

СОДЕРЖАНИЕ

Том 47, номер 3, 2021

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.

Адресная доставка противоопухолевых препаратов к клеткам мультиформной глиобластомы (обзорная статья)

Т. И. Шлапакова, Е. Е. Тягунова, Р. К. Костин, Д. А. Данилова 299

Биологически активные природные 2'-гидроксисалконы (обзорная статья)

*Г. О. Исмаилова, Н. М. Юлдашев, Х. Н. Акбарходжаева,
М. М. Шертаев, Э. К. Зиямутдинова* 304

Синтетические антимикробные пептиды. III. Влияние катионных групп лизина, аргинина и гистидина на антимикробную активность пептидов с “линейным” типом амфипатичности

Н. В. Амирханов, А. В. Бардашева, Н. В. Тикунова, Д. В. Пышный 315

Матричная сборка ДНК-наноструктур из разветвленных олигонуклеотидов

*А. А. Фокина, Ю. Е. Полетаева, Е. А. Буракова, А. Ю. Бакулина, Т. С. Зацепин,
Е. И. Рябчикова, Д. А. Стеценко* 327

Синтез и анализ свойств иммуногенного фрагмента полипептида NS4A вируса гепатита С

*А. Н. Белявцев, М. В. Мельникова, Н. Г. Шевченко, Г. В. Сапронов, Р. Г. Вахренев,
Н. С. Шастина, Е. Ф. Колесанова, Л. И. Николаева* 341

Триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды: получение и исследование их взаимодействия с клетками и ДНК-связывающими белками

*М. С. Купрюшкин, Т. Д. Жарков, Е. С. Ильина, О. В. Марков, А. С. Кочеткова,
М. М. Ахметова, А. А. Ломзов, Д. В. Пышный, О. И. Лаврик, С. Н. Ходырева* 348

Олигонуклеотидные зонды типа “молекулярный маяк” с флуоресцеиновым бифлуорофором

*В. А. Брылёв, И. Л. Лысенко, Е. А. Кокин, Ю. В. Мартыненко-Макаев,
Д. Ю. Рязанцев, В. В. Шманай, В. А. Коршун* 365

Оценка антимикробной активности пептида СЗf – производного белка СЗ человека

*В. А. Позолотин, Е. С. Умнякова, П. М. Копейкин, А. С. Комлев,
Я. А. Дубровский, И. А. Кренин, О. В. Шамова, М. Н. Берлов* 373

Синтез, антимикробные и противоопухолевые свойства производных 5-тиофен-2-илметилена-2-тиоксотиазолидин-4-она

В. Я. Горшин, В. С. Матийчук 382

Региоселективный синтез, структура и хемосенсибилизирующая противоопухолевая активность циклической гидроксамовой кислоты на основе DL-валина

*И. В. Выстороп, Г. В. Шилов, А. В. Черняк, Е. Н. Климанова, Т. Е. Сашенкова,
С. Г. Клочков, М. Е. Неганова, Ю. Р. Александрова, У. Ю. Алаярова, Д. В. Мищенко* 391

Исследование процессов взаимодействия трипсина с ионообменными
волокнами и хитозаном

*С. М. Панкова, Ф. А. Сакибаев, М. Г. Холявка, Ю. М. Вышкворкина,
А. Н. Лукин, В. Г. Артюхов*

400

ПИСЬМО РЕДАКТОРУ

Лабильность стационарных и времяразрешенных оптических свойств
конформационно фиксированного производного хромофора CFP

А. М. Богданов, Д. А. Горбачев, Э. Р. Зайцева, А. Ю. Смирнов, Н. С. Балеева, М. С. Баранов

413



УДК 616-006.484.04

АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ К КЛЕТКАМ МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ

© 2021 г. Т. И. Шлапакова*, Е. Е. Тягунова*.,#, Р. К. Костин*, Д. А. Данилова**

* Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

** ФГАОУВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ), Россия, 603950 Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

Поступила в редакцию 23.04.2020 г.

После доработки 30.04.2020 г.

Принята к публикации 02.05.2020 г.

В настоящее время распространенность опухолей головного мозга увеличивается, а их клиническая картина отягается все более серьезными осложнениями. По данным Всемирной организации здравоохранения, мультиформная глиобластома (ГБМ) относится к числу наиболее распространенных агрессивных, сложно прогнозируемых опухолей головного мозга, при этом большинство случаев носят спорадический характер и не имеют генетической предрасположенности. Поскольку полного излечения хирургическим путем достичь невозможно, а наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) значительно осложняет проникновение и накопление химиотерапевтических препаратов в клетках глиобластомы, что приводит к неудовлетворительному терапевтическому эффекту, современная медицина требует различных подходов к доставке лекарств в ЦНС. Наибольшую актуальность приобретает векторная доставка противоопухолевых препаратов, а также применение различных препаратов, изменяющих проницаемость ГЭБ для облегчения прохождения противоопухолевых препаратов и их большего специфического накопления в опухолевых клетках. Обратимое кратковременное размыкание плотных соединений в эндотелиальных клетках головного мозга и влияние на работу активных оттоковых транспортных систем, представленных АТФ-связывающими кассетными транспортерами, используются для доставки в мозг лекарств, нацеленных на борьбу с мультиформной ГБМ. Особенно перспективное направление в этой области – разработка препаратов, не нарушающих целостность ГЭБ и не требующих введения дополнительных лекарственных средств для улучшения своего действия и проницаемости. Наночастицы с активной доставкой более эффективны, чем пассивно направленные наночастицы. Препараты, индуцирующие изменение проницаемости ГЭБ для различных наночастиц и других противоопухолевых препаратов, весьма эффективны, но имеют ряд недостатков и могут приводить к развитию осложнений. Поэтому перед применением таких препаратов стоит сначала оценить все риски, контролируемость данного процесса, эффективность действия препаратов-ингибиторов осуществляющихся реакций. Более безопасной и эффективной считается активная направленная доставка препарата, при которой используется прикрепление сайт-специфических лигандов к поверхности наночастиц.

Ключевые слова: глиобластома, плотные соединения, ГЭБ, гематоэнцефалический барьер, EPR-эффект, ABC-транспортеры, векторная доставка лекарств, адресная терапия, наночастицы

DOI: 10.31857/S0132342321020251

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время распространенность опухолей головного мозга увеличивается, а их клиническая картина отягается все более серьезными осложнениями. Мультиформная ГБМ относится к числу наиболее распространенных видов опухо-

лей – по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на ее долю приходится до 52% первичных опухолей мозга и до 20% всех внутричерепных опухолей. Мультиформная ГБМ – одна из наиболее агрессивных, сложно прогнозируемых опухолей мозга, большинство случаев носят спорадический характер и не имеют генетической предрасположенности [1]. К тому же подавляющее большинство противоопухолевых препаратов обладает крайне низкой биодоступностью, в связи с чем к клеткам ГБМ попадает уменьшенная доза препарата по сравнению с введенной.

Сокращения: EPR-эффект – эффект повышенной проницаемости и удержания; TIL – лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (tumor-infiltrating lymphocytes), ГБМ – глиобластома; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер.

Автор для связи: (тел.: +7 (977) 623-15-11; e-mail: katerina.tyagunova@yandex.ru).

Это усложняет разработку новых препаратов, снижает эффективность уже известных лекарственных средств. Поэтому в последнее время становятся все более востребованными препараты с векторной доставкой.

В данной статье мы рассмотрим различные варианты доставки противоопухолевых препаратов к глиобластоме (ГБМ), проанализируем их сильные и слабые стороны.

МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ГЛИОБЛАСТОМ

При изучении особенностей адресной доставки препаратов к клеткам ГБМ и химиотерапевтической индукции изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для лучшего проникновения лекарственных средств были проанализированы опубликованные статьи из баз данных Elsevier, NCBI MedLine, Scopus, Scholar.Google, Embase, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, EMBASE, Global Health, CyberLeninka и RSCI. Для поиска англоязычных статей использовали следующие ключевые слова: “glioblastoma”, “targeted therapy”, “tight junctions”, “TJs”, “BBB”, “blood brain barrier”, “case report”, “targeted drug delivery”, “EPR-effect”, “statistics”, “ABC-transporters”, “chitosan nanoparticles”, “NPs”, “nanoparticles drug”. Для поиска русскоязычных статей были использованы следующие ключевые слова: “глиобластома”, “клинический случай”. Оценку приемлемости англо- и русскоязычных оригинальных источников осуществляли в несколько этапов: просматривали заголовки, аннотации и полнотекстовые статьи, затем осуществляли дополнительный поиск источников, указанных в выбранных статьях. Были исключены статьи, включающие оригинальные исследования на небольших группах пациентов (или подопытных животных), статьи, в которых были приведены предварительные результаты исследований или дублировались результаты предыдущих исследований.

ОСОБЕННОСТИ ВЕКТОРНОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Поскольку в настоящее время опухоли головного мозга весьма распространены, и с каждым годом клиническая картина онкологических заболеваний становится все тяжелее [2], наибольшую актуальность приобретает векторная доставка противоопухолевых препаратов. Преимущества их использования неоспоримы [3]:

1) появляется возможность использовать очень агрессивные препараты с наименьшим вредом для организма, т.к. доза лекарства в разы меньше [4];

2) снижается токсичность терапии [5], следовательно, улучшается переносимость такой тера-

пии [6], поскольку препарат доставляется направленно к опухоли, значительно снижается его негативное воздействие на другие ткани организма;

3) отмечается высокая селективность противоопухолевых препаратов, достигаемая за счет направленного транспорта к клеткам-мишеням с помощью белковых векторов [7, 8].

Данный метод доставки препарата к мишени основан на ковалентном присоединении к препарату белкового вектора, помогающего доставить данный конъюгат в клетку с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза.

В этой обзорной статье мы сконцентрировали внимание на векторной доставке лекарств к клеткам мультиформной ГБМ – одной из наиболее распространенных опухолей головного мозга [9], ненаправленная доставка препаратов к которой значительно затруднена [10, 11], значит, адресная доставка химиопрепаратов могла бы помочь решить ряд проблем.

ВЕКТОРНАЯ ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВ К КЛЕТКАМ ГБМ

Действительно, одна из самых актуальных проблем лечения мультиформных ГБМ – относительно плохая биодоступность и большие дозы используемого препарата [12, 13]. Поэтому наночастицы, обладающие активной или пассивной направленной доставкой, считаются одной из наиболее эффективных систем доставки лекарств [14, 15]. Пассивно направленные препараты доставляются посредством EPR-эффекта – эффекта повышенной проницаемости и удержания, при котором молекулы определенных размеров (обычно липосомы, наночастицы и макромолекулярные препараты) накапливаются в опухолевой ткани больше, чем в нормальных тканях. Таким образом, данный метод учитывает и использует такие особенности опухоли, как высокая плотность сосудов, хорошо развитая сосудистая сеть, неэффективный лимфодренаж, а также уникальные свойства самих наночастиц: их размер и форму, характеристики их поверхности, т.к. они оказывают влияние на EPR-эффект [16, 17].

Однако у пассивного направленного действия есть и существенные недостатки [18]: EPR-эффект зависит от диффузии лекарств, однако лишь немногие препараты могут эффективно диффундировать через клеточные мембраны. Диффузия лекарств в опухолях головного мозга часто нарушается из-за того, что они обладают относительно слабым EPR-эффектом, обусловленным плотным матриксом головного мозга; повышение давления интерстициальной (межклеточной) жидкости в опухоли вследствие неэффективного лимфодренажа приводит к накоплению в опухоли более крупных частиц и диффузии более мелких.

Поэтому при внутривенном введении ~95% наночастиц с пассивной системой адресной доставки неспецифически накапливается в других органах и не достигает опухоли [14, 16].

Есть еще как минимум один нейропротекторный барьер для проникновения таких препаратов к опухолевым клеткам головного мозга – это ГЭБ [17]. В связи с этим пассивно направленные препараты не могут в достаточном количестве достигнуть опухолевых инвазивных клеток, а EPR-эффект оказывается слишком слабым вблизи инфильтрирующих опухолевых клеток [19–21]. К тому же гематоэнцефалический опухолевый барьер тоже предотвращает попадание лекарств в опухолевую массу, особенно при высокой активности TIL-клеток (tumor-infiltrating lymphocytes; лимфоциты, инфильтрующие опухоль), тем самым способствуя устойчивости к химиотерапии и рецидиву заболевания [22, 23].

РАЗЛИЧНЫЕ МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПРЕОДОЛЕНИЕМ ГЭБ

Относительно недавно был разработан новый метод доставки химиопрепаратов к опухолевым клеткам с преодолением ГЭБ. Он заключается в обратимом и кратковременном размыкании плотных соединений в эндотелиальных клетках головного мозга. Стимулы этого процесса могут быть различными: химическими (маннит), биологическими (гистамин и брадикинин), физическими (ультразвук и электромагнитные волны). Принцип их действия, соответственно, тоже отличается [24, 25]. Например, маннит уменьшает объем эндотелиальных клеток головного мозга, обезвоживая их, тем самым изменяя их форму и открывая плотные соединения на несколько часов. А брадикинин действует на β_2 -рецепторы эндотелиальных клеток головного мозга, что приводит к нарушению целостности плотных соединений и, соответственно, увеличению проницаемости ГЭБ для лекарственных средств [15]. К тому же поверхностно активные вещества, полисорбат 80 и додецилсульфат натрия, тоже могут разрушать плотные соединения [14, 15].

Однако применение этого метода ограничено рядом факторов: 1) высокая токсичность; 2) нарушение нейропротекторной функции ГЭБ; 3) нарушение целостности ГЭБ недостаточно для достижения значительного результата у пациентов с мультиформной ГБМ, т.к. лекарствам все еще необходимо преодолевать другие физиологические барьеры (например, паренхиму мозга) для достижения клеток-мишеней [14]; 4) ненаправленность действия [15].

Важную роль в защите ГЭБ от проникновения через него противоопухолевых препаратов игра-

ют активные оттоковые транспортные системы, представленные АТФ-связывающими кассетными транспортерами (ABC-transporters) [26]. Противораковые препараты – это субстраты для эффлюкс-переносчиков, ограничивающих проникновение лекарственных веществ к опухолевым клеткам. Поэтому разрабатываются новые способы увеличения количества препарата, проникающего к клеткам мозга (не нарушая целостности ГЭБ), к которым относятся блокировка оттока и блокировка транспортеров оттока [15].

Однако специфические ингибиторы эффлюкс-переносчиков также имеют ряд недостатков: недостаточная степень ингибирования, неконтролируемая степень ингибирования, повышенная проницаемость ГЭБ после ингибирования, увеличивающая проникновение токсических элементов в мозг. До сих пор в клинических испытаниях ингибиторов эффлюкс-переносчиков не выявлено статистически значимых результатов. Поэтому перед применением нужно учесть требуемый уровень ингибирования и общую безопасность этой терапевтической стратегии, необходимо найти наиболее подходящую комбинацию “лекарственное средство – ингибитор” в соответствии с тканью-мишенью [27, 28].

Для повышения селективности поглощения и накопления применяется активная направленная доставка препарата, при которой используется прикрепление сайт-специфических лигандов к поверхности наночастиц. Аффиные лиганды (антитела, пептиды или аптамеры) связываются на поверхности клеток-мишеней с антигенами или рецепторами, которые сверхэкспрессируются опухолевыми клетками и не экспрессируются здоровыми клетками. Сайт-специфическое связывание лигандов приводит к интернализации наночастиц посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза и тем самым усиливает терапевтические эффекты. Однако основная группа наночастиц разрабатывается без непосредственного изменения характеристик сайта связывания рецептора [12, 14, 17]. Интересно отметить, что при систематическом введении наночастицы обычно образуют слой в виде “короны”. Это обусловлено циркуляцией в биологических жидкостях организма белков, пептидов и других клеточных веществ, которые адсорбируются на поверхности наночастиц, обычно изменяя их первоначальные физико-химические свойства и придавая им новую биологическую идентичность, влияя на поглощение наночастиц клетками, время циркуляции и биодоступность [29, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применяются различные способы доставки химиопрепаратов к клеткам ГБМ. Наночастицы с активной доставкой более эффективны, чем пассивно направленные наночастицы.

Препараты, индуцирующие изменение проницаемости ГЭБ для различных наночастиц и других противоопухолевых препаратов, весьма эффективны, но имеют ряд недостатков и могут приводить к развитию осложнений, потому перед применением данных препаратов стоит сначала оценить все риски, контролируемость данного процесса, эффективность действия препаратов-ингибиторов осуществляющихся реакций. Более безопасной и эффективной считается активная направленная доставка препарата, при которой используется прикрепление сайт-специфических лигандов к поверхности наночастиц.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы Е.Е. Тягунова и Р.К. Костин внесли равноценный вклад в работу, равный вкладу первого автора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P.* // *Acta Neuropathol.* 2007. V. 114. P. 97–109.
2. *Wu W., Zhong D., Zhao Z., Wang W., Li J., Zhang W.* // *World J. Surg. Oncol.* 2017. V. 15. P. 231. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1300-7>
3. *Miranda A., Blanco-Prieto M.J., Sousa J., Pais A., Vitorino C.* // *Int. J. Pharm.* 2017. V. 531. P. 389–410. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.049>
4. *Touat M., Idbah A., Sanson, M., Ligon K.L.* // *Ann. Oncol.* 2017. V. 28. P. 1457–1472. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx106>
5. *Le Rhun E., Preusser M., Roth P., Reardon D.A., van den Bent M., Wen P., Reifemberger G., Weller M.* // *Cancer Treat Rev.* 2019. V. 80. P. 101896. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896>
6. *Deng S., Liu L., Wang D., Tong D., Zhao G.* // *World Neurosurg.* 2018. V. 110. P. 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.11.038>
7. *Shamul J.G., Shah S.R., Kim J., Schiapparelli P., Vazquez-Ramos C.A., Lee B.J., Patel K.K., Shin A., Quinones-Hinojosa A., Green J.J.* // *Int. J. Nanomedicine.* 2019. V. 14. P. 10047–10060. <https://doi.org/10.2147/IJN.S231167>
8. *Goryaynov S.A., Gol'dberg M.F., Golanov A.V., Zolotova S.V., Shishkina L.V., Ryzhova M.V., Pitshelauri D.I., Zhukov V.Yu., Usachev D.Yu., Belyaev A.Yu., Kondrashov A.V., Shurkhay V.A., Potapov A.A.* // *Zh. Vopr. Neurokhir. im. N.N. Burdenko.* 2017. V. 81. P. 5–16. <https://doi.org/10.17116/neiro20178135-16>
9. *Liu Y., Hao S., Yu L., Gao Z.Z.* // *World J. Surg. Oncol.* 2015. V. 13. P. 142. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0558-x>
10. *Moraes F.Y., Lo A., Morgan E.R., Millar B.A., Shultz D.B., Maurice C., Harlos C., Kongkham P., Bernstein M., Zadeh G., Laperriere N., Mason W., Berlin A.* // *Can. J. Neurol. Sci.* 2018. V. 45. P. 199–205. <https://doi.org/10.1017/cjn.2017.278>
11. *Chanchotisation A., Xiong J., Yu J., Chu S.* // *World Neurosurg.* 2019. V. 122. P. 573–576. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.11.113>
12. *Wang K., Kievit F.M., Jeon M., Silber J.R., Ellenbogen R.G., Zhang M.* // *Adv. Healthc. Mater.* 2015. V. 4. P. 2719–2726. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500563>
13. *Whittle J.R., Lickliter J.D., Gan H.K., Scott A.M., Simes J., Solomon B.J., MacDiarmid J.A., Brahmabhatt H., Rosenthal M.A.* // *J. Clin. Neurosci.* 2015. V. 22. P. 1889–1894. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.06.005>
14. *Wu M., Fan Y., Lv S., Xiao B., Ye M., Zhu X.* // *Drug Deliv.* 2016. V. 23. P. 2720–2725.
15. *Zhan C., Li B., Hu L., Wei X., Feng L., Fu W., Lu W.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011. V. 50. P. 5482–5485. <https://doi.org/10.1002/anie.201100875>
16. *Zhang B., Zhang Y., Liao Z., Jiang T., Zhao J., Tuo Y., She X., Shen S., Chen J., Zhang Q., Jiang X., Hu Y., Pang Z.* // *Biomaterials.* 2015. V. 36. P. 98–109.
17. *Zhang H., Zhang W., Zhou Y., Jiang Y., Li S.* // *Transl. Oncol.* 2017. V. 10. P. 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.12.011>
18. *Raucher D., Dragojevic S., Ryu J.* // *Front. Oncol.* 2018. V. 8. P. 624. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00624>
19. *Beauchesne P., Blonski M., Brissart H.* // *In Vivo.* 2011. V. 25. P. 991–993.
20. *Luthra P.M., Lal N.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2016. V. 109. P. 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.049>
21. *Madan J., Pandey R.S., Jain V., Katare O.P., Chandra R., Katyal A.* // *Nanomedicine.* 2013. V. 9. P. 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.10.003>
22. *Zhang L., Habib A.A., Zhao D.* // *Oncotarget.* 2016. V. 7. P. 38693–38706. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9584>
23. *Zou L., Tao Y., Payne G., Do L., Thomas T., Rodriguez J., Dou H.* // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 6564–6578. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14169>
24. *Wen L., Tan Y., Dai S., Zhu Y., Meng T., Yang X., Liu Y., Liu X., Yuan H., Hu F.* // *Drug Deliv.* 2017. V. 24. P. 1843–1855. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1386731>
25. *Chang J., Mancuso M.R., Maier C., Liang X., Yuki K., Yang L., Kwong J.W., Wang J., Rao V., Vallon M., Kossinski C., Zhang J.J., Mah A.T., Xu L., Li L., Gholamin S., Reyes T.F., Li R., Kuhnert F., Han X., Yuan J., Chiou S.H., Bretman A.D., Daly L., Corney D.C., Cheshier S.H., Shortliffe L.D., Wu X., Snyder M., Chan P., Giffard R.G.,*

- Chang H.Y., Andreasson K., Kuo C.J.* // Nat. Med. 2017. V. 23. P. 450–460.
<https://doi.org/10.1038/nm.4309>
26. *Stoyanov G.S., Dzhenkov D., Ghenev P., Iliev B., Enchev Y., Tonchev A.B.* // Med. Oncol. 2018. V. 35. P. 27.
<https://doi.org/10.1007/s12032-018-1083-x>
27. *Beier C.P., Schmid C., Gorlia T., Kleinletzenberger C., Beier D., Grauer O., Steinbrecher A., Hirschmann B., Brawanski A., Dietmaier C., Jauch-Worley T., Kölbl O., Pietsch T., Proescholdt M., Rümmele P., Muigg A., Stockhammer G., Hegi M., Bogdahn U., Hau P.* // BMC Cancer. 2009. V. 9. P. 308.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-308>
28. *Qu J., Zhang L., Chen Z., Mao G., Gao Z., Lai X., Zhu X., Zhu J.* // Drug Deliv. 2016. V. 23. P. 3408–3416.
29. *Litofsky N.S., Mix T.C., Baker S.P., Recht L.D., Smith T.W.* // Surg. Neurol. 1998. V. 50. P. 579–585.
30. *Yabar A., Melendez R., Munoz S., Deneo H., Freire J., Dominguez V., Carrasco-Navarro R.M., Diaz M.E., Velarde-Lopez R.E.* // Mol. Clin. Oncol. 2017 V. 6. P. 503–509.
<https://doi.org/10.3892/mco.2017.1185>

Targeted Antitumor Drug Delivery to Glioblastoma Multiforme Cells

T. I. Shlapakova*, E. E. Tyagunova*^{#,}, R. K. Kostin*, and D. A. Danilova**

[#]Phone: +7 (977) 623-15-11; e-mail: katerina.tyagunova@yandex.ru

* Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

** Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education National Research University of Nizhny Novgorod named after N.I. Lobachevsky, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

Currently, brain tumors are becoming more common and their clinical picture is aggravated by serious complications. According to the statistics of the World Health Organization (WHO) the glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive brain tumor with high invasive capacity, which is difficult to predict, while most cases are sporadic and do not have a genetic predisposition. Since GBM can't be simply eliminated by operation, drug availability to penetrate the blood-brain barrier (BBB) is greatly complicated and the accumulation of chemotherapeutics in GBM is low, the therapeutic effects are poor, there is a strong need in development of various approaches to deliver drugs to CNS. The vector delivery of antitumor drugs is becoming more relevant, as well as various drugs that change the permeability of the BBB to facilitate the passage of antitumor drugs and their greater specific accumulation in tumor cells. The reversible short-term opening of tight junctions in brain endothelial cells and the effect on the functioning of active outflow transport systems represented by ATP-binding cassette transporters have been under serious research focus for the last few years in order to develop the appropriate drug delivery to the brain to treat GBM. A particularly promising direction in this area is the development of drugs that do not violate the integrity of the BBB and do not require the introduction of additional drugs to improve their activity and permeability. Active delivery nanoparticles are more effective than passively directed nanoparticles. Drugs that induce changes in the permeability of the BBB for various nanoparticles and other anticancer drugs are very effective, but they have a number of disadvantages and can cause complications. Therefore, before using these substances, all the risks should be evaluated, the controllability of this process, the effectiveness of the drugs that inhibit ongoing reactions. It is considered safer and more effective to use active targeted drug delivery, which uses the attachment of site-specific ligands to the surface of nanoparticles.

Keywords: glioblastoma, tight junctions, TJs, blood brain barrier, BBB, EPR-effect, ABC-transporters, targeted drug delivery, targeted therapy, nanoparticles



УДК 547.814.5

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРИРОДНЫЕ 2'-ГИДРОКСИХАЛКОНЫ

© 2021 г. Г. О. Исмаилова^{*, #}, Н. М. Юлдашев^{*}, Х. Н. Акбарходжаева^{*},
М. М. Шертаев^{*}, З. К. Зиямутдинова^{*}^{*}Ташкентский педиатрический медицинский институт,
Узбекистан, 100140 Ташкент, ул. Богишамол, 223

Поступила в редакцию 27.05.2020 г.

После доработки 06.10.2020 г.

Принята к публикации 17.10.2020 г.

Приведены современные данные литературы о результатах исследований в области флавоноидов лекарственных растений, данные об особенностях биогенеза, общая характеристика, возможные функции, биологические свойства и аспекты практического применения 2'-гидроксихалконов. Систематизация проведена по наиболее распространенным структурам выделенных 2'-гидроксихалконов и их производных из 59 источников природного сырья.

Ключевые слова: 2'-гидроксихалконы, производные халконов, биогенез, лекарственные растения, биологическая активность

DOI: 10.31857/S0132342321030088

ВВЕДЕНИЕ

Повышенный интерес к изучению флавоноидов, проявляемый учеными и специалистами различных направлений, объясняется важной ролью, которую играют эти соединения в жизнедеятельности растительных и животных организмов, а также их высокой и разноплановой биологической активностью. По сравнению с другими типами флавоноидов, халконам свойствен более широкий диапазон физиологических воздействий на организм.

Халконы – α,β -ненасыщенные кетоны, состоящие из двух ароматических колец (А и В), имеющих различные заместители. Химия халконов изучается уже не одно десятилетие, и интерес к этой области продолжает расти.

Халконы придают желтый цвет некоторым декоративным растениям, таким как георгин, *Coreopsis*, *Cosmos* (Asteraceae) и львиный зев (*Antirrhinum majus*, Scrophulariaceae). Желтая окраска цветков *Dahlia variabilis*, в основном, обусловлена наличием 4'-малонила глюкозидов б'-дезоксихалконов, изоликвиригенина и бутеина (3,4,2',4'-тетрагидроксихалкона). Они содержатся во многих фруктах (цитрусовые, яблоки, помидоры и т.д.), овощах (лук-шалот, ростки фасоли, картофель и т.д.), а также в некоторых съедобных растениях (солодка) из нашего повседневного рациона. Эта группа природных соединений обладает широким спектром биологической активности, совме-

стимой с антиканцерогенной активностью, включая антиоксидантную, противовоспалительную и стимуляцию остановки клеточного цикла и апоптоза [1].

В растениях семейства бобовых чаще всего встречаются 2'-гидроксихалконы. Эти соединения практически лишены токсичности. Сочетание малой токсичности и высокой биологической активности делает 2'-гидроксихалконы перспективными для использования в медицинской практике в качестве препаратов для профилактики и лечения ряда серьезных заболеваний.

Цель работы – обобщить и систематизировать данные литературы для разработки новых подходов в области синтеза новых производных 2'-гидроксихалконов с разнообразным набором функциональных групп как перспективных биологически активных соединений.

БИОГЕНЕЗ ХАЛКОНОВ

Нумерация 2'-гидроксихалконов производится согласно схеме 1.

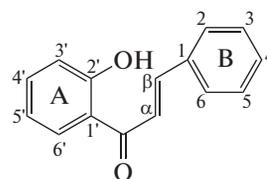
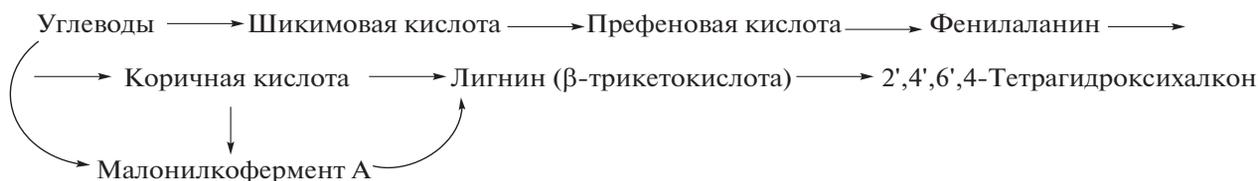


Схема 1. 2'-Гидроксихалкон.

[#] Автор для связи (тел.: +9 (9890) 356-11-47; эл. почта: ismailova.gulzira@mail.ru).

Разнообразие халконов обусловлено, прежде всего, различными заместителями в кольцах А и В. Практически каждый атом этих колец может иметь гидроксильную группу. Кроме того, каждый гидроксил может быть метилирован с образованием метоксильной группы. Халконы могут присутствовать в растениях как в свободном, так и в связанном виде.

Классификация халконов основывается на современных представлениях о биосинтезе фенольных соединений. С помощью меченых атомов ¹⁴С было показано, что важным звеном в биосинтезе халконовых соединений выступает коричная кислота, образующаяся в растениях из фенилаланина. Следующее звено биосинтеза — образование 2'-гидроксихалкона.



Флороглюциновое ядро А образуется по ацетатному механизму — конденсацией трех молекул уксусной кислоты с участием ацетилкофермента А или малонилкофермента А. Звено С₆-С₃ (цикл В) происходит от шикимовой кислоты. Радиоизотопный метод указывает на то, что биогенетический путь образования этой части молекулы протекает через шикимовую и префеновую кислоты с образованием фенилаланина и коричной кислоты, которая присоединяет триацетатное производное (цикл А), образуя халкон (схема 2).

как во флаваноиды, так и в изофлаваноиды. Обработывая различные растения меченым халконом, удается получать флаваноиды различных типов, как показано на схеме 2.

Исследования с мечеными изотопами подтвердили, что в биогенезе различных флаваноидов центральное положение занимают первично образующиеся халконы, из них образуются различные дифенилпропаноиды.

В соответствии с классификацией приведены данные литературы о синтезе важнейших халконов и их распространении в растениях [2]. Флаваноиды и изофлаваноиды, биогенетическими предшественниками которых являются халконы, целесообразно рассматривать в рамках общей классификации лишь с точки зрения биосинтеза. 2'-Гидроксихалконы также являются биогенетическими предшественниками ауроновых соединений [3].



Схема 2. Получение флаваноидов из халкона (биогенез).

При биогенезе предшественниками флаваноидов различных типов с различной степенью окисления выступают халконы, а не флаваноны. Значит, фенилаланин внедряется через халкон

Применение меченых предшественников позволяет выяснить, на каких стадиях биогенеза происходит гидроксирование, метилирование, глюкозилирование и пренилирование природных изофлаваноидов.

Для синтеза флаваноидов халконы обычно получают щелочной конденсацией Кляйзена—Шмидта 2-гидроксиацетофенонов с ароматическими альдегидами в спирте в классическом варианте. Механизм образования халконов в присутствии основного катализатора представлен на схеме 3, в кислотном катализе — на схеме 4.

Таким образом, применение изотопной техники позволяет выяснить, что общим генетическим носителем для флаваноидов и изофлаваноидов является первично образующийся халкон.

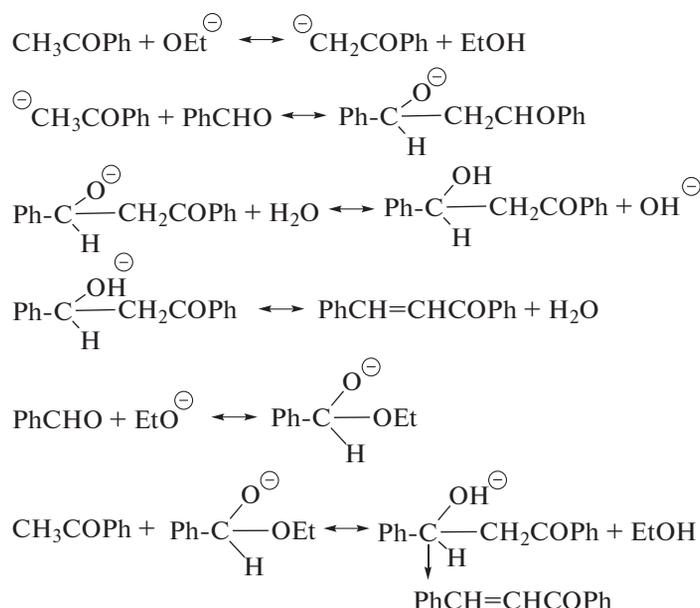


Схема 3. Механизм образования халконов в присутствии основного катализатора.

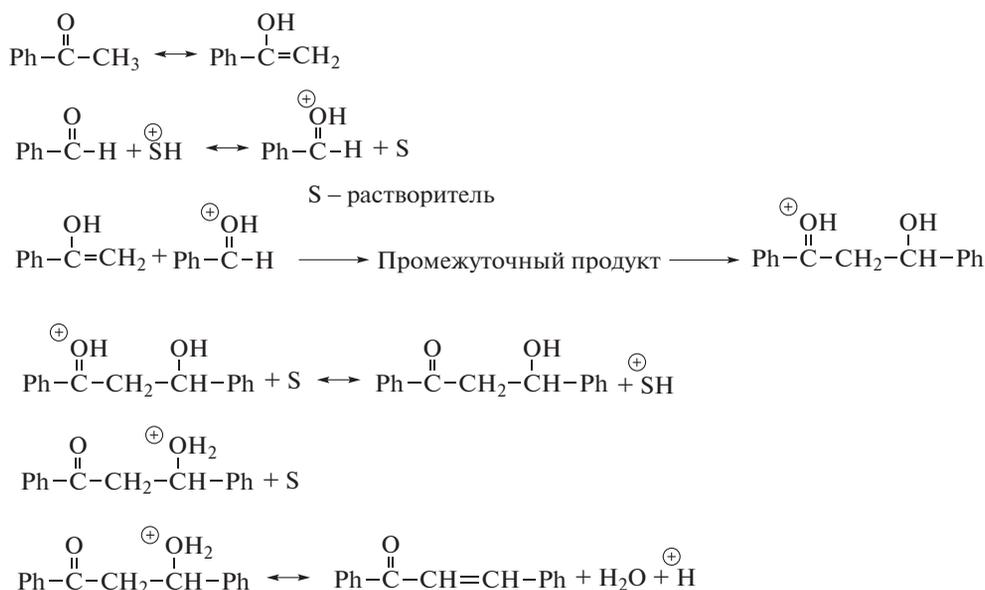


Схема 4. Механизм образования халконов в кислотном катализе.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА 2'-ГИДРОКСИХАЛКОНА

У названия 2'-гидроксихалконов есть следующие синонимы: (2*E*)-1-(2-гидроксифенил)-3-фенилпроп-2-ен-1-он; *O*-гидроксихалкон; бензилиден-(2-гидроксиацетофенон); бензилиден-2'-гидроксиацетофенон; 2-бензал-2'-гидроксиацетофенон; 2-бензилиден-2'-гидроксиацетофенон; 2-гидроксибензалацетофенон.

$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2$; M_r 224; цвет кристаллов ярко-желтый; т. пл. 144–150°C; плотность $1.191 \pm$

$\pm 0.060 \text{ г/см}^3$ (20°C, 760 мм рт. ст.); показатель преломления 1.654; R_f 0.78 (толуол : этилацетат 1 : 1). УФ-спектр (λ -максимум, нм), полученный на приборе СФ-2000 в кислой среде (рН 4) – 330, нейтральной (рН 7) – 248, 320, щелочной (рН 11) – 294, 400. Полосы поглощения длинноволновой части спектра 331–428 нм обусловлены $\pi \rightarrow \pi^*$ электронными переходами в циннамоильной части молекул халконов по схеме 5а. Полосы поглощения в более коротковолновой части спектра (200–300 нм) соответствуют электронным переходам с

участием карбонильной группы (бензоильная часть молекул) по схеме 5б.

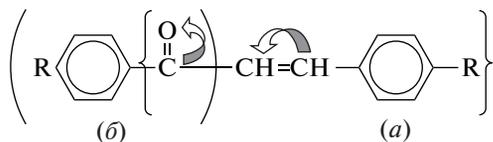


Схема 5. УФ-спектр 2'-гидроксихалкона.

2'-Гидроксихалконы окисляются быстро при температуре 20°C.

МС: тип прибора ИТ/ионная ловушка; энергия столкновения 0; масс-спектр типа MS2; тип прекурсора $[M + H]^+$; прекурсор m/z 225.091; всего пиков 14; m/z вершина пика 210.1; m/z 2-й наивысший 207.1; m/z 3-й наивысший 121.1 (схема б) [4].

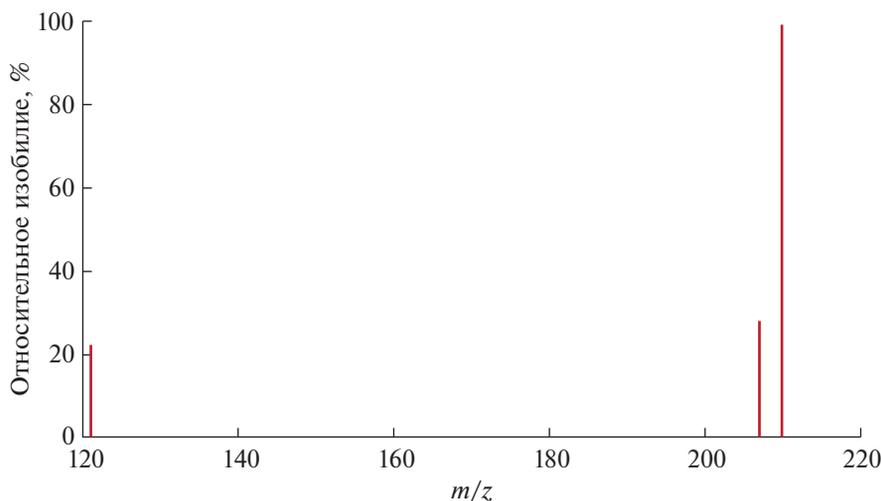


Схема 6. Масс-спектр 2'-гидроксихалкона. Фрагменты МС/МС, отображаются верхние пики.

ПРИРОДНЫЕ 2'-ГИДРОКСИХАЛКОНЫ

За последнее десятилетие из природного сырья (98 источников) нами были изучены новые производные халконов [2]. Большая часть их была обнаружена у растений семейств Myristicaceae, Angiosperm, Mогасеае, Fabaceae и Annonaceae. Данный обзор является дополнительным изучением производных 2'-гидроксихалконов, выявленных в листьях, стеблях, древесине, корнях, цветках и семенах лекарственных растений (табл. 1).

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНЫХ 2'-ГИДРОКСИХАЛКОНОВ

Известно, что многие соединения халконовой структуры выполняют защитную функцию [5], функции дыхательных катализаторов, участвуют в окислительно-восстановительных процессах при дыхании растительных клеток.

Халконы, содержащие в бензольном кольце ацетамидную группу в положении 4, проявляют значительную антиинфицирующую активность [6]. Дигидроксопроизводные халконов с *o*- и *n*-расположением ОН-групп проявляют высокую антиоксидантную активность [7]. Положение двух гидроксильных групп в бензольном кольце В

халкона является важным структурным фактором их антирадикальной активности [8]. Вициально диоксигенированные халконы, а также халконы с цепью пропаноламина в *n*-положении проявляют высокую антигипергликемическую активность [9], хлорсодержащие халконы – антипротозойную [10, 11] и антиплазмодияльную активность [12, 13], а халконы с триазольным, пиррольным и бензотриазольным кольцами – антипаразитарную активность [8]. Присутствие 1,4-диоксанового цикла в структуре приводит к появлению антигепатотоксической активности [14], которая усиливается наличием в положении 2 диоксанового цикла 2-гидроксиметильной группы. Кроме того, халконы проявляют свойства, схожие с инсулином, что говорит о возможности применения халконов в качестве противодиабетических средств. Так, исследования метилгидроксихалкона, выделенного из корицы (*Cinnamotum verum*, Lauraceae), показали, что этот халкон способствует снижению темпов развития диабета и его осложнений [9]. Антилейшманиальная активность [15, 16] характерна для халконов с более гидрофильным характером, т.е. для НО-производных халконов, а также для халконов с нафталиновым и пиридиновым фрагментами в ядре А.

Исследован ряд халконов, содержащих бор, в качестве противораковых средств и выяснены механизм их действия [17–19]. Изучена ингибирующая активность тиразины ряда халконов в отношении реакций образования меланина и их антиоксидантные возможности [20]. Исследована активность производных 2',5'-дигидроксиалконов и обнаружено, что большинство халконов проявляют цитотоксическую активность против различных линий опухолевых клеток [13, 21]. К интересным свойствам халконов относятся инициирование апоптоза раковых клеток [13, 22] и угнетение их митохондриального дыхания.

Помимо указанных видов активности, выявлены ларвицидная [23], иммуномодулирующая [24], антимиотическая активности [11] халконов. Показано также ингибирующее действие на ферменты α -амилазы млекопитающих [25], циклооксигеназы [26], моноаминоксидазы [27], тирозиназы [28, 29] и др. Халконы обладают антибактериальной [30–35], противовирусной [36], антиплазматической [37–39], противогрибковой [40, 41], эстрогенной [13, 42–49], противовоспалительной [41, 50], антиишемической, антиспазматической [50], ингибиторной [48, 51–53], ферментативной [54] и фитохимической активностью [31]. Показано наличие антипролиферативной активности [49, 55] при высоких концентрациях (10, 50 мкМ), а при низких концентрациях (0.01–1.00 мкМ) халконы ускоряли клеточный рост. За проявление противовоспалительной активности халконов ответственна α,β -ненасыщенная карбонильная функциональная группа. Халконы обладают способностью укреплять капилляры и могут использоваться в качестве противовоспалительных средств [56, 57].

Сравнительно недавно показано, что 1,3-дифенил-2-пропен-1-оны с оксатиолоновым циклом помимо цитотоксичности проявляют активность в отношении *Micobacterium tuberculosis* H₃₇Rv [9, 13, 31, 58, 59].

Халконы используются как ингибиторы агрегации тромбоцитов, липоксигеназ и ароматаз [44], как светочувствительные компоненты в фоторезистах, флуоресцентные зонды в медицинской диагностике, органические материалы для нелинейных оптических кристаллов [31]. Показано, что халконы вносят преобладающий вклад в ингибирование ВАСЕ1 со значениями $IC_{50} = 6.03$ мкМ из этилацетатной фракции, значит, обладая низкой молекулярной массой и липофильными фрагментами (пренильные и лавандулильные группы), халконы могут быть сильными профилактическими и терапевтическими кандидатами для лечения болезни Альцгеймера [60].

Обоватахалкон, выделенный из *Tephrosia obovata*, проявил умеренную пищеварительную активность против гольца *Misgurnus anguillicaudatus* [13]. Тефрозон из *Tephrosia purpurea* был оценен на

предмет потенциальных химиопрофилактических свойств при раке с использованием анализа клеточной индукции хинонредуктазы [13]. Тефропурпурин был получен как активное соединение из *Tephrosia purpurea* и использован для анализа индукции активности хинонредуктазы (QR) с использованием культивированных клеток гепатомы мыши Нера 1c1c7 [13].

Изообавахалкон, ксантоангелол и 4-гидроксидеридин, выделенные из наземных частей листа *Angelica keiskei*, проявили сильную ингибирующую активность в отношении мальтазы дрожжей со значениями $IC_{50} = 20, 32, 11.54$ и 33.76 мкМ соответственно [61]. Брусохалкон А и брусохалкон В, выделенные из корней *Broussonetia papyrifera*, оказывали дозозависимое ингибирующее действие на дрожжевую α -глюкозидазу со значениями $IC_{50} = 5.3$ и 11.1 мкМ [61].

2',4,4',2"-Тетрагидрокси-3'-(3"-метилбут-3"-енил)халкон, выделенный из этанольного экстракта листьев *Maclura tinctoria* (L.) Gaud., был оценен против оппортунистических грибковых патогенов, связанных со СПИДом [29]. Ксантоангелол и 4-гидроксидеридин из *Angelica keiskei* проявили антибактериальную (против грамположительных патогенных бактерий) и противовозвращенную активность [29]. Ксантоангелол из коры стебля *Artocarpus kemando* проявляет активность разрыва цепи ДНК [29]. Ксантохумол и пять других родственных веществ из *Humulus lupulus* – 2',4,4',6'-тетрагидрокси-3'-пренилхалкон, 2',4,4',6'-тетрагидрокси-3'-геранилхалкон, дегидроциклоксантохумол, ксантогумол В и изоксантогумол – прошли испытания на их антипролиферативную активность в клетках рака груди человека (MCF-7), рака толстой кишки (HT-29) и рака яичников (A-2780) *in vitro* [29]. Изокордоин и 2',4'-дигидроксиалкон из *Monotes africanus* проявляли ингибирующую активность в отношении ВИЧ [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщение и систематизация литературных данных показали, что ценные фармакологические свойства 2'-гидроксиалконов, обладающих широким спектром биологического действия, позволяют использовать результаты исследований последнего десятилетия для разработки новых подходов к решению задачи повышения биологической активности этого класса соединений. Появляются возможности для разработки подходов к синтезу как природных 2'-гидроксиалконов, так и их модифицированных аналогов с прогнозируемой биологической активностью.

Путем изменения строения молекул халконов можно увеличить абсолютные показатели их активности в биологических тестах. Данные этой статьи о биологической активности и химическом

Таблица 1. Природные производные 2'-гидроксихалконов (данные литературы с 2000 г.)

| № | Источники | Халконы и их производные |
|----|---|---|
| 1 | <i>Averrhoa carambola</i> L. (Oxalidaceae), листья [62] | С-гликозиды дигидрохалкона |
| 2 | <i>Angelica keiskei</i> (Umbelliferae), листья и корни [29, 61, 63] | Изабавахалкон; ксантоангелол F и G; 4-гидроксидерицин; 2',4',4'-тригидрокси-3'-[2-гидрокси-7-метил-3-метил-6-октаенил]халкон; 2',4',4'-тригидрокси-3'-генарилхалкон; 2',4',4'-тригидрокси-3'-[6-гидрокси-3,7-диметил-2,7-октаенил]халкон; 2',4'-дигидрокси-4'-метокси-3'-[2-гидроперокси-3-метил-3-бутенил]халкон; 2',4'-дигидрокси-4'-метокси-3'-генарилхалкон; 2',4'-дигидрокси-4'-метокси-3'-[3-метил-3-бутенил]халкон |
| 3 | <i>Anthyllis hermanniae</i> , надземные части [29] | Антиллизон; антиллин |
| 4 | <i>Artocarpus kemando</i> , кора стебля [29] | Ксантоангелол; изоликвиритигенин (2',4,4'-тригидроксихалкон) |
| 5 | <i>Artocarpus nobilis</i> (Moraceae) [64] | 2',4',4'-Тригидрокси-3'-геранилхалкон; 2',4',4'-тригидрокси-3'-[6-гидрокси-3,7-диметил-2'(E),7-этадиенил]халкон; 2',4',4'-тригидрокси-3'-[2'-гидрокси-7-метил-3-метил-6-этаенил]халкон; 2',3,4,4'-тетрагидрокси-3'-геранилхалкон; 2',3,4,4'-тетрагидрокси-3'-[6-гидрокси-3,7-диметил-2(E),7-октадиенил]халкон |
| 6 | <i>Broussonetia papyrifera</i> (Moraceae), корни [29, 61, 65] | Брусохалкон А и В; изогемихалкон С; 3'-[γ-гидроксиметил-(E)-γ-диметилаллил]-2,4,2',4'-тетрагидроксихалкон 11'-окумарат |
| 7 | <i>Carthamus arborescens</i> [64] | 2',4'-Диацетоксихалкон |
| 8 | <i>Calea uniflora</i> [66] | Бутеин; α-гидроксидеин; бутеин-4'-O-глюкопиранозил |
| 9 | <i>Cedrelopsis grevei</i> (Ptaerogoyaceae), плоды и семена [64] | Флавокавин В; 2'-метоксигеликразихалкон; цедредипренон |
| 10 | <i>Cinnamomum verum</i> (Lauraceae) [9] | Метилгидроксихалкон |
| 11 | <i>Coreopsis tinctoria</i> , цветы [67] | Оканин; оканин-4'-глюкозид |
| 12 | <i>Cleistocalyx operculatus</i> , почва [64, 68] | 2',4'-Дигидрокси-6'-метокси-3',5'-диметилхалкон |
| 13 | <i>Cryptocarya konishii</i> , древесина [69] | 2'-Гидроксихалкон; десметилинфектокарион |
| 14 | <i>Dahlia variabilis</i> , цветы [67] | 4'-Малонилглюкозид-6'-дезоксихалкон; изоликвиритигенин; бутеин-(3,4,2',4'-тетрагидроксихалкон) |
| 15 | <i>Dalea versicolor</i> [64] | 2',4'-Дигидрокси-3',5'-диметил-6'-метоксихалкон |
| 16 | <i>Derodendron phlomidis</i> (Verbenaceae), корни и цветки [70] | 4,4'-бис-α-D-глюкозил-4,2',4'-тригидрокси-6'-метоксихалкон (агликон) |
| 17 | <i>Derris indica</i> , корни [61] | Понгамол; овалитенон |
| 18 | <i>Dorstenia kameruniana</i> , листья [29] | 3,4-4',5'-бис(2,2-диметилхромано)-2'-гидроксихалкон |
| 19 | <i>Dorstenia prorepens</i> , ветки [29] | 5,3'-Ди-(3,7-диметил-2,6-октадиенил)-3,4,2',4'-тетрагидроксихалкон |
| 20 | <i>Dorstenia zenkeri</i> [29] | 3',4'-(3-Гидрокси-2,2-диметилдигидропирано)-4,2'-дигидроксихалкон |
| 21 | <i>Dorstenia barteri</i> [29] | Изабавахалкон; 4,2',4'-тригидрокси-3,3'-дипренилхалкон |
| 22 | <i>Empetrum nigrum</i> L. (Empetraceae) [71] | 2'-Метокси-4'-гидрокси-α,β-дигидрохалкон |
| 23 | <i>Guibourtia tessmanii</i> , кора ствола [72] | Дигидрохалконглюкозид; 2',4'-дигидрокси-4'-метокси-6'-O-β-глюкопиранозид-дигидрохалкон |
| 24 | <i>Glycyrrhiza glabra</i> [29] | 2',4,4'-Тригидрокси-3-(3-метилбут-2-енил)-халкон (ликоагрохалкон А); ликоагрохалконы В, С и D |

Таблица 1. Продолжение

| № | Источники | Халконы и их производные |
|----|--|--|
| 25 | <i>Glycyrrhiza inflata</i> , корни [64] | Лакохалкон А и Е; 5-фенилбутеин; изоликвиритигенин; ликоагрохалкон А; канзонол С |
| 26 | <i>Helichrysum gymnocephalum</i> (DC) Humbert. [12] | Гимнохалкон (α -терпинеол-пиноцембрин-халкон) |
| 27 | <i>Helichrysum gymnocomum</i> , цветы [64] | 4',6',8-Тригидроксиалкон; 2-гидрокси-4',6'-добензилокси-халкон |
| 28 | <i>Humulus lupulus</i> [29, 64] | Ксантогумол В; 2',4,4'-тригидрокси-6'-метокси-3'-(γ,γ -диметилаллил)-халкон (ксантогумол); дегидроциклоксантохумол; пренилксантогумол; десметилксантогумол; 2',4,4',6'-тетрагидрокси-3'-геранилхалкон; 2',4,4',6'-тетрагидрокси-3'-пренилхалкон |
| 29 | <i>Iryanthera juruensis</i> (Myristicaceae) [64] | 2',4'-Дигидрокси-4,6'-диметоксидигидрохалкон |
| 30 | <i>Lindera umbellata</i> var. <i>membranacea</i> и <i>lancea</i> (Lauraceae), листья или кора [12] | Линдератин; линдерахалкон; метиллиндератин |
| 31 | <i>Litsea rubescens</i> [64] | Лицейон А |
| 32 | <i>Lonchocarpus subglaucescens</i> , корни [29] | Глабрахромен (халкон с группой ахромена в кольце А) |
| 33 | <i>Maclura tinctoria</i> (L.) Gaud., листья [29, 64] | 2',4,4',2''-Тетрагидрокси-3'-(3''-метилбутил-3''-енил)халкон; изовахалкон; бакухалкон; 4'- <i>O</i> - β -D-(2''- <i>p</i> -кумароил)гликопиранозил-4,2',3'-тригидроксиалкон; 4'- <i>O</i> - β -D-(2''- <i>p</i> -кумароил)-6''-ацетилгликопиранозил-4,2',3'-тригидроксиалкон; 3'-(3-метил-2 бутенил)-4'- <i>O</i> - β -D-гликопиранозил-4,2'-дигидроксиалкон; 4'- <i>O</i> - β -D-(2''-ацети-6''-циннамоил)гликопиранозил-4,2',3'-тригидроксиалкон |
| 34 | <i>Malotus filippinensis</i> [64] | Маллотофилиппены С, D, Е; ксантогумол |
| 35 | <i>Mitrella kentii</i> (Annonaceae), кора ствола [12] | Линдератин |
| 36 | <i>Millettia erythrocalyx</i> , корни [73] | 3,4-Метилендиокси-2',4'-диметоксисалкон |
| 37 | <i>Morus alba</i> , кора [29] | Канзонол С; кураридин |
| 38 | <i>Monotes africanus</i> [29] | Изокордоин; 2',4'-дигидроксиалкон |
| 39 | <i>Morus nigra</i> [29] | 2',4'-Дигидроксиалкон |
| 40 | <i>Psoralea corylifolia</i> Linn., корни, листья, семена [74] | Псорохалкон А; бавахалкон; необавахалкон; изобавахалкон; бакухалкон; бавахроманол; бавахромен; изобавахромен; хроменофлаванон; гидроксилонкокарпин |
| 41 | <i>Pichia membranifaciens</i> [29] | 2'-(2''-Гидроксиизопропил)дигидрофурано [4',5':3',4']-2',4'-дигидрокси-6'-метоксисалкон; 2'-(2''-гидроксиизопропил)-дигидрофурано [5',4':2',3']-4,4'-дигидрокси-6'-метоксисалкон |
| 42 | <i>Poinsettifolia engler</i> , трава [29] | Пуансеттифолин А |
| 43 | <i>Plasmodium falciparum</i> (Leguminosae), корни [75] | <i>E</i> -2',6'-Диметокси-3',4'-(2'',2''-диметил)пираноретрохалкон (эквихалкон А); <i>Z</i> -2',6'-диметокси-3',4'-(2'',2''-диметил)пираноретрохалкон (эквихалкон В); 4''-этокси-3''-гидроксипраксансон В (эквихалкон С) |
| 44 | <i>Sophora tonkinensis</i> (Fabaceae) [76] | 2',4,4'-Тригидрокси-3,3',5-трис(3-метил-2-бутенил)халкон (софоратин) |
| 45 | <i>Sophora flavescens</i> (Fabaceae) [29, 60, 77] | 2',4',2,4-Тетраокси-6'-метокси-3'-лавандулилхалкон (кураридин) |

Таблица 1. Окончание

| № | Источники | Халконы и их производные |
|----|--|--|
| 46 | <i>Solanum lycopersicum</i> (Solanaceae) [78] | Нарингенин халкон; эриодиктиола халкон; флоретин-30,50-ди-С-глюкозид; дигидроксидиметоксихалкон-С-диглюкозид |
| 47 | <i>Tephrosia major</i> Micheli, корни и надземные части [79] | 2',6'-Дигидрокси-3'-пренил-4'-метокси-β-гидроксиалкон |
| 48 | <i>Tephrosia candida</i> (Leguminosae) [13] | Кандидахалкодин; тефрон |
| 49 | <i>Tephrosia purpurea</i> [13] | О-Метилпонгамол; (+)-тефрозон; (+)-тефропурпурин; пурпуритенин; 6'-деметоксипракансон В |
| 50 | <i>Tephrosia pulcherrima</i> [13] | (+)-Тэфрозон; (+)-тефропурпурин; фрозон; 2',6'-диметокси-4',5'-(2''2'-диметил)пиранохалкон |
| 51 | <i>Tephrosia elata</i> [13] | (+)-Тэфропурпурин; (S)-елатадигидрохалкон |
| 52 | <i>Tephrosia praecans</i> [13] | 2',6'-Диметокси-4',5'-(2'',2'-диметил)пиранохалкон; прекаксон А и В |
| 53 | <i>Tephrosia obovata</i> [13] | Обоватахалкон |
| 54 | <i>Tephrosia spinosa</i> [13] | Спинохалкон С, А и В; 3',5'-диизопентенил-2',4'-дигидроксиалкон |
| 55 | <i>Tephrosia crassifolia</i> [13] | (4'',5''-Дигидро-3'-гидрокси-6'-метокси-изопронилдигидрофуран(2'',3'',4',3'')-халкон)крассихалкон |
| 56 | <i>Tephrosia woodii</i> [13] | Оахакацин |
| 57 | <i>Tephrosia tunicate</i> , корни [13, 29] | 3',3'-Ди-(γ-диметилаллил)-2',4'-ди-оксо-енол-халкон(туника-тахалкон) |
| 58 | <i>Tephrosia carrollii</i> [13] | Эпоксидная смола обоватахалкон |
| 59 | <i>Zuccagnia punctata</i> [64] | 2',4'-Дигидрокси-3'-метоксихалкон; 2',4'-дигидроксиалкон |

составе могут возобновить интерес фармакологов и фитохимиков к этому классу соединений.

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. Michael S., Marc D. // Epigenetic Cancer Therapy. 2015. P. 393–425. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800206-3.00018-5>
2. Исмаилова Г.О., Каримова Ш.Ф., Зиямутдинова З.К., Баходирова М.А. // Альманах современной науки и образования. 2016. № 10 (112). Тамбов: Грамота. С. 36–45.
3. Попова А.В., Бондаренко С.П., Фрасинюк М.С. // Химия гетер. соедин. 2019. Т. 55(4/5). С. 285–299.
4. Панасенко А.И. // Вестник ТГУ. 2010. Т. 15. Вып. 1. С. 62–64.
5. Бондакова М.В. // Разработка рецептуры и технологии производства косметических изделий с использованием экстракта винограда: Дис. канд. техн. наук: 05.18.06. Защищена 14.03.2014. Утв. 2014; 04201456077. М., 2014. 171 с.: ил. Библиогр.: С. 25–26.
6. Gouveia M.G., Xavier M.A., Barreto A.S., Gelain D.P., Santos J.P., Araújo A.A., Silva F.A., Quintans J.S., Agra M.F., Cabral A.G., Tavares J.F., Silva M.S., Quintans-Júnior L.J. // J. Med. Food. 2011. V. 14. № 11. P. 1389–1396. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0212>
7. Anderson A. // J. Am. Coll. Nutr. 2001. V. 20. № 4. P. 327–336.
8. Степкина Н.Н., Великородов А.В. // Фундаментальные исследования. 2015. № 11. Ч. 3. Россия. С. 505–510. <https://doi.org/10.17513/fr.39449>
9. Satyanarayana M., Tiwari P., Tripathi K., Srivastava A.K., Pratap R. // Bioorg. Med. Chem. 2004. V. 12. P. 883–889. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.12.026>
10. Ramirez I., Carabot A., Melendez P., Carmona J., Jimenez M., Patel A.V., Crabb T.A., Blunden G., Cary P.D., Croft S.L., Costa M. // Phytochemistry. 2003. V. 64. P. 645–647. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00241-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00241-3)

11. Lunardi F., Guzela M., Rodrigues A.T., Corre R., Eger-Mangrich I., Steindel M., Grisard E.C., Assreuy J., Calixto J.B., Santos A.R. // Antimicrobial Agents and Chemotherap. 2003. V. 47. P. 1449–1451.
12. Фабр П., Пуани С., Белобр Ф., Мандо А. Монотерпеновые производные халькона или дигидрохалькона и их применение в качестве депигментирующих агентов. № 0002595860; № 216.015.509Е. Заявлено 27.08.2016. Опубл. 13.01.2020 // Открытия. Изобретения. 2020.
13. Yinning C., Tao Y., Chenghai G., Wenhao C., Riming H. // Molecules J. 2014. V. 19. P. 1432–1458.
<https://doi.org/10.3390/molecules19021432>
14. Khan S.A., Ahmed B., Alam T. // Pak. J. Pharm. Sci. 2006. V. 19. P. 290–294.
15. Jun N., Hong G., Jun K. // Bioorg. Med. Chem. 2007. V. 15. P. 2396–2402.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.017>
16. Liu M., Wiliarat P., Croft S.L. // Bioorg. Med. Chem. 2003. V. 11. P. 2729–2738.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00233-5)
17. Achanta G., Modzelewska A., Feng L., Khan S.R., Huang P.A. // Mol. Pharmacol. 2006. V. 70. P. 426–433.
<https://doi.org/10.1124/mol.105.021311>
18. Echeverria C., Santibanez J.F., Donoso-Tauda O., Escobar C.A., Tagle R.R. // Int. J. Mol. Sci. 2009. V. 10. P. 221–231.
<https://doi.org/10.3390/ijms10010221>
19. Romagnoli R., Baraldi P.G., Carrion M.D., Cara C.L., Cruz-Lopez O., Preti D. // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. P. 5367–5376.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.026>
20. Meng C.Q., Zheng X.S., Ni L., Ye Z., Simpson J.E., Worsencroft K.J., Hotema M.R., Weingarten M.D., Skudlarek J.W., Gilmore J.M., Hoong L.K., Hill R.R., Marino E.M., Suen K.L., Kunsch C., Wasserman M.A., Sikorski J.A. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 1513–1517.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.01.021>
21. Nam N.H., Kim Y., You Y.J., Hong D.H., Kim H.M., Ahn B.Z. // Eur. J. Med. Chem. 2003. V. 38. P. 179–187.
[https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01443-5](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01443-5)
22. Sabzevarib O., Galati G., Moridani M.Y., Siraki A., O'Brien P.J. // Chem.-Biol. Interactions. 2004. V. 148. P. 57–67.
23. Begum N.A., Roy N., Laskar R.A., Roy K. // Med. Chem. Res. 2011. V. 20. P. 184–191.
<https://doi.org/10.1007/s00044-010-9305-6>
24. Barford L., Kemp K., Hansen M., Kharazmi A. // Int. Immunopharmacol. 2002. V. 2. P. 545–550.
25. Najafian M., Ebrahim-Habibi A., Hezareh N., Yaghmaei P., Parivar K., Larijani B. // Mol. Biol. Rep. 2010. V. 10. P. 271–274.
26. Zarghi A., Zebardast T., Hakimion F., Shirazi F.H., Rao P.N.P., Knaus E.E. // Bioorg. Med. Chem. 2006. V. 14. P. 7044–7050.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.022>
27. Chimenti F., Fioravanti R., Bolasco A., Chimenti P., Secci D., Rossi F., Yanez M., Francisco O.F., Ortufo F., Alcaro S. // J. Med. Chem. 2009. V. 49. P. 4912–4925.
28. Khatib S., Nerua O., Musa R., Shmnell M., Tamir S., Vaya J. // Bioorg. Med. Chem. 2005. V. 13. P. 433–441.
29. Bruno B., Alberto V., Pilar M., Domenico M., Giuliano D.M. // Curr. Med. Chem. 2005. V. 12. № 6. P. 713–739.
<https://doi.org/10.2174/0929867053202241>
30. Hatano T., Kusudo M., Inada K., Ogawa T., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T. // Phytochemistry. 2005. V. 66. P. 2047–2055.
31. Шмуйлович К.С. // Взаимодействие полифторированных халконов с бинуклеофильными реагентами: Дис... канд. хим. наук: 02.00.03. Защищена 27.06.2014. Утв. 2014. Новосибирск. 2014. 117 с.: ил. Библиогр.: С. 4–5.
32. Tiwari K.N., Monserrat J.-P., Arnaud Hequet A., Ganem-Elbaz C., Cresteil T., Jaouen G., Vessières A., Hillard E.A., Jolivald C. // Dalton Trans. 2012. V. 41. P. 6451–6457.
33. Bhatia N.M., Mahadik K.R., Bhatia M.S. // Chem. Papers. 2009. V. 63. P. 456–463.
<https://doi.org/10.2478/s11696-009-0026-6>
34. Hamdi N., Fischmeister C., Puerta M.C., Valerga P. // Med. Chem. Res. 2011. V. 20. P. 522–530.
<https://doi.org/10.1007/s00044-010-9326-1>
35. Bonakdar A.P.S., Sadeghi A., Aghaei H.R., Beheshtimaal K., Nazifi S.M.R., Massah A.R. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 371–381.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020030048>
36. Dao T.T., Nguyen P.H., Lee H.S., Kim E., Park J., Lim S., Oh W.K. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 21. P. 294–298.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.11.016>
37. Yenesew A., Induli M., Derese S., Midiwo J.O., Heydenreich M., Peter M.G., Akala H., Wangui J., Liyala P., Waters N.C. // Phytochemistry. 2004. V. 65. P. 3029–3032.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.050>
38. Portet B., Fabre N., Roumy V., Gornitzka H., Bourdy G., Chevalley S., Sauvain M., Valentin A., Moulis C. // Phytochemistry. 2007. V. 68. P. 1312–1320.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.006>
39. Yenesew A., Derese S., Midiwo J.O., Oketch-Rabah H.A., Lisgarten J., Palmer R., Heydenreich M., Peter M.G., Akala H., Wangui J., Liyala P., Waters N.C. // Phytochemistry. 2003. V. 64. P. 773–779.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00373-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00373-x)
40. Jayasinghe L., Balasooriya B.A.I.S., Padmini W.C., Hara N., Fujimoto Y. // Phytochemistry. 2004. V. 65. P. 1287–1290.
41. Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M. // Phytochemistry. 2007. V. 68. P. 939–953.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.019>
42. Jayasinghe L., Rupasinghe G., Hara N., Fujimoto Y. // Phytochemistry. 2006. V. 67. P. 1353–1358.
43. Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S.E., Bektasoglu B., Berker K.I., Ozyurt D. // Mol. J. 2007. V. 12. P. 1496–1547.
<https://doi.org/10.3390/12071496>
44. Bajgai E.S., Prachyawarakarn V., Mahidol C., Ruchirawat S., Kittakoop P. // Phytochemistry. 2011. V. 72. P. 2062–2067.

