

СОДЕРЖАНИЕ

Том 46, номер 2, 2020

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.

- Исследование растительных кумаринов. 18. Конъюгаты кумаринов с лупановыми тритерпеноидами и 1,2,3-триазолами: синтез и противовоспалительная активность
A. В. Липеева, М. П. Долгих, Т. Г. Толстикова, Э. Э. Шульц 115
- 5-алкилтиометильные производные 2'-дезоксинуридина: синтез и антибактериальная активность
С. Д. Негря, Д. А. Макаров, П. Н. Сольев, И. Л. Карпенко, О. В. Чехов, А. А. Глухова, Б. Ф. Васильева, И. Г. Сумарукова, О. В. Ефременкова, С. Н. Кочетков, Л. А. Александрова 124
- Синтез новых L-гомосерин лактонов на основе халкона и оценка их способности ингибировать чувство кворума
Chunying Luo, Pan Li, Haoyue Liu, Pengxia Feng, Jieming Li, Liutao Zhao, and Chun-Li Wu 131
- Влияние агентов, чувствительных к кворуму, против *Pseudomonas aeruginosa*
M. Asif and M. Imran 132
- Модификация олигопептидов с целью повышения эффективности их взаимодействия с интерлейкином-8 в плазме крови человека
О. В. Грибовская, В. П. Мартинович, Д. А. Макаревич, В. П. Голубович, Т. В. Рябцева, В. В. Кирковский 133
- Особенности пространственной структуры мутантной формы L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* в комплексах с аспарагиновой и глутаминовой аминокислотами
В. И. Тимофеев, Н. Е. Жухлистова, И. П. Куранова 140
- Димеры и тримеры хондроитина в молекулярном докинге с бычьей тестикулярной гиалуронидазой
А. В. Максименко, Р. Ш. Бибилашвили 151
- Компьютерное моделирование и синтез потенциальных ингибиторов тирозинкиназы BCR-ABL с мутацией T315I
А. Н. Федоркевич, О. Л. Шарко, В. В. Шманай 158
- Одновременное определение тиреотропного гормона и свободного тироксина в сухих пятнах крови человека с использованием фосфоресцентных наночастиц
Н. И. Бекман, С. Ю. Ларичева, Т. А. Быченкова, В. Г. Помелова, Н. С. Осин 170
- Идентификация и характеристика микроРНК *Batrachuperus karlschmidti* с помощью платформы глубокого секвенирования ILLUMINA
Yong Huang, Jianli Xiong, and Xihong Sun 180
- Оптимизация твердофазного синтеза бета-амилоида (1-40) и получение антител, выявляющих его в условиях иммуноблота
Т. Д. Волкова, Д. О. Короев, А. В. Камынина, М. П. Филатова, А. В. Аветисян, О. М. Вольпина 181

Ингибирование роста бактериальной пленки, гемолитическая активность и соотношение структура–активность *N*-(2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-6-ил)-4-нитро-*N*-(замещенных бензил)бензенсульфонамидов

Muhammad A. Abbasi, M. Irshad, Aziz-ur-Rehman, Sabahat Z. Siddiqui, Syed A. Ali Shah, and M. Shahid

188

Исследование фототоксического эффекта новых замещенных производных фуридигидрохинолина – потенциальных средств для фототерапии псориаза

Е. Н. Ходот, А. Б. Шевелев, А. В. Шибаева, М. С. Смирнова, Н. В. Позднякова, О. О. Рябая, Е. С. Богданова, М. А. Гусева, В. А. Волнухин, В. А. Кузьмин

189

Синтез и противомикробная активность бензилиденгидразидов глицирретовой кислоты

Л. А. Балтина, Р. М. Кондратенко, А. К. Булгаков

201

Влияние производных гидроксамовых кислот на васкулогенную мимикрию

А. А. Вартамян, Д. А. Хоченков, Ю. А. Хоченкова, Ю. С. Мачкова, Д. С. Хачатрян, А. В. Колотаев, А. Н. Балаев, К. А. Охманович, В. Н. Осипов

207

Письмо редактору

Способ эмульсионной ПЦР-амплификации ДНК-библиотек с вырожденной центральной частью, предназначенный для селекции аптамеров

В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов, Р. А. Мифтахов, С. А. Лапа, А. С. Заседателев, Э. Н. Тимофеев, А. В. Чудинов

220



УДК 547.587.51.057

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КУМАРИНОВ. 18. КОНЬЮГАТЫ КУМАРИНОВ С ЛУПАНОВЫМИ ТРИТЕРПЕНОИДАМИ И 1,2,3-ТРИАЗОЛАМИ: СИНТЕЗ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ^{1, 2}

© 2020 г. А. В. Липеева*, М. П. Долгих*, Т. Г. Толстикова**, Э. Э. Шульц*, **, #

*Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН,
Россия, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 9

**Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, Россия, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

Поступила в редакцию 18.07.2019 г.

После доработки 23.08.2019 г.

Принята к публикации 19.09.2019 г.

Реакцией кумарина пеурутеницина с α, ω -дибромалканами синтезированы соответствующие 7-(ω -бромалкилокси)кумарины, взаимодействием которых с азидом натрия получены 7-(ω -азидоалкил)-замещенные производные пеурутеницина, проявившие высокую активность в Cu(I)-катализируемой реакции Хьюзгена с пропаргиловым эфиром бетулоновой кислоты. В результате реакции синтезированы 28-*O*-(хроменоалкил-триазилилметил)лупеноны. Взаимодействие пропаргилата бетулоновой кислоты с 2-азидоорезолонами в присутствии водного сульфата меди и аскорбата натрия приводит к соответствующим (фурохромен-триазилил)-20(29)-лупеноатам. У вновь синтезированного гибридного соединения тритерпеноидфурукумарина, содержащего триазольный линкер, выявлены противовоспалительные свойства на модели гистаминового воспаления.

Ключевые слова: тритерпеноиды, бетулин, кумарины, фурукумарины, азиды, 1,3-диполярное циклоприсоединение

DOI: 10.31857/S0132342320010194

ВВЕДЕНИЕ

Бетулин (I) и бетулоновая кислота (II), получаемая из бетулина, обладают комплексом важных биологических свойств и представляют интерес для создания фармакологически перспективных агентов [2, 3]. Так, химические модификации бетулина и бетулоновой кислоты по положению C28 привели к получению противовоспалительных, гепатопротекторных, антипаразитарных, противовирусных и противоопухолевых агентов [3–7]. Существенный интерес для создания селективных лекарственных агентов представляет синтез гибридных соединений, объединяющих в своей структуре две или более фармакофорные субъединицы. При этом биологически активные фрагменты комбинируются, образуя соединение лидер, имеющее более высокий аффинитет.

