолин, биоизостеры мелатонина

DOI: 10.31857/S0132342323020215, EDN: PGNDUV

ВВЕДЕНИЕ

Глаукома — одна из наиболее тяжелых форм офтальмопатологии, характеризующаяся постоянным или периодическим повышением внутриглазного давления (ВГД), без должного лечения приводящая к слепоте и слабовидению. На данный момент ВГД — единственный контролируемый фактор прогрессирования глаукомы. В связи с этим актуальным остается поиск соединений, которые способны понизить внутриглазное давление, препятствуя развитию нейропатии зрительного нерва и сопряженных с этим явлением состояний [1]. В последнее время в литературе обсуждается появление новых мишеней для офтальмогипотензивных соединений, одна из которых — Na^+/H^+ -обменник-1 (NHE-1) [2, 3].

NHE-1 контролирует внутриклеточный pH и активность гликолитических ферментов — гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы, а его экспрессия и активность повышаются, например, при сахарном диабете. NHE-1-зависимая регуляция гликолиза, в условиях ингибирования (хрусталик) или недостаточной активации (сетчатка) глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, лежит в основе отвода избыточного гликолитического потока в сторону нескольких путей, способствующих окислительному стрессу, причинному фактору диабетического катарактогенеза и ретинопатии. Доказано, что активация NHE-1 способствует формированию диабетической катаракты, а также окислительно-нитратному стрессу и апоптозу сетчатки [4].

Многочисленные доклинические испытания, проведенные на крысах, кроликах и обезьянах, а также клинические испытания на людях подтверждают снижение ВГД при применении ингибиторов Na^+/H^+ -обменника (NHE) [5, 6]. Так, в ис-

Сокращения: NHE — Na^+/H^+ -обменник; ВГД — внутриглазное давление; ПБогТ — плазма, богатая тромбоцитами.

Автор для связи: (тел.: +7 (996) 511-05-08; эл. почта: taran-a.s@yandex.ru).

следовании блокирования Na^+/H^+ - и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменников карипоридом, амилоридом и этил-изопропил-амилоридом было показано, что данные воздействия в культуре клеток бычьего пигментного и беспигментного эпителия цилиарного тела препятствуют поглощению этими клетками ионов Na^+ , необходимых для секреции внутриглазной жидкости. В ранее проведенных исследованиях на кафедре фармакологии и биоинформатики Волгоградского государственного медицинского университета [6, 7] были выявлены соединения, ингибирующие NHE.

NHE-1 экспрессируется и активен в цилиарном пигментированном эпителии цилиарного тела, где он вместе с антипортером $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE2 способствует поглощению NaCl из стромы цилиарного отростка, что выступает решающим этапом для образования водянистой влаги. Кроме того, натрийуретические пептиды, которые локально синтезируются в цилиарном теле, ингибируют активность NHE-1, что, возможно, приводит к снижению ВГД. Кроме того, было показано, что активность NHE-1 регулируется соматостатином, который вырабатывается в этом эпителии и активирует $\text{P}13\text{K}/\text{AKT}$ и эндотелиальный NO -синтазный путь. В непигментированном эпителии базолатеральные NHEs (возможно, NHE-1 и NHE-4) ингибируются NO , который, вероятно, действует через sGMP и протеинкиназу G [8]. Взяты вместе, эти результаты указывают на возможную роль ингибирования NHE1 в снижении внутриглазного давления. Соответственно, ингибиторы NHE снижают ВГД и могут рассматриваться как потенциальные фармакологические агенты.

Цель настоящего исследования — получение новых гуанидиновых производных хиназолина и изучение их возможного влияния на Na^+/H^+ -обменник и внутриглазное давление у крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гетероциклических производных хиназолинового ряда. Производные хиназолина представляют собой биоизостеры мелатонина, который, согласно многочисленным исследованиям [9], не только корректирует нарушенные циркадные ритмы, сон и настроение, но и выступает перспективным соединением для патогенетической терапии глаукомы [6].

N-Алкилирование исходных оснований бензиловым эфиром хлоруксусной кислоты и изопропиловым эфиром α -хлорпропионовой кислоты, а также аминирование промежуточных сложных эфиров хиназолинилкарбоновых кислот гуанидином и аминоксидом осуществляли по разработанной ранее методике [10]. В резуль-

тате было синтезировано девять новых пиримидиновых производных хиназолина (I–IX).

Фармакологические свойства синтезированных соединений. *NHE-ингибирующая активность in vitro.* При физиологическом значении pH NHE-1 имеет низкую активность. Во время возникновения внутриклеточного ацидоза происходит накопление внутриклеточных протонов, которые выводятся из клеток через сарколеммный NHE-1 в обмен на вход ионов Na^+ . Возрастание внутриклеточного содержания ионов Na^+ активирует $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -реверсивный обмен через сарколемму, инициируя вход ионов Ca^{2+} в кардиомиоциты. Возникает “ Ca^{2+} -перегрузка” [11, 12].

В контрольной серии экспериментов при добавлении к 200 мкл плазмы, богатой тромбоцитами (ПБогТ), раствора Кребса наблюдали увеличение светопропускания в среднем на 30–40% от исходного уровня калибровки. При добавлении к 200 мкл ПБогТ для снижения внутриклеточного pH 600 мкл пропионатного буфера (контрольная серия) происходила активация NHE-1, увеличивался приток Na^+ , связанный с выделением цитозольного H^+ , что приводило к отеку (сферуляции) тромбоцита в результате аккумуляции воды в цитоплазме. При этом наблюдали облегчение светопропускания до 60–70%.

В опытных исследованиях после предварительной инкубации ПБогТ с новыми соединениями или препаратом сравнения зонипоридом происходило снижение уровня светопропускания по отношению к контрольным исследованиям только с натрий-пропионатным буфером. Это свидетельствует о том, что исследуемые соединения ингибируют NHE-1 и уменьшают вероятность сферуляции тромбоцитов. Полученные результаты согласуются с литературными данными [11, 13, 14].

В исследовании *in vitro* все производные хиназолина в концентрации 1 нМ статистически значимо по отношению к контрольным исследованиям ($p < 0.05$) вызывали угнетение активности NHE-1. Соединения (II), (IV–VI) и (VIII) превосходили препарат сравнения зонипорид, однако статистически значимые различия с зонипоридом были только в отношении соединения (VIII) (табл. 1).

Офтальмогипотензивные свойства. Офтальмогипотензивную активность исследуемых соединений и препаратов сравнения изучали методом тонометрии на белых беспородных интактных крысах. Животные были разделены на опытные группы, которым в правый (тестовый) глаз инстиллировали (вводили в конъюнктивальный мешок) исследуемые соединения, и группы препаратов сравнения, которым в тестовый глаз инстиллировали тимолол и зонипорид. Левый

Таблица 1. Влияние новых соединений и препаратов сравнения на активность Na^+/H^+ -обменника и показатели внутриглазного давления у интактных крыс