45. Stevens J.F., Page J.E. // *Phytochemistry*. 2004. V. 65. P. 1317–1330.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
46. Prachayasittikul S., Buraparuangsang P., Worachartcheewan A., Isarankura-Na-Ayudhya C., Ruchirawat S., Prachayasittikul V. // *Mol. J.* 2008. V. 13. P. 904–921.
<https://doi.org/10.3390/molecules13040904>
47. Куркин В.А., Куркина А.В., Авдеева Е.В. // Рациональное питание, пищевые добавки и биостимуляторы. 2014. № 4. С. 26.
48. Nerya O., Musa R., Khatib S., Tamir S., Vaya J. // *Phytochemistry*. 2004. V. 65. P. 1389–1395.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.016>
49. Calliste C.A., Le Bail J.C., Trouillas P., Pouget C., Habrioux G., Chulia A.J. // *Anticancer Res.* 2001. V. 21. P. 3949–3956.
50. Bo Han, Zheng Q., Wang J., Chen W., Tang H., Qi Wang, Wang X., Ji Li. // *ХПС*. 2010. № 4. С. 443–446.
51. Martinez-Luis S., Perez-Vasquez A., Mata R. // *Phytochemistry*. 2007. V. 68. P. 1882–1903.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.025>
52. Meazza G., Scheffler B.E., Tellez M.R., Rimando A.M., Romagni J.G., Duke S.O., Nanayakkara D., Khan I.A., Abourashed E.A., Dayan F.E. // *Phytochemistry*. 2002. V. 59. P. 281–288.
53. Haraguchi H., Tanaka Y., Kabbash A., Fujioka T., Ishizu T., Yagi A. // *Phytochemistry*. 2004. V. 65. P. 2255–2260.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.06.025>
54. Eckermann C., Matthes B., Nimtz M., Reiser V., Lederer B., Boger P., Schroder J. // *Phytochemistry*. 2003. V. 64. P. 1045–1054.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00516-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00516-8)
55. dos Santos M.B., Anselmo D.B., de Oliveira J.G., Jardim-Perassi B.V., Monteiro D.A., Silva G., Gomes E., Fachin A.L., Marins M., de Campos Zuccari D.A.P., Regasini L.O. // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2019. V. 34. P. 1093–1099.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1615485>
56. Hsieh H.K., Tsao L.T., Wang J.P., Lin C.N. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2000. V. 52. P. 163–171.
<https://doi.org/10.1211/0022357001773814>
57. Won S.J., Liu C.T., Tsao L.T., Weng J.R., Ko H.H., Wang J.P., Lin C.N. // *Eur. J. Med. Chem.* 2005. V. 40. P. 103–112.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.09.006>
58. Okunade A.L., Elvin-Lewis M.P.F., Lewis W.H. // *Phytochemistry*. 2004. V. 65. P. 1017–1032.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.02.013>
59. Айтмамбетов А., Ибрагимов З.Ю., Хожамбергенов К., Ибрагимов М.Ю. // Теорет. и клин. медицина. Ташкент. 2006. № 5. С. 184.
60. Hyun Ah J., Takako Y., Byung-Woo K., Jee H.J., Jae S.Ch. // *Am. J. Chin. Med.* 2010. V. 38 (2). P. 415–429.
<https://doi.org/10.1142/S0192415X10007944>
61. Hongyu W., Tingting L., Dejian H. // *Adv. Food Nut. Res.* 2013. V. 70. P. 103–136.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416555-7.00003-5>
62. Yue Y., Xuchao J., Haihui X., Xiaoyi W. // *Phytochemistry*. 2020. 174:112364.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112364>
63. Toshihiro A., Harukuni T., Motohiko U., Masao I., Stefan S., Kazuya O., Teruo M., Kenji I., Takashi S., Hoyoku N. // *Cancer Lett.* 2003. V. 201. P. 133–137.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(03\)00466-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00466-X)
64. Rosa M.P.G., Alethia M.-R., Jahel V.S. // *African J. Pharm. Pharm.* 2015. V. 9(8). P. 237–257.
<https://doi.org/10.5897/AJPP2015.4267>
65. Hyung W.R., Mi H.P., Ok-Kyoung K., Doo-Young K., Jung-Yeon H., Yang H. Jo, Kyung-Seop A., Bang Y.H. // *Bioorg. Chem.* 2019. V. 92. 103233.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103233>
66. Tamires C.L., Rafaela J.S., Alan D.C.S., Milene H.M., Nicole E.B., Andersson B., Mário S., Maique W.B. // *Nat. Product Res.* 2015. V. 30(5). P. 1–7.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1030740>
67. Øyvind M.A., Monica J. // *Comprehensive Nat. Products II*. 2010. V. 3. P. 547–614.
<https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00086-1>
68. Dykens J.A. // *Comprehensive Med. Chem. II*. 2007. V. 2. P. 1053–1087.
<https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00071-7>
69. Fera K., Lia D.J., Yana M.S., Sjamsul A.A., Euis H.H., Kiyotaka K., Kaoru K., Kunio T. // *J. Nat. Med.* 2010. V. 64. P. 121–125.
<https://doi.org/10.1007/s11418-009-0368-y>
70. Anam Edet M. // *Indian J. Chem. B.* 1997. V. 36 (10). P. 897–900.
71. Краснов Е.А., Ермилова Е.В., Кадырова Т.В., Ралдугин В.А., Багрянская И.Ю., Гатилов Ю.В., Друганов А.Г., Семенов А.А., Толстиков Г.А. // *ХПС*. 2000. № 5. С. 389–391.
72. Fuendjiep V., Wandji J., Tillequin F., Mulholland D.A., Budzikiewicz H., Fomum Z.T., Nyemba A.M., Koch M. // *Phytochemistry*. 2002. V. 60(8). P. 803–806.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00108-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00108-5)
73. Boonchoo S., Kittisak L., Jürgen C., Wolfgang K. // *Phytochemistry*. 2002. V. 61(8). P. 943–947.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00337-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00337-0)
74. Lim S.H., Ha T.Y., Ahn J., Kim S. // *Phytomedicine*. 2011. V. 18. P. 425–430.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.02.002>
75. Yoseph A., Sandra D., Matthias H., Lois M.-M., Vicky M.A., Máté E., Abiy Y. // *Molecules*. 2017. V. 22(2). P. 318.
<https://doi.org/10.3390/molecules22020318>
76. Panthathi M.K., Rao K.N.V., Sandhya S., David B. // *Brazil. J. Pharmacognosy*. 2012. V. 22. P. 1145–1154.
77. Motahare B., Saba S., Mehrdad I. // *Phytother Res.* 2019. V. 33(3). P. 546–560.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6265>
78. Handbook of Dietary Phytochemicals / Eds. Xiao J. et al. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2020.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-1745-3_10-1
79. Federico G.-G., Oswaldo T.-V., Gregorio M.-T., José S.C. // *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2014. V. 57(7–8). P. 579–583.
<https://doi.org/10.1515/znc-2002-7-805>

Biologically Active Natural 2'-Hydroxychalcones

G. O. Ismailova^{*,#}, N. M. Yuldashev^{*}, Kh. N. Akbarhodjaeva^{*},
M. M. Shertaev^{*}, and Z. K. Ziyamutdinova^{*}

[#]Phone: +9 (9890) 356-11-47; e-mail: ismailova.gulzira@mail.ru

^{*}Tashkent Pediatric Medical Institute, ul. Bogishamol 223, Tashkent, 100140 Uzbekistan

Provides additional modern data from the literature on the results of research in the field of flavonoids of medicinal plants. Systematization was carried out according to the most common structures of the isolated 2'-hydroxychalcones and their derivatives from 59 sources of natural raw materials. The data on the features of biogenesis, general characteristics, possible functions, biological properties and aspects of practical application are presented.

Keywords: 2'-hydroxychalcones, chalcone derivatives, biogenesis, medicinal plants, biological activity



УДК 577.181:577.112.6

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ. III. ВЛИЯНИЕ КАТИОННЫХ ГРУПП ЛИЗИНА, АРГИНИНА И ГИСТИДИНА НА АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ С “ЛИНЕЙНЫМ” ТИПОМ АМФИПАТИЧНОСТИ

© 2021 г. Н. В. Амирханов*, #, А. В. Бардашева*, Н. В. Тикунова*, Д. В. Пышный*

*ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 04.07.2020 г.

После доработки 16.07.2020 г.

Принята к публикации 18.07.2020 г.

Исследована антимикробная и гемолитическая активность синтетических антимикробных пептидов (САМП) Arg₉Phe₂ (P1-Arg), Lys₉Phe₂ (P2-Lys) и His₉Phe₂ (P3-His), обладающих “линейным” типом амфипатичности и содержащих катионные аминокислотные остатки аргинина, лизина или гистидина. На примере различных патогенных штаммов микроорганизмов – грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, а также условно-патогенного дрожжеподобного гриба *Candida albicans* – показано, что замена остатков аргинина на остатки лизина или гистидина в исследованных САМП значительно ухудшает антибактериальные свойства таких САМП в ряду: P1-Arg > P2-Lys ≫ P3-His. Катионный аналог САМП P1-Arg обладает наибольшей антибактериальной активностью (минимальная подавляющая концентрация пептида (МПК₅₀) от 43 до 76 мкМ), а пептид P3-His фактически не проявляет антибактериальную активность (МПК₅₀ > 100 мкМ). По отношению к условно-патогенной дрожжевой культуре *C. albicans* пептиды P1-Arg и P2-Lys в целом проявили более чем в 6–10 раз (МПК₅₀ = 6.7 и 10.9 мкМ), а пептид P3-His – более чем в 100 раз (МПК₅₀ = 0.6 мкМ) повышенную антимикотическую активность по сравнению с аналогичным их действием на бактериальные клетки. Все исследуемые нами пептиды с “линейным” типом амфипатичности P1-Arg, P2-Lys и P3-His, имеющие в своем составе лишь два остатка Phe и обладающие низкой гидрофобностью, независимо от их катионного состава аминокислот (Arg, Lys или His) проявляют относительно низкую гемолитическую активность (не более 4% гемолиза при 1000 мкМ концентрации пептидов). Таким образом, принимая во внимание одинаковую эффективность синтеза (56–63%) и примерно одинаковую низкую токсичность исследованных пептидов, для создания антибактериальных препаратов на основе САМП с “линейным” типом амфипатичности рекомендуется использовать пептиды, содержащие в качестве катионных групп аминокислотные остатки аргинина, а для создания антигрибковых препаратов – пептиды с остатками гистидина.

Ключевые слова: твердофазный синтез пептидов, синтетические антимикробные пептиды, амфифильность, “линейный” тип амфипатичности, “круговой” тип амфипатичности, гемолитическая активность, селективность, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, гистатины

DOI: 10.31857/S0132342321030027

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробные пептиды (АМП) – наиболее многочисленный и хорошо изученный класс био-

логически активных пептидов, синтезирующихся в ответ на внедрение чужеродных микроорганизмов [1–3]. Несмотря на то, что лишь немногие АМП нашли применение в медицинской практике, изучение этого класса соединений продолжает привлекать внимание значительного числа исследователей в мире [2–9]. Повышенное внимание к АМП обусловлено редким развитием резистентности к ним у микроорганизмов, особенно у бактерий, что делает весьма привлекательным дизайн новых антибиотиков на основе антимикробных пептидов [5–7, 10–12].

Ранее для конструирования и поиска АМП с новыми свойствами нами было предложено использовать синтетические антимикробные пептиды (САМП) [13, 14], которые должны отличаться

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды; КТА – “круговой” тип амфипатичности; ЛТА – “линейный” тип амфипатичности; МГК – минимальная гемолитическая концентрация (концентрация пептида, которая вызывает лизис не более 10% свежих красных кровяных клеток); МПК₅₀ – минимальная подавляющая концентрация (концентрация пептида, при которой рост микроорганизмов подавляется на 50%); САМП – синтетические антимикробные пептиды; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; HATU – 2-(1*H*-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфат; Hst – гистатин; NMM – *N*-метилморфолин; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; PBS – фосфатно-солевой буфер; TFA – трифторуксусная кислота.

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-51-35; эл. почта: nagiman@niboch.nsc.ru).

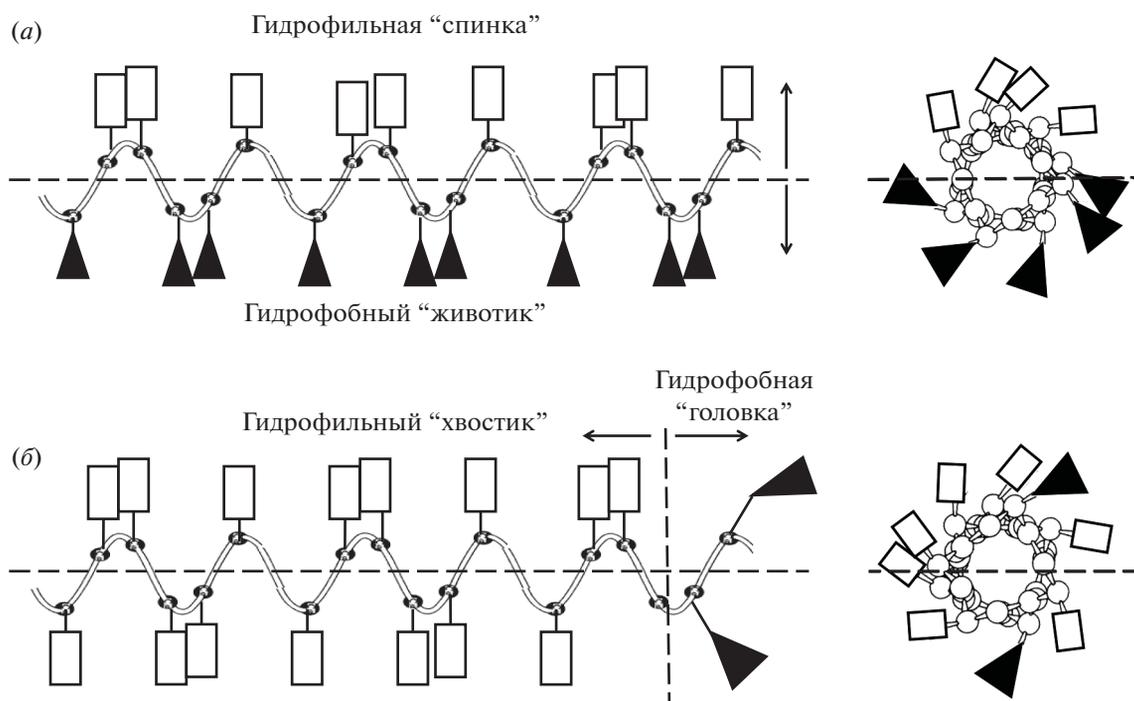


Рис. 1. Гипотетическое представление классического “кругового” (а) и “линейного” (б) типов амфипатичности α -спиральных пептидов. Прямоугольниками обозначены гидрофильные или катионные остатки аминокислот, треугольниками – гидрофобные остатки. В случае классического “кругового” типа амфипатичности (КТА) [2, 8, 9] гидрофобные и гидрофильные полярные поверхности α -спиральной молекулы пептида разделены продольной осевой линией (а). На рисунке верхняя поверхность гидрофильная, нижняя – гидрофобная (амфипатичность по типу “спинка–животик”). В случае линейного типа амфипатичности (ЛТА) гидрофобные и гидрофильные (катионные) остатки аминокислот размещены на противоположных концах вдоль линейной оси пептида. Гидрофобная и гидрофильная полярные области в этом случае разделены поперечной линией перпендикулярной продольной оси пептида (б), где левый конец молекулы имеет гидрофильный “хвостик”, правый – гидрофобную “головку”. Справа представлены двумерные проекции “спиральных колес” Шиффера и Эдмундсона [15, 16] этих же пептидов. Видно, что полярная однородность гидрофобных и гидрофильных групп в случае линейного типа амфипатичности (б) в проекции, представленной слева, гораздо выше, чем когда та же молекула представлена в классическом виде в виде двумерных проекций “спиральных колес” (справа).

от природных АМП [2, 8, 9] тем, что они сконструированы независимо от структуры многочисленных известных природных АМП. Конструирование таких САМП основано на общих принципах воздействия АМП на микробные клетки, а именно на принципах амфифильности пептида, т.е. наличия в молекуле пептида одновременно гидрофобных и гидрофильных положительно заряженных групп. В зависимости от взаимного расположения полярных амфифильных аминокислот АМП относительно друг друга в пространстве такие пептиды также могут быть разделены на два подтипа или класса по типу их амфипатичности – пептиды с классическим “круговым” (спиральный или кольцевой) типом амфипатичности (КТА) [2, 8, 9, 15, 16] (рис. 1а) и пептиды с новым, “линейным” типом амфипатичности (ЛТА) (рис. 1б) [13, 14].

В этих же работах было показано, что САМП с так называемым “линейным” типом амфипатичности (САМП-ЛТА) обладают повышенными антимикробными свойствами по сравнению с САМП с классическим, так называемым “круго-

вым”, типом амфипатичности (САМП-КТА). По сравнению с пептидами с КТА, у которых амфифильные гидрофобные и/или гидрофильные катионные группы расположены в противоположных сторонах α -спирали, пептиды с ЛТА обладают меньшей гидрофобностью и, как следствие, меньшей гемолитической активностью, что существенно повышает индекс селективности таких препаратов на основе САМП [13, 14].

В ранее представленных работах исследования биологической активности таких пептидов проводились на основе аргинин-содержащего катионного пептида R_9F_2 (P1-Arg) АМП [13, 14]. Однако далее важно было получить ответ на ряд вопросов. Во-первых, связана ли ранее обнаруженная повышенная антимикробная активность САМП-ЛТА P1-Arg с содержанием в качестве катионных групп именно остатков аргинина ($pK_a \sim 12$) (по сравнению с САМП-КТА [13, 14]) или такой же эффект может быть получен и с другими катионными остатками, такими как лизин ($pK_a \sim 10$), и/или условно катионными остатками, такими как гистидин ($pK_a \sim 6$)? Во-вторых, из-за разной

Таблица 1. Структура, выходы продуктов синтеза и физико-химические характеристики синтетических анти-микробных пептидов, полученных в настоящей работе

| Пептид | Структура ^а | Выходы по Fmoc ^б | | Выход по ВЭЖХ ^в | Общий выход синтеза ^г , % | Время удерживания ^д , мин | | Молекулярная масса [M + H] | |
|---------------|--|-----------------------------|-----------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------|--------|
| | | средний | суммарный | | | 80% CH ₃ CN | 50% CH ₃ CN | расч. | эксп. |
| P1-Arg | H-R ₉ F ₂ -NH ₂ | 96.9 | 70.2 | 85.0 | 56.0 | 15.5 | 20.4 | 1717.0 | 1716.5 |
| P2-Lys | H-K ₉ F ₂ -NH ₂ | 97.5 | 75.5 | 80.0 | 57.8 | 14.6 | 18.2 | 1465.0 | 1465.3 |
| P3-His | H-H ₉ F ₂ -NH ₂ | 99.8 | 98.2 | 70.5 | 62.9 | 15.6 | 20.0 | 1545.7 | 1545.8 |

^а Длина всех пептидов одинаковая и составляет 11 а.о. Заряд равен +10 также для всех пептидов.

^б Средний и суммарный выход конденсации на полимерном носителе, определенный по измерению деблокированной Fmoc-группы, соответственно, после каждой или последней (11-й) конденсации на полимерном носителе.

^в Выход, определенный измерением количества пептида до хроматографии и после очистки методом ВЭЖХ (см. “Эксперим. часть”).

^г Конечный выход после удаления с полимерного носителя и очистки методом офВЭЖХ в расчете на первую загруженную аминокислоту на полимерном носителе.

^д В условиях аналитической офВЭЖХ (условия – см. “Эксперим. часть”).

химической природы катионных остатков аргинина, лизина и гистидина и, соответственно, разных химических свойств защитных групп боковых цепей этих аминокислот в ходе синтеза и деблокирования синтез таких пептидов может проходить с разной эффективностью. Если имеются различия в эффективности синтеза пептидов с разными катионными остатками, то какова величина или степень таких различий? И далее, если допустить одинаковую эффективность синтеза, а также одинаковую антимикробную активность таких пептидов независимо от их катионного состава, преимущество в выборе в качестве эффективного антимикробного препарата может быть оказано тем пептидам, которые имеют меньшую гемолитическую активность или токсичность. Следовательно, в-третьих, необходимо было выяснить, зависит ли гемолитическая активность пептидов САМП-ЛТА от их катионного состава (остатки аргинина, лизина или гистидина).

Очевидно, что при разных антимикробных свойствах и разных гемолитических активностях преимущество в качестве потенциального антимикробного препарата могло бы быть предоставлено пептиду, обладающему более высоким индексом селективности или терапевтическим индексом (ТИ), т.е. высоким значением минимальной гемолитической концентрации (МГК) и низким значением минимальной подавляющей концентрации (МПК₅₀) (ТИ = МГК/МПК₅₀).

Для оптимизации структуры САМП и поиска наиболее активных антимикробных препаратов на основе САМП с “линейным” типом амфипатичности были изучены три типа таких пептидов общей структуры X₉Phe₂, где X = Arg, Lys или His.

Целью настоящей работы было исследование зависимости эффективности синтеза САМП с так

называемым “линейным” типом амфипатичности от состава катионных аминокислотных составляющих (аргинина, лизина или гистидина), а также выявление их антимикробной и гемолитической активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез пептидов P1-Arg, P2-Lys и P3-His. Синтез пептидов проводили стандартным твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [17] согласно приведенной схеме 1, на пептидном синтезаторе PS3, который ранее был приспособлен для масштабного препаративного синтеза в реакторном варианте [18, 19]. Структура синтезированных пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His** включала в себя 11-звенную последовательность аминокислот, содержащую свободную N-концевую аминогруппу (придающую дополнительный положительный заряд пептиду) и амидную группу на C-конце цепи, нейтрализующую отрицательный заряд свободной концевой карбоксильной группы (схема 1). Эффективность присоединения одного аминокислотного мономерного звена, определенные путем измерения количества удаляемых Fmoc-групп на каждой стадии конденсации, для пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His** в среднем составили 96.9–99.8% (табл. 1). Конечные выходы пептидов после 11 шагов конденсации на твердофазном носителе, деблокирования и удаления с полимерного носителя, а также очистки методом офВЭЖХ составили 56–63%. По данным офВЭЖХ и МС все выделенные пептиды соответствовали ожидаемой структуре и были гомогенными с содержанием основного вещества не менее 95% (табл. 1).

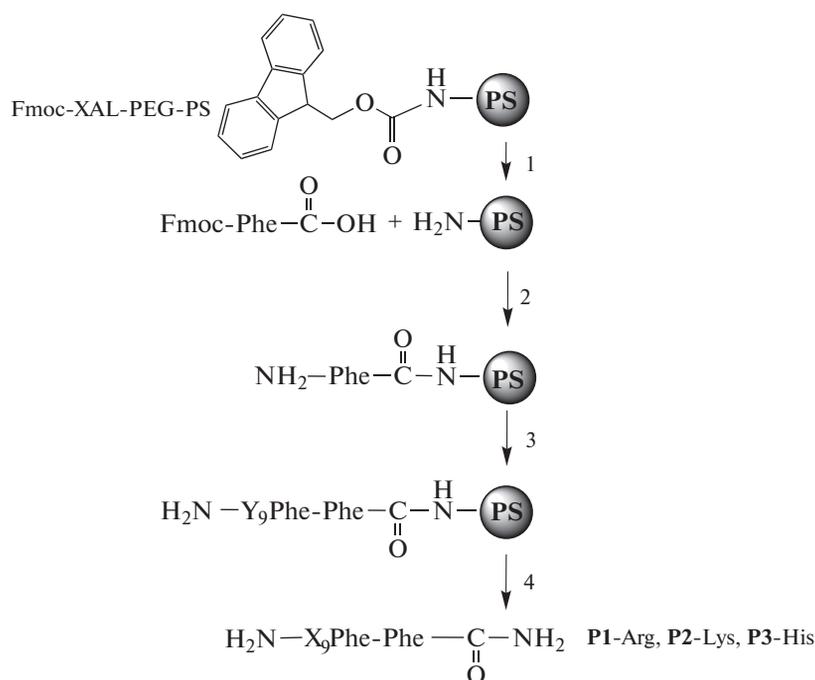


Схема 1. Синтез пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His** с C-концевыми амидными группами твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии. Y = Arg^{Pbf}, Lys^{Boc} или His соответственно; X = Arg, Lys или His; PS – полистирольный полимер; 1. пиперидин/DMF (1 : 5). 2. а) HATU, NMM, DMF; б) Ac₂O/NMM/DMF; в) пиперидин/DMF (1 : 5); 3. повторяющиеся циклы: а) Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg^{Pbf}-OH, Fmoc-Lys^{Boc}-OH или Fmoc-His-OH, HATU, NMM, DMF; б) Ac₂O/NMM/DMF; в) пиперидин/DMF (1 : 5); 4. TFA/*m*-крезол.

Таким образом, синтез пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His** в указанном режиме проходит достаточно эффективно с относительно высокими выходами независимо от состава аминокислот в структуре пептида.

Основной проблемой в пептидном синтезе может оказаться очистка сырой реакционной смеси, получаемой после синтеза, деблокирования и снятия с полимерного носителя, которая содержит примеси модифицированных или более коротких пептидов, появляющихся из-за недостаточно высокой эффективности конденсаций мономерных звеньев аминокислот на полимерном носителе или модификации аминокислотных остатков при синтезе и деблокировании защитных групп. В этом случае в виде примесей могут появиться последовательности пептидов с меньшей длиной цепи, которые по подвижности на офВЭЖХ мало отличаются от целевого продукта. Как видно из данных табл. 1, эффективность присоединения мономерных звеньев в нашем случае оказалась достаточно высокой для всех исследованных пептидов, а для гистидин-содержащего пептида **P3-His** выход, определяемый по измерению Fmoc-групп, был особенно высоким и составил в среднем 99.8% на каждую стадию, суммарный выход для этого пептида составил 98.2% (табл. 1). Тем не менее, несмотря на относительно высокую эффективность конденсаций между

аминокислотными мономерами, выходы пептида **P3-His**, содержащего остатки гистидина, по ВЭЖХ наиболее низкие по сравнению с пептидами **P1-Arg** или **P2-Lys**, содержащими, соответственно, остатки аргинина или лизина (рис. 2). Вероятно, это происходит из-за того, что в ходе реакции активации и присоединения мономерных звеньев гистидина образуется ряд побочных продуктов, что сказывается, скорее всего, на относительной чистоте целевого соединения в сыром неочищенном продукте до его выделения и при очистке методом офВЭЖХ. Несмотря на такое различие в промежуточных выходах этих трех пептидов, конечные выходы очищенных целевых продуктов относительно одинаковые. Скорее всего, в данном случае недостаточно высокая эффективность очистки пептида **P3-His** методом офВЭЖХ нивелируется высокой эффективностью конденсаций между аминокислотами на полимерном носителе (табл. 1). Тем не менее конечные выходы очищенных пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His** оказались примерно равными и составили 56, 58 и 63% соответственно (табл. 1).

Резюмируя все сказанное выше относительно синтеза исследуемых нами пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His**, можно заключить, что эффективность синтеза этих пептидов практически не зависит от состава используемых катионных аминокислот – аргинина, лизина или гистидина.

Антимикробная активность синтетических пептидов P1-Arg, P2-Lys и P3-His. В качестве исследуемых микроорганизмов при испытании антимикробной активности пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His** были использованы грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Salmonella enterica*, грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* и штамм условно-патогенного дрожжеподобного гриба *Candida albicans*.

Каждый из пептидов в конечных концентрациях 0.3–100 мкМ добавляли к растущим культурам клеток микроорганизмов и наблюдали за ростом клеток. Влияние присутствия пептидов в культуральной среде на рост самой культуры клеток контролировали измерением оптической плотности (оптического поглощения при 595 нм) суспензии растущих клеток во времени в течение 24 ч. Для количественной оценки антимикробной активности пептидов удобным оказалось одновременное построение на одном графике двух дозозависимых кривых: 1) зависимости относительной *степени роста* микробных культур (N_p/N_0) от концентрации пептида и 2) зависимости относительной *степени подавления роста* этих же культур клеток ($1 - N_p/N_0$), где N_p – оптическая плотность (концентрация) микробных частиц после добавления пептидного препарата, N_0 – оптическая плотность микробных частиц в контрольной культуре (рис. 3). По месту пересечения этих двух кривых на одном и том же графике можно сразу определить минимальную подавляющую концентрацию препарата в среде (МПК₅₀, мкМ), при которой концентрация микробных частиц, инкубированных в присутствии пептидной пробы, после 24 ч при 37°С составляет половину концентрации клеточных частиц культур, инкубированных в среде без препарата. В качестве примера на рис. 3 приведены данные зависимости степени роста и степени подавления роста культуры клеток *C. albicans* исследуемыми пептидами **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His** от концентрации этих пептидов в среде. Аналогичные графики по ингибированию роста были получены и для остальных культур клеток (данные не приведены), по которым, исходя из трехкратных повторов, нами были определены соответствующие усредненные значения МПК₅₀ для всех исследованных пептидов по отношению к каждой из культур клеток (табл. 2).

По отношению к исследованным бактериальным культурам клеток наибольшую активность проявил пептид **P1-Arg**, содержащий катионные остатки аргинина (табл. 2). Пептид **P3-His**, содержащий остатки гистидина, по отношению к бактериальным культурам в пределах максимально используемой концентрации в среде 100 мкМ не проявил вообще никакой активности. Пептид **P2-Lys**, содержащий катионные остатки лизина, проявил фиксируемую активность по отноше-

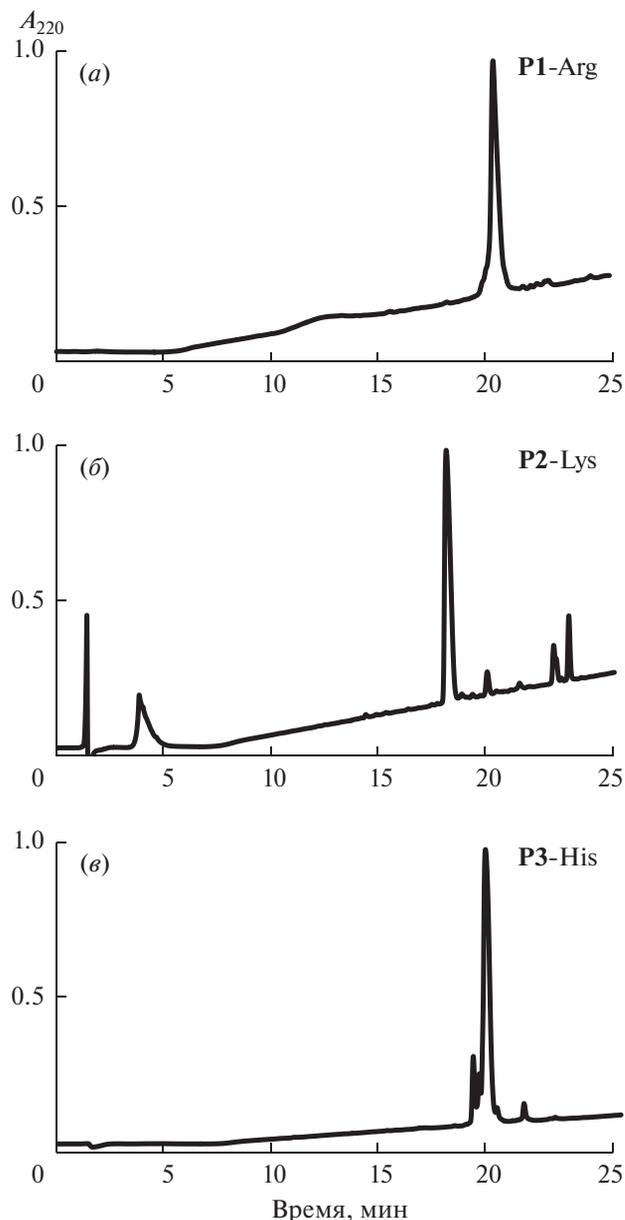


Рис. 2. Профили офВЭЖХ реакционных смесей пептидов **P1-Arg** (а), **P2-Lys** (б) и **P3-His** (в), полученных после синтеза и деблокирования с полимерного носителя. Представлены данные детекции при длине волны 220 нм (условия хроматографии – см. “Эксперим. часть”).

нию лишь к двум бактериальным культурам – *E. coli* и *P. aeruginosa* (МПК₅₀ = 77.5 и 80.0 мкМ соответственно).

Таким образом, замена остатков аргинина в ранее исследованном пептиде H-R₉F₂-NH₂ на остатки лизина или гистидина в рамках наших исследований не привела к улучшению их антибактериальной активности. В случае же гистидинового аналога такого пептида, напротив, после замены остатков аргинина на гистидин пептид

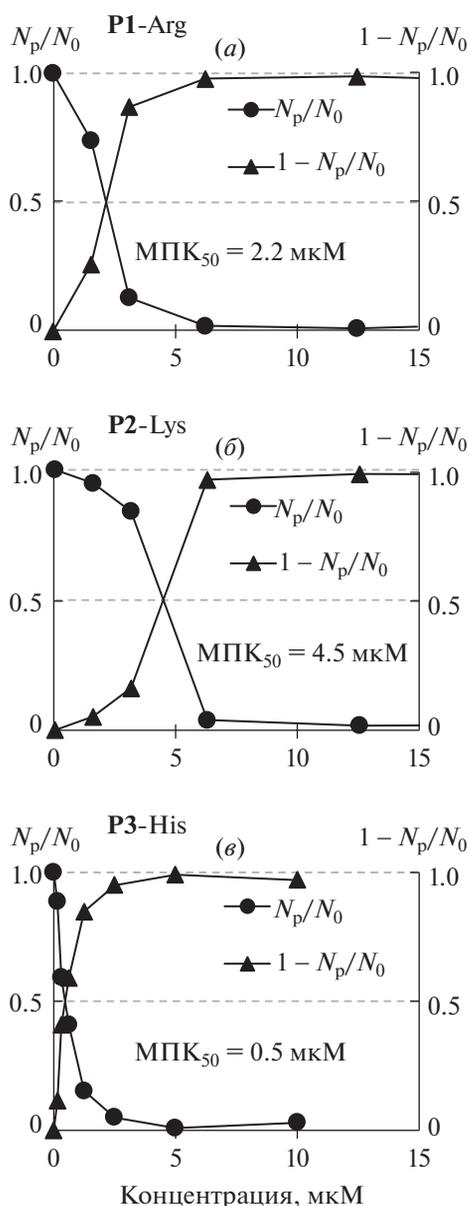


Рис. 3. Зависимость относительной степени роста (N_p/N_0) клеточных культур *C. albicans* или степени ингибирования их роста ($1 - N_p/N_0$) от воздействия различных концентраций antimicrobных пептидов **P1-Arg** (а), **P2-Lys** (б) и **P3-His** (е) после 24 ч инкубации, где N_p/N_0 – отношение оптической плотности (концентрации) микробных частиц после добавления пептидного препарата (N_p) к оптической плотности (концентрации) в контрольной культуре (N_0).

потерял какую-либо заметную антибактериальную активность (табл. 2).

Тем не менее неожиданным оказалось воздействие пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His** по отношению к условно-патогенной дрожжевой культуре *C. albicans* (рис. 3, табл. 2). Эффективность воздействия этих пептидов на культуры клеток *C. albicans* в среднем оказалась в 6–10 раз выше,

чем аналогичная эффективность их воздействия на бактериальные клетки. Однако действие пептида **P3-His** наряду с пептидами **P1-Arg** и **P2-Lys** оказалось уникальным не только по сравнению с их действием на бактериальные клетки, но и по сравнению с действием самих пептидов **P1-Arg** и **P2-Lys** на саму культуру дрожжевых клеток *C. albicans*. Пептид **P3-His**, содержащий остатки гистидина, по отношению к *C. albicans* оказался наиболее активным ($MPK_{50} = 0.6 \mu M$) по сравнению с двумя другими пептидами **P1-Arg** и **P2-Lys**, содержащими катионные остатки аргинина или лизина ($MPK_{50} = 6.7$ и $10.9 \mu M$ соответственно).

Таким образом, антимикробная активность пептида **P3-His** по отношению к *C. albicans* более чем в 10 раз превышала антимикробную активность пептидов **P1-Arg** и **P2-Lys**, а при сравнении действия на *C. albicans* и клетки бактерий тот же пептид **P3-His** проявил антигрибковую активность, превышающую антибактериальную активность более чем в 100 раз (табл. 2).

Такое избирательное действие пептида **P3-His**, содержащего остатки гистидина, по отношению к грибковым культурам подтверждается литературными данными, в которых указывается на целый класс гистидин-содержащих природных АМП, так называемых гистатинов (Hst) – богатых гистидином (катионных) антимикробных белков, которые содержатся в слюне [20] и проявляют избирательную активность как к условно-патогенным дрожжевым культурам, таким как *C. albicans* [20], так и к другим дрожжевым культурам [21]. Так, например, известно, что среди всех Hst гистатин 5 (Hst 5) обладает наиболее сильным фунгицидным действием против патогенных грибов, включающих не только *C. albicans* [22], но и другие важные с медицинской точки зрения виды *Candida*, такие как *Candida kefyr*, *Candida krusei* и *Candida parapsilosis* ($MPK_{50} = 3-7 \mu M$), а также *Cryptococcus neoformans* и *Aspergillus fumigatus* ($MPK_{50} = 1.5-2.0 \mu M$) [23]. Известно также, что Hst 5 может ингибировать трансформацию почти 100% клеток *C. albicans* в более патогенные гифы [24, 25].

Участие Hst в антимикробной активности делает их частью врожденной иммунной системы [26]. Гистатины (Hst-1, Hst-3 и Hst-5) были впервые выделены в 1988 г. как пептиды, принимающие участие в поддержании гомеостаза в полости рта и связывании ионов металлов [20, 22]. Более ранние исследования указывали на мембранолитические механизмы для Hst, вызывающие гибель грибковых клеток. Однако более поздние исследования показали, что множественные внутриклеточные мишени – более вероятные участки воздействия Hst, т.е. механизм действия Hst скорее метаболический, чем мембранолитический.

Таблица 2. Антимикробная активность пептидов P1-Arg, P2-Lys и P3-His

| Пептиды | МПК ₅₀ , мкМ | | | | |
|---------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | <i>Candida albicans</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Salmonella enterica</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| P1-Arg | 6.7 | 42.8 | 48.2 | 59.4 | 76.0 |
| P2-Lys | 10.9 | >100.0 | 77.5 | 100.0 | 80.0 |
| P3-His | 0.6 | >100.0 | >100.0 | >100.0 | >100.0 |
| AgNO ₃ * | 48.0 | 26.6 | 18.6 | 22.2 | 22.1 |
| XГ* | 9.7 | 1.8 | 1.7 | 7.7 | 9.4 |

* AgNO₃ – водный раствор нитрата серебра [14], а также хлоргексидин (XГ) были использованы в качестве внутренних контролей для сравнения относительной антимикробной активности пептидных препаратов.

Например, известно, что Hst 5, попав внутрь грибковых клеток, может влиять на функционирование митохондрий и вызывать окислительный стресс, а конечная причина гибели клеток – дисбаланс ионов, вызванный осмотическим стрессом [27]. Помимо этих разнообразных механизмов воздействия на внутриклеточные мишени обсуждаются также механизмы, основанные на способности Hst связываться с ионами металлов меди и/или цинка.

Метаболический путь воздействия АМП на микробные клетки при его сравнении с мембранолитическим более эффективен, поскольку позволяет запускать каскад процессов, приводящих к опосредованному нарушению нормального метаболизма клеток и, в конечном итоге, к гибели самих клеток, тогда как мембранолитический путь воздействия АМП на микробные клетки – непосредственный, прямой и в какой-то мере “механистический” – воздействие происходит лишь на мембрану клеток, что приводит к механистической деструкции мембраны и ее дальнейшему разрушению и требует, вследствие этого, большего в статистическом плане количества молекул самого воздействующего пептидного препарата. Вероятно, вследствие именно этих причин исследованный нами пептид P3-His (обладающий, как и многие гистидин-содержащие АМП, метаболическим характером воздействия) проявляет повышенную противогрибковую активность (более чем в 10 раз) в сравнении с другими исследованными нами пептидами P1-Arg и P2-Lys, которые оказывают, вероятно, как и все катионные АМП, преимущественно мембранолитическое воздействие. Более того, как мы предполагаем, за счет существования специфических рецепторов на поверхности дрожжевых клеток к гистидин-богатым пептидам пептид P3-His к тому же обладает активностью по отношению к *C. albicans*, более чем в 100 раз превышающей его активность по отношению к исследованным нами бактериальным клеткам.

Согласно литературным данным (см., например, обзор [27] и приведенные в нем ссылки), Hst 5 связывается с белками клеточной стенки *C. albicans* (Ssa1/2) и гликанами и поглощается клетками посредством переносчиков грибковых полиаминов. Попав внутрь грибковых клеток, Hst 5 может влиять на функции митохондрий и вызывать окислительный стресс; однако конечная причина гибели клеток – дисрегуляция объема и дисбаланс ионов, вызванный осмотическим стрессом. Но поскольку специфической активностью по отношению к *C. albicans* обладают не только Hst 5, но и остальные гистатины, содержащие в своем составе остатки гистидинов, вполне уместно предположить, что на поверхности дрожжевых клеток *C. albicans* имеются специфические рецепторы к гистидин-богатым пептидам. Причина проникновения гистатинов, как мы предполагаем, – не их катионный состав (у гистидин-содержащего пептида P3-His один положительный заряд, образованный за счет открытой концевой аминокислотной группы, и слабый положительный заряд за счет остатков гистидина), а наличие рецепторов, специфических к гистидин-богатым пептидам. Проникновение в клетку в данном случае, скорее всего, должно идти не по электростатическому, а по рецептор-опосредованному механизму, хотя электростатическое взаимодействие также играет немаловажную роль в первоначальном связывании с отрицательно заряженной поверхностью клетки *C. albicans*.

Гемолитическая активность. При создании САМП в качестве потенциальных лекарственных препаратов одним из важных факторов, помимо высокой эффективности синтеза и повышенной антимикробной активности, выступает их относительно низкая токсичность по отношению к высшим организмам, в частности низкая гемолитическая активность создаваемых САМП. В большей части работ, посвященных созданию и конструированию модифицированных природных АМП путем изменения структуры, в основном

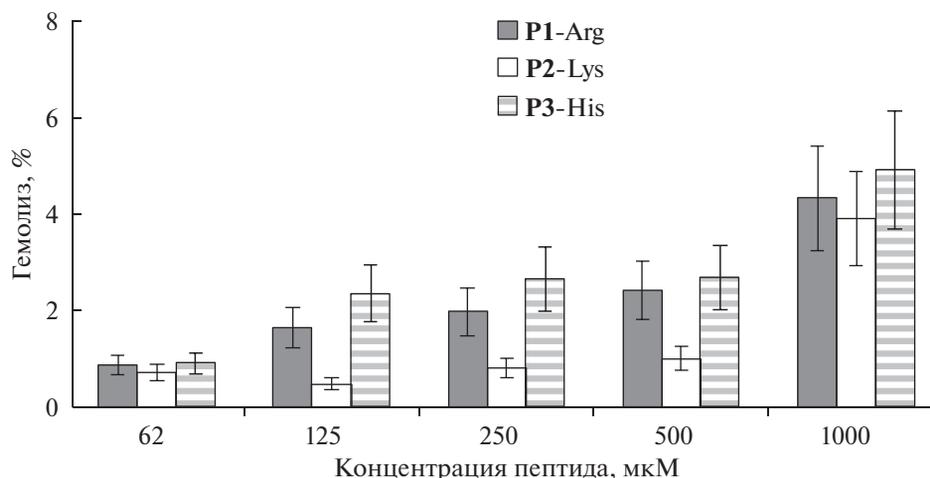


Рис. 4. Гемолитическая активность пептидов P1-Arg, P2-Lys и P3-His.

удавалось уменьшить их гемолитическую активность, тогда как попытки каким-либо образом направленно увеличить антимикробную активность модифицируемых АМП не всегда приводили к желаемому результату [6, 25, 26]. Вероятно, природа уже выбрала свою оптимальную максимально эффективную структуру соответствующего АМП. Тем не менее уменьшение гемолитической активности видоизмененного или модифицированного природного АМП, даже при сохранении прежней его антимикробной активности, приводило в некоторых случаях к значительному (до 50 раз) увеличению индекса селективности модифицированного природного АМП [6]. При всем этом показатель гемолитической активности, когда гемолиз не превышает 10% при 100–125 мкМ концентрации пептида в среде, считается приемлемым [6, 11, 12]. Следует отметить, что, в большинстве своем, уменьшение гемолитической активности достигалось простым уменьшением общей гидрофобности модифицируемых природных АМП путем замены в их составе гидрофобных аминокислотных остатков на какие-либо нейтральные, гидрофильные или катионные аминокислотные остатки, что в некоторых случаях существенно не влияло на их антимикробную активность, однако значительно уменьшало их гемолитическую активность [11, 12].

На рис. 4 приведены результаты исследования гемолитической активности пептидов P1-Arg, P2-Lys и P3-His в зависимости от их концентрации в среде. Видно, что гемолитическая активность всех исследуемых пептидов даже при достаточно высокой их концентрации в среде (до 1000 мкМ), содержащей эритроциты, не превышает 4% — это относительно низкая величина по сравнению с известными в литературе данными для природных АМП, показатель гемолитической активности

которых составлял 10% при 100–125 мкМ концентрации АМП [6, 11, 12].

Таким образом, все исследуемые нами пептиды P1-Arg, P2-Lys и P3-His независимо от их катионного состава аминокислот (Arg, Lys или His) обладают низкой гемолитической активностью (не более 4% гемолиза при 1000 мкМ концентрации пептидов), причем по своим гемолитическим свойствам мало отличаются друг от друга (в пределах 2–4% при той же концентрации пептидов 100–1000 мкМ).

Тем не менее следует отметить некоторое несущественное различие между гемолитическими свойствами, проявляемыми под воздействием пептида P1-Arg и пептидов P2-Lys и P3-His. Так, например, гидрофобность пептидов P1-Arg, P2-Lys и P3-His примерно одинакова за счет того, что все пептиды содержат в своем составе одинаковое число гидрофобных (два остатка Phe) и одинаковое число гидрофильных катионных остатков (по 9 остатков Arg, Lys или His в каждом из соответствующих пептидов) (табл. 1). Поэтому справедливо было ожидать, что гемолитические свойства исследуемых пептидов не будут существенно отличаться друг от друга. Тем не менее, как указывалось выше, гидрофобность аргинин- или гистидин-содержащих пептидов P1-Arg и P3-His (определяемая по времени их удерживания на колонке при офВЭЖХ, табл. 1) немного выше, чем гидрофобность лизин-содержащего пептида P2-Lys. Гемолитические свойства этих пептидов, определенные нами в данной работе, также пропорционально изменяются в соответствии с их гидрофобными свойствами. Как видно из рис. 4, наибольшую и примерно одинаковую гемолитическую активность проявили аргинин- или гистидин-содержащие пептиды P1-Arg и P3-His (при концентрации пептида 500 мкМ, гемолиз для которых составляет 2.4 и 2.7% соответствен-

но), тогда как пептид **P2-Lys**, содержащий в своем составе остатки лизинов, проявил наименьшую гемолитическую активность (1.0% при такой же концентрации пептида, равной 500 мкМ). Таким образом, как гемолитическую активность исследованных пептидов, так и их гидрофобность можно расположить в одном ряду по возрастанию их гемолитической активности и гидрофобности: **P3-His** > **P1-Arg** > **P2-Lys**.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали реактивы для пептидного синтеза фирм Sigma, Fisher Scientific, Bachem, Protein Technologies (США); полистирольный полимер 855013 Novabiochem® NovaSyn®TG Sieber resin, функционализированный 9-Fmoc-аминоксантен-3-илоксильным фрагментом, 200 ммоль/г (Merck Schuchardt OHG, Германия); защищенные аминокислотные мономеры фирмы Protein Technologies (США); конденсирующий реагент HATU – 2-(1*H*-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионийгексафторфосфат (Cat. № 023926, Oakwood Products Inc., США).

Синтез пептидов. Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием Fmoc-стратегии [17] согласно приведенной схеме 1 на пептидном синтезаторе PS3 (Protein Technologies, США), который ранее был приспособлен нами для масштабного препаративного синтеза в реакторном варианте [18, 19]. Содержание основного вещества в синтезированных пептидах по данным офВЭЖХ составляло не менее 95%.

Штаммы микроорганизмов. Штаммы патогенных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 14028 и условно-патогенного гриба *Candida albicans* ЭМТК 34 поддерживали и нарабатывали в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Аналитическую офВЭЖХ проводили на хроматографе LC-20 AD (Shimadzu, Япония) с использованием детектора SPD-M20A (Shimadzu, Япония) на колонке Gemini 5 μm NX-C18, 110 Å, 4.6 × 250 мм (Phenomenex Inc., США), уравновешенной 0.1%-ным раствором TFA, в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 0–80% в течение 30 мин при скорости потока 1 мл/мин, УФ-детекция при длине волны 210, 220, 240 и 260 нм.

Молекулярные массы пептидов (табл. 1) определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (REFLEX III, Bruker Daltonics, Германия) и ESI-MS (LC/MS XCT Ultra, Agilent Technologies, США) в Центре масс-спектрометрического анализа

Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Растворы пептидов для определения антимикробной активности определенной концентрации готовили по сухим навескам непосредственно перед проведением эксперимента. Для всех пептидов **P1-Arg**, **P2-Lys** и **P3-His**, которые содержали по два остатка фенилаланина, дополнительно проводили определение концентрации путем измерения поглощения в ближней УФ-области спектра с использованием значений молярных коэффициентов поглощения при длине волны 260 нм $330 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$, молярные коэффициенты которых ранее были определены, исходя из соответствующих растворов пептидов, приготовленных из сухих навесок. Исходные растворы пептидов с концентрацией 1–2 мМ хранили при –15°C в темноте не более месяца. Непосредственно перед экспериментом растворы разводили до нужной концентрации водой или средой Мюллера–Хинтона. Исходная концентрация пептидов для приготовления проб для дальнейшего испытания их гемолитической активности составляла 10 мМ в воде.

Определение антимикробной активности пептидных препаратов. Для работы использовали взвесь ночных бульонных культур, выращенных на стандартных питательных средах. Количество микроорганизмов (титр) во взвеси определяли по оптической плотности при длине волны 595 нм. Для оценки антибактериального действия пептидов проводили совместное инкубирование клеточных культур с исследуемыми препаратами в 96-луночных планшетах для культивирования. Ночные бульонные культуры ресуспендировали в среде Мюллера–Хинтона (для *C. albicans* – в среде Сабура), доводя количество микроорганизмов до посевной дозы $\sim 5 \times 10^5$ КОЕ/мл. В лунки последовательно вносили раствор исследуемых препаратов, а затем клеточную суспензию в соотношении 1 : 9 по объему (общий объем 200 мкл) в конечных концентрациях 0.3–100 мкМ. В качестве отрицательного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем среды Мюллера–Хинтона (для *C. albicans* – среды Сабура). В качестве положительного контроля вместо тестируемого пептида вносили аналогичный объем растворов AgNO₃ или хлоргексидина в соответствующих разведениях, так же как и для пептидов, в конечных концентрациях 0.3–100 мкМ. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 37°C и 560 об/мин на шейкер-инкубаторе (Kuhner LT-X, АБТЕК, Россия). В нулевой точке и через 2, 4, 5, 6, 7, 8 и 24 ч после начала инкубирования измеряли оптическую плотность суспензии на планшетном спектрофотометре iMark™ (Bio-Rad, США) при длине волны 595 нм. Результаты выражали в виде среднего значения оптической плотности

клеточной суспензии в трех независимых экспериментах, выполненных в двух повторах. Среднестатистическая ошибка (или стандартное отклонение значений экспериментальных данных) при этом не превышала 15–30%. Стандартное отклонение (S) рассчитывали по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x_{cp})^2},$$

где n – число измерений, x_i – i -тый элемент выборки, x_{cp} – среднее арифметическое значение выборки.

Методика расчета МПК₅₀. Исходя из полученных средних значений оптической плотности суспензий клеточных культур, определяли величины относительной степени роста культуры микробных клеток (N_p/N_0) в виде отношения оптической плотности (концентрации) микробных частиц после добавления пептидного препарата (N_p) к оптической плотности (концентрации) в контрольной культуре (N_0). Концентрацию пептида, при которой величина относительной степени роста культуры микробных клеток составляла 50%, определяли по кривым зависимости величины относительной степени роста культуры микробных клеток (N_p/N_0) в процентах от концентрации пептидов.

Фотометрический метод оценки гемолитической активности антимикробных пептидов в отношении эритроцитов человека. Гемолитическую активность исследуемых пептидов тестировали в отношении свежих эритроцитов человека согласно ранее опубликованным методикам [6, 28]. Метод основан на измерении оптической плотности при длине волны 540 нм в надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии эритроцитов, поскольку при разрушении эритроцитов вышедший из клеток гемоглобин придает среде характерную красную окраску, сохраняющуюся после осаждения эритроцитов. Свежие эритроциты человека трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS: 10 мМ Na₂HPO₄, 1.76 мМ K₂HPO₄, рН 7.4), содержащим 173 мМ NaCl и 2.7 мМ KCl. К 50 мкл суспензии эритроцитов в PBS добавляли растворы пептидов в виде двукратных серийных разведений до конечного объема 100 мкл и концентрации суспензии эритроцитов 4% (по объему, за 100% принимали объем суспензии осажденных центрифугированием эритроцитов) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После центрифугирования и отделения осадка измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 540 нм. За 100% гемолиза принимали оптическую плотность раствора, полученную при действии на эритроциты 10%-ного раствора тритона X-100. За 0% принимали оптическую плотность, полученную при

действии на эритроциты “холостого” буферного раствора, не содержащего пептидных проб. Гемолитический анализ проводили дважды с использованием одного образца крови человека. Данные представлены как среднее значение \pm стандартные отклонения трех независимых экспериментов. Средняя ошибка эксперимента при этом не превышала 15–20%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С синтетической точки зрения синтез катионных пептидов общей формулы X₉Phe₂, где X – это остатки аргинина, лизина или гистидина, проходит с примерно одинаковой эффективностью и практически не зависит от их катионного состава:



Замена остатков аргинина на остатки лизина или гистидина в исследованных САМП значительно ухудшает антибактериальные свойства таких САМП в ряду:



т.е. катионный аналог САМП P1-Arg, содержащий остатки аргинина, в этом ряду обладает наибольшей антибактериальной активностью (МПК₅₀ = 43–76 мкМ), а пептид, содержащий остатки гистидина P3-His, фактически не проявляет антибактериальную активность (МПК₅₀ > 100 мкМ).

По отношению к условно-патогенной дрожжевой культуре *C. albicans* все пептиды в целом проявляют более высокую активность, чем к бактериальным культурам, их воздействие в среднем оказалось в 6–10 раз выше, чем такое же воздействие на бактериальные клетки.

Однако порядок эффективности противогрибкового воздействия исследованных пептидов P1-Arg, P2-Lys и P3-His на *C. albicans* совершенно другой, чем в случае воздействия их на бактериальные культуры клеток. По эффективности воздействия на дрожжевые культуры *C. albicans* исследованные пептиды расположены в следующем ряду:



Принимая во внимание одинаковую эффективность синтеза и примерно одинаковую низкую токсичность исследованных САМП, для создания антибактериальных препаратов на основе САМП с “линейным” типом амфипатичности рекомендуется использовать САМП, содержащие в качестве катионных групп аминокислотные остатки аргинина, а для создания антигрибковых препаратов необходимо использовать пептиды с остатками гистидина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Штаммы микроорганизмов взяты из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке грантов Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2017–2020 годы (VI.62.1.4, 0309-2016-0004 и VI.55.1.1, 0309-2016-0002).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи исследований с использованием животных в качестве объектов.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей (отбор крови для тестирования гемолитической активности препаратов), соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике, Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Peschel A., Sahl H.G.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 529–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1441>
2. *Bahar A.A., Ren D.* // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013. V. 6. P. 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
3. *Chung P.Y., Khanum R.J.* // *Microbiol. Immunol. Infect.* 2017. V. 50. P. 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
4. *Overton K., Greer H.M., Ferguson M.A., Spain E.M., Elmore D.E., Nunez M.E., Volle C.B.* // *Langmuir*. 2020. V. 36. P. 650–659. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02726>
5. *Bilikova K., Huang S.C., Lin I.P., Šimuth J., Peng C.C.* // *Peptides*. 2015. V. 68. P. 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.001>
6. *Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V.* // *J. Pept. Sci.* 2015. V. 21. P. 105–113. <https://doi.org/10.1002/psc.2732>
7. *Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatskiy M.* // *Drug Discov. Today*. 2010. V. 15. P. 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>
8. *Jiang Z., Vasil A.I., Hale J.D., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S.* // *Biopolymers*. 2008. V. 90. P. 369–383. <https://doi.org/10.1002/bip.20911>
9. *Huang Y.B., Huang J.F., Chen Y.X.* // *Protein Cell*. 2010. V. 1. P. 143–152. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>
10. *Bechinger B., Gorr S.U.* // *J. Dent. Res.* 2017. V. 96. P. 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
11. *Matsuzaki K., Sugishita K., Harada M., Fujii N., Miyajima K.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1327. P. 119–130. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(97\)00051-5](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00051-5)
12. *Смирнова М.П., Афонин В.Г., Шпень В.М., Тяготин Ю.В., Колодкин Н.И.* // *Биоорг. химия*. 2004. Т. 30. С. 458–465. [*Smirnova M.P., Afonin V.G., Shpen' V.M., Tyagotin Yu.V., Kolodkin N.I.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2004. V. 30. P. 409–416.] <https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000043782.21640.c2>
13. *Амирханов Н.В., Тукунова Н.В., Пышный Д.В.* // *Биоорг. химия*. 2018. Т. 44. С. 492–505. <https://doi.org/10.1134/S0132342318050032> [*Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 492–503.] <https://doi.org/10.1134/S1068162018050035>
14. *Amirkhanov N.V., Tikunova N.V., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 833–841. <https://doi.org/10.1134/S1068162019060037>
15. *Chen Y., Mant C.T., Farmer S.W., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 12316–12329. <https://doi.org/10.1074/jbc.m413406200>
16. *Schiffer M., Edmundson A.B.* // *Biophys. J.* 1967. V. 7. P. 121–135. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(67\)86579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2)
17. *Chan W.C., White P.D.* // *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach* / Eds. Chan W.C., White P.D. Oxford: IRL Press, 2000. P. 64–66.
18. *Amirkhanov N.V., Zhang K., Aruva M.R., Thakur M.L., Wickstrom E.* // *Bioconjug. Chem.* 2010. V. 21. P. 731–740. <https://doi.org/10.1021/bc900523c>
19. *Амирханов Н.В., Амирханов Р.Н., Зарытова В.Ф.* // *Биоорг. химия*. 2012. Т. 38. С. 692–705. [*Amirkhanov N.V., Amirkhanov R.N., Zarytova V.F.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2012. V. 38. P. 613–624.] <https://doi.org/10.1134/s1068162012060027>
20. *Khurshid Z., Najeeb S., Mali M., Moin S.F., Raza S.Q., Zohaib S., Sefat F., Zafar M.S.* // *Saudi Pharm. J.* 2017. V. 25. P. 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.027>
21. *Tsai H., Bobek L.A.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1336. P. 367–369. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(97\)00076-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00076-7)
22. *Oppenheim F.G., Xu T., McMillian F.M., Levitz S.M., Diamond R.D., Offner G.D., Troxler R.F.* // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 7472–7477. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68522-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68522-9)

23. Helmerhorst E.J., Reijnders I.M., van't Hof W., Simoons-Smit I., Veerman E.C., Amerongen A.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. P. 702–704. <https://doi.org/10.1128/aac.43.3.702>
24. Xu T., Levitz S.M., Diamond R.D., Oppenheim F.G. // *Infect. Immun.* V. 1991. V. 59. P. 2549–2554. <https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2549-2554.1991>
25. Lin A.L., Shi Q., Johnson D.A., Patterson T.F., Rinaldi M.G., Yeh C.K. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999. V. 6. P. 851–855.
26. Qin Y., Zhang L., Xu Z., Zhang J., Jiang Y.Y., Cao Y., Yan T. // *Virulence.* 2016. V. 7. P. 512–526. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1138201>
27. Puri S., Edgerton M. // *Eukaryot. Cell.* 2014. V. 13. P. 958–964. <https://doi.org/10.1128/ec.00095-14>
28. Jacobsen F., Mohammadi-Tabrasi A., Hirsch T., Mittler D., Mygind P.H., Sonksen C.P., Raventos D., Kristensen H.H., Gatermann S., Lehnhardt M., Daigeler A., Steinau H.U., Steinstraesser L. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. V. 59. P. 493–498. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl513>

Synthetic Antimicrobial Peptides. III. The Effect of Cationic Groups of Lysine, Arginine and Histidine on the Antimicrobial Activity of Peptides with a “Linear” Type of Amphipathy

N. V. Amirkhanov*, #, A. V. Bardasheva*, N. V. Tikunova*, and D. V. Pyshnyi*

#Phone: +7 (383) 363-51-35; e-mail: nariman@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

We studied the antimicrobial and hemolytic activity of synthetic antimicrobial peptides (CAMPs) Arg₉Phe₂ (**P1**-Arg), Lys₉Phe₂ (**P2**-Lys) and His₉Phe₂ (**P3**-His), which have a linear type of amphipathy and contain cationic amino acid residues of arginine, lysine or histidine. Using various pathogenic microorganism strains of gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, as well as the conditionally pathogenic yeast fungus *Candida albicans*, it has been shown that replacing arginine residues with lysine or histidine residues in the studied CAMPs significantly degrades their antibacterial properties that antibacterial activity which is located in the series **P1**-Arg > **P2**-Lys ≧ **P3**-His. The cationic analog of SAMP **P1**-Arg has the highest antibacterial activity (MIC₅₀ from 43 to 76 μM), and the **P3**-His peptide does not actually show antibacterial activity (MIC₅₀ > 100 μM). In relation to the conditionally pathogenic yeast culture of *C. albicans*, the **P1**-Arg and **P2**-Lys peptides generally showed more than 6–10 times (MIC₅₀ 6.7 and 10.9 μM), and the peptide and **P3**-His more than 100 times (MIC₅₀ 0.6 μM) increased antimycotic activity, compared with their similar effect on bacterial cells. All the peptides studied with the “linear” type of amphipathicity **P1**-Arg, **P2**-Lys and **P3**-His, containing only two Phe residues and having low hydrophobicity, regardless of their cationic composition of amino acids (Arg, Lys or His) exhibit a relatively low hemolytic activity (not more than 4% hemolysis at 1000 μM peptide concentration). Thus, taking into account the same synthesis efficiency (56–63%) and approximately the same low toxicity of the studied SAMPs, it is recommended to use SAMPs containing amino acid residues of arginine as cationic groups to create antibacterial preparations based on SAMPs with a “linear” type of amphipathicity, and to create peptides with histidine residues must be used among the SAMPs among the antifungal peptide preparations that we studied.

Keywords: solid-phase synthesis of peptides, synthetic antimicrobial peptides, amphiphilicity, linear type of amphipathicity, circular type of amphipathicity, hemolytic activity, selectivity, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *histatins*



УДК 577.11+004.942

МАТРИЧНАЯ СБОРКА ДНК-НАНОСТРУКТУР ИЗ РАЗВЕТВЛЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 2021 г. А. А. Фокина*, **, Ю. Е. Полетаева***, Е. А. Буракова*, **, А. Ю. Бакулина*, ****, Т. С. Зацепин*****, *****, Е. И. Рябчикова*, ***, Д. А. Стеценко*, **, #

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

**ФГБУН Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10

***ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

****ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора,
Россия, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово

*****Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205, Московская обл.,
Инновационный центр “Сколково”, Большой бульвар, 30, стр. 1

*****Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Поступила в редакцию 17.10.2020 г.

После доработки 26.11.2020 г.

Принята к публикации 20.12.2020 г.

Ранее нами был предложен способ построения трехмерных наноконструкций на основе нуклеиновых кислот, основанный на матричной сборке с использованием в качестве матрицы и строительных блоков разветвленных олигонуклеотидов, в состав которых включены линкеры ненуклеотидной природы, в частности точки разветвления, соединяющие две или три олигонуклеотидные цепи. В данной работе мы осуществили синтез разветвленных олигонуклеотидных матриц (для сборки ДНК-тетраэдра и ДНК-куба) и разветвленного олигонуклеотидного строительного блока, а также предприняли попытку матричной сборки ДНК-тетраэдра.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, ДНК-нанотехнология, твердофазный синтез, фотолabile защитная группа, клик-химия, реакция азид-алкинового [3+2]циклоприсоединения, промотируемая напряжением цикла (SPAAC)

DOI: 10.31857/S0132342321030064

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее динамично развивающихся направлений химии нуклеиновых кислот выступает ДНК-нанотехнология [1, 2], которая рассматривает молекулу ДНК как уникальный мате-

риал для конструирования разнообразных наноархитектур [3], что открывает возможность создания на основе ДНК динамических наноустройств [4], наномашин [5] и нанороботов [6, 7]. В основе данного применения лежит присущая полинуклеотидам способность к комплементарному уотсон-криковскому связыванию, а также к образованию структур более высокого порядка [3]. Предложенный в 2006 г. метод ДНК-оригами [8], состоящий в “укладке” (folding) протяженной одноцепочечной молекулы ДНК, например, кольцевого генома фага M13, с помощью сотен олигонуклеотидов-“скрепок”, комплементарных уникальным участкам ДНК, за прошедшие полтора десятилетия развился в практическую технологию формирования двумерных и трехмерных ДНК-наноструктур с потенциалом применения в биомедицине для биоанализа [9], создания биосенсоров [10], биоимиджинга [11], доставки ле-

Сокращения: ОН – олигонуклеотид; РО – разветвленный олигонуклеотид; РОМ – разветвленная олигонуклеотидная матрица; РОСТ – разветвленный олигонуклеотидный строительный блок; РЭ – размыкаемый элемент; ВСN – бицикло[6.1.0]нонин-4; ВР – краситель бромфеноловый синий; DMTr – 4,4'-диметокситритил; DTT – дитиотреит; EtBr – бромистый этидий; MMTr – 4-метокситритил; NPOМ – 1-(2-нитропиперонил)этоксиметильная группа; SPAAC – реакция азид-алкинового [3+2]циклоприсоединения, промотируемая напряжением цикла; TEAA – ацетат триэтиламмония; ТНРТА – трис-гидроксипропилтриазолилметиламин; префиксы d и g в обозначениях олигодезокси- и 2'-O-метилрибонуклеотидов опущены.

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 363-49-63; эл. почта: d.stetsenko@nsu.ru).

карств [12, 13] и иммунотерапии [14]. В основе большинства современных вариантов ДНК-оригами лежит сочетание компьютерных алгоритмов программируемой самосборки молекул ДНК [15, 16] с методами манипуляции протяженными ДНК из арсенала молекулярной биологии [17]. Однако использованию методов химической модификации участков нуклеиновых кислот при рациональном конструировании наноархитектур, на наш взгляд, все еще уделяется недостаточно внимания [18]. Это приводит к усложнению и увеличению размеров и массы ДНК-модулей для сборки наноархитектур, что может вызывать дополнительные проблемы при проникновении в клетку [19]. Представляется вероятным, что объемные ДНК-модули могут быть заменены относительно простыми синтетическими модифицированными олигонуклеотидами, в частности разветвленными олигонуклеотидами. Это позволило бы расширить интервал размеров получаемых ДНК-наноструктур в направлении нижней границы диапазона (~10 нм). Таким образом, дополнение метода ДНК-оригами приемами из арсенала твердофазного олигонуклеотидного синтеза и химической модификации нуклеиновых кислот с целью создания новых технологий конструирования трехмерных нанообъектов и функциональных наноустройств представляется актуальной задачей.

В ранее опубликованной работе мы предложили способ конструирования дискретных многогранников на основе нуклеиновых кислот (“энкаэдров”) по принципу матричной сборки из разветвленных олигонуклеотидных блоков, формирующих вершины и ребра энкаэдра, с использованием в качестве матрицы (каркаса) разветвленного олигонуклеотида (РО), структура которого определяется формой целевого многогранника, например, тетраэдра, куба, октаэдра и т.п. [20]. Наиболее подходящим способом получения соответствующих РО представляется комбинация автоматизированного твердофазного синтеза (с использованием ненуклеозидных фосфитамидных реагентов различной функциональности) с постсинтетической конъюгацией в растворе, например, при помощи методов клик-химии [21].

Ранее нами был обоснован расчетами выбор последовательностей олигонуклеотидов для конструирования разветвленных олигонуклеотидных матриц (РОМ) для сборки ДНК-тетраэдра, ДНК-куба и ДНК-аналога фуллерена C₂₄, а также разветвленного олигонуклеотидного строительного блока (РОСТ), общего для всех этих топологий [20]. Был определен набор необходимых ненуклеозидных разветвляющих и модифицирующих реагентов для получения матриц и разветвленного строительного блока.

Настоящая работа была сосредоточена на решении двух основных задач: 1) получение разветвленных олигонуклеотидов (РО), служащих для построения олигонуклеотидных матриц для сборки ДНК-тетраэдра и ДНК-куба, и разветвленного олигонуклеотидного строительного блока (РОСТ), общего для обоих многогранников; 2) практическая отработка подходов к конструированию конкретных энкаэдров (на примере ДНК-тетраэдра) на основе направленной самосборки разветвленных олигонуклеотидных блоков на каркасе разветвленной олигонуклеотидной матрицы (РОМ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Простейшей моделью для отработки условий матричной сборки энкаэдров служит ДНК-тетраэдр. Предложенная последовательность операций матричной сборки ДНК-тетраэдра изложена в работе Vakilina et al. [20]. В качестве “четыревалентной” (т.е. формирующей четыре вершины будущего тетраэдра) разветвленной олигонуклеотидной матрицы (РОМ-1) для сборки ДНК-тетраэдра выступает димер разветвленного олигонуклеотида Y (“вилки”), формирующийся за счет самокомплементарного олиго-2'-O-метилрибонуклеотида ОН1 и содержащий четыре одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотида ОН2 (рис. 1а). Первый шаг сборки – гибридизация матрицы РОМ-1 с разветвленным олигонуклеотидным строительным блоком – “звездочкой” РОСТ-1 (рис. 1е), формирующая четыре вершины тетраэдра, с образованием дуплексов ОН2:ОН3.