Недавние исследования показали, что введение в состав гибридных молекул фрагмента бе-

тулоновой кислоты, приводит к созданию эффективных агентов, обладающих минимальными побочными эффектами. Так, в качестве перспективных противовоспалительных агентов известны тритерпеноиды лупанового ряда, содержащие фрагменты 1,3,4-оксадиазолов и оксадиазол-2-оксидов. [7]. Описана интересная библиотека анти-ВИЧ-агентов, включающих фрагменты бетулина (или бетулиновой кислоты), соединенные триазольным линкером с 3-азидо-26,3'-дезокситимидином (AZT) [8]. Синтезированы конъюгаты лупановых тритерпеноидов с аскорбиновой кислотой, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса гриппа H1N1 [9]. Реакцией азид-алкинового циклоприсоединения алкиниламинов бетулоновой кислоты с алифатическими и ароматическими азидами синтезированы производные, проявляющие антиоксидантную и противовоспалительную активности [10]. Описаны триазолы 28-*O*-пропаргилового эфира бетулина, для которых выявлена противоопухолевая и антимикробная активность [11, 12].

Потенциал Cu-катализируемой реакции азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC-реак-

¹ Сообщение 17 см. [1].

² Сокращения: AZT – 3-азидо-26,3'-дезокситимидин.

Автор для связи: (тел.: +7 (383) 330-85-33; факс: +7 (383) 330-97-52; эл. почта: schultz@nioch.nsc.ru).

ции) с участием производных лупановых тритерпеноидов в качестве одного из фармакофорных фрагментов обсужден в обзорах [13, 14]. Следует отметить, что гибридные соединения типа кумарин-тритерпеноид ранее не были синтезированы. Однако синтез таких соединений весьма перспективен, поскольку описанные нами ранее 7-триазолилзамещенные кумарины и 2-триазолилфурукумарины, проявляют антикоагулянтную [15], противоопухолевую [16] и антибактериальную [17] активности. Известны также противовоспалительные агенты, содержащие 1,2,3-триазольный фрагмент в качестве линкера [18, 19]. Целью настоящей работы является синтез гибридных соединений, сочетающих фрагменты бетулоновой кислоты и кумаринов (фурукумаринов), конъюгированные через алкилтриазольный линкер, а также оценка противовоспалительной активности тритерпеновых производных новых типов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве исходного соединения использовали пропаргильный эфир бетулоновой кислоты (**III**), синтезированный по методике [20]. Новые производные кумаринов – 7-(ω -азидоалкилокси)-6-метоксиабронилкумарины (**IVa–в**) получали из растительного кумарина пеурутеницина (**V**) [21]. Взаимодействие (**V**) с дибромалканами (**VIa–в**) в присутствии K_2CO_3 в DMF гладко приводило к соответствующим 7-(ω -бромалкилокси)кумаринам (**VIIa–в**) (выход 75–92%). Реакцией кумаринов (**VIIa–в**) с азидом натрия синтезировали азиды (**IVa–в**) (выход 86–88%) (схема 1). Реакцию терминального алкина (**III**) с азидами (**IVa–в**) проводили в присутствии $CuSO_4$ (5 мол. %) и аскорбата натрия (15 мол. %) в системе CH_2Cl_2 –вода, 1 : 1 (в условиях работы [22]). После перекристаллизации выделяли соответствующие 1,4-дизамещенные 1,2,3-триазолы (**VIIIa–b**) (выход 72–75%).

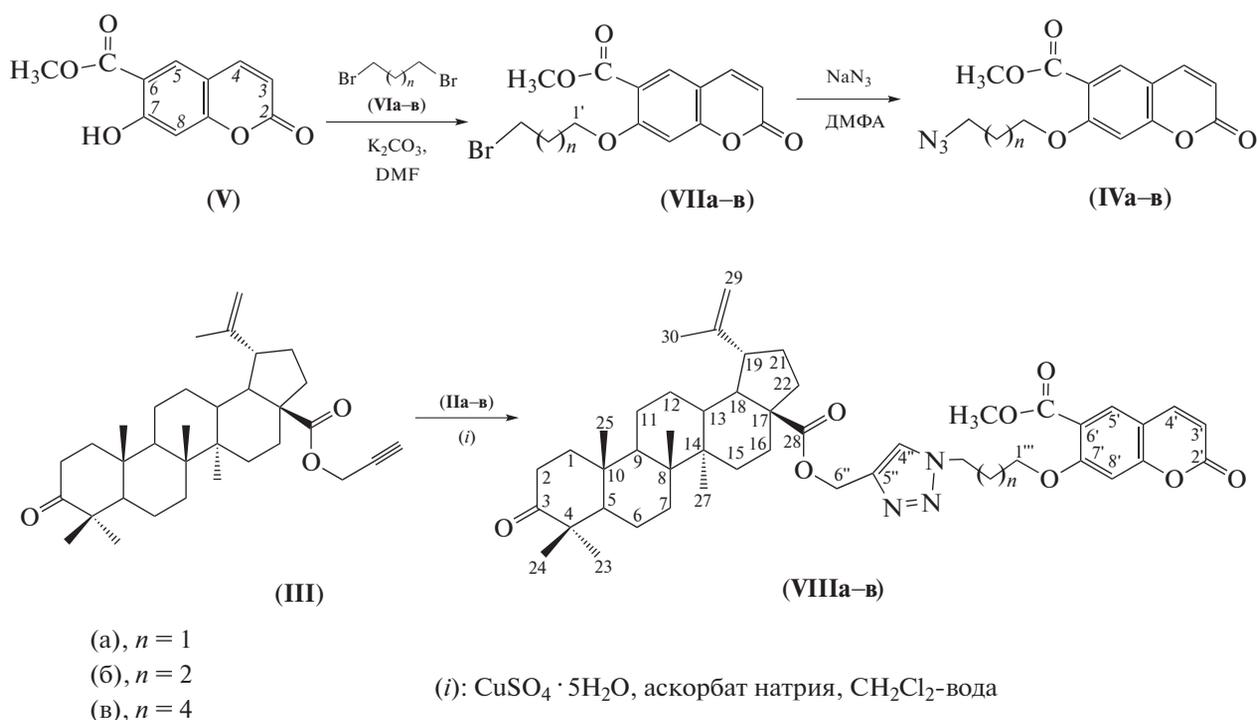


Схема 1. Синтез гибридных соединений (**VIIIa–в**).

Для получения тритерпеноид-фурукумариновых гибридов изучили взаимодействие пропаргильного эфира бетулоновой кислоты (**III**) с 2-азидоорезолоном (**IXa**) и 2-азидо-9-(*N*-метилпиперазинометил)орезолоном (**IXб**) (схема 2), синтез

которых описан нами ранее [16]. Полная конверсия исходных соединений достигалась при проведении $CuAAC$ -реакции при нагревании в течение 12 ч. Выход гибридных соединений (**Xa,б**) составляет 78–82%.