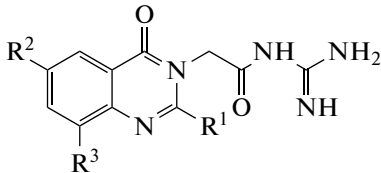
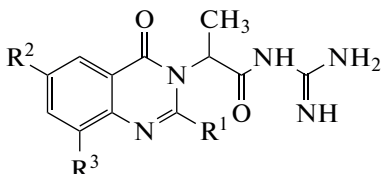
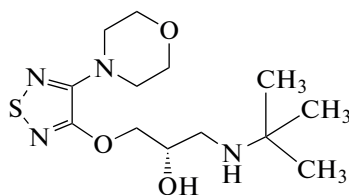
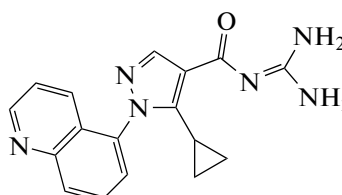
Соединение/ препарат	NHE-ингибирующая активность в дозе 1 нМ ($\Delta\%$), $M \pm m$	Максимальное изменение ВГД, %	Время максимального снижения ВГД, ч	Влияние на ВГД коллатерального глаза	R1	R2	R3
Производные хинаязолина с линейным гуанидиновым фрагментом							
Группа 1							
				Базовая структура 4-оксохинаязолинацетилгуанидина			
(I)	34.2 ± 11.8	-26.2^*	2	—	—	—	—
(III)	$48.3 \pm 3.8^*$	6.5	ВГД не снижалось	+	CH_3	—	—
(IX)	$47.1 \pm 9.2^*$	8.6	ВГД не снижалось	—	—	CH_3	—
(VII)	$46.1 \pm 8.6^*$	5.3	ВГД не снижалось	+	—	Cl	—
(IV)	$57.6 \pm 8.9^*$	$-41.0^{*, \#}$	2	—	—	Br	—
(VIII)	$74.5 \pm 7.1^{*, **}$	-2.6	2	—	CH_3	Br	—
(VI)	$56.7 \pm 12.0^*$	-15.8^*	2	—	—	Br	Br
Группа 2							
				Базовая структура 4-оксохинаязолинпропионилгуанидина			
(II)	$56.2 \pm 12.91^*$	-21.1^*	1	—	—	—	—
(V)	$68.9 \pm 10.9^*$	2.9	ВГД не снижалось	+	—	Br	—
Препараты сравнения							
Тимолол	Не исследовали	-24.4^*	2	+	 (S)-1-(<i>мрем</i> -Бутиламино)-3-[(4-морфолино-1,2,5-тиадиазол-3-ил)окси]-2-пропанол (гемигидрат или малеат)		

Таблица 1. Окончание

Соединение/ препарат	NHE-ингибирующая активность в дозе 1 нМ ($\Delta\%$), $M \pm m$	Максимальное изменение ВГД, %	Время максимального снижения ВГД, ч	Влияние на ВГД коллатерального глаза	R1	R2	R3
Зонипорид	$41.5 \pm 8.1^*$	$-46.5^{*, \#}$	3	—	 [1-(Хинолин-5-ил)-5-циклопропил-1H-пиразол-4-карбонил]гуанидина гидрохлорид моногидрат		

* Различие достоверно относительно показателей контрольной группы ($p < 0.05$, t -тест Стьюдента).

Различие достоверно относительно показателей группы тимолола ($p < 0.05$, t -тест Стьюдента).

** Различие достоверно относительно показателей группы зонипорида ($p < 0.05$, t -тест Стьюдента).

(контрольный, коллатеральный) глаз служил для оценки возможного резорбтивного действия исследуемых соединений. Так, тимолол при инстиляции снижал офтальмотонус через 30 мин на 24% и достигал максимального эффекта через 1 ч (рис. 1а), ВГД-снижающий эффект сохранялся в течение 3 ч, что соответствует литературным данным и подтверждается в терапии. Зонипорид проявлял ВГД-снижающую активность через 60 мин (-27.9%) и достигал максимального эффекта к третьему часу (-46.5%) (рис. 1б).

При изучении влияния ингибиторов NHE на ВГД было выявлено, что из девяти синтезированных пиримидиновых производных хиназолина в различной степени снижали ВГД только четыре соединения – производные (I), (II), (IV) и (VI), остальные пять соединений не проявляли активность.

Соединение (VI) снижало ВГД максимально на 15.8% по отношению к исходному значению ко второму часу исследования, без тенденции к дальнейшему снижению ВГД. У соединения (II) максимальный офтальмогипотензивный эффект был достигнут к первому часу, ВГД было снижено на 21.1%, с последующим уменьшением оказываемого эффекта. Высокую активность, превосходящую препарат сравнения тимолол, проявили соединения (IV) и (I), максимум ВГД-снижающего эффекта в обоих случаях достигался к началу второго часа исследования и составлял 41.0 и 26.3% соответственно. В ходе исследования зонипорида установлено, что ВГД к третьему часу снижается на 46.5%, превосходя препарат сравнения тимолол.

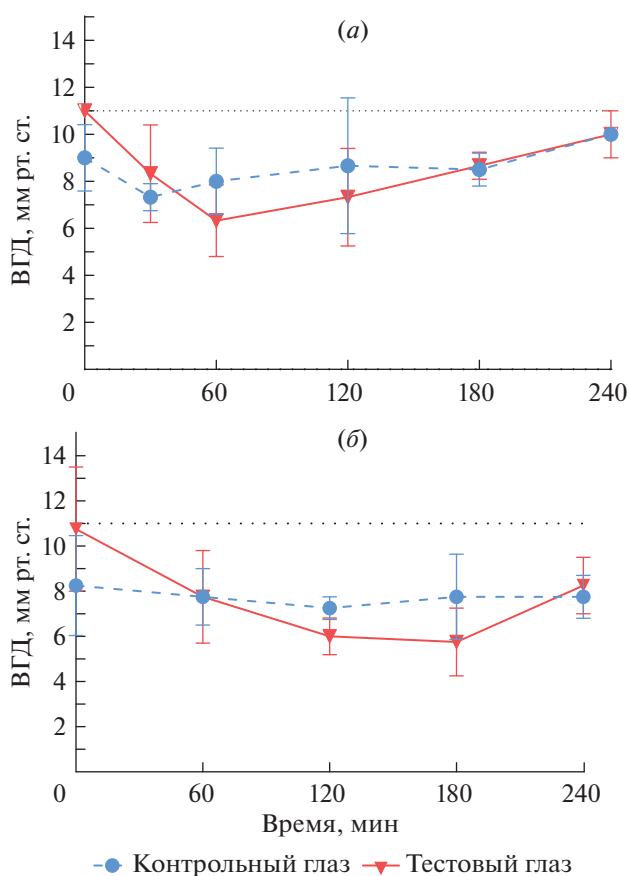


Рис. 1. Влияние тимолола (а) и зонипорида (б) на внутриглазное давление у крыс при однократной инстиляции в концентрации 0.2%.

Влияние исследуемых соединений на ВГД коллатерального глаза исследовали с целью выявления системного действия при попадании в кровоток и в дальнейшем прогнозирования возможных побочных эффектов. Таким образом, наиболее активные соединения (IV), (I), (II) и (VI) не вызывают изменения ВГД коллатерального глаза, в отличие от препарата сравнения тимолола, а значит, не проявляют резорбтивный эффект.

Для наиболее активных соединений определяли продолжительность изучаемого эффекта. Так, соединение (IV) через 60 мин после инстилляций снижало ВГД относительно исходного уровня на 36%, через 120 мин — на 41%, но к 180 мин исследуемый показатель возвращался к исходному значению (рис. 2а). Соединение (I) через 60 мин после инстилляций снижало ВГД на 16% относительно исходного уровня, к 120 мин эффективность возрастала до 26%, а к 180 мин гипотензивный эффект не наблюдался (рис. 2б). При инстиляции соединения (II) максимальное снижение ВГД наступало через 60 мин (21%), в дальнейшем активность снижалась: через 2 ч — до 15%, а через 3 ч — до 10% (рис. 2в).

Влияние на коллатеральный глаз у исследуемых соединений (I), (II) и (IV) не было обнаружено и находилось в пределах уровня ошибки.