В результате гибридизации самокомплементарных олигодезоксирибонуклеотидов ОН4 из состава “звездочки” РОСТ-1 (рис. 1е) образуются ребра тетраэдра, при этом формируется пирамидальная супрамолекулярная двучепочечная ДНК-конструкция в виде ДНК-тетраэдра, вершины которого соединены внутренним каркасом из матрицы РОМ-1. В качестве побочных продуктов возможно получение изомерных конструкций, имеющих отличную от тетраэдра топологию.

Для конструирования матрицы РОМ-1 был получен разветвленный олигонуклеотид Y (рис. 1а). Как следует из анализа электрофоретической денатурирующей и нативного гель-электрофореза, матрица РОМ-1 образуется путем димеризации “вилки” Y за счет аутогибридизации самокомплементарного олиго-2'-O-метилрибонуклеотида ОН1 (рис. 2).

Для матричной сборки ДНК-куба требуется “восьмивалентная” разветвленная матрица РОМ-2, формирующая восемь вершин куба (например, рис. 1д). Попытка прямого твердофазного синтеза олигонуклеотида, соответствующего данной топологии матрицы, не увенчалась успехом из-за

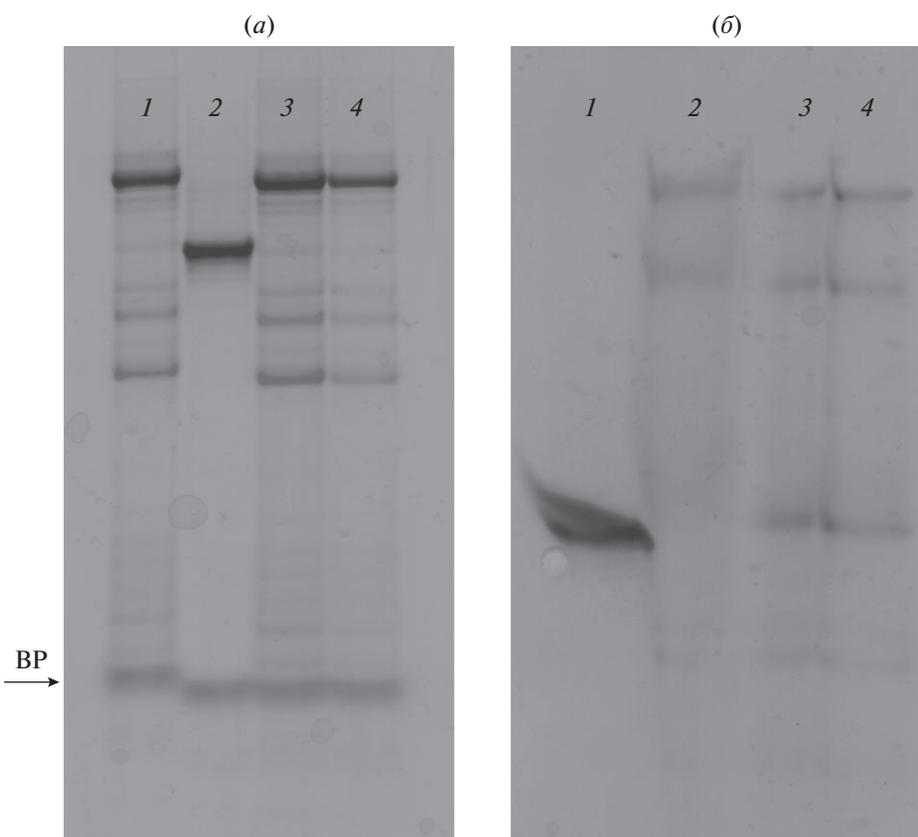


Рис. 2. (а) – Электрофоретический анализ олигонуклеотидов в 20%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, с окрашиванием красителем Stains-All. Дорожки: 1 – “вилка” Y после 2 мин прогрева при 95°C и быстрого нанесения на гель под напряжением; 2 – маркер длины **D157** (одноцепочечный олигодезоксирибонуклеотид длиной 34 нт); 3 – “вилка” Y (0.1 о.е.); 4 – “вилка” Y (0.05 о.е.). ВР – краситель бромфеноловый синий; (б) – нативный электрофорез в 15%-ном ПААГ, окрашивание красителем Stains-All. Дорожки: 1 – **D157** после 2 мин прогрева при 95°C и быстрого нанесения на гель под напряжением; 2 – “вилка” Y в 1 М NaCl; 3 – “вилка” Y без 1 М NaCl; 4 – “вилка” Y без 1 М NaCl после 2 мин прогрева при 95°C с последующей инкубацией 10 мин при 0°C.

олигонуклеотида: РО-азид, содержащий одну 6-азидогексаноильную группу, введенную по 3'-концу ОН2 через амиолинкер С7 (рис. 1б), и РО-гекс, содержащий два остатка 1-гексина, введенные посредством конденсации коммерческого 1-гексинильного фосфитамида вслед за симметричным удвоителем на 5'-конце ОН1 (рис. 1в).

Конъюгация РО-азид и РО-гекс (4 : 1) по реакции СуААС была осуществлена по методике, разработанной ранее [24]. Однако по данным гель-электрофореза (данные не приведены) основным продуктом реакции выступал монозамещенный конъюгат РО-гекс с одной молекулой РО-азид (рис. 1г) наряду с множественными полосами, вероятно, соответствующими деградации олигонуклеотидов при воздействии солей меди(I) и (II) даже в присутствии лиганда ТНРТА (*трипс*-гидроксипропилтриазилилметиламин).

Чтобы избежать деградации олигонуклеотида в присутствии солей меди, было решено использовать для синтеза нового варианта матрицы РОМ-2' реакцию “безмедного клика”, а именно

некаталитическую реакцию алкин-азидного циклоприсоединения, промотируемую напряжением в производном циклооктина (SPAAC) [25–28]. Для решения этой задачи был синтезирован новый набор разветвленных олигонуклеотидов (рис. 3). Получение бициклоноинового (BCN) производного (рис. 3г) протекало с высоким выходом из соответствующего 3'-аминогексильного предшественника и коммерческого активированного карбоната бицикло[6.1.0]нонина-4. Однако с очисткой диазидного компонента от примеси соответствующего монопроизводного возникли трудности. Полученные реакционные смеси не удавалось эффективно разделить ни с помощью офВЭЖХ, ни с помощью электрофореза в ПААГ. После перебора нескольких вариантов синтеза наилучший результат показало *бис*-азидоацетильное производное РО-азид' (рис. 3б), полученное с помощью коммерческого амиолинкера с последующей обработкой *N*-гидроксисукцинимидным эфиром азидоуксусной кислоты, приготовленным *in situ*.

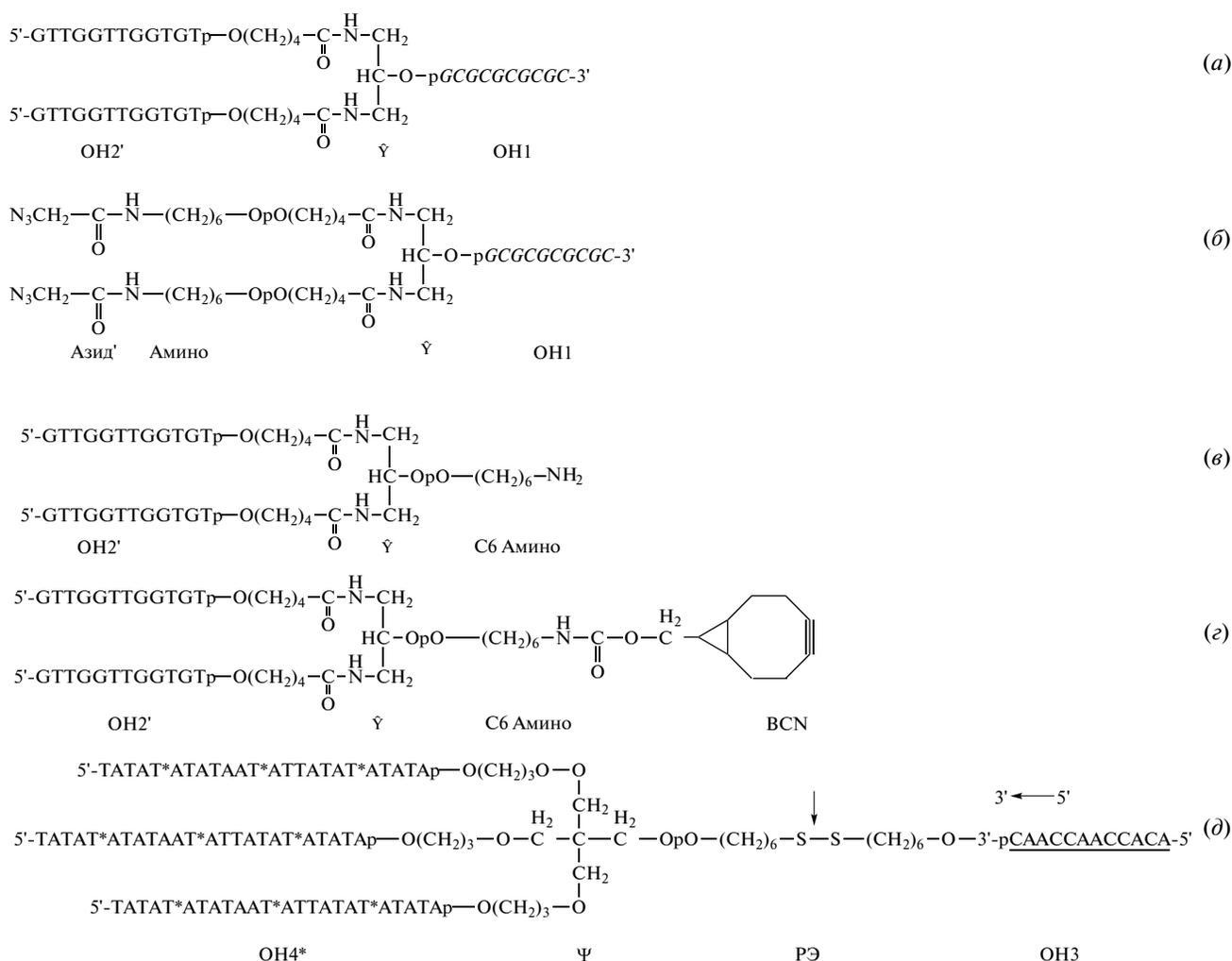


Рис. 3. Структуры и последовательности разветвленных олигонуклеотидов (РО), полученных на втором этапе работы: (а) – “вилки” $\hat{\text{Y}}$ – мономера для сборки “четырёхвалентной” разветвленной олигонуклеотидной матрицы РОМ-1' для ДНК-тетраэдра; (б) – РО-азид' – азидного фрагмента “восьмивалентной” матрицы (РОМ-2') для сборки ДНК-куба; (в) – РО-С6-амино – исходного материала для синтеза бициклоклононинового (BCN) фрагмента матрицы РОМ-2' (РО-BCN) (г); (д) – “звездочки” – разветвленного олигонуклеотидного строительного блока РОСТ-2'. Обозначения: $\hat{\text{Y}}$ – остаток симметричного удвоителя (symmetric doubler); Ψ – остаток симметричного утроителя (trebler); p – фосфодиэфирная группа $-\text{P}(=\text{O})(-\text{O}-)$; OH – олигонуклеотид; PЭ – размыкаемый элемент, вертикальной стрелкой указана расщепляемая дисульфидная связь; С6 Амино – 6-аминогексильная группа; Амино – остаток аминокислоты; BCN – остаток бицикло[6.1.0]нонина-4; Азид' – азидацетильная группа; Т* – остаток тимидина с фотолabileйной защитной группой (NPOM). Дезоксирибонуклеотиды обозначены прописными буквами, 2'-O-метилрибонуклеотиды – курсивом, последовательность OH3, собранная из “обратных” 5'-фосфитамидов в направлении 5'–3', подчеркнута, направление последовательности указано горизонтальной стрелкой; опущены префиксы d и r для обозначения олигодезоксирибонуклеотидов и олиго-2'-O-метилрибонуклеотидов соответственно.

Предпринятый синтез мономера матрицы РОМ-2' из РО-азид' и РО-BCN в соотношении 1 : 4 по реакции “безмедного клика” (SPAAC) (рис. 4) протекал значительно медленнее, чем каталитическая версия (CuAAC). В результате после 72 ч при 40°C, что значительно жестче условий, принятых в работе Jawalekar et al. [28] (комнатная температура, 12 ч), на электрофореграмме можно было зарегистрировать в основном образование монозамещенного продукта и лишь следовых количеств целевого дизамещенного олигонуклеоти-

да (рис. 5). Таким образом, и этот путь конструирования “восьмивалентной матрицы” РОМ-2' не привел к успеху, и отработка условий для матричной сборки ДНК-куба требует дальнейших исследований.

Далее был осуществлен синтез разветвленных олигонуклеотидных строительных блоков – “звездочек” РОСТ-1 и РОСТ-2 (рис. 1e и рис. 3d соответственно), которые, по нашим расчетам, могут использоваться для сборки как ДНК-тетраэдра, так и ДНК-куба [20]. Наибольшие пробле-

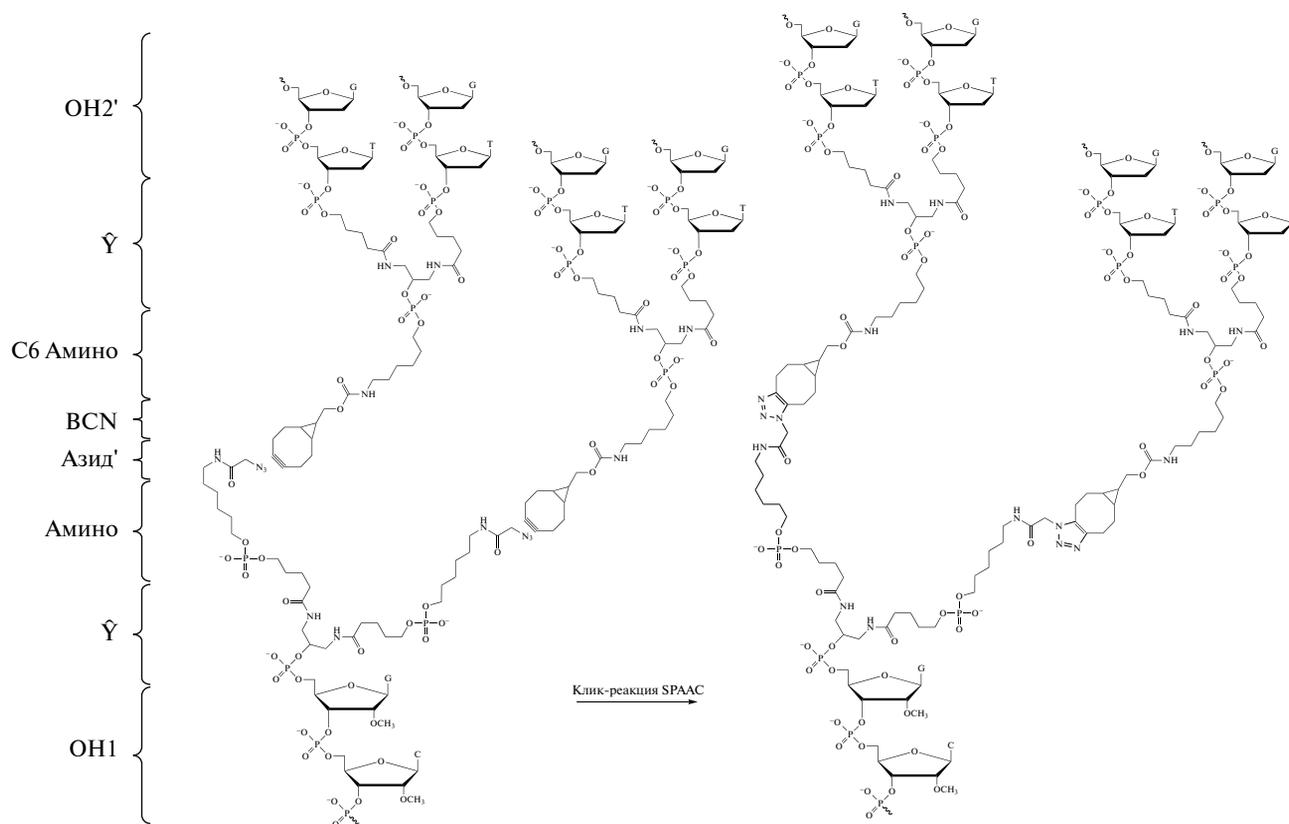


Рис. 4. Схема синтеза “восьмивалентной” матрицы POM-2’ для ДНК-куба с помощью реакции “безмедного клика” (SPAAC) [14] между разветвленными олигонуклеотидами, содержащими азидоацетильные группы (Азид’) и остатки бицикло[6.1.0]нонина-4 (BCN), между которыми происходит реакция [2+3]циклоприсоединения с образованием 1,4,5-тризамещенного 1,2,3-триазола. Обозначения у фигурных скобок слева соответствуют рис. 5.

мы вызвало введение размыкаемого элемента, а именно дисульфидной связи, с помощью коммерческого дисульфидного фосфитамида. Выход олигонуклеотида после 6 мин конденсации свежеприготовленного 0.15 М раствора дисульфидного фосфитамида в абсолютном ацетонитриле не превышал 40% по офВЭЖХ. Увеличение времени конденсации до 15 мин не привело к повышению выхода целевого компонента. При синтезе “звездочек” неудовлетворительная конденсация дисульфидного фосфитамида вызывала наибольшие потери продукта.

С использованием матрицы POM-1 и разветвленного олигонуклеотидного блока РОСТ-1 в соотношении 1 : 4 была предпринята матричная сборка ДНК-тетраэдра. Анализ реакционной смеси с помощью нативного гель-электрофореза в агарозе показал наличие продукта, соответствующего по молекулярной массе расчетной массе ДНК-тетраэдра (рис. 6). В то же время в смеси присутствовало значительное количество полимерных продуктов большой молекулярной массы, не обладающих подвижностью в геле. Образование высокомолекулярных продуктов можно объяснить неконтролируемой полимеризацией “звездочки” РОСТ-1 за счет гибридизации самокомплементарных олигонуклеотидов ОН4 (рис. 1e).

С помощью просвечивающей электронной микроскопии было показано присутствие наряду с полимерными продуктами дискретных продуктов с линейными размерами <50 нм, которые могут соответствовать агрегатам “звездочки” РОСТ-1 (рис. 7).

Полученные результаты убедительно продемонстрировали необходимость использования защитной группы, которая препятствовала бы преждевременной аутогибридизации “звездочки”. В качестве защитной группы нами была использована фотолabile 1-(2-нитропиперонил)-этоксиметильная группа (NPOM) в положении 3 остатка тимидина, предложенная ранее для сходных целей Deuters et al. [29–31]. Исследование скорости удаления NPOM-группы с остатка тимидина в составе модельного олигонуклеотида **D574** при облучении УФ-светом ($\lambda = 365$ нм) показало (табл. 1), что для >90%-ного отщепления в оптимизированных условиях требуется не менее 4 ч (рис. 8, дорожки 4 и 5). Длина волны была подобрана с целью минимизации возможного образования фотодимера тимидина и других нежелательных

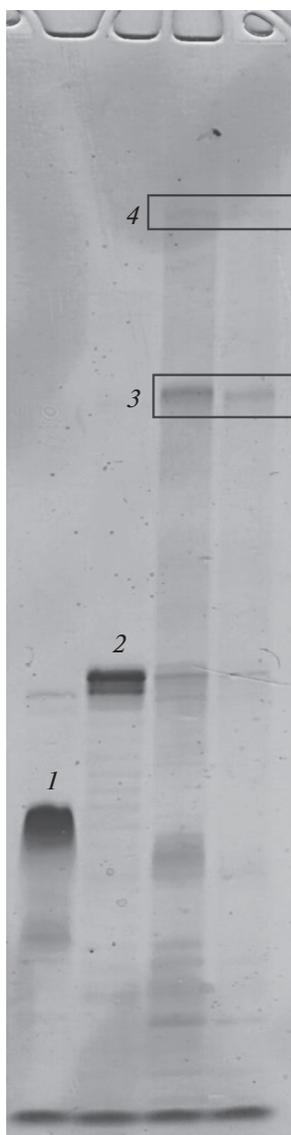


Рис. 5. Электрофореграмма реакции “безмедного” клика (SPAAC). Обозначения полос: 1 – Азид; 2 – BСN; 3, 4 – продукты циклоприсоединения моно(основной) и бис-(следы) соответственно.

фотопродуктов. Как видно из электрофореграммы на рис. 8 (дорожки 1–3), облучение “звездочки” РОСТ-2 (олигонуклеотид **D570**), содержащей по три остатка NPOM-T(T*) на ветвь (рис. 3д), в Трис-ацетатном буфере (ТАЕ, рН 7.6) УФ-светом ($\lambda = 365$ нм) в течение 5 ч и последующая обработка 100 мМ дитиотреитом (ДТТ) в течение 1 ч для разрыва дисульфидной связи, как и ожидалось, приводили к снижению электрофоретической подвижности олигонуклеотида.

Сборку ДНК-тетраэдра на основе матрицы РОМ-1' и “звездочки” РОСТ-2 (рис. 3а и 3д соответственно) проводили поэтапно в следующей последовательности: отжиг – инкубация – УФ-

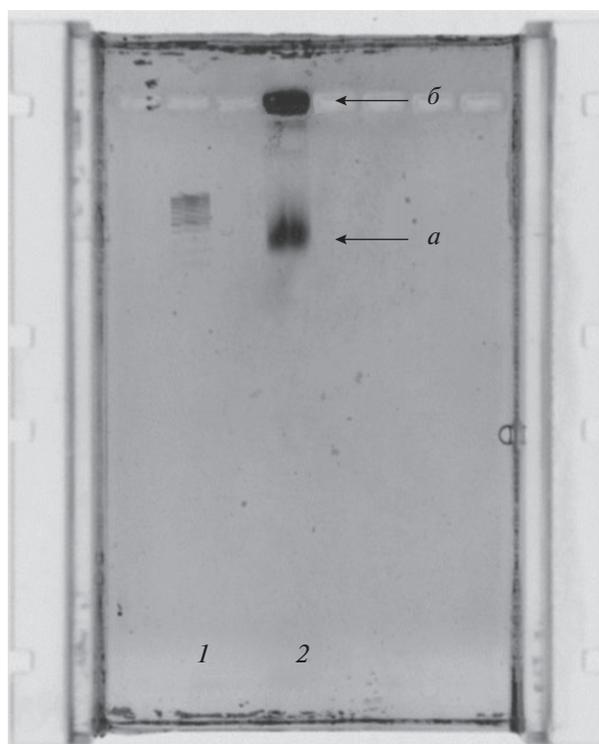


Рис. 6. Анализ продуктов матричной сборки ДНК-тетраэдра с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Дорожки: 1 – ДНК-маркеры 100–1000 нт; 2 – реакционная смесь после сборки ДНК-тетраэдра из РОМ-1 и РОСТ-1 (4 экв.); а – интенсивная полоса с размером между 200 и 400 нт; б – высокомолекулярные продукты, не вошедшие в гель (предположительно агрегаты конкатемерной природы).

облучение ($\lambda = 365$ нм) – восстановление ДТТ. Наличие продукта проверяли при помощи электрофореза в нативных условиях: в 8%-ном ПААГ или 0.75%-ном агарозном геле (условия – см. “Эксперим. часть”) (рис. 9). В указанных условиях не удалось достоверно зарегистрировать образование целевой наноструктуры. Однако, как видно из рис. 9а, матрица РОМ-1' присутствует в виде димера, что согласуется с концепцией сборки.

На заключительном этапе работы было решено провести сборку комплекса при соотношении РОМ-1' и РОСТ-2 (олигонуклеотиды **D544** и **D570** соответственно) 1 : 8 и повышенной до 1 мкМ концентрации матрицы. В данных условиях нам удалось зафиксировать образование комплекса матрицы и “звездочки” до облучения (рис. 10б и 10г). Однако после облучения УФ-светом нам не удалось достоверно зарегистрировать образование наноструктур в нативном 8%-ном ПААГ. При попытке зафиксировать образование наноструктур в 0.75%-ном агарозном геле с целью увеличения стабильности комплексов в буфер для электрофореза добавляли $MgCl_2$ до концентрации 10 мМ. Как видно из рис. 9в, это привело к

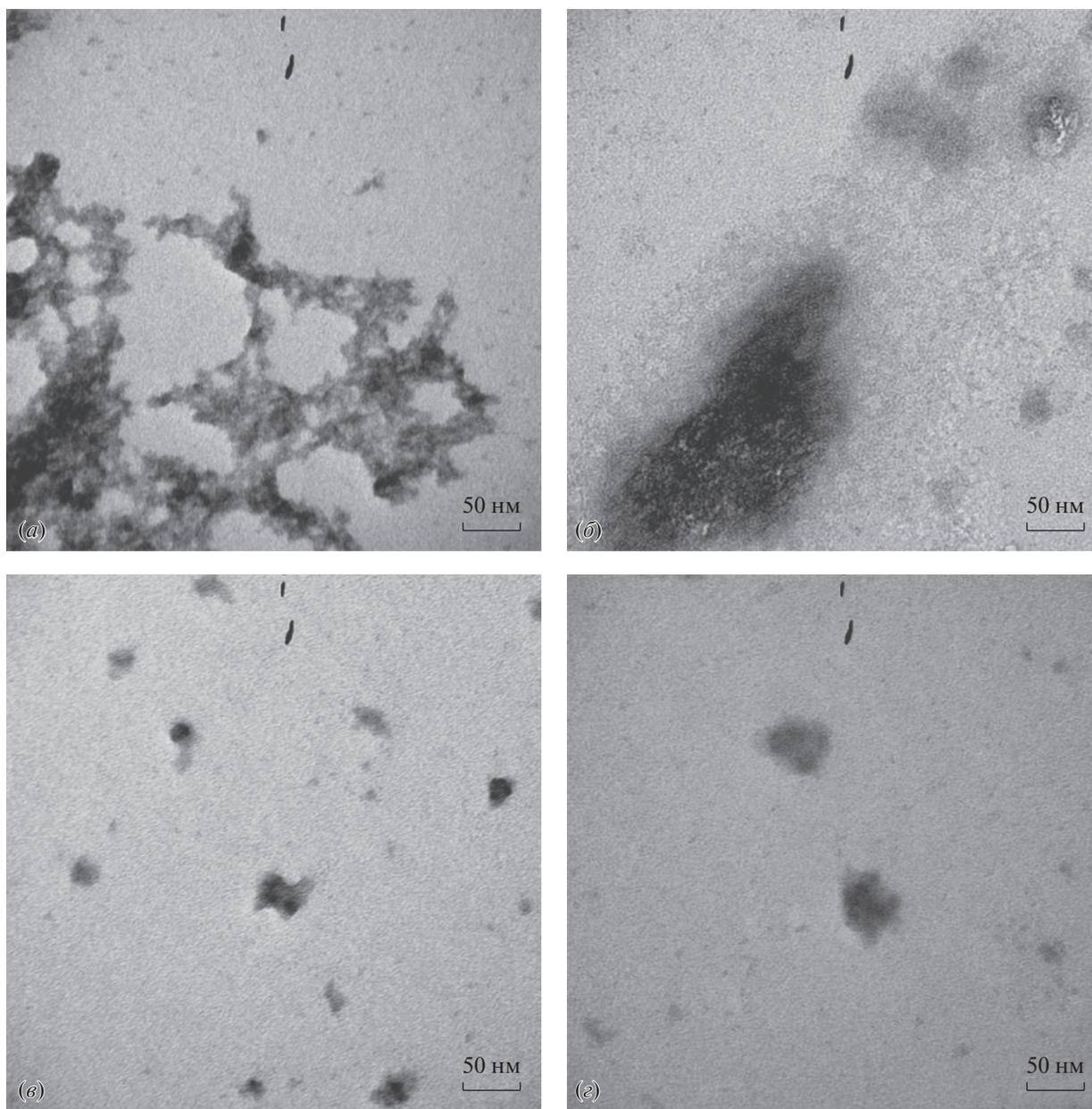


Рис. 7. Микрофотографии образцов олигонуклеотидов, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии: (а) – POM-1; (б) – POCT; (в) и (г) – продукты матричной сборки ДНК-тетраэдра из POM-1 и POCT-1 в соотношении 1 : 4; [POCT-1] = 0.3 мкМ. Негативное контрастирование ацетатом уранила.

ухудшению разрешения полос ДНК в геле. Тем не менее можно отметить, что интенсивность полос при окрашивании бромистым этидием (EtBr), который преимущественно связывается с двуцепочечной ДНК, в случае облученных комплексов **D544–D570** значительно выше по сравнению с полосами необлученных образцов при одинаковом количестве нанесенных образцов (рис. 9б). Это свидетельствует в пользу образования ДНК-наноструктур, содержащих большое число двуцепочечных участков, что соответствует концепции сборки.

Препараты, полученные на финальной стадии сборки ДНК-тетраэдра и очищенные в агарозном геле, содержали дискретные нанообъекты размерами 10–12 нм, что хорошо согласуется с результатами компьютерного моделирования, опубликованными нами ранее [20] (рис. 10). Эти нанообъекты могут представлять собой искомые ДНК-тетраэдры. Визуализацию олигонуклеотидных структур в просвечивающем электронном микроскопе осуществляли с использованием иона уранила UO_2^{2+} , который специфически свя-

Таблица 1. Удаление фотолabileной 1-(2-нитропиперонил)-этоксиметильной группы NPOМ с модельного олигонуклеотида 5'-TGTTT*GGCGC-3' (**D574**) при УФ-облучении ($\lambda = 365$ нм)

| Время облучения, ч | Степень удаления, %** |
|--------------------|-----------------------|
| 1 | 38 |
| 3 | 76 |
| 4 | 88 |
| 4*** | 91 |

* Положение остатка 3-NPOМ-тимидина.

** По данным офВЭЖХ (см. “Эксперим. часть”).

*** В УФ-прозрачной пластиковой пробирке для ПЦР объемом 200 мкл.

зывается с фосфатными группами ДНК в соотношении 1 : 2 [32, 33]. В качестве контрастирующего реагента для визуализации ДНК-наноструктур предпочтительнее использовать формиат уранила



Рис. 8. Электрофореграмма олигонуклеотидов: **D570** (“звездочка” РОСТ-2, рис. 5д) до (дорожка 1) и после (дорожка 2) облучения УФ-светом ($\lambda = 365$ нм) и после обработки ДТТ (дорожка 3); **D574** до (дорожка 4) и после (дорожка 5) облучения УФ-светом ($\lambda = 365$ нм). Условия: 15%-ный ПААГ, 8 М мочевины, 1× ТВЕ, рН 8,3, окрашено красителем Stains-All. ВР – краситель бромфеноловый синий.

$UO_2(HCOO)_2$, дающий более тонкое “зерно” [34–36]. В данной работе для выявления ДНК-наноструктур мы использовали ацетат уранила $UO_2(CH_3COO)_2$ [37], поскольку формиат уранила производится только в США, и его экспорт запрещен. В результате оказалось невозможным однозначно подтвердить с помощью просвечивающей электронной микроскопии, что топология полученных нанообъектов соответствует ДНК-тетраэдру. Для этого требуются дополнительные исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для офВЭЖХ использовали ацетонитрил UHPLC grade Supergradient (Panreac, Испания). Раствор ацетата триэтиламмония (ТЕАА, 2 М, рН 7.0) был приготовлен из триэтиламина ACS grade (Panreac, Испания) и ледяной уксусной кислоты (о.с.ч., Реахим, Россия). Дихлоруксусная кислота, иод, 0.25 М раствор 4,5-дицианимидазола (DCI) в безводном ацетонитриле, краситель Stains-All, ксиленцианол FF и бромфеноловый синий (BP) были приобретены у компании Sigma-Aldrich (США), перхлорат натрия – у фирмы Acros Organics (США), дихлорметан, тетрагидрофуран, пиридин и триэтиламин – у фирмы Panreac (Испания). Формамид, акриламид, *N,N'*-метиллен-бис-акриламид, мочевины, трис(гидроксиметил)-аминометан (Трис), борная кислота, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na_2 ЭДТА) были приобретены у компании Диаэм (Россия). Концентрированный водный раствор аммиака (о.с.ч.), уксусная кислота (о.с.ч.) и ацетон (о.с.ч.) были производства Реахим (Россия). Все реактивы были наивысшей степени чистоты, доступной у соответствующих коммерческих поставщиков. Ацетонитрил (UHPLC grade Supergradient, Panreac, Испания) для синтеза олигонуклеотидов кипятили 6 ч над CaH_2 в атмосфере аргона, затем перегоняли в атмосфере аргона и хранили под аргоном над молекулярными ситами 3 Å. Бидистиллированную воду подготавливали непосредственно в лаборатории.

Для центрифугирования небольших объемов растворов использовали микроцентрифугу Mini-Spin Plus (Eppendorf, ФРГ). Химические реакции проводили с использованием термошейкера Thermomixer Compact (Eppendorf, ФРГ). Растворы встряхивали с помощью вортекса BioVortexV1 (Biosan, Эстония). Гель-электрофорез проводили с использованием установки для электрофореза компании Bio-Rad (США). Небольшие объемы растворов олигонуклеотидов (до 1.5 мл) концентрировали с помощью вакуумного концентратора Savant SpeedVac DNA120OP (Thermo Fisher Scientific, США).

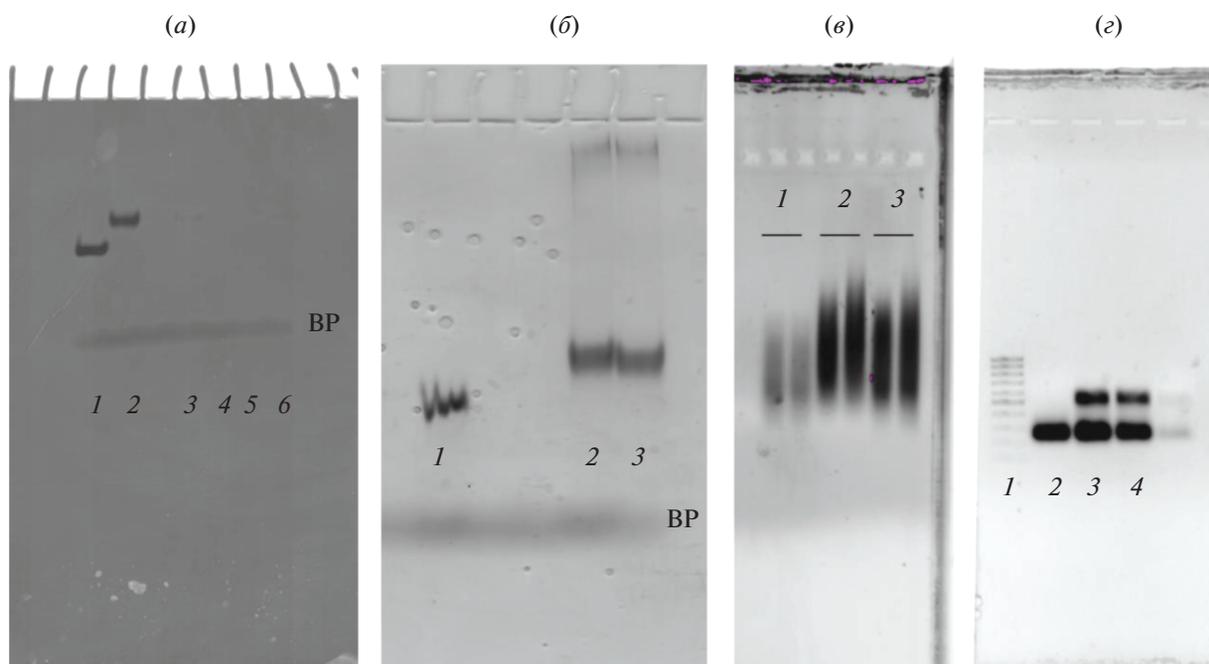


Рис. 9. Электрофореграммы процесса матричной сборки ДНК-тетраэдра: (а) – 8%-ный нативный ПААГ, $1\times$ ТАЕ, рН 7.6, 10 мМ $MgCl_2$, окрашено Stains-All; дорожки: 1 – **D544** (0.05 о.е.); 2 – **D570** (0.05 о.е.); 3 – **D570** (800 нМ); 4–6 – **D544** : **D570** 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 8 соответственно; $[D544] = 100$ нМ; (б) – 8%-ный нативный ПААГ, $1\times$ ТАЕ, рН 7.6, окрашено Stains-All; дорожки: 1 – **D544** (0.05 о.е.); 2, 3 – **D544** : **D570** 1 : 8, 12.5 или 20 мМ $MgCl_2$ соответственно; $[D544] = 1$ мкМ; (в) – 0.75%-ный агарозный гель, $1\times$ ТАЕ, рН 7.6, 10 мМ $MgCl_2$, окрашено EtBr, **D544** : **D570** 1 : 8, $[D544] = 1$ мкМ, 12.5 мМ $MgCl_2$ и 20 мМ $MgCl_2$, 1 – без облучения при 365 нм, 2 – 5.5 ч облучения при 365 нм, 3 – 5.5 ч облучения и обработка 100 мМ DTT в течение 1 ч; (г) – 0.75%-ный агарозный гель, $1\times$ ТАЕ, рН 7.6, окрашено EtBr; дорожки: 1 – ДНК-маркеры 100–1000 нт; 2 – **D570**; 3 – **D544** : **D570** 1 : 8, 12.5 мМ $MgCl_2$; 4 – **D544** : **D570** 1 : 8, 20 мМ $MgCl_2$; $[D544] = 1$ мкМ. BP – краситель бромфеноловый синий.

Олигонуклеотиды были получены с помощью автоматического ДНК/РНК-синтезатора ASM-800 (Биоссет, Новосибирск, Россия) согласно модифицированным протоколам фосфитамидного синтеза в стандартных реакторах объемом 25–50 мкл в масштабе 0.2–0.4 мкМ из соответствующих 5'-DMTr-3'- β -цианэтил-*N,N*-диизопропилфосфитамидов 2'-дезоксидеокси- и 2'-*O*-метилрибонуклеозидов (Sigma-Aldrich, США), а также 3'-DMTr-5'- β -цианэтил-*N,N*-диизопропилфосфитамидов 2'-деоксирибонуклеозидов (“обратных” фосфитамидов, ChemGenes, США) и соответствующих полимерных носителей на основе пористого стекла с размером пор 1000 Å с привитыми 2'-дезоксидеокси- (Sigma-Aldrich, США) или 2'-*O*-метилрибонуклеозидами (Link Technologies, Великобритания). Для введения узлов разветвления были использованы коммерчески доступные нуклеозидные разветвляющие β -цианэтил-*N,N*-диизопропилфосфитамиды: симметричный удвоитель (symmetric doubler) (Glen Research, США, кат. № 10-1920) и симметричный утроитель (trebler) (GlenResearch, США, кат. № 10-1922). Для введения размыкаемого элемента (РЭ) в РОСТ использовали дисульфидный фосфитамида С6 (С6 S-S modifier) (GlenResearch, США, кат. № 10-1936). Для введе-

ния алкинильной группы по 5'-концам разветвленного олигонуклеотида (“вилки”) использовали β -цианэтил-*N,N*-диизопропиламинофосфит 5-гексин-1-ола (GlenResearch, США, кат. № 10-1908). Для постсинтетического введения 6-азидогексаноильной группы по 3'-концевой аминогруппе разветвленного олигонуклеотида использовали полимерный носитель 3'-Amino-Modifier C7 CPG 1000 (Link Technologies, Великобритания). Для введения 6-аминогексильной группы по 5'-концам разветвленного олигонуклеотида применяли β -цианэтил-*N,N*-диизопропиламинофосфит 6-*N*-монометокситритил-(ММTr)-аминогексанола (Sigma-Aldrich, США). Все фосфитамиды растворяли в сухом ацетонитриле до концентрации 0.1 или 0.15 М (для doubler, trebler и С6 S-S modifier). Время конденсации варьировало от 0.5 мин для 3'-фосфитамидов дезоксирибонуклеозидов, 6 мин для 5'-фосфитамидов дезоксирибонуклеозидов (“обратных”), фосфитамидов 2'-*O*-метилрибонуклеозидов, амиолинкерного и дисульфидного фосфитамидов и фосфитамида 5-гексин-1-ола, и до 30 мин в случае удвоителя и утроителя. При введении обоих типов разветвителей время конденсации увеличивали до 30 мин, а масштаб синтеза поднимали с 200 до 400 нМ.

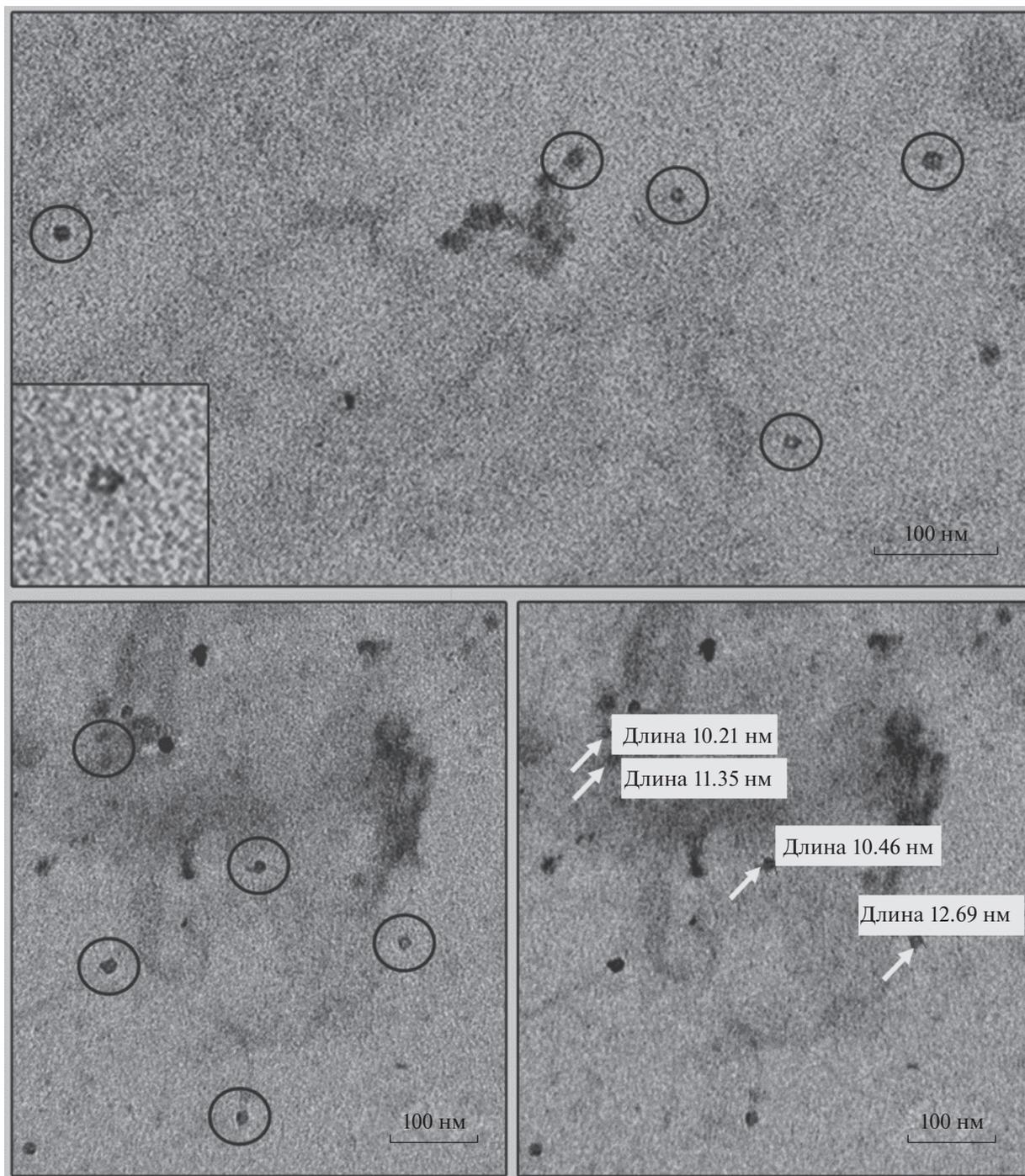


Рис. 10. Фотографии просвечивающей электронной микроскопии дискретных нанобъектов, полученных в процессе сборки ДНК-тетраэдра (обведены кружками). Для отдельных нанобъектов (указаны стрелками) указан размер. На врезке – увеличенное изображение нанобъекта. Негативное контрастирование ацетатом уранила.

Для аналитической ВЭЖХ использовали хроматограф Agilent 1220 (Agilent Technologies, США) с УФ-детекцией при длине волны 260 нм, колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 мкм 4.6 × 150 мм (Agilent Technologies, США). Элюцию осуществляли в градиенте ацетонитрила 0–60% в 20 мМ

ТЕАА, pH 7.0, за 30 мин и скорости потока 1 мл/мин. Выделение олигонуклеотидов проводили с помощью хроматографа Waters 600E (Waters Corp., США) с УФ-детекцией при длинах волн 190, 260 и 280 нм и колонкой ZORBAX Eclipse Prep HT XDB-C18 7 мкм 21.2 × 150 мм

(Agilent Technologies, США) в градиенте ацетонитрила 0–60% в 20 мМ ТЕАА, рН 7.0, за 30 мин при скорости потока 21 мл/мин.

Олигонуклеотиды были синтезированы в режиме без сохранения 5'-DMTr-группы (“DMTr OFF”) с выделением с помощью препаративного гель-электрофореза в 20%-ном ПААГ толщиной 2–3 мм в денатурирующих условиях и обессоливанием на колонке NAP-25 с сорбентом Sephadex G-25 (GE Healthcare, Великобритания) в виде натриевой соли. Для контроля качества олигонуклеотидов проводили аналитический электрофорез в 20%-ном ПААГ толщиной 0.4 мм в аналогичных условиях: акриламид – *N,N'*-метиленбис-акриламид (30 : 1), 8 М мочевины, 90 мМ Трис-борат, рН 8.3, 2 мМ Na₂ЭДТА при напряжении 50 В/см. Олигонуклеотиды наносили в растворе, содержащем 8 М мочевины, 0.05% ксиленианола FF и 0.05% бромфенолового синего. Визуализацию полос проводили окрашиванием геля раствором красителя Stains-All (500 мг/л) в формамиде с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Концентрацию олигонуклеотидов определяли по оптической плотности раствора с помощью УФ-спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США).

Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF на приборе Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия). Масс-спектры олигонуклеотидов получали в линейном режиме отрицательных ионов прибора и в диапазоне m/z от 500 Да до 16 кДа. Параметры измерения включали также частоту импульсов 25 Гц, ускоряющее напряжение 25.0 кВ и время задержки экстракции ионов 120 нс. Образцы олигонуклеотидов растворяли в водном буфере до концентрации 0.1 мМ, содержащем 20 мМ ТЕАА и 60% ацетонитрила. Объем анализируемого образца составлял 10 мкл. Смешивали 0.7 мкл образца на подложке (Ground Steel или Anchor Chip) с 0.7 мкл раствора матрицы, приготовленного согласно базовому протоколу производителя (Bruker Daltonics, Германия). Матрицей для ионизации олигонуклеотидов в отрицательном режиме служил 2,6-дигидроксиацетофенон (2,6-DHAP) с добавлением дигидроцитрата аммония. Итоговый масс-спектр получали суммированием 8–20 одиночных спектров по 100 импульсов лазера на точку. Калибровку прибора проводили с использованием калибровочных стандартов фирмы Bruker Daltonics (Германия), а также набора олигодезоксирибонуклеотидов с известными массами. Молекулярные массы олигонуклеотидов рассчитывали, используя наборы экспериментальных значений m/z , определенные для каждого анализируемого образца.

Сборку ДНК-тетраэдра регистрировали при помощи электрофореза в нативных условиях (8%-ный ПААГ, акриламид : метиленбис-акриламид 30 : 1, или 0.75%-ный агарозный гель) (рис. 10). Сборку осуществляли поэтапно следующим образом. Проводили отжиг олигонуклеотидов **D544** (матрица POM-1') и **D570** (“звездочка” РОСТ-2) в 1× ТАЕ, 10 мМ MgCl₂ при 95°C в течение 8 мин с последующим охлаждением до комнатной температуры и дальнейшей инкубацией в течение суток. Полученный комплекс облучали УФ-светом с длиной волны 365 нм в течение 5 ч и оставляли на сутки при комнатной температуре. На последнем этапе обрабатывали комплекс 100 мМ ДТТ в течение 1 ч. Концентрация матрицы **D544** составляла 100 нМ, концентрация олигонуклеотида **D570** – 200, 400 или 800 нМ (рис. 9а).

Для электронно-микроскопического исследования образцы сорбировали на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, в течение 2 мин. После отбора излишков жидкости фильтровальной бумагой образцы контрастировали 0.5%-ным водным раствором уранилацетата (EMS, США) в течение 10–15 с. Образцы изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония), цифровые изображения получали с помощью камеры бокового ввода Veleta (EMSIS, Германия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осуществлен синтез серии разветвленных олигонуклеотидов для использования в качестве матриц и строительных блоков при матричной сборке ДНК-тетраэдра и ДНК-куба. Был проведен процесс матричной сборки ДНК-тетраэдра, в результате которой были получены дискретные нанообъекты, соответствующие по линейным размерам предполагаемому ДНК-тетраэдру. Размер полученных нанообъектов хорошо согласуется с предсказанным ранее с помощью метода компьютерного моделирования [20].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 16-03-01055_а, 18-29-08062_мк) и Министерства образования и науки Российской Федерации (проект Новосибирского государственного университета FSUS-2020-0035).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seeman N., Sleiman H. // Nat. Rev. Mater. 2018. V. 3. P. 17068. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.68>
2. Seeman N.C. // Nano Lett. 2020. V. 20. P. 1477–1478. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c00325>
3. Templated DNA Nanotechnology: Functional DNA Nanoarchitectonics // Ed. Govindaraju T. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2019. ISBN: 978-0-429-42866-1 (eBook).
4. Rajwar A., Kharbanda S., Chandrasekaran A.R., Gupta S., Bhatia D. // ACS Appl. Bio Mater. 2020. V. 3. P. 7265–7277. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00916>
5. Angell C., Kai M., Xie S., Dong X., Chen Y. // Advanced Healthcare Materials. 2018. V. 7. P. 1701189. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701189>
6. Li S., Jiang Q., Liu S., Zhang Y., Tian Y., Song C., Wang J., Zou Y., Anderson G.J., Han J.-Y., Chang Y., Liu Y., Zhang C., Chen L., Zhou G., Nie G., Yan H., Ding B., Zhao Y. // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 258–264. <https://doi.org/10.1038/nbt.4071>
7. Ma W., Zhan Y., Zhang Y., Shao X., Xie X., Mao C., Cui W., Li Q., Shi J., Li J., Fan C., Lin Y. // Nano Lett. 2019. V. 19. P. 4505–4517. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01320>
8. Rothemund P.W.K. // Nature. 2006. V. 440. P. 297–302. <https://doi.org/10.1038/nature04586>
9. DNA Nanotechnology for Bioanalysis: from Hybrid DNA Nanostructures to Functional Devices // Eds. Arrabito G., Wang L. World Scientific Publishing Europe Ltd., 2018. ISBN: 9781786343796
10. Yu S., Chen T., Zhang Q., Zhou M., Zhu X. // Analyst. 2020. V. 145. P. 3481–3489. <https://doi.org/10.1039/D0AN00159G>
11. Muhammad M., Baig F.A., Lai W.-F., Akhtar M.F., Saleem A., Ahmed S.A., Xia X.-H. // Nano-Structures & Nano-Objects. 2020. V. 23. P. 100523. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100523>
12. Hu Q., Li H., Wang L., Gu H., Fan C. // Chem. Rev. 2019. V. 119. P. 6459–6506. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00663>
13. Xu F., Xia Q., Wang P. // Front. Chem. 2020. V. 8. P. 751. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00751>
14. Chi Q., Yang Z., Xu K., Wang C., Liang H. // Front Pharmacol. 2019. V. 10. P. 1585. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01585>
15. Tapio K., Bald I. // Multifunct. Mater. 2020. V. 3. P. 032001. <https://doi.org/10.1088/2399-7532/ab80d5>
16. Loretan M., Domljanovic I., Lakatos M., Rüegg C., Acuna G.P. // Materials. 2020. V. 13. P. 2185. <https://doi.org/10.3390/ma13092185>
17. Bush J., Singh S., Vargas M., Oktay E., Hu C.-H., Veneziano R. // Molecules. 2020. V. 25. P. 3386. <https://doi.org/10.3390/molecules25153386>
18. Madsen M., Gothelf K.V. // Chem. Rev. 2019. V. 119. P. 6384–6458. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00570>
19. Balakrishnan D., Wilkens G.D., Heddle J.D. // Nano-medicine (Lond.). 2019. V. 14. P. 911–925. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0440>
20. Bakulina A.Yu., Rad'kova Z.V., Burakova E.A., Benassi E., Zaitsepin T.S., Fokina A.A., Stetsenko D.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 608–618. <https://doi.org/10.1134/S1068162019060062>
21. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. // Angew. Chem. Int. Ed. 2001. V. 40. P. 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)
22. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. // J. Org. Chem. 2002. V. 67. P. 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>
23. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. // Angew. Chem. Int. Ed. 2002. V. 41. P. 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4)
24. Васильева С.В., Буракова Е.А., Жданова Л.Г., Анисименко М.С., Стеценко Д.А. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. С. 51–58. [Vasilyeva S.V., Burakova E.A., Zhdanova L.G., Anisimenko M.S., Stetsenko D.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 43–49.] <https://doi.org/10.1134/S1068162017010113>
25. Jayaprakash K.N., Geng Peng C., Butler D., Varghese J.P., Maier M.A., Rajeev K.G., Manoharan M. // Org. Lett. 2010. V. 12. P. 5410–5413. <https://doi.org/10.1021/ol102205j>
26. Van Delft P., Meeuwenoord N.J., Hoogendoorn S., Dinke-laar J., Overkleef H.S., van der Marel G.A., Filippov D.V. // Org. Lett. 2010. V. 12. P. 5486–5489. <https://doi.org/10.1021/ol102357u>
27. Marks I.S., Sung Kang J., Jones B.T., Landmark K.J., Cleland A.J., Taton T.A. // Bioconjug. Chem. 2011. V. 22. P. 1259–1263. <https://doi.org/10.1021/bc1003668>
28. Jawalekar A.M., Malik S., Verkade J.M.M., Gibson B., Barta N.S., Hodges J.C., Rowan A., van Delft F.L. // Molecules. 2013. V. 18. P. 7346–7363. <https://doi.org/10.3390/molecules18077346>
29. Young D.D., Deiters A. // Org. Biomol. Chem. 2007. V. 5. P. 999–1005. <https://doi.org/10.1039/B616410M>
30. Lusic H., Young D.D., Lively M.O., Deiters A. // Org. Lett. 2007. V. 9. P. 1903–1906. <https://doi.org/10.1021/ol070455u>
31. Deiters A. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2009. V. 13. P. 678–686. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.09.026>
32. Zobel R.C., Beer M. // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961. V. 10. P. 335–346. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.3.335>
33. Beer M., Zobel C.R. // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 717–726. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80076-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80076-4)

34. Ketterer Ph., Willner E.M., Dietz H. // *Sci. Adv.* 2016. V. 2. e1501209.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1501209>
35. Nickels Ph.C., Hoiberg H.C., Simmel S.S., Holzmeister Ph., Tinnefeld Ph., Liedl T. // *ChemBioChem.* 2016. V. 17. P. 1093–1096.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201600059>
36. Wang W., Chen S., An B., Huang K., Bai T., Xu M., Bellet G., Ke Y., Xiang Y., Wei B. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 1067.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08647-7.10:1067>
37. Smith D.M., Schüller V., Forthmann C., Schreiber R., Tinnefeld Ph., Liedl T. // *J. Nucleic Acids.* 2011. Article ID 360954.
<https://doi.org/10.4061/2011/360954>

Template-Assisted Assembly of DNA Nanostructures from Branched Oligonucleotides

A. A. Fokina^{*, **}, Yu. E. Poletaeva^{***}, E. A. Burakova^{*, **}, A. Yu. Bakulina^{*, ****},
 T. S. Zatsepin^{*****}, E. I. Ryabchikova^{*, ***}, and D. A. Stetsenko^{*, **, #}

[#]Phone: +7 (383) 363-49-63; e-mail: d.stetsenko@nsu.ru

^{*}Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

^{**}Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Ak. Lavrentieva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

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

^{****}State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

^{*****}Skolkovo Institute of Science and Technology, Innovation Centre SKOLKOVO, Bolshoi bulv. 30, str. 1, Moscow Region, 121205 Russia

^{*****}Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, str. 3, Moscow, 119991 Russia

Previously, we proposed a template-assisted assembly method for three-dimensional nucleic acid nanostructures. The method involves a branched oligonucleotide as a template and a building block, which incorporates non-nucleotidic linkers, in particular, branching points connecting two or three oligonucleotide chains. In this paper, we have attempted the synthesis of branched oligonucleotide templates for the assembly of a DNA tetrahedron and a DNA cube, a branched oligonucleotide building block (“starlet”), and studied the assembly of a DNA tetrahedron.

Keywords: nucleic acids, DNA nanotechnology, solid-phase synthesis, photolabile protecting group, click chemistry, strain-promoted azide-alkyne cycloaddition



СИНТЕЗ И АНАЛИЗ СВОЙСТВ ИММУНОГЕННОГО ФРАГМЕНТА ПОЛИПЕПТИДА NS4A ВИРУСА ГЕПАТИТА С

© 2021 г. А. Н. Белявцев*, ***, #, М. В. Мельникова**, Н. Г. Шевченко***, ****, Г. В. Сапронов****, Р. Г. Вахренев**, Н. С. Шастина*, Е. Ф. Колесанова**, Л. И. Николаева***

*ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

**ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Россия, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

***ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Россия, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18

****Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Россия, 125995 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Поступила в редакцию 13.07.2020 г.

После доработки 25.07.2020 г.

Принята к публикации 27.07.2020 г.

Цель настоящей работы – синтез и анализ пептидного фрагмента антигена NS4A вируса гепатита С (ВГС) субтипа 1b, содержащего консервативный В-клеточный и Т-хелперный эпитопы. Методом твердофазного синтеза по Fmoc-протоколу получен 24-членный пептид VIVGRILSGRPAVIP-DREVLRYK-NH₂, аминокислотная последовательность которого содержит целевой участок 24–46 а.о. антигена NS4A ВГС субтипа 1b (соответствует 1681–1703 а.о. полипротеина ВГС). Для раствора пептида с концентрацией 0.5 мг/мл методом динамического светорассеяния было показано наличие частиц с размерами 73 ± 10 нм (30%) и 236 ± 5 нм (70%). Индекс полидисперсности 0.377 ± 0.012 предполагает наличие гетерогенности вследствие агрегации молекул пептида. Методом электрофоретического светорассеяния определен ζ-потенциал агрегатов пептида: 7.0 ± 0.5 мВ. Эти данные подтверждают возможность создания наноразмерной липосомальной формы пептидного препарата. Исследована иммунореактивность синтезированного высокоочищенного пептида с использованием сывороток крови больных хроническим гепатитом С. В 41.7% образцов сывороток крови были выявлены иммуноглобулины G к данному пептиду. Таким образом, показано, что этот пептид воспроизводит по крайней мере один В-эпитоп, к которому образуются антитела при естественной ВГС-инфекции. Синтезированный 24-членный пептид – перспективный кандидат для проведения дальнейших исследований и использования в качестве потенциального иммуногена при конструировании наноразмерной терапевтической иммуногенной липосомальной композиции с пептидом и адьювантом в виде синтетических липидов.

Ключевые слова: гепатит С, антиген NS4A, синтетический пептид, твердофазный пептидный синтез, физико-химические свойства пептида, иммунореактивность

DOI: 10.31857/S0132342321030039

ВВЕДЕНИЕ

Разработка средств противовирусной терапии гепатита С и вакцины против вируса гепатита С (ВГС) – одна из актуальных задач здравоохранения. В настоящее время исследователи продолжают проведение поиска новых или модификацию уже существующих лекарственных средств

для повышения эффективности или минимизации побочного действия [1–4]. Синтетические пептиды, содержащие аминокислотные последовательности эпитопов антигена, могут целенаправленно активировать клетки иммунной системы [5–8]. Для создания полноценного иммуногена необходимо использовать пептид, содержащий в себе не только В-клеточную антигенную детерминанту, но и Т-хелперный эпитоп, а также правильно подобранный адьювант, что обеспечит повышение иммуногенности и формирование иммунологической памяти [6, 8–13].

Сокращения: ВГС – вирус гепатита С; УВО – устойчивый вирусологический ответ; Fmoc – 9-флуоренилметилокси-карбонильная защитная группа; NF-κB – ядерный фактор каппа В; NS4A – неструктурный полипептид 4А.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 265-39-83; эл. почта: belyavcev@mirea.ru).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | В-клеточный консервативный эпитоп | | | | | | | | | | В-клеточный типоспецифичный эпитоп | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--------------------|----|----|-----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 |
| S | T | W | V | L | V | G | G | V | L | A | A | L | A | A | Y | C | L | T | T | G | S | V | V | I | V | G | R | I | L | S | G | K | P | A | V | I | P | D | R | E | V | L | Y | R | E | F | D | E | M | E | E | C | |
| Т-хелперный эпитоп | | | | | | | | | | Т-хелперный эпитоп | | | | | | | | | | Т-хелперный эпитоп | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | S | | | | | | | | | | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | V | | | | | | | | | | V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | V | | | | | | | | | | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | R | | | | | | | | | | R | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | V | | | | | | | | | | V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | I | | | | | | | | | | Q | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | C | | | | | | | | | | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Т-хелперный эпитоп | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Рис. 1. Аминокислотная последовательность антигена NS4A вируса гепатита С субтипа 1b. Под последовательностью расположены обозначения замен аминокислот в других изолятах субтипа 1b [24]. Серым цветом выделен выбранный для синтеза пептида участок 24–46 а.о.

В качестве объекта исследования в данной работе был выбран полипептид NS4A ВГС субтипа 1b как наиболее распространенного на территории России. Биологическая значимость полипептида NS4A заключается в том, что он выполняет роль кофактора сериновой протеазы NS3 ВГС, активируя последнюю путем изменения ее конформации в районе каталитической триады при формировании комплекса с полипептидом NS4A. В результате каталитическая триада His-1083, Asp-1107 и Ser-1165 взаимодействует с субстратом и тем самым ускоряет отщепление от вирусного полипротеина неструктурных белков NS4B, NS5A и NS5B [14]. Полипептид NS4A состоит из 54 а.о. (соответствуют 1658–1711 а.о. последовательности полипротеина ВГС) и содержит в себе экспериментально подтвержденные В-клеточные и Т-хелперные (стимулирующие CD4⁺-Т-клетки) эпитопы [15, 16]. N-Концевой участок полипептида NS4A гидрофобен и погружен в липидный бислой мембраны эндоплазматической сети, вследствие чего белок NS3, содержащий протеазный и хеликазный домены, удерживается около мембраны [17]. Полипептид NS4A также участвует в блокировке внутриклеточного антивирусного сигналинга, регулировании репликации вируса и гиперфосфорилировании антигена NS5A [18]. Протеазный комплекс NS3–NS4A принимает участие в сборке вириона, и его мутации могут привести к дефектам при сборке [19]. Предполагается, что полипептид NS4A способствует участию креатинкиназы В в функционировании репликационного комплекса ВГС, что приводит к повышению уровня АТФ и стимулированию ферментативных активностей, необходимых для репликации [20]. В соответствии с гипотетической моделью молекулярных взаимодействий между NS3, NS4A и NS5A особое значение в обеспечении этих контактов имеет участок полипротеина 1691–1704 а.о., соответствующий 34–47 а.о. NS4A [21]. Фрагмент 21–34 а.о. NS4A (соответствует 1678–1691 а.о. полипротеина ВГС) непосредственно взаимодействует с белком NS3 в специальном участке, связывающем кофактор сериновой протеазы, и содержит в себе консервативную для всех генотипов вируса область (рис. 1) [16, 21]. Вполне вероятно, что блокирование соответствующих

участков полипептида NS4A может оказать ингибирующее воздействие на репликационную активность вируса. Один из способов такого блокирования – связывание с антителами, специфичными к участку взаимодействия полипептида NS4A с протеазным доменом NS3. Для продукции таких антител необходимо составить иммунную конструкцию, содержащую как участок полипептида NS4A, ответственный за взаимодействие с протеазой NS3, так и В-клеточный и Т-хелперный эпитопы [6, 8, 12]. Поскольку полипептид NS4A содержит в своем составе экспериментально выявленные В-клеточные и Т-хелперные эпитопы, полностью или частично входящие в состав участка взаимодействия с NS3 [15, 16], иммунная конструкция может представлять собой фрагмент полипептида NS4A, содержащий как участок взаимодействия с NS3, так и указанные эпитопы. Показано, что высокие титры антител к полипептиду NS4A – прогностический признак эффективности лечения гепатита С [22, 23].

Цель настоящей работы – синтез 24-членного пептидного фрагмента антигена NS4A вируса гепатита С субтипа 1b, содержащего консервативный В-клеточный и Т-хелперный эпитопы, а также участок взаимодействия с сериновой протеазой NS3, с последующим анализом физико-химических свойств этого пептида и оценкой иммунореактивности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После анализа литературных данных из аминокислотной последовательности полипептида NS4A ВГС субтипа 1b [24] для синтеза был выбран 23-членный фрагмент VIVGRILSGRPVAVIPDREVLRYR, соответствующий 1681–1703 а.о. полипротеина ВГС. Этот фрагмент содержит большую часть участка связывания NS4A с сериновой протеазой NS3, полностью В-клеточный (консервативный для всех генотипов, 24–36 а.о.) [16] и Т-хелперный эпитопы (37–46 а.о.) [15], а также частично типоспецифичный В-клеточный (32–54 а.о.) [25] и Т-хелперный эпитопы (14–33 а.о.) [26] (рис. 1).

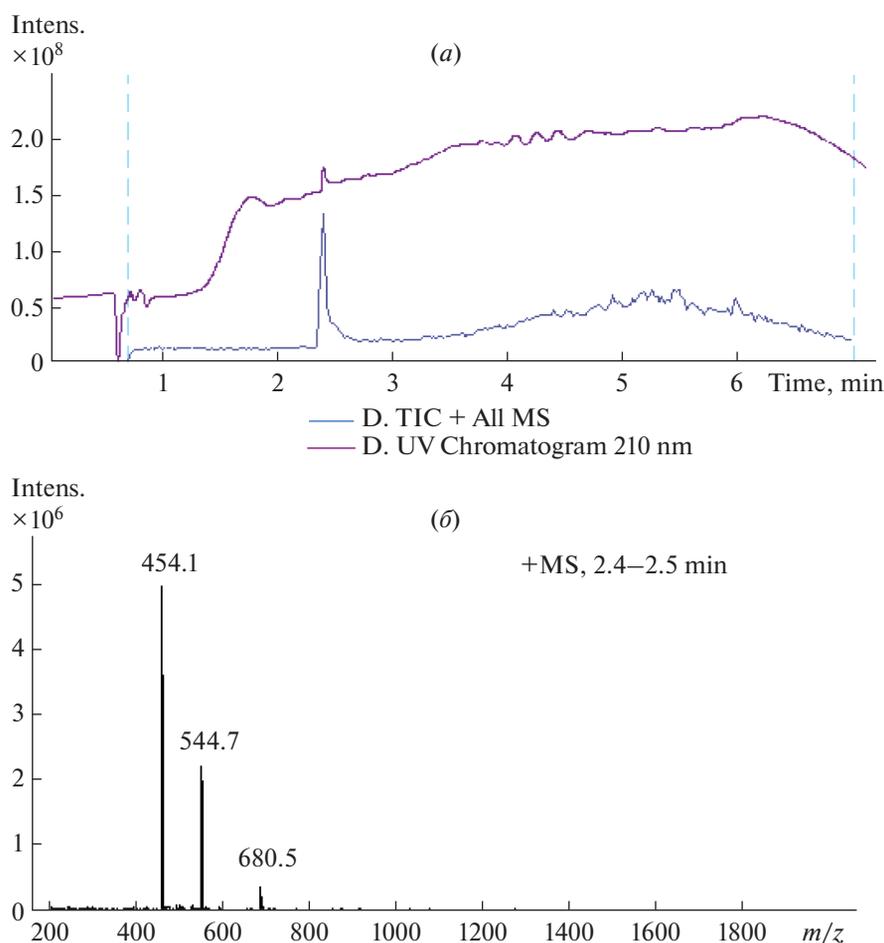


Рис. 2. (а) – Хроматограмма офВЭЖХ 24-членного пептида после препаративной очистки; (б) – масс-спектр очищенного пептида, представлены 4-, 5- и 6-зарядные ионы.