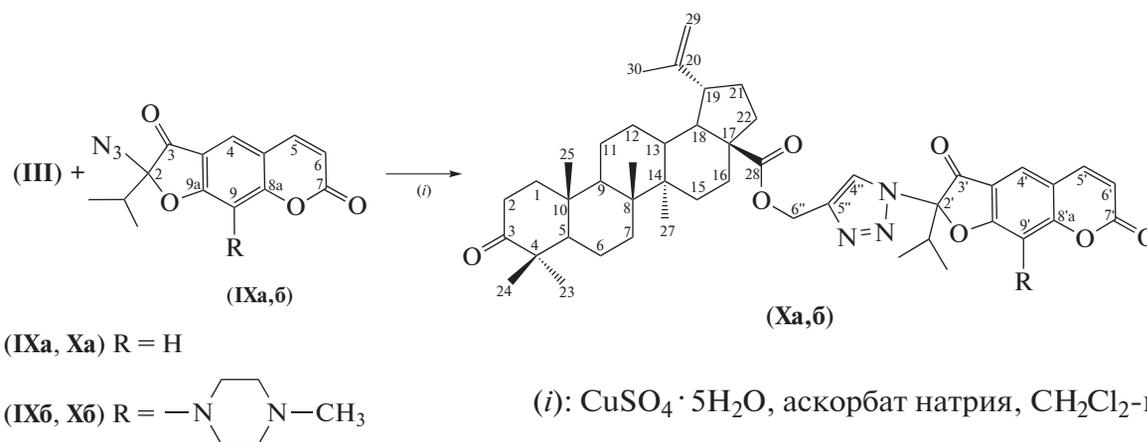


Схема 2. Синтез гибридных соединений (Xa, б).

Состав и строение новых соединений устанавливали по данным спектроскопии ИК, ЯМР ^1H и ^{13}C и элементного анализа. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C синтезированных гибридных соединений (VIIIa–в), (Xa, б) содержат характерный набор сигналов три-терпенового, кумаринового фрагментов и триазольного цикла. Протону 1,2,3-триазольного цикла в спектрах ЯМР ^1H отвечает синглет, расположенный в области 7.88–7.99 м.д. Атомам углерода этого гетероцикла в спектрах ЯМР ^{13}C соответствуют сигналы при 122.26–125.49 (дублет атома С5 в спектрах записанных в режиме J-MOD) и 139.01–143.06 м.д. (синглет атома С4). Эти данные подтверждают образование 1,4-дизамещенных 1*H*-1,2,3-триазолов в результате CuAAC-реакции [23]. Характерной особенностью спектров ЯМР ^1H и ^{13}C соединений (Xa, б) является удвоение сигналов метильных групп изопропильной

группы в положении С-2' фурукумаринового заместителя, что свидетельствует об образовании гибридных соединений в виде смеси 2(*R*)- и 2(*S*)-диастереомеров.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

Изучение противовоспалительной активности гибридных соединений (VIIIa–в), (Xa, б), бетулоновой кислоты (II), пеурутеницина (III) и препарата сравнения индометацина проводили на белых беспородных мышях массой 18–20 г (56 особей обоего пола) на гистаминовой модели воспаления. Результаты исследования приведены в табл. 1. Значительной противовоспалительной активностью обладало соединение (Xa) – конъюгат лупанового тритерпеноида с фурукумарином ореозеленом. Указанное соединение статисти-

Таблица 1. Сравнительная противовоспалительная (ПВ) активность соединений (VIIIa–в), (Xa, б), бетулоновой кислоты (II), пеурутеницина (III) и препарата индометацина

| Соединение | Доза, мг/кг | Индекс отека*, % | Размер отека относительно контроля, % | ПВ-активность, % |
|---|-------------|--------------------|---------------------------------------|------------------|
| Контроль (H_2O + гистамин) | – | 37.9 ± 0.27 | 100 | 0 |
| (II) | 50 | 32.1 ± 0.12 | 84 | 16 |
| (III) | 50 | 31.8 ± 0.08^a | 83 | 17 |
| (VIIIa) | 50 | 31.4 ± 0.05^a | 82 | 18 |
| (VIIIб) | 50 | 36.8 ± 0.28 | 97 | 3 |
| (VIIIв) | 50 | 35.7 ± 0.12 | 94 | 6 |
| (Xa) | 50 | 24.5 ± 0.013^b | 64 | 36 |
| (Xб) | 50 | 35.9 ± 0.67 | 95 | 5 |
| Индометацин | 20 | 22.4 ± 0.72^c | 59 | 41 |

^a $P < 0.05$;

^b $P < 0.005$ относительно препарата сравнения;

^c $P < 0.05$ относительно контроля.

* Индекс отека – это процент воспаления по отношению к здоровой лапе (см. экспериментальную часть). 100% -ный отек: Это отек лапы в группе животных без введения препарата (вводятся физ. раствор, затем гистамин).

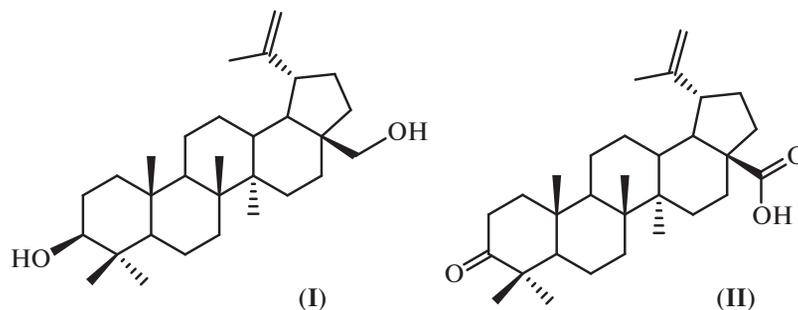


Рис. 1. Структуры лупановых тритерпеноидов.

чески значимо снижало отек лапы, вызванный введением гистамина. Введение дополнительного заместителя в положение С9 фурукумарина ореозелона приводило к потере противовоспалительной активности [соединение (Хб)]. Из гибридов бетулоновой кислоты с кумарином пеурутеницином слабый противовоспалительный эффект проявило соединение (VIIIa), содержащее линкерный алкилтриазольный фрагмент, с короткой трехзвенной алкильной цепочкой. Это соединение статистически значимо снижало отек, вызванный гистамином; его эффект был вдвое меньше эффекта конъюгата (Ха). Удлинение алкильной цепи линкера приводило к потере противовоспалительной активности [соединения VIIIб,в].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, Cu(I)-катализируемой реакцией азид-алкинового циклоприсоединения азидов кумаринов с пропаргиловым эфиром бетулоновой кислоты синтезированы гибридные соединения, сочетающие фрагменты бетулоновой кислоты и кумаринов или фурукумаринов, соединенные триазольным линкером с дополнительной алифатической цепочкой. Для конъюгата бетулоновой кислоты с растительным фурукумарином ореозелоном, выявлена достоверная противовоспалительная активность, сравнимая с эффектом нестероидного противовоспалительного препарата индометацина на модели гистаминового воспаления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C растворов соединений в CDCl_3 зарегистрированы на спектрометрах Bruker AV-400 (400 и 100 МГц соответственно). Химические сдвиги (δ , м.д.) приведены с использованием в качестве внутреннего стандарта сигналов хлороформа ($\text{H} - \delta 7.24$, $\text{C} - \delta 76.90$ м.д.). Отнесение сигналов в спектрах соединений выполнено на основе анализа спектров ЯМР ^1H и ^{13}C (JMOD) с привлечением литературных дан-

ных для бетулоновой кислоты (II) [24]. Масс-спектры высокого разрешения записаны на масс-спектрометре DFS ThermoScientific, США (температура испарителя 200°C , ионизация ЭУ, 70 эВ). Величины удельного вращения $[\alpha]_D$ измерены на поляриметре PolAAR 3005 (Великобритания).