Зависимость проявляемых фармакологических эффектов от химической структуры исследуемых соединений. По результатам исследования был проведен анализ зависимости ВГД-снижающей активности от химической структуры изучаемых соединений. Все исследуемые производные хиназолина были разделены на две группы (табл. 1): группа 1 включает в себя ацетилгуанидиновые производные хиназолина, группа 2 — пропионилгуанидиновые производные хиназолина.

В группу 1 входят производные хиназолина, в которых гетероцикл соединен с линейным гуанидиновым фрагментом посредством ацетильного линкера. Соединение (I), проявляющее среднюю активность и снижающее ВГД на 26.32%, представляет собой базовую структуру для всех изучаемых в данном исследовании соединений. Замещение атома Н на атом Вг в положении С6 (IV) приводит к увеличению активности и наибольшему снижению ВГД (–41%), тогда как дальнейшее бромирование в положение С8 (VI), создающее дополнительные электронные и стерические эффекты, снижает изучаемую активность (до –15.79%). В то же время наличие одного, но более электроотрицательного атома С1 в положении С6 (VII) приводит к обратному эффекту — незначительному повышению ВГД на 5.26%. Такой же эффект обеспечивает и введение метильной группы в положения С2 (III) и С6 (IX) — ВГД возрастает на 6.45 и 8.57% соответственно. Модификация структуры (IX) и последующее введение ато-

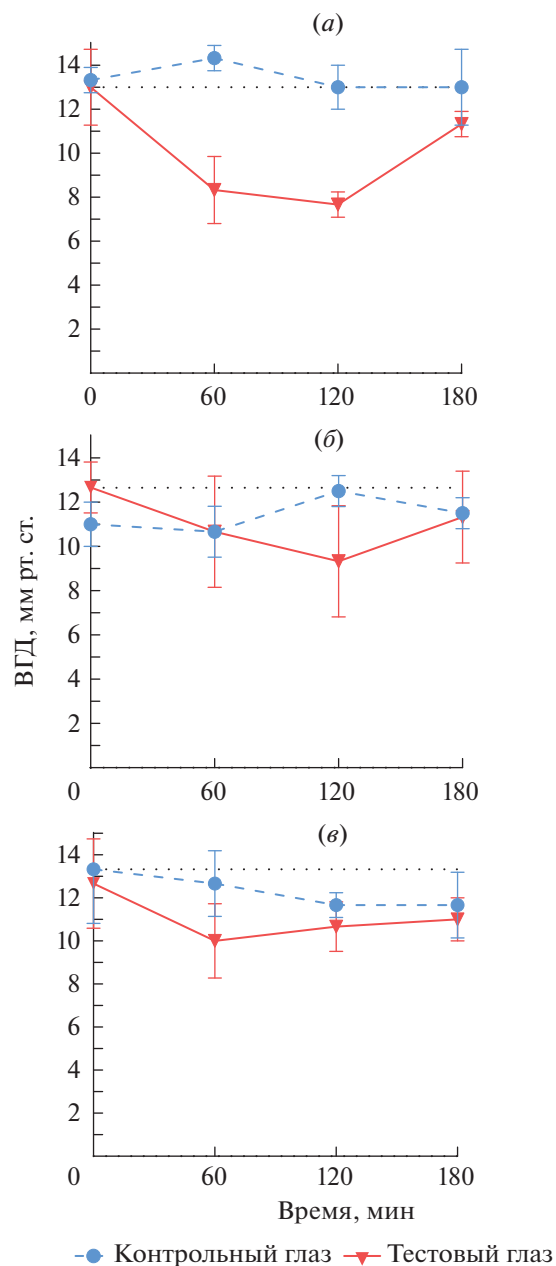


Рис. 2. Влияние соединений (IV) (а), (I) (б) и (II) (в) на внутриглазное давление у крыс при однократной инстиляции в концентрации 0.2%.

ма Вг в положение С6 (VIII) приводит к незначительному проявлению активности и снижению офтальмотонуса.

В группу 2 входят гуанидиновые производные хиназолина, у которых линкер представлен пропионильным фрагментом. Обнаружено, что включение в ацетильный линкер базового соединения (I) дополнительной метильной группы (II) почти не влияет на снижение ВГД (–21.1%). Однако дальнейшее бромирование в положение С6 (V), так же как и в случае С2-метилирования,

приводит к инверсии эффекта, и это соединение, наоборот, повышает офтальмотонус на 2.94%.

По результатам ННЕ-ингибиторной активности также был проведен анализ, отображающий связь химических структур изучаемых соединений и проявления фармакологического эффекта. Так, среди производных 4-оксохиназолинацетилгуанидина соединение (I), выступающее базовой структурой для всех изучаемых в данном исследовании соединений, проявляло наименьшую ННЕ-ингибирующую активность (34.21%). Электроотрицательный атом хлора в положении С6 (VII) приводит к увеличению ННЕ-ингибирующего действия до 46.12%, а замена Cl^{*} на метильную группу (IX) повышает активность до 47.05%. Наличие метильного заместителя в положении С2 (III) повышает изучаемую активность до 48.31%. Если же ввести два атома Вг в положения С6 и С8 (VI), ННЕ-ингибиторная активность повышается до 56.70%, сопоставимым эффектом (57.56%) обладает соединение (IV) только с одним атомом Вг в положении С6, а замещение атома Н^{*} на метильную группу в положении С2 (VIII) приводит к максимальному среди исследуемых соединений увеличению ННЕ-ингибирующей активности — до 74.50%.

Среди производных 4-оксохиназолинпропионилгуанидина соединение (II), не имеющее заместителей в хиназолиновом скаффолде, проявляет высокую ННЕ-ингибирующую активность (56.23%), но введение атома Вг в положение С6 (V) повышает активность до 68.85%.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез гетероциклических производных хиназолинового ряда. Все реагенты получали от компаний Sigma-Aldrich (США), AcrosOrganics (Бельгия) и использовали без дополнительной очистки. ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Avance 400 (Bruker, Германия; 400 МГц для ¹H и 100 МГц для ¹³C) в DMSO-*d*₆ с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. Температуру плавления определяли в стеклянных капиллярах на приборе Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США).

Исходные основания — хиназолин-4(3*H*)-он и 2-метилхиназолин-4(3*H*)-он — коммерчески доступные соединения. 6-Бромхиназолин-4(3*H*)-он, 2-метил-6-бромхиназолин-4(3*H*)-он и 6,8-дибромхиназолин-4(3*H*)-он получали в соответствии с опубликованными методиками [15, 16].

***N*-[2-[4-Оксохиназолин-3(4*H*)-ил]ацетил]гуанидин (I). А. Бензиловый эфир [хиназолин-3(4*H*)-ил]уксусной кислоты.** Перемешивали 2.00 г (13.7 ммоль) хиназолин-4(3*H*)-она и 4.00 г (28.9 ммоль) безводного карбоната калия в 40 мл безводного диметилформамида при 80–85°C в течение

15 мин, добавляли раствор 3.25 г (14.2 ммоль) бензилового эфира бромуксусной кислоты в 10 мл диметилформамида и перемешивали при той же температуре в течение 1 ч. Реакционную массу охлаждали, фильтровали, фильтрат упаривали на ротационном испарителе при остаточном давлении 10 мм рт. ст. при температуре бани 90–95°C, остаток охлаждали, растирали с 25 мл воды, фильтровали, промывали на фильтре холодной водой (2 раза по 10 мл), сушили на воздухе в течение суток и кристаллизовали из 50 мл изопропилового спирта. Получили 3.30 г (82%) светло-желтого кристаллического вещества. Т. пл. 116–117°C.