Выбранный фрагмент был синтезирован в виде амидированного по С-концу 24-членного пептида VIVGRILSGRPAVIPDREVLYRK-NH₂ ($M = 2719$ г/моль). Амидирование С-концевого остатка пептида моделирует его естественное состояние – участие в амидной (пептидной) связи с соседней аминокислотой [27]. Наличие лизина позволяет ацилировать данный пептид липофильным адьювантом по менее гидрофобному С-концу через ϵ -аминогруппу лизина при условии ее блокирования селективно удаляемой защитной группой. Пептид был получен твердофазным синтезом на смоле Ринка по Fmoc-протоколу методом активированных эфиров *in situ* [28, 29]. После синтеза пептид был очищен методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (офВЭЖХ) с использованием УФ- и масс-спектрометрического детектирования для идентификации целевого пептида и примесей. Чистота полученного препарата пептида по данным аналитической офВЭЖХ составила более 95% (рис. 2).

Для подтверждения воспроизведения В-эпитопов была проведена оценка иммунореактивности очищенного пептида методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием сывороток крови людей, инфицированных гепатитом С. Исследовали 84 образца сывороток крови от людей, инфицированных ВГС. По результатам ИФА в тест-системе “Бест-анти-ВГС-спектр” установлено, что в данных образцах присутствовали суммарные антитела к антигенам NS4A и NS4B. В качестве контроля были протестированы образцы сывороток крови 10 здоровых людей, в которых анти-ВГС антитела отсутствовали.

Антитела к синтезированному пептиду были выявлены методом ИФА в сыворотках крови 41.7% инфицированных пациентов. Во всех образцах сывороток крови от здоровых людей антитела к данному пептиду не были обнаружены. В позитивных образцах от инфицированных пациентов превышение значения оптической плотности (ОП) относительно средней величины зна-

чения ОП образцов от здоровых людей составило от 2.5 до 159 раз. Однако у большинства позитивных образцов сывороток (68.57%) наблюдался низкий коэффициент позитивности (КП) антител — от 1 до 10. (КП — это отношение ОП образца сыворотки крови к пороговому значению ОП.) Доля позитивных образцов с высоким значением КП (от 21 до 53) составила 22.86%. Ранее при анализе сывороток крови пациентов с хроническим гепатитом С было показано, что доля NS4A-позитивных образцов (при использовании рекомбинантного антигена NS4A, воспроизводящего последовательность 19–54 а.о.) составляла 45% [30, 31], что позволяет предположить наличие у синтезированного пептида по крайней мере одного иммунодоминантного В-эпитопа полипептида NS4A, к которому образуются антитела при ВГС-инфекции.

Среди 84 образцов сывороток крови от инфицированных людей 59 образцов сывороток были получены от пациентов до начала противовирусной терапии пэгилированным интерфероном- $\alpha 2$ и рибавирином. Учитывая завершение лечения и его результат, сыворотки были поделены на две группы. Первая группа сывороток включала 29 образцов от пациентов с успешным результатом терапии (достигнут устойчивый вирусологический ответ (УВО), т.е. РНК в крови не выявлялась на 24-й неделе после лечения); вторая группа сывороток — 30 образцов от пациентов, не достигших УВО. У 20 пациентов (66.7%), не достигших УВО, антитела к пептиду отсутствовали. Антипептидные иммуноглобулины не были выявлены и у 14 участников (48.3%), достигших УВО. Достоверных различий в отсутствии антител между группами не обнаружено ($p > 0.05$; $t = 1.43$), что, скорее всего, связано с небольшой выборкой сравниваемых образцов. Однако явно прослеживается тенденция к наличию связи между появлением антител к выбранному нами в качестве антигена фрагменту полипептида NS4A и УВО на интерферонотерапию. Это дополнительно подтверждает присутствие в синтезированном нами пептиде основного(-ых) В-эпитопа(-ов) полипептида NS4A ВГС, поскольку показано, что наличие антител против этого белка — прогностический признак успешной интерферонотерапии [22, 23].

Для раствора пептида с концентрацией 0.5 мг/мл методом динамического светорассеяния было показано наличие частиц с размерами 73 ± 10 нм (30%) и 236 ± 5 нм (70%). Индекс полидисперсности 0.377 ± 0.012 предполагает наличие гетерогенности вследствие агрегации молекул пептида. Методом электрофоретического светорассеяния определили ζ -потенциал агрегатов пептида, который составил 7.0 ± 0.5 мВ. По-видимому, гидрофобный N-концевой участок пептида способствует агрегации его молекул, учитывая относительно низкую растворимость пептида в

водном растворе. Эти данные подтверждают возможность создания наноразмерной липосомальной формы пептида, его достаточно гидрофильный C-концевой участок в составе липосом предположительно будет доступен для контакта с Th-лимфоцитами, что позволит обеспечить эффективную доставку препарата [32, 33]. Известно, что липофильные соединения на основе жирных кислот стимулируют Toll-подобные рецепторы (неспецифическая иммунная активация через NF- κ B-путь) и выступают эффективными адъювантами для синтетических пептидов [34–37].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Fmoc-защищенные L-аминокислоты Arg(Pbf) (Sigma-Aldrich, США); Lys(Boc), Tyr(OBu^t), Leu, Val, Glu(OBu^t), Asp(OBu^t), Pro, Ile, Ala, Gly, Ser(OBu^t), амидную смолу Ринка с Fmoc-защитой аминокислотной группы (емкость 0.7 ммоль/г), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуронийгексафторфосфат (HBTU) (Chemper, США); 4-метилпиперидин, 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU), триизопропилсилан, тиоанизол, трифторуксусную кислоту, 2,4,6-коллидин, пропионовый ангидрид (Acros Organics, Бельгия); этиловый эфир циангидроксииминоацетата (Охума Pure) (Merck, Германия); цианид калия, нингидрин, фенол (Warrington, Великобритания); растворители диметилформамид (DMF), хлористый метилен, диэтиловый эфир (Химмед, Россия). DMF класса чистоты о.с.ч. дополнительно осушали свежепрокаленными молекулярными ситами 4А.

Получение пептида VIVGRILSGRPAVIP-DREVLRYK-NH₂. Синтез осуществляли в ручном режиме в стеклянном реакторе с фильтром и трехходовым краником для промывки смолы, в нижней части реактора предусмотрен отвод для вакуум-фильтрации для удаления избытка реагентов и промывания смолы. При масштабе синтеза 0.25 ммоль (в расчете на количество активных групп на смоле) в сосуд помещали 0.357 г смолы Ринка (концентрация Fmoc-NH₂-групп на смоле 0.7 ммоль/г), добавляли хлористый метилен для набухания смолы, удаляли Fmoc-группу действием 4-метилпиперидина (2%, v/v — здесь и далее) и DBU (2%) в DMF, далее наращивали пептидную цепь, последовательно присоединяя аминокислоты, удаляя Fmoc-группу перед присоединением следующей аминокислоты. Карбоксильную группу присоединяемой аминокислоты активировали HBTU и Охума Pure в присутствии 2,4,6-коллидина в DMF. Образование пептидной связи осуществляли с использованием 4-кратного избытка присоединяемой аминокислоты (1 ммоль). Полимерную смолу промывали DMF (5 × 2 мл) и хлористым метиленом (3 × 2 мл).

Присоединение аминокислот контролировали с помощью пробы Кайзера. При положительной пробе Кайзера проводили ацилирование оставшихся реакционноспособных аминогрупп пропионовым ангидридом.

После отщепления от смолы с одновременным удалением защитных групп боковых цепей действием трифторуксусной кислоты (92.5%) в присутствии тиоанизола (2.5%), триизопропилсилана (2.5%) и воды (2.5%) пептид осаждали диэтиловым эфиром. Очистку пептида проводили методом полупрепаративной оФВЭЖХ на колонке УМС-Actus Triart C8 (УМС, Швейцария; 250 × 20 мм I.D., S – 5 мкм, 12 нм), элюент вода/ацетонитрил с 0.1%-ной уксусной кислотой, скорость потока 15 мл/мин, хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), детектирование по оптическому поглощению элюента при длине волны 210 нм, диодно-матричный детектор G1314A. Чистоту препарата пептида подтверждали методом аналитической ВЭЖХ с УФ- и масс-спектрометрической детекцией, колонка УМС-Triart C18 (50 × 2.1 мм L.D., S – 1.9 мкм), колонку термостатировали при 30°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.35 мл/мин, в качестве подвижной фазы использовали 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В); хроматографическое разделение веществ проводили в режиме градиентного элюирования: 0 мин – 2% В, 0–10 мин – линейный градиент до 100% В, 10–12 мин – 2% В; $t_R = 2.4$ мин, масс-спектрометр Agilent 6340 Ion Trap (Agilent Technologies, США) с ионизацией электрораспылением, детектор – ионная ловушка.

Выход пептида составил 0.204 г (30% от теоретического); ESI-MS, m/z : найдено $[M + 4H]^{4+}$ 680.5; $[M + 5H]^{5+}$ 544.7; $[M + 6H]^{6+}$ 454.1; вычислено M_r (C₁₂₄H₂₁₆N₃₈O₃₀) 2719.3.

Определение размеров частиц в растворе пептида. Пептид растворяли в бидистиллированной воде (рН 5.9) в концентрации 0.5 мг/мл, исследовали распределение частиц по размерам и измеряли ζ -потенциал на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, США) при 25°C с использованием программного обеспечения Zetasizer Software. Эксперимент повторяли 3 раза.

Иммуноферментный анализ. В работе использовали образцы сывороток крови от 84 пациентов, инфицированных ВГС (35 женщин и 49 мужчин, средний возраст 41 год), с подтвержденным наличием суммарных антител к антигенам NS4A и NS4B (по результатам ИФА в сертифицированной тест-системе “Бест-анти-ВГС-спектр”, Вектор-Бест, Россия). В качестве контроля были протестированы образцы сывороток крови 10 здоровых людей (5 женщин и 5 мужчин, средний

возраст 35 лет), в которых анти-ВГС антитела отсутствовали.

Пептид иммобилизовали в лунках иммунологического 96-луночного полистирольного планшета с повышенной сорбцией (Nunc, Дания) при 4°C в концентрации 10 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9.25) в течение ночи. Свободные зоны лунок блокировали раствором бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл; Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере (рН 7.2). После этого в лунки вносили образцы сывороток крови, разведенные в 10 раз фосфатно-солевым буфером с 0.1% Tween 20 (рН 7.2), после инкубирования отмывали и выявляли антипептидные иммуноглобулины G. Остальные этапы ИФА выполняли по общепринятой методике [23].

Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм, используя иммуоферментный микропланшетный анализатор (фотометр) Stat-Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США). Пороговое значение оптической плотности рассчитывали как среднее значение оптической плотности отрицательного контроля плюс тройное стандартное отклонение. Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля составляло 0.032. Достоверность различий по выявлению антител в сравниваемых группах пациентов оценивали по t -критерию Стьюдента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Твердофазным методом синтезирован 24-членный пептид VIVGRIILSGRPAVIPDREVLYRK-NH₂, целевая часть которого соответствует фрагменту 24–46 а.о. неструктурного полипептида NS4A ВГС субтипа 1b (рис. 1).

Показана иммунореактивность полученного 24-членного пептида путем взаимодействия с сыворотками крови людей, инфицированных вирусом гепатита С. Установлено, что 41.7% сывороток крови больных, имеющих антитела к суммарным антигенам NS4A и NS4B, содержали иммуноглобулины G к анализируемому пептиду. По косвенным данным, синтезированный пептид имеет иммунодоминантный В-эпитоп NS4A.

Показано, что данный 24-членный пептид в виде высокоочищенного водного препарата образовывал агрегаты гетерогенной структуры небольших размеров и умеренной стабильности. Это указывает на способность пептида к связыванию с липосомами в виде частиц среднего размера (~200 нм) и подтверждает его перспективность в качестве кандидата при конструировании липопептидного иммуногена против вируса гепатита С.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность аспирантам А.А. Юшиной и В.А. Щелконогову (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова) за содействие в определении размера частиц и ζ -потенциала пептида.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-33-90037).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование выполнено с соблюдением этических стандартов, изложенных в Хельсинкской декларации (1975 г., 2013 г.). Пациенты дали информированное согласие на использование их сывороток крови в исследовательских целях. Исследование одобрено этическим комитетом Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gonzalez-Aldaco K., Torres-Reyes L.A., Ojeda-Granados C., Jose-Abrego A., Fierro N.A., Roman S. // *Ann. Hepatol.* 2018. V. 17. P. 908–919. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7191>
2. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. // *Gastroenterology.* 2019. V. 156. P. 418–430. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
3. Chudinov M.V. // *Fine Chem. Technol.* 2019. V. 14. P. 7–23. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2019-14-4-7-23>
4. Crouch E., Wrensch F., Schuster C., Zeisel M.B., Baumert T.F. // *Ther. Adv. Gastroenterol.* 2018. V. 11. P. 1–15. <https://doi.org/10.1177/1756283X18759483>
5. Brown L.E., Jackson D.C. // *Curr. Drug Deliv.* 2005. V. 2. P. 383–393. <https://doi.org/10.2174/156720105774370258>
6. Мойса А.А., Колесанова Е.Ф. // *Биомед. химия.* 2011. Т. 57. С. 14–30. <https://doi.org/10.18097/pbmc20115701014>
7. Колесанова Е.Ф., Соболев Б.Н., Мойса А.А., Егорова Е.А., Арчаков А.И. // *Биомед. химия.* 2015. Т. 61. С. 254–264. <https://doi.org/10.18097/PBMC20156102254>
8. Moisa A.A., Kolesanova E.F. // *InTech: Rijeka,* 2012. P. 201–228. <https://doi.org/10.5772/2240>
9. Baz A., Buttigieg K., Zeng W., Rizkalla M., Jackson D.C., Groves P., Kelso A. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 2570–2579. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.022>
10. BenMohamed L., Gras-Masse H., Tartar A., Daubersies P., Brahimi K., Bossus M., Thomas A., Druilhe P. // *Eur. J. Immunol.* 1997. V. 27. P. 1242. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270528>
11. Иванов Б.Б., Мещерякова Е.А., Андропова Т.М., Иванов В.Т. // *Биоорг. химия.* 1991. Т. 17. С. 732–746. [Ivanov B.B., Meshcheryakova E.A., Andronova T.M., Ivanov V.T. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 1991. V. 17. P. 732–746.]
12. Sobolev B.N., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Poroikov V.V., Archakov A.I. // *Curr. Comp.-Aid. Drug Des.* 2005. V. 1. P. 207–222. <https://doi.org/10.2174/1573409053585681>
13. Волпина О.М., Титова М.А., Жмак М.Н., Короев Д.О., Обозная М.Б., Волкова Т.Д., Иванов В.Т. // *Биоорг. химия.* 2002. Т. 28. С. 387–395. [Volpina O.M., Titova M.A., Zhmak M.N., Koroev D.O., Oboznaya M.B., Volkova T.D., Ivanov V.T. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2002. V. 28. P. 349–356.] <https://doi.org/10.1023/A:1020452709271>
14. Suzuki T., Ishii K., Aizaki H., Wakita T. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007. V. 59. P. 1200–1212. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.014>
15. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Gruner N.H., Jung M.-C., Schraut W., Schirren C.-A., Heeg M., Scholz S., Witter K., Zahn R., Vogler A., Zachoval R., Pape G.R., Diepolder H.M. // *J. Virol.* 2005. V. 19. P. 12425–12433. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12425-12433.2005>
16. Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E. // *J. Med. Virol.* 1998. V. 56. P. 105–111.
17. Wolk B., Sansonno D., Krausslich H.G., Dammacco F., Rice C.M., Blum H.E., Moradpour D. // *J. Virol.* 2000. V. 74. P. 2293–2304.
18. Gu M., Rice C.M. // *Curr. Opin. Virol.* 2013. V. 3. P. 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.013>
19. Dubuisson J., Cosset F.-L. // *J. Hepatology.* 2014. V. 61. P. 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.031>
20. Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T. // *J. Virol.* 2009. V. 83. P. 5137–5147. <https://doi.org/10.1128/jvi.02179-08>
21. Campo D.S., Dimitrova Z., Mitchell R.J., Lara J., Khudya-kov Y. // *PNAS.* 2008. V. 105. P. 9685–9690. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801774105>
22. Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sallberg M., Quiroga J., Carreno V., Leroux-Roels G. // *J. Med. Virol.* 2007. V. 79. P. 701–713. <https://doi.org/10.1002/jmv.20846>
23. Николаева Л.И., Макашова В.В., Петрова Е.В., Шунулин Г.А., Самохвалов Е.И., Токмалаев А.К., Львов Д.К. // *Биомед. химия.* 2009. Т. 55. С. 201–212. <https://doi.org/10.1134/S1990750809020127>
24. Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., Ashfaq U.A., Asad S., Gull S., Shahid I., Hassan S. // *J. Virol.* 2011. V. 8. P. 317. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317>
25. Chien D.Y., McFarland J., Tabrizi A., Kuo C., Houghton M., Kuo G. // In: *Viral Hepatitis and Liver Disease* / Eds.

- Nishioka K., Suzuki H., Mishiro S., Oda T. Springer, То-
кьо, 1994. P. 320–324.
26. Day C.L., Lauer G.M., Robbins G.K., McGovern B., Wurcel A.G., Gandhi R.T., Chung R.T., Walker B.D. // *J. Virol.* 2002. V. 76. P. 12584–12595. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12584-12595.2002>
 27. Короев Д.О., Вольпина О.М., Волкова Т.Д., Камынина А.В., Самохин А.Н., Филатова М.П., Бобкова Н.В. // *Биоорг. химия.* 2019. Т. 45. С. 518–523. [Koroev D.O., Volpina O.M., Volkova T.D., Kamynina A.V., Samokhin A.N., Filatova M.P., Bobkova N.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 5. P. 361–365.] <https://doi.org/10.1134/S1068162019050054>
 28. Алешина Е.Ю., Пындык Н.В., Мойса А.А., Санжаков М.А., Харьбин О.Н., Николаев Е.Н., Колесанова Е.Ф. // *Биомед. химия.* 2008. Т. 54. С. 184–191. <https://doi.org/10.1134/S1990750808030098>
 29. Kolesanova E.F., Sanzhakov M.A., Kharybin O.N. // *Int. J. Pept.* 2013. V. 2013. P. 197317. <https://doi.org/10.1155/2013/197317>
 30. Николаева Л.И., Куприянов В.В., Лейбман Е.А., Ионова К.С., Самохвалова Е.Г., Васильев А.В. // В сб. *Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международ-*
ным участием (Москва, 30 марта–1 апреля 2015 г.), Москва, 2015. С. 244.
 31. Николаева Л.И., Куприянов В.В., Зыкова А.А., Ионова К.С., Равин Н.В. // В мире вирусных гепатитов. 2015. В. 1–2. С. 12–17.
 32. Добрынина А.В., Цыкунова М.А., Себякин Ю.Л. // *Тонк. хим. технол.* 2010. Т. 5. С. 98–103.
 33. Varypataki E.M., Benne N., Bouwstra J., Jiskoot W., Ossendorp F. // *Cancer Immunol. Res.* 2017. V. 5. P. 1–12. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0283>
 34. Tan A.C.L., Mifsud E.J., Zeng W., Edenborough K., McVernon J., Brown L.E., Jackson D.C. // *Mol. Pharm.* 2012. V. 9. P. 2710–2718. <https://doi.org/10.1021/mp300257x>
 35. Zeng W., Eriksson E., Chua B.Y., Grollo L., Jackson D. // *Amino Acids.* 2010. V. 39. P. 471–480. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0463-0>
 36. Langhans B., Schweitzer S., Nischalke H.D., Braunschweiger I., Sauerbruch T., Spengler U. // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 189. P. 248–253. <https://doi.org/10.1086/380763>
 37. Langhans B., Braunschweiger I., Schweitzer S., Jung G., Inchauspe G., Sauerbruch T., Spengler U. // *Immunology.* 2001. V. 102. P. 460–465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01209.x>

Synthesis and Analysis of Properties of an Immunogenic Fragment of the Polypeptide NS4A of Virus Hepatitis C

A. N. Belyavtsev^{*, ***, #}, M. V. Melnikova^{**}, N. G. Shevchenko^{***, ****}, G. V. Saprionov^{****}, R. G. Vahrenev^{**}, N. S. Shastina^{*}, E. F. Kolesanova^{**}, and L. I. Nikolaeva^{***}

[#]Phone: +7 (495) 246-05-55, e-mail: belyavcev@mirea.ru

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

^{**}Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

^{***}Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, ul. Gamaleya 18, Moscow, 123098 Russia

^{****}Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, ul. Barrikadnaya 2/1, Moscow, 123995 Russia

The work is aimed at the synthesis and analysis of a NS4A hepatitis C virus (HCV) antigen peptide fragment that contains a conserved B-cell and T-helper epitopes. 24-mer peptide VIVGRIILSGRPAVIPDREVLRYK-NH₂, which contains the main immunogenic site 24–46 of HCV NS4A antigen (corresponding to the 1681–1703 amino acid residues of the HCV polypeptide), subtype 1b, has been prepared via solid-phase synthesis according to the Fmoc-protocol. Particles with diameters of 73 ± 10 nm (30%) и 236 ± 5 nm (70%) have been detected in the water solution of the highly purified peptide (0.5 mg/mL) by dynamic light scattering. Polydispersity index of 0.377 ± 0.012 implies the existence of heterogeneity because of the aggregation of the peptide molecules. ζ -Potential of the peptide aggregates has been determined as 7.0 ± 0.5 mV by means of electrophoretic light scattering. These data confirm the possibility for the development of a nanoscale liposome form of the peptide preparation. Immunoreactivity of the synthesized highly purified peptide has been studied with the use of blood sera of patients with chronic hepatitis C. Anti-peptide immunoglobulins G have been detected in 41.7% serum samples. Thus, this peptide has been shown to reproduce at least one B-epitope, to which antibodies are raised during natural HCV infection. The synthesized 24-mer peptide is a promising candidate for further research and for the use as a potential immunogen for the design of a nanoscale therapeutic immunogenic liposomal peptide composition with synthetic lipids as an adjuvant.

Keywords: hepatitis C, antigen NS4A, synthetic peptid, solid-phase peptide synthesis, physicochemical properties of peptide, immunoreactivity



УДК 577.113.4

ТРИАЗИНИЛАМИДОФОСФАТНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КЛЕТКАМИ И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИМИ БЕЛКАМИ

© 2021 г. М. С. Купрюшкин*, Т. Д. Жарков*, **, Е. С. Ильина*, **, О. В. Марков*,
А. С. Кочеткова*, **, М. М. Ахметова**, А. А. Ломзов*, Д. В. Пышный*,
О. И. Лаврик*, **, С. Н. Ходырева*.,#

*ФГБУН “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” СО РАН,
Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

**ФГБОУ ВПО “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”,
Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 19.10.2020 г.

После доработки 26.10.2020 г.

Принята к публикации 28.10.2020 г.

Впервые получены представители класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидных производных, предложена и осуществлена схема введения модифицированного звена на твердофазном носителе при проведении стадии окисления высокорекреакционным 2-азидо-4,6-дихлор[1,3,5]триазинном по реакции Штаудингера с последующим введением различных алифатических остатков при обработке соответствующими аминами. Был синтезирован ряд модельных олигонуклеотидов, содержащих триазиниламидофосфатную модификацию. Исследованы химическая устойчивость, проникновение в клетки и цитотоксичность полученных производных. Изучено влияние типа алифатического заместителя в составе полученных олигонуклеотидов на их устойчивость к ферментативному гидролизу в экстрактах культивируемых клеток человека с различным содержанием ключевых регуляторных белков репарации ДНК, Ku-антигена и поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 (PARP1) – потенциально наиболее эффективных акцепторов модифицированных олигонуклеотидов.

Ключевые слова: автоматизированный амидофосфитный синтез, реакция Штаудингера, триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды, PARP1, Ku-антиген

DOI: 10.31857/S0132342321030118

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические олигонуклеотиды широко применяются в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии и медицины [1, 2]. Одним из наиболее перспективных направлений можно считать использование олигонуклеотидов в качестве терапевтических агентов – не менее 11 препаратов уже одобрены организацией FDA (Food and Drug Administration) и множество препаратов находятся на различных стадиях клинических испытаний [3–5]. В области онкотерапии существует подход, основанный на применении ДНК-повреждающих агентов совместно с синтетическими олигонуклеотидами в качестве ингибиторов систем репарации [6]. Такие олигонук-

леотиды имитируют реальные повреждения клеточной ДНК, что позволяет их использовать в качестве эффективных “ловушек”. Ключевые белки репарации ДНК связываются с такими олигонуклеотидами, что вызывает ингибирование репарации. В результате возникшие при химио- или лучевой терапии повреждения клеточной ДНК не репарируются, что приводит к гибели раковой клетки.

В составе каждого олигонуклеотидного препарата присутствуют химические модификации, что позволяет значительно улучшить важные для его биологического применения свойства, такие как эффективность проникновения через клеточную мембрану, химическая и ферментативная устойчивость, стабильность образуемого дуплекса с комплементарным участком, улучшенное биораспределение и т.п. [7]. Не исключена возможность с помощью таких модификаций улучшить

Сокращения: ФГО – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды; Ku – Ku-антиген; PARP1 – поли(АДФ-рибоза)полимераза 1; PBS – натрий-фосфатный буфер.

Автор для связи: (тел. +7 (383) 363-51-96, эл. почта: svetakh@niboch.nsc.ru).

эффективность связывания с олигонуклеотидами белков систем репарации.

В структуре олигонуклеотида присутствует ряд положений для модификации – азотистые основания, углеводный компонент сахарофосфатного остова, межнуклеотидная фосфатная группа. Для введения неприродных химических групп межнуклеотидная фосфатная группа выгодно отличается от остальных позиций, поскольку введение модификаций через фосфатный фрагмент остова незначительно влияет на фундаментальное свойство олигонуклеотидов – способность образовывать комплементарные комплексы с клеточными мишенями – нуклеиновыми кислотами. Поскольку в качестве белков-мишеней систем репарации нами были выбраны Ku-антиген и PARP1 (поли(АДФ-рибоза)полимераза 1), взаимодействующие преимущественно с ДНК-дуплексами и имеющие высокое сродство к концам ДНК-дуплексов, имитирующим двойные разрывы, то сохранение стабильности дуплексов имеет большое значение. При этом введение различных групп способно наделять создаваемое соединение широким диапазоном новых свойств.

На данный момент известно множество типов модификаций межнуклеотидной фосфатной группы. К примеру, ранее в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН был предложен новый класс аналогов нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО), полученные при взаимодействии фосфит-триэфирного производного олигонуклеотида с различными диаминокарбоний азидами [8]. Простота и эффективность введения модификации с использованием пока единственного коммерчески доступного азидо-модификатора позволяют получать ФГО, обладающие различными свойствами, обусловленными варьированием количества и места введения фосфорилгуанидиновых звеньев, но не их типом. Получение же диаминокарбоний азидов, несущих различные функциональные остатки, – отдельная задача синтетической химии для каждого типа вводимых заместителей. В связи с этим актуальна разработка нового типа модификации по фосфатной группе, введение которой позволит легко варьировать различные функциональные группы в составе создаваемого олигонуклеотидного производного, а также при конструировании ДНК-дуплексов, проникающих в клетки и эффективно взаимодействующих с белками систем репарации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор структуры реагента-модификатора. Учитывая успешный опыт применения реакции Штаудингера при создании олигонуклеотидов, модифицированных по межнуклеотидной фосфатной группе, в качестве реагента-модификато-

ра было принято решение использовать органический азид. При этом для эффективного протекания реакции необходимо, чтобы органический заместитель при азидогруппе обладал выраженными электронно-акцепторными свойствами. С другой стороны, для возможности варьирования вводимых заместителей необходимо наличие в структуре модификатора дополнительных реакционноспособных центров.

После рассмотрения различных вариантов остова в качестве наиболее подходящего был выбран замещенный 2,4,6-замещенный-1,3,5-триазин и, соответственно, цианурхлорид как его коммерчески доступный предшественник.

Триазинный остов модификации был выбран по нескольким причинам. Во-первых, наличие трех реакционных центров в структуре цианурхлорида обеспечивает, помимо введения необходимой азидогруппы в состав целевого модификатора, возможность введения еще двух функциональных групп. Во-вторых, триазинный остаток, особенно с электронно-акцепторными заместителями, обеспечит высокую реакционную способность создаваемому азиду в реакции Штаудингера. В-третьих, получаемая после этапа финального деблокирования триазиниламидофосфатная группа, в отличие от алкиламидофосфатов, не должна быть склонна к кислотному гидролизу.

Для получения 2-азидо-4,6-дихлор-1,3,5-триазина необходимо заместить один из трех эквивалентных атомов хлора в исходном цианурхлориде на азидогруппу. Известно, что последовательные реакции замещения атомов хлора на донорные группы в цианурхлориде протекают при разных температурах – если первое замещение проходит при 0°C, то второе – уже при 25°C, а последнее замещение протекает только при нагревании до 60–70°C [9]. Однако азидогруппа по своим акцепторным свойствам близка к атому хлора, поэтому даже при охлаждении продуктами реакции цианурхлорида с азидом натрия (рис. 1, реакция 1) выступают моно-, ди-, и тризамещенные азидотриазины. В связи с этим требуется тщательно подбирать условия реакции [10], а также дополнительно очищать синтезированный азид от примесей продуктов реакций избыточного замещения.

Учитывая электронно-акцепторную природу атомов хлора в составе полученного азидо-модификатора, было принято решение использовать именно это соединение в качестве азидо-модификатора на этапе окисления образующегося фосфит-триэфира при конденсации очередного звена при синтезе олигонуклеотидов амидофосфитным методом синтеза (рис. 1, реакция 2). При этом с использованием соответствующих аминов атомы хлора триазинного производного будут замещены на функциональные остатки уже в составе получаемого фосфазенового олигонуклеотидного произ-

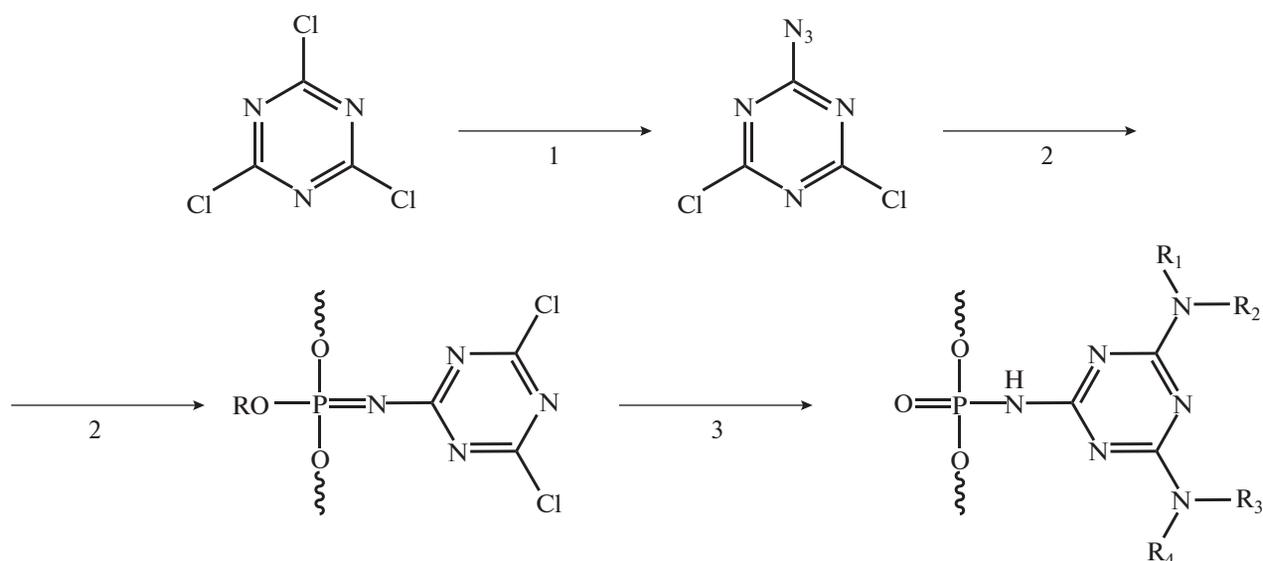


Рис. 1. Принципиальная схема синтеза триазириламинофосфатных производных: 1 – получение 2-азидо-4,6-дихлор-1,3,5-триазина; 2 – введение триазинового остова синтезируемой олигонуклеотидной цепи через реакцию Штаудингера; 3 – введение различных заместителей в состав создаваемой структуры, продолжение олигонуклеотидного синтеза и финальное деблокирование с получением целевого соединения.

водного (рис. 1, реакция 3). Большое количество разнообразных коммерчески доступных аминов позволит широко варьировать вводимые группировки, что обеспечит необходимую универсальность выбранного подхода.

Таким образом, в рамках выбранной стратегии получения триазириламинофосфатных производных олигонуклеотидов предполагается использование наиболее реакционноспособного азидотриазина – 2-азидо-4,6-дихлор-1,3,5-триазина, получение общего промежуточного фосфазенового производного и дальнейшая обработка разнообразными аминами для введения в состав получаемого олигонуклеотидного производного интересующих функциональных групп.

Исследование эффективности протекания реакции Штаудингера, получение модельных триазириламинофосфатных декатимидилатов. В качестве модельных систем для проверки эффективности протекания реакции модификации были выбраны декатимидилаты, в которых модификация вводилась в ближайший к 5'-концу межнуклеотидный фосфат.

Получение модельных олигонуклеотидов осуществляли следующим образом. Синтез олигонуклеотидной цепи проводили на ДНК-синтезаторе вплоть до стадии конденсации звена, чья фосфатная часть будет модифицирована триазиновым остатком. Далее полученный фосфит-триэфир, иммобилизованный на твердофазном носителе, переносили в пробирку и проводили этап окисления добавлением раствора 2-азидо-4,6-дихлор-1,3,5-триазина в ацетонитриле (0.1 М,

15 мин, 25°C). После отмывки полимера от азидомодификатора добавляли раствор бутиламина (1 М в ацетонитриле, 60 мин, 25°C, **O2**) или додециламина (3 М в пиридине, 30 мин, 55°C, **O3**) для введения в структуру синтезируемого олигонуклеотида соответствующих остатков. Далее полимерный носитель переносили в реактор для синтеза олигонуклеотидов, после чего продолжали автоматизированный твердофазный синтез по амидофосфитному протоколу. После завершения олигонуклеотидного синтеза проводили финальное деблокирование концентрированным водным раствором метиламина. В случае остатков метиламина введение соответствующих остатков выполняли непосредственно на этапе финального деблокирования (**O1**).

Общая схема получения модельных декатимидилатов представлена на рис. 2.

Эффективность модификации для всех заместителей была оценена методом оФВЭЖХ реакционных смесей олигонуклеотидов (рис. 3). Из анализа профилей хроматографического разделения реакционных смесей различных представителей триазириламинофосфатов можно сделать вывод, что выходы целевых продуктов сильно зависят от условий протекания реакций с участием аминов, несущих функциональные остатки. При этом, как и ожидалось, стадия окисления азидотриазином проходит более чем на 90% даже при комнатной температуре.

Таким образом, на модельных олигонуклеотидах была исследована эффективность получения триазириламинофосфатных производных и их

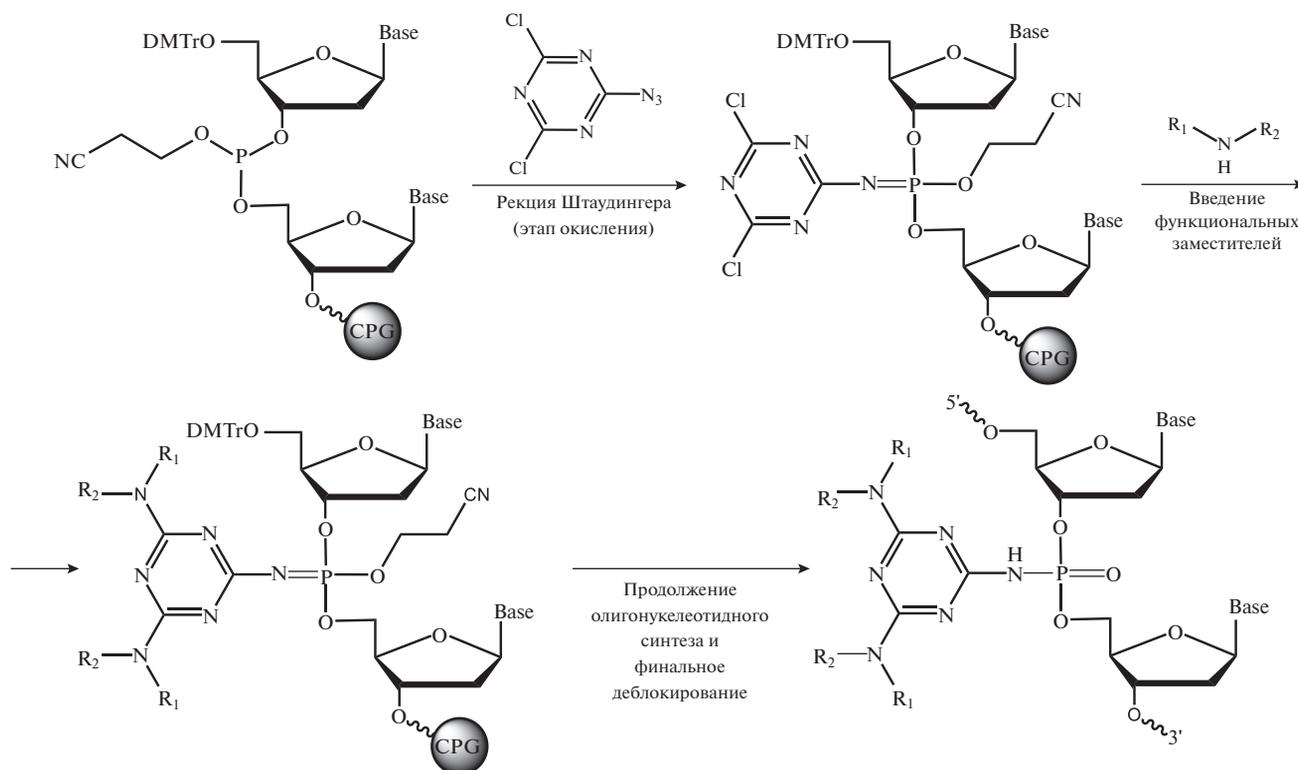


Рис. 2. Общая схема синтеза модифицированных триазириламинофосфатных олигонуклеотидов. CPG – полимерный носитель, Base – азотистое основание, DMTr – диметокситригильная защитная группа, R_1 и R_2 – вводимые в состав олигонуклеотида заместители.

устойчивость в рамках протоколов твердофазного автоматического амидофосфитного синтеза ДНК, и, в частности, устойчивость вводимых модификаций к жестким щелочным условиям – обработке концентрированным водным раствором метил-амина.

Получение модифицированных олигонуклеотидов, обладающих гетеронуклеотидной последовательностью. При исследовании возможности введения триазириламинофосфатной модификации в состав синтезируемой олигонуклеотидной последовательности, содержащей звенья, отличные от тимидилатов, после завершения синтеза полноразмерной последовательности в реакционной смеси были обнаружены значительные количества побочных продуктов (данные не приведены). Вероятно, в результате наличия нескольких реакционных центров в 2-азидо-4,6-дихлор-1,3,5-триазине при проведении этапа окисления происходит и побочная реакция взаимодействия используемого модификатора даже с защищенными экзоциклическими аминогруппами цитозина, гуанина и аденина. Данный факт – ограничение используемого подхода для введения триазин-амидофосфатных модификаций в произвольное положение гетеронуклеотидной последовательности. Однако это не препятствует получению олигонуклео-

тидов, содержащих модификацию в 3'-концевой области последовательности, где модифицируемый фосфат будет располагаться между звеньями, не содержащими цитозина, гуанина или аденина, например, между двумя тимидилатными звеньями.

В качестве последовательности для дальнейшего изучения свойств создаваемых модифицированных олигонуклеотидов был выбран 16-звенный олигонуклеотид 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*Т-3', содержащий на 5'-конце остаток флуоресцеина и триазириламинофосфатную модификацию в 3'-концевой области. Были синтезированы модифицированные олигонуклеотиды, содержащие бутильные остатки (OSN1F), додецильные (OSN4F), контрольный олигонуклеотид, не содержащий триазириновой модификации (OSNF) и комплементарный ему олигонуклеотид 5'-AATACTTCATAGTCAG-3'.

Стоит отметить, что выбор вводимых заместителей не случаен. Ранее мы показали [11], что олигонуклеотиды, содержащие два и более остатка додецила, способны с определенной эффективностью проникать внутрь клетки. Сравнение эффективности проникновения различных триазириламинофосфатных олигонуклеотидов позволит оценить вклад как триазинового остова (OSNF

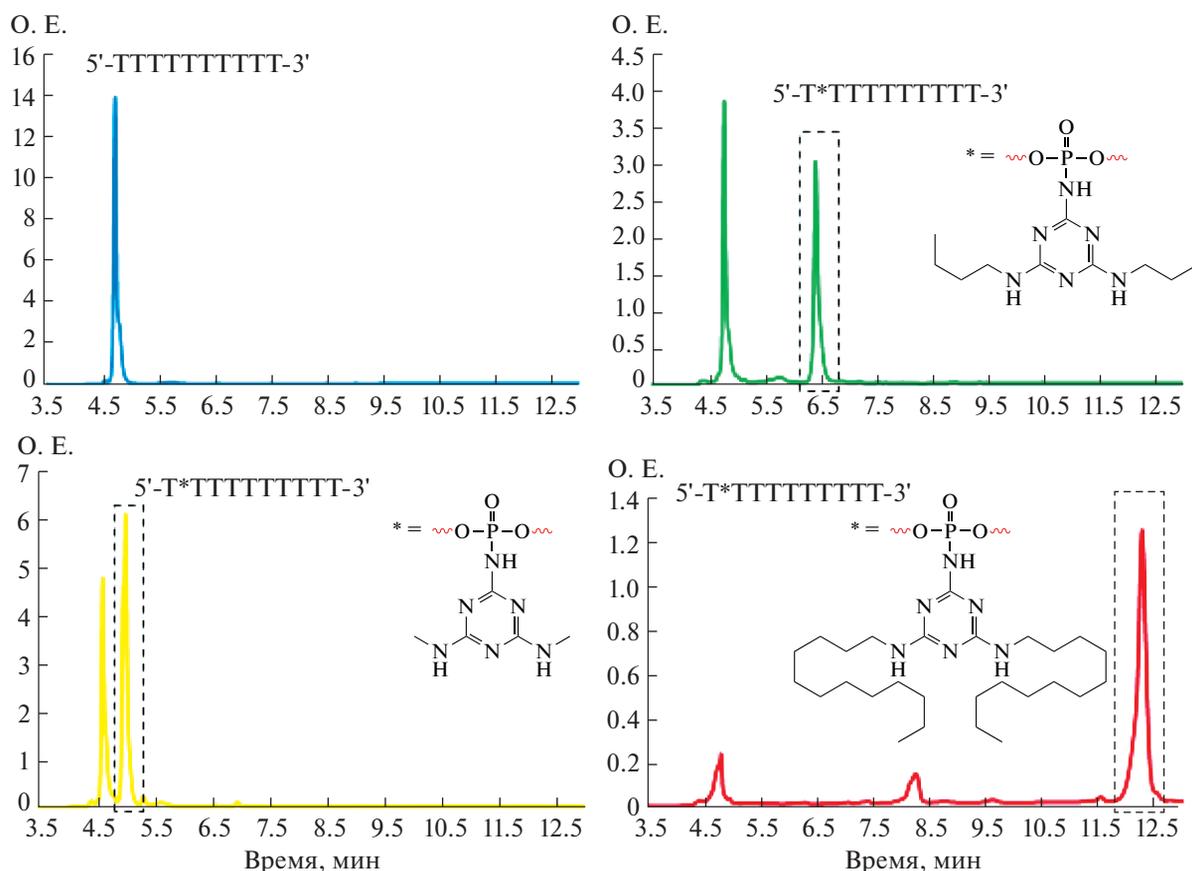


Рис. 3. Профиль офВЭЖХ реакционной смеси модельных триазириламинофосфатных олигонуклеотидов с остатками метиламина (**O1**, желтый), бутиламина (**O2**, зеленый) и додециламина (**O3**, красный) и контрольного олигонуклеотида без модификации (**T10**, синий). Градиент: 0–90% CH_3CN за 15 мин, $\lambda = 260$ нм.

против OSN1F), так и гидрофобности заместителей в остоле (OSN1F против OSN4F).

Полученные олигонуклеотиды были очищены и охарактеризованы методами офВЭЖХ и масс-спектрометрии. На рис. 4 представлены профили аналитической офВЭЖХ выделенных олигонуклеотидов. Последовательности олигонуклеотидов и результаты ESI масс-спектрометрии приведены в табл. 1.

Представленные профили аналитической офВЭЖХ наглядно демонстрируют зависимость гидрофобности получаемых соединений от типа вводимых заместителей.

Исследование устойчивости триазириламинофосфатного звена в кислой среде. Исследуемые производные можно отнести к классу амидофосфатных производных. Известно, что амидофосфаты могут подвергаться кислотному гидролизу. Степень гидролиза выше для алкиламинофосфатов и снижается при переходе к ароматическим заместителям [12].

Для сравнения гидролитической активности разных типов модификаций был проведен эксперимент по выдерживанию в кислой среде (0.1 M

HCl) олиготимидилатов с триазириламинофосфатной (**O2**) и бензиламинофосфатной (**Bz**) модификациями. Результаты анализа гидролиза с течением времени представлены на рис. 5.

Количество олигонуклеотида, содержащего бензиламинофосфатную модификацию (**Bz**), уже через 3 ч снижалось на 60%, а после 13 ч – более чем на 85%. В то же время количество олигонуклеотида, содержащего триазириламинофосфатную модификацию (**O2**), не менялось на протяжении всего времени эксперимента.

Таким образом, можно заключить, что триазириламинофосфатная модификация, в отличие от алкиламинофосфатных аналогов, обладает высокой степенью устойчивости при низких значениях pH.

Выбор модельных клеточных линий и оценка в них содержания белков репарации. Для изучения возможности применения модифицированных олигонуклеотидов в качестве агентов, сенсбилизирующих клетки к действию химио- или лучевой терапии, необходима информация о взаимодействии олигонуклеотидов с ключевыми белками-инициаторами репарации ДНК, в частности с

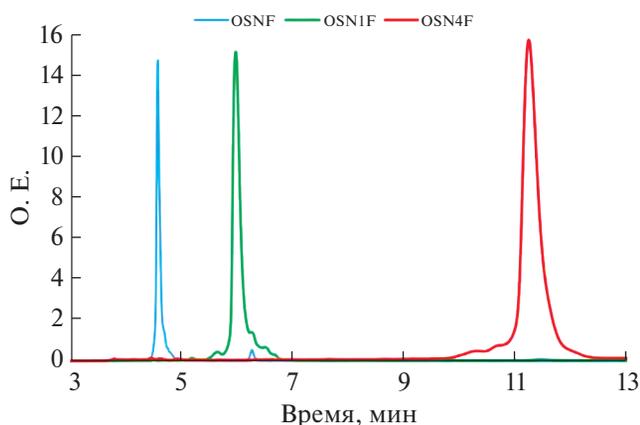


Рис. 4. Профиль офВЭЖХ реакционной смеси триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с остатками бутиламина (OSN1F) додециламина (OSN4F) и контрольного олигонуклеотида без модификации (OSNF). Градиент: 0–90% CH_3CN за 15 мин, $\lambda = 260$ нм.

Ku-антигеном и PARP1. Ku-антиген — ключевой фактор процесса негомологичной рекомбинации, ответственной за исправление двойных разрывов в ДНК [13]. PARP1 регулирует различные механизмы репарации, в том числе репарацию двойных разрывов в ДНК [14]. Для этих целей рационально проводить исследования на модельных клеточных системах с известным содержанием этих белков.

Для оценки в клетках количества ключевых белков репарации был использован метод аффинной модификации фотоактивируемым ДНК-интермедиатом эксцизионной репарации оснований (рис. 6). Анализ содержания целевых белков в экстрактах основан на оценке количества ковалентных комплексов, образованных ими с мечеными ДНК-интермедиатами репарации. Этот метод продемонстрировал свою эффективность при исследовании репарации ДНК в экстрактах клеток млекопитающих, различающихся по содержанию Ku-антигена и PARP1 [15].

При выборе модельных клеточных линий в панель были включены онкотрансформированные клетки разного происхождения: шейка матки (HeLa), молочная железа (MCF7), периферическая кровь (В-лимфоциты (Im9), лимфома Беркита

(BJAB)), мозг человека (глиобластома T98G), а также иммортализованные неонкотрансформированные клетки эмбриональной почки человека (HEK293T) и эмбриональные легочные фибробласты человека (MRC5).

Анализ данных показывает, что основными белками-мишенями фотоактивируемых ДНК выступают PARP1, Ku80- и Ku70-субъединицы Ku-антигена (рис. 6). Интересно отметить, что соотношение интенсивностей продуктов мечения, относящихся к PARP1 и Ku-антигену, варьирует в зависимости от экстракта. В экстракте HEK293T (дорожка 4) содержание Ku-антигена и PARP1 близко к максимальному, а в экстракте T98G (дорожка 3) эти белки практически не детектируются.

Содержание Ku-антигена и PARP1 в клеточных экстрактах было дополнительно оценено методом вестерн-блоттинга (рис. 7). Оценка количеств белков PARP1 и Ku-антигена в экстрактах клеток на основе данных фотоаффинной модификации (рис. 6) хорошо согласуется с результатами вестерн-блот-анализа этих белков в экстрактах (рис. 7). Экстракт T98G существенно обеднен по целевым белкам, а экстракт HEK293T содержит количества этих белков, близкие к максимальным. Интересно отметить, что использованные подходы взаимно дополняют друг друга. Вестерн-блоттинг позволяет оценить содержание целевых полипептидов, но не их активность в связывании ДНК. Аффинная модификация детектирует молекулы белка, связанные с ДНК, и учитывает конкуренцию других ДНК-связывающих белков экстракта. Следует отметить, что HEK293T — часто используемая в работах контрольная (неонкотрансформированная) клеточная линия.

Таким образом, для дальнейших экспериментов были выбраны клеточные линии HEK293T и T98G со значительным различием по содержанию целевых белков. Кроме того, эти клеточные линии неприхотливы в культивировании.

Проверка устойчивости модифицированных олигонуклеотидов к действию нуклеаз цельноклеточных экстрактов. В эукариотической клетке присутствует более десятка белков для деградации собственной и чужеродной ДНК [16, 17]. В связи с этим для оценки влияния триазилил-

Таблица 1. Последовательности полученных олигонуклеотидов и результаты масс-спектрометрического анализа

| Шифр | Последовательность (5'–3') | Вводимые остатки | $M_{\text{теор}}$, г/моль | $M_{\text{эксп}}$, г/моль |
|-------|----------------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
| OSNF | [FAM]CTGACTATGAAGTATT | — | 5432.3 | 5432.0 |
| OSN1F | [FAM]CTGACTATGAAGTAT*Т | Бутил | 5652.5 | 5652.1 |
| OSN4F | [FAM]CTGACTATGAAGTAT*Т | Додецил | 5876.8 | 5876.4 |
| ISN | AАТАСТTCАТАGTCAG | — | 4864.3 | 4863.8 |

Примечание: [FAM] — остаток флуоресцеина, * — триазиниламидофосфатное звено.

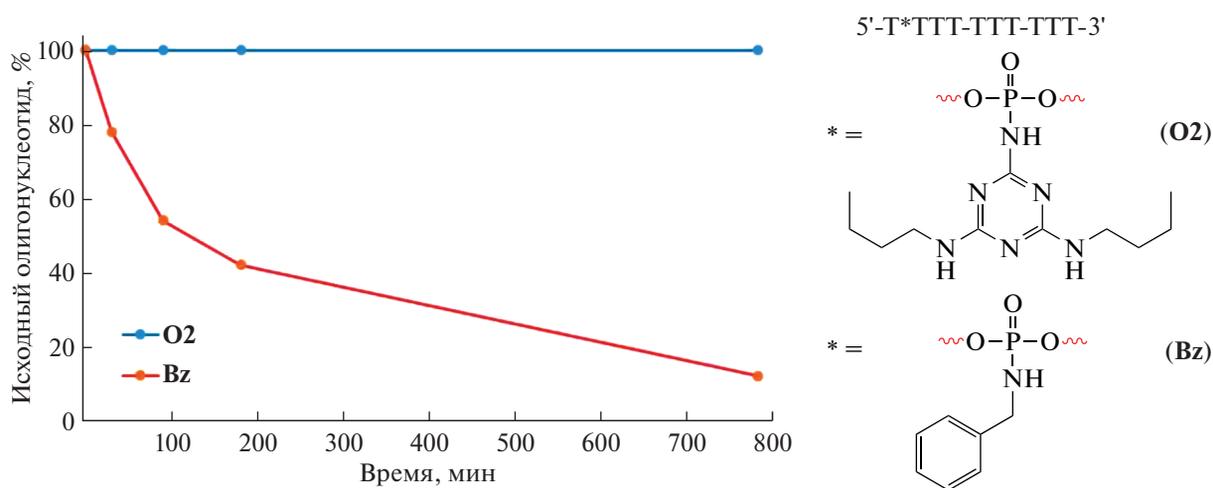


Рис. 5. Химическая устойчивость триазириламидофосфатов и бензиламидофосфатов в кислой среде. Содержание негидролизованного соединения оценивали методом оФВЭЖХ в пробах через 30, 90, 180 и 780 мин после начала реакции.



Рис. 6. (а) – Фотоаффинная модификация белков цельноклеточных экстрактов. Наименование клеточных линий приведено под электрофореграммой. Реакционные смеси содержали 1 мг/мл белков экстракта, 100 нМ [³²P]-содержащей фотоактивируемой ДНК и другие стандартные компоненты. Схематическое изображение использованной ДНК приведено над рисунком. Красной звездочкой указано положение радиоактивного фосфата, желтой звездочкой – положение фотоактивируемого остатка FAP-dCMP; (б) – структурная формула FAP-dCTP.

амидофосфатной группы на устойчивость одно- и двуцепочечных олигонуклеотидов к действию нуклеаз были проведены эксперименты с использованием цельноклеточных экстрактов линий HEK293T и T98G, выбранных нами для дальнейших исследований (рис. 8).

Для модифицированных ДНК-дуплексов (OSN1F/ISN и OSN4F/ISN) и контрольного немодифицированного дуплекса (OSNF/ISN) было установлено, что температуры их плавления ($T_{пл}$)

в условиях, близких к физиологическим (см. “Эксперим. часть”), лишь незначительно различаются и составляют, соответственно, 49.6, 49.2 и 50°C. Следовательно, введение предложенных модификаций межнуклеотидного фосфата вблизи конца дуплексной структуры слабо влияет на его термическую стабильность. При этом увеличение объема и гидрофобности остатка (OSN4F/ISN, $T_{пл} = 49.2^\circ\text{C}$) в большей степени стабилизирует двойную спираль.

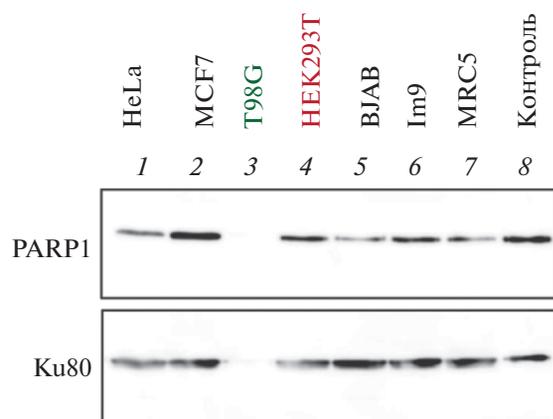


Рис. 7. Содержание PARP1 и Ку-антигена в экстрактах различных клеток. На дорожках 1–7 нанесены белки клеточных экстрактов (указаны сверху) с суммарным содержанием белка 10 мкг на пробу. На дорожке 8 нанесено 28 нг индивидуального PARP1 или 38 нг индивидуального Ку-антигена.

Из данных, представленных на рис. 8, можно выявить ряд закономерностей. Во-первых, для обоих экстрактов характерна меньшая устойчивость всех одноцепочечных олигонуклеотидов к действию нуклеаз по сравнению с соответствующими ДНК-дуплексами; во-вторых, эффективность расщепления одноцепочечных олигонуклеотидов несколько выше в экстракте HEK293T, чем в экстракте T98G, причем эта закономерность наблюдается для нативного и модифицированных олигонуклеотидов; в-третьих, наличие и

тип модифицирующей группы вблизи 3'-конца вносят значимый вклад в устойчивость олигонуклеотидов. Для немодифицированного олигонуклеотида в одноцепочечном состоянии или в составе дуплекса в экстракте T98G удалось зарегистрировать продукты частичного экзонуклеазного гидролиза в направлении 3'→5', в отличие от экстракта HEK293T, где детектировались только продукты полного гидролиза, обладающие максимальной электрофоретической подвижностью. Следует отметить, что формирование низкомолекулярного продукта может быть дополнительно обусловлено непосредственным расщеплением остова вблизи FAM-группы. Отсутствие продуктов “пошагового” расщепления в экстракте HEK293T, скорее всего, обусловлено защитным эффектом белков экстракта, в частности Ку-антигена. Ку-антиген связывается с ДНК, “надеваясь как бусина на нитку”, локализуется преимущественно вблизи концов и накрывает ~12–14 нт [18]. Ку-антиген способен связываться с одноцепочечной ДНК, хотя и менее эффективно [19]. Косвенно на защитное действие Ку-антигена указывает значительно более выраженный эффект на ДНК-дуплексах, проявляющийся в экстракте HEK293T, который обогащен по этому белку. Ку-антиген способен “нагружаться” на ДНК со стороны тупого конца, не содержащего модификации, в то время как введение объемной флуоресцентной группы в 5'-конец, вероятно, препятствует связыванию Ку-антигена с ДНК с соответствующего тупого конца или затрудняет этот этап. Учитывая размер отрезка ДНК, находящегося в непосредственном

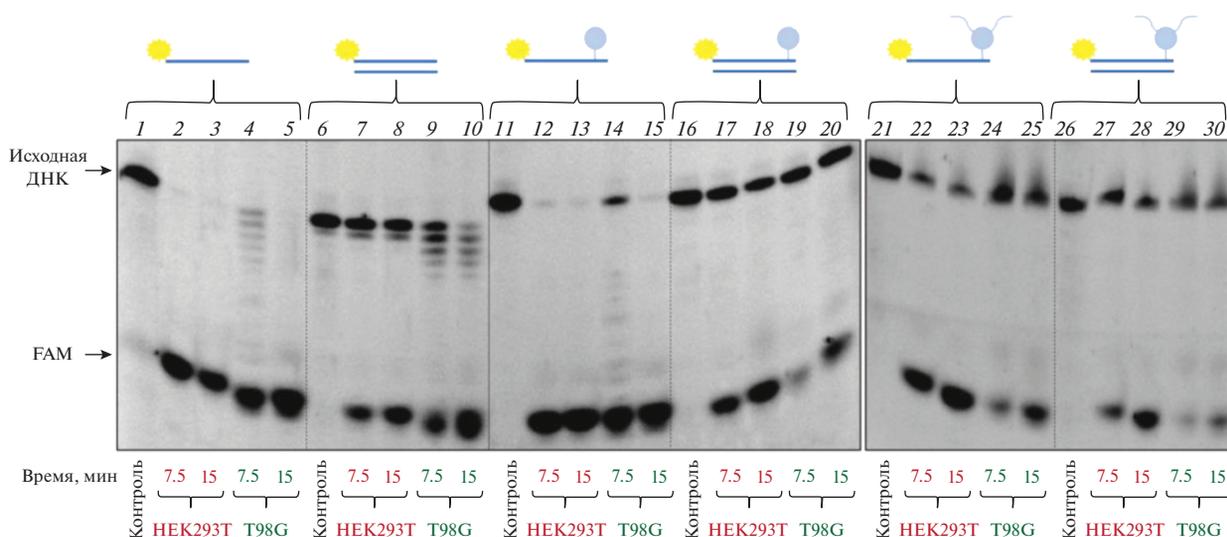


Рис. 8. Устойчивость одноцепочечных олигонуклеотидов и ДНК-дуплексов к действию нуклеаз клеточных экстрактов HEK293T и T98G. Реакционные смеси, содержащие 1 мг/мл белков экстракта HEK293T или T98G, 100 нМ FAM-содержащих олигонуклеотидов (OSNF, OSNF/ISN, OSN1F, OSN1F/ISN, OSN4F, OSN4F/ISN, схематическое изображение приведено сверху) и другие стандартные компоненты, инкубировали 7.5 или 15 мин при 37°C, затем аликвоты анализировали в ПААГ в присутствии 7 М мочевины. Желтой звездочкой отмечено положение флуоресцентной метки, голубым кружком показано положение триазинового заместителя.

контакте с Ku-антигеном, и длину олигонуклеотида (16 звеньев), можно предположить, что возле FAM-модифицированного конца остается достаточное пространство для связывания нуклеаз, которые расщепляют остов ДНК. На возможность такого хода событий указывает отсутствие продуктов “пошагового” 3'→5' экзонуклеазного расщепления в экстракте НЕК293Т, характерного для экстракта Т98G. Хотя Ku-антиген преимущественно локализуется возле концов, он может перемещаться вдоль ДНК-дуплекса без затрат энергии [20], благодаря чему возможно проявление его защитного эффекта в участках ДНК, удаленных от концов.

В том случае, если связывание Ku-антигена затруднено, следует ожидать отсутствия его защитного влияния. Действительно, для дуплексов OSN1F/ISN и OSN4F/ISN с модифицированными олигонуклеотидами характер расщепления в обоих экстрактах схож и резко отличается от картины, характерной для немодифицированного дуплекса OSNF/ISN.

В целом устойчивость олигонуклеотидов к действию клеточных нуклеаз в направлении 3'→5' как для одноцепочечных олигонуклеотидов, так и в составе ДНК-дуплексов, уменьшается в ряду OSN4F > OSN1F > OSNF. Таким образом, введение триазинового производного в область 3'-конца олигонуклеотида увеличивает его устойчивость к действию клеточных нуклеаз, причем увеличение размера заместителей в составе вводимого производного приводит к увеличению этой устойчивости.

Таким образом, было показано, что по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами их триазиламидофосфатные производные обладают повышенной устойчивостью к ферментативному гидролизу, катализируемому клеточными нуклеазами, что значительно расширяет возможности использования таких олигонуклеотидов в экспериментах с клетками.

Проникновение триазиламидофосфатных олигонуклеотидов через клеточную мембрану. Для оценки способности олигонуклеотида OSN4F, содержащего два остатка додецила, проникать в клетки в отсутствие трансфектантов с помощью проточной цитофлуорометрии было исследовано внутриклеточное накопление OSN4F в клетках НЕК293Т и Т98G. В качестве отрицательного контроля использовали доставку контрольного олигонуклеотида OSNF в отсутствие трансфектантов, а в качестве положительного контроля — доставку OSNF с помощью Липофектамина 2000. Для определения влияния замены нативной межнуклеотидной фосфатной группы на триазиламидофосфатное звено с нейтрализацией заряда без увеличения общей гидрофобности были также проведены эксперименты по оценке проник-

новения олигонуклеотида, содержащего два бутильных остатка (OSN1F). Трансфекцию клеток проводили в течение 4 ч в среде IMDM без сыворотки и антибиотиков, после чего клетки анализировали с помощью проточной цитофлуорометрии (рис. 9). Из представленных данных видно, что олигонуклеотид OSN4F эффективно проникает в клетки НЕК293Т как с точки зрения количества трансфицированных клеток, так и интенсивности флуоресценции (рис. 9а, 9б), при этом эффективность трансфекции напрямую зависела от концентрации олигонуклеотида в инкубационной среде — до 100% клеток были трансфицированы с интенсивностью флуоресценции от 1.3×10^5 до 4.2×10^5 RFU для 1 и 5 мкМ OSN4F соответственно. При этом уровень трансфекции OSN4F был сопоставим с эффективностью доставки контрольного олигонуклеотида OSNF с помощью коммерческого трансфектанта Липофектамина 2000 (100% трансфицированных клеток, 2.9×10^5 – 5.8×10^5 RFU).

Для клеток глиобластомы Т98G было показано, что эффективность накопления как для олигонуклеотида OSN4F, так и комплексов OSNF с Липофектаминам 2000 была 2–5 раз ниже по сравнению с клетками НЕК293Т (рис. 9в, 9г), при этом сохранялась дозозависимая закономерность увеличения эффективности трансфекции. Снижение эффективности трансфекции для данного типа клеток, вероятно, связано с их морфологическими и метаболическими особенностями. Для клеток Т98G также следует отметить, что в отличие от НЕК293Т, разница между эффективностью доставки олигонуклеотида OSN4F и липофекцией OSNF с помощью Липофектамина 2000 была значительнее — интенсивность флуоресценции составила 1.5×10^4 – 1.8×10^5 для 1 и 5 мкМ OSN4F, 1.8×10^5 – 4.6×10^5 для 1 и 5 мкМ Липофектамина 2000/OSNF соответственно.

Таким образом, было показано, что олигонуклеотид OSN4F способен эффективно накапливаться в клетках НЕК293Т и Т98G, при этом эффективность его доставки сопоставима (для НЕК293Т) или в 2 раза ниже (для Т98G) по сравнению с эффективностью трансфекции контрольного олигонуклеотида с помощью Липофектамина 2000.

Внутриклеточное накопление дуплексов в клетках НЕК293Т и Т98G. С помощью проточной цитофлуорометрии была также исследована эффективность накопления дуплекса OSN4F/ISN в клетках НЕК293Т и Т98G через 4 ч после начала трансфекции. В качестве отрицательного контроля использовали дуплекс, сформированный из контрольного немодифицированного олигонуклеотида OSNF, не несущего липофильные модификации, и комплементарного олигонуклеотида ISN. Основываясь на результатах эксперимента

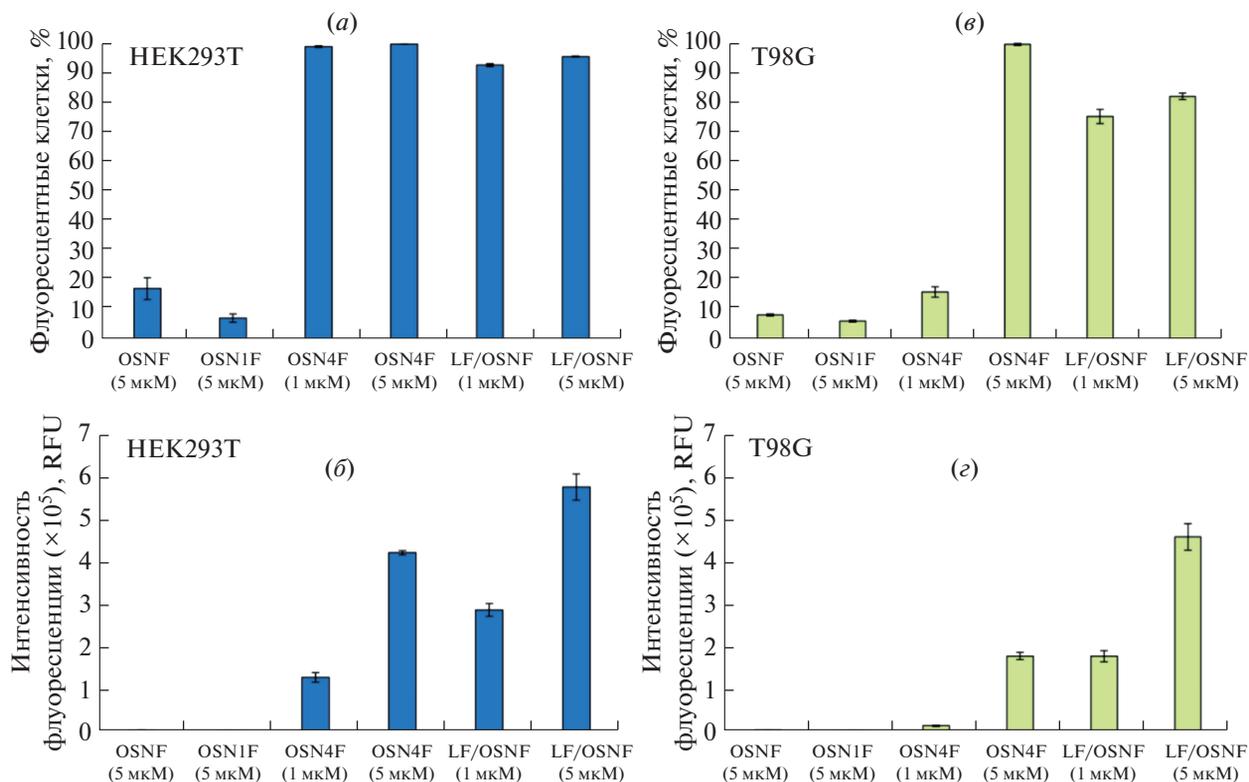


Рис. 9. Внутриклеточное накопление олигонуклеотидов в клетках HEK293T (а, б) и T98G (в, г). Процент флуоресцентных клеток (а, в) и среднюю интенсивность флуоресценции (б, г) измеряли с помощью проточной цитофлуориметрии через 4 ч после трансфекции. RFU – относительные флуоресцентные единицы, LF – Липофектамин 2000. Данные представлены как средние значения \pm SD.