Температура плавления измерена в термосистеме Mettler Toledo FP900 (США). ИК-спектры (ν , cm^{-1}) сняты на Фурье-спектрометре Vector-22 в таблетках с KBr. УФ-спектры поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$, нм (lg ϵ)) получены на спектрометре HP 8453 UV-Vis в растворе EtOH. Элементный анализ проведен на приборе Elemental Analyzer EA3000 (Германия). Контроль за ходом реакций осуществлен методом ТСХ на пластинах Silufol UV-254 с использованием систем: хлороформ, хлороформ–этанол, 10 : 1. Проявление в йодной камере и в УФ-свете.

Анализ чистоты веществ (Ха,б) проведен методом ВЭЖХ на приборе NexeraX2 (неподвижная фаза – сорбент Nucleosil 100-C18, 3 мкм, длина колонки 250 мм, внутренний диаметр – 2.1 мм; детекция пиков с помощью диодно-матричного детектора с диапазоном 190–700 нм). Бетулоновая кислота (II) [24], пропаргиловый эфир бетулоновой кислоты (III) [20], пеурутеницин (V) [21] и 2-азидореозелоны (IXa,б) [16] синтезированы по известным методикам. Используемые в работе реагенты: аскорбат натрия, дибромалканы (IVa–в), азид натрия, медный купорос приобретены у фирмы “Alfa Aesar”. Растворители (хлористый метилен, DMF) очищены по стандартным методикам.

Химический синтез и характеристика соединений

Метил-7-(ω -бромалкилокси)-2-оксо-2H-хромен-6-карбоксилатов (VIIa–в). К раствору 0.5 г (2.27 ммоль) пеурутеницина (V) в 50 мл DMF добавили 1.1 экв (2.5 ммоль) соответствующего дибромалкана (IVa–в) и 0.46 г (3.3 ммоль, 1.5 экв) K_2CO_3 . Реакционную смесь перемешивали 12 ч при комнатной температуре. По окончании реакции отфильтровали осадок, раствор вылили на чашку

Петри для свободного испарения. Сухой остаток кипятили в хлористом метиле (20 мл) в течение 20 мин, нерастворившийся осадок отфильтровали, раствор упарили в вакууме и высушили с азотной ловушкой.

Метил-7-(3-бромпропокси)-2-оксо-2H-хромен-6-карбоксилат (VIIa). Получен из 0.5 г пеурутеницина (V), 0.25 мл 1,3-дибромпропана и 0.46 г K_2CO_3 . Выход 0.58 г (75%). Желтое масло. Найдено, %: С 49.76; Н 4.04; Вг 23.55. $C_{14}H_{13}BrO_5$. Вычислено, %: С 49.29; Н 3.84; Вг 23.42. 1H -ЯМР: 2.34 (м, 2H, H $2'$), 3.64 (м, 2H, H $3'$), 3.84 (с, 3H, OCH $_3$), 4.17 (м, 2H, H $1'$), 6.22 (д, 1H, J 9.8, H3), 6.80 (с, 1H, H8), 7.59 (д, 1H, J 9.8, H4), 7.95 (с, 1H, H5). ^{13}C -ЯМР: 29.23, 29.62 (C $2'$, C $3'$), 52.12 (OCH $_3$), 68.35 (C $1'$), 100.80 (C8), 111.52 (C4a), 111.65 (C3), 113.97 (C6), 132.02 (C5), 142.91 (C4), 157.98 (C8a), 160.14 (C2), 161.47 (C7), 165.10 (C=O). ИК-спектр: 3074, 3056, 2946, 2921, 2852, 1739, 1699, 1623, 1444, 1382, 1282, 1257, 1228, 1216, 1207, 1155, 1132, 1076, 829, 750. УФ-спектр: 213 (4.36), 242 (4.2), 270 (3.79), 322 (4.12).

Метил-7-(4-бромбутокси)-2-оксо-2H-хромен-6-карбоксилат (VIIб). Получен из 0.5 г пеурутеницина, 0.3 мл 1,4-дибромбутана и 0.46 г K_2CO_3 . Выход 0.72 г (90%). Т. пл. 103–104°C (эфир). Найдено, %: С 50.74; Н 4.16; Вг 22.87. $C_{15}H_{15}BrO_5$. Вычислено, %: С 50.72; Н 4.26; Вг 22.50. Масс спектр: m/z 354.00972 [M] $^+$. Рассчитана M 354.0097 ($C_{15}H_{15}BrO_5$). 1H -ЯМР: 2.00–2.10 (м, 4H, H $2'$, H $3'$), 3.49 (м, 2H, H $4'$), 3.86 (с, 3H, OCH $_3$), 4.08 (м, 2H, H $1'$), 6.23 (д, 1H, J 9.8, H3), 6.77 (с, 1H, H8), 7.60 (д, 1H, J 9.8, H4), 7.95 (с, 1H, H5). ^{13}C -ЯМР: 27.37, 29.23, 33.15 (C $2'$, C $3'$, C $4'$), 52.12 (OCH $_3$), 68.35 (C $1'$), 100.65 (C8), 111.65 (C4a), 111.68 (C3), 113.97 (C6), 132.02 (C5), 142.91 (C4), 157.79 (C8a), 160.07 (C2), 161.23 (C7), 165.10 (C=O). ИК-спектр: 3457, 3083, 3062, 2950, 2927, 2852, 1733, 1702, 1621, 1444, 1380, 1288, 1280, 1220, 1205, 1153, 1132, 1106, 1076, 823, 750. УФ-спектр: 212 (4.35), 243 (4.18), 268 (3.8), 323 (4.12).

Метил-7-(6-бромгексилокси)-2-оксо-2H-хромен-6-карбоксилат (VIIв). Получен из 0.5 г пеурутеницина, 0.375 мл 1,6-дибромгексана и 0.46 г K_2CO_3 . Выход 0.79 г (92%). Т. пл. 114–115°C (эфир). Найдено, %: С 53.12; Н 4.94; Вг 20.88. $C_{17}H_{19}BrO_5$. Вычислено, %: С 53.28; Н 5.00; Вг 20.85. 1H -ЯМР: 1.52–1.85 (м, 8H, H $2'$, H $3'$, H $4'$, H $5'$, 4 × CH $_2$), 3.39 (м, 2H, H $6'$), 3.86 (с, 3H, OCH $_3$), 4.04 (м, 2H, H $1'$), 6.23 (д, 1H, J 9.8, H3), 6.78 (с, 1H, H8), 7.60 (д, 1H, J 9.8, H4), 7.94 (с, 1H, H5). ^{13}C -ЯМР: 27.21, 27.65, 28.56, 32.52, 33.50 (C $2'$, C $3'$, C $4'$, C $5'$, C $6'$), 52.07 (OCH $_3$), 69.18 (C $1'$), 100.68 (C8), 111.53 (C4a), 111.62 (C3), 113.88 (C6), 131.96 (C5), 142.94 (C4), 157.83 (C8a), 160.13 (C2), 161.49 (C7), 165.13 (C=O). ИК-спектр: 3118, 3081, 2929, 2854, 1741, 1702, 1623,

1442, 1500, 1382, 1288, 1278, 1222, 1207, 1155, 1132, 1108, 825, 750. УФ-спектр: 213 (4.35), 243 (4.18), 268 (3.78), 323 (4.13).