Б. *N*-[2-[4-Оксохиназолин-3(4*H*)-ил]ацетил]гуанидин (I). К кипящему раствору 2.00 г (6.80 ммоль) бензилового эфира [хиназолин-3(4*H*)-ил]уксусной кислоты и 0.75 г (7.85 ммоль) гуанидина гидрохлорида в 50 мл безводного метилового спирта добавляли в один прием 0.50 г (8.04 ммоль) гранулированного калия гидроксида и кипятили в течение 30 мин. Горячий раствор фильтровали, отделяя образовавшийся осадок калия хлорида, фильтрат охлаждали и выдерживали в течение суток при комнатной температуре. Выделившийся осадок отфильтровывали, промывали холодным метиловым спиртом (2 раза по 10 мл), 10 мл диэтилового эфира, сушили на воздухе в течение суток при комнатной температуре. Получили 1.45 г (87%) белого кристаллического вещества. Т. пл. 240–242°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц): 4.39 (с, 2H, CH₂), 7.50 (т, 1H, *J* 8, H⁶), 7.54 (уш. с, 4H, NH), 7.65 (д, 1H, *J* 8, H⁸), 7.78 (т, 1H, *J* 8, H⁷), 8.12 (д, 1H, *J* 8, H⁵), 8.22 (с, 1H, H²). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 49.50, 121.95, 126.32, 127.05, 127.27, 134.37, 148.31, 149.29, 158.95, 160.59, 171.65.

Остальные соединения получали аналогичным образом.

***N*-[2-[2-Метил-4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (III).** Белое кристаллическое вещество, выход 80%. Т. пл. 262–264°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц): 2.46 (с, 3H, CH₃), 4.69 (с, 2H, CH₂), 6.80 (уш. с, 4H, NH), 7.45 (т, 1H, *J* 8, H⁶), 7.58 (д, 1H, *J* 8, H⁸), 7.76 (т, 1H, *J* 8, H⁷), 8.07 (д, 1H, *J* 8, H⁵). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 26.23, 52.62, 123.22, 129.44, 129.58, 129.84, 137.58, 150.60, 159.02, 164.51, 165.83, 180.77.

***N*-[2-[6-Метил-4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (IX).** Белое кристаллическое вещество, выход 81%. Т. пл. 267–270°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц): 2.44 (с, 3H, CH₃), 4.35 (с, 2H, CH₂), 7.55 (д, 1H, *J* 8, H⁸), 7.61 (д, 1H, *J* 8, H⁷), 7.62 (уш. с, 4H, NH), 7.92 (с, 1H, H⁵), 8.16 (с, 1H, H²). Спектр ¹³C-ЯМР (δ, м.д.): 21.16, 49.40, 121.87, 125.64, 127.20, 135.49, 136.53, 146.49, 148.62, 159.14, 160.41, 171.48.

***N*-[2-[6-Хлор-4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (VII).** Белое кристаллическое веще-

ство, выход 76%. Т. пл. 244–247°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.; J , Гц): 4.36 (с, 2H, CH_2), 7.56 (уш. с, 4H, NH), 7.67 (д, 1H, J 8, H^8), 7.80 (д, 1H, J 8, H^7), 8.04 (с, 1H, H^5), 8.26 (с, 1H, H^2). Спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.): 52.61, 126.30, 128.33, 132.71, 134.29, 137.44, 150.23, 152.93, 162.16, 162.53, 174.33.

***N*-[2-[6-Бром-4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (IV).** Белое кристаллическое вещество, выход 89%. Т. пл. 242–244°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.; J , Гц): 4.37 (с, 2H, CH_2), 7.47 (уш. с, 4H, NH), 7.60 (д, 1H, J 8, H^8), 7.90 (д, 1H, J 8, H^7), 8.17 (с, 1H, H^2), 8.28 (с, 1H, H^5). Спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.): 52.66, 122.47, 126.60, 131.44, 132.83, 140.17, 150.44, 152.98, 162.08, 162.41, 174.31.

***N*-[2-[2-Метил-6-бром-4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (VIII).** Белое кристаллическое вещество, выход 83%. Т. пл. 281–284°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.; J , Гц): 2.46 (с, 3H, CH_3), 4.47 (с, 2H, CH_2), 7.51 (д, 1H, J 8, H^8), 7.60 (уш. с, 4H, NH), 7.88 (д, 1H, J 8, H^7), 8.13 (с, 1H, H^5). Спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.): 23.24, 47.76, 118.44, 121.86, 128.56, 129.20, 137.14, 146.53, 156.98, 159.13, 160.22, 170.91.

***N*-[2-[6,8-Дибром-4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]ацетил]гуанидин (VI).** Светло-желтое кристаллическое вещество, выход 81%. Т. пл. 313–316°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.; J , Гц): 4.36 (с, 2H, CH_2), 7.58 (уш. с, 4H, NH), 8.18 (с, 1H, H^7), 8.30 (с, 1H, H^5), 8.38 (с, 1H, H^2). Спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.): 52.80, 122.24, 126.55, 127.46, 131.41, 142.56, 148.20, 153.87, 161.91, 162.21, 173.70.

***N*-[2-[4-Оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]гуанидин (II).** Белое кристаллическое вещество, выход 78%. Т. пл. 268–270°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.; J , Гц): 1.57 (д, 3H, J 8, CH_3), 5.17 (кв, 1H, J 8, CH), 7.50 (т, 1H, J 8, H^6), 7.61 (уш. с, 4H, NH), 7.66 (д, 1H, J 8, H^8), 7.80 (т, 1H, J 8, H^7), 8.13 (д, 1H, J 8, H^5), 8.29 (с, 1H, H^2). Спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.): 21.30, 56.91, 124.82, 129.56, 129.94, 130.29, 137.36, 150.74, 151.00, 162.14, 163.36, 177.08.

***N*-[2-[6-Бром-4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]гуанидин (V).** Белое кристаллическое вещество, выход 84%. Т. пл. 264–267°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.; J , Гц): 1.56 (д, 3H, J 8, CH_3), 5.13 (кв, 1H, J 8, CH), 7.58 (уш. с, 4H, NH), 7.60 (д, 1H, J 8, H^8), 7.92 (д, 1H, J 8, H^7), 8.20 (с, 1H, H^5), 8.23 (с, 1H, H^2). Спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м.д.): 21.24, 57.28, 122.33, 126.38, 131.65, 132.78, 140.23, 150.02, 151.40, 162.20, 162.28, 176.56.

Фармакологические свойства синтезированных соединений. *NHE*-ингибирующая активность *in vitro*. Влияние соединений на активность Na^+/H^+ -обменника изоформы 1 (*NHE*-1) изучали *in vitro* по методу D. Roskopf et al. (1991) [13] и K. Kusumoto (2002) [14] с модификациями [11] с использовани-

ем лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 (ООО НПФ “БИОЛА”, Россия; программное обеспечение AGGR 2.00, Россия). Для эксперимента были выбраны тромбоциты кролика (исследования выполнены на пяти кроликах-самцах весом 3.0–4.0 кг (Филиал “Электрогорский” ФГБУН НЦБМТ ФМБА, ветеринарное свидетельство 250 № 36969458 от 08.09.2015), поскольку на них активно экспрессирует *NHE*-1. В основу метода положены изменения светопропускания при изменении формы тромбоцита в условиях, имитирующих ишемию. Светопропускание ПБогТ принимали за 0%, раствора Кребса – за 100%.