по доставке одноцепочечного олигонуклеотида, описанного выше, в качестве рабочей была выбрана концентрация 5 мкМ.

Показано, что дуплекс OSN4F/ISN эффективно накапливался в клетках HEK293T (100% трансфицированных клеток, 4.1×10^5 RFU) и в 2 раза менее эффективно – в клетках T98G (100% трансфицированных клеток, 1.9×10^5 RFU) (рис. 10). Следует отметить, что эффективность доставки дуплекса OSN4F/ISN была практически равнозначна эффективности накопления одноцепочечного олигонуклеотида OSN4F (рис. 9 и 10).

Таким образом, с использованием проточной цитофлуориметрии была продемонстрирована эффективность проникновения через клеточную мембрану как одноцепочечного олигонуклеотида, несущего в своем составе два остатка додецила (OSN4F), так и соответствующего комплементарного комплекса (OSN4F/ISN).

Проверка цитотоксичности триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов. Помимо стабильности в биологических средах и эффективности проникновения в клетки важное свойство, определяющее перспективность терапевтического применения исследуемых олигонуклеотидов, –

общая цитотоксичность. Исследование цитотоксичности модифицированного олигонуклеотида OSN4F и дуплекса OSN4F/ISN в отношении клеток HEK293T и T98G выполняли *in vitro* в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence (ACEA Biosciences, США) в течение 24–36 ч. Данные по выживаемости клеток в зависимости от времени инкубации представлены на рис. 11 (левая панель). На основе полученных данных были построены дозозависимые кривые выживаемости клеток и рассчитаны значения IC_{50} (рис. 11, правая панель). Из представленных данных видно, что олигонуклеотид OSN4F – нетоксичен в отношении клеток HEK293T и T98G ($IC_{50} = 201.8$ и 385.8 мкМ соответственно) (рис. 11а, правая панель). Дуплекс OSN4F/ISN оказался на порядок более токсичным в отношении исследованных клеток по сравнению с одноцепочечным олигонуклеотидом OSN4F – IC_{50} составила 33.1 мкМ для HEK293T и 28.1 мкМ для T98G (рис. 11б, правая панель). Тем не менее, рассчитанные значения IC_{50} для дуплекса были значительно выше рабочих концентраций олигонуклеотидов, обычно используемых в клеточных экспериментах, т.е. 1–5 мкМ. Было показано, что и олигонуклеотид OSN4F, и дуплекс OSN4F/ISN –

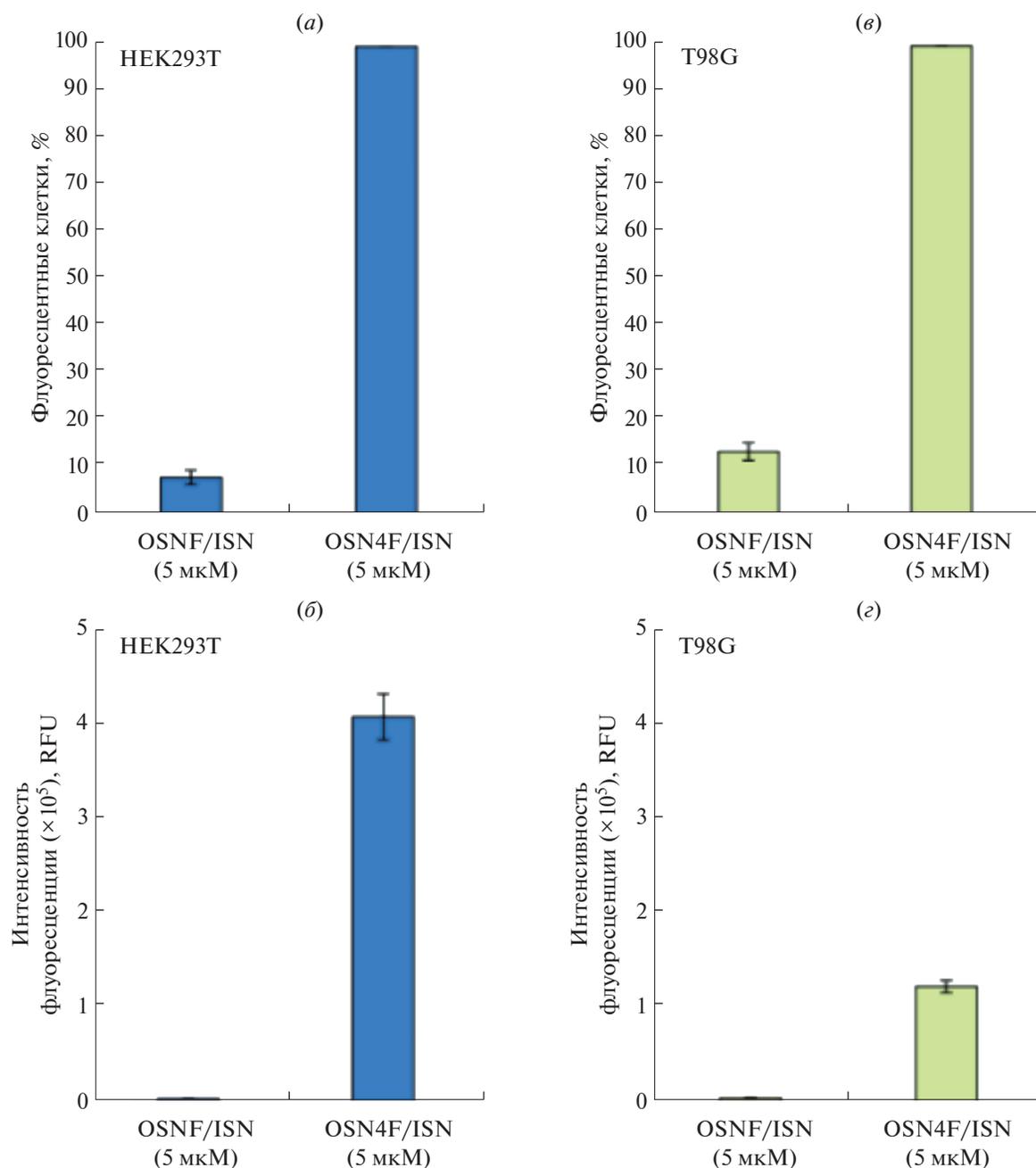


Рис. 10. Внутриклеточное накопление дуплексов OSNF/ISN и OSN4F/ISN олигонуклеотидов в клетках HEK293T (а, б) и T98G (в, г). Процент флуоресцентных клеток (а, в) и среднюю интенсивность флуоресценции (б, г) измеряли с помощью проточной цитофлуориметрии через 4 ч после трансфекции. RFU – относительные флуоресцентные единицы. Данные представлены как средние значения \pm SD.

нетоксичны для клеток HEK293T и T98G в рабочих концентрациях до 5 мкМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. В работе были использованы нуклеотидные амидофосфиты (Glen Research, США); цианурхлорид, азид натрия, Tween 20, Nonidet P-40, формамид (PanReac AppliChem,

Испания); бутиламин (Merck, Германия); додециламин (Acros Organics, США); ТЕМЕД, бис-акриламид (Amresco, США); Трис, бромфеноловый синий (Sigma, США); акриламид, ЭДТА, ксиленцианол, персульфат аммония (Helicon, Россия); реактивы и растворители квалификации х.ч. и о.с.ч.

FAP-dCTP (экзо-*N*-{2-[*N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил]-

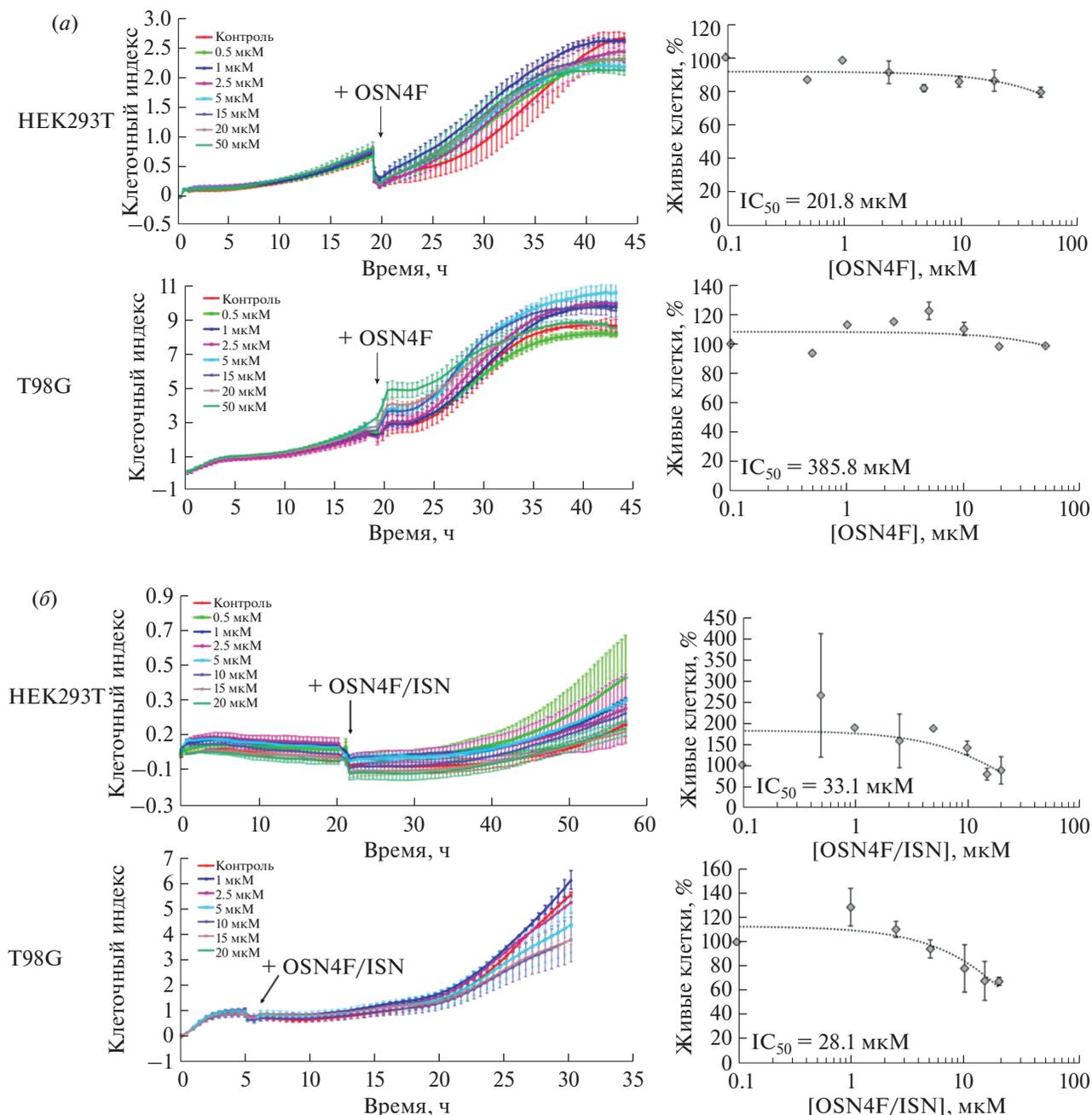


Рис. 11. Цитотоксичность олигонуклеотида OSN4F (а) и дуплекса OSN4F/ISN (б) в отношении клеток HEK293T и T98G. Клетки инкубировали с увеличивающейся концентрацией олигонуклеотида/дуплекса в течение 24–36 ч. Левая панель — данные по выживаемости клеток в режиме реального времени, полученные с помощью прибора xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Контроль — клетки HEK293T или T98G, инкубированные в отсутствие олигонуклеотида/дуплекса. Правая панель — дозозависимые кривые выживаемости клеток в конечной точке инкубации. Все экспериментальные точки выполнены в трех повторах для статистического анализа. Данные представлены как средние значения \pm SD.

аминоэтил}-2'-дезокситидин-5'-трифосфат) любезно предоставлен В.Н. Сильниковым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). [γ - 32 P]АТФ (>3000 Ки/ммоль) произведен в лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Поликлональные антитела кролика к PARP1 любезно предоставлены д.б.н. Г.Л. Диановым (Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия); моноклональные антитела кролика к Ku80-субъединице Ku-антигена (Oncogene Research Products, США), T4 полинуклеотидкиназа (Биосан, Россия) и конъюгат пероксидазы хрена со вторичными ан-

тителами к антителам кролика (Биосан, Россия); таблетированный коктейль ингибиторов протеаз Mini EDTA Free (Roche, Германия); маркеры молекулярной массы белков PageRuler (Thermo Scientific, США). Краситель Coomassie Brilliant Blue R-250, фильтровальная бумага и нитроцеллюлозная мембрана для вестерн-блот-анализа, буфер Trans-blot Buffer (Bio-Rad, США); субстрат для проявления вестерн-блота Pierce ECL Western Blotting Substrate, Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, США), сухое обезжиренное молоко (Regilait, Франция). TEMED, бис-акриламид (Amresco, США); $MgCl_2$, Трис, SDS, DTT, бромфеноловый синий, $NaBH_4$, бычий сывороточный альбумин, дитиотреитол, акриламид, персульфат аммония, ЭДТА, глицин (Sigma, США); глицерин (ICN, США).

Для ТСХ применяли пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия). Для колоночной адсорбционной хроматографии использовали колонки объемом 100 и 200 мл с рассчитанным количеством сорбента Kieselgel 60 (размер частиц 0.06–0.20 мм, размер пор 60 Å; Merck, Германия).

Для концентрирования водных и органических растворов использовали ротационные испарители Rotavapor R200, Rotavapor RE120 (Buchi, Швейцария) и CentriVap Vacuum Concentrator Systems (Labconco, США) при давлении 10–15 мм рт. ст. и температуре до 40°C. Получаемые соединения высушивали до постоянной массы, выдерживая их в эксикаторе при пониженном давлении (4 мм рт. ст.) над P_2O_5 .

офВЭЖХ реакционных смесей модифицированных олигонуклеотидов проводили на хроматографе Милихром А02 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C18 (2 × 75 мм; Эконова, Россия). Разделение продуктов реакции осуществляли в градиенте ацетонитрила (0–90% за 15 мин) в 0.02 М водном растворе триэтиламмоний ацетата, pH 7 (скорость потока 200 мкл/мин, температура термостата 35°C). Детекцию осуществляли на четырех длинах волн: 260, 280, 300 и 360 нм.

Хроматографическое выделение олигонуклеотидов проводили на хроматографе Agilent 1200 (США) с колонкой Zorbax SB-C18 (5 мкм) 4.6 × 150 мм в градиенте ацетонитрила 0–90% в 20 мМ ацетате триэтиламмония, pH 7, в течение 30 мин при скорости потока 1.5 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали со смесью $H_2O/EtOH$ 1 : 1 в вакууме на установке SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, США). Затем олигонуклеотиды осаждали добавлением 1 мл раствора 1 М $LiClO_4$ в ацетоне, осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе в течение 20 мин.

Спектры ESI-MS модифицированных олигонуклеотидов регистрировали на масс-спектро-

метре Reflex III Autoflex Speed (Bruker, Германия) в варианте отрицательных ионов.

^{13}C -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker AC 200 (300, 500 МГц; Bruker, Германия) в дейтерированном хлороформе с концентрацией 100 мг/мл. Спектры анализировали с помощью программы SPINWORKS. Спектры регистрировали в Химическом исследовательском центре коллективного пользования СО РАН при Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Электрофорез в денатурирующих условиях проводили в 20%-ном ПААГ с соотношением акриламида к бис-акриламиду 19 : 1 и 7 М мочевиной в 1× TBE-буфере (20× TBE : 1 М Трис, pH 8.3, 1 М H_3BO_3 , 0.0265 М ЭДТА). Для полимеризации добавляли 10 мкл персульфата аммония (10%) и 1 мкл TEMED на 1 мл объема. В качестве электродного буфера использовали 1× TBE-буфер. Денатурирующий буфер (5×) содержал формид, бромфеноловый синий и ксиленианол.

В работе использовали спектрофотометр U-0080D (Hitachi, Япония); вакуумную сушилку для акриламидных гелей GD 2000 (Hoefler, США); pH-метр OP 211/1 (Radelkis, Венгрия). Распределение флуоресценции в гелях определяли с использованием системы Typhoon (GE Healthcare, США) и программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad, США).

Синтез 2-азидо-4,6-дихлор-1,3,5-триазина. К цианурхлориду (3 г, 16.3 ммоль) в 40 мл ацетона добавляли азид натрия (1.06 г, 16 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали концентрированным раствором NaCl (4 × 20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали до получения белого осадка продукта. Очистку проводили методом колоночной хроматографии в системе CH_2Cl_2 /гексан, 1 : 1. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянной массы. Масса полученного вещества составила 1.016 г (выход 33%). R_f 0.33; система CH_2Cl_2 /гексан, 1 : 1. ^{13}C -ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 171.41, 172.61.

Синтез олигонуклеотидов. Синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе ASM800 (Биоссет, Россия) согласно стандартному протоколу 2-цианэтильного амидофосфитного метода, используя стандартные коммерческие дезоксирибонуклеозидные мономеры и соответствующие пористые стекла (Glen Research, США). Для введения триазиламидофосфатной модификации после конденсации звена, чья фосфатная часть будет модифицирована, синтез останавливали, полимерный носитель переносили в пробирку, образовавшийся фос-

фит-триэфир окисляли в реакции с 200 мкл 0.1 М раствора 2-азидо-4,6-дихлор-1,3,5-триазина в ацетонитриле в течение 15 мин при 25°C. После промывки полимера от азидо-модификатора добавляли раствор амина: 1 М бутиламин в ацетонитриле (60 мин, 25°C); 3 М додециламин в пиридине (30 мин, 55°C). Далее загружали полимерный носитель в реактор и продолжали автоматический синтез по амидофосфитному протоколу на ДНК-синтезаторе.

Присоединение к олигонуклеотидам остатка флуоресцеина [FAM] проводили по стандартному амидофосфитному протоколу синтеза с увеличенным временем (30 мин), объемом (70 мкл) и концентрацией подаваемого коммерчески доступного мономера (0.1 М) (6-FAM amidite, LumiProbe, Россия).

Клеточные линии. Клеточные линии, любезно предоставленные сотрудниками Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, культивировали, как описано в работе Pina et al. [21]. Клетки HeLa, MCF7, T98G, HEK293T, MRC5 культивировали в среде IMDM (Gibco, США), клетки Im9 и VJAB культивировали в среде RPMI 1640 (Gibco, США) в присутствии 10% FBS (HyClone, США), 100 ед./мл пенициллина (Invitrogen, США) и 100 г/мл стрептомицина (Invitrogen, США) в атмосфере 5% CO₂. Цельноклеточные экстракты получали по методике Biade et al. [22]. Концентрацию белка в клеточных экстрактах определяли методом Бредфорд [23] с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Концентрации суммарного белка в экстрактах выравнивали, замораживали в аликвотах и хранили при -70°C.

Введение [³²P]-метки в 5'-конец олигонуклеотида и получение ДНК-дуплексов. Введение радиоактивной метки и получение ДНК-дуплексов осуществляли согласно методике Pina et al. [21].

Фотоаффинная модификация. Фотоактивируемый аналог dCTP встраивали в ДНК с помощью ДНК-полимеразы β с использованием FAP-dCTP (экзо-*N*-{2-[*N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпирдин-6-ил)-3-аминопропионил]аминоэтил}-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата) в качестве субстрата, как описано в работе Pina et al. [21]. Фотоаффинную модификацию проводили согласно методике Pina et al. [21]. Реакционные смеси для облучения содержали 0.1 мкМ фотоактивируемую ДНК и 1 мг/мл белков клеточного экстракта (HeLa, MCF7, T98G, HEK293T, VJAB, Im9 или MRC5). Контрольные пробы вместо белков экстракта содержали 34 или 20 нМ индивидуальные белки Ku и PARP1 соответственно. Гели анализировали с использованием сканера Typhoon (GE Healthcare, США) и программы Quantity One (Bio-Rad, США).

Сравнение количества PARP1 и Ku в клеточных экстрактах с помощью вестерн-блот-анализа. Вестерн-блот-анализ проводили согласно методике Pina et al. [24]. Кратко, 10 мкг суммарного белка клеточного экстракта (HeLa, MCF7, T98G, HEK293T, VJAB, Im9 или MRC5) или чистые белки PARP1 или Ku разделяли с помощью электрофореза по методу Лэммли [25]. Процедуру переноса проводили с использованием набора Trans-Blot Turbo в условиях, указанных производителем. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в растворе первичных антител (антитела кролика к PARP1 или Ku80 в разведении 1 : 1000), в растворе конъюгата пероксидазы хрена с вторичными антителами к антителам кролика, затем с коммерческим субстратом для проявки вестерн-блота Super Signal West Pico PLUS (Thermo Scientific, США). Хемилюминесценцию регистрировали на приборе Amersham Imager 600 (GE Healthcare, США).

Проверка устойчивости модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов к действию нуклеаз цельноклеточных экстрактов. Реакционные смеси содержали 1 мг/мл белков клеточного экстракта (T98G или HEK293T), 0.1 мкМ ДНК и буферные компоненты: 10 мМ MgCl₂, 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 50 мМ NaCl. Реакцию проводили в течение 7.5 и 15 мин для каждого экстракта при 37°C. Реакцию останавливали введением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ. После этого аликвоты анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях по методике Мазина с соавт. [26].

Формирование ДНК-дуплексов и определение температур их плавления. Для получения ДНК-дуплексов OSN4F/ISN и OSN4F/ISN соответствующие олигодезоксирибонуклеотиды в концентрации 2.5 мкМ каждого смешивали в эквимлярном соотношении в буфере PBS, смеси нагревали в течение 5 мин при 95°C, а затем медленно охлаждали. Полученные дуплексы использовали для экспериментов сразу после отжига.

Термическую денатурацию осуществляли на установке Cary 300 BioMelt (Varian, Австралия). Температуры плавления ($T_{пл}$) комплексов определяли, анализируя профили денатурации и ренатурации дуплексов, зарегистрированные на длинах волн 260 и 270 нм. Скорость нагрева/охлаждения образцов не превышала 0.5°C/мин. Точность определения величин $T_{пл}$ составила 0.1°C. Термодинамический анализ проводили, как описано в работе Shevelev et al. [27].

Исследование токсичности олигонуклеотидов и их дуплексов. Цитотоксичность олигонуклеотида OSN4F и дуплекса OSN4F/ISN изучали на клеточных культурах HEK293T и T98G в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence (ACEA Biosciences, США) в течение 24–36 ч. Клетки высевали на 16-луночные E-планшеты в

плотности 10^5 кл./лунку в 150 мкл полной среды IMDM и инкубировали в стандартных условиях в течение 7–24 ч для прикрепления клеток ко дну планшета. После этого среду заменяли на 150 мкл среды IMDM, содержащей 10% FBS и 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 мкМ олигонуклеотид OSN4F или 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 мкМ дуплекс OSN4F/ISN. Клетки инкубировали в течение 24–36 ч в стандартных условиях. Значения клеточных индексов измеряли каждые 30 мин. Дозозависимые кривые выживаемости клеток строили с помощью программного обеспечения MS Excel для временной точки 24 ч после добавления олигонуклеотида/дуплекса к клеткам. Цитотоксичность дуплекса OSN4F/ISN в отношении клеток HEK293T определяли через 36 ч после добавления дуплекса к клеткам вследствие медленной пролиферации клеток HEK293T. Значения IC_{50} рассчитывали как концентрацию олигонуклеотида/дуплекса, необходимого для снижения клеточного индекса на 50% по сравнению с контрольными клетками, инкубированными в отсутствие олигонуклеотида/дуплекса.

Исследование эффективности трансфекции клеток HEK293T и T98G олигонуклеотидом OSN4F и дуплексом OSN4F/ISN. Клетки HEK293T и T98G высевали в лунки 24-луночного планшета в концентрации 2×10^5 (HEK293T) или 1.2×10^5 кл./лунку (T98G) в 500 мкл полной среды IMDM и инкубировали в течение 18 ч для прикрепления клеток. Далее клеточную среду заменяли на 200 мкл среды IMDM без сыворотки и антибиотиков. Олигонуклеотиды (OSNF, OSN1F, OSN4F) или дуплексы (OSN4F/ISN) растворяли в среде Opti-MEM и добавляли к клеткам до финальной концентрации 1 или 5 мкМ для олигонуклеотидов и 5 мкМ для дуплексов (по 50 мкл на лунку). В качестве положительного контроля использовали трансфекцию клеток контрольным олигонуклеотидом OSNF с помощью коммерчески доступного трансфектанта Липофектамина 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Трансфекцию выполняли согласно протоколу фирмы-изготовителя. Клетки инкубировали в течение 4 ч в стандартных условиях. После инкубации клетки снимали с культурального пластика с помощью 2%-ного трипсина (MP Biomedicals, США), ресуспендировали в полной среде IMDM, центрифугировали при 200 g в течение 5 мин, промывали PBS и фиксировали в 2%-ном растворе формальдегида в PBS (10 мин, комнатная температура). Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США). Все экспериментальные точки выполняли в трех повторах для статистического анализа. Эффективностью трансфекции характеризовали двумя показателями – процентом флуоресцентных клеток в популяции и средней интенсивностью флуоресценции клеток в образце.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Авторами данной работы впервые получен новый класс олигонуклеотидных производных – триазириламидофосфаты. Для синтеза данных соединений на этапе окисления была использована реакция Штаудингера между фосфит-триэфирным производным олигонуклеотида и высокореакционноспособным 2-азидо-4,6-дихлор-1,3,5-триазином. Получаемое фосфазеновое производное – общее соединение-прекурсор для всех представителей класса, получаемых дальнейшей обработкой различными замещенными аминами. Такой подход позволяет гибко варьировать вводимые в состав триазинового остова функциональные группы. Результаты анализа полученных олигонуклеотидов методами офВЭЖХ и масс-спектрометрии указывают на высокую эффективность введения триазириламидофосфатной модификации предложенным методом.

С помощью фотоаффинной модификации и иммуноферментного анализа в экстрактах определено содержание Ku-антигена и PARP1 – потенциальных акцепторов ДНК-дуплексов. Для дальнейших экспериментов были выбраны клеточные линии с резко различающимся содержанием этих белков, что впоследствии облегчит возможность оценки вклада этих белков в действие созданных модифицированных олигонуклеотидов на клетки.

Проведенные эксперименты показали повышенную устойчивость триазириламидофосфатных олигонуклеотидов к действию клеточных нуклеаз. Олигонуклеотид, несущий два остатка додецила на триазиновом остове, способен эффективно проникать через клеточную мембрану, не проявляя выраженной цитотоксичности.

Предложенный класс триазириламидофосфатных олигонуклеотидов, несмотря на определенные ограничения в используемом способе их получения, перспективен в области создания терапевтических препаратов нового поколения, направленных на белковые мишени.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00204).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.С. Купрюшкин и Т.Д. Жарков внесли равный вклад в работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rinaldi C., Wood M. J. A.* // *Nat. Rev. Neurol.* 2017. V. 14. P. 9–21.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.169>
2. *Juskowiak B.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 399. P. 3157–3176.
<https://doi.org/10.1007/s00216-010-4304-5>
3. *Yin W., Rogge M.* // *Clin. Transl. Sci.* 2019. V. 12. P. 98–112.
<https://doi.org/10.1111/cts.12624>
4. *Balwani M., Sardh E., Ventura P., Peiró P.A., Rees D.C., Stölzel U., Bissell D.M., Bonkovsky H.L., Windyga J., Anderson K.E., Parker C., Silver S.M., Keel S.B., Wang J.-D., Stein P.E., Harper P., Vassiliou D., Wang B., Phillips J., Ivanova A., Langendonk J.G., Kauppinen R., Minder E., Horie Y., Penz C., Chen J., Liu S., Ko J.J., Sweetser M.T., Garg P., Vaishnav A., Kim J.B., Simon A.R., Gouya L.* // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. P. 2289–2301.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913147>
5. *Heo Y.* // *Drugs.* 2020. V. 80. P. 329–333.
<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01267-2>
6. *Keung M.Y.T., Wu Y., Vadgama J.V.* // *J. Clin. Med.* 2019. V. 8. P. 435–459.
<https://doi.org/10.3390/jcm8040435>
7. *Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 1229–1234.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1813376116>
8. *Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 709–718.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060153>
9. *Blotny G.* // *Tetrahedron.* 2006. V. 62. P. 9507–9522.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.07.039>
10. *Bucher G., Siegler F., Jens Wolff J.* // *Chem. Commun.* 1999. V. 20. P. 2113–2114.
<https://doi.org/10.1039/A905971G>
11. *Markov O.V., Filatov A.V., Kupryushkin M.S., Chernikov I.V., Patutina O.A., Strunov A.A., Chernolovskaya E.L., Vlassov V.V., Pyshnyi D.V., Zenkova M.A.* // *Molecules.* 2020. V. 25. P. 1–27.
<https://doi.org/10.3390/molecules25163663>
12. *Garrison A.W., Boozer C.E.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1968. V. 90. P. 3486–3494.
<https://doi.org/10.1021/ja01015a035>
13. *Fell V.L., Schild-Poulter C.* // *Mutat. Res.* 2015. V. 763. P. 15–29.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.06.002>
14. *Khodyreva S.N., Lavrik O.I.* // *Mol. Biol. (Mosk).* 2016. V. 50. P. 655–673.
<https://doi.org/10.7868/S0026898416040030>
15. *Kosova A.A., Kutuzov M.M., Evdokimov A.N., Ilina E.S., Belousova E.A., Romanenko S.A., Trifonov V.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I.* // *Aging.* 2019. V. 11. P. 2852–2873.
<https://doi.org/10.18632/aging.101959>
16. *Menon V., Povirk L.F.* // *DNA Repair.* 2016. V. 43. P. 57–68.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.011>
17. *Yang W.* // *Q. Rev. Biophys.* 2011. V. 44. P. 1–93.
<https://doi.org/10.1017/S0033583510000181>
18. *Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J.* // *Nature.* 2001. V. 412. P. 607–614.
<https://doi.org/10.1038/35088000>
19. *Krasner D.S., Daley J.M., Sung P., Niu H.* // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 18806–18816.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660191>
20. *Blier P.R., Griffith A.J., Craft J., Hardin J.A.* // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 7594–7601.
21. *Ilina E.S., Khodyreva S.N., Berezhnoy A.E., Larin S.S., Lavrik O.I.* // *Mutat. Res.* 2010. V. 685. P. 90–96.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.08.008>
22. *Biade S., Sobol R.W., Wilson S.H., Matsumoto Y.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 898–902.
23. *Bradford M.M.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
24. *Ilina E.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I.* // *Biochimie.* 2018. V. 150. P. 88–99.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.027>
25. *Laemmli U.K.* // *Nature* 1970. V. 227. P. 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
26. *Мазин А.В., Кузнецов А.В., Краев А.С., Холодилов Н.Г., Блинов А.Г., Кузьминов А.В., Головин С.Я., Наякин А.М., Соловьев В.В., Ямщиков В.Ф., Кокоза В.А., Иванов С.В., Потапов В.А., Санарбаев М.К., Дианов Г.Л., Протопопов М.О., Калачиков С.М., Богачев С.С., Чикаев Н.А.* // *Методы молекулярной генетики и геномной инженерии* / Под ред. Салганика Р.И. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1990. С. 238–239.
27. *Shevelev G.Y., Kabilov M.R., Lomzov A.A., Dovydenko I.S., Pyshnyi D.V.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 684–698.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019060359>

Triazinylamidophosphate Oligonucleotides: Synthesis and Study of Their Interaction with Cells and DNA-Binding Proteins

M. S. Kupryushkin*, T. D. Zharkov*, **, E. S. Ilina*, **, O. V. Markov*, A. S. Kochetkova*, **, M. M. Akhmetova**, A. A. Lomzov*, D. V. Pyshnyi*, O. I. Lavrik*, **, and S. N. Khodyreva*, #

Phone: +7 (383) 363-51-96; e-mail: svetakh@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, prosp. Acad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

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

In this work, representatives of the class of triazinylamidophosphate oligonucleotide derivatives were obtained for the first time. A scheme for the introduction of a modified unit on a solid-phase support during the oxidation step with highly reactive 2-azido-4,6-dichloro[1,3,5]triazine according to the Staudinger reaction was proposed and implemented, followed by the introduction of various aliphatic residues upon treatment with the corresponding amines. A number of model oligonucleotides containing triazinylamidophosphate modification was synthesized. The chemical stability, cell penetration and cytotoxicity of the obtained derivatives were studied. The effect of the type of aliphatic substituent in the composition of the obtained oligonucleotides on their resistance to enzymatic hydrolysis in extracts of cultured human cells with different contents of DNA repair key regulatory proteins of, Ku antigen, and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), potentially the most effective acceptors of modified oligonucleotides, was studied.

Keywords: automated amidophosphate synthesis, Staudinger's reaction, triazinylamidophosphate oligonucleotides, PARP1, Ku antigen



УДК 577.113.6

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ЗОНДЫ ТИПА “МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАЯК” С ФЛУОРЕСЦЕИНОВЫМ БИФЛУОРОФОРОМ¹

© 2021 г. В. А. Брылёв^{*,#}, И. Л. Лысенко^{**}, Е. А. Кокин^{*}, Ю. В. Мартыненко-Макаев^{**}, Д. Ю. Рязанцев^{*}, В. В. Шманай^{**}, В. А. Коршун^{*,***,****}

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

^{**}Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь, 220072 Минск, ул. Сурганова, 13

^{***}Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Россия, 117312 Москва, ул. Вавилова, 7

^{****}Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021 Москва, ул. Б. Пироговская, 11

Поступила в редакцию 19.10.2020 г.

После доработки 26.10.2020 г.

Принята к публикации 31.10.2020 г.

Получено азидопроизводное флуоресцеинового бифлуорофора и использовано для синтеза олигонуклеотидных флуорогенных зондов типа “молекулярный маяк” для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). На основе оптимизированной последовательности синтезированы восемь вариантов зондов: с одним или двумя остатками тушителя на 3'-конце, с одиночной либо бифлуорофорной флуоресцеиновой меткой, присоединенной с помощью модифицирующих фосфамидитов (короткий линкер) или “клик-реакции” (длинный линкер). Сравнение зондов в ПЦР-РВ показало, что зонды с удвоенным тушителем (одиночный флуоресцеин на коротком линкере) и удвоенным красителем на коротком линкере (одиночный тушитель) несколько превосходят по чувствительности стандартный зонд (одиночный тушитель, одиночный краситель на коротком линкере) на величину $\Delta C_t = 1-2$.

Ключевые слова: флуорогенные ДНК-зонды, 5-карбоксифлуоресцеин, 3,5-диаминобензойная кислота, тушение флуоресценции, ПЦР-РВ

DOI: 10.31857/S0132342321030052

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные ДНК-зонды, входящие в состав наборов реагентов для качественной и количественной детекции ДНК и РНК, продолжают оставаться мощным инструментом исследований и средством диагностики [1–4]. Одной из наиболее важных областей применения таких зондов выступает полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) [5]. Данный метод служит для экспресс-детекции и полуколичественного

(по порядку величины) анализа генетического материала; наиболее актуально применение ПЦР-РВ в молекулярной диагностике наследственных патологий, генетически модифицированных организмов, микробных и вирусных патогенов, например, ВИЧ [6] и SARS-CoV-2 [7]. В ПЦР-РВ применяют различные типы флуорогенных ДНК-зондов, способных к усилению флуоресценции при взаимодействии с накапливающимся ПЦР-продуктом; флуорогенный эффект достигается в результате взаимодействия двух красителей, один из которых может быть нефлуоресцентным (тушителем) [5, 8]. Для флуорогенных зондов изучается взаимосвязь типа красителя и структуры зонда [9], разрабатываются новые красители [10–12], исследуются зонды с двумя остатками флуоресцентного красителя и/или тушителя флуоресценции [13–15]. Наиболее популярным красителем для ДНК-зондов остается флуоресцеин, присоединяемый в виде карбоксильного производного по аминогруппе того или

¹ Дополнительные материалы к статье доступны по doi 10.31857/S0132342321030052 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ВHQ1 – 4'-(2-нитро-4-толилдиазо)-2'-метокси-5'-метилазобензол-4-диалкиламин (тушитель флуоресценции); DMAP – 4-диметиламинопиридин; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; 5-FAM – 5-карбоксивфлуоресцеин амид; HOBT – 1-гидроксисбензотриазол.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (499) 724-67-15; эл. почта: v.brylev@yandex.ru).

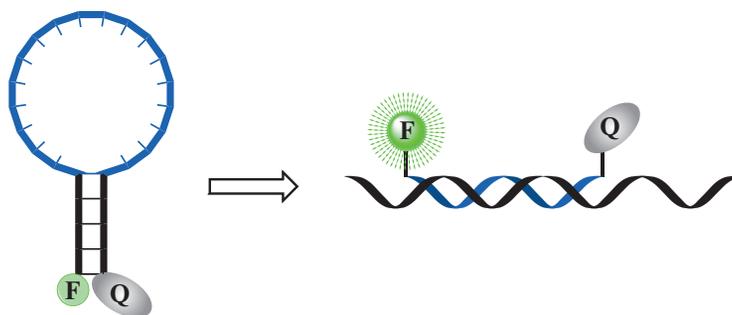


Рис. 1. Принцип действия флуорогенного ДНК-зонда “молекулярный маяк”. F – флуоресцентный краситель, Q – тушитель.

иногo линкера; такой флуоресцеинамид обозначают аббревиатурой FAM. Введение в биоконъюгат нескольких остатков флуоресцеина может привести к значительному самотушению флуоресценции [16]; с другой стороны, прикрепление флуоресцеинов с помощью жесткого линкера предотвращает самотушение [17]. Ранее мы получили FAM-бифлуорофоры на основе 3,5-диаминобензойной кислоты [18, 19]. Целью данной работы стало исследование FAM-бифлуорофора на различных линкерах в сравнении с одиночной флуоресцеиновой меткой в составе флуорогенных олигонуклеотидных зондов типа “молекулярный маяк” для ПЦР-РВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДНК-зонды типа “молекулярный маяк” (рис. 1) представляют собой олигонуклеотид, несущий на 5'- и 3'-концах флуоресцентный краситель (F) и тушитель (Q), причем 5'- и 3'-концевые области зонда (5–7 нуклеотидов) комплементарны. В результате в водном растворе при комнатной температуре зонд существует преимущественно в виде шпильчатой структуры, состоящей из стебля и петли, причем флуорофор и тушитель сближены. Петлевая часть “молекулярного маяка” комплементарна целевой последовательности – мишени (в ПЦР-РВ – продукт ПЦР), и в результате гибридизации с ней шпилька разрушается, красители разобщаются, и происходит разгорание флуоресценции (рис. 1). Мониторинг интенсивности флуоресценции проводят на каждом цикле ПЦР, регистрируя в результате зависимость эмиссии от числа циклов ПЦР.

В данной работе был использован оптимизированный шпильчатый зонд, комплементарный участку амплифицируемого фрагмента гена фактора трансляции 1 α гриба *Fusarium avenaceum* [14]. Нуклеотидная последовательность зонда, структуры его химических модификаций и подходы к синтезу 5-FAM-бифлуорофорных зондов приведены на рис. 2. Зонды **MB3** и **MB4** (табл. 1) синтезировали с использованием фосфорамидитного

реагента (**I**) [18]. В данной работе получен азидный реагент (**V**) на основе 5-FAM-бифлуорофора для мечения алкин-модифицированных олигонуклеотидов с помощью Cu(I)-катализируемой реакции циклоприсоединения (“клик-реакция”). Исходную 3,5-ди(трифторацетиламино)бензойную кислоту (**II**) [20] конденсировали с 3-азидпропиламином [21] с последующим деблокированием аминогрупп аммиаком. Полученный диамин (**III**) ацилировали пентафторфениловым эфиром дипивалоил-защищенного 5-карбоксихлорофлуоресцеина (**IV**) [22]. Удаление пивалоильных защитных групп привело к образованию азидного производного 5-FAM-бифлуорофора (**V**). Последний использовали для модификации алкиновых олигонуклеотидов в растворе с помощью “клик-реакции”; таким образом получены зонды **MB7** и **MB8** (табл. 1). Зонды с одиночным флуоресцеином получали с помощью 5-FAM-фосфамидита [22] (**MB1** и **MB2**) или “клик”-модификацией алкиновых олигонуклеотидов 5-FAM-азидным реагентом [23] (**MB5** и **MB6**) (табл. 1). Терминальный алкин вводили в олигонуклеотиды с помощью фосфамидитного реагента [24]. Удвоенный тушитель BHQ1 (Q₂) вводили в олигонуклеотиды, как описано ранее [13]. Все компоненты зондов представлены на рис. 2. На 3'-конце располагается один или два тушителя BHQ1 (Q), а на 5'-конце могут находиться один или два флуорофора (5-FAM), присоединенные с помощью фосфамидитов или “клик-реакции” с азидными реагентами.

При нагревании шпильчатых зондов в растворе происходит “плавление” стебля, сопровождающееся разгоранием флуоресценции. По максимуму первой производной функции зависимости интенсивности флуоресценции от температуры можно определить температуру плавления зонда (табл. 1). Видно, что структура модификации 5'-концевой области (линкер и число остатков 5-FAM) практически не влияет на температуру плавления зонда. Напротив, введение дополнительного остатка тушителя BHQ1 (Q) в 3'-конце-

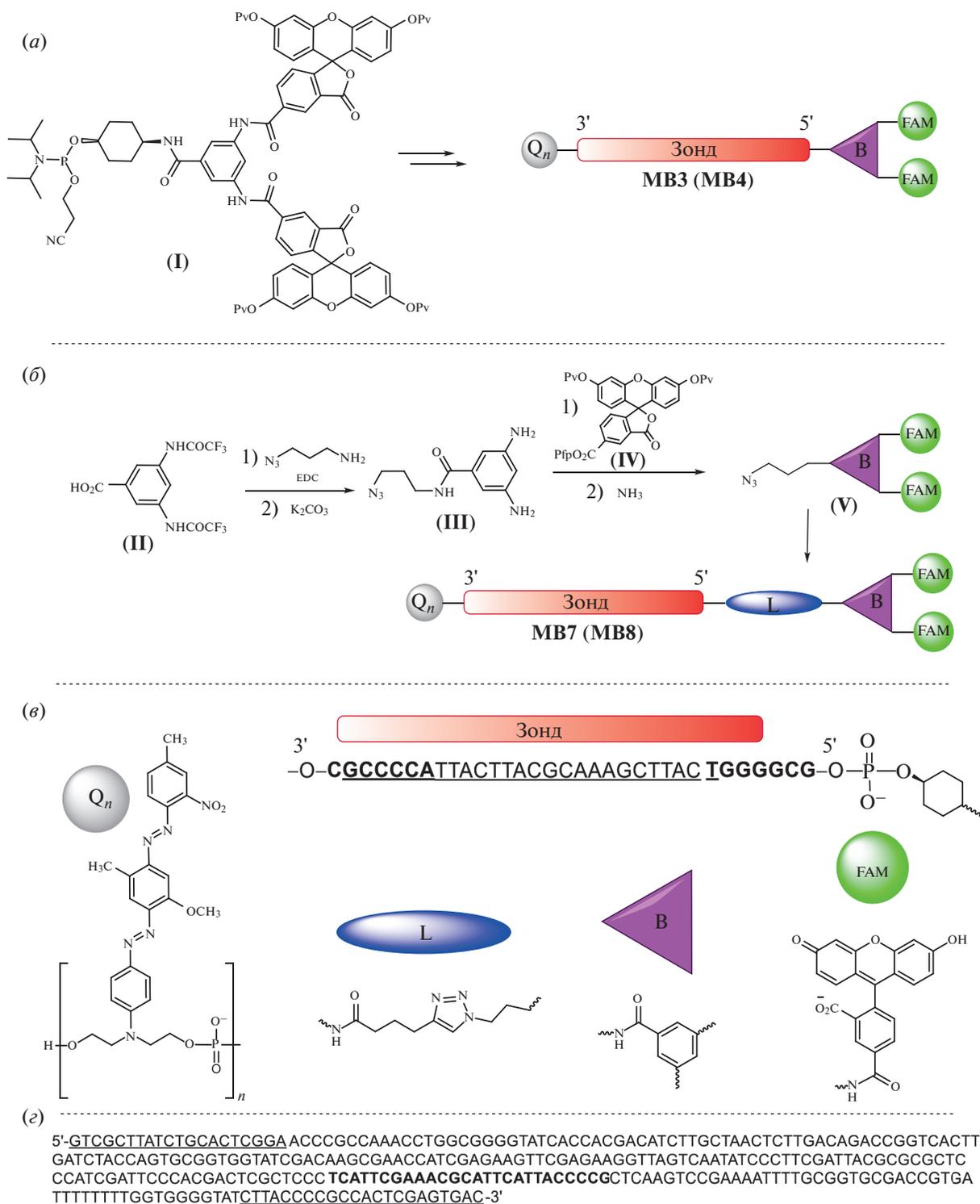
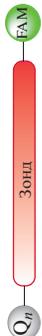
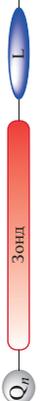
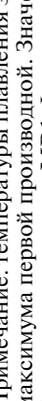


Рис. 2. Синтез олигонуклеотидных зондов с 5-FAM-бифлуорофором. Pv – пивалоил, Pfr – пентафторфенил, FAM – 5-FAM-флуорофор. (a) – Схема синтеза зондов **MB3** и **MB4** амидофосфитным способом; (б) – синтез азидопроизводного (V) и зондов **MB7** и **MB8**; (в) – основные компоненты зонда, Q – тушитель, L – линкер, B – разветвляющий фрагмент на основе 3,5-диаминобензойной кислоты. Подчеркнута последовательность зонда, комплементарная мишени; жирным выделены фрагменты, образующие стебель шпильки; (е) – детектируемая последовательность фрагмента гена, кодирующего фактор элонгации трансляции 1 α длиной 290 п.н. из *Fusarium avenaceum*. Подчеркнуты участки, комплементарные праймерам Fat65R и Fat65F; жирным выделен участок гена, связывающийся с зондами **MB1**–**MB8**.

Таблица 1. Основные характеристики флуорогенных зондов для ПЦР-РВ

| Схема зонда, 3'→5' | Шифр | n | Плавление флуоресцентного зонда | | ПЦР-РВ | | | |
|---|------|---|---------------------------------|------|---|--|-------------------|--|
| | | | T _{пл} , °C | SBR | детекция при 55°C | | детекция при 64°C | |
| | | | | | относительная фоновая флуоресценция, I _{0MBi} /I _{0MB1} | относительное усиление флуоресценции, I _{ГМВи} /I _{0МВи} | | относительная фоновая флуоресценция, I _{0МВи} /I _{0МВи1} |
|  | MB1 | 1 | 65.3 | 10.4 | 1.00 | 2.69 | 1.00 | 1.35 |
|  | MB2 | 2 | 70.9 | 11.3 | 0.74 | 2.97 | 0.89 | 1.63 |
|  | MB3 | 1 | 65.6 | 21.6 | 1.31 | 3.17 | 1.17 | 1.72 |
|  | MB4 | 2 | 71.8 | 7.7 | 1.31 | 1.49 | 0.75 | 1.21 |
|  | MB5 | 1 | 66.9 | 8.5 | 0.94 | 2.32 | 0.92 | 1.30 |
|  | MB6 | 2 | 68.5 | 9.1 | 0.88 | 2.07 | 0.52 | 1.40 |
|  | MB7 | 1 | 66.6 | 3.0 | 2.91 | 1.26 | — | — |
|  | MB8 | 2 | 73.3 | 4.6 | 0.95 | 1.60 | 0.57 | 1.26 |

Примечание: температуры плавления зондов (T_{пл}) определяли с использованием нагревания в термоциклере (20°C→95°C, см. “Эксперим. часть”) как значение в точке максимума первой производной. Значения отношения сигнал/фон (SBR) рассчитаны, как описано в “Эксперим. часть”. I_{0МВи} – начальная (фоновая) интенсивность флуоресценции зондов MB1–MB8; I_{ГМВи} – конечная (плато) интенсивность флуоресценции зондов MB1–MB8; значения рассчитаны на основе экспериментов ПЦР-РВ (условия см. в “Эксперим. часть”). Все значения приведены как средние величины параметров, полученных в трех повторах каждого эксперимента. Прочерк – данные отсутствуют. Q_n – тушитель (один или два – см. значение n), L – линкер, B – разветвляющийся фрагмент на основе 3,5-диаминобензойной кислоты.

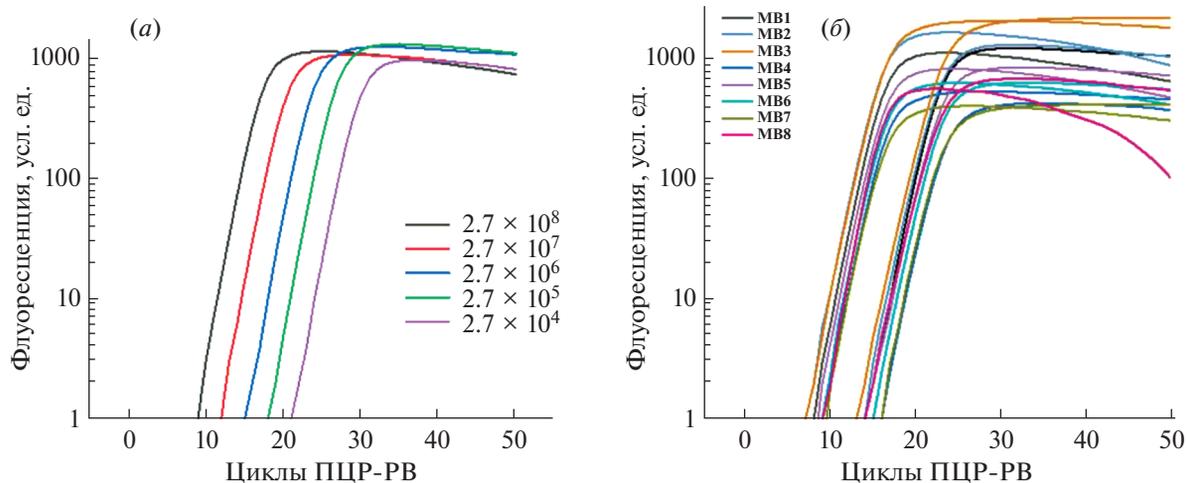


Рис. 3. Профили разгорания флуоресценции в количественной ПЦР-РВ; детекция флуоресценции при 55°C. (а) – Детекция различного количества молекул мишени с помощью зонда **MB1**; (б) – сравнение зондов **MB1–MB8** в ПЦР-РВ с 2.7×10^7 (слева) и 2.7×10^8 молекул мишени (справа).

вую область увеличивает температуру плавления шпильки на 4–5°C, что согласуется с ранее опубликованными данными [14]. Для разгорания флуоресценции зондов при плавлении сложно выделить какие-то закономерности, можно лишь отметить, что зонды с короткими линкерами дают большее увеличение интенсивности эмиссии (табл. 1).

В условиях ПЦР-РВ при накоплении ПЦР-продукта все большая доля зонда образует с ним дуплекс, и при нагревании происходит плавление комплекса зонд–мишень. Поэтому было также изучено изменение флуоресценции при плавлении дуплекса зонда с мишенью (см. дополнительные материалы к публикации). При плавлении как шпильки, так и дуплекса с мишенью наилучшую кооперативность плавления показал зонд **MB2** с двумя тушителями.

Далее зонды сравнивали в условиях ПЦР-РВ, причем детекцию флуоресценции в каждом цикле проводили при двух температурах (55 и 64°C). Были получены значения относительной фоновой флуоресценции по сравнению с контрольным зондом **MB1**, а также относительное усиление флуоресценции в конечной точке ПЦР по сравнению с исходной флуоресценцией зонда (табл. 1). Видно, что дополнительный остаток тушителя во всех случаях приводит к некоторому уменьшению исходной (фоновой) флуоресценции (табл. 1), но снижает конечное разгорание эмиссии в случае зондов **MB4** и **MB6** (рис. 3б).

Для проверки применимости зондов для количественной детекции генетического материала использовали серию 10-кратных разведений мишени. Зонд **MB1** позволяет детектировать мишень в диапазоне 50 зептомоль – 0.5 фемтомоль (рис. 3а). Наилучшую чувствительность проде-

монстрировали зонды **MB2** (удвоенный тушитель и единичный остаток 5-FAM на коротком линкере) и **MB3** (единичный тушитель и FAM-бифлуорофор на коротком линкере) – они разгорались примерно на один цикл раньше, чем стандартный зонд **MB1**. Остальные зонды по чувствительности уступали **MB1** (рис. 3б).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворители и реагенты использовали без дополнительной очистки. 3-Азидопропиламин [21], а также соединения **(II)** и **(IV)** синтезировали, как описано ранее [20, 22]. ^1H - и ^{13}C -спектры ЯМР были получены на ЯМР-спектрометре DRX-500 (500 МГц; Bruker, Германия) с отношением сигналов по пикам остаточных протонов в $\text{DMSO}-d_6$ (2.50 м.д. для ^1H и 39.52 м.д. для ^{13}C). КССВ приведены в герцах (Гц) для соответствующих мультиплетов. Тонкослойную хроматографию выполняли на алюминиевых пластинах TLC Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия).

3-Азидопропил-3,5-бис(3',6'-дигидрокси-3-оксо-3H-спиро(изобензо-фуран-1,9'-ксантен)-5-ил-карбоксамидо)бензоат (V). К раствору кислоты **(II)** (2.00 г, 5.8 ммоль) в ДМФА (15 мл) добавляли 3-азидопропиламин (700 мг, 6.9 ммоль), EDC·HCl (1.67 г, 8.7 ммоль), HOBT (1.18 г, 8.7 ммоль), Et_3N (2.42 мл, 17.4 ммоль) и перемешивали 12 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона. Разбавляли AcOEt (50 мл), промывали водой (2 × 30 мл), 10%-ным раствором лимонной кислоты (3 × 30 мл), 5%-ным раствором NaHCO_3 (3 × 30 мл), насыщенным раствором NaCl (30 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали, остаток перекристаллизовывали из метилхлорида. Получили 3-азидо-

пропиламид 3,5-ди(трифторацетиламино)бензойной кислоты (2.00 г, 81%) в виде белого порошка. R_f 0.6 (метанол–дихлорметан 5 : 95 (v/v)). Спектр для промежуточного соединения (II) ^1H -ЯМР (DMSO- d_6), δ , м.д.: 11.54 (с, 2H), 8.62 (т, J 5.6, 1H), 8.24 (т, J 2.0, 1H), 7.94 (д, J 2.0, 2H), 3.41 (т, J 6.8, 2H), 1.78 (квинтет, J 6.8, 2H).

К раствору бистрифторацетамида (II) (500 мг, 1.2 ммоль) в метаноле (15 мл) добавляли K_2CO_3 (842 мг, 6.1 ммоль), воду (4 мл) и перемешивали 1.5 ч при кипячении в атмосфере аргона. Упаривали досуха, упаривали с ацетонитрилом (4 \times 20 мл), растворяли в AcOEt (30 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали. Получили соединение (III) в виде желтоватого масла, которое далее использовали без дополнительной очистки и характеристики. R_f 0.32 (метанол–дихлорметан 1 : 9 (v/v)).

Соединение (III) растворяли в DMF (20 мл), добавляли DMAP (428 мг, 3.5 ммоль), Et_3N (488 мкл, 3.5 ммоль), пентафторфениловый эфир пивалат-защищенного карбоксифлуоресцеина (IV) (2.08 г, 2.9 ммоль) и перемешивали 7 сут при 50°C в атмосфере аргона. Затем реакционную смесь упаривали досуха, разбавляли AcOEt (50 мл), промывали водой (2 \times 30 мл), 10%-ной лимонной кислотой (2 \times 30 мл), 5%-ным раствором NaHCO_3 (3 \times 30 мл), насыщенным раствором NaCl (30 мл). Органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , упаривали, остаток хроматографировали на силикагеле в системе дихлорметан/ацетон (100 : 0 \rightarrow 75 : 25 (v/v)). Целевые фракции объединяли, упаривали, остаток растворяли в ацетоне (15 мл), добавляли 25%-ный водный раствор аммиака (2 мл), перемешивали 1 ч при комнатной температуре. Избыток аммиака и ацетон упаривали, раствор разбавляли до 10 мл водой и добавляли 10%-ный раствор HCl до pH 2; осадок фильтровали, промывали водой. Перекристаллизовывали из смеси метанол–ацетонитрил (1 : 9 (v/v)). Получили соединение (V) в виде желтоватого порошка (645 мг, 58%). R_f 0.7 (метанол–этилацетат 1 : 3 (v/v)). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6), δ , м.д.: 10.82 (с, 2H), 8.69–8.65 (м, 2H), 8.62–8.57 (м, 2H), 8.40 (дд, J 8.1, 1.7, 2H), 8.02 (д, J 1.9, 2H), 7.47 (д, J 8.1, 2H), 6.75 (д, J 2.3, 2H), 6.64 (д, J 8.7, 4H), 6.62–6.58 (м, 4H), 3.44 (т, J 6.8, 2H), 3.36 (кварт, J 6.4, 2H), 1.82 (квинтет, J 6.8, 2H). Спектр ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6), δC , м.д.: 168.15, 166.62, 164.12, 159.91, 154.93, 151.97, 139.14, 136.42, 135.96, 135.23, 129.22, 126.61, 124.55, 124.11, 115.56, 115.46, 112.90, 109.14, 102.40, 48.62, 36.83, 28.47.

Количественную ПЦР-РВ проводили на детектирующем амплификаторе ДТпрайм (ДНК-технология, Россия) с использованием пары праймеров Fat65R–Fat65F и плазмиды rTZ-Fat, содержащей фрагмент гена, кодирующего фактор элонгации трансляции 1α длиной 290 п.н. из *Fusarium avenaceum* (рис. 2з).

Реакционная смесь (35 мкл) содержала 83.75 мМ Трис- HCl , 20.75 мМ сульфат аммония, 3.125 мМ хлорид магния, 0.003% Tween-20, 0.003% NP-40, 6.25% глицерина, 0.17 мМ каждого dNTP, 0.36 мкМ праймеров, 0.2 мкМ каждого зонда из набора MB1–MB8, 2.5 МЕ Taq-полимеразы и ДНК-матрицу (плазида rTZ-Fat, 2.7×10^4 – 2.7×10^8 копий), pH 8.8. Эксперименты повторяли трижды и анализировали геометрическим методом (C_q) с использованием программного обеспечения Real-time PCR 7.9 (ДНК-технология, Россия). Учитывали фоновую флуоресценцию каждой лунки с образцом. Для количественной детекции разных концентраций матрицы зондом MB1 соблюдалась прямая зависимость количества циклов от содержания матрицы в образце, а величина $R^2 \geq 0.99$. Для количественной ПЦР использовали раствор матрицы с заранее определенной концентрацией (спектрофотометрически при длине волны 260 нм). Из этого раствора отбирали аликвоты и последующим разведением получали образцы с известным количеством молекул мишени. Программа ПЦР-РВ: 80°C – 60 с; 94°C – 90 с (1 цикл); затем 94°C – 30 с, 64°C – 15 с (5 циклов) и 94°C – 10 с, 64°C – 15 с (45 циклов) (флуоресценцию регистрировали при 55 или 64°C с помощью детектора в FAM-канале).

Эксперименты по плавлению зондов MB1–MB8 проводили в трех повторах на том же приборе (канал обнаружения FAM) с каждым зондом из ряда MB1–MB8 по отдельности в буфере для ПЦР без dNTP, праймеров, Taq-полимеразы и плазмидной матрицы. Концентрация каждого зонда составляла 0.2 мкМ. Температуру повышали с 20 до 95°C с шагом 0.5°C в 15 с. Для каждого шага измеряли уровень флуоресценции. Дуплексы MB_{*i*}/мишень предварительно отжигали с двукратным избытком короткой 26-мерной комплементарной последовательности и плавили в тех же условиях. Затем строили график зависимости интенсивности флуоресценции от температуры в диапазоне 20–95°C. Температуры плавления рассчитывали как максимумы первой производной с использованием программы OriginPro 8. Отношение сигнал/фон (SBR) для зондов MB1–MB8 рассчитывали по формуле:

$$\text{SBR} = (I_{\text{fMB}_i} - I_0) / (I_{\text{oMB}_i} - I_0),$$

где I_0 – флуоресцентный шумовой сигнал образца для ПЦР, содержащего все компоненты, но без зонда; MB_i – испытуемый зонд из набора MB1–MB8; I_{oMB_i} – флуоресценция MB_i в отсутствие матрицы; I_{fMB_i} – флуоресцентный сигнал предварительно гибридизированного MB_i с короткой комплементарной 26-мерной последовательностью 5'-CGGGGTAATGAATGCGTTTCGAATGA-3'. Измерения I_0 , I_{oMB_i} , I_{fMB_i} проводили при 20°C в детектирующем амплификаторе ДТпрайм (ДНК-

технология, Россия) с 0.2 мкМ МВ₁ и двукратным избытком комплементарного олигонуклеотида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была исследована эффективность FAM-бифлуорофора на основе 3,5-диаминобензойной кислоты на различных линкерах в сравнении с одиночной флуоресцеиновой меткой в составе флуорогенных олигонуклеотидных зондов типа “молекулярный маяк” для ПЦР-РВ. Показано, для таких шпилечных ПЦР-РВ-зондов предпочтительно присоединение флуоресцеина (как одиночной метки, так и бифлуорофора) через короткий линкер с помощью амидофосфитных реагентов. Наибольшая чувствительность зонда в ПЦР-РВ достигается при введении нестандартных модификаций – удвоенного тушителя либо удвоенного красителя, но не обеих модификаций одновременно.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 17-54-04111, В.А. Брылёв) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант М17РМ-047, Ю.В. Мартыненко-Макаев).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vilaivan T. // *Beil. J. Org. Chem.* 2018. V. 14. P. 253–281. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.17>
2. Chen J., Shi C., Kang X., Shen X., Lao X., Zheng H. // *Anal. Meth.* 2020. V. 12. P. 884–893. <https://doi.org/10.1039/c9ay02332a>
3. Michel B.Y., Dziuba D., Benhida R., Demchenko A.P., Burger A. // *Front. Chem.* 2020. V. 8. P. 112. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00112>
4. Quan K., Yi C., Yang X., He X., Huang J., Wang K. // *Tr. Anal. Chem.* 2020. V. 124. P. 115784. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115784>
5. Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M.J., Solera J. // *Clin. Chim. Acta.* 2015. V. 439. P. 231–250. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
6. Farzan V.M., Kvach M.V., Aparin I.O., Kireev D.E., Prikazchikova T.A., Ustinov A.V., Shmanai V.V., Shipulin G.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Talanta.* 2019. V. 194. P. 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.043>
7. Vogels C.B.F., Brito A.F., Wyllie A.L., Fauver J.R., Ott I.M., Kalinich C.C., Petrone M.E., Casanovas-Massana A., Muenker M.C., Moore A.J., Klein J., Lu P., Lu-Culligan A., Jiang X., Kim D.J., Kudo E., Mao T., Moriyama M., Oh J.E., Park A., Silva J., Song E., Takahashi T., Taura M., Tokuyama M., Venkataraman A., Weizman O.-E., Wong P., Yang Y., Cheemarla N.R., White E.B., Lapidus S., Earnest R., Geng B., Vijayakumar P., Odio C., Fournier J., Bermejo S., Farhadian S., Dela Cruz C.S., Iwasaki A., Ko A.I., Landry M.L., Foxman E.F., Grubaugh N.D. // *Nature Microbiol.* 2020. V. 5. P. 1299–1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
8. Ranasinghe R.T., Brown T. // *Chem. Commun.* 2005. P. 5487–5502. <https://doi.org/10.1039/b509522k>
9. Farzan V.M., Aparin I.O., Veselova O.A., Podkolzin A.T., Shipulin G.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Anal. Meth.* 2016. V. 8. P. 5826–5831. <https://doi.org/10.1039/c6ay01304j>
10. Aparin I.O., Farzan V.M., Veselova O.A., Chistov A.A., Podkolzin A.T., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Formanovsky A.A., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Analyst.* 2016. V. 141. P. 1331–1338. <https://doi.org/10.1039/c5an01767j>
11. Натыров А.Н., Власова Н.А., Матвиенко И.В., Волков Е.М., Байрамов В.М., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И. // *Биоорг. химия.* 2018. Т. 44. С. 570–580. [Natyrov A.N., Matvienko I.V., Bayramov V.M., Alexeev J.I., Vlasova N.A., Volkov E.M., Kurochkin V. E. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 562–571.] <https://doi.org/10.1134/S1068162018040131>
12. Матвиенко И.В., Байрамов В.М., Парыгина Н.А., Курочкин В.Е., Алексеев Я.И. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 310–321. [Matvienko I.V., Bayramov V.M., Parygina N.A., Kurochkin V.E., Alexeev Y.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 349–359.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020030127>
13. Ryazantsev D.Y., Tsybulsky D.A., Prokhorenko I.A., Kvach M.V., Martynenko Y.V., Philipchenko P.M., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zavriev S.K. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 404. P. 59–68. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6114-4>
14. Ryazantsev D.Y., Kvach M.V., Tsybulsky D.A., Prokhorenko I.A., Stepanova I.A., Martynenko Y.V., Gontarev S.V., Shmanai V.V., Zavriev S.K., Korshun V.A. // *Analyst.* 2014. V. 139. P. 2867–2872. <https://doi.org/10.1039/c4an00081a>
15. Tsybulsky D.A., Kvach M.V., Ryazantsev D.Y., Aparin I.O., Stakheev A.A., Prokhorenko I.A., Martynenko Y.V., Gontarev S.V., Formanovsky A.A., Zatsepin T.S., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zavriev S.K. // *Mol. Cell. Probes.* 2016. V. 30. P. 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.10.003>
16. Haralambidis J., Angus K., Pownall S., Duncan L., Chai M., Tregear G.W. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 501–505. <https://doi.org/10.1093/nar/18.3.501>
17. Martin V.V., Alferiev I.S., Weis A.L. // *Tetrahedron Lett.* 1999. V. 40. P. 223–226. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)02280-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)02280-1)
18. Мартыненко-Макаев Ю.В., Брылёв В.А., Удодова В.В. // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* 2017. Т. 3. С. 72–78.

19. Povedailo V.A., Lysenko I.L., Tikhomirov S.A., Yakovlev D.L., Tsybulsky D.A., Kruhlik A.S., Fan F., Martynenko-Makaev Y.V., Sharko O.L., Duong P.V., Minh P.H., Shmanai V.V. // *J. Fluoresc.* 2020. V. 30. P. 629–635. <https://doi.org/10.1007/s10895-020-02535-w>
20. Washio I., Shibasaki Y., Ueda M. // *Org. Lett.* 2007. V. 9. P. 1363–1366. <https://doi.org/10.1021/ol0702425>
21. Knör S., Modlinger A., Poethko T., Schottelius M., Wester H.-J., Kessler H. // *Chem. Eur. J.* 2007. V. 13. P. 6082–6090. <https://doi.org/10.1002/chem.200700231>
22. Kvach M.V., Tsybulsky D.A., Ustinov A.V., Stepanova I.A., Bondarev S.L., Gontarev S.V., Korshun V.A., Shmanai V.V. // *Bioconjugate Chem.* 2007. V. 18. P. 1691–1696. <https://doi.org/10.1021/bc7001874>
23. Wang Q., Chan T.R., Hilgraf R., Fokin V.V., Sharpless K.B., Finn M.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 3192–3193. <https://doi.org/10.1021/ja021381e>
24. Farzan V.M., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Kvach M.V., Aparin I.O., Brylev V.A., Prikazchikova T.A., Maklakova S.Y., Majouga A.G., Ustinov A.V., Shipulin G.A., Shmanai V.V., Korshun V.A., Zatsepin T.S. // *Bioconjugate Chem.* 2017. V. 28. P. 2599–2607. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00462>

Molecular Beacon DNA Probes with Fluorescein Bifluorophore

V. A. Brylev*[#], I. L. Lysenko**, E. A. Kokin*, Y. V. Martynenko-Makaev**, D. Y. Ryazantsev*, V. V. Shmanai**, and V. A. Korshun*^{***}, ****

[#]Phone: +7(499)724-67-15; e-mail: v.brylev@yandex.ru

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

**Institute of Physical Organic Chemistry of NAS Belarus, ul. Surganova 13, Minsk, 220072 Belarus

***Department of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, ul. Vavilova 7, Moscow, 117312 Russia

****Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bolshaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119021 Russia

There was obtained azido-derivative of a fluorescein bifluorophore. It was used for the synthesis of “molecular beacon”-type oligonucleotide fluorogenic probes for RT-PCR. There were obtained 8 probe variants based on the optimized sequence: with one or two quencher residues at the 3'-end, with a single or bifluorophore fluorescein label attached to 5'-end using modifying phosphoramidites (short linker) or “click reaction” (long linker). Comparison of probes in RT-PCR showed that probes with a doubled quencher (single fluorescein on a short linker) and doubled dye on a short linker (single dye) are somewhat superior in sensitivity to a standard probe (single quencher, single dye on a short linker) by the value of $\Delta C_t = 1-2$.