Метил-7-(ω-азидоалкилокси)-2-оксо-2H-хромен-6-карбоксилатов (IVa–в).

К раствору 1 ммоль бромида (VIIa–в) в 50 мл DMF добавили 1.1 экв. азидата натрия. Смесь нагревали при 70°C 10 ч, затем вылили на чашку Петри для свободного испарения. Сухой остаток растворили в 20 мл CH $_2$ Cl $_2$, промыли насыщенным раствором соли, высушили над MgSO $_4$ и упарили. После перекристаллизации из эфира получили азиды (IVa–в).

Метил-7-(3-азидопропокси)-2-оксо-2H-хромен-6-карбоксилат (IVa). Выход 86% (0.59 г). Т. пл. 62–65°C (эфир). Найдено, %: С 55.72; Н 4.12; N 13.77. $C_{14}H_{13}N_3O_5$. Вычислено, %: С 55.45; Н 4.32; N 13.86. 1H -ЯМР: 2.02 (м, 2H, H $2'$), 3.52 (м, 2H, H $3'$), 3.78 (с, 3H, OCH $_3$), 4.06 (м, 2H, H $1'$), 6.16 (д, 1H, J 9.8, H3), 6.73 (с, 1H, H8), 7.55 (д, 1H, J 9.8, H4), 7.89 (с, 1H, H5). ^{13}C -ЯМР: 29.16 (C $2'$), 51.58 (C $3'$), 68.28 (C $1'$), 52.04 (OCH $_3$), 101.16 (C8), 111.44 (C4a), 111.59 (C3), 113.82 (C6), 131.87 (C5), 142.83 (C4), 157.91 (C8a), 160.05 (C2), 161.40 (C7), 165.02 (C=O). ИК-спектр: 2948, 2929, 2850, 2100, 1726, 1666, 1621, 1442, 1380, 1286, 1257, 1218, 1207, 1153, 1105, 1076, 825, 750.

Метил-7-(4-азидобутокси)-2-оксо-2H-хромен-6-карбоксилат (IVб). Выход 0.63 г (88%). Т. пл. 98–99°C (эфир). Найдено, %: С 56.87; Н 4.85; N 13.12. $C_{15}H_{15}N_3O_5$. Вычислено, %: С 56.78; Н 4.77; N 13.24. 1H -ЯМР: 1.79–1.91 (м, 4H, H $2'$, H $3'$), 3.34 (м, 2H, H $4'$), 3.82 (с, 3H, OCH $_3$), 4.04 (м, 2H, H $1'$), 6.19 (д, 1H, J 9.8, H3), 6.74 (с, 1H, H8), 7.57 (д, 1H, J 9.8, H4), 7.91 (с, 1H, H5). ^{13}C -ЯМР: 27.63, 29.49 (C $2'$, C $3'$), 50.15 (C $4'$), 52.37 (OCH $_3$), 68.61 (C $1'$) 100.91 (C8), 111.91 (C4a), 114.23 (C3), 117.52 (C6), 132.28 (C5), 143.16 (C4), 158.41 (C8a), 160.32 (C2), 161.13 (C7), 165.07 (C=O). ИК-спектр: 3087, 2946, 2867, 2100, 1724, 1621, 1467, 1375, 1282, 1201, 1153, 1132, 1106, 1076, 825, 750.

Метил-7-(6-азидогексилокси)-2-оксо-2H-хромен-6-карбоксилат (IVв). Выход 0.67 г (86%). Т. пл. 104–105°C (эфир). Найдено, %: С 58.76; Н 5.32; N 12.19. $C_{17}H_{19}N_3O_5$. Вычислено, %: С 59.12; Н 5.55; N 12.17. 1H -ЯМР: 1.52–1.92 (м, 8H, H $2'$, H $3'$, H $4'$, H $5'$, 4 × CH $_2$), 3.35 (м, 2H, H $6'$), 3.95 (с, 3H, OCH $_3$), 4.12 (м, 2H, H $1'$), 6.30 (д, 1H, J 9.8, H3), 6.85 (с, 1H, H8), 7.71 (д, 1H, J 9.8, H4), 8.01 (с, 1H, H5). ^{13}C -ЯМР: 24.97, 25.84, 28.25 (C $2'$, C $3'$, C $4'$, C $5'$), 50.78 (C $6'$), 68.77 (C $1'$), 51.70 (OCH $_3$), 100.16 (C8), 111.10 (C4a), 113.17 (C3), 116.73 (C6), 131.65 (C5), 143.01 (C4), 157.31 (C8a), 160.16 (C2), 161.11 (C7), 164.85 (C=O). ИК-спектр: 3066, 2939, 2860, 2096, 1731, 1702, 1621, 1456, 1444, 1380, 1288, 1278, 1218, 1205, 1153, 1132, 1105, 825, 750.

(1-{3-[6-(Метоксикарбонил)-2-оксо-2H-хромен-7-илокси]алкил}-1H-1,2,3-триазол-4-илметил)-3-оксо-луп-20(29)ен-28-оаты (VIIIa–в). К раствору 0.8 ммоль азиды (IVa–в) в 10 мл хлористого метилена прибавили предварительно растворенные в 10 мл воды 15 мол. % аскорбата натрия и 5 мол. % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. В последнюю очередь добавили 0.4 г (0.8 ммоль) пропаргилата бегулоновой кислоты (III). Реакционную смесь перемешивали 3 ч при 20°C и 1 ч при 40°C. Смесь обработали 10 мл воды, слои разделили, дополнительно продукт извлекли хлористым метиленом (4 × 5 мл), объединенные экстракты промыли водой, сушили MgSO_4 , осушитель отфильтровали, растворитель упарили. После обработки эфиром выделили соединения (VIIIa–в).