Из краевой вены уха кролика забирали кровь в пробирки с 3.8%-ным раствором цитрата натрия (в соотношении 1 : 10). Кровь центрифугировали в течение 12 мин (Multi Centrifuge CM 6M, Латвия) при 1000 об/мин. Забирали надосадочную жидкость – плазму, богатую тромбоцитами (ПБогТ).

Контрольные измерения изменений светопропускания проводили без соединений. В условиях отсутствия активности *NHE*-1 (рН 7.4) к 200 мкл ПБогТ добавляли 600 мкл раствора Кребса (в мМ: NaCl – 120, KCl – 4.8, KH_2PO_4 – 1.2, MgSO_4 – 2.5, NaHCO_3 – 25, CaCl_2 – 2.6, глюкоза – 5.4; рН 7.4, 37°C). Для активации *NHE*-1 снижали рН: к 200 мкл ПБогТ добавляли 600 мкл буферного раствора, содержащего натрия пропионат (в мМ: натрия пропионат – 135, *HEPES* – 20, CaCl_2 – 1, MgCl_2 – 1, глюкоза – 10; рН 6.7, 37°C).

В опытных измерениях изменений светопропускания в кювету к 200 мкл ПБогТ предварительно добавляли изучаемые соединения или препарат сравнения в концентрации 1 нМ и объеме 10 мкл, предварительно инкубировали 5 мин до добавления раствора пропионатного буфера. Все пробы инкубировали при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки (800 об/мин, 37°C). В качестве препарата сравнения использовали селективный ингибитор *NHE*-1 зонипорид (Sigma, США).

Дельта % ингибирования рассчитывали по формуле:

$$\Delta\% = (\text{Б} \times 100) / \text{А} - 100,$$

где А – разница светопропускания между контрольными замерами с пропионатным буфером и раствором Кребса; Б – разница светопропускания между замерами с пропионатным буфером в условиях добавления соединений в пробу (опыт) и без них (контроль).

Статистические расчеты проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США).

Офтальмогипотензивные свойства. Изучение влияние на внутриглазное давление проводили на беспородных интактных крысах обоих полов мас-

сой 220–400 г, возрастом 2 месяца (питомник “Рапполово”, Ленинградская область). Все животные были разделены на опытные группы и группы препаратов сравнения по шесть животных в каждой. В 9:00 утра у животных всех групп измеряли исходное ВГД в обоих глазах. Для определения ВГД использовали ветеринарный тонометр ICARE TonoVet (Финляндия) для ранней диагностики глаукомы в ветеринарии [6, 17]. После измерения животным опытных групп проводили инстилляцию 0.2%-ных водных растворов изучаемых соединений в объеме 50 мкл в правый глаз (тестовый). Животным групп препаратов сравнения в тестовый глаз инстиллировали тимолол (лекарственное средство, снижающее ВГД, применяемое в клинической практике; Тимолол-СОЛОфарм 0.5%, Гротекс, Россия) и 0.2%-ный раствор зонипорида (стандартный ингибитор ННЭ; Sigma, США). Левый глаз (контрольный, коллатеральный) служил для определения возможного резорбтивного эффекта. ВГД в тестовом и коллатеральном глазах измеряли через 30, 60, 120, 180 и 240 мин.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office и Graph Pad Prizm (GraphPad Software, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезировано девять новых пиримидиновых производных хиназолина, изучено их влияние на ингибирование Na^+/H^+ -обменника и внутриглазное давление (ВГД) крыс в сравнении с зонипоридом (ингибитор ННЭ) и тимололом (препарат для снижения ВГД, используемый в клинической практике). Показано, что соединение (IV) — бромированное в положении С6 производное 4-оксохиназолинацетилгуанидина — выступает ингибитором ННЭ-1 и обладает высокой офтальмогипотензивной активностью у крыс, превосходящей препарат сравнения тимолол, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения его возможных антиглаукомных свойств, а также детализации механизма действия в отношении внутриглазного давления.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследования выполнены в рамках проекта Российского научного фонда от 25 марта 2022 года № 22-15-20025 (“Синтез и исследование эффективности биоизостеров мелатонина”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальную работу проводили в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и правилами лабораторной

практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации в соответствии с ГОСТ Р 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики” и приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”, с соблюдением директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балалин С.В., Фокин В.П. // Клиническая офтальмология. 2019. Т. 19. С. 43–48.
<https://doi.org/10.21689/2311-7729-2019-19-1-43-48>
2. Avila M.Y., Seidler R.W., Stone R.A., Civan M.M. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002. V. 43. P. 1897–1902.
3. Mandal A., Shahidullah M., Delamere N.A., Terán M.A. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2009. V. 297. P. C111–C120.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00539.2008>
4. Lupachyk S., Stavniichuk R., Komissarenko J., Drel V., Obrosova A., El-Remessy B., Pacher P., Obrosova I. // Int. J. Mol. Med. 2012. V. 29. P. 989–998.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.933>
5. Fidzinski P., Salvador-Silva M., Choritz L., Geibel J., Coca-Prados M. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2004. V. 287. P. C655–C663.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00552.2003>
6. Spasov A., Ozerov A., Vassiliev P., Kosolapov V., Gurova N., Kucheryavenko A., Naumenko L., Babkov D., Sirotenko V., Taran A., Litvinov R., Borisov A., Klochkov V., Merezhkina D., Miroshnikov M., Uskov G., Ovsyankina N. // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03722-w>
7. Снасов А.А., Гурова Н.А., Тимофеева А.С., Сорокин С.М. // Эксперим. и клинич. фармакология. 2014. Т. 77. № 6. С. 13–17.
8. Pedersen S.F., Counillon L. // Physiol. Rev. 2019. V. 99. P. 2015–2113.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2018>
9. Gubin D., Neroev V., Malishevskaya T., Cornelissen G., Astakhov S., Kolomeichuk S., Yuzhakova N., Kabitskaya Y., Weinert D. // J. Pineal Res. 2021. V. 70. P. e12730.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12730>
10. Озеров А.А., Новиков М.С., Глухова Е.Г. // Усп. соврем. естествознания. 2016. № 2. С. 53–56.
11. Гурова Н.А., Снасов А.А., Питерсен А.С. // Вестник Волгоград. гос. мед. ун-та. 2011. № 2. С. 70–72.
12. Снасов А.А., Гурова Н.А., Харитонов М.В. // Эксперим. и клинич. фармакология. 2013. Т. 76. № 1. С. 43–48.
13. Roskopf D., Morgenstern E., Scholz W., Osswald U., Siffert W. // J. Hypertens. 1991. V. 9. № 3. P. 231–238.