Keywords: *fluorogenic DNA probes, 5-carboxyfluorescein, 3,5-diaminobenzoic acid, fluorescence quenching, real-time qPCR*



Авторы посвящают статью памяти своего учителя, профессора Владимира Николаевича Кокрякова (1944–2020) – удивительного человека и выдающегося ученого, основателя отечественной школы по изучению антимикробных пептидов животного происхождения.

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДА C3f – ПРОИЗВОДНОГО БЕЛКА C3 ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. В. А. Позолотин*, **, Е. С. Умнякова*, П. М. Копейкин*, А. С. Комлев*, Я. А. Дубровский**, ***, И. А. Кренев*, **, О. В. Шамова*, М. Н. Берлов*, #

*ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”,
Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12

**Санкт-Петербургский государственный университет,
Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7–9

***ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова” Минздрава России,
Россия, 197341 Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Поступила в редакцию 12.07.2020 г.

После доработки 28.07.2020 г.

Принята к публикации 29.07.2020 г.

Система комплемента играет важную роль в защите организма от инфекции. Ключевой этап активации комплемента – протеолитическое расщепление белка C3 с образованием растворимого пептида анафилатоксина C3a и белка C3b, способного к формированию ковалентной связи с поверхностными молекулами микробных клеток. Активность C3b регулируется его дальнейшим ограниченным протеолизом с высвобождением пептида C3f, который, как считается, не обладает собственной функциональной активностью. На основании физико-химических свойств C3f мы предположили, что этот пептид может проявлять антимикробную активность. Активация комплемента, как правило, осуществляется на поверхности патогенов, в частности бактериальных клеток, и локальная генерация антимикробных пептидов может вносить существенный вклад в их нейтрализацию. Из литературы уже известна антимикробная активность производных комплемента – пептидов C3a и C4a. Для исследования антимикробных свойств C3f данный пептид был получен методом твердофазного синтеза. Показано, что пептид C3f человека обладает умеренной антимикробной активностью *in vitro* в отношении некоторых грамположительных бактерий (*Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*) с минимальными ингибирующими концентрациями 70 мкМ (для *L. monocytogenes*) и выше. Выявленная антимикробная активность пептида C3f существенно уступает описанной в литературе активности C3a. Ряд микроорганизмов (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) оказался устойчив к действию пептида C3f.

Ключевые слова: система комплемента, C3f, антимикробные пептиды, твердофазный синтез

DOI: 10.31857/S0132342321030155

ВВЕДЕНИЕ

Система комплемента представляет собой важный компонент врожденного иммунитета позвоночных животных. Следствиями активации комплемента на поверхности микроорганизмов

становятся продукция анафилатоксинов (C3a, C5a), привлекающих и активирующих различные виды лейкоцитов, опсонизация микробных клеток, способствующая их последующему фагоцитозу (C3b, C4b и продукты их деградации), а также непосредственный лизис клеток грамотрицательных бактерий в результате формирования на их поверхности мембраноатакующего комплекса (МАК) (C5b, C6, C7, C8, C9) [1–4]. Имеются данные, что гуморальная инактивация микроорганизмов в результате функционирования системы комплемента может осуществляться не только

Сокращения: МАК – мембраноатакующий комплекс; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; Fmoc – флуоренилметилоксикарбонильная защитная группа; MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация.

Автор для связи: (тел.: +7 (812) 234-07-64; эл. почта: berlov.mn@iemspb.ru).

благодаря действию МАК, но и за счет продукции антимикробных пептидов – производных белков комплемента. Было показано, что пептид С3а, образующийся из белка С3 при активации комплемента, проявляет свойства не только анафилатоксина, но и антимикробного пептида, активного против широкого спектра микроорганизмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также дрожжевой гриб *Candida albicans* [5, 6]. Более слабая антимикробная активность была показана и для пептида С4а [7]. Мы предположили, что пептид С3f, являющийся, как и С3а, производным белка С3, тоже может обладать антимикробными свойствами.

Белок С3 представляет собой ключевой компонент системы комплемента, на котором сходятся все три пути активации (классический, лектиновый и альтернативный) [2, 3, 8]. В результате расщепления белка С3-конвертазами, формирующимися в ходе активации комплемента, образуются растворимый пептид С3а и белок С3b, который способен к формированию ковалентной связи с молекулами, содержащими гидроксильную группу и, в меньшей степени, аминокгруппу, за счет своей тиоэфирной группировки. В случае связывания С3b с поверхностными молекулами микробных клеток он функционирует как регуляторная субъединица С3- и С5-конвертаз, а также как опсонин. Функционирование С3b регулируется его дальнейшим протеолитическим расщеплением фактором I с образованием связанного с поверхностью iС3b (инактивированный С3b) и высвобождаемого в циркуляцию пептида С3f с молекулярной массой ~2 кДа. Хотя iС3b более не способен поддерживать работу С3- и С5-конвертаз, он, вопреки своему названию, сохраняет и даже усиливает присущую С3b опсоническую активность.

Принято считать, что второй продукт расщепления С3b – пептид С3f – не обладает собственной функциональной активностью [9]. Тем не менее опубликованы единичные работы, посвященные возможной биологической роли С3f. Было показано, что С3f человека частично напоминает пептид С3а по своим свойствам: он проявляет спазмогенную активность, стимулируя сокращение гладких мышц подвздошной кишки морской свинки, а также увеличивает проницаемость сосудов в коже. Однако пептид С3f оказался значительно менее активным, чем С3а. Так, сравнивая с С3а спазмогенная активность наблюдалась только при достижении молярного избытка С3f на три порядка [10]. Было показано, что продукт деградации С3f – гексапептид HWESAS – может функционировать в качестве кофактора инсулиноподобных факторов роста I и II [11]. Также С3f стимулирует продукцию трансформирующего фактора роста $\beta 1$ эндотелиальными клетками микрососудов кожи и пролиферацию этих клеток [12].

Учитывая наблюдения Ganu et al. о перекрывании функциональной активности С3а и С3f [10], мы предположили, что оно может распространяться и на антимикробную активность. Активация комплемента, как правило, осуществляется на поверхности патогенов, в частности бактериальных клеток, и локальная генерация антимикробных пептидов может вносить существенный вклад в их нейтрализацию.

Цель данной работы – исследование антимикробных свойств синтетического пептида С3f человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования антимикробной активности С3f данный пептид (17 а.о.) был получен методом твердофазного синтеза на 2-хлортритилхлоридной смоле по Fmoc/tBu-стратегии путем наращивания пептидной цепи карбодиимидным методом, начиная с С-конца. Очистку полученного после синтеза пептида от побочных продуктов производили методом офВЭЖХ. В результате был получен электрофоретически гомогенный пептид, соответствующий С3f по молекулярной массе по данным масс-спектрометрии (рис. 1).

Методами *in silico* были оценены некоторые физико-химические свойства пептида (табл. 1). По расчетным данным, изоэлектрическая точка С3f составляет 10.83. Заряд пептида при нейтральном рН равен +2.4, в связи с наличием в молекуле двух остатков гистидина он может заметно увеличиваться при незначительном закислении. Доля остатков с неполярными боковыми группами в аминокислотной последовательности С3f составляет 35%. Известно, что основная мишень действия антимикробных пептидов – цитоплазматическая мембрана бактериальных клеток. Большинство изученных антимикробных пептидов характеризуется высоким содержанием и положительно заряженных, и гидрофобных аминокислот, что позволяет им взаимодействовать как с анионными головками, так и с жирнокислотными хвостами фосфолипидов бактериальной мембраны [13–17]. Таким образом, по своему аминокислотному составу пептид С3f соответствует типичному антимикробному пептиду.

Многие антимикробные пептиды, не содержащие дисульфидных связей или значительного количества остатков пролина, формируют структуру амфипатической α -спирали, в которой пространственно разобщены остатки катионных и гидрофобных аминокислот. Часто α -спиральная конформация антимикробных пептидов стабилизируется при их взаимодействии с цитоплазматической мембраной бактерий [15, 16]. С помощью программы PEP-FOLD-3 были построены десять наиболее вероятных моделей трехмерной

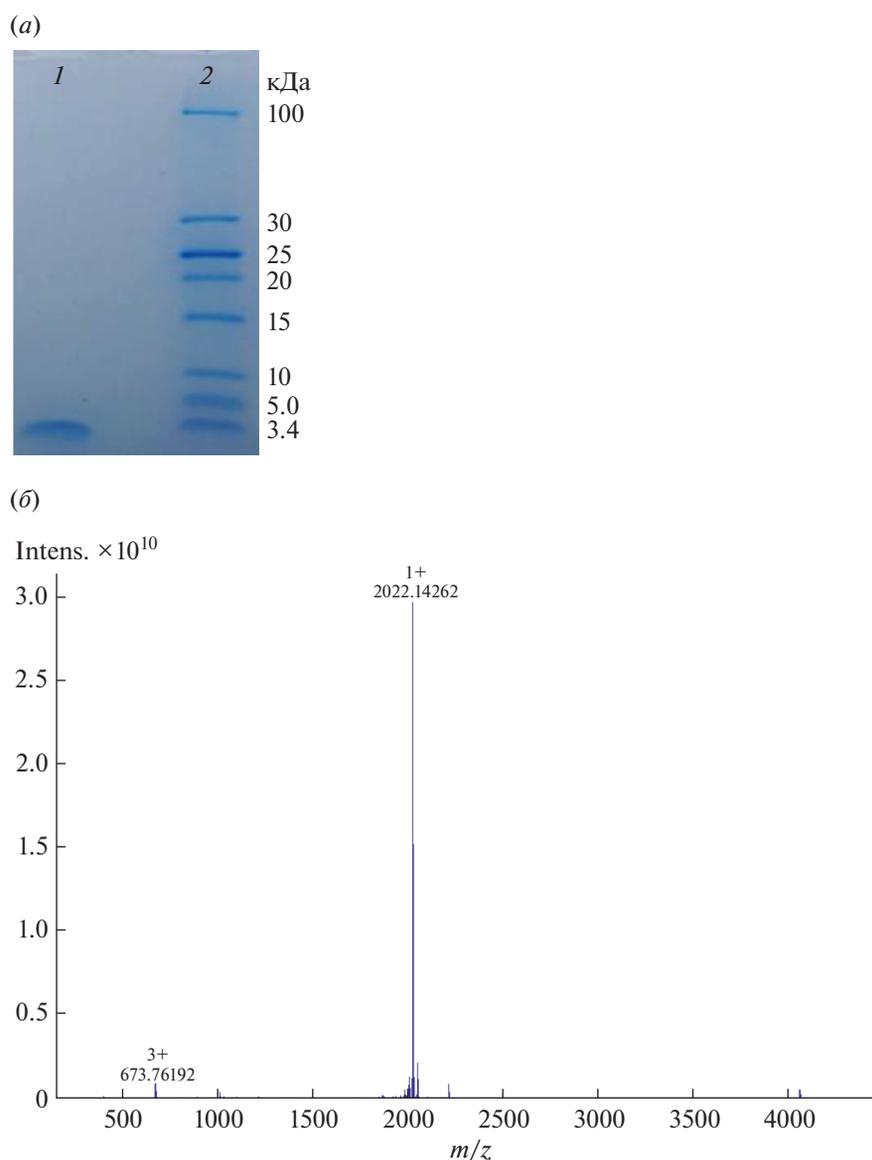


Рис. 1. Анализ качества препарата синтетического пептида С3f. (а) – Анализ пептида С3f методом электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (1 – С3f, 2 – стандарты молекулярной массы); (б) – MALDI-масс-спектр пептида С3f. Указан наиболее интенсивный сигнал с m/z 2022.14262, соответствующий второму сигналу в изотопном распределении. Расчетная моноизотопная масса однозарядного иона пептида $[M + H]^+$ – 2021.10; найденная экспериментально $[M + H]^+$ – 2021.14.

структуры С3f, все они содержат α -спиральный участок (в одной из моделей – два участка). Модель с максимальной протяженностью спирали представлена на рис. 2а. Визуализация ориентации аминокислотных остатков пептида С3f при формировании α -спиральной конформации по всей длине полипептидной цепи (проекция Эдмундсона [18]) (рис. 2б) показывает, что в этом случае все три остатка с положительно заряженными радикалами (два аргинина и лизин) локализируются на одной стороне спирали. Это свидетельствует в пользу потенциальной антимикробной активности пептида. В то же время остатки гидрофобных аминокислот не формируют единого кластера на поверхности молекулы, а остаток

Таблица 1. Аминокислотная последовательность и расчетные физико-химические свойства пептида С3f

| | | |
|-----------------------------------|-------------------|------|
| Аминокислотная последовательность | SSKITHRIHWESASLLR | |
| Число аминокислотных остатков | 17 | |
| Молекулярная масса, Да | 2021 | |
| pI | 10.83 | |
| Заряд при различных значениях pH | 7.0 | +2.4 |
| | 6.5 | +3.0 |
| | 6.0 | +3.5 |
| Доля неполярных остатков, % | 35 | |

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) пептида С3f в отношении различных микроорганизмов

| Вид | Штамм | Принадлежность | МИК, мкМ |
|-------------------------------|--------|----------------|----------|
| <i>Escherichia coli</i> | ML-35p | Грам (-) | >1024 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | EGD | Грам (+) | 70 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | A270 | Грам (+) | 161 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | L3 | Грам (+) | 192 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 10702 | Грам (+) | >1024 |
| <i>Candida albicans</i> | 820 | Дрожжевой гриб | >1024 |

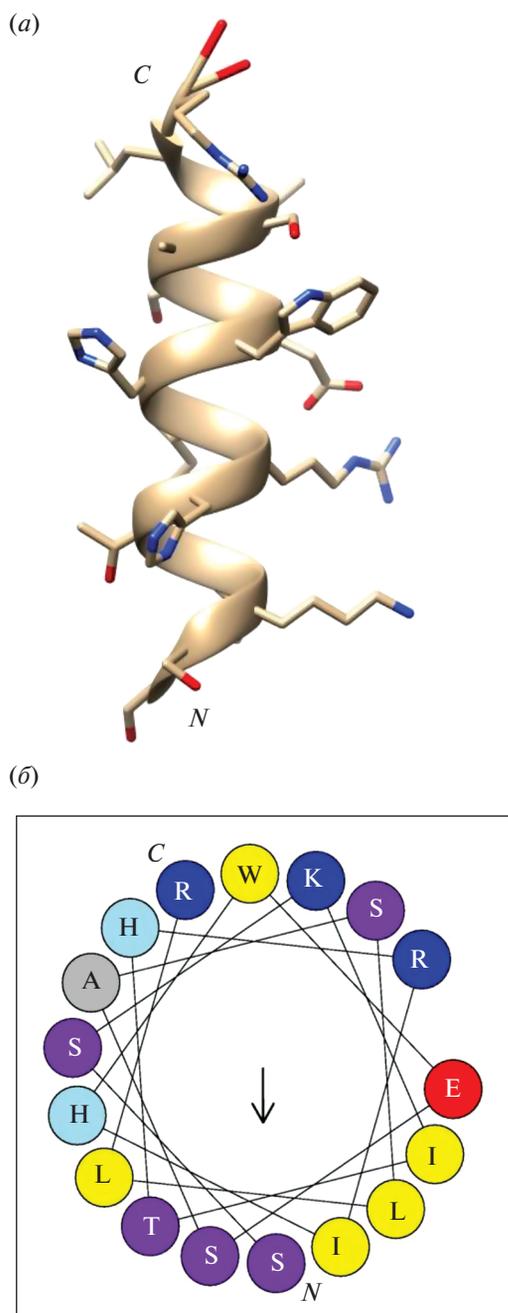


Рис. 2. Трехмерная структура пептида С3f. (а) – Модель трехмерной структуры пептида С3f; (б) – предсказанное расположение аминокислотных остатков пептида С3f при формировании α -спиральной конформации.

триптофана располагается в непосредственном соседстве с катионными остатками.

Хотя линейные антимикробные пептиды обычно превышают по размеру С3f (17 а.о.), известны и обратные примеры. Так, триптофан-богатые антимикробные пептиды – индолицидин коровы и трирптитин свиньи – содержат по 13 а.о. [19, 20]. Многие изоформы таких пептидов амфибий, как темпорины и ауреины, содержат по 13–17 и даже 10 а.о. Примечательно, что для темпоринов и ауреинов (как, вероятно, и для С3f) характерна α -спиральная конформация [21–23].

Таким образом, совокупность физико-химических свойств пептида С3f позволила ожидать проявление им антимикробных свойств.

Экспериментальную оценку антимикробной активности синтетического пептида С3f проводили методом радиальной диффузии. Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) использовали серии двукратных разведений пептида, начиная с максимальной концентрации 1024 мкМ. В табл. 2 приведены полученные значения МИК пептида С3f в отношении различных микроорганизмов. Согласно нашим результатам, пептид С3f человека обладает антимикробной активностью в отношении некоторых грамположительных бактерий (*Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*). На рис. 3 в качестве примера приведена фотография участка чашки Петри с *L. monocytogenes*, в отношении которой пептид С3f проявляет наибольшую антимикробную активность (МИК 70 мкМ). Грамотрицательная бактерия *Escherichia coli* и грибок *Candida albicans* оказались нечувствительны к антимикробному действию С3f, так же как и еще один грамположительный микроорганизм – *Bacillus cereus*. Следует отметить, что выявленная нами антимикробная активность пептида С3f существенно уступает описанной в литературе активности другого производного компонента – пептида С3а. С использованием того же метода радиальной диффузии была показана выраженная антимикробная активность С3а против ряда микроорганизмов, включая резистентные к действию пептида С3f виды (*E. coli*, *C. albicans*), при этом значения МИК в отношении бактерий не превышали 1 мкМ [5, 6]. Подобные различия по степе-

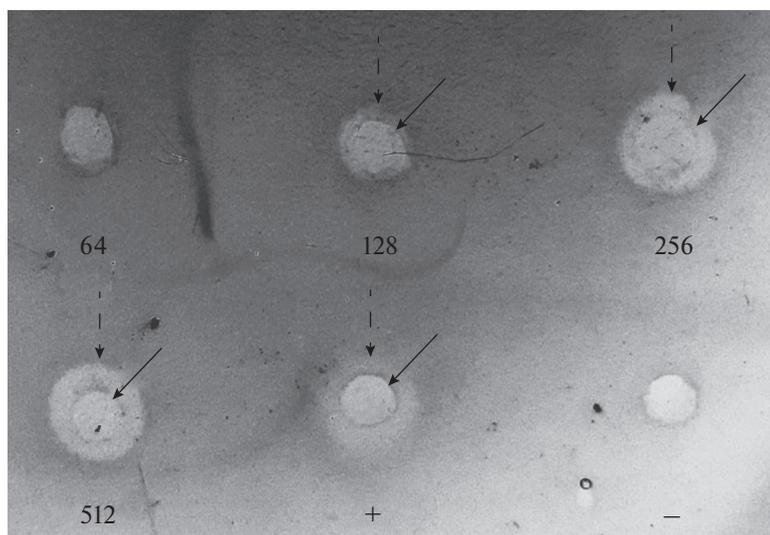


Рис. 3. Антимикробная активность пептида С3f в отношении *L. monocytogenes*, определенная методом радиальной диффузии. Цифры – концентрации (мкМ) пептида С3f в пробах; “+” – положительный контроль (дефенсина человека НРР-1–3); “–” – отрицательный контроль. Сплошными стрелками обозначены границы лунок, пунктирными – границы зон ингибирования роста.

ни биологической активности между пептидами С3а и С3f были описаны ранее и для их спазмогенной активности [10].

Полученные результаты не дают основания оценивать выявленную *in vitro* антимикробную активность пептида С3f человека как физиологически значимую. Таким образом, вопрос о собственной функциональной активности пептида остается открытым. Аргументом в пользу ее наличия могла бы быть консервация в эволюции аминокислотной последовательности или физико-химических свойств пептида. Для оценки консервативности структуры С3f мы провели сравнение аминокислотных последовательностей пептида у разных представителей позвоночных животных (табл. 3).

Видно, что структура пептида С3f проявляет высокую эволюционную вариабельность в аминокислотной последовательности, несмотря на идентичный размер пептида – 17 а.о. у всех видов. Единственным инвариантным остатком выступает С-концевой остаток аргинина, необходимый для взаимодействия с фактором I и катализируемого им ограниченного протеолиза. Еще один высококонсервативный остаток – изолейцин в позиции 8 (в редких случаях заменен лейцином), которому в большинстве последовательностей предшествует аргинин. У плацентарных млекопитающих в первичной структуре С3f можно выделить высококонсервативный С-концевой участок молекулы, представленный в большинстве случаев мотивом А(Г)SLLR. Если предположить, что у плацентарных пептид С3f выполняет какую-либо консервативную функцию, следует ожидать участие этого мотива в ее реализации. Между тем,

пептид HWESAS (соответствующий позициям 9–14 в последовательности С3f человека) заметно менее консервативен. Таким образом, описанная для этого гексапептида биологическая активность [11] не отражает, по всей видимости, эволюционно консервативную функцию.

Пептиды С3f различных видов характеризуются в большинстве случаев положительным зарядом, что рассматривается как главная структурная детерминанта антимикробной активности пептидов [14–16]. Тем не менее как минимум у представителей трех видов (собака, опоссум, кобра) С3f имеет изоэлектрическую точку менее 7, т.е. С3f – анионная молекула, что говорит о низкой вероятности его функционирования в качестве антимикробного пептида.

Не исключено, что у разных видов животных биологические свойства С3f могут различаться. У таких животных, как корова и свинья, пептиды С3f имеют более высокую изоэлектрическую точку (11.70 в обоих случаях), нежели С3f человека, и, вероятно, могут проявлять более высокую антимикробную активность. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы проверить эти предположения экспериментально. В то же время выявленная по результатам наших экспериментов антимикробная активность пептида С3f человека недостаточно высока, чтобы иметь физиологическую значимость. Можно предположить, что реализация потенциальных антимикробных свойств пептида С3f возможна в условиях локального закисления среды либо в кооперации с другими антимикробными факторами сыворотки крови.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности пептида С3f у различных представителей позвоночных животных

| Вид | UniProt ID | Аминокислотная последовательность | Расчетная pI |
|---|-----------------------|-----------------------------------|--------------|
| Человек (<i>Homo sapiens</i>) | >P01024 1304-1320 | SSKITHRIHWESASLLR | 10.83 |
| Кролик (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) | >P12247 367-383 | SSPVKHRIVWDSASLLR | 10.83 |
| Мышь (<i>Mus musculus</i>) | >P01027 1304-1320 | SSATTFRLLWENGNLLR | 9.31 |
| Крыса (<i>Rattus norvegicus</i>) | >P01026 1304-1320 | SSPTVFRLLWESGSLLR | 9.31 |
| Морская свинка (<i>Cavia porcellus</i>) | >P12387 1309-1325 | SSPSKFRLVWEAGSLLR | 10.83 |
| Собака (<i>Canis lupus familiaris</i>) | >F1PIX8 1305-1321 | STEIKHHIVWDSPSLQR | 6.66 |
| Тихоокеанский морж (<i>Odobenus rosmarus divergens</i>) | >A0A2U3VK97 1303-1319 | NSIIKHLILWESASLLR | 8.75 |
| Свинья (<i>Sus scrofa</i>) | >P01025 1302-1318 | SAPVRHRILWESASLLR | 11.70 |
| Корова (<i>Bos taurus</i>) | >Q2UVX4 1303-1319 | NSAVRHRILWESASLLR | 11.70 |
| Африканский слон (<i>Loxodonta africana</i>) | >G3T5N8 1284-1300 | SSLIKHRIVWESASLLR | 10.83 |
| Домовый опоссум (<i>Monodelphis domestica</i>) | >F6ZDV8 1308-1324 | SSAINYRINYESDSLRLR | 5.79 |
| Утконос (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>) | >F6WUL9 1296-1312 | QSIVKFRIDTKNSQLLR | 11.00 |
| Китайский аллигатор (<i>Alligator sinensis</i>) | >A0A1U7S0C0 1295-1311 | ATPVKIRIENSNAFLSR | 10.84 |
| Индийская кобра (<i>Naja naja</i>) | >Q01833 1291-1307 | EVPERYSINDRNAVQAR | 6.28 |
| Курица (<i>Gallus gallus</i>) | >Q90633 1293-1309 | ANAI TYRIENNNALVAR | 8.79 |
| Когтистая шпорцевая лягушка (<i>Xenopus tropicalis</i>) | >F7CXW4 1298-1314 | QQPLTYRINHENALLAR | 8.75 |
| Атлантический лосось (<i>Salmo salar</i>) | >P98093 1279-1295 | ASVTKWSINNKNQFHTR | 11.17 |

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение пептида С3f. Твердофазный синтез.

Для химического синтеза пептида С3f использовали аминокислоты, 2-хлортритилхлоридную смолу, диизопропилэтиламин, этил-(гидроксиимино)цианоацетат ОхутаPure и 1,3-диизопропилкарбодиимид (Iris Biotech GmbH, Германия). Были использованы аминокислоты с защищенными флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой α -аминогруппами и защищенными функциональными группами боковых радикалов. Боковые цепи аминокислот были защищены 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильной (Arg), *трет*-бутильной (Glu, Ser), *трет*-бутоксикарбонильной (Lys, Trp) и трифенилметильной (His) группами. Синтез проводили твердофазным методом на 2-хлортритилхлоридной смоле по Fmoc/tBu-стратегии путем наращивания пептидной цепи карбодиимидным методом, начиная с C-конца. C-Концевую аминокислоту присоединяли к смоле в реакции с 0.24 мМ диизопропилэтиламином в хлористом метиле, содержащем 5% диметилсульфоксида, в течение 2 ч при комнатной температуре. Деблокирование α -аминогрупп аминокислотных остатков проводили 25%-ным раствором диэтиламина в *N,N*-диметилформамиде. Конденсацию последующих аминокислот производили в *N,N*-диметилформамиде с добавлением 0.4 мМ ОхутаPure и 0.4 мМ 1,3-ди-

изопропилкарбодиимида в течение 2 ч при комнатной температуре. После завершения синтеза для отщепления пептида от полимерного носителя и удаления защитных групп боковых радикалов смолу инкубировали в растворе, содержащем 95% TFA, 2.5% триизопропилсилана и 2.5% H₂O, в течение 60 мин.

Очистка синтетического пептида. Очистку полученного после синтеза пептида от побочных продуктов производили методом оФВЭЖХ на колонке C18 25 × 1 см (Waters, США) с размером гранул сорбента 10 мкм. Элюцию проводили линейным градиентом ацетонитрила (5–70%) в присутствии 0.1% TFA в течение 60 мин со скоростью 1.5 мл/мин.

Электрофорез. Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS проводили по методу Schagger et al. [24].

Масс-спектрометрия. Для проведения масс-спектрометрического анализа на поверхность мишени наносили 0.5 мкл раствора матрицы (5 мг/мл α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50%-ном ацетонитриле с 0.1% TFA) и 0.5 мкл пробы, высушивали при комнатной температуре. Анализ проводили с помощью масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием Solarix XR (Bruker Daltonics, США), оснащенного ячейкой с динамической гармонизацией, сверхпроводящим магнитом на-

пряженностью 7 Т и MALDI-источником. Ионы детектировали в диапазоне m/z от 70 до 5000.

Определение концентрации С3f. Концентрацию С3f в растворах оценивали по поглощению при 280 нм с учетом молярного коэффициента поглощения, равного $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, определенного с помощью программы ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) [25] в соответствии с содержанием остатков ароматических аминокислот по формуле Pace et al. [26].

Оценка физико-химических свойств пептида С3f. Расчетные значения молекулярной массы и изоэлектрической точки пептида определяли в программе ProtParam. Заряд пептида при различных значениях pH оценивали в программе Protein Calculator (<http://protcalc.sourceforge.net/>). Расположение аминокислотных остатков пептида С3f при формировании α -спиральной структуры, а также долю неполярных остатков оценивали с помощью программы HeliQuest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>) [27]. Трехмерная структура С3f была предсказана программой PEP-FOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) [28], визуализацию осуществляли с помощью программы Chimera 1.14 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) [29].

Аминокислотные последовательности пептидов С3f разных видов животных находили, используя первичные структуры белка С3, полученные из базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Для установления границ последовательности, соответствующей С3f, осуществляли выравнивание аминокислотной последовательности белков С3 разных видов и пептида С3f человека в программе ClustalW [30]. Ключевым критерием установления границ С3f считали наличие остатков аргинина в С-концевом положении пептида и в позиции, непосредственно предшествующей N-концевому остатку, формирующих, таким образом, два сайта протеолитического расщепления R-X. Последовательность С3f была обнаружена во всех проанализированных структурах белка С3 за исключением С3 миноги *Lethenteron camtschaticum* (Q00685).

Антимикробная активность. Для оценки антимикробных свойств синтетического пептида С3f использовали культуры следующих микроорганизмов: грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* (штамм ML-35p); грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes* (штамм EGD), *Micrococcus luteus* (штамм A270), *Enterococcus faecium* (штамм L3), *Bacillus cereus* (штамм 10702); гриба *Candida albicans* (штамм 820). Для анализа антимикробной активности пептида применяли метод радиальной диффузии [31]. К аликвотам суспензий, содержащих по 4×10^6 бактериальных клеток в логарифмической (экспоненциальной) фазе роста или клеток ночной культуры *C. albicans*, добавляли по 12 мл расплавленной 1%-ной

агарозы в 0.01 М натрий-фосфатном буфере (pH 7.4), термостатированной при 42°C. Полученные смеси наносили на чашки Петри диаметром 90 мм, оставляли до застывания агарозы. Затем в агарозе делали лунки диаметром 2–3 мм и вносили в них анализируемые пробы в 5 мкл 0.01%-ной уксусной кислоты. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель (0.01%-ная уксусная кислота), а в качестве положительного контроля – α -дефенсина человека HNP-1–3 в концентрации 60 мкМ. Чашки Петри с внесенными пробами инкубировали при 37°C в течение 2.5 ч, после чего добавляли по 12 мл термостатированной при 42°C расплавленной 1%-ной агарозы, содержащей 6% питательной среды Soyabean Casein Digest Medium – Tryptone Soya Broth (для чашек с *C. albicans* – 6% Sabouraud Dextrose Broth), и инкубировали 15–18 ч при 37°C. Рост микроорганизмов останавливали добавлением 5%-ной уксусной кислоты.

Антимикробную активность пробы определяли как разность диаметра зоны ингибирования роста и диаметра лунки. Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) пептида строили график зависимости антимикробной активности от десятичного логарифма его концентрации (без учета проб с нулевой активностью). Методом линейной регрессии проводили прямую линию, соответствующую экспериментальным точкам, и определяли точку ее пересечения с осью абсцисс. Значение концентрации для этой точки принимали за МИК [32]. Значения МИК пептида С3f в отношении различных микроорганизмов были получены как медианы по результатам трех независимых экспериментов.

В качестве положительного контроля в антимикробных тестах использовали тотальный дефенсин из нейтрофилов человека (HNP-1–3). Для получения препарата дефенсинов из нейтрофилов экстрагировали катионные белки и пептиды с помощью бромистого цетилтриметиламмония путем последовательной экстракции, как описано ранее [33, 34]. Экстракты, содержавшие дефенсины согласно данным аналитического электрофореза, фракционировали методами твердофазной экстракции на картридже С-18 (дефенсины элюировали 13%-ным раствором ацетонитрила в отсутствие TFA) и оФВЭЖХ на колонке С-18 с помощью изократической элюции раствором, содержащим 0.1% TFA и 23% ацетонитрила.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были исследованы антимикробные свойства синтетического пептида С3f человека – производного белка компонента С3. Мы показали, что С3f обладает антимикробной активностью в условиях *in vitro* в отношении некоторых грамположительных бактерий, однако она существенно уступа-

ет описанной в литературе антимикробной активности другого производного белка СЗ — пептида СЗa. Низкий уровень антимикробной активности пептида СЗf не позволяет сделать вывод о ее физиологической значимости, хотя нельзя исключать участие СЗf в противомикробной защите организма в кооперации с другими факторами сыворотки крови. Вопрос о собственной биологической активности пептида СЗf остается открытым, а его решение требует дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрический анализ проводили на оборудовании ФГУП “НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека” ФМБА России.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект 0557-2019-0010).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. P. 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
- Merle N.S., Church S.E., Fremeaux-Bacchi V., Roumenina L.T. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. Article 262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>
- Barnum S.R. // *Pharmacol. Ther.* 2017. V. 172. P. 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.014>
- Умнякова Е.С., Пашинская Л.Д., Крнев И.А., Легковой С.В., Кокряков В.Н., Берлов М.Н. // *Мед. акад. журн.* 2018. Т. 18. С. 7–16. <https://doi.org/10.17816/MAJ1837-16>
- Nordahl E.A., Rydengård V., Nyberg P., Nitsche D.P., Mörgelin M., Malmsten M., Björck L., Schmidtchen A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 48. P. 16879–16884. <https://doi.org/10.1073/pnas.040667810>
- Sonesson A., Ringstad L., Nordahl E.A., Malmsten M., Mörgelin M., Schmidtchen A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1768. P. 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.017>
- Pasupuleti M., Walse B., Nordahl E., Mörgelin M., Malmsten M., Schmidtchen A. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 2520–2528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607848200>
- Ricklin D., Reis E.S., Mastellos D.C., Gros P., Lambris J.D. // *Immunol. Rev.* 2016. V. 274. P. 33–58. <https://doi.org/10.1111/imr.12500>
- Barnum S.R. // *The Complement FactsBook*. 2nd ed. / Eds. Barnum S., Schein T. Acad. Press, 2018. P. 157–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810420-0.00016-X>
- Ganu V.S., Müller-Eberhard H.J., Hugli T.E. // *Mol. Immunol.* 1989. V. 10. P. 939–948. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(89\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(89)90112-0)
- Dousset B., Straczek J., Maachi F., Nguyen D.L., Jacob C., Capiaumont J., Nabet P., Belleville F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 247. P. 587–591. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8834>
- Xiang Y., Matsui T., Matsuo K., Shimada K., Tohma S., Nakamura H., Masuko K., Yudoh K., Nishioka K., Kato T. // *Arthritis Rheum.* 2007. V. 56. P. 2018–2030. <https://doi.org/10.1002/art.22645>
- Teixeira V., Feio M.J., Bastos M. // *Prog. Lipid Res.* 2012. V. 51. P. 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Кокряков В.Н., Алешина Г.М., Берлов М.Н., Янкевич И.А., Умнякова Е.С., Леонова Л.Е., Цветкова Е.В., Колобов А.А., мл., Меньшенин А.В., Курдюмова И.В. // *Росс. иммун. журн.* 2014. Т. 8. С. 325–328.
- Kumar P., Kizhakkedathu J.N., Straus S.K. // *Biomolecules.* 2018. V. 8. Article 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Rončević T., Puizina J., Tossi A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. Article 5713. <https://doi.org/10.3390/ijms20225713>
- Ajingi Y.S., Jongruja N. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 339. [Ajingi Y.S., Jongruja N. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 463–479.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020040044>
- Schiffer M., Edmundson A.B. // *Biophys. J.* 1967. V. 7. P. 121–135. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(67\)86579-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2)
- Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W., Cullor J.S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 4292–4295.
- Lawyer C., Pai S., Watabe M., Borgia P., Mashimo T., Eagleton L., Watabe K. // *FEBS Lett.* 1996. V. 390. P. 95–98. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00637-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00637-0)
- Simmaco M., Mignogna G., Canofeni S., Miele R., Mangoni M.L., Barra D. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 242. P. 788–792. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0788r.x>
- Rozek T., Wegener K.L., Bowie J.H., Olver I.N., Carver J.A., Wallace J.C., Tyler M.J. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 5330–5341. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01536.x>
- Manzo G., Ferguson P.M., Gustilo V.B., Hind C.K., Clifford M., Bui T.T., Drake A.F., Atkinson R.A., Sutton J.M., Batoni G., Lorenz C.D., Phoenix D.A., Mason A.J. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Article 1385. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37630-3>
- Schägger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. // *Proteomics Protocols Handbook* / Ed. Walker J.M. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. P. 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>

26. Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Gimsley G., Gray T. // Protein Sci. 1995. V. 4. P. 2411–2423. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>
27. Gautier R., Douguet D., Antonny B., Drin G. // Bioinformatics. 2008. V. 24. P. 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>
28. Lamiable A., Thévenet P., Rey J., Vavrusa M., Derreux P., Tufféry P. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. W449–W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>
29. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // J. Comput. Chem. 2004. V. 25. P. 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
30. Stevers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. // Mol. Syst. Biol. 2011. V. 7. Article 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
31. Lehrer R.I., Rosenman M., Harwig S.S., Jackson R., Eisenhauer P. // J. Immunol. Meth. 1991. V. 137. P. 167–173. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90021-7)
32. Qu X.-D., Harwig S.S.L., Oren A., Shafer W.M., Lehrer R.I. // Infect. Immun. 1996. V. 64. P. 1240–1245.
33. Берлов М.Н., Лодыгин П.А., Андреева Ю.В., Кокряков В.Н. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 1238–1244. [Berlov M.N., Lodygin P.A., Andreeva Yu.V., Kokryakov V.N. // Biochemistry (Mosc.). 2001. V. 66. P. 1008–1013.] <https://doi.org/10.1023/a:1012325810788>
34. Берлов М.Н., Кorableва Е.С., Андреева Ю.В., Овчинникова Т.В., Кокряков В.Н. // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 551–559. [Berlov M.N., Korableva E.S., Andreeva Yu.V., Ovchinnikova T.V., Kokryakov V.N. // Biochemistry (Mosc.). 2007. V. 72. P. 445–451.] <https://doi.org/10.1134/S0006297907040128>

Evaluation of the Antimicrobial Activity of C3f Peptide, a Derivative of Human C3 Protein

V. A. Pozolotin*, **, E. S. Umnyakova*, P. M. Kopeykin*, A. S. Komlev*, Y. A. Dubrovskii**, ***, I. A. Krenev*, **, O. V. Shamova*, and M. N. Berlov*, #

#Phone: +7 (812) 234-07-64; e-mail: berlov.mn@iemsph.ru

*Institute of Experimental Medicine, ul. Akad. Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

**Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

***Almazov National Medical Research Centre, ul. Akkuratova 2, St. Petersburg, 197341 Russia

The complement system plays an important role in the protection of the organism from infection. A key step in complement activation is the proteolytic cleavage of C3 protein resulting in a soluble anaphylatoxin C3a peptide and C3b protein that is able to form a covalent bond with surface molecules of microbial cells. The activity of C3b is regulated by its subsequent limited proteolysis with the release of the C3f peptide, which is believed to have no functional activity itself. Based on the physicochemical properties of C3f, we hypothesized that this peptide may exhibit antimicrobial activity. Complement activation usually takes place on the surface of pathogens, in particular, bacterial cells, and local generation of antimicrobial peptides can contribute significantly to their neutralization. The antimicrobial activity of complement derivatives, C3a and C4a peptides, is already known from the literature. To study the antimicrobial properties of C3f, we obtained this peptide by the method of solid-phase synthesis. It has been shown that human C3f exhibits moderate antimicrobial activity *in vitro* against certain gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecium*) with minimal inhibitory concentrations of 70 μ M (for *L. monocytogenes*) or higher. The revealed antimicrobial activity of C3f is much lower than the activity of C3a described in the literature. Several microorganisms (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) were resistant to C3f.

Keywords: complement system, C3f, antimicrobial peptides, solid-phase synthesis



СИНТЕЗ, АНТИМИКРОБНЫЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ 5-ТИОФЕН-2-ИЛМЕТИЛЕН-2-ТИОКСОТИАЗОЛИДИН-4-ОНА

© 2021 г. В. Я. Горишний*, В. С. Матийчук**,#

*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина, 79010 Львов, ул. Пекарская, 69

**Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Украина, 79005 Львов, ул. Кирилла и Мефодия, 6

Поступила в редакцию 29.06.2020 г.

После доработки 11.07.2020 г.

Принята к публикации 14.07.2020 г.

Взаимодействием тиофен-2-карбальдегида с производными роданина произведен синтез 5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-4-онов. Полученные в том числе (4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил)алканкарбоновые кислоты использованы для ацилирования биогенного амина триптамина и его производных. В результате синтезирован ряд новых *N*-[2-(5-[*R*-1*H*-индол-3-ил)-этил]-2-(4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил)карбамидов. Исследованы антимикробные и противоопухолевые свойства полученных соединений. Идентифицированы соединения с высокой антимикробной активностью относительно *Staphylococcus aureus* и *Cryptococcus neoformans*.

Ключевые слова: тиофен, роданин, ацилирование, антимикробная активность, противоопухолевая активность

DOI: 10.31857/S0132342321030076

ВВЕДЕНИЕ

Антимикробные средства – одна из наиболее важных и обширных групп биологически активных веществ, имеющих практическое значение в современной медицине. Арсенал применяемых антимикробных препаратов требует постоянного обновления, поскольку микроорганизмы постоянно мутируют, в результате чего появляются штаммы, устойчивые к существующим антимикробным средствам. Остро стоит и проблема наличия эффективных противоопухолевых средств. На сегодняшний день многие виды рака неизлечимы, а количество онкобольных постоянно растет.

Одно из перспективных направлений современной медицинской химии – дизайн новых соединений, сочетающих в своем составе несколько фармакофоров, с целью получения биоактивных молекул с широким спектром фармакологического действия. Как известно, производные роданина (2-тионтиазолидин-4-она) и тиофена обладают широким спектром биологического дей-

ствия. Среди них выявлены соединения-лидеры с антимикробной, противотуберкулезной, противовирусной, антидиабетической, противовоспалительной, противоопухолевой, противосудорожной и другими видами активности, в связи с чем роданиновый и тиофеновый циклы принято считать фармакофор-образующими структурами в медицинской химии [1–3].

Настоящая работа – продолжение наших исследований по дизайну биологически активных гетероциклических соединений [4–13]. Нами представлен синтез и исследование антимикробных и противоопухолевых свойств производных 5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-4-она. Следует отметить, что среди подобного рода соединений уже найдены вещества с противоопухолевым [14, 15], антимикробным [16–19], а также антиоксидантным [20], цитотоксическим [20], анальгетическим [21] и противовоспалительным [21] действием. Они выступают ингибиторами киназ [22–24], протеазы сибирской язвы [25], HCV NS5B полимеразы [26], тирозинфосфатазы [27], альдозоредуктазы [28] и других ферментов.

Сокращения: MIC – минимальная ингибирующая концентрация.

Автор для связи: (тел.: +38 (067) 675-16-83; эл. почта: v_matyichuk@ukr.net).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью получения комбинаторной библиотеки производных 5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксо-тиазазолидин-4-онов изучено взаимодействие тиофен-2-карбальдегида (I) с роданинами (II–V).

Установлено, что оптимальная среда для прохождения этой реакции – кипящая уксусная кислота в присутствии ацетата натрия или аммония. Таким образом синтезированы 5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксо-4-тиазазолидоны (VI–IX) (схема 1).

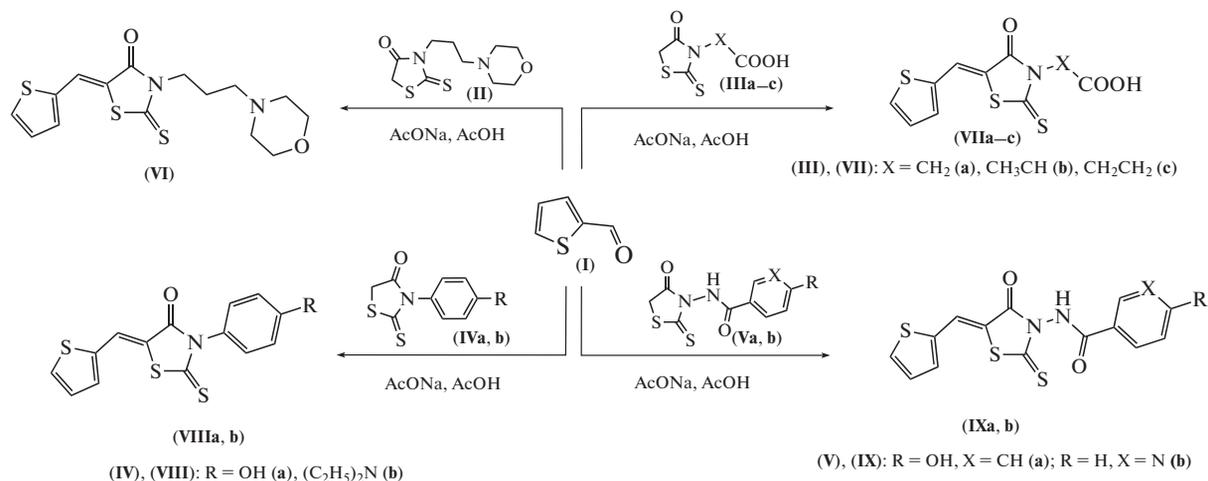


Схема 1. Синтез 5-тиенилиденроданинов (VI–IX).

Кислоты (VIIa, b) были превращены в соответствующие хлорангидриды (Xa, b) при действии хлористого тионила. Реакцию проводили в среде толуола, а ее окончанием считали полное растворение исходной кислоты. Целевые амиды (XIa–e)

получали классическим способом – взаимодействием хлорангидридов (Xa, b) с соответствующими триптамими (XIa–d) (схема 2). Реакцию проводили в среде безводного диоксана в присутствии триэтиламина.

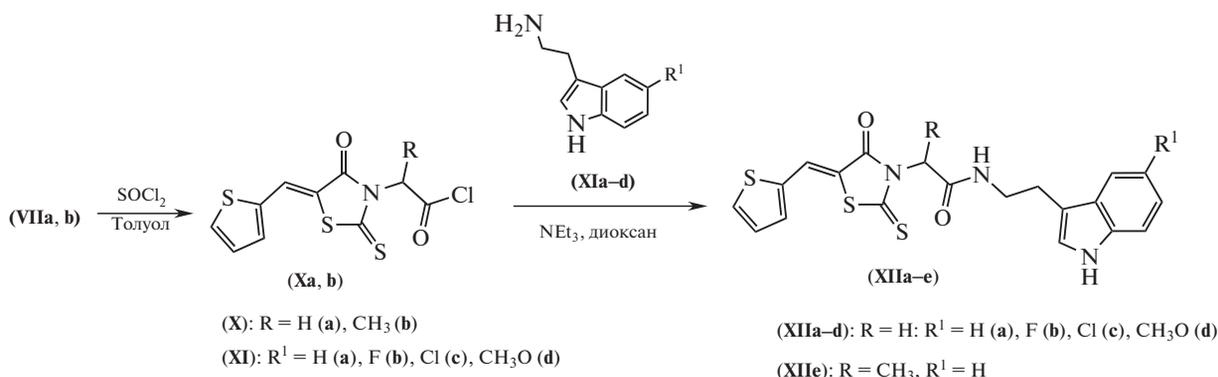


Схема 2. Синтез триптамидов (XIIa–e).

Строение соединений (VI–IX) и (XIIa–e) подтверждено при помощи ¹H-ЯМР-спектроскопии. В спектрах присутствуют сигналы всех протонов в областях, которые однозначно согласуются со строением исследуемых веществ. В частности, в области 8.06–8.28 м.ч. находятся сигналы 5-метиленового протона, что указывает на Z-конфигурацию синтезированных веществ.

Антимикробная активность синтезированных соединений. Исследование антимикробной активности синтезированных соединений (VI–IX)

и (XIIa–e) осуществлено в рамках проекта “The Community for Antimicrobial Drug Discovery” (CO-ADD) при поддержке Wellcome Trust (Великобритания) и университета Квинсленда (Австралия) [29]. В качестве тестовых микроорганизмов использовали пять штаммов бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, а также два штамма дрожжеподобных грибов: *Candida albicans* ATCC 90028 и

Таблица 1. Антимикробная активность синтезированных соединений (GI, %)*

| Соединение | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>A. baumannii</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. neoformans</i> |
|------------|------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| (VI) | 25.0 | 5.7 | 2.3 | 4.1 | 20.0 | 30.0 | 24.2 |
| (VIIc) | 86.6 | 5.7 | 6.4 | 5.2 | 14.9 | 21.7 | 40.8 |
| (VIIIa) | 56.6 | 1.9 | 9.0 | 11.3 | 3.2 | 15.5 | 12.7 |
| (VIIIb) | 29.0 | 4.4 | 7.1 | 0.2 | 13.7 | 12.5 | 30.8 |
| (IXa) | 94.7 | -0.2 | -2.9 | 9.6 | 37.8 | 77.7 | 60.2 |
| (IXb) | 92.7 | -10.6 | -3.6 | -2.5 | -7.2 | 38.0 | 92.7 |
| (XIIa) | 35.9 | -5.4 | 9.1 | -4.2 | 16.0 | 44.3 | 97.3 |
| (XIIb) | 8.3 | 6.1 | -7.1 | 11.0 | 12.3 | 34.0 | 99.0 |
| (XIIc) | -5.6 | -1.0 | -2.5 | 13.7 | -1.9 | 55.3 | 101.5 |
| (XIId) | 33.8 | 8.1 | 7.7 | 11.5 | 9.1 | 66.6 | 87.2 |
| (XIIe) | 27.7 | 3.5 | 9.7 | 3.1 | 24.7 | 55.4 | 90.5 |

* Рост клеток (%) для исследуемых соединений в концентрации 32 мкг/мл.

Cryptococcus neoformans ATCC 208821. Результаты исследований антимикробной активности приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, большинство тестируемых соединений проявило отчетливую или высокую антимикробную активность исключительно относительно грамположительных микроорганизмов, а именно устойчивого к метициллину штамма *S. aureus* ATCC 43300. Грамотрицательные бактерии оказались нечувствительными к тестируемым соединениям. Особенность строения всех соединений, обнаруживших высокую антистафилококковую активность, заключается в наличии гидрофильных заместителей в положении 3 роданинового цикла, таких как карбоксильная группа (VIIc), фенольный гидроксил (VIIIa, IXa) или гидрофильный по своей природе амидный фрагмент (IXa, b). Причем соединение (IXa), содержащее фенольный гидроксил в амидном фрагменте, характеризуется широким спектром действия, демонстрируя высокие показатели антимикробной активности в отношении *S. aureus* ATCC 43300 и противогрибковой – относительно *C. albicans* ATCC 90028 и *C. neoformans* ATCC 208821.

Все триптамыды (XIIa–e) проявляют высокую противогрибковую активность в отношении штаммов *C. albicans* ATCC 90028 и *C. neoformans* ATCC 208821, причем опять же стоит отметить наличие в их составе гидрофильного амидного фрагмента. Этот фрагмент содержится и в 3-арильных замещенных (IXa, b), которые кроме высокой антистафилококковой активности проявляют также выраженную противогрибковую активность.

Соединения (VIIc) и (IXa, b) были отобраны для второго этапа исследований антимикробной активности, а соединения (XIIa–e) – для ана-

лиза противогрибковой активности, который заключался в нахождении минимальной ингибирующей концентрации (MIC) и определении цитотоксичности (CC₅₀ и HC₁₀) относительно эмбриональных клеток почек (human embryonic kidney cells) и эритроцитов человека (human red blood cells). Результаты исследований антимикробной активности в отношении *S. aureus* ATCC 43300 приведены в табл. 2. Проведенные исследования подтвердили антимикробную активность указанных соединений. Установлено, что самое сильное антимикробное действие продемонстрировали соединения (VIIc) и (IXb). Для них минимальная ингибирующая концентрация составляла 4 мкг/мл. Наиболее отчетливая противогрибковая активность относительно *C. neoformans* наблюдалась у соединений (XIIb, c) (MIC = 4 мкг/мл). Особенность их строения заключается в наличии галогена в индольном фрагменте молекулы. Однако для этих соединений характерна относительная токсичность по отношению к эмбриональным клеткам почек человека. Все остальные тестируемые соединения вышеуказанного вида токсичности не проявили.

Противоопухолевая активность синтезированных соединений. Противоопухолевую активность синтезированных соединений в концентрации 10 мкМ изучали методом высокоэффективного биологического скрининга согласно международной научной программе Национального института здоровья США – DTP (Developmental Therapeutic Program) Национального института рака (Бетезда, Мэриленд, США) [30–33] *in vitro* на 60 линиях клеток, охватывающих практически весь спектр раковых заболеваний. Количественным критерием активности соединений был рассчитанный процент роста клеток линий рака (GR, %) по сравнению с контролем [25–28]. Результаты исследования приведены в табл. 3.

Таблица 2. Антимикробная, цитотоксическая и гемолитическая активность соединений (VIIc), (IXa, b) и (XIIa–e)

| Соединение | MIC, мкг/мл | | Hk CC ₅₀ , мкг/мл | Hm HC ₁₀ , мкг/мл |
|---------------|------------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>C. neoformans</i> | HEK293 | RBC |
| (VIIc) | 4 | >32 | >32 | >32 |
| (IXa) | 16 | >32 | >32 | >32 |
| (IXb) | 4 | >32 | >32 | >32 |
| (XIIa) | >32 | 8 | >32 | >32 |
| (XIIb) | >32 | 4 | 19.6 | >32 |
| (XIIc) | >32 | 4 | 26.2 | >32 |
| (XIId) | >32 | 32 | >32 | >32 |
| (XIIe) | >32 | 16 | >32 | >32 |
| Цефтриаксон | 32 | NT | NT | NT |
| Амфотерицин В | NT | 1.46 | NT | NT |

Примечание: MIC – минимальная ингибирующая концентрация; Hk CC₅₀ – цитотоксичность относительно эмбриональных клеток почек (human embryonic kidney cells (HEK293)); Hm HC₁₀ – цитотоксичность относительно эритроцитов человека (human red blood cells (RBC)); NT – не тестировалось.

Таблица 3. Цитотоксичность синтезированных соединений в концентрации 10 мкМ на 60 линиях раковых клеток

| Соединение | Митотическая активность на 60 линиях, GP, % | | Наиболее чувствительные линии | |
|------------|---|--------------|--|-------|
| | средняя | диапазон | линия рака/тип | GP, % |
| (VIIc) | 101.71 | 80.66–121.12 | UO-31 (рак почек) | 80.66 |
| (VIIa) | 96.96 | 71.14–123.55 | MDA-MB-468 (рак молочной железы) | 71.14 |
| (IXa) | 101.58 | 78.88–117.79 | UO-31 (рак почек) | 78.88 |
| (IXb) | 100.18 | 73.74–113.57 | UO-31 (рак почек) | 73.74 |
| | | | RPMI-8226 (лейкемия) | 82.75 |
| (XIIa) | 98.04 | 52.09–144.10 | UO-31 (рак почек) | 52.09 |
| (XIIb) | 101.51 | 59.28–146.38 | UO-31 (рак почек) | 59.28 |
| | | | CAKI-1 (рак почек) | 77.45 |
| | | | NCI-H522 (немелкоклеточный рак легких) | 79.82 |
| | | | SNB-75 (рак ЦНС) | 80.53 |
| | | | UACC-62 (меланома) | 85.21 |
| (XIIc) | 100.69 | 71.89–147.13 | UO-31 (рак почек) | 71.89 |
| | | | CCRF-CEM (лейкемия) | 76.35 |
| | | | NCI-H522 (немелкоклеточный рак легких) | 78.48 |
| | | | A498 (рак почек) | 80.95 |
| | | | CAKI-1 (рак почек) | 82.37 |
| | | | SNB-75 (рак ЦНС) | 82.40 |
| (XIId) | 101.48 | 69.99–129.25 | UO-31 (рак почек) | 69.99 |
| | | | NCI-H522 (немелкоклеточный рак легких) | 81.88 |
| | | | SNB-75 (рак ЦНС) | 82.59 |
| | | | CAKI-1 (рак почек) | 85.99 |
| (XIIe) | 96.16 | 50.05–120.29 | UO-31 (рак почек) | 50.05 |
| | | | CAKI-1 (рак почек) | 64.40 |
| | | | SNB-75 (рак ЦНС) | 73.69 |
| | | | UACC-62 (меланома) | 76.83 |
| | | | NCI-H226 (немелкоклеточный рак легких) | 82.73 |
| | | | CCRF-CEM (лейкемия) | 83.96 |
| | | | NCI-H522 (немелкоклеточный рак легких) | 84.46 |
| | | | SF-268 (рак ЦНС) | 87.38 |

Установлено, что синтезированные соединения проявляют среднюю или низкую противоопухолевую активность. Наиболее чувствительной практически ко всем тестируемым соединениям оказалась линия УО-31 рака почек.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

^1H -ЯМР-спектры растворов веществ в ДМСО- d_6 регистрировали на спектрометре Mercury VX-400 (400 МГц, Varian, США), внутренний стандарт – ТМС. Температуры плавления синтезированных соединений определяли в открытых капиллярных трубках на электротермическом приборе ПТП-М (АО “ЛОИП”, Россия). Контроль за ходом реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках Silica gel 60 F254 (Merck, Германия). В качестве исходных соединений использовали коммерчески доступные реагенты.

Синтез 5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-4-онов (VI–IX). В круглодонную колбу с обратным холодильником помещали 3 ммоль соответствующего роданина (II–V), 0.4 г (3.6 ммоль) тиофен-2-карбальдегида (I), 0.25 г (3 ммоль) ацетата натрия и 5 мл уксусной кислоты. Реакционную смесь кипятили 1.5–2 ч, охлаждали, осадок отфильтровывали (соединение VI) выделяли подщелачиванием реакционной смеси 5%-ным раствором NaOH до pH ~ 8 при перемешивании и охлаждении с последующим отфильтровыванием осадка и промыванием его водой), промывали уксусной кислотой, водой, высушивали и перекристаллизовывали из уксусной кислоты или смеси ДМФА с уксусной кислотой.

(5Z)-3-(3-Морфолин-4-илпропил)-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-4-он (VI). Выход 92%. Т. пл. 114–115°C. Спектр ^1H -ЯМР, δ , м.д.: 8.11 (с, 2H, CH= + 3-H, тиофен), 7.77 (с, 1H, 5-H, тиофен), 7.33 (с, 1H, 4-H, тиофен), 4.11 (с, 2H, 1-CH₂), 3.46 (с, 4H, (CH₂)₂O, морфолин), 2.38–2.18 (м, 6H, 3CH₂, (CH₂)₂N, морфолин + 3-CH₂), 1.87–1.79 (м, 2H, 2-CH₂). Найдено, %: С 50.96; Н 5.19; N 7.81. C₁₅H₁₈N₂O₂S₃. Вычислено, %: С 50.82; Н 5.12; N 7.90.

[(5Z)-4-Оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]уксусная кислота (VIIa). Выход 97%. Т. пл. 236–237°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., J, Гц): 13.36 (с, 1H, COOH), 8.19 (с, 1H, CH=), 8.15 (д, J 5.0, 1H, 3-H, тиофен), 7.81 (д, J 3.7, 1H, 5-H, тиофен), 7.35 (т, J 4.8, 4-H, 1H, тиофен), 4.73 (с, 2H, CH₂). Найдено, %: С 41.96; Н 2.42; N 4.99. C₁₀H₇NO₃S₃. Вычислено, %: С 42.09; Н 2.47; N 4.91.

2-[(5Z)-4-Оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]пропановая кислота (VIIb). Выход 93%. Т. пл. 178–180°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ ,

м.д., J, Гц): 13.24 (с, 1H, COOH), 8.15 (д, J 5.1, 1H, 3-H, тиофен), 8.13 (с, 1H, CH=), 7.87–7.68 (м, 1H, 5-H, тиофен), 7.34 (дд, J 4.9, 3.8, 1H, 4-H, тиофен), 5.59 (кв, J 7.1, 1H, CH), 1.54 (д, J 7.1, 3H, CH₃). Найдено, %: С 44.02; Н 2.97; N 4.61. C₁₁H₉NO₃S₃. Вычислено, %: С 44.13; Н 3.03; N 4.68.

3-[(5Z)-4-Оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]пропановая кислота (VIIc). Выход 92%. Т. пл. 200–201°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., J, Гц): 12.53 (с, 1H, COOH), 8.14–8.10 (м, 2H, CH= + 3-H, тиофен), 7.78 (д, J 3.6, 1H, 5-H, тиофен), 7.32 (дд, J 4.8, 3.9, 1H, 4-H, тиофен), 4.22 (д, J 7.7, 2H, CH₂CO), 2.64 (т, J 7.9, 2H, CH₂N). Найдено, %: С 44.25; Н 2.99; N 4.75. C₁₁H₉NO₃S₃. Вычислено, %: С 44.13; Н 3.03; N 4.68.

(5Z)-3-(4-Гидроксифенил)-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-4-он (VIIIa). Выход 90%. Т. пл. 229–231°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., J, Гц): 9.89 (с, 1H, OH), 8.17–8.10 (м, 2H, CH= + 3-H, тиофен), 7.80 (д, J 3.5, 1H, 5-H, тиофен), 7.44 (т, J 3.5, 1H, 4-H, тиофен), 7.17 (д, J 8.7, 2H, 3-H + 5-H, C₆H₄OH), 6.88 (д, J 8.7, 2H, 2-H + 6-H, C₆H₄OH). Найдено, %: С 52.51; Н 2.77; N 4.32. C₁₄H₉NO₂S₃. Вычислено, %: С 52.64; Н 2.84; N 4.38.

(5Z)-3-(4-Диэтиламинофенил)-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-4-он (VIIIb). Выход 91%. Т. пл. 209–210°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., J, Гц): 8.14–8.06 (м, 2H, CH= + 3-H, тиофен), 7.76 (д, J 3.3, 1H, 5-H, тиофен), 7.34 (т, J 4.5, 1H, 4-H, тиофен), 7.09 (д, J 8.9, 2H, 2-H + 6-H, C₆H₄), 6.74 (д, J 8.4, 2H, 3-H + 5-H, C₆H₄), 3.39 (кв, J 6.9, 4H, 2CH₂CH₃), 1.14 (т, J 6.8, 6H, 2CH₂CH₃). Найдено, %: С 57.86; Н 4.77; N 7.55. C₁₈H₁₈N₂OS₃. Вычислено, %: С 57.72; Н 4.84; N 7.48.

4-Гидрокси-N-[(5Z)-4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]бензамид (IXa). Выход 91%. Т. пл. 238–240°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., J, Гц): 11.52 (с, 1H, NH), 10.35 (с, 1H, OH), 8.28 (с, 1H, CH=), 8.20 (д, J 4.9, 1H, 3-H, тиофен), 7.88–7.81 (м, 3H, 2-H + 6-H, C₆H₄ + 5-H, тиофен), 7.37 (т, J 4.0, 1H, 4-H, тиофен), 6.90 (д, J 8.5, 2H, 3-H + 5-H, C₆H₄). Найдено, %: С 49.69; Н 2.84; N 7.78. C₁₅H₁₀N₂O₃S₃. Вычислено, %: С 49.71; Н 2.78; N 7.73.

N-[(5Z)-4-Оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]никотинамид (IXb). Выход 96%. Т. пл. 228–230°C. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д., J, Гц): 11.97 (с, 1H, NH), 9.13 (с, 1H, 2-H, пиридин), 8.85 (д, J 4.8, 1H, 4-H, пиридин), 8.31 (д, J 8.0, 1H, 6-H, пиридин), 8.26 (с, 1H, CH=), 8.18 (д, J 5.0, 1H, 3-H, тиофен), 7.83 (с, 1H, 5-H, тиофен), 7.63 (дд, J 7.8, 4.9, 1H, 5-H, пиридин), 7.37 (т, J 4.7, 1H, 4-H, тиофен). Найдено, %: С 48.29; Н 2.67; N 12.16. C₁₄H₉N₃O₂S₃. Вычислено, %: С 48.40; Н 2.61; N 12.09.

Синтез (4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил)-алканхлоридов (Xa, b). В круглодонную колбу с обратным холодильником помещали 20 ммоль кислоты (**VIIa**) или (**VIIb**), 0.7 г (60 ммоль тионилхлорида) и 5–10 мл безводного толуола. Реакционную смесь кипятили 10–20 мин до полного растворения кислоты, добавляли 15–30 мл петролейного эфира, охлаждали, осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из смеси бензол–гексан или толуол–петролейный эфир.

(4-Оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил)-ацетилхлорид (Xa). Выход 78%. Т. пл. 138–140°C.

2-(4-Оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил)-пропионилхлорид (Xb). Выход 90%. Т. пл. 104–106°C.

Общая методика синтеза триптамидов (XIa–e). К раствору 2 ммоль соответствующего триптамина (**XIa–d**), 0.2 г (2 ммоль) триэтиламина в 5 мл безводного диоксана добавляли раствор 2 ммоль (4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил)-алканхлорида (**Xa**) или (**Xb**) в 5 мл горячего диоксана и оставляли на 30 мин. Реакционную смесь разбавляли 100 мл воды. Осадок отфильтровывали, высушивали и перекристаллизовывали из уксусной кислоты.

N-[2-(1H-Индол-3-ил)этил]-2-[(5Z)-4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]ацетамид (XIa). Выход 81%. Т. пл. 217–220°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д., J, Гц): 10.85 (с, 1H, C(O)NH), 8.42 (т, J 5.5, 1H, 1-H, индол), 8.17 (с, 1H, CH=), 8.15 (д, J 5.0, 1H, 3-H, тиофен), 7.81 (д, J 3.5, 1H, 5-H, тиофен), 7.53 (д, J 7.8, 1H, 2-H, индол), 7.37–7.31 (м, 2H, 4-H, индол + 4-H, тиофен), 7.15 (д, J 2.2, 1H, 7-H, индол), 7.06 (т, J 7.5, 1H, 5-H, индол), 6.98 (т, J 7.4, 1H, 6-H, индол), 4.63 (с, 2H, CH₂CO), 3.42–3.25 (м, 2H, CH₂NH), 2.82 (т, J 7.3, 2H, NHCH₂CH₂). Найдено, %: C 56.29; H 4.11; N 9.76. C₂₀H₁₇N₃O₂S₃. Вычислено, %: C 56.18; H 4.01; N 9.83.

N-[2-(5-Фторо-1H-индол-3-ил)этил]-2-[(5Z)-4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]ацетамид (XIb). Выход 82%. Т. пл. 212–214°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д., J, Гц): δ 10.95 (с, 1H, C(O)NH), 8.40 (с, 1H, 1-H, индол), 8.16 (с, 2H, CH= + 3-H, тиофен), 7.80 (с, 1H, 5-H, тиофен), 7.43–7.17 (м, 4H, 2-H + 4H + 6-H, индол + 4-H, тиофен), 6.90 (с, 1H, 6-H, индол), 4.63 (с, 2H, CH₂CO), 3.35–3.28 (м, 2H, CH₂NH), 2.78 (т, J 7.2, 2H, NHCH₂CH₂). Найдено, %: C 54.03; H 3.57; N 9.36. C₂₀H₁₆FN₃O₂S₃. Вычислено, %: C 53.91; H 3.62; N 9.43.

N-[2-(5-Хлоро-1H-индол-3-ил)этил]-2-[(5Z)-4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]ацетамид (XIc). Выход 78%. Т. пл. 223–

226°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д., J, Гц): 11.06 (с, 1H, C(O)NH), 8.40 (т, J 5.5, 1H, 1-H, индол), 8.17–8.13 (м, 2H, CH= + 3-H, тиофен), 7.80 (д, J 3.5, 1H, 5-H, тиофен), 7.56 (с, 1H, 2-H, индол), 7.36 (с, 1H, 4-H, индол), 7.34 (с, 1H, 4-H, тиофен), 7.23 (с, 1H, 7-H, индол), 7.06 (дд, J 8.6, 1.8, 1H, 6-H, индол), 4.63 (с, 2H, CH₂CO), 3.36–3.29 (м, 2H, CH₂NH), 2.79 (т, J 7.2, 2H, NHCH₂CH₂). Найдено, %: C 51.78; H 3.55; N 9.02. C₂₀H₁₆ClN₃O₂S₃. Вычислено, %: C 51.99; H 3.49; N 9.09.