(1-{3-[6-(Метоксикарбонил)-2-оксо-2H-хромен-7-илокси]пропил}-1H-1,2,3-триазол-4-илметил)-3-оксо-луп-20(29)ен-28-оат (VIIIa) получен из 250 мг (0.8 ммоль) азиды (IVa), 400 мг (0.8 ммоль) пропаргилата бегулоновой кислоты (III) в присутствии 25 мг (0.12 ммоль, 15 мол. %) аскорбата натрия, 10 мг (5 мол. %, 0.04 ммоль) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Выход 0.46 г (72%). Т. пл. 174–175°C (диэтиловый эфир). $[\alpha]_D + 13.6$ (с 1.00, CHCl_3). Найдено, %: С 70.68; Н 7.46; N 5.03. $\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_8$. Вычислено, %: С 70.92; Н 7.72; N 5.28. ^1H -ЯМР: 0.88, 0.93, 0.95, 0.98, 1.03 (все с, 15H, H25, H24, H26, H27, H23, 5 × CH_3), 1.10–1.13 (м, 2H, H5, H9), 1.22–1.38 (м, 15H, CH, CH_2), 1.65 (с, 3H, H30), 1.69 (1H, м, H12), 1.80–1.89 (4H, м, H1, H21, H22, H16), 2.25 (м, 1H, H13), 2.37 (м, 2H, H2'''), 2.42–2.46 (2H, м, H2, H19), 3.69 (м, 2H, H3'''), 3.87 (с, 3H, OCH_3), 4.21 (м, 2H, H1'''), 4.59 (уш.с, 1H, H29), 4.65 (м, 2H, H6''), 4.70 (уш.с, 1H, H29), 6.26 (д, 1H, J 9.4, H3'), 6.84 (с, 1H, H8'), 7.62 (д, 1H, J 9.4, H4'), 7.96 (с, 1H, H5'), 7.99 (с, 1H, H5''). ^{13}C -ЯМР: 14.56 (C27), 15.87 (C26), 15.90 (C25), 19.31 (C30), 19.34 (C6), 20.95 (C24), 21.31 (C11), 25.43 (C12), 26.54 (C23), 29.61 (C21), 29.63 (C2'''), 30.65 (C15), 31.72 (C3'''), 31.74 (C16), 34.06 (C7), 36.82 (C2), 36.83 (C22), 38.24 (C10), 39.57 (C13), 40.66 (C1), 42.38 (C8), 42.43 (C14), 46.73 (C19), 46.90 (C4), 49.32 (C9), 49.83 (C18), 51.28 (C6''), 52.16 (OCH_3), 54.85 (C5), 56.46 (C17), 66.44 (C1'''), 100.83 (C8'), 109.68 (C29), 111.80 (C4'a), 114.15 (C3'), 116.98 (C6'), 125.26 (C5''), 132.20 (C5'), 141.42 (C4''), 142.94 (C4'), 150.26 (C20), 157.96 (C8'a), 160.25 (C2'), 161.54 (C7'), 165.17 (C=O), 175.07 (C28), 211.11 (C3). ИК-спектр: 3077, 2948, 2931, 2869, 1729, 1621, 1461, 1454, 1444, 1378, 1286, 1257, 1207, 1153, 1132, 1105, 1076, 825, 786, 750. УФ-спектр: 242 (4.39), 268 (3.94), 322 (4.31).

(1-{3-[6-(Метоксикарбонил)-2-оксо-2H-хромен-7-илокси]бутил}-1H-1,2,3-триазол-4-илметил)-3-оксо-луп-20(29)ен-28-оат (VIIIb) получен из 255 мг (0.8 ммоль) азиды (IVb) и 400 мг (0.8 ммоль) (III) в присутствии 25 мг аскорбата натрия и 10 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Выход 0.5 г (77%).

Т. пл. 181–182°C (эфир). $[\alpha]_D + 14.4$ (с 1.00, CHCl_3). Найдено, %: С 71.26; Н 8.17; N 5.25. $\text{C}_{48}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_8$. Вычислено, %: С 71.17; Н 7.84; N 5.19. ^1H -ЯМР: 0.89, 0.93, 0.95, 0.99, 1.04 (все с, 15H, H25, H24, H26, H27, H23, 5 × CH_3), 1.09–1.13 (м, 2H, H5, H9), 1.22–1.45 (м, 15H, CH, CH_2), 1.59 (1H, м, H12), 1.66 (с, 3H, H30), 1.78–1.91 (4H, м, H1, H21, H22, H16), 2.03 (м, 2H, H3'''), 2.15 (м, 2H, H2'''), 2.25 (м, 1H, H13), 2.38–2.46 (2H, м, H2, H19), 3.48–3.53 (м, 2H, H4'''), 3.89 (с, 3H, OCH_3), 4.10 (м, 2H, H1'''), 4.59 (уш.с, 1H, H29), 4.65 (м, 2H, H6''), 4.71 (уш.с, 1H, H29), 6.27 (д, 1H, J 9.4, H3'), 6.81 (с, 1H, H8'), 7.62 (д, 1H, J 9.4, H4'), 7.96 (с, 1H, H5'), 7.98 (с, 1H, H5''). ^{13}C -ЯМР: 14.68 (C27), 15.75 (C26), 15.80 (C25), 19.49 (C30), 19.57 (C6), 20.96 (C24), 21.33 (C11), 25.45 (C12), 26.55 (C23), 27.37, 29.25 (C2'', 3''), 29.28 (C21), 30.40 (C15), 31.81 (C16), 33.30 (C4'''), 34.09 (C7), 36.70 (C2), 36.84 (C22), 38.26 (C10), 39.56 (C13), 40.66 (C1), 42.38 (C8), 42.40 (C14), 46.75 (C19), 47.28 (C4), 49.33 (C9), 49.83 (C18), 51.31 (C6''), 52.26 (OCH_3), 54.87 (C5), 56.48 (C17), 68.27 (C1'''), 100.65 (C8'), 109.68 (C29), 111.67 (C4'a), 112.95 (C3'), 114.05 (C6'), 122.26 (C5'''), 132.16 (C5'), 141.11 (C4''), 143.02 (C4'), 150.29 (C20), 157.84 (C8'a), 160.24 (C2'), 161.21 (C7'), 165.17 (C=O), 175.10 (C28), 218.25 (C3). ИК-спектр: 3143, 3075, 2947, 2868, 1728, 1620, 1579, 1455, 1444, 1378, 1287, 1256, 1219, 1205, 1152, 1130, 1105, 1075, 964, 823, 784, 749. УФ-спектр: 242 (4.45), 302 (4.31), 323 (4.39).