14. Kusumoto K., Igata H., Abe A., Ikeda S., Tsuboi A., Ima-miya E., Fukumoto S., Shiraishi M., Watanabe T. // *Br. J. Pharmacol.* 2002. V. 135. P. 1995–2003.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704647>
15. Солодунова Е.А., Новиков М.С., Озеров А.А. // *Вол-гоград. научно-мед. журн.* 2015. № 3. С. 36–38.
16. Солодунова Г.Н., Волкова А.О., Коршенинникова А.С., Кучеренко А.Р., Скороход Е.Д., Толкачева В.И., Тур-ченкова К.В., Турченкова Л.В. // *Волгоград. научно-мед. журн.* 2018. № 2. С. 20–22.
17. Marcus A.J., Iezhitsa I., Agarwal R., Vassiliev P., Spasov A., Zhukovskaya O., Anisimova V., Ismail N.M. // *Data Brief.* 2018. V. 18. P. 523–554.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.019>

Effect of Guanidine Derivatives of Quinazoline on Na^+/H^+ -Exchanger and Intraocular Pressure

A. S. Taran*, **, #, L. V. Naumenko*, Ju. A. Govorova*, N. A. Gurova*, A. A. Spasov*, **, A. A. Ozerov*, **, and D. V. Merezhkina*, #

Phone: +7 (996) 511-05-08; e-mail: taran-a.s@yandex.ru

*Volgograd State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

**Volgograd Medical Scientific Center, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

Based on the data of the role of Na^+/H^+ -exchanger (NHE) in the modulation of intraocular pressure, which is the main factor in the development of glaucoma, and previously conducted studies by various authors proving the presence of inhibitory NHE-1 activity in quinazoline derivatives, nine new compounds belonging to this class were synthesized. The effect of the obtained quinazoline derivatives on the inhibition of Na^+/H^+ -exchanger and their on intraocular pressure (IOP) in comparison with zoniporide (NHE inhibitor) and timolol (a drug for lowering IOP used in clinical practice) was studied. Among the compounds studied *in vitro*, all quinazoline derivatives at a concentration of 1 nM inhibited the activity of NHE-1, the most active compound was a derivative of quinazoline acetylguanidine. However, not all compounds showed IOP-reducing activity *in vivo* in rats. So the most active of the quinazoline derivatives are 4-oxoquinazoline acetylguanidine, its brominated derivative at position C6 and quinazoline propionylguanidine. The structure–activity analysis showed that the presence of the Br atom at the C6 position of the 4-oxoquinazoline acetylguanidine derivative leads to a maximum decrease in IOP during instillation of the solution of the compound.

Keywords: Na^+/H^+ -exchanger (NHE), intraocular pressure (IOP), glaucoma, quinazoline, melatonin bioisosters



УДК 577.115:547.233.3

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИОНИЗИРУЕМОГО ЛИПИДА ALC-0315 – КЛЮЧЕВОГО КОМПОНЕНТА ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ мРНК-ВАКЦИНЫ

© 2023 г. И. А. Болдырев*, В. П. Шендриков*, **, А. Г. Вострова*, Е. Л. Водовозова*, #

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

**Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,
Россия, 125047 Москва, Миусская пл., 9

Поступила в редакцию 06.09.2022 г.

После доработки 11.09.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Ионизируемый липид ALC-0315 – ((4-гидроксibuтил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканонат) – входит в состав липидной матрицы мРНК-вакцины для профилактики заражения вирусом SARS-CoV-2 производства фирмы Pfizer/BioNTech. Этот липид обеспечивает эффективную сборку вакцинной конструкции, защиту мРНК от преждевременной деградации, а после эндоцитоза способствует выходу нуклеиновой кислоты в цитоплазму для дальнейшего процессинга. В данной работе предложен упрощенный и экономичный способ получения липида ALC-0315, который может быть использован при производстве мРНК-вакцин.

Ключевые слова: ионизируемый липид, ALC-0315, синтез, липидные наночастицы, мРНК

DOI: 10.31857/S0132342323020069, **EDN:** GHQWWK

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия коронавируса SARS-CoV-2, охватившая мир в конце 2019 г., способствовала интенсивной разработке, стремительной коммерциализации и внедрению в клиническую практику высокоэффективных профилактических вакцин на основе липидных наночастиц (ЛНЧ) и мРНК полноразмерного белка шипа вируса (S-белка) производства фирм Moderna [1, 2] и Pfizer/BioNTech [3]. Эти вакцинные конструкции представляют собой супрамолекулярные системы – наночастицы, построенные из множества молекул липидов и молекул(ы) мРНК (например, см. обзоры [4, 5]). Структурно-функциональная роль молекул липидов заключается в обеспечении компактизации длинноцепочечных молекул нуклеиновой кислоты, ее защите от деградации под действием внеклеточных ферментов, обеспечении транспорта наночастицы в клетку за счет эндоцитоза (фагоцитоза или пиноцитоза) и последующего выхода мРНК из эндосомы (фагосомы) в цитоплазму для осуществления трансляции и экспрессии белка с иммуногенными эпитопами. Предпо-

ложительно, выход мРНК в цитоплазму осуществляется благодаря переходу липидов ЛНЧ в условиях закисления среды в эндосомах в катионную форму, что способствует их контакту с анионными липидами периплазматического монослоя мембраны эндосом и дестабилизации мембраны за счет формирования небислойных липидных структур (гексагональной фазы) [6]. В связи с разнообразием функций, липидная платформа ЛНЧ с мРНК должна включать несколько классов липидов. Ключевой компонент – ионизируемые липиды, которые обеспечивают как компактизацию мРНК при формировании ЛНЧ, так и выход мРНК в цитоплазму. Структуры ионизируемых липидов в вакцинах обоих производителей очень близки, схемы их синтеза описаны в соответствующих патентах [7–9].

Коммерческий успех мРНК-вакцин на основе ионизируемых липидов привел к взрывному росту интереса к разработкам в данной области и, как следствие, к поиску упрощенных способов синтеза доказавших свою эффективность липидов, в частности липида ALC-0315 – ((4-гидроксibuтил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоната). На сегодня известны два способа получения этого липида, исходя из 2-гексилдекановой кислоты (рис. 1а, 1б). Предлагаемый в данной работе альтернативный вариант представлен на рис. 1в.

Сокращения: ЛНЧ – липидные наночастицы; ALC-0315 – ((4-гидроксibuтил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканонат).

Автор для связи (тел.: +7 (495) 330-66-10; эл. почта: elvod@lipids.ibch.ru).