N-[2-(5-Метокси-1H-индол-3-ил)этил]-2-[(5Z)-4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]ацетамид (XIId). Выход 77%. Т. пл. 226–229°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д., J, Гц): 10.66 (с, 1H, C(O)NH), 8.38 (с, 1H, 1-H, индол), 8.14 (д, J 7.5, 2H, CH= + 3-H, тиофен), 7.80 (д, J 3.6, 1H, 5-H, тиофен), 7.37–7.32 (м, 1H, 4-H, тиофен), 7.22 (д, J 8.7, 1H, 2-H, индол), 7.11 (д, J 2.1, 1H, 4-H, индол), 7.00 (д, J 2.2, 1H, 7-H, индол), 6.71 (дд, J 8.7, 2.3, 1H, 6-H, индол), 4.64 (с, 2H, CH₂CO), 3.77 (с, 3H, CH₃), 3.35 (т, 6.0, 2H, CH₂NH), 2.79 (т, J 7.3, 2H, NHCH₂CH₂). Найдено, %: C 55.24; H 4.08; N 9.11. C₂₁H₁₉N₃O₃S₃. Вычислено, %: C 55.12; H 4.19; N 9.18.

N-[2-(1H-Индол-3-ил)этил]-2-[(5Z)-4-оксо-5-тиофен-2-илметилден-2-тиоксотиазолидин-3-ил]пропанамид (XIe). Выход 92%. Т. пл. 112–115°C. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д., J, Гц): 10.81 (с, 1H, C(O)NH), 8.20–8.11 (м, 2H, 1-H, индол + 3-H, тиофен), 8.10 (с, 1H, CH=), 7.78 (д, J 3.1, 1H, 5-H, тиофен), 7.53 (д, J 7.9, 1H, 2-H, индол), 7.38–7.28 (м, 2H, 4-H, индол + 4-H, тиофен), 7.14 (с, 1H, 7-H, индол), 7.05 (т, J 7.2, 1H, 5-H, индол), 6.97 (т, J 7.4, 1H, 6-H, индол), 5.45 (д, J 6.9, 1H, CH), 3.42–3.25 (м, 2H, CH₂NH), 2.88–2.74 (м, 2H, NHCH₂CH₂), 1.57 (д, J 6.9, 3H, CH₃). Найдено, %: C 57.02; H 4.27; N 9.60. C₂₁H₁₉N₃O₂S₃. Вычислено, %: C 57.12; H 4.34; N 9.52.

Антимикробная активность. Для определения ингибирования роста бактерий (*S. aureus* ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *A. baumannii* ATCC 19606) планшеты с исследуемыми веществами и бактериальными культурами инкубировали при 37°C в течение 18 ч без встряхивания и измеряли поглощение при 600 нм (*OD*₆₀₀) с использованием автоматизированного монохроматора/спектрографа M1000 Pro (Тесан, Швейцария). Для определения ингибирования роста грибка *C. albicans* ATCC 90028 планшеты с исследуемыми веществами и грибковой суспензией инкубировали при 35°C в течение 36 ч без встряхивания и измеряли поглощение при 530 нм (*OD*₅₃₀) с помощью спектрофотометра Synergy HTX (Biotek, США). Ингибирование в аналогичных условиях роста грибка *C. neoformans* ATCC

208821 определяли, измеряя разницу между поглощением при 600 и 570 нм ($OD_{600-570}$) после добавления резазурина (конечная концентрация 0.001%) и инкубации в течение дополнительных 2 ч при 35°C.

Процент ингибирования роста (GI, %) рассчитывали для каждой ячейки микротитрационного планшета, используя отрицательный контроль (только среда) и положительный контроль (бактериальная/грибковая среда без ингибиторов) в тех же условиях.

Цитотоксический эффект *in vitro* оценивали на эмбриональной клеточной линии почек НЕК293 в концентрации исследуемых веществ, которая вызвала 50%-ную гибель клеток (CC_{50}). Ингибирование роста клеток оценивали по флуоресценции после добавления резазурина (5 мкл, 25 мкг/мл; конечная концентрация 2.3 мкг/мл) и инкубации в течение 3 ч при 37°C и 5% CO_2 . Интенсивность флуоресценции измеряли на приборе M1000 Pro (Tecan, Швейцария) монохромным считывателем микропланшетов с использованием автоматического расчета данных.

Гемолитический эффект оценивали по поглощению при 405 нм супернатанта, образованного после инкубации пластинок (37°C, 1 ч), содержащих исследуемые соединения вместе с промытыми клетками крови человека с последующим центрифугированием (1000 об/мин, 10 мин). Поглощение измеряли на приборе M1000 Pro (Tecan, Швейцария) монохромным считывателем планшетов. В качестве положительного гемолитического стандарта использовали меллитин.

Противоопухолевая активность. Противоопухолевая активность синтезированных соединений в отношении 60 линий раковых клеток, представляющих девять онкологических заболеваний (лейкемия, немелкоклеточный рак легких, рак ЦНС, яичников, молочной железы, простаты, почек, эпителиальный рак кишечника, меланома), исследовали в National Cancer Institute of Health (США) в рамках Development Therapeutic Program по стандартной процедуре [27]. Определение противоопухолевой активности проводили высокочувствительным флуорометрическим методом посредством количественной оценки интенсивности цвета флуоресцентного излучения (краситель – сульфородамин Б) через 48 ч после обработки клеток тестируемыми соединениями. Процент ингибирования роста рассчитывали по формулам:

$$[(T_i - T_z)/(C - T_z)] \times 100$$

(при концентрациях, для которых $T_i \geq T_z$),

$$[(T_i - T_z)/T_z] \times 100$$

(при концентрациях, для которых $T_i < T_z$),

где T_i – тестовый рост в присутствии исследуемого соединения, T_z – концентрация клеток в начальный момент, C – контрольный рост.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено взаимодействие тиофен-2-карбальдегида с производными роданина, в результате чего получена комбинаторная библиотека производных 5-тиофен-2-илметил-2-тиоксотиазолидин-4-она. Исследованы антимикробные и противоопухолевые свойства синтезированных соединений, обнаружены определенные закономерности взаимосвязи “структура–действие”. Идентифицированы соединения с высокой антибактериальной активностью относительно штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и противогрибковой активностью в отношении штамма *Cryptococcus neoformans* ATCC 208821. Полученные результаты свидетельствуют о перспективах дальнейших исследований в направлении поиска эффективных антимикробных средств.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит описания выполненных кем-либо из авторов исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tomasić T., Masic L.P. // *Curr. Med. Chem.* 2009. V. 16. P. 1596–1629. <https://doi.org/10.2174/092986709788186200>
2. Kaminsky D., Kryshchyn A., Lesyk R. // *Expert Opin. Drug Discov.* 2017. V. 12. P. 1233–1252. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1388370>
3. Keri R.S., Chand K., Budagumpi S., Balappa Somappa S., Patil S.A., Nagaraja B.M. // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. V. 138. P. 1002–1033. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.038>
4. Походьло Н.Т., Матийчук В.С., Обушак Н.Д. // *Хим. гетероцикл. соед.* 2009. Т. 45. С. 140–142. [Pokhodylo N.T., Matiychuk V.S., Obushak N.D. // *Chem. Heterocycl. Comp.* 2009. V. 45. P. 121–122.] <https://doi.org/10.1007/s10593-009-0238-2>
5. Bazel Y., Tupys A., Ostapiuk Y., Tymoshuk O., Matiychuk V.J. // *Mol. Liq.* 2017. V. 242. P. 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.047>
6. Обушак Н.Д., Горак Ю.И., Матийчук В.С., Лытвын Р.З. // *ЖОрХ.* 2008. Т. 44. С. 1712–1716.

- [Obushak N.D., Gorak Yu.I., Matiichuk V.S., Lytvyn R.Z. // Russ. J. Org. Chem. 2008. V. 44. P. 1689–1694.]
<https://doi.org/10.1134/S1070428008110213>
7. Походьло Н.Т., Матийчук В.С., Обушак Н.Д. // Хим. гетероцикл. соед. 2009. Т. 45. С. 612–618. [Pokhodylo N.T., Matiychuk V.S., Obushak N.D. // Chem. Heterocycl. Comp. 2009. V. 45. P. 483–488.]
<https://doi.org/10.1007/s10593-009-0287-6>
8. Pokhodylo N.T., Teslenko Y.O., Matiychuk V.S., Obushak M.D. // Synthesis. 2009. V. 16. P. 2741–2748.
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1216875>
9. Pokhodylo, N.T., Matiychuk, V.S. // J. Heterocyclic Chem. 2010. V. 47. P. 415–420.
<https://doi.org/10.1002/jhet.321>
10. Chaban T.I., Ogurtsov V.V., Matiychuk V.S., Chaban I.G., Demchuk I.L., Nektegayev I.A. // Acta Chim. Slov. 2019. V. 66. P. 103–111.
<https://doi.org/10.17344/acsi.2018.4570>
11. Obushak M.D., Matiychuk V.S., Turytsya V.V. // Tetrahedron Lett. 2009. V. 50. P. 6112–6115.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.08.024>
12. Pokhodylo N.T., Teslenko Y.O., Matiychuk V.S., Obushak M.D. // Synthesis. 2009. V. 16. P. 2741–2748.
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1216875>
13. Tupys A., Kalemkiewicz J., Ostapiuk Y., Matiichuk V., Tymoshuk O., Woźnicka E., Byczyński Ł. // J. Therm. Anal. Calorim. 2017. V. 127. P. 2233–2242.
<https://doi.org/10.1007/s10973-016-5784-0>
14. Wala I. El-Sofany, Othman D.A.A., Mahran A.M., El-Manawaty A. May, Wael A. El-Sayed // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 393–402.
<https://doi.org/10.1134/S106816202003005X>
15. El-Helw E.A.E., Derbala H.A., El-Shahawi M.M., Salem M.S., Ali M.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 42–53.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019010047>
16. Cai M.G., Wu Y., Chang J. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016. V. 26. P. 2517–2520.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.089>
17. Ponnuchamy S., Kanchithalaivan S., Kumar R.R., Ali M.A., Choon T.S. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014. V. 24. P. 1089–1093.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.01.007>
18. Remon M. Zaki, Adel M. Kamal El-Dean, Shaban M. Radwan, Mahmoud A. Ammar // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 85–96.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020010148>
19. Safaa I. Elewa, Eman Mansour, Ibrahim F. Nassar, Amal A.I. Mekawey // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 382–392.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020030061>
20. Shi F., Li C., Xia M., Miao K., Zhao Y., Tu S., Zheng W., Zhang G., Ma N. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. V. 19. P. 5565–5568.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.046>
21. Sarigol D., Uzgoren-Baran A., Tel B.C., Somuncuoglu E.I., Kazkayasi I., Ozadali-Sari K., Unsal-Tan O., Okay G., Ertan M., Tozkoparan B. // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 2518–2528.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.049>
22. Pomel V., Klicic J., Covini D., Church D.D., Shaw J.P., Roulin K., Burgat-Charvillon F., Valognes D., Camps M., Chabert C., Gillieron C., Françon B., Perrin D., Leroy D., Gretener D., Nichols A., Vitte P.A., Carboni S., Rommel C., Schwarcz M.K., Rückle T. // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 3857–3871.
<https://doi.org/10.1021/jm0601598>
23. Li S.N., Xu Y.Y., Gao J.Y., Yin H.R., Zhang S.L., Li H.Q. // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 3221–3227.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.065>
24. Bataille C.J., Brennan M.B., Byrne S., Davies S.G., Durbin M., Fedorov O., Huber K.V., Jones A.M., Knapp S., Liu G., Nadali A., Quevedo C.E., Russell A.J., Walker R.G., Westwood R., Wynne G.M. // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 2657–2665.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.056>
25. Johnson S.L., Jung D., Forino M., Chen Y., Satterthwait A., Rozanov D.V., Strongin A.Y., Pellicchia M. // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 27–30.
<https://doi.org/10.1021/jm050892j>
26. Ding Y., Smith K.L., Varaprasad C.V., Chang E., Alexander J., Yao N. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007. V. 17. P. 841–845.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.08.104>
27. Xie Y., Liu Y., Gong G., Rinderspacher A., Deng S.X., Smith D.H., Toebben U., Tzilianos E., Branden L., Vidović D., Chung C., Schürer S., Tautz L., Landry D.W. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 2840–2844.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.079>
28. Stephen Kumar Celestina, Sundaram K., Ravi S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 405–415.
<https://doi.org/10.1134/S1068162019050066>
29. Open-access antimicrobial screening program, <https://www.co-add.org/>
30. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Joseph Mayo, Boyd M. // J. Nat. Cancer Inst. 1991. V. 83. P. 757–766.
<https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>
31. Boyd M.R., Paull K.D. // Drug Dev. Res. 1995. V. 34. P. 91–109.
<https://doi.org/10.1002/ddr.430340203>
32. Boyd M.R. // In: Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval / Ed. Teicher B.A. Humana Press: Totowa, NJ, USA, 1997. P. 23–42.
33. Shoemaker R.H. // Nat. Rev. Cancer. 2006. V. 6. P. 813–823.
<https://doi.org/10.1038/nrc1951>

Synthesis, Antimicrobial and Antitumor Properties of 5-Thiophen-2-Ylmethylene-2-Thioxothiazolidin-4-One Derivatives

V. Ya. Horishny* and V. S. Matiychuk**,#

#Phone: +38 (067) 675-16-83; e-mail: v_matiychuk@ukr.net

*Danylo Halatsky Lviv National Medical University, ul. Pekarskaya 69, Lviv, 79010 Ukraine

**Ivan Franko National University of Lviv, ul. Kirilla i Mefodiya 6, Lviv, 79005 Ukraine

By the reaction of thiophene-2-carbaldehyde with rhodanine derivatives was synthesized a combinatorial library of 5-thiophen-2-ylmethylene-2-thioxothiazolidin-4-ones. The prepared (4-oxo-5-thiophen-2-ylmethylene-2-thioxothiazolidin-3-yl)alkanecarboxylic acids were used to acylation of biogenic amine tryptamine and its derivatives. A number of new *N*-[2-(5-[*R*-1*H*-indol-3-yl)ethyl]-2-(4-oxo-5-thiophen-2-ylmethylene-2-thioxothiazolidin-3-yl)carboxamides were synthesized. The antimicrobial and antitumor properties of the obtained compounds were investigated. Compounds with high antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans* has been identified.

Keywords: thiophene, rhodanine, acylation, antimicrobial activity, antitumor activity



УДК 539.26:541.632:541.69

РЕГИОСЕЛЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И ХЕМОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩАЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЦИКЛИЧЕСКОЙ ГИДРОКСАМОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ DL-ВАЛИНА

© 2021 г. И. В. Выстороп*, Г. В. Шилов*, А. В. Черняк*, Е. Н. Климанова*, Т. Е. Сашенкова*, С. Г. Клочков**, М. Е. Неганова**, #, Ю. Р. Александрова**, У. Ю. Аллаярова*, Д. В. Мищенко*, ***

*ФГБУН “Институт проблем химической физики” РАН,
Россия, 142432 Черноголовка, просп. академика Семенова, 1

**ФГБУН “Институт физиологически активных веществ” РАН,
Россия, 142432 Черноголовка, Северный проезд, 1

*** Научно-образовательный центр “Медицинская химия” Московского государственного областного университета в г. Черноголовка, Россия, 141014 Мытищи, ул. Веры Волошиной, 24

Поступила в редакцию 10.07.2020 г.

После доработки 22.07.2020 г.

Принята к публикации 26.07.2020 г.

Реакция DL-валин-гидроксиаминовой кислоты с триацетонамином проходит как *N,N'*-региоселективная циклоконденсация с образованием (\pm)-1-гидрокси-3-изопропил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро[4,5]декан-2-она. Исследование антиметастатической и противоопухолевой активности полученной гидроксиаминовой кислоты *in vivo* методом комбинированной терапии с цитостатиком алкилирующего типа на модели экспериментальной перевиваемой меланомы В16 мышей показало способность данного соединения повышать чувствительность опухоли к действию известного противоопухолевого препарата циклофосфида, примененного в субтерапевтической дозе. Хемосенсибилизирующая активность гидроксиаминовой кислоты в комбинации с циклофосфидом привела к повышению противоопухолевого действия цитостатика почти в 2 раза, а также заметному снижению количества метастазов, что выражалось в увеличении индекса ингибирования метастазирования до 74%.

Ключевые слова: гидроксиаминовые кислоты, циклоконденсация, меланома В16, цитостатик, хемосенсибилизатор

DOI: 10.31857/S0132342321030179

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания — глобальная проблема современного общества, затрагивающая миллионы пациентов [1, 2]. На сегодняшний день злокачественные новообразования занимают второе место среди причин смертности, уступая лидирующую позицию лишь сердечно-сосудистым патологиям [3]. Так, согласно данным Всемирной организации здравоохранения, еже-

годный темп прироста онкозаболеваний составляет ~1.5%, при этом в 2018 г. было зарегистрировано более 9.6 млн смертельных случаев от онкопатологий.

Используемые в настоящее время противоопухолевые агенты характеризуются низким терапевтическим индексом и, как следствие, высоким токсическим действием не только на неопластические клетки, но и на здоровые клетки организма, что может быть связано с разнообразием патогенеза и этиологии опухолей, их развитием, симптоматикой и феноменом резистентности. Поэтому не вызывает сомнения актуальность поиска высокоэффективных малотоксичных онкопрепаратов с целью получения лекарственных средств нового поколения с различными механизмами действия.

Сокращения: ГК — гидроксиаминовая кислота; ИИМ — индекс ингибирования метастазирования; НЭП — неподеленная электронная пара; УПЖ — увеличение продолжительности жизни; DL-AlaГК — DL-аланин-гидроксиаминовая кислота; DL-ValГК — DL-валин-гидроксиаминовая кислота; GlyГК — глицин-гидроксиаминовая кислота; HDACs — гистоновые деацетилазы; LD — летальная доза; ТАА — триацетонамин.

Автор для связи: (тел.: +7 (962) 937-68-69; эл. почта: neganova83@mail.ru).

Одним из перспективных классов химических соединений с подтвержденным противоопухолевым потенциалом выступают гидроксамовые кислоты (ГК), которые обладают широким спектром биологической активности [4–6]. На сегодняшний день FDA одобрено использование трех представителей данного класса для лечения кожной и периферической Т-клеточной лимфомы и множественной миеломы [7]: вориностат (SAHA, Золинза) [8], панобиностат (Фаридак) [9] и белиностат (Белеодаг) [10], что наглядно подтверждает перспективность поиска антинеопластических агентов среди гидроксамовых кислот. Анализ современных тенденций в исследованиях противоопухолевых свойств соединений этого класса при терапии онкологических заболеваний показывает, что антинеопластический потенциал гидроксамовых кислот может реализовываться по нескольким направлениям: 1) использование монотерапии, нацеленной на эффективное ингибирование гистоновых деацетилаз (HDACs) [5, 11]; 2) создание на основе ГК полифункциональных препаратов с разными фармакофорными фрагментами, воздействующими одновременно на несколько различных звеньев патологии [12, 13]; 3) применение ГК в качестве хемосенсибилизаторов при комбинированной терапии с цитостатиками [14].

Ранее было показано, что реакции глицингидроксамовой (GlyГК) и ряда других DL- α -аминогидроксамовых кислот с ацетоном в избытке кетона осуществляются как региоселективные циклоконденсации N,N' -типа с образованием 2,2-диметил-3-гидроксиимидазолидин-4-она (**Ia**) и его 5-замещенных производных (**Ib–e**) соответственно с умеренными выходами 55–83% [15–17].

Аналогичным способом образуются спироциклические ГК (**II**) и (**III**) на основе реакции GlyГК и DL-аланингидроксамовой кислоты (DL-AlaГК) соответственно с триацетонамином (ТАА) в этаноле с высокими выходами (70–80%) [18].

Исследование хемосенсибилизирующей противолейкозной активности циклических ГК (**II**) и

(**III**) в комбинации с цитостатиками алкилирующего типа на модели лейкоза P388 показало способность кислот (**II**) и (**III**) усиливать действие цитостатиков, что привело к увеличению продолжительности жизни (УПЖ) животных экспериментальных групп на 30–50% [18].

В настоящей работе изучена возможность осуществления региоселективной реакции циклоконденсации пространственно затрудненной гидрофобной DL-валингидроксамовой кислоты (DL-ValГК) с ТАА с целью получения гомолога кислот (**II**) и (**III**). Для изучения взаимозависимости “структура–активность” в ряду производных 1-гидрокси-1,4,8-триазаспиро[4,5]декан-2-она проанализированы структурные особенности полученной спироциклической ГК (**IV**), а также исследованы ее спектральные данные, хемосенсибилизирующая и антиметастатическая активности в терапии экспериментальной перевиваемой меланомы В16 мышей *in vivo* с цитостатиком алкилирующего типа – циклофосфамидом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез и спектральные данные гидроксамовой кислоты (IV). Исследование реакции DL-ValГК с ТАА (схема 1) в мягких условиях (соотношение реагентов 1 : 1.3, кипячение в этаноле в течение 2 ч), аналогичных проведению реакции GlyГК и DL-AlaГК с ТАА, показало, что хотя реакция и приводит к образованию спироциклической гидроксамовой кислоты (**IV**), но исходная кислота DL-ValГК вступает в реакцию не полностью (<40%). Попытка изменения условий реакции путем увеличения продолжительности проведения реакции до 5 ч и применения 2-кратного избытка кетона приводит к почти полному расходованию DL-ValГК (до 95%). Однако реакция осложняется образованием олигомерных продуктов, что снижает выход целевого продукта (**IV**) (<45%).

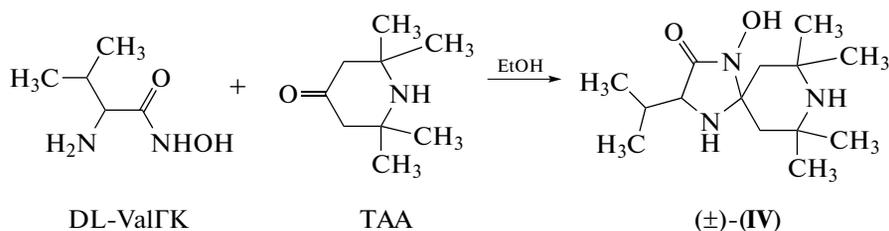


Схема 1. Синтез спироциклической гидроксамовой кислоты (IV).

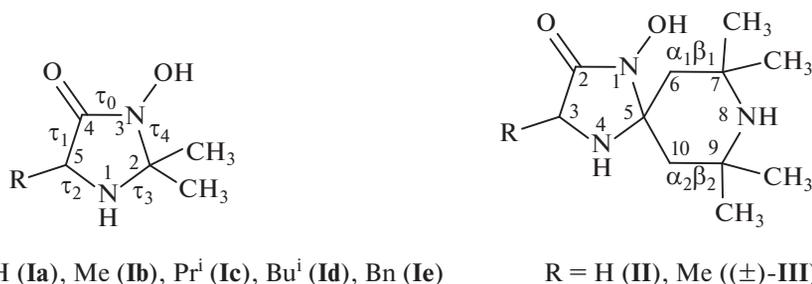


Рис. 1. 2,2-Диметил-3-гидроксиимидазолидин-4-он (**Ia**) и его 5-замещенные производные (**Ib–e**), спироциклические гидроксамовые кислоты (**II**) и (**III**).

Вероятно, причиной пониженной реакционной способности DL-ValГК служит увеличение пространственной затрудненности и понижение растворимости DL-ValГК по сравнению с GlyГК и DL-AlaГК. В условиях накопления в реакционной смеси побочного продукта – воды и отсутствия выпадения в виде осадка кислоты (**IV**) из реакционной среды это способствует смещению равновесия реакции в обратном направлении.

Поэтому были предложены более эффективные способы проведения реакции DL-ValГК с ТАА: 1) поэтапный способ – с добавлением новых порций ТАА к непрореагировавшей DL-ValГК (3–4 этапа); 2) способ дробной отгонки реакционной воды в виде тройной азеотропной смеси EtOH–бензол–H₂O с периодическим добавлением в реакционную среду абсолютированного бензола. В обоих случаях реакция проводится в мягких условиях и позволяет достичь приемлемого выхода продукта (**IV**) (64–70%).

Строение кислоты (**IV**) доказано методами масс-спектрологии высокого разрешения, ИК-, 1D- (¹H, ¹³C (с подавлением или без подавления ¹H-¹³C ССВ)) и 2D-спектрологии ЯМР (COSY ¹H-¹H и HSQC ¹H-¹³C) в растворах CDCl₃ и DMSO-*d*₆.

Уширенные полосы в области 2700–2200 см⁻¹ (ν_{max} = 2616 и 2490 см⁻¹) в ИК-спектрах (KBr) и положительные тест-реакции с FeCl₃ в MeOH подтверждают наличие OH-группы в кислоте (**IV**). Это исключает образование циклического гидроксамата (–CO–NH–OR) посредством возможной альтернативной циклоконденсации *N,O*-типа.

Согласно данным спектров ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР, кислота (**IV**) образует кристаллосольваты двух видов: 1) с MeCN и H₂O в мольном соотношении 2 : 1 : 1 соответственно (т. пл. 152–153°C (из MeCN), (**IVa**)); 2) с диоксаном в эквимольном соотношении (т. пл. 158–159°C (из диоксана), (**IVb**)), аналогично гомологам (**II**) (с MeCN в

соотношении 1 : 1) и (**III**) (с диоксаном в соотношении 2 : 1) [18].

Спектры ¹H-ЯМР обеих форм (**IVa, b**) в CDCl₃ в концентрации 10 мкМ почти идентичны и несут отличия, обусловленные присутствием сигналов сольватных растворителей δ_H 2.03 (MeCN) или δ_H 3.73 м.д. (диоксан).

Отнесение сигналов углеродов кислоты (**IV**) проведено анализом спектров HSQC ¹H-¹³C форм (**IVa**) в DMSO-*d*₆ и (**IVb**) в CDCl₃ (рис. 1). Отсутствии кросс-пиков сигналов углеродов групп NCN, β-CMe₂ и C=O с сигналами каких-либо протонов в спектрах HSQC ¹H-¹³C форм (**IVa, b**) подтверждает апротонный характер этих углеродов.

Химические сдвиги сигнала углерода NCN в спектрах ¹³C-ЯМР (δ_C 77.5 (DMSO-*d*₆, (**IVa**), 78.3 м.д. (CDCl₃, (**IVb**)), отвечающие тетраэдрическому характеру атома углерода, подтверждают спироциклическую структуру кислоты (**IV**), аналогично данным спектров для кислот (**II**) (δ_C 79.6, DMSO-*d*₆) и (**III**) (80.3, CD₃OD) [18]. С другой стороны, отсутствие сигналов тригонального углерода группы C=N в спектрах ¹³C-ЯМР (δ_C > 150 м.д.) [19] и наличие сигнала протона NH-группы имидазолидинового цикла в спектрах ¹H-ЯМР (δ_H 2.32 (DMSO-*d*₆, *c* 0.4 М, (**IVa**), 1.55 (CDCl₃, *c* 0.05 М, (**IVa, b**), 1.48 м.д. (CDCl₃, 0.25 М, (**IVb**)), аналогично данным спектров для гомологов кислот (**II**) (δ_H 3.10) и (**III**) (2.61 м.д., DMSO-*d*₆) [18], исключает структуру соответствующей ациклической азометиновой формы кислоты (**IV**) (HONH(C=O)CH(CHMe₂)N=R, где R – тетраметилпиперидиновый цикл.

Отсутствие сигналов азометиновой формы в спектрах ¹H- и ¹³C-ЯМР указывает на отсутствие медленной в шкале времени ЯМР кольчато-цепной таутомерии ГК (**IV**) в CDCl₃ и DMSO-*d*₆.

Отнесение сигнала протона NH-группы имидазолидинового цикла кислоты (**IV**) основано на сопоставлении данных спектров COSY ¹H-¹H

(наблюдаются кросс-пики и вицинальные КССВ протонов NH- и CHCO-групп) и HSQC ^1H - ^{13}C (отсутствуют кросс-пики сигнала протона NH-группы с сигналом какого-либо углерода) в растворах CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$. В спектре ^1H -ЯМР кислоты (IV) в $\text{DMSO}-d_6$ наблюдается дезэкранирующий эффект для NH-группы по сравнению со спектром в CDCl_3 .

Сигналы протонов метильных групп кислоты (IV) в спектрах ^1H -ЯМР в CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$ отнесены в соответствии со следующей зависимостью их химических сдвигов: $\delta_{\text{H}} (\text{Me}_A < \text{Me}_B < \text{Me}_C < \text{Me}_D)$. При этом наблюдается обратная последовательность величин химических сдвигов протонов ($\delta_{\text{H}} (\text{Me}_A, \text{Me}_B, 1.0\text{--}1.2) < \delta_{\text{H}} (\text{Me}_C, \text{Me}_D, 1.3\text{--}1.5 \text{ м.д.})$) и углеродов Me-групп ($\delta_{\text{C}} (\text{Me}_A, \text{Me}_B, \sim 35) > \delta_{\text{C}} (\text{Me}_C, \text{Me}_D, \sim 29 \text{ м.д.})$) пиперидинового цикла.

Известно, что сигналы ^{13}C аксиальных Me-групп резонируют в более сильном поле по сравнению с сигналами экваториальных Me-групп циклогексана (в конформации “кресло” на $\sim 4.5 \text{ м.д.}$) [20]. Это позволяет предположить для групп Me_C, Me_D и Me_A, Me_B кислоты (IV), соответственно, *a*- и *e*-ориентации при пиперидиновом цикле.

Отнесение сигналов углеродов α^1 - и α^2 -метиленовых групп пиперидинового цикла кислоты (IV) в растворах CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$ основано на следующей зависимости химических сдвигов этих сигналов: $\delta_{\alpha^2\text{-C}} (\sim 45 \text{ м.д.}) > \delta_{\alpha^1\text{-C}} (\sim 40 \text{ м.д.})$, аналогично сигналам кислоты (III) ($\delta_{\alpha^2\text{-C}} \sim 45.3 \text{ м.д.}, \delta_{\alpha^1\text{-C}} \sim 40.8 \text{ м.д.}$) в CD_3OD [18]. Для ахиральной кислоты (II) наблюдается изохронность сигналов углеродов метиленовых групп ($\delta_{\alpha^1\text{-C}}, \delta_{\alpha^2\text{-C}} 41.3 \text{ м.д.}, \text{DMSO}-d_6$) [18].

Углерод α_1 - CH_2 -группы пиперидинового цикла, вероятно, экранируется неподеленной электронной парой (НЭП) атома N1. Углероды метиленовых групп C6 и C7 находятся, соответственно, в *транс*- и *цис*-положениях к псевдо-*a*-ориентации N1N, а значит, соответственно, в *цис*- и *транс*-положениях к псевдо-*e* НЭП при атоме N1, т.е. атомы псевдо-*a*-C6 и псевдо-*e*-C7 соответствуют, вероятно, углеродам α_1 - CH_2 - и α_2 - CH_2 -групп.

Сигналы протонов АВ-систем α_1 - и α_2 -метиленовых групп пиперидинового цикла отнесены сопоставлением данных спектров COSY ^1H - ^1H и HSQC ^1H - ^{13}C . Наблюдается существенно большая разница относительного химического сдвига α_2 - CH_2 -группы ($\Delta\delta_{\text{AB}} 0.53\text{--}0.58 (\text{CDCl}_3), 0.17\text{--}0.20 \text{ м.д.} (\text{DMSO}-d_6)$) по сравнению с α_1 - CH_2 -группой ($\Delta\delta_{\text{AB}} 0.16\text{--}0.2 (\text{CDCl}_3), 0.05 \text{ м.д.} (\text{DMSO}-d_6)$) кислоты (IV). Аналогичное соотно-

шение $\Delta\delta_{\text{AB}}$ отмечается и для гомологов (II) (0.05) и (III) (0.25 и 0.07 м.д.) в $\text{DMSO}-d_6$ [18]. В растворе CDCl_3 кислоты (IV) это происходит в основном за счет дезэкранирования слабополюсного протона α_2 - H_B по сравнению с протоном α_1 - H_B ($\Delta\delta (\alpha_1, \alpha_2\text{-H}_B) 0.28 \text{ м.д.}$). В то же время сильнополюсные протоны α_2 - H_A и α_1 - H_B метиленовых групп показывают меньшее различие химических сдвигов их сигналов ($\Delta\delta (\alpha_1, \alpha_2\text{-H}_A) 0.09 \text{ м.д.}$). В растворе $\text{DMSO}-d_6$ наблюдается изохронность сигналов протонов α_1 - H_A и α_2 - H_A метиленовых групп кислоты (IV).

Сравнение величин $\Delta\delta_{\text{AB}}$ метиленовых групп кислоты (IV) указывает на большую конформационную подвижность α_1 - CH_2 -группы в процессе интерконверсии пиперидинового цикла, которая осуществляется, вероятно, по механизму осциллирующего псевдовращения [19].

Интересно, что конформационная подвижность пиперидинового цикла в кислоте (IV), как и в кислотах (II) и (III) [18], выше в биполярном апротонном растворителе $\text{DMSO}-d_6$, склонном к образованию ассоциатов с молекулами растворенного в нем вещества, по сравнению с малополярным CDCl_3 .

В спектрах ^1H -ЯМР обеих форм (IVa, b) в CDCl_3 наблюдается дальняя КССВ $^4J_{\text{H,H}} 1.6 \text{ Гц}$ (*c* 0.25 М), 2.0 Гц (*c* 0.05 М) между сильнополюсными протонами α_1 - H_A и α_2 - H_A метиленовых групп. Это возможно при экваториальной ориентации этих протонов в конформации “кресло” пиперидинового цикла, поскольку реализуется *транс*-W-конфигурация разделяющих их связей, тогда как для слабополюсных протонов α_1 - H_B и α_2 - H_B этих групп аксиальной ориентации реализуется *цис*-конфигурация разделяющих их связей, при которой не должно наблюдаться заметной $^4J_{\text{H,H}}$.

Приписывание сильнополюсным (H_A) и слабополюсным (H_B) протонам α -метиленовых групп пиперидинового цикла кислоты (IV) в спектрах ^1H -ЯМР в CDCl_3 , соответственно, экваториальной и аксиальной ориентаций подтверждается анализом спектров ^1H -ЯМР в CDCl_3 и $\text{DMSO}-d_6$ аналогичных циклических ГК [20], имеющих незамещенные α - и β -метиленовые группы пиперидинового цикла. Согласно характеру вицинальных взаимодействий протонов этих групп, для слабополюсных протонов α - H_B и β - H_B , в отличие от сильнополюсных протонов α - H_A и β - H_A , наблюдается большая КССВ ($^3J (\alpha\text{-H}_B, \beta\text{-H}_B) \geq 10 \text{ Гц}$), что возможно только для аксиальных протонов *транс*-ориентации в преимущественной конформации “кресло” пиперидинового цикла [21, 22].

Наблюдаемые в спектрах ^1H -ЯМР (**IVa, b**) КССВ протона группы $\text{C}=\text{O}$ с протонами $\text{C}(\text{H})\text{Me}_2$ ($^3J(\text{C}(\text{HCO}), \text{C}(\text{H})\text{Me}_2)$ 4.8–4.9 (CDCl_3), 6.3–6.5 Гц ($\text{DMSO}-d_6$)) и NH -групп ($^3J(\text{C}(\text{HCO}), \text{NH})$ 10.2–10.3 (c 0.05 M, CDCl_3), 9.9 (c 0.25 M, CDCl_3), 10.7 Гц ($\text{DMSO}-d_6$)) свидетельствует, соответственно, о взаимной *цис*- и *транс*-ориентации этих протонов, т.е. конформационной однородности имидазолидинового цикла в растворе сильно различающихся по полярности растворителей.

Острая токсичность гидроксамовой кислоты (IV) in vivo. При изучении острой токсичности на мышах-гибридах линии BDF_1 показано, что при однократном внутрибрюшинном введении соединения (**IV**) гибель животных отмечалась на 1-е и 2-е сутки наблюдения после инъекции раствора гидроксамовой кислоты в дозе 500–900 мг/кг. У выживших животных каких-либо клинических проявлений интоксикации и изменений в поведенческих реакциях не наблюдалось до конца опыта. На рис. 2 представлена кривая нарастания токсичности гидроксамовой кислоты (**IV**) по мере увеличения дозы, исходя из которой была определена величина $\text{LD}_{50} = 730.4 \pm 32.4$ мг/кг, а также были рассчитаны токсические дозы: $\text{LD}_{16} = 639.7$; $\text{LD}_{84} = 833.9$ и $\text{LD}_{100} = 885.7$ мг/кг.

Результаты исследования острой токсичности позволяют отнести соединение (**IV**) к III классу токсичности, т.е. данная гидроксамовая кислота — умеренно токсичное соединение в соответствии с ГОСТ 12.1.007–76.

Хемосенсибилизирующая противоопухолевая активность кислоты (IV) in vivo. Для оценки хемосенсибилизирующего противоопухолевого и антиметастатического действия гидроксамовой кислоты (**IV**) на модели экспериментальной перевиваемой меланомы B16 на самцах мышей-гибридов линии BDF_1 для внутрибрюшинного введения была взята одна третья часть от величины

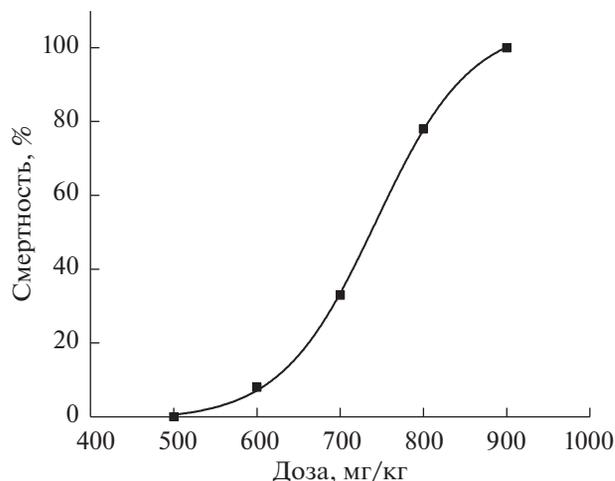


Рис. 2. Кривая зависимости “доза–эффект” для определения параметров острой токсичности после однократного внутрибрюшинного введения раствора гидроксамовой кислоты (**IV**) мышам-гибридам линии BDF_1 .

LD_{50} , которая составила 233 мг/кг. При монотерапии гидроксамовой кислотой и цитостатиком было выявлено достоверное увеличение индекса ингибирования метастазирования (ИИМ) — до 12.82 и 38.46% соответственно. При применении комбинированной химиотерапии циклофосфамидом с исследуемым соединением (**IV**) наблюдалось двукратное увеличение данного показателя по сравнению с группой циклофосфамид (до 74.36%) и появление эффекта усиления противоопухолевого действия известного цитостатика, что может свидетельствовать о проявлении данной ГК адьювантной способности. Терапия меланомы B16 низкотоксичной кислотой (**IV**) в комбинации с циклофосфамидом позволила достичь торможения роста опухоли животных экспериментальных групп до 31.56%, что более чем в 1.5 раза выше данного показателя при монотера-

Таблица 1. Хемосенсибилизирующий эффект кислоты (**IV**) на модели экспериментальной перевиваемой меланомы B16 мышей

| Препарат | Разовая доза, мг/кг | Режим введения, сут | Среднее количество метастаз | Индекс ингибирования метастазирования, % | Средний вес опухоли, г | Торможение роста опухоли, % |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|--|------------------------|-----------------------------|
| Циклофосфамид (IV) | 20 | 2, 7 | $6.00 \pm 1.39^*$ | 38.46 | 7.95 ± 1.34 | 20.26 |
| Циклофосфамид + (IV) | 233 | 2–9 | 8.50 ± 1.70 | 12.82 | 9.71 ± 0.59 | 2.62 |
| Циклофосфамид + (IV) | 20 + 233 | 2, 7 + 2–9 | $2.50 \pm 1.11^{***}$ | 74.36 | $6.83 \pm 1.22^{**}$ | 31.56 |
| Контроль | — | — | 9.75 ± 2.05 | — | 9.97 ± 1.34 | — |

* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$ (достоверность отличий относительно контроля).

пии циклофосфамидом (табл. 1). Ранее нами также было показано усиление противолейкозного действия циклофосфамида в комбинированной терапии лимфолейкоза P388, которое выражалось в увеличении выживаемости животных до 38% и увеличении средней продолжительности жизни невылеченных животных почти в 2 раза по сравнению с монотерапией данным цитостатиком [23].

Введение разветвленной изопропильной группы при имидазолидиновом цикле приводит к значительному повышению хемосенсибилизирующей способности кислоты валинового ряда (IV) по сравнению с ее гомологами глицинового (II) и аланинового ряда (III), активность которых была описана нами ранее [21]. Наибольшее отличие в хемосенсибилизирующей активности наблюдается при совместном действии кислоты (IV) и циклофосфамида (ИИМ ~74%, УПЖ >280% [23]).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез гидроксамовой кислоты (IV). ИК-спектры образцов соединений, запрессованных в таблетки с KBr, регистрировали на спектрометре Specord-82M (Analytik Jena, Германия) в области 400–4000 см⁻¹. Масс-спектры высокого разрешения снимали на квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре Sciex QStar (SCIEX, США) с ортогональным вводом ионов и на масс-спектрометре Thermo Fisher Exactive (Thermo Fisher Scientific, США) с источником ионизации электро-распылением и масс-анализатором Orbitrap. Для ионизации были взяты растворы исходных веществ в ацетонитриле с концентрацией ~10 мкМ. При расчете молекулярных масс использовали следующие величины атомных масс: Н – 1.007825, О – 15.994915, С – 12.000000, N – 14.003074. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance III-500 (Bruker, Германия) с частотой 500.20 МГц (¹Н) и 125.775 МГц (¹³С). Химические сдвиги ядер ¹Н и ¹³С определяли относительно остаточных сигналов растворителя (δ, м.д., 2.50 и 39.52 для DMSO-*d*₆, 7.26 и 77.16 для CDCl₃ соответственно). Температуры плавления определяли на микронагревательном столике Boetius RNMK (Boetius, Германия). Элементный анализ (С, Н, N) выполняли на микроанализаторе Vario MicroCube Elementar (Elementar, Германия). DL-ValГК ((*R,S*)-2-амино-3-метилбутирогидроксамовая кислота, (*R,S*)-*N*-гидроксиамид-2-амино-3-метилмасляной кислоты) синтезировали по известной методике [24].

1-Гидрокси-3-изопропил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триазаспиро[4,5]декан-2-он (IV). Масс-

спектр (ESI), *m/z*: 270.2192 (M + H)⁺. C₁₄H₂₇N₃O₂. Вычислено: 270.2176 (M + H)⁺.

Гидроксамовая кислота (IVa). Спектр ¹Н-ЯМР (CDCl₃, *c* 0.05 М, δ, м.д., *J*, Гц): 0.96 (д, 3Н, СНMe_A, ³*J* 6.9), 1.06 (д, 3Н, СНMe_B, ³*J* 6.9), 1.20 (с, 3Н, β-Me_A), 1.23 (с, 3Н, β-Me_B), 1.44 (с, 3Н, β-Me_C), 1.46 (с, 3Н, β-Me_D), 1.46 (д.д, 1Н, α₂-H_A, ²*J* 13.9, ⁴*J*_{α1-HA} 2.0), 1.55 (д.д, 2Н, NH + α₁-H_A, *J* 13.6, *J* 2.0), 1.71 (д, 1Н, α₁-H_B, ²*J* 13.6), 1.99 (д, 1Н, α₂-H_B, ²*J* 13.9), 2.03 (с, 1.5 Н, MeCN), 2.10 (д. гепт, 1Н, СНMe₂, ³*J*_{Me} 6.9, ³*J*_{CHCO} 4.8), 3.33 (д.д, 1Н, CHCO, ³*J*_{NH} 10.2, ³*J*_{CHMe2} 4.8), 4.96 (уш. с, 2Н, 0.5H₂O + NOH).

Спектр ¹Н-ЯМР (DMSO-*d*₆, *c* 0.4 М, δ, м.д., *J*, Гц): 0.93 (д, 3Н, СНMe_A, ³*J* 6.6), 1.02 (д, 3Н, СНMe_B, ³*J* 6.7), 1.05 (с, 3Н, β-Me_A), 1.06 (с, 3Н, β-Me_B), 1.34 (с, 3Н, β-Me_C), 1.35 (с, 3Н, β-Me_D), 1.42 (уш. д, 2Н, α₁-H_A + α₂-H_A, ²*J* 13.3), 1.47 (д, 1Н, α₁-H_B, ²*J* 13.3), 1.62 (д.д, 1Н, α₂-H_B, ²*J* 13.5, *J* 2.4), 1.90 (д. гепт, 1Н, СНMe₂, ³*J*_{Me} 6.9, ³*J*_{CHCO} 6.5), 2.08 (с, 1.5Н, 0.5 MeCN), 2.32 (уш. д, 1Н, NH, ³*J*_{CHCO} 10.7), 3.07 (д.д, 1Н, CHCO, ³*J*_{NH} 10.7, ³*J*_{CHMe2} 6.3), 3.71 (уш. с, H₂O + NOH).

Спектр ¹³С-ЯМР (DMSO-*d*₆, *c* 0.4 М, δ, м.д., *J*, Гц): 1.42 (к, 0.5С, MeCN, ¹*J* 135.8), 18.67 (к.м, 1С, СНMe_A, ¹*J* 125.8), 18.95 (к.м, 1С, СНMe_B, ¹*J* 125.8), 29.15 (к.м, 1С, β-Me, ¹*J* 125.8), 29.27 (д.м, 1С, СНMe₂, ¹*J* 127.0), 29.34 (к.м, 1С, β-Me, ¹*J* 125.8), 35.25 (к.м, 1С, β-Me, ¹*J* 125.8), 35.35 (к.м, 1С, β-Me, ¹*J* 125.8), 39.69 (т, 1С, α₁-CH₂, ¹*J* 127.0), 44.19 (т, 1С, α₂-CH₂, ¹*J* 127.0), 50.11 (м, 1С, β-CMe₂), 50.20 (м, 1С, β-CMe₂), 59.88 (д, 1С, CHCO, ¹*J* 139.6), 77.45 (м, 1С, NCN), 118.06 (к, 0.5С, MeCN, ²*J* 10.1), 171.27 (д.д, 1С, C=O, *J* 3.8, *J* 2.5).

Гидроксамовая кислота (IVb). Спектр ¹Н-ЯМР (CDCl₃, *c* 0.05 М, δ, м.д., ³*J*, Гц): 0.97 (д, 3Н, СНMe_A, ³*J* 6.9), 1.07 (д, 3Н, СНMe_B, ³*J* 6.9), 1.20 (с, 3Н, β-Me_A), 1.23 (с, 3Н, β-Me_B), 1.44 (с, 3Н, β-Me_C), 1.46 (с, 3Н, β-Me_D), 1.47 (д.д, 1Н, α₂-H_A, ²*J* 13.9, ⁴*J*_{α2-HA} 2.0), 1.55 (д.д, 2Н, NH + α₁-H_A, *J* 13.4, *J* 2.0), 1.69 (д, 1Н, α₁-H_B, ²*J* 13.7), 1.97 (д, 1Н, α₂-H_B, ²*J* 14.0), 2.12 (д. гепт, 1Н, СНMe₂, ³*J*_{Me} 6.9, ³*J*_{CHCO} 4.9), 3.35 (д.д, 1Н, CHCO, ³*J*_{NH} 10.3, ³*J*_{CHMe2} 4.9), 3.73 (с, 8Н, диоксан).

Спектр ¹Н-ЯМР (CDCl₃, *c* 0.25 М, δ, м.д., ³*J*, Гц): 0.88 (д, 3Н, СНMe_A, ³*J* 6.9), 0.99 (д, 3Н, СНMe_B, ³*J* 6.9), 1.15 (с, 3Н, β-Me_A), 1.17 (с, 3Н, β-Me_B), 1.38 (д.д, 1Н, α₂-H_A, ²*J* 13.9, ⁴*J*_{α2-HA} 1.6), 1.39 (с, 3Н, β-Me_C),

1.41 (с, 3H, β -Me_D), 1.48 (д.д, 2H, NH + α_1 -H_A, J 13.5, J 1.6), 1.68 (д, 1H, α_1 -H_B, 2J 13.5), 1.96 (д, 1H, α_2 -H_B, 2J 13.9), 2.04 (д. гепт, 1H, CHMe₂, $^3J_{Me}$ 6.9, $^3J_{CHCO}$ 4.8), 3.24 (д.д, 1H, CHCO, $^3J_{NH}$ 9.9, $^3J_{CHMe_2}$ 4.8), 3.65 (с, 8H, диоксан), 6.06 (уш.с, 1H, NOH).

Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl₃, с 0.25 М, δ , м.д., 3J , Гц): 17.66 (1C, CHMe_A), 18.88 (1C, CHMe_B), 28.46 (1C, β -Me_D), 28.74 (1C, β -Me_C), 28.94 (1C, CHMe₂), 35.04 (1C, β -Me_B), 35.23 (1C, β -Me_A), 40.68 (1C, α_1 -CH₂), 45.63 (1C, α_2 -CH₂), 51.15 (2C, β -CMe₂), 60.71 (1C, CHCO), 67.07 (4C, диоксан), 78.34 (1C, NCN), 170.91 (1C, C=O).

Острая токсичность гидроксамовой кислоты (IV). Острую токсичность (LD₅₀) определяли на мышах-гибридах BDF₁, полученных из УНУ Питомник и виварий ФГБУН “Институт проблем химической физики” РАН, при однократном внутрибрюшинном введении водных растворов кислоты (IV) по методу, описанному в работе [25]. Исследования острой токсичности соединения (IV) проводили в соответствии с ГОСТ ISO 10993-11-2011. В качестве тест-объекта использовали самцов мышей-гибридов линии BDF₁ весом 21–24 г ($n = 30$). Животных содержали в соответствии с методическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных в вивариях со свободным доступом к воде и пище. В каждую опытную группу рандомизированно распределяли по шесть особей с использованием в качестве основного критерия массу тела так, чтобы различия в данном параметре между особями не превышали 20%. Соединения вводили животным однократно внутрибрюшинно в виде водного раствора в диапазоне доз 500–900 мг/кг массы тела животного. Для учета гибели и оценки общего клинического состояния мышей наблюдения за животными проводили непрерывно в течение первых 30 мин после введения вещества, затем с интервалом 1 ч в течение 4 ч и далее ежедневно один раз в день. Общий срок наблюдения составил 14 сут. Для определения токсических доз строили кривую нарастания токсичности по мере увеличения дозы. Расчет доз LD₁₆, LD₅₀, LD₈₄ и LD₁₀₀ проводили с использованием метода пробит-анализа.

Хемосенсибилизирующая активность гидроксамовой кислоты (IV). Исследование хемосенсибилизирующей активности гидроксамовой кислоты (IV) проводили на модели экспериментальной перевиваемой меланомы B16 на самцах мышей-гибридов линии BDF₁ весом 22–24 г ($n = 32$), полученных из УНУ Питомник и виварий ФГБУН “Институт проблем химической физики” РАН. Мышей содержали в клетках со свободным доступом к воде и пище. Опухоли трансплантировали

подкожно (инокулум измельченной опухолевой ткани в изотоническом растворе NaCl 1 : 5 в объеме 0.2 мл). Противоопухолевый цитостатик циклофосфамид (в субтерапевтической дозе) и соединение (IV) вводили в виде водных растворов внутрибрюшинно. Дозы и режимы введения (сутки после трансплантации опухоли) указаны в табл. 1. Отдельная группа животных-опухолосителей, получавшая вместо инъекций препаратов растворитель, служила контролем. Каждая группа содержала восемь мышей. Наблюдение за животными проводили ежедневно в течение 24 сут, после чего мышей выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков, извлекали внутренние органы, проводили взвешивание опухоли и подсчет метастазов в легких. Антиметастатическую активность соединений определяли по изменению индекса ингибирования метастазирования (ИИМ) по формуле:

$$\text{ИИМ}(\%) = \frac{((A_k \times B_k) - (A_o \times B_o))}{(A_k \times B_k)} \times 100,$$

где A_o и A_k – частота метастазирования в опытной и контрольной группах соответственно; B_o и B_k – среднее число метастазов в опытной и контрольной группах животных соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было показано, что реакция DL-валингидроксамовой кислоты с триацетонамином проходит как N,N' -региоселективная циклоконденсация с образованием (\pm)-1-гидрокси-3-изопропил-7,7,9,9-тетраметил-1,4,8-триаза Spiro[4,5]декан-2-она. В ходе исследования антиметастатической и противоопухолевой активности синтезированной циклической гидроксамовой кислоты (IV) была обнаружена ее способность повышать чувствительность экспериментальной перевиваемой меланомы B16 мышей к действию циклофосфамида (известного цитостатика алкилирующего действия, использованного в субтерапевтической дозе), проявляя тем самым хемосенсибилизирующие свойства. Было показано значительное снижение количества метастазов, а также торможение роста опухоли у животных экспериментальной группы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности синтеза циклических гидроксамовых кислот на основе DL-валина в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Аналитического центра коллективного пользования ФГБУН “Институт проблем химической физики” РАН.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-10195) и в рамках государственного задания № АААА-А19-119071890015-6.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей в качестве объектов.

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с решениями Комиссий по биоэтике ФГБУН «Институт проблем химической физики» РАН и ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torre L.A., Bray F, Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2015. V. 65. P. 87–108.
<https://doi.org/10.3322/caac.21262>
2. Torre L.A., Siegel R.L., Jemal A. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 893. P. 1–19.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_1
3. Harding M.C., Sloan C.D., Merrill R.M., Harding T.M., Thacker B.J., Thacker E.L. // *Prev. Chronic Dis.* 2018. V. 15. P. 180151.
<https://doi.org/10.5888/pcd15.180151external icon>
4. Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D. // *Med. Res. Rev.* 2012. V. 32. P. 1–165.
<https://doi.org/10.1002/med.20200>
5. Manal M., Chandrasekar M.J.N., Gomathi Priya J., Nanjan M.J. // *Bioorg. Chem.* 2016. V. 67. P. 18–42.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.05.005>
6. Вартамян А.А., Хоченков Д.А., Хоченкова Ю.А., Мачкова Ю.С., Хачатрян Д.С., Колотаев А.В., Балаев А.Н., Охманович К.А., Осипов В.Н. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 207–219. [Vartanyan A.A., Khochenkov D.A., Khochenkova Yu.A., Markova Yu.S., Khachatryan D.S., Korotaev A.V., Balaev A.N., Okhmanovich K.A., Osipov V.N. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 252–263.]
<https://doi.org/10.1134/S106816202002017X>
7. Shah R.R. // *Drug Saf.* 2019. V. 42. P. 235–245.
8. Duvi M., Talpur R., Ni X., Zhang Ch., Hazarika P., Kelly C., Chiao J.H., Reilly J.F., Ricker J.L., Richon V.M., Frankel S.R. // *Blood.* 2007. V. 109. P. 31–39.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-025999>
9. Atadja P. // *Cancer Lett.* 2009. V. 280. P. 233–241.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.019>
10. Sawas A., Radeski D., O'Connor O.A. // *Ther. Adv. Hematol.* 2015. V. 6. P. 202–208.
<https://doi.org/10.1177/2040620715592567>
11. Qin H.-T., Li H.-Q., Liu F. // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2016. V. 27. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1276565>
12. Rajulu G.G., Naik H.S.B., Viswanadhan A., Thiruvengadam J., Rajesh K., Ganesh S., Jagadheshan H., Kesavan P.K. // *Chem. Pharm. Bull.* 2014. V. 62. P. 168–175.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c13-00797>
13. Zhang X., Zhang J., Tong L., Luo Yu., Su M., Zang Y., Li J., Lu W., Chen Y. // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21. P. 3240–3244.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.049>
14. Rikiishi H., Shinohara F., Sato T., Sato Y., Suzuki M., Echigo S. // *Int. J. Oncol.* 2007. V. 30. P. 1181–1188.
15. Vystorop I.V., Lyssenko K.A., Kostyanovsky R.G. // *Mendeleev Commun.* 2002. V. 12. P. 85–87.
<https://doi.org/10.1070/MC2002v012n03ABEH001603>
16. Vystorop I.V., Aliev Z.G., Andreeva N.Yu., Atovmyan L.O., Fedorov B.S. // *Russ. Chem. Bull.*, 2000. V. 49. P. 182–183.
<https://doi.org/10.1070/MC2002v012n03ABEH001603>
17. Vystorop I.V., Nelyubina Yu.V., Voznesensky V.N., Sun W.-H., Lodygina V.P., Lyssenko K.A., Kostyanovsky R.G. // *Mendeleev Commun.* 2010. V. 20. P. 106–108.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2010.03.014>
18. Vystorop I.V., Konovalova N.P., Nelyubina Yu.V., Varfolomeev V.N., Fedorov B.S., Sashenkova T.E., Berseneva E.N., Lyssenko K.A., Kostyanovsky R.G. // *Russ. Chem. Bull.* 2010. V. 59. P. 127–135.
<https://doi.org/10.1007/s11172-010-0055-x>
19. Hogradi M. // *Akademiai Kiado, Budapest, chapter 1.2.3, 1981.*
20. Williams D.H., Fleming I. // *Stereochemistry. Basic Concept and Applications / Akademiai Kiado, Budapest, chapter 1.2.3, 1981.*
21. Vystorop I.V., Konovalova N.P., Nelyubina Yu.V., Chernyak A.V., Sashenkova T.E., Klimanova E.N., Utiyshchev A.N., Fedorov B.S., Shilov G.V., Kostyanovsky R.G. // *Russ. Chem. Bull.* 2013. V. 62. P. 1272–1281.
<https://doi.org/10.1007/s11172-013-0176-0>
22. Vystorop I.V., Konovalova N.P., Sashenkova T.E., Berseneva E.N., Chernyak A.V., Fedorov B.S., Kostyanovsky R.G. // *Mendeleev Commun.* 2011. V. 21. P. 239–241.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2011.09.002>
23. Mishchenko D.V., Neganova M.E., Klimanova E. N., Sashenkova T. E., Klochkov S.G., Shevtsova E.F., Vystorop I.V., Tarasov V.V., Chubarev V.N., Samsonova A.N., Ashraf G.Md., Barreto G., Yarla N.S., Aliev G. // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2018. V. 18. P. 365–371.
<https://doi.org/10.2174/1568009617666170623104030>
24. Gunningham K.G., Newbold G.T., Spring F.S., Stark J. // *Chem. Soc.* 1949. P. 2091.
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

Regioselective Synthesis, Structure and Chemosensitizing Antitumor Activity of Cyclic Hydroxamic Acid Based on DL-Valine

I. V. Vystorop*, G. V. Shilov*, A. V. Chernyak*, E. N. Klimanova*, T. E. Sashenkova*, S. G. Klochkov**, M. E. Neganova**.#, Yu. R. Aleksandrova**, U. Yu. Allayarova*, and D. V. Mishchenko*, ***

Phone: +7 (962) 937-68-69; e-mail: neganova83@mail.ru

*Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, prosp. acad. Semenova 1, Chernogolovka, 142432 Russia

**Institute of Physiologically Active Compounds of Russian Academy of Sciences, Severniy proezd 1, Chernogolovka, 142432 Russia

***Scientific and Educational Center "Medical Chemistry" of Moscow Region State University in Chernogolovka, ul. Very Voloshinoy 24, Mytishi, 141014 Russia

The reaction of DL-valine hydroxamic acid with triacetonamine passes as N,N' -regioselective cyclocondensation to form (\pm)-1-hydroxy-3-isopropyl-7,7,9,9-tetramethyl-1,4,8-triazaspiro[4,5]decan-2-one. *In vivo* study of chemosensitizing antimetastatic and antitumor activity of the obtained hydroxamic acid by the combination therapy with cytostatic of alkylating type in the experimental transplanted tumor models of mouse melanoma B16 showed the ability of this compound to increase the sensitivity of the tumor to the action of the well-known antitumor drug cyclophosphamide applied at sub-therapeutic dose. Chemosensitizing activity of hydroxamic acid in combination with the cyclophosphamide allowed us to achieve an increase the antitumor activity of cytostatic by almost two times, as well as a noticeable decrease in the number of metastases, which is expressed in an increase in the metastasis inhibition index to 74%.

Keywords: hydroxamic acids, cyclocondensation, melanoma B16, cytostatics, chemosensitizers



ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИПСИНА С ИОНООБМЕННЫМИ ВОЛОКНАМИ И ХИТОЗАНОМ

© 2021 г. С. М. Панкова*, Ф. А. Сакибаев*, М. Г. Холявка*, #,
Ю. М. Вышкворкина**, А. Н. Лукин*, В. Г. Артюхов*

*Воронежский государственный университет, Россия, 394018 Воронеж, Университетская площадь, 1

**Московский физико-технический институт, Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

Поступила в редакцию 17.06.2020 г.

После доработки 28.06.2020 г.

Принята к публикации 29.06.2020 г.

Изучена локализация заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков в молекуле трипсина и определено процентное соотношение аминокислот разных типов на поверхности глобулы фермента. Показано, что заряженные и гидрофобные аминокислотные остатки распределены по поверхности белка неравномерно, образуя участки локального скопления. Выявлено, что перспективными носителями для иммобилизации трипсина выступают ионообменные волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1 и хитозан, поскольку сорбция на них позволила сохранить, соответственно, 54, 58 и 65% каталитической активности нативного фермента в растворе, измеренной по скорости гидролиза бычьего сывороточного альбумина. Проанализированы ИК-спектры свободного (нативного) фермента и иммобилизованного на полимерных носителях. Установлено, что при адсорбции трипсина на волокнах ВИОН преобладали электростатические взаимодействия и водородные связи. Карбоксильные группы ВИОН КН-1 взаимодействовали с положительно заряженными участками молекулы, содержащими в своем составе His, Lys и Arg. Большое количество аминокислотных групп ВИОН АН-1 и хитозана создавали избыточный положительный заряд, благодаря которому происходило связывание с отрицательно заряженными остатками Asp и Glu. Однако при адсорбции трипсина на хитозане ключевыми стали гидрофобные взаимодействия, в которых принимали участие остатки Gly, Ala, Tyr, Val, Phe, Pro и Leu.

Ключевые слова: трипсин, адсорбция, анионообменное волокно ВИОН АН-1, катионообменное волокно ВИОН КН-1, хитозан

DOI: 10.31857/S0132342321030143

ВВЕДЕНИЕ

Субстратная специфичность протеаз определяется как строением их активного центра, так и размером молекулы гидролизуемого субстрата, а также аминокислотами, участвующими в образовании расщепляемой пептидной связи в белке [1].

Трипсин (КФ 3.4.21.4) — фермент семейства сериновых протеиназ, обладающий эстеразной активностью, гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и лизина и играет важную роль в ряде биологических процессов, включая пищеварение, активацию зимогенов химотрипсина и других ферментов. Молекулярная масса трипсина, выделенного из разных источников, составляет 23–24 кДа [2–4], $K_m = 0.240–0.485$ мМ [5]. Оптимум каталитической активности наблюдается

при рН 8.0 и 37°C [6]. Изоэлектрическая точка трипсина (pI) составляет 10.1–10.5 [7].

Молекула трипсина быка состоит из 223 а.о., образующих одну полипептидную цепь, и содержит шесть дисульфидных связей. Каталитически значимые аминокислотные остатки находятся между двухцепочечными доменами β -баррелей, упакованными друг против друга. Активный центр трипсина состоит из серина, гистидина и аспарагина [8]. При гидролизе белка Ser195 действует как нуклеофил и продуцирует промежуточный ацил-фермент с субстратом, His57 вступает в реакцию как основание, Asp102 стабилизирует таутомерное равновесие His57 и обеспечивает компенсацию возникновения положительного заряда [9].

Трипсин обнаружен у всех позвоночных животных и человека. Трипсин и трипсиноподобные ферменты — популярные объекты исследования из-за их центральной роли в гидролизе белка в желудочно-кишечном тракте, а также в таких

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин.

Автор для связи: (тел.: +7 (473) 220-85-86; эл. почта: holyavka@rambler.ru).

важных физиологических процессах, как свертывание крови, фибринолиз, апоптоз и иммунный ответ [10].

Трипсин – широко используемый протеолитический фермент, применяемый в медицине для ускоренного восстановления после хирургических и ортопедических травм в качестве противовоспалительного, противоотечного, фибринолитического, антиоксидантного и противоинфекционного средства. Трипсин способствует снятию признаков и симптомов воспаления, возникающих вследствие повреждения тканей, и облегчает процесс их восстановления [11].

В качестве альтернативы трипсину быка был предложен трипсин тихоокеанской трески (*Pacific cod*). Фермент рыб выступает антипатогенным агентом. В исследованиях *in vitro* трипсин атлантической трески (*Gadus morhua*) показал высокую эффективность против вируса простого герпеса 1-го типа (HSV-1) и респираторно-синцитиального вируса (RSV) – двух наиболее распространенных патогенных вирусов в инфекциях верхних дыхательных путей. Синергический эффект трипсина атлантической трески и антибиотиков используют для профилактики, ингибирования и удаления бактериальных биопленок у пациентов с рецидивирующими и нозокомиальными (внутрибольничными) инфекциями [12].

Несмотря на значительное число работ, посвященных получению биопрепаратов с протеолитической активностью, в клиническую практику из них введены единицы, т.к. использование свободных (водорастворимых) форм ферментов накладывает ряд ограничений: невозможность их повторного использования и быстрого выведения из области реакции, низкая резистентность к инактивирующим факторам [13]. Известен целый ряд заболеваний, связанных с отсутствием или изменением активности того или иного фермента из-за каких-либо генетических эффектов или тканевых нарушений [14, 15]. На протекание подобных расстройств организма можно влиять путем введения больному растворимого фермента, но при этом, с высокой долей вероятности, возникает аллергическая реакция, которая сама по себе может привести к летальному исходу. Кроме того, растворимый фермент зачастую неустойчив и быстро выводится из организма с помощью иммунной системы. Эти недостатки удается преодолевать путем иммобилизации фермента, препятствующей его взаимодействию с иммунной системой, а также стабилизирующей его пространственную структуру. Протеазы, иммобилизованные на волокнистых материалах, применяют для эффективного лечения ран, язв, ожогов, а их белковые ингибиторы – в заместительной терапии для лечения панкреатитов. Достаточно перспективными в

области клинического применения считаются препараты иммобилизованных протеаз [16, 17].

Использование иммобилизованного трипсина позволяет в 2–3 раза сократить сроки дооперативного лечения, иммобилизованные формы трипсина входят в состав мазей для очищения раневых поверхностей. Препараты иммобилизованного трипсина применяют в виде аппликаций и дренажей в хирургии, в основном при гнойных раневых и ожоговых поражениях, сопровождающихся некрозом тканей. Их готовят в форме мазей на основе кремнегеля, в виде пленок на основе гидратцеллюлозной или нейлоновой мембран и в форме композиционных препаратов “пленка с носителем” [18–21].

Использование метода адсорбционной иммобилизации в наибольшей степени (по сравнению с другими методами иммобилизации) способствует сохранению нативной структуры молекул и высокого уровня их каталитической активности за счет отсутствия химической модификации фермента [22]. При этом обеспечивается большая конформационная подвижность по сравнению с ковалентной иммобилизацией за счет реализации слабых связей и взаимодействий. В ряде исследований показано увеличение (относительно нативного фермента) стабильности трипсина, иммобилизованного на гранулах целита [23], полиэтилентерефталатных волокнах [24], полиэтиленовых волокнах [25], полимерных мембранах [26], карбонатных микрочастицах [27], в геле арабиногалактана [28], на матрице пищевого кислоторастворимого среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозана [29, 30].

В настоящее время в исследовании механизмов адсорбции ферментов на твердых носителях путем моделирования используются методы молекулярного докинга и молекулярной динамики [31]. Эти модели могут быть экспериментально подтверждены методом ИК-спектроскопии [32, 33], который обладает высокой чувствительностью к химическому составу и пространственной ориентации молекул и выступает одним из классических методов определения их структуры. ИК-спектроскопия служит ценным инструментом для изучения структуры белка [34–37], молекулярных механизмов белковых реакций [38, 39], процессов сворачивания и разворачивания молекул белка [40, 41]. Анализ частот и интенсивностей полос поглощения и линий колебаний амидной группы, главным образом колебаний полос Амид I и Амид II, широко используется для установления конформационной структуры пептидной цепи [42]. ИК-спектроскопия позволяет получать сведения о вторичной структуре белков (соотношении α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных структур) [43, 44].