(1-{3-[6-(Метоксикарбонил)-2-оксо-2H-хромен-7-илокси]гексил}-1H-1,2,3-триазол-4-илметил)-3-оксо-луп-20(29)ен-28-оат (VIIIв) получен из 250 мг (0.72 ммоль) азиды (IVв) и 350 г (0.72 ммоль) (III) в присутствии 21 мг аскорбата натрия (15 мол. %) и 9 мг (5 мол. %) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Выход 0.45 г (75%). Т.пл. 188–189°C (эфир). $[\alpha]_D + 23.02$ (с 1.00, CHCl_3). Найдено, %: С 71.31; Н 8.30; N 5.12. $\text{C}_{50}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_8$. Вычислено, %: С 71.66; Н 8.06; N 5.01. ^1H -ЯМР: 0.89, 0.93, 0.95, 0.99, 1.04 (все с, 15H, H25, H24, H26, H27, H23, 5 × CH_3), 1.09–1.13 (м, 2H, H5, H9), 1.22–1.42 (м, 15H, CH, CH_2), 1.53 (м, 4H, H3''', H4'''), 1.60–1.63 (1H, м, H12), 1.66 (с, 3H, H30), 1.79–1.93 (8H, м, H1, H21, H22, H16, 2 H2''', 2 H5'''), 2.21–2.27 (м, 1H, H13), 2.37–2.48 (2H, м, H2, H19), 3.39–3.45 (м, 2H, H6'''), 3.88 (с, 3H, OCH_3), 4.06 (м, 2H, H1'''), 4.58 (уш.с, 1H, H29), 4.65 (м, 2H, H6''), 4.71 (уш.с, 1H, H29), 6.25 (д, 1H, J 9.8, H3'), 6.81 (с, 1H, H8'), 7.61 (д, 1H, J 9.8, H4'), 7.94 (с, 1H, H5'), 7.97 (с, 1H, H5''). ^{13}C -ЯМР: 15.68 (C27), 15.91 (C26), 15.93 (C25), 19.34 (C30), 19.38 (C6), 20.98 (C24), 21.34 (C11), 25.05 (C12), 26.11 (C23), 27.53, 27.70 (C3''', 4'''), 28.59 (C5'''), 28.86 (C21), 30.12 (C15), 31.82 (C16), 32.54 (C2'''), 33.64 (C6'''), 34.09 (C7), 36.83 (C2), 36.85 (C22), 38.26 (C10), 39.69 (C13), 40.69 (C1), 42.33 (C8), 42.38 (C14), 47.25 (C19), 47.28 (C4), 49.35 (C9), 49.50

(C18), 51.31 (C6"), 52.07 (OCH₃), 54.89 (C5), 56.49 (C17), 69.16 (C1"), 100.67 (C8'), 109.72 (C29), 113.91 (C4'a), 113.94 (C3'), 117.21 (C6'), 125.49 (C5"), 132.07 (C5"), 139.01 (C4"), 143.03 (C4'), 150.26 (C20), 157.96 (C8'a), 160.25 (C2'), 161.54 (C7'), 165.17 (C=O), 175.07 (C28), 211.11 (C3). ИК-спектр: 3147, 3081, 2928, 1731, 1620, 1579, 1461, 1456, 1378, 1287, 1256, 1218, 1205, 1151, 1129, 1105, 1075, 1012, 967, 824, 785, 749. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lg ϵ): 242 (4.32), 268 (3.91), 323 (4.27).

{[1-(2-Изопропил-3,7-диоксо-3,7-дигидро-2H-фууро[3,2-g]хромен-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил]-метил}-3-оксо-20(29)-лупен-28-оат (Xa). Смесь 350 мг (1 ммоль) 2-азидоорезелона (IXa), 492 мг (1 ммоль) пропаргилата бетулоновой кислоты (III), 13 мг (0.5 ммоль) CuSO₄ · 5H₂O и 40 мг (2 ммоль) аскорбата натрия в растворе CH₂Cl₂/H₂O (в соотношении 2 : 1) перемешивали при 40°C 12 ч. Реакционную смесь охлаждали и разбавляли небольшим количеством H₂O, продукт экстрагировали CH₂Cl₂ (4 × 10 мл). Объединенный экстракт сушили над MgSO₄, растворитель удаляли в вакууме, полученное вещество подвергали сушке в вакууме масляного насоса. Выход: 0.647 г (82%). Чистота по ВЭЖХ 95%. Т. пл. 245–246°C (эфир). Найдено, %: C 72.21; H 7.87; N 5.21. C₄₇H₅₉N₃O₇. Вычислено, %: C 72.56; H 7.64; N 5.40. ¹H-ЯМР: 0.71, 0.85, 0.90, 0.97, 0.99 (все с, 15H, 5 × CH₃), 0.86 (м, 1H, CH₅), 0.99, 1.01 (оба д, 6H, J 7.0, 2 × CH₃, i-Pr), 1.02–1.05 (м, 1H, CH₉), 1.19–1.39 (м, 15H, CH, CH₂), 1.51–1.55 (2H, м, H1, H12), 1.62 (с, 3H, H30), 1.77–1.89 (3H, м, H21, H22, H16), 2.14–2.21 (м, 1H, H13), 2.30–2.48 (2H, м, H2, H19), 3.17 (м, 1H, H-iPr), 4.55 (уш.с, 1H, H29), 4.65 (уш.с, 2H, H6"), 4.72 (уш.с, 1H, H29), 6.39 (д, 1H, J 9.7, H6'), 7.09 (с, 1H, H9'), 7.70 (д, 1H, J 9.7, H5'), 7.80 (с, 1H, H4'), 7.88 (с, 1H, H5"). ¹³C ЯМР: 14.50 (C27), 15.36 (C26), 15.51, 15.68 (2 × CH₃, i-Pr), 15.90 (C25), 19.21 (C11), 19.50 (C6), 20.99 (C24), 21.02 (C6), 25.33 (CH), 25.37 (C12), 25.89 (C23), 29.44 (C21), 30.33 (C15), 31.76 (C16), 33.93 (C7), 36.78 (C2), 37.25 (C22), 39.02 (C10), 39.52 (C13), 40.47 (C1), 42.33 (C8), 42.36 (C14), 46.80 (C19), 47.25 (C4), 49.13 (C9), 49.76 (C18), 51.32 (C6"), 54.87 (C-5), 56.45 (C17), 98.43 (C2'), 101.17 (C9'), 109.73 (C29), 115.70 (C3'a), 115.79 (C4'a), 116.45 (C6'), 123.87 (C5"), 125.74 (C4'), 142.83 (C5'), 143.06 (C4"), 150.13 (C20), 158.53 (C9'a), 161.78 (C8'a), 171.58 (C7'), 175.99 (C28), 191.42 (C3'), 217.87 (C3). ИК спектр, ν , см⁻¹: 3083, 3060, 3023, 2956, 2925, 2869, 2854, 1733, 1675, 1629, 1579, 1490, 1444, 1432, 1394, 1342, 1299, 1236, 1213, 1141, 1108, 1076, 948. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (lg ϵ): 220 (4.11), 225 (4.09), 245 (4.31), 287 (3.97), 305 (3.92), 323 (4.01).