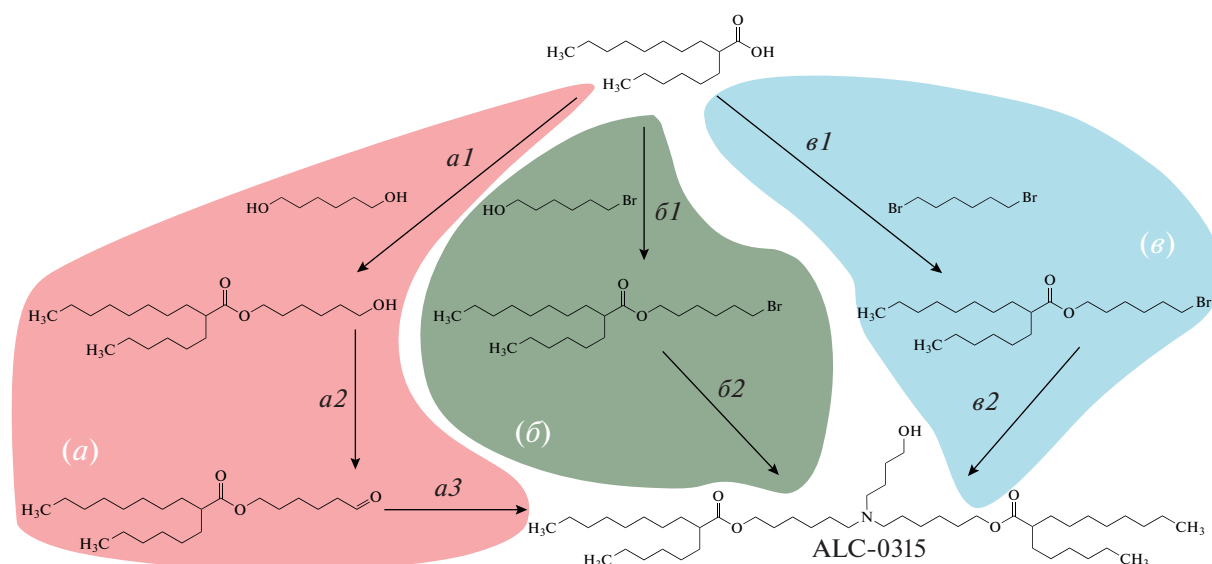


Рис. 1. Пути синтеза липида ALC-0315.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый способ синтеза ALC-0315 (рис. 1а) запатентован [8, 9]. Стадия *a1* — ацилирование избытка гександиола в стандартных условиях этерификации по Штеглиху [10] (конденсация с дигексилкарбодиимидом в присутствии катализатора 4-диметиламинопиридина). Продукт реакции используют далее без очистки. Стадия *a2* — окисление пиридинхлорхроматом; продукт экстрагируют гексаном или петролейным эфиром, выделяют хроматографией на колонке с силикагелем в системе гексан—хлористый метилен. Заключительная стадия *a3* — восстановительное аминирование. Ключевой реагент для этой реакции — натрия триацетоксиборгидрид, можно использовать коммерческий реагент либо получить его *in situ* реакцией натрия боргидрида с ледяной уксусной кислотой в бензоле или в диметилацетамиде [11]. Целевой продукт ALC-0315 выделяют хроматографией на колонке с силикагелем в градиенте метанола в хлористом метилене. Описанный путь синтеза обладает двумя недостатками: 1) последовательно используются стадии окисления и восстановления конечного атома углерода (стадии *a2* и *a3*), в результате которых степень окисления углерода остается такой, как и была исходно (+1), что свидетельствует о возможности замены стадии окисления и восстановления на стадию конденсации; 2) в ходе первой стадии (стадия *a1*) — этерификации по Штеглиху — появляется побочный продукт, производное мочевины, который усложняет очистку конечного продукта.

Альтернативный путь синтеза (рис. 1б) был недавно предложен в патенте [12]. В данной схеме проблема окисления—восстановления была ре-

шена за счет использования бромгексанола вместо гександиола. Это позволило уменьшить количество стадий, однако этерификация в присутствии водоотнимающего агента осталась.

Мы предлагаем дальнейшее усовершенствование схемы получения ALC-0315 (рис. 1в) за счет использования на первой стадии дибромгексана. Простота очистки и возможность рецикла дибромгексана, наряду с использованием K_2CO_3 в качестве конденсирующего реагента вместо более дорогостоящих и опасных для организма карбодиимидных производных, делают такой путь синтеза экономически привлекательным.

Синтез липида ALC-0315 проведен нами в две стадии (рис. 1в). 2-Гексилдекановую кислоту вводили в реакцию с четырехкратным избытком 1,6-дибромгексана в ДМФА в присутствии поташа. Через 3 сут перемешивания реакционной смеси при комнатной температуре продукт конденсации выделяли хроматографией на силикагеле с выходом 85%. При этом регенерация дибромгексана составила 52%. Целевой продукт ALC-0315 получали конденсацией 2-гексилдекановой кислоты 6-бромгексильного эфира с 4-аминобутанолом в тех же мягких условиях, что и при проведении предыдущей стадии. При всего лишь 10%-ном избытке 6-бромгексил-2-гексилдеканата по стехиометрическому соотношению реагентов выход целевого продукта после выделения хроматографией на силикагеле составил 62%. Кроме того, выделяли смесь целевого продукта с продуктом моноалкилирования, которую подмешивали к 6-бромгексил-2-гексилдеканату при последующих повторных загрузках синтеза. С учетом рецикла и регенерации колонки с силикагелем (последовательная промывка изопропанолом и

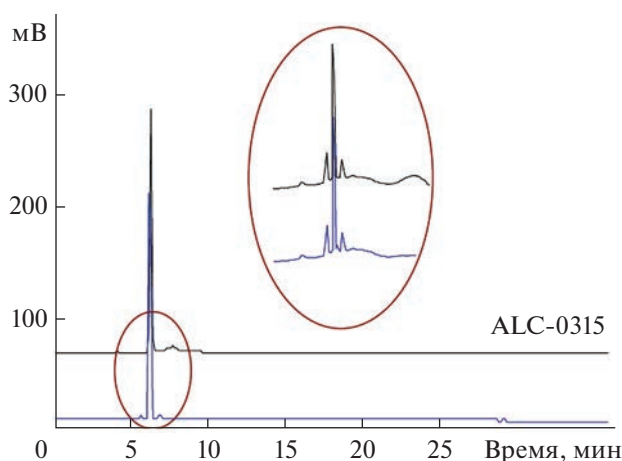


Рис. 2. Хроматограммы синтезированного ионизируемого липида (синяя линия) и стандарта ALC-0315 (черная линия). Условия проведения ВЭЖХ приведены в “Эксперим. части”.

хлороформом) выход целевого продукта достигал 80%. Структура полученного целевого соединения подтверждена спектром ^1H -ЯМР.

Чистоту продукта контролировали ВЭЖХ. Хроматограммы свидетельствуют о более высоком уровне чистоты синтезированного целевого соединения по сравнению с коммерческим препаратом ALC-0315 (рис. 2).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали декановую кислоту, гексилбромид, 1,6-дибромгексан, 4-аминобутанол (Реахим, Россия); бутиллитий (Acros Organics, США); диизопропиламин, 4-диметиламинопиридин (Merck, ФРГ); сульфат натрия, гексан, этилацетат, тетрагидрофуран, хлороформ, хлористый метилен, метанол, ледяную уксусную кислоту (ООО ТД “ХИММЕД”, Россия). Очистку растворителей проводили по стандартным методикам. Растворы упаривали на роторном испарителе (Heidolph, ФРГ). Высушивание в вакууме масляного насоса проводили на лиофильной сушке Иней-4 (Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино, Россия).

2-Гексилдекановую кислоту получали, как описано в работе Ramishetti et al. [13]. ТСХ выполняли на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия); для обнаружения соединений опрыскивали пластинки раствором Родамина-6G в этаноле (0.16 мМ), при просматривании под УФ-лампой проявлялись оранжевые пятна на розовом фоне. Для колоночной хроматографии использовали силикагель КСКГ 0.063–0.2 мм (ООО “Хром-Лаб”, Россия). Газовую хроматографию выполняли на газовом хроматографе Кристаллюкс

(ООО “Метахром”, Россия), капиллярная колонка Zebron-ZB-1 (Phenomenex, США). ВЭЖХ проводили с использованием хроматографической системы JETchrom (ПортЛаб, Россия), состоящей из двух насосов и динамического смесителя, инжектора Rheodyne 7125 (IDEX, США) и детектора светорассеяния Sedex-LC LT-ELSD (Sedere, Франция). Сбор и обработку хроматографических данных осуществляли при помощи программы МультиХром 3.4 (ООО “Амперсент”, Россия). ^1H -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Avance 700 (Bruker, США) с рабочей частотой 700 МГц при постоянной температуре образца 303 К. Растворитель — CDCl_3 . Химические сдвиги в спектрах ЯМР приведены в миллионных долях (м.д.), в качестве внутреннего стандарта использовали остаточные сигналы протонов растворителя (7.27 м.д.).