Таблица 1. Абсолютное и относительное количество аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина

| Характеристика остатков | Абсолютное количество | Относительное количество, % |
|--|-----------------------|-----------------------------|
| Гидрофобные | 26 | 30.5 |
| Положительно заряженные (при pH 7.0) | 12 | 14.0 |
| Отрицательно заряженные (при pH 7.0) | 4 | 5.0 |
| Незаряженные (заряды скомпенсированы при pH 7.0) | 43 | 50.5 |

Целью настоящей работы стало изучение процесса взаимодействия трипсина с ионообменными волокнами и хитозаном с использованием методов компьютерного моделирования и ИК-спектроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На поверхности молекулы трипсина при проведении расчетов *in silico* с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 4.1.0 нами обнаружено 85 а.о., доступных для растворителя не менее чем на 20%. Среди них преобладают полярные незаряженные (заряды скомпенсированы при pH 7.0) аминокислоты, такие как серин, треонин, цистеин, метионин, аспарагин, глутамин. Поскольку

изоэлектрическая точка трипсина $pI \sim 10$, то при pH 7.0 суммарный заряд белковой молекулы положителен. Количество гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы превышает число заряженных (при pH 7.0) аминокислотных остатков. Сведения об абсолютном и относительном количестве аминокислотных остатков приведены в табл. 1. В табл. 2 представлен перечень заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина с доступностью для растворителя не менее 20%.

Анализ модели пространственной структуры трипсина показал, что аминокислотные остатки на поверхности молекулы распределены неравномерно. На поверхности глобулы обнаружено 12 положительно заряженных аминокислот, из которых часть распределена равномерно, а некоторые аминокислотные остатки сгруппированы в отдельные участки скопления положительного заряда. Первый участок образуют Lys87 и Lys109, второй – His57 и Lys60, третий – Lys222 и Lys224. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки располагаются относительно равномерно по поверхности молекулы (рис. 1).

При адсорбционной иммобилизации белковые молекулы связываются с носителями, на поверхности которых имеются гидрофобные группы, за счет гидрофобных взаимодействий. Анализ модели пространственной структуры трипсина показал, что гидрофобные остатки аминокислот на поверхности молекулы распределены неравномерно и образуют скопления. На рис. 2 представлено расположение гидрофобных аминокислот на поверхности трипсина, где первое скопле-

Таблица 2. Перечень заряженных (при pH 7.0) и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина

| Положительно заряженные аминокислотные остатки | Отрицательно заряженные аминокислотные остатки | Гидрофобные аминокислотные остатки | |
|--|--|------------------------------------|--------|
| His57 | Glu77 | Gly18 | Ala111 |
| Lys60 | Asp153 | Gly19 | Leu114 |
| Lys87 | Asp165 | Ala24 | Ala132 |
| Lys109 | Glu186 | Gly38 | Gly133 |
| Arg177 | | Tyr39 | Gly148 |
| Lys145 | | Tyr59 | Tyr151 |
| Lys159 | | Gly62 | Pro173 |
| Lys169 | | Val75 | Gly174 |
| Lys188 | | Val76 | Leu185 |
| Lys222 | | Gly78 | Gly188 |
| Lys224 | | Phe82 | Gly203 |
| Lys239 | | Val90 | Gly219 |
| | | Pro92 | Ala243 |

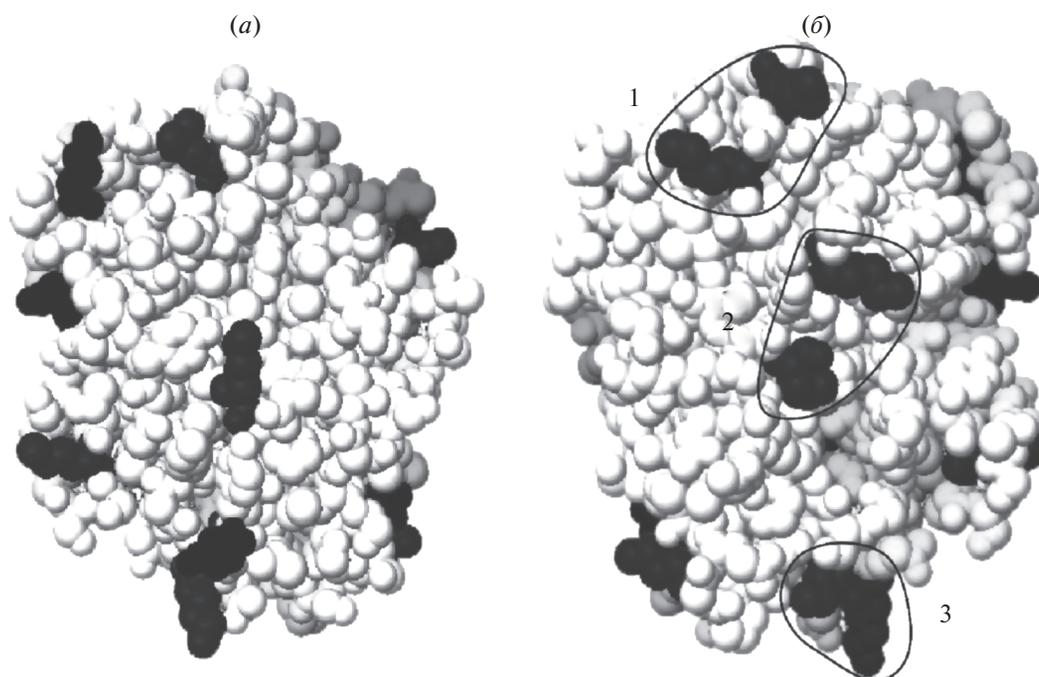


Рис. 1. Локальные скопления (1–3) заряженных (при pH 7.0) аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина (черным цветом выделены остатки, заряженные отрицательно, серым – заряженные положительно); (б) – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма (а).

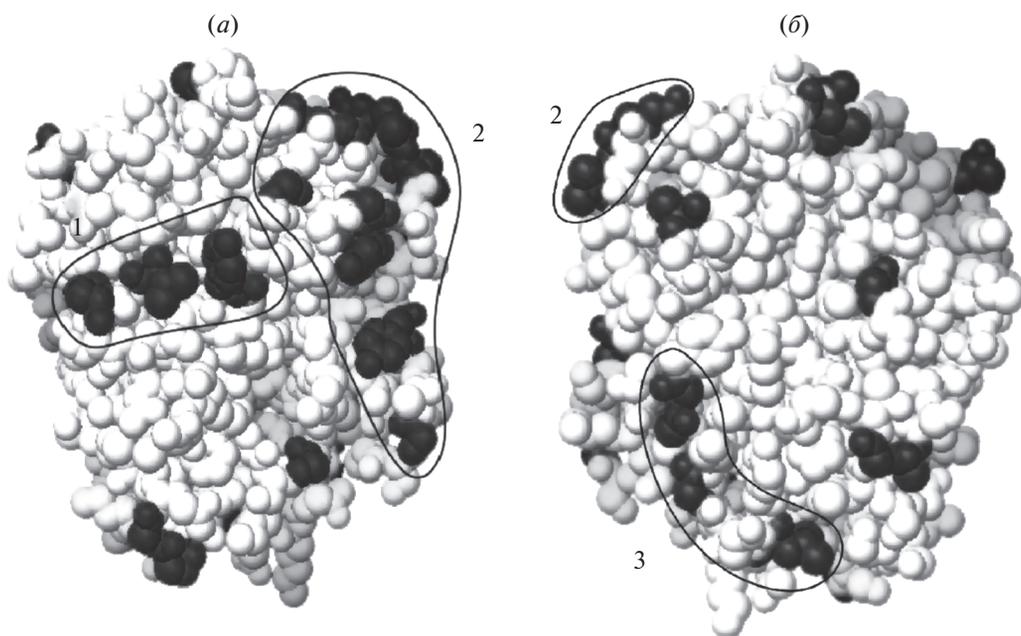


Рис. 2. Локальные скопления (1–3) гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина; (б) – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма (а).

ние образовано Tyr59, Val90 и Pro92; второе – Gly62, Gly38, Tyr39, Val75, Val76, Phe82, Gly148 и Tyr151; третье – Gly19, Leu185 и Gly187.

Размеры молекулы трипсина составляют порядка $38 \times 42 \times 50 \text{ \AA}$ (рис. 3). Размеры были рас-

считаны *in silico* на основе модели негидратированной молекулы трипсина, поскольку для расчета параметров гидратной оболочки необходимо ее отдельное моделирование с учетом определенных условий иммобилизации на конкретном носите-

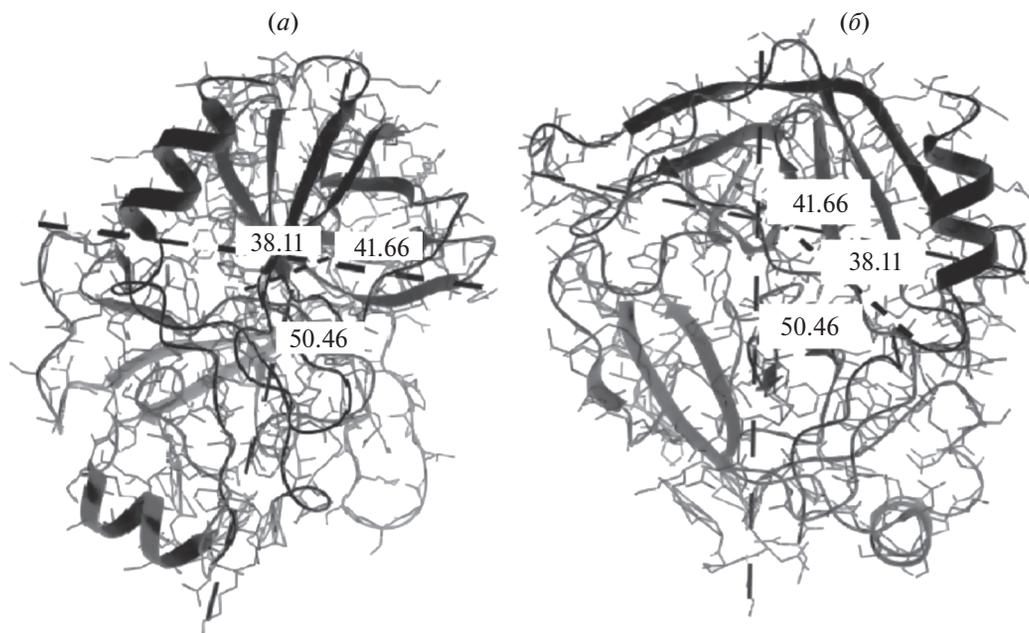


Рис. 3. Размер молекулы трипсина (Å), где (б) – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма (а).

ле. Как правило, при гидратации размеры белковой молекулы увеличиваются вдвое [45], следовательно, минимальный размер пор носителя для адсорбционной иммобилизации фермента в его порах соответствует ~100 Å (10 нм).

В формировании S–S-мостиков трипсина с носителем может участвовать расположенный на поверхности молекулы Cys128, другие остатки цистеина находятся внутри глобулы.

В табл. 3 и 4 представлены рассчитанные *in silico* расстояния (Å) от активного центра фермента до потенциальных сайтов связывания трипсина с заряженными носителями. Аминокислота His57, входящая в активный центр фермента, гипотетически также может принимать участие в образовании связи с матрицей носителя при адсорбционной иммобилизации, т.к. находится на поверхности белковой молекулы. При этом комплекс трипсина с полимером – более устойчивый к воздействию физических или химических факторов по сравнению со свободной формой белка.

В табл. 5 представлены рассчитанные *in silico* значения расстояния (Å) от активного центра фермента до сайтов связывания трипсина с гидрофобными носителями. Следует отметить, что некоторые заряженные и гидрофобные аминокислоты, располагающиеся на поверхности и находящиеся в непосредственной близости от активного центра трипсина, взаимодействуют с носителем при иммобилизации фермента, препятствуя при этом доступу макромолекул гидролизующего субстрата – бычьего сывороточного альбумина

(БСА) – к активному центру адсорбированного на нерастворимом полимере (хитозане) трипсина.

Носители для иммобилизации должны обладать рядом свойств: нерастворимостью, высокой химической и биологической стойкостью, высокой механической прочностью, возможностью создания различных структур (мембран, пластин, гранул, трубочек). Ни один из используемых в настоящее время в качестве носителя материалов не отвечает полностью всем предъявляемым требо-

Таблица 3. Рассчитанные *in silico* расстояния (Å) от активного центра трипсина до сайтов связывания с отрицательно заряженными носителями

| Положительно заряженные аминокислоты | Активный центр | | |
|--------------------------------------|----------------|--------|--------|
| | His57 | Asp102 | Ser195 |
| His57 | 0 | 6.66 | 9.63 |
| Lys60 | 7.79 | 13.86 | 12.96 |
| Lys87 | 15.80 | 18.92 | 20.35 |
| Lys109 | 19.70 | 22.80 | 21.65 |
| Arg117 | 27.53 | 28.88 | 22.43 |
| Lys145 | 21.51 | 24.45 | 12.87 |
| Lys159 | 22.84 | 22.41 | 14.81 |
| Lys169 | 20.88 | 16.61 | 20.57 |
| Lys188 | 23.27 | 23.44 | 15.41 |
| Lys222 | 24.07 | 23.78 | 18.56 |
| Lys224 | 21.43 | 20.19 | 17.29 |
| Lys239 | 18.05 | 15.05 | 22.17 |

Таблица 4. Рассчитанные *in silico* расстояния (Å) от активного центра трипсина до сайтов связывания с положительно заряженными носителями

| Отрицательно заряженные аминокислоты | Активный центр | | |
|--------------------------------------|----------------|--------|--------|
| | His57 | Asp102 | Ser195 |
| Glu77 | 28.49 | 32.59 | 22.35 |
| Asp153 | 22.95 | 27.12 | 14.35 |
| Asp165 | 22.87 | 17.88 | 21.88 |
| Glu186 | 26.42 | 24.97 | 20.57 |

Таблица 5. Рассчитанные *in silico* расстояния (Å) от активного центра трипсина до сайтов связывания с гидрофобными носителями

| Гидрофобные аминокислоты | Активный центр | | |
|--------------------------|----------------|--------|--------|
| | His57 | Asp102 | Ser195 |
| Gly18 | 23.18 | 24.62 | 14.08 |
| Gly19 | 23.58 | 24.81 | 14.30 |
| Ala24 | 27.45 | 29.69 | 19.35 |
| Gly38 | 17.17 | 23.36 | 15.81 |
| Tyr39 | 17.30 | 23.44 | 14.55 |
| Tyr59 | 4.31 | 10.57 | 10.52 |
| Gly62 | 14.11 | 19.77 | 17.67 |
| Val75 | 25.88 | 30.65 | 19.35 |
| Val76 | 27.74 | 32.38 | 21.78 |
| Gly78 | 29.39 | 33.14 | 23.58 |
| Phe82 | 22.56 | 26.55 | 19.98 |
| Val90 | 8.60 | 10.07 | 16.60 |
| Pro92 | 11.05 | 8.74 | 19.59 |
| Ala111 | 23.85 | 26.05 | 24.49 |
| Leu114 | 26.64 | 28.03 | 24.33 |
| Ala132 | 24.47 | 19.80 | 22.01 |
| Gly133 | 25.28 | 21.28 | 21.56 |
| Gly148 | 23.45 | 26.77 | 16.64 |
| Tyr151 | 21.47 | 25.81 | 13.13 |
| Pro173 | 20.71 | 17.61 | 21.30 |
| Gly174 | 20.45 | 16.73 | 22.55 |
| Leu185 | 24.54 | 22.68 | 19.07 |
| Gly188 | 23.27 | 23.44 | 15.41 |
| Gly203 | 23.96 | 21.52 | 19.88 |
| Gly219 | 16.53 | 17.79 | 12.59 |
| Ala243 | 20.88 | 19.33 | 25.45 |

ваниям. Тем не менее существует широкий набор носителей, используемых для иммобилизации определенных ферментов в конкретных условиях [46, 47]. Для трипсина перспективны-

ми носителями для иммобилизации стали ионообменные волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1 и хитозан. Каталитическая активность иммобилизованного трипсина в реакции гидролиза БСА составляет, соответственно, 3.4 ± 0.3 , 3.7 ± 0.3 и 4.2 ± 0.4 ед./мг иммобилизованного белка, количество белка в образцах равно 7.4 ± 0.4 , 8.4 ± 0.8 и 12.4 ± 1.2 мг/г носителя. На рис. 4 показаны процент адсорбированного белка и процент сохранения каталитической активности трипсина после иммобилизации на данных полимерах. При сравнительном анализе каталитической активности иммобилизованного фермента нами установлено, что наиболее эффективной становится иммобилизация трипсина на матрице хитозана, позволяющая сохранить (65 ± 6)% активности (скорости гидролиза БСА) нативного фермента в растворе. Количество адсорбированного трипсина при этом составило 12.4 ± 1.2 мг/г носителя, т.е. адсорбировалось (62 ± 6)% от общего количества белка (20 мг на 1 г носителя).

Выделяют две основные причины снижения активности при иммобилизации: уменьшение конформационной подвижности фермента и диффузионные ограничения для высокомолекулярного субстрата [48]. Диффузионные ограничения можно подразделить на два типа: внешний и внутренний диффузионный барьеры. Первый возникает вследствие существования тонкого неперемешиваемого слоя растворителя, окружающего полимерную частицу, так называемого слоя Нернста. Растворенные вещества диффундируют в этот слой благодаря сочетанию пассивной молекулярной диффузии и конвекции. Для снижения эффектов внешнего диффузионного барьера мы перемешивали суспензии образцов при проведении реакции гидролиза БСА. Внутренние диффузионные барьеры – это ограничения свободной диффузии внутри полимерной матрицы, налагаемые самой матрицей. Внутренний диффузионный барьер более выражен, если фермент иммобилизован путем включения его в полимерную матрицу, а не в результате его прикрепления к поверхности этой матрицы. При этом в большинстве случаев можно пренебречь либо внешним, либо внутренним барьером, т.к. обычно только один из них лимитирует общую скорость диффузии [49]. В наших экспериментах была осуществлена адсорбция трипсина на полимерных носителях, количество фермента (в данном случае равное 12 мг/г, или 1.2 мас. %) не создает ограничений массопереносу субстрата к иммобилизованному ферменту. Ранее нами было показано, что поведение адсорбированного на волокнах ВИОН трипсина подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен [50]. Если бы имели место значительные диффузионные ограничения, то построение графика в обратных координатах Лайнуивера–Бэрка привело бы к получению кривых

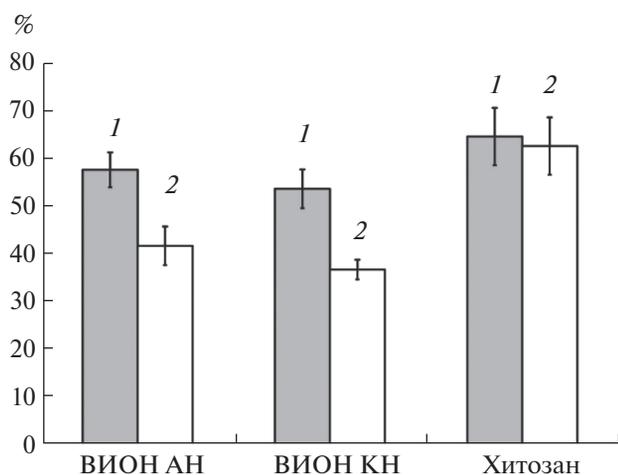


Рис. 4. Каталитическая активность (1) и содержание адсорбированного белка (2) в образцах трипсина, иммобилизованного на полимерных носителях. За 100% принимали скорость гидролиза бычьего сывороточного альбумина свободным трипсином (1) и максимально возможное количество адсорбированного трипсина – 20 мг на 1 г носителя (2).

сигмоидной формы [49], чего в наших экспериментах не наблюдалось. Таким образом, потерю ~40% активности трипсина после его иммобилизации на волокнах ВИОН и хитозане мы объясняем следующим образом: водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия фермента с носителем изменили структуру белко-

вой глобулы, но при этом не блокировали активный центр фермента полностью.

Для исследования структурных изменений в молекуле трипсина и изучения механизма адсорбции фермента на матрицах хитозана и ионообменных волокон ВИОН КН-1, ВИОН АН-1 мы использовали метод ИК-спектроскопии. Элементарные звенья ионообменных волокон ВИОН АН-1, ВИОН КН-1 и хитозана представлены на рис. 5.

Колебательные полосы поглощения в белках обычно вызваны переходами, которые относятся к определенным химическим связям. Наиболее информативными выступают колебательные переходы в пептидном скелете молекулы. В первую очередь это полосы, связанные с растяжением NH-связи $\approx 3300 \text{ см}^{-1}$, растяжением связи C=O – $1660\text{--}1632 \text{ см}^{-1}$ (полоса Амид I), деформацией NH-связи – $1550\text{--}1520 \text{ см}^{-1}$ (полоса Амид II).

При анализе ИК-спектра молекулы свободного трипсина (рис. 6–8) выявлено следующее: 1) полоса поглощения в области $3272\text{--}3078 \text{ см}^{-1}$ – результат валентных колебаний OH- и NH-групп; 2) область поглощения $3078\text{--}2875 \text{ см}^{-1}$ отвечает за валентные колебания связи C–H и характеризуется наличием пиков $2964, 2934$ и 2875 см^{-1} , относящихся к асимметричным и симметричным колебаниям метильной группы; 3) пик 1632 см^{-1} – результат асимметричных деформационных колебаний NH_3^+ ; 4) пик 1533 см^{-1} связан с симметричными де-

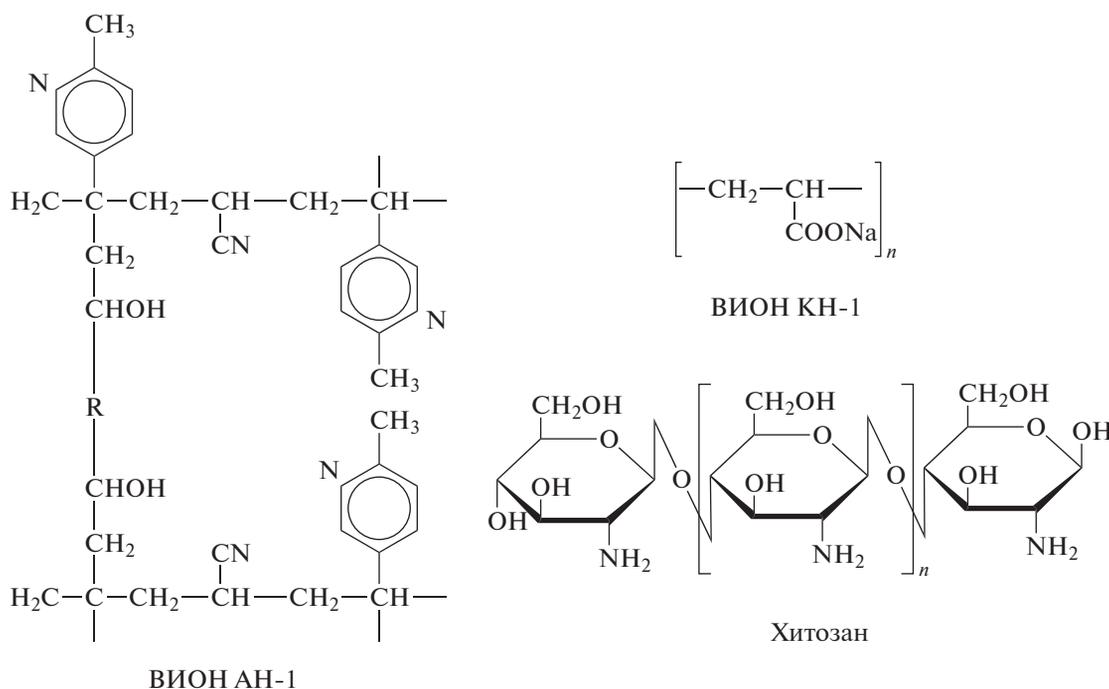


Рис. 5. Элементарные звенья ионообменных волокон ВИОН АН-1, ВИОН КН-1 и хитозана.

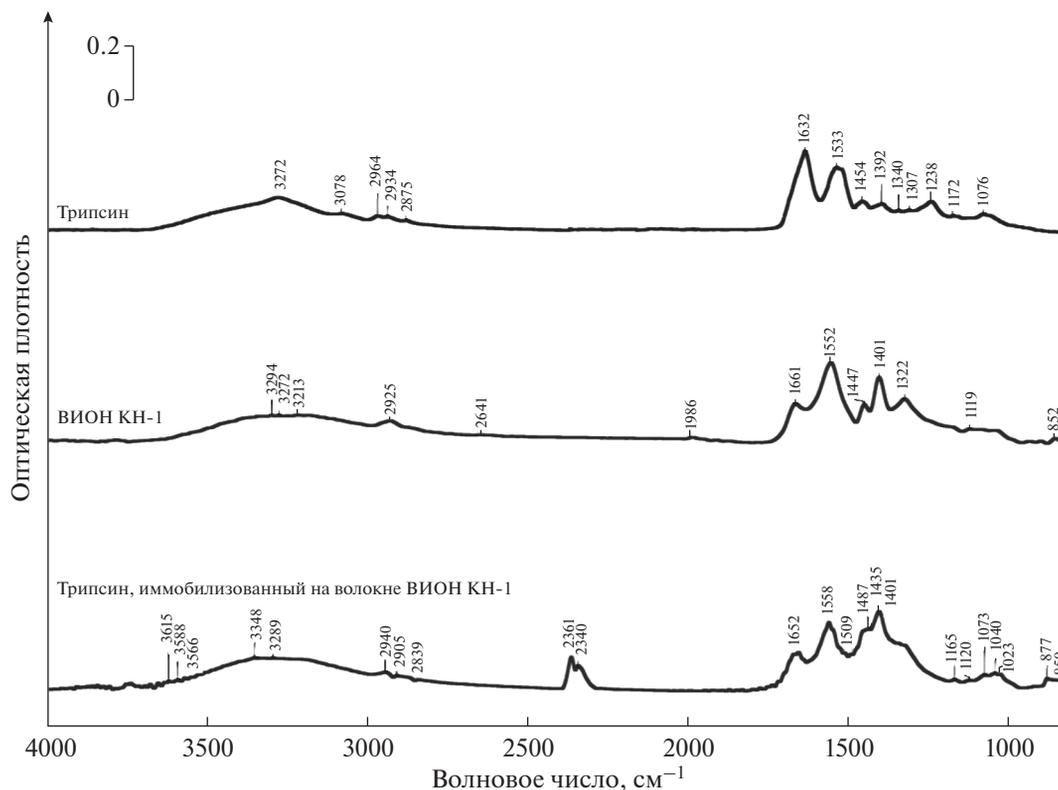


Рис. 6. ИК-спектры трипсина, VION KH-1 и иммобилизованного на матрице ионообменного волокна фермента.

формационными колебаниями NH_3^+ ; 5) пик 1454 см^{-1} обусловлен деформационными колебаниями связей $\text{C}-\text{H}$; 6) полоса поглощения в области $1238\text{--}1076\text{ см}^{-1}$ низкой интенсивности и соответствует валентным колебаниям связи $\text{C}-\text{S}$ (рис. 6–8) [51, 52].

Ионообменные волокна VION KH-1 и VION AN-1 представляют собой нерастворимые высокомолекулярные соединения с жестко фиксированными функциональными группами и подвижными противоионами, способными к реакциям ионного обмена.

В качестве функциональных групп волокна VION KH-1 выступают карбоксильные группировки. В ИК-спектре катионита зарегистрированы пики 2925 , 1447 , 1401 см^{-1} , отвечающие за колебания метильно-метиленовых групп; пик 1119 см^{-1} , соответствующий деформационным колебаниям OH -группы; полоса поглощения в области 1661 см^{-1} , обусловленная валентными колебаниями связи $\text{C}=\text{O}$. После иммобилизации трипсина на волокне VION KH-1 в ИК-спектре появляются новые полосы поглощения в области $1165\text{--}1023\text{ см}^{-1}$, связанные с колебаниями $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ и $-\text{COOH}$, возникает пик 1509 см^{-1} и установлено смещение пика 1447 см^{-1} , ответственного за деформационные колебания групп $>\text{CH}-$ и $-\text{CH}_2-$, в

сторону более высоких значений волновых чисел (1487 см^{-1}). Зарегистрировано смещение пика, соответствующего поглощению ионизированных асимметричных колебаний COO -группы, от 1552 к 1558 см^{-1} . Появляются пики CH -групп ненасыщенных и ароматических соединений ($2839\text{--}2340\text{ см}^{-1}$) и полоса поглощения в области $3615\text{--}3348\text{ см}^{-1}$, соответствующая свободной OH -группе в парах вещества и указывающая на взаимодействие OH -группы по типу водородной связи $\text{OH}\cdots\text{O}$. Таким образом, можно предположить что, водородные связи принимают участие в связывании молекулы фермента с матрицей носителя (рис. 6).

В ИК-спектре волокна VION AN-1 (рис. 7) присутствуют максимумы поглощения, обусловленные валентными и деформационными колебаниями групп, входящих в состав элементарного звена. Пиримидиновые кольца имеют поглощение при 1569 и 1032 см^{-1} , метильно-метиленовые группы — при 2924 и 1370 см^{-1} , группа $\text{C}-\text{N}$ имеет абсорбционную полосу при 2242 см^{-1} [51]. После адсорбционной иммобилизации трипсина на ионообменном волокне VION AN-1 в ИК-спектре образца зарегистрировано появление пиков 1650 и 1604 см^{-1} , отвечающих за наличие β -структур и за β -повороты в молекуле фермента; таким образом, происходят изменения в полосе Амид I,

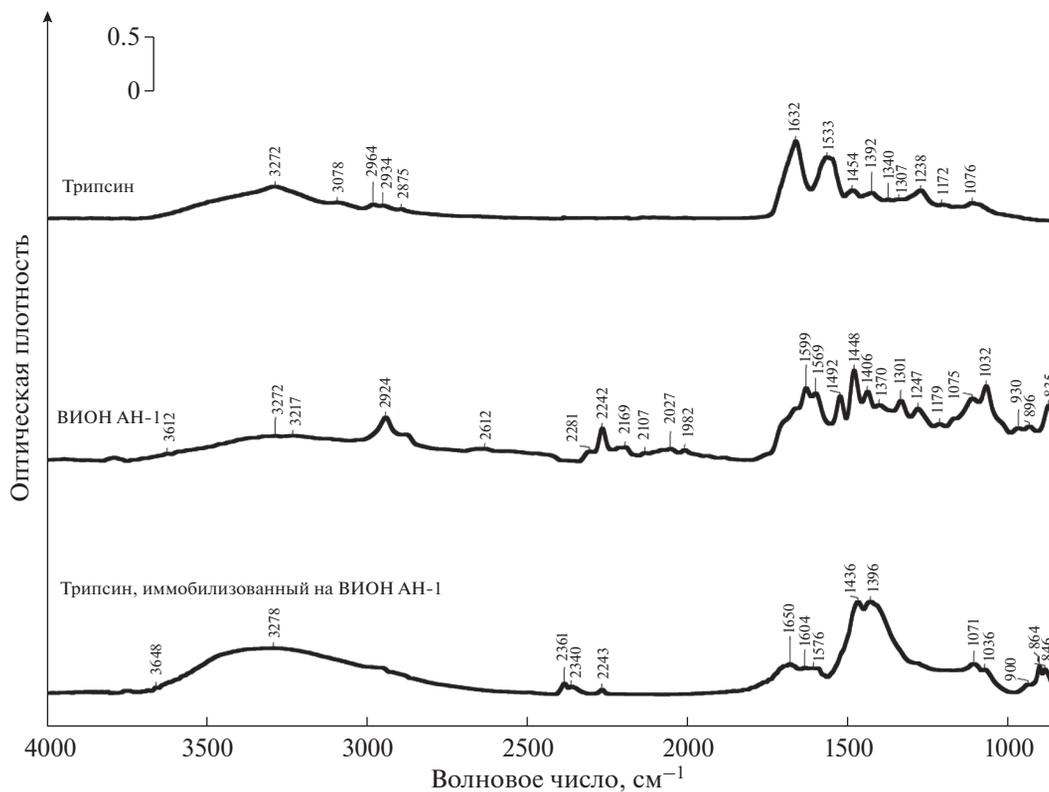


Рис. 7. ИК-спектры трипсина, ВИОН АН-1 и иммобилизованного на матрице ионообменного волокна фермента.

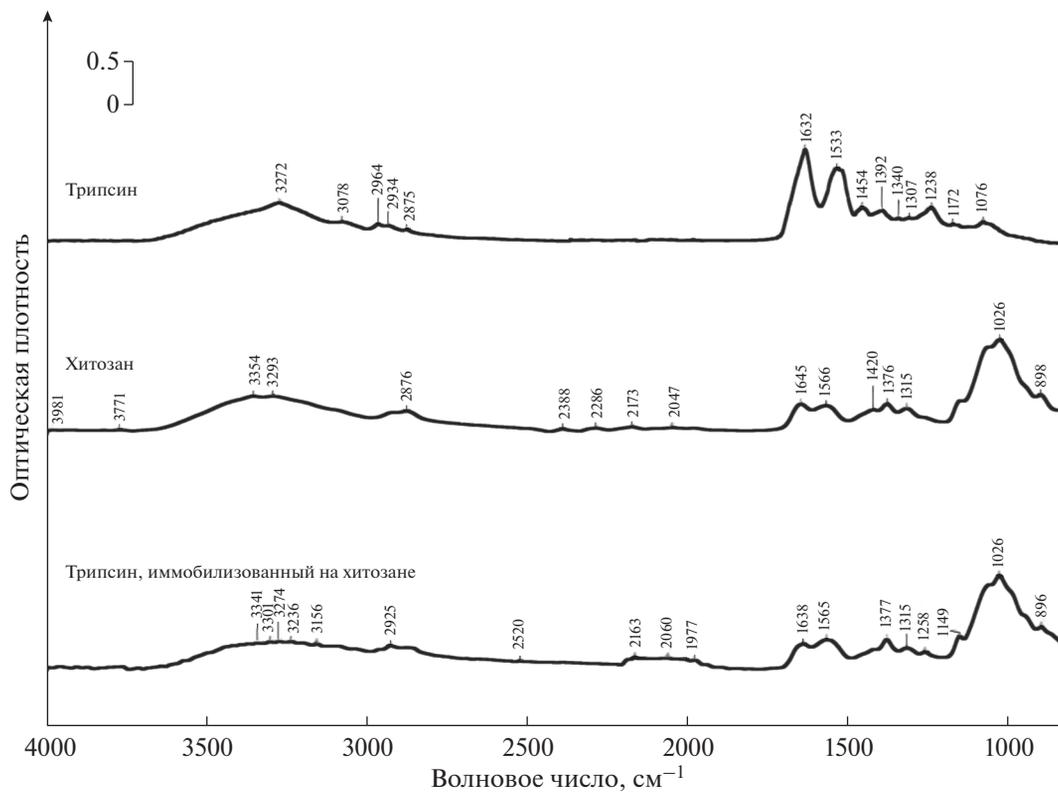


Рис. 8. ИК-спектры трипсина, хитозана и иммобилизованного на матрице полимера фермента.

что говорит о появлении связей и взаимодействий между волокном ВИОН АН-1 и молекулой трипсина. Установлено возникновение пиков в области колебаний СН-групп ненасыщенных и ароматических соединений ($2361\text{--}2340\text{ см}^{-1}$); исчезновение полосы поглощения $2169\text{--}1982\text{ см}^{-1}$, связанной с колебаниями группы --COO^- ; смещение пиков $1576\text{--}1569\text{ см}^{-1}$ (колебания пиримидиновых колец) в сторону более высоких энергий; смещение пиков $1406\text{--}1396\text{ см}^{-1}$ (колебания метильно-метиленовых групп) в сторону более низких значений волновых чисел, что обусловлено перестройками в глобуле белка, а также изменением структуры ионообменного волокна (рис. 7) [51, 52].

В ИК-спектре хитозана (рис. 8) присутствуют пики поглощения 1566 см^{-1} (отвечает за вибрацию NH_2 -группы) и 1645 см^{-1} (обусловлен поглощением карбонила). Спектр хитозана характеризуется типичными полосами поглощения 3354 и 2876 см^{-1} , которые отвечают за колебания групп --OH и --CH_3 . После иммобилизации трипсина на матрице хитозана увеличивается интенсивность полосы $3341\text{--}3156\text{ см}^{-1}$, ответственной за растяжение связи N--H и вибрацию NH_2 -групп, исчезает полоса поглощения $2388\text{--}2286\text{ см}^{-1}$, обусловленная колебаниями ионизированных аминокислотных групп. В ИК-спектрах иммобилизованного трипсина зарегистрированы полосы поглощения в области 1977 и 1638 см^{-1} , указывающие на наличие карбоксильной и альдегидной групп. Это свидетельствует о том, что функциональные группы хитозана --OH и --NH_2 приняли участие в образовании водородных связей и электростатических взаимодействий между молекулой трипсина и матрицей носителя. Кроме того, было образовано большое количество гидрофобных взаимодействий между молекулами трипсина и хитозана, что подтверждается следующим: максимум пика на ИК-спектре хитозана 2876 см^{-1} , обусловленного асимметричными и симметричными колебаниями --CH- и --CH_2 -групп, после иммобилизации трипсина сдвигается до значения 2925 см^{-1} ; происходит смещение максимума, обусловленного пульсационными колебаниями пиранозного цикла хитозана, от 898 до 896 см^{-1} (рис. 8) [52].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования и носители для его иммобилизации. В качестве объекта исследования был выбран трипсин быка (MP Biomedicals, США), субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА, 66.4 кДа ; Sigma-Aldrich, США), носителями для иммобилизации — хитозан высокомолекулярный (350 кДа ; ЗАО “Био-прогресс”, Россия), ионообменные волокна

ВИОН КН-1 (катионит) и ВИОН АН-1 (анионит) (ООО “ЛИРСОТ”, Россия).

Подготовка ионообменных волокон к иммобилизации. Подготовку осуществляли следующим методом. При кондиционировании их помещали в дистиллированную воду, после набухания обрабатывали растворами HCl переменной концентрации ($0.5, 1.0, 1.5, 1.0, 0.5\text{ М}$) для удаления ионов железа. Обработку образцов проводили в статических условиях. После отмывки дистиллированной водой осуществляли попеременную 4-кратную обработку 1 М растворами NaOH и HCl с промежуточной промывкой дистиллированной водой [52].

Иммобилизация трипсина. Иммобилизацию трипсина проводили путем адсорбции при комнатной температуре: 1 г носителя заливали 10 мл 0.1 М боратного буфера ($\text{pH } 9.0$) в случае ВИОН КН-1, 0.1 М карбонатного буфера ($\text{pH } 10.0$) в случае ВИОН АН-1 и 0.1 М фосфатного буфера ($\text{pH } 6.5$) в случае хитозана (эти буферы оптимальны для иммобилизации трипсина на данных носителях согласно работам [29, 50]) и выдерживали в течение 1 ч . К суспензии носителя добавляли 5 мл раствора трипсина (в концентрации 4 мг/мл) и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 2 ч при температуре 25°C . Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин при 1500 g , осадок промывали буфером, используемым для иммобилизации трипсина, до отсутствия белка в промывочных водах, контроль за содержанием белка осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) при 280 нм [53, 54]. Таким образом, максимально возможное количество адсорбированного трипсина составляло 20 мг на 1 г носителя, это значение принимали за 100% на рис. 4.

Определение количества белка. Определение количества белка в образцах осуществляли модифицированным методом Лоури. Сущность модификации заключалась в том, что на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей между матрицей носителя и молекулой фермента. Для этого иммобилизованный трипсин обрабатывали раствором K_2Na -тарtrate (в концентрации 20 мг/мл или 0.7 М), приготовленном на 1 М NaOH , при 50°C в течение 10 мин [55]. Ранее было показано, что трипсин в данных условиях десорбируется полностью. Отсутствие процессов разрушения трипсина контролировали путем регистрации и анализа его спектра поглощения на спектрофотометре UV-2550PC (Shimadzu, Япония).

Определение протеолитической активности трипсина. Для определения протеолитической активности трипсина в качестве субстрата использовали БСА (66.4 кДа) в концентрации 100 мкМ , растворенный в 0.1 М фосфатном буфере ($\text{pH } 6.5$), гидролиз субстрата осуществляли в течение 30 мин при 37°C . Далее пробирки центрифуги-

ровали в течение 10 мин при 11700 g для удаления иммобилизованного трипсина. О протеолитической активности образцов судили по разности концентрации альбумина в растворе до начала реакции гидролиза и в надосадочной жидкости после протекания реакции. За единицу активности свободного и иммобилизованного трипсина принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ БСА за 1 мин. Для определения каталитической активности образцов мы также применяли метод Лоури, но с другой модификацией – без добавления в реакционную среду сульфата меди [56]. Ранее в процессе сравнения ряда методик определения количества белка в растворе мы установили, что наименьший вклад в окрашивание реакционной среды матрица хитозана вносит при использовании модифицированного метода Лоури (без добавления сульфата меди). Кроме того, данный метод незначительно “реагирует” на отдельные аминокислоты, в частности изолейцин, а его применение позволяет минимизировать вклад в ход реакции молекул самого хитозана, а также процессов связывания БСА с матрицей хитозана и реакции автолиза трипсина [57].

ИК-спектроскопия. Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов выполняли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета с помощью ИК-Фурье-спектрометра Vertex-70 (Bruker, Германия). Спектры регистрировали с неориентированных порошковых образцов.

Выявление аминокислотных остатков на поверхности трипсина. Выявление аминокислотных остатков на поверхности трипсина (PDB ID: 5T3H) с доступностью для растворителя не менее 20% проводили с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 4.1.0. Программа рассчитывает доступную для растворителя площадь поверхности следующим образом: вода выступает как сфера с радиусом 1.4 Å, программа симулирует перемещение этой сферы по поверхности молекулы, записывая значение проконтактировавшей площади конкретной аминокислоты. Данная площадь считается доступной для растворителя. В нашем случае осуществлялся отбор аминокислот, для которых такая площадь составляет не менее 20% от площади поверхности аминокислоты [58–60].

Локализацию гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков визуализировали с помощью программы Maestro 10.3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При иммобилизации трипсина согласно результатам, полученным *in silico*, отрицательно заряженные носители, в том числе ВИОН КН-1, взаимодействуют с остатками His, Arg и Lys, образующими участки локального скопления на по-

верхности молекулы фермента. Содержание адсорбированного белка в иммобилизованных на ВИОН КН-1 образцах составляет $(37 \pm 2)\%$, а их каталитическая активность сохраняется на $(54 \pm 4)\%$ по отношению к активности свободного трипсина.

В качестве положительно заряженных носителей трипсина выступают волокна ВИОН АН-1 и хитозан. В ходе абсорбции фермента происходит их взаимодействие с остатками Glu и Asp. Содержание адсорбированного белка в иммобилизованном на ВИОН АН-1 трипсине составляет $(42 \pm 4)\%$, а его каталитическая активность – $(58 \pm 4)\%$.

Согласно нашим расчетным данным, в процессе гидрофобного взаимодействия с матрицей хитозана принимают участие скопления Gly, Ala, Tyr, Val, Phe, Pro и Leu на поверхности молекулы трипсина. Содержание адсорбированного белка в образцах иммобилизованного на матрице хитозана трипсина составляет $(62 \pm 6)\%$, а их каталитическая активность – $(65 \pm 6)\%$, что выше, чем эти же характеристики у волокон ВИОН.

В совокупности расчетные данные *in silico* и результаты ИК-спектроскопии свидетельствуют о том, что при адсорбции трипсина на волокнах ВИОН преобладают электростатические взаимодействия и водородные связи. При адсорбции трипсина на хитозане активно образуются гидрофобные взаимодействия, а функциональные группы хитозана –ОН и –NH₂ принимают участие в образовании водородных связей и электростатических взаимодействий между молекулой фермента и носителем.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке промышленных катализаторов и медицинских препаратов на основе иммобилизованного трипсина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные исследования были проведены с использованием научно-технической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мосолов В.В.* // Протеолитические ферменты. Наука, Москва, 1971. 404 с.
2. *Ladisch M.R., Kohlmann K.L.J.* // *Biotechnol. Prog.* 1992. V. 8. P. 469–478. <https://doi.org/10.1021/bp00018a001>
3. *Pereira H.J., Salgado M.C., Oliveira E.B.* // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009. V. 22. P. 2039–2044. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.036>
4. *Wu P.* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 391. P. 283–293. <https://doi.org/10.1515/bc.2010.030>
5. *Torbica A.M.* // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58. P. 7980–7985. <https://doi.org/10.1021/jf100830m>
6. *Noguchi H.* // *J. Cell Transplant.* 2009. V. 18. P. 541–547. <https://doi.org/10.1177/096368970901805-609>
7. *Walsh K.A.* // *Meth. Enzymol.* 1970. V. 19. P. 41–63. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(70\)19006-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(70)19006-9)
8. *Perera E., Rodríguez-Viera L., Perdomo-Morales R., Montero-Alejo V., Moyano F.J., Martínez-Rodríguez G., Mancera J.M.* // *J. Comp. Physiol. B.* 2015. V. 185. P. 17–35. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0851-y>
9. *Muhlia-Almazan A., Sanchez-Paz A., García-Carreno F.L.* // *J. Comp. Physiol. B.* 2008. V. 178. P. 655–672. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0263-y>
10. *Суханова С.М., Петручук Е.М., Генералов А.А.* // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018. Т. 18. С. 106–113.
11. *Jesus-de la Cruz K., Alvarez-Gonzalez C.A., Pena E., Morales-Contreras J.A., Avila-Fernandez A.* // *J. Biotech.* 2018. V. 8. P. 186. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1208-0>
12. *Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А.* // Основы биотехнологии. Академия, Москва, 2003. 208 с.
13. *Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Семенухина А.В., Рахманова Т.И.* // Биомед. химия. 2008. Т. 54. С. 114–121.
14. *Lysogorskaya E.N., Roslyakova T.V., Belyaeva A.V., Bacheva A.V., Lozinskij V.I., Filippova I.Yu.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2008. T. 44. P. 241–246. <https://doi.org/10.1134/S0003683808030022>
15. *Iskusnykh I.Y., Popova T.N., Agarkov A.A., Rjevskiy S.G., Pinheiro De Carvalho M.A.A.* // *J. Toxicol.* 2013. Article ID 870628. <https://doi.org/10.1155/2013/870628>
16. *Mateo C., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M.* // *J. Enzyme Microb. Technol.* 2007. V. 40. P. 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
17. *Valuev I.L., Vanchugova L.V., Valuev L.I.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. P. 35–38. <https://doi.org/10.31857/S0555109920010158>
18. *Макарьин В.Е., Турсунов Б.С.* // Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств и полимерных имплантатов. Москва, 1992. С. 115–116.
19. *Бледнов А.В.* // Новости хирургии. 2006. Т. 14. № 1. P. 9–19.
20. *Верниковский В.В., Степанова Э.Ф.* // Вестник новых медицинских технологий. 2006. Т. XIII. № 4. С. 130–131.
21. *Kovalenko G.A.* // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 1998. V. 32. No 4. P. 213–216. <https://doi.org/10.1007/BF02465836>
22. *Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М.* // Радиацион. биол. радиоэкол. 2017. Т. 57. С. 66–70. <https://doi.org/10.7868/S0869803117010064>
23. *Goradia D.* // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2005. V. 32. P. 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.12.007>
24. *Díaz J.F., Balkus K.J.* // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 1996. V. 2. No 2–3. P. 115–126. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(96\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(96)00017-3)
25. *Kulik E.A., Kato K., Ivanchenko M.I., Ikada Y.* // *Bio-materials.* 1993. V. 14. P. 76–769. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90041-Y](https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90041-Y)
26. *Xu F., Wang W.H., Tan Y.J., Bruening M.L.* // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 10045–10051. <https://doi.org/10.1021/ac101857j>
27. *Бородина Т.Н., Руми Л.Д., Кунижев С.М., Сухорук Г.Б., Ворожцов Г.Н., Фельдман Б.М., Марквичева Е.А.* // Биомед. химия. 2007. Т. 53. С. 557–565.
28. *Тандыгов Ш.З.* // В книге: Инновационные химические технологии и биотехнологии материалов и продуктов. II Международная конференция Российского химического общества им. Д.И. Менделеева: тезисы докладов. 2010. С. 348–349.
29. *Логвинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.* // Биофарм. журн. 2015. № 2. С. 13–16.
30. *Сливкин А.И., Беленова А.С., Холявка М.Г., Богачев М.И., Логвинова Е.Е.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т. 13. Вып. 1. С. 53–59.
31. *Хельтье Х.-Д., Зипль В., Роньян Д., Фолькерс Г.* // Молекулярное моделирование: теория и практика / Пер. с англ. 2-е изд. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2013. 319 с.
32. *Holyavka M.G., Koroleva V.A., Makin S.M., Olshannikova S.S., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Artyukhov V.G.* // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017. Т. 3. С. 86–90.
33. *Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Terentyev V.V., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., Artyukhov V.G.* // *Biophysics.* 2017. V. 62. P. 5–11. <https://doi.org/10.1134/S0006350917010109>
34. *Arrondo J.L.R., Muga A., Castresana J., Goñi F.M.* // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1993. V. 59. P. 23–56. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(93\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0079-6107(93)90006-6)
35. *Siebert F.* // *Methods Enzymol.* 1995. V. 246. P. 501–526.
36. *Jackson M., Mantsch H.H.* // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995. V. 30. P. 95–120. <https://doi.org/10.3109/10409239509085140>
37. *Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.-M.* // *Sub-cell Biochemistry.* 1994. V. 23. P. 329–362.
38. *Fabian H., Mantele W.* *Infrared spectroscopy of proteins* // *Handbook of Vibrational Spectroscopy* / Eds. Chalmers J.M., Griffiths P.R. John Wiley & Sons, Chichester, 2002. P. 3399–3426.
39. *Barth A.* *IR spectroscopy* // *Protein Structures: Methods in Protein Structure and Stability Analysis* / Eds. Uversky V.N., Permyakov E.A., Nova Science Publishers, 2006. P. 69–152.

40. *Arrondo J.L.R., Goñi F.M.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1999. V. 72. P. 367–405.
https://doi.org/10.1016/s0079-6107(99)00007-3
41. *Kauffmann E., Darnton N.C., Austin R.H., Batt C., Gerwert K.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 6646–6649.
https://doi.org/10.1073/pnas.101122898
42. *Тен Г.Н., Герасименко А.Ю., Щербакова Н.Е., Баранов В.И.* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2019. Т. 19. № 1. С. 43–57.
43. *Файзуллин Д.А., Коннова Т.А., Эртле Т., Зуев Ю.Ф.* // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 411–417. [Faizullin D.A., Konnova T.A., Zuev Y.F., Naertle T. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 366–372.]
https://doi.org/10.7868/S0132342313040076
44. *Valiullina Y.A., Ermakova E.A., Faizullin D.A., Zuev Y.F., Mirgorodskaya A.B.* // J. Struct. Chem. 2014. V. 55. P. 1556–1564.
https://doi.org/10.1134/S0022476614080253
45. *Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж.* // Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: в 2 т. М.: КДУ, 2009. Т. 1. 568 с.
46. *Горбунов Н.В.* // Журн. физ. химии. 1978. Т. 52. С. 1259–1262.
47. *Полянский Н.Г.* // Методы исследования ионитов. Москва, Химия, 1976. С. 208.
48. *Холявка М.Г., Артюхов В.Г.* // Иммуобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение (учебное пособие). Воронежский государственный университет. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. 261 с.
49. *Тривен М.Д.* // Иммуобилизованные ферменты: Ввод. курс и применение в биотехнологии / Пер. с англ. Майзеля Е.Б. Москва, Мир, 1983. С. 213.
50. *Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M., Nakvasina M.A.* // Pharm. Chem. J. 2017. V. 51. P. 702–706.
https://doi.org/10.1007/s11094-017-1678-0
51. *Углянская В.А.* // Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов. Воронеж, Воронежский государственный университет, 1989. С. 208.
52. *Смит А.* // Прикладная ИК-спектроскопия: основы, техника, аналитическое применение (пер. с англ.). Москва, Мир, 1982. С. 327.
53. *Холявка М.Г., Каюмов А.Р., Логинова О.О., Байдашина Д.Р., Тризна Е.Ю., Сазыкина С.М., Беленова А.С., Артюхов В.Г., Сливкин А.И.* // Биофарм. журнал. 2017. Т. 9. С. 31–37.
54. *Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С.* // Фундамент. исследования. 2013. № 11–3. С. 484–487.
55. *Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Biyuyskaya L.A., Grechkina M.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 422–427.
56. *Folin O., Ciocalteu V.* // J. Biol. Chem. 1929. V. 73. P. 627–650.
57. *Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С.* // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2013. № 2. С. 116–119.
58. *Can T., Chen C.I., Wang Y.F.* // J. Mol. Graphics Modell. 2006. V. 25. P. 442–454.
https://doi.org/10.1016/j.jmgl.2006.02.012
59. *Richards F.M.* // Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1977. V. 6. P. 151–176.
https://doi.org/10.1146/annurev.bb.06.060177.001055
60. *Guex N., Peitsch M.C.* // Electrophoresis. 1997. V. 18. P. 2714–2723.

Study on the Processes of Interactions between Trypsin and Ion Exchange Fibers and Chitosan

S. M. Pankova*, F. A. Sakibaev*, M. G. Holyavka*., Y. M. Vyshkvorkina**,
A. N. Lukin*, and V. G. Artyukhov*

*Phone: +7 (473) 220-85-86; e-mail: holyavka@rambler.ru

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

**Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskij per. 9, Moscow region, Dolgoprudny, 141701 Russia

The localization of charged and hydrophobic amino acid residues in the trypsin molecule was studied. The percentage ratio of different types of amino acids on the surface of the enzyme globule was determined. It was found that charged and hydrophobic amino acid residues were distributed non-uniformly on the surface of the protein, forming sections of a local cluster. It was revealed that ion-exchange fibers VION KN-1, VION AN-1 and chitosan were the promising carriers for immobilization of trypsin, since adsorption on them ensured the preservation 54, 58 and 65% of the catalytic activity (rate of bovine serum albumin hydrolysis) of the native enzyme (in solution), respectively. The IR spectra of the soluble and immobilized on polymeric supports enzymes were analyzed. It was established, that during trypsin adsorption on VION fibers, electrostatic interactions and hydrogen bonds predominated. The carboxyl groups of VION KN-1 interacted with positively charged sections of the molecule containing His, Lys and Arg. A large number of amino groups of VION AN-1 and chitosan created an excess positive charge, due to which, possibly, binding to negatively charged Asp and Glu. However, hydrophobic interactions were key in the adsorption of trypsin on chitosan; Gly, Ala, Tyr, Val, Phe, Pro, Leu participated in their formation.

Keywords: trypsin, adsorption, anion-exchange fiber VION AN-1, cation-exchange fiber VION KN-1, chitosan



УДК 547.782

ЛАБИЛЬНОСТЬ СТАЦИОНАРНЫХ И ВРЕМЯРАЗРЕШЕННЫХ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОНФОРМАЦИОННО ФИКСИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО ХРОМОФОРА CFP

© 2021 г. А. М. Богданов*, Д. А. Горбачев*, Э. Р. Зайцева*, **, А. Ю. Смирнов*,
Н. С. Балеева*., #, М. С. Баранов*., ***

*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 площадь, 9

***Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 16.09.2020 г.

После доработки 26.09.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

Исучено сольватохромное поведение модельного соединения, имитирующего хромофор цианового флуоресцентного белка (CFP), в спектральном и временном доменах. Анализ времяразрешенного флуоресцентного сигнала, проведенный в 40 растворителях, принадлежащих к различным классам, показал, что липофильное окружение способствует увеличению, а ароматические растворители и третичные амины – уменьшению времени жизни флуоресценции этого соединения. На основании проведенного исследования сделаны предположения о возможностях рационального дизайна CFP-подобных белков.

Ключевые слова: имидазолон, хромофоры, циановый флуоресцентный белок, CFP, оптические свойства

DOI: 10.31857/S0132342321030040

Традиционные методы флуоресцентной визуализации опираются на детекцию и анализ сигнала в спектральном домене, где основной характеристикой служит длина волны. Поскольку полосы поглощения и испускания большинства флуорофоров имеют заметную ширину, такой подход позволяет проводить раздельную детекцию флуоресцентного сигнала лишь в 3–5 спектральных каналах одновременно. Альтернативным подходом к разделению флуоресцентных сигналов становится их детекция во временном домене, где отдельные фотоны регистрируются относительно момента возбуждения флуоресценции. Этот принцип позволяет в одном спектральном канале визуализировать несколько маркеров, контрастных по времени жизни флуоресценции.

Сокращения: CFP – циановый флуоресцентный белок; КВФ – квантовый выход флуоресценции; ФБ – флуоресцентный белок.

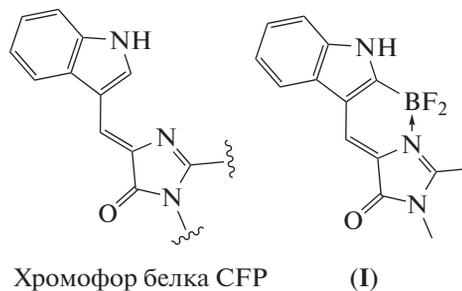
Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).

На сегодняшний день методы времяразрешенной флуоресцентной визуализации (FLIM и схожие) находят все большее применение в области биомедицинских исследований.

Флуоресцентные белки (ФБ) выступают одной из важнейших меток в биологической флуоресцентной микроскопии и уже более 20 лет используются для многоцветного мечения. В то же время поведение ФБ во временном домене изучено менее подробно. Как правило, время жизни флуоресценции ФБ жестко привязано к величине квантового выхода флуоресценции (КВФ) и в пределах спектральной группы ФБ варьирует достаточно слабо, однако существует ряд исключений из этого правила – выявлены белки с увеличенным [1–5] или укороченным [6] временем жизни. В этих случаях увеличение или уменьшение времени жизни не приводит к пропорциональному изменению величины КВФ, что свидетельствует о том, что взаимосвязь этих характери-

стик может различаться не только для химически отличающихся хромофоров, но и для идентичного хромофора в разном белковом окружении [7]. Таким образом, открываются возможности для дизайна ярких ФБ, имеющих одинаковый хромофор, но различающихся по времени жизни флуоресценции. На данный момент не существует модели, достоверно предсказывающей время жизни флуоресценции флуорофоров в зависимости от их окружения, а поиск новых ФБ с разными временами жизни с помощью случайного мутагенеза представляется достаточно трудоемким. В связи с этим перспективным представляется изучение поведения модельных веществ, имитирующих строение хромофоров ФБ, в различных средах, в свою очередь, моделирующих ближайшее аминокислотное окружение хромофора в составе белка.

В настоящей работе мы изучили влияние среды на оптические характеристики модельного хромофора белка CFP (соединение (I), схема 1, табл. 1) и выявили ряд закономерностей. В использованную выборку растворителей вошли различные полярные протонные и апротонные вещества, вещества различной степени гидрофобности и вязкости, а также ароматические соединения, фторированные производные и различные амины. В большинстве случаев время жизни флуоресценции колебалось в области 5.0–5.7 нс и практически не зависело от полярности растворителя. Заметное отличие наблюдалось в ряду различных ароматических растворителей (производных бензола), у которых эта величина снижалась на 0.5–1.0 нс. Еще ниже она оказывалась в различных аминах (до 1.5 нс), а в сильно липофильных средах фторированных растворителей наблюдался ее рост (>6 нс). Также мы показали, что для данного хромофора нет прямой корреляции между КВФ и временем жизни. Так, наибольшие значения КВФ наблюдались для вышеупомянутых ароматических растворителей, в которых время жизни флуоресценции было сравнительно коротким. Значительное падение одновременно КВФ и среднего времени жизни флуоресценции наблюдалось в аминах, однако в этом случае кинетика затухания флуоресценции описывалась биэкспоненциальной моделью, что, как мы предполагаем, связано с наличием отдельного процесса гашения флуоресценции, например, за счет переноса электрона от растворителя [8]. Неожиданным наблюдением стало очень слабое влияние вязкости на оптические свойства – в ряду различных спиртов характеристики оказались схожими.



Хромофор белка CFP (I)

Схема 1. Хромофор белка CFP и модельное соединение (I).

Среди аминокислотных остатков близкого хромофорного окружения флуоресцентных белков семейства CFP можно выделить Arg96, Gln183, Tyr/Ala145, His/Asp148, Thr203, Glu222 [1, 9]. Первые два остатка консервативны и вовлечены в созревание хромофора [10], остатки в положениях 145 и 148 фиксируют планарную конформацию хромофора [9], а остатки в положениях 203 и 222 могут рассматриваться как потенциальные мишени для мутагенеза при создании в хромофорном окружении условий, аналогичных исследованным в настоящей работе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры поглощения в УФ- и видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США).

(*Z*)-4-((2-(Дифторборил)-1*H*-индол-3-ил)метил)-1,2-диметил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (I) синтезировали по методике, предложенной ранее [11].

Измерение времени жизни флуоресценции производили на специально сконструированной для съемки макрообъектов установке, основанной на fdFLIM-системе LIFA (Lambert Instruments, Нидерланды). Для возбуждения флуоресценции использовали импульсный источник модулированного излучения из набора Multi-LED (Lambert Instruments, Нидерланды; $\lambda = 471$ нм, частота повторения импульсов 20 МГц). Для детекции сигнала использовали камеру Toggel (Lambert Instruments, Нидерланды) с присоединенным к ней светосильным фотообъективом 50–100/1.8 (Sigma, Япония), снабженным эмиссионным фильтром HQ510lp (Chroma, США). Калибровку системы производили с помощью калибровочного образца “зеленая акриловая пластина” ($\tau = 4.2$ нс) из набора FSK5 (Thorlabs, США). Настройку параметров детекции и математическую обра-

Таблица 1. Оптические свойства модельного соединения (I) в различных растворителях

| Растворитель | Время жизни флуоресценции, нс | Максимум поглощения, нм | Коэффициент экстинкции | Максимум эмиссии, нм | КВФ, % |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|--------|
| Вода | 5.55 | 476 | 26000 | 520 | 59 |
| Ацетонитрил | 5.71 | 460 | 25000 | 507 | 68 |
| Этилацетат | 5.28 | 468 | 27000 | 504 | 64 |
| Диэтиловый эфир | 5.50 | 475 | 29500 | 501 | 88 |
| Диметилацетамид | 5.13 | 470 | 27000 | 510 | 63 |
| Диоксан | 5.15 | 472 | 26000 | 502 | 65 |
| Метилэтилкетон | 5.32 | 469 | 26000 | 509 | 59 |
| Циклогексанон | 5.16 | 470 | 24500 | 514 | 64 |
| NMP | 5.07 | 468 | 27000 | 510 | 41 |
| Диметилсульфооксид | 5.08 | 479 | 29500 | 512 | 62 |
| Уксусная кислота | 5.61 | 479 | 28000 | 515 | 66 |
| Октан | 5.70 | | Плохо растворим | | |
| Метанол | 5.64 | 475 | 29000 | 512 | 54 |
| Этанол | 5.51 | 482 | 29000 | 516 | 66 |
| Пропанол-1 | 5.46 | 486 | 29000 | 514 | 62 |
| Бутанол-1 | 5.41 | 486 | 27500 | 515 | 70 |
| Гексанол-1 | 5.40 | 487 | 29000 | 515 | 75 |
| Деканол-1 | 5.46 | 488 | 28500 | 515 | 69 |
| Додеканол-1 | 5.38 | 489 | 24500 | 512 | 72 |
| Изоамиловый спирт | 5.47 | 489 | 27500 | 512 | 71 |
| Изопропанол | 5.53 | 485 | 29500 | 507 | 69 |
| Бутанол-2 | 5.37 | 484 | 29000 | 514 | 65 |
| Октанол-2 | 5.40 | 489 | 29500 | 507 | 74 |
| Третбутанол | 5.52 | 486 | 31500 | 515 | 64 |
| Хлороформ | 5.48 | 481 | 29000 | 514 | 74 |
| Дихлорэтан | 5.44 | 472 | 28500 | 508 | 71 |
| Дихлорметан | 5.51 | 474 | 30000 | 509 | 80 |
| Триэтиламин | 1.44 | 485 | 24000 | 504 | 11 |
| TMEDA | 1.62 | 478 | 28000 | 504 | 10 |
| N-Этилморфолин | 3.21 | 479 | 27000 | 510 | 30 |
| Трифторэтанол | 6.43 | 478 | 28000 | 519 | 60 |
| Перфторбензол | 6.34 | 470 | 22000 | 505 | 61 |
| Фтортолуол | 6.63 | 474 | 25500 | 505 | 61 |
| Фторацетон | 5.65 | 484 | 28000 | 530 | 35 |
| Тетрафторпропан | 5.92 | 476 | 24500 | 519 | 59 |
| Октафторпентанол | 6.04 | 473 | 28000 | 519 | 61 |
| Дихлорбензол | 4.95 | 482 | 26500 | 510 | 76 |
| Хлорбензол | 4.89 | 480 | 28500 | 509 | 74 |
| Бензол | 4.73 | 480 | 28500 | 504 | 75 |
| Толуол | 4.74 | 480 | 28500 | 502 | 78 |
| Пиридин | 4.70 | 478 | 27000 | 515 | 66 |

Примечание: NMP – N-метилпирролидон, TMEDA – тетраметилэтилендиамин.

ботку данных производили с помощью программы LIFA Tau Software 1.2.0 (Lambert Instruments, Нидерланды).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перспективной модификацией белка CFP служит введение липофильных остатков (например, Leu, Ile в положения 203 и 222 полипептидной цепи) в белковое окружение хромофора для увеличения времени жизни флуоресценции или ароматических и амин-содержащих остатков (например, Trp или Phe в положение 203 и Lys в положение 222 полипептидной цепи) для его снижения.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00255).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Goedhart J., Stetten D., Noirclerc-Savoye M., Lelimosin M., Joosen L., Hink M.A., van Weeren L., Gadella T.W.J., Royant A.* // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 751–755.
<https://doi.org/10.1038/ncomms1738>
2. *Sarkisyan K.S., Goryashchenko A.S., Lidsky P.V., Gorbachev D.A., Bozhanova N.G., Gorokhovatsky A.Y., Perezveva A.R., Ryumina A.P., Zherdeva V.V., Savitsky A.P., Solntsev K.M., Bommarius A.S., Sharonov G.V., Lindquist J.R., Drobizhev M., Hughes T.E., Rebane A., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // *Biophys. J.* 2015. V. 109. P. 380–389.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.018>
3. *Bindels D.S., Haarbosch L., van Weeren L., Postma M., Wiese K.E., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., Hink M.A., Gadella T.W.J.* // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 53–56.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
4. *Matela G., Gao P., Guigas G., Eckert A., Nienhaus K., Nienhaus G.* // *Chem. Commun.* 2017. V. 53. P. 979–982.
<https://doi.org/10.1039/C6CC09081H>
5. *Piatkevich K.D., Malashkevich V.N., Morozova K.S., Nemkovich N.A., Almo S.C., Verkhusha V.V.* // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 1847.
<https://doi.org/10.1038/srep01847>
6. *Mamontova A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 13224.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31687-w>
7. *Плетнева Н.В., Горячева Е.А., Артемьев И.В., Архипова С.Ф., Плетнев В.З.* // *Биорг. химия.* 2019. T. 45. С. 339–347. [*Pletneva N.V., Goryacheva E.A., Artemyev I.V., Arkhipova S.F., Pletnev V.Z.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 187–194].
<https://doi.org/10.1134/S0132342319030047>
8. *Inada T.N., Kikuchi K., Takahashi Y., Ikeda H., Miyashi T.* // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2000. V. 137. P. 93–97.
[https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(00\)00352-X](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(00)00352-X)
9. *Malo G.D., Pouwels L.J., Wang M., Weichsel A., Montfort W.R., Rizzo M.A., Piston D.W., Wachter R.M.* // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 9865–9873.
<https://doi.org/10.1021/bi602664c>
10. *Wood T.I., Barondeau D.P., Hitomi C., Kassmann C.J., Tainer J.A., Getzoff E.D.* // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 16211–16220.
<https://doi.org/10.1021/bi051388j>
11. *Baleeva N.S., Tsarkova A.S., Baranov M.S.* // *Tet. Lett.* 2016. V. 57. P. 3043–3045.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.06.006>

Lability of Stationary and Time-Resolved Optical Properties of the Conformationally-Locked CFP Chromophore Derivative

A. M. Bogdanov*, D. A. Gorbachev*, E. R. Zaitseva*, **, A. Yu. Smirnov*, N. S. Baleeva*, #, and M. S. Baranov*, ***

#Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

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

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

***Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

The solvatochromic behavior of a model compound mimicking the chromophore of cyan fluorescent protein (CFP) in the spectral and time domains has been studied. Analysis of the time-resolved fluorescent signal, carried out in 40 solvents belonging to different classes, showed that the lipophilic environment promotes an increase, while aromatic solvents and tertiary amines — a decrease in the fluorescence lifetime of the chromophore. Based on this study, the possible rational design of CFP-like proteins was proposed.

Keywords: imidazolones, chromophores, cyan fluorescent protein, CFP, optical properties