2-Гексилдекановой кислоты 6-бромгексилловый эфир. В круглодонной колбе на 50 мл смешивали 9.74 г (4 экв., 39.9 ммоль) 1,6-дибромгексана, 2.56 г (1 экв., 9.98 ммоль) 2-гексилдекановой кислоты, 20 мл сухого ДМФА. Добавляли 2.05 г K_2CO_3 (х.ч.; предварительно поташ растирали в ступке и просушивали при 100°C в течение 30 мин). Перемешивали в течение 72 ч, наблюдали образование бесцветного мелкодисперсного осадка КВг. Ход реакции контролировали ТСХ в системе петролейный эфир—этилацетат—уксусная кислота, 39 : 1 : 0.05. R_f 1,6-дибромгексана, целевого соединения, диэфира гексана и 2-гексилдекановой кислоты 0.98, 0.59, 0.38 и 0.11 соответственно. В реакционную смесь добавляли 200 мл воды, тщательно перемешивали и экстрагировали этилацетатом (3×100 мл). Объединенные экстракты промывали водой, сушили над Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в ступенчатом градиенте: в петролейном эфире элюировали исходный дибромгексан, в системе петролейный эфир—этилацетат (3 : 1) выделяли продукт. Выход 3.58 г (85%), бесцветная прозрачная жидкость. Регенерировали 5.08 г дибромгексана.

Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.; КССВ — J , Гц): 4.15 (т, J 6.7, 2H), 3.47 (т, J 6.8, 2H), 2.42–2.35 (уш. м, 1H), 1.91 (квинтет, J 7.0, 2H), 1.71 (квинтет, J 7.0, 2H), 1.69–1.61 (м, 2H), 1.58–1.43 (м, 6H), 1.40–1.27 (уш. м, 20H), 0.95 (два перекрывающихся т, J 7.2, 6H).

4-Гидроксibuтил-бис-(6-(2-гексилдеканоат)гексил)амин (систематическое название [(4-гидроксibuтил)азандиил]ди(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканоат)). В круглодонной колбе на 50 мл смешивали 3 г (7.15 ммоль) 6-бромгексил-2-гексилдеканоата, 0.286 г (3.21 ммоль) 4-бутаноламина,

1 г K_2CO_3 (приготовлен, как описано выше) и 20 мл сухого ДМФА. Перемешивали в течение 72 ч. Ход реакции контролировали ТСХ в системе хлороформ–метанол–триэтиламин, 95 : 5 : 0.1. R_f целевого продукта и продукта моноалкилирования 0.35 и 0.1 соответственно. Реакционную смесь обрабатывали, как описано выше для 6-бромгексил-2-гексилдеканоата. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе хлороформ–метанол, 97 : 3. Выход чистого целевого продукта составил 1.54 г (62%). В следующей фракции собирали смесь продуктов моно- и диалкилирования 4-бутаноламина (1.6 г), которую использовали в повторном синтезе.

ВЭЖХ целевого продукта и стандарта ALC-0315 (BroadPharm, США) выполняли на колонке C18 Gravity, 150 × 4.6 мм, 5 мкм (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, ФРГ) в градиенте растворителей: элюент А – 0.1%-ная ТФУ в H_2O , элюент В – метанол; скорость потока 1.2 мл/мин.

Спектр 1H -ЯМР ($CDCl_3$, δ , м.д.; КССВ – J, Гц): 4.12 (т, J 6.7, 4H), 3.62 (уш. т, J 5.5, 2H), 2.53–2.47 (уш. м, 4H), 2.40–2.34 (м, 2H), 1.75–1.60 (м, 12H), 1.59–1.52 (м, 4H), 1.52–1.41 (м, 10H), 1.39–1.27 (уш. м, 46H), 0.94 (два перекрывающихся т, J 7.2, 12H).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый способ получения ионизируемого липида ALC-0315, отличающийся простотой и экономичностью использования реагентов. С учетом роста интереса к мРНК-вакцинам на основе липидных наночастиц мы полагаем, что этот способ может быть востребован в их производстве.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Соглашения № 075-15-2021-1049 с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Roupheal N.,

Creech C.B., McGettigan J., Khetan S., Segall N., Solis J., Brosz A., Fierro C., Schwartz H., Neuzil K., Corey L., Gilbert P., Janes H., Follmann D., Marovich M., M.D., Mascola J., Polakowski L., Ledgerwood J., Graham B.S., Bennett H., Pajon R., Knightly C., Leav B., Deng W., Zhou H., Han S., Ivarsson M., Miller J., Zaks T. // N. Engl. J. Med. 2021. V. 384. P. 403–416. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>

2. Anderson E.J., Roupheal N.G., Widge A.T., Jackson L.A., Roberts P.C., Makhene M., Chappell J.D., Denison M.R., Stevens L.J., Puijssers A.J., McDermott A.B., Flach B., Lin B.C., Doria-Rose N.A., O'Dell S., Schmidt S.D., Corbett K.S., Swanson P.A., Padilla M., Neuzil K.M., Bennett H., Leav B., Makowski M., Albert J., Cross K., Edara V.V., Floyd K., Suthar M.S., Martinez D.R., Baric R., Buchanan W., Luke C.J., Phadke V.K., Rostad C.A., Ledgerwood J.E., Graham B.S., Beigel J.H. // N. Engl. J. Med. 2020. V. 383. P. 2427–2438. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028436>
3. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Pérez Marc G., Moreira E.D., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Roychoudhury S., Koury K., Li P., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W., Jr., Hammitt L.L., Türeci Ö., Nell H., Schaefer A., Ünal S., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Jansen K.U., Gruber W.C. // N. Engl. J. Med. 2020. V. 383. P. 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
4. Schoenmaker L., Witzigmann D., Kulkarni J.A., Verbeke R., Kersten G., Jiskoot W., Crommelin D.J.A. // Int. J. Pharm. 2021. V. 601. P. 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
5. Hou X., Zaks T., Langer R., Dong Y. // Nat. Rev. Mater. 2021. V. 6. P. 1078–1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
6. Szoka F.C., Xu Y., Zelphati O. // Adv. Drug Deliv. Rev. 1997. V. 24. P. 291. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00470-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00470-X)
7. Benenato K.E., Kumarasinghe E.S., Cornebise M. // Patent Application US 20170210697 A1, 2017.
8. Ansell S.M., Du X. // Patent US 10166298 B2, 2019.
9. Ansell S.M., Du X. // Int. Application WO 2017075531 A1, 2017.
10. Neises B., Steglich W. // Angew. Chem. Int. Ed. 1978. V. 17. P. 522–524. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>
11. Gribble G.W., Abdel-Magid A.F. // Sodium Triacetoxyborohydride / In: Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780-470842898.rs112.pub2>
12. Yan D., Xueming T. // Patent CN 114249662 A, 2022.
13. Ramishetti S., Hazan-Halevy I., Palakuri R., Chatterjee S., Naidu Gonna S., Dammes N., Freilich I., Kolik Shmuel L., Danino L., Peer D. // Adv. Mater. 2020. V. 32. P. e1906128. <https://doi.org/10.1002/adma.201906128>

A Route to Synthesize Ionizable Lipid ALC-0315, a Key Component of the Lipid Matrix of an mRNA Vaccine

I. A. Boldyrev*, V. P. Shendrikov*, **, A. G. Vostrova*, and E. L. Vodovozova*, #

Phone: +7 (495) 330-66-10; e-mail: elvod@lipids.ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

Ionizable lipid ALC-0315 — ((4-hydroxybutyl)azanediyl)bis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate) — is a part of the lipid matrix of the mRNA vaccine for the prevention of infection with the SARS-CoV-2 virus manufactured by Pfizer/BioNTech. This lipid provides effective assembly of the vaccine particle, protection of mRNA from premature degradation, and after endocytosis, promotes the release of nucleic acid into the cytoplasm for further processing. In this paper, a simplified and economical method for producing ALC-0315 is proposed, which can be used in the production of mRNA vaccines.

Keywords: ionizable lipid, ALC-0315, synthesis, lipid nanoparticles, mRNA