2-[1-(2-Изопропил-9-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-3,7-диоксо-3,7-дигидро-2H-фууро[3,2-g]хромен-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил]метил]-

3-оксо-20(29)-лупен-28-оат (Xб). Смесь 350 мг (0.9 ммоль) 2-азидо-9-замещенного ореозелона (IXб), 443 мг (0.9 ммоль) пропаргилата бетулоновой кислоты (III), 11 мг (0.045 ммоль) CuSO₄ · 5H₂O и 2.7 мг (0.14 ммоль) аскорбата натрия в смеси CH₂Cl₂–H₂O (2 : 1, v/v) перемешивали при 40°C 12 ч. Реакционную смесь охлаждали и разбавляли небольшим количеством H₂O, продукт экстрагировали CH₂Cl₂ (4 × 10 мл). Экстракт сушили над MgSO₄, растворитель удаляли в вакууме, полученное вещество подвергали сушке в вакууме масляного насоса. Выход: 0.54 г (78%). Чистота по ВЭЖХ 94%. Т. пл. 184–185°C (эфир). Найдено, %: C 71.11; H 8.94; N 7.92. C₅₃H₇₁N₅O₇. Вычислено, %: C 71.51; H 8.04; N 7.87. ¹H-ЯМР: 0.88, 0.90, 0.92, 0.96, 0.98 (все с, 15H, 5CH₃), 0.84–0.93 (м, 1H, H5), 1.15, 1.09 (оба д, 6H, J 7.0, 2 × CH₃, i-Pr), 1.04–1.10 (м, 1H, H9), 1.28–1.45 (м, 15H, CH, CH₂), 1.53–1.69 (2H, м, H1, H12), 1.65 (с, 3H, H30), 1.75–1.92 (м, 7H, 3H, CH₂-16,21,22 и 4H, пиперазино), 2.21 (с, 3H, CH₃), 2.16–2.41 (м, 5H, H13 и 4H, пиперазино), 2.32–2.49 (м, 2H, H2, H19), 3.26–3.36 (м, 1H, CH), 4.57 (уш.с, 1H, H29), 4.61 (уш.с, 2H, H6"), 4.66 (уш.с, 2H, CH₂-при C9'), 4.70 (уш.с, 1H, H29), 6.65 (уш.д, 1H, J 9.7, H6'), 7.61 (уш.д, 1H, J 9.7, H5'), 7.72 (с, 1H, H4'), 7.99 (с, 1H, H5"). ¹³C-ЯМР: 14.44 (C27), 15.30 (C26), 15.85 (CH₃), 15.88 (CH₃), 15.91 (C25), 19.42 (C30), 19.44 (C6), 20.93 (C24), 21.20 (C11), 25.31 (CH), 25.40 (C12), 26.14 (C23), 29.38 (C21), 30.27 (C15), 31.70 (C16), 33.87 (C7), 36.73 (C2), 37.28 (C22), 39.18 (C10), 39.46 (C13), 40.42 (C1), 42.12 (C8), 42.27, 46.07 (4C, пиперазино), 42.36 (C14), 46.68 (C19), 47.23 (C4), 47.38 (CH₂ при C9'), 49.07 (C9), 49.70 (C18), 51.21 (C6"), 54.17 (NMe), 54.65 (C5), 56.39 (C17), 98.43 (C2'), 101.11 (C9'), 110.42 (C29), 115.64 (C3'a), 116.32 (C4'a), 116.39 (C6'), 125.14 (C5"), 125.26 (C4'), 142.77 (C5'), 143.00 (C4"), 150.07 (C20), 158.47 (C9'a), 161.72 (C8'a), 169.50 (C7'), 175.00 (C28), 193.03 (C3'), 216.68 (C3). ИК-спектр: 3103, 3060, 3013, 2946, 2908, 2875, 2814, 1733, 1677, 1629, 1576, 1487, 1442, 1419, 1394, 1342, 1218, 1206, 1203, 1141, 1105, 1006, 945. УФ-спектр: 220 (4.30), 255 (4.18), 294 (3.99), 306 (3.85).

Изучение противовоспалительной активности

Животные. Животных (белых беспородных мышей) для исследования, полученных из вивария ФИЦ института цитологии и генетики СО РАН, содержали в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде.

Противовоспалительную активность изучали на модели гистаминового отека [25]. Животных делили на группы по 8 особей в каждой. Исследуемые соединения вводили однократно в желудок в водно-твиновой суспензии. Через 1 ч после вве-

дения исследуемых веществ вводили 0.1% раствор гистамина (0.05 мл) под апоневроз левой задней лапы. По прошествии 5 ч после введения флогогена животных умерщвляли, отрезали задние лапы по линии запястного сустава и измеряли их массу. Противовоспалительную активность представляли в виде среднего для каждой группы значения процента воспаления. Процент воспаления (индекс отека) рассчитывали для каждой мышцы по следующей формуле: $ИО = [(M_{ВЛ} - M_{КЛ}) : M_{КЛ}] \times 100\%$, где $M_{ВЛ}$ – масса воспаленной лапы, $M_{КЛ}$ – масса не воспаленной лапы [25].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Химический Сервисный Центр коллективного пользования СО РАН за спектральные и аналитические исследования.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда (проекты № 17-73-10099, 18-13-00361).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводили в соответствии с Европейской Конвенцией защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes”, 1986).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Захаров Д.О., Липеева А.В., Гатилов Ю.В., Макаров А.Г., Шульц Э.Э. // Журнал орган. химии. 2019. Т. 55. Вып. 10. С. 1567–1576.
- Толстикова Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстикова А.Г. // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. Т. 13. С. 1–30.
- Шинтяпина А.В., Шульц Э.Э., Петренко Н.И., Узенкова Н.В., Толстикова Г.А., Пронкина Н.В., Кожевников В.С., Покровский А.Г. // Биоорганическая химия. 2007. Т. 33. Вып. 6. С. 579–583.
- Антимонова А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Полюшко Ю.Ф., Шакиров М.М., Иртегова И.Г., Покровский М.А., Шерман К.М., Григорьев И.А., Покровский А.Г., Толстикова Г.А. // Биоорганическая химия. 2013. Т. 39. Вып. 2. С. 206–211.
- Сорокина И.В., Баев Д.С., Жукова Н.А., Толстикова Т.Г., Антимонова А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Григорьев И.А. // Биоорганическая химия. 2013. Т. 39. Вып. 6. С. 749–752. [Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 668–670].
- Eignerova B., Tichy M., Krasulova J., Kvasnica M., Rarova L., Christova R., Urban M., Bednarczyk-Cwynar B., Hajdich M., Sarek J. // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 140. P. 403–420.
- Popov S.A., Semenova M.D., Baev D.S., Sorokina I.V., Zhukova N.A., Frolova T.S., Tolstikova T.G., Shults E.E., Turks M. // Steroids. 2019 (принята в печать) <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108443>
- Bori I.D., Hung H.-Y., Qian K., Chen C.-H., Morris-Natschke S.L., Lee K.-H. // Tetrahedron Lett. 2012. V. 53. P. 1987–1989.
- Wang H., Xu R., Shi Y., Si L., Jiao P., Fan Z., Han X., Wu X., Zhou X., Yu F., Zhang Y., Zhang L., Zhang L., Zhou D., Xiao S. // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 110. P. 376–388.
- Vasilevsky S.F., Govdi A.I., Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Baev D.S., Tolstikov G.A., Mamatyuk V.I., Alabugin I.V. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 21. P. 62–65.
- Khan I., Guru S.K., Rath S.K., Chinthakindi P.K., Singh B., Koul S., Bhushan S., Sangwan P.L. // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 108. P. 104–116
- Bebenek E., Jastrzebska M., Kadela-Tomanek M., Chrobak E., Orzechowska B., Zwolińska R., Latocha M., Mertas A., Czuba Z., Boryczka S. // Molecules. 2017. V. 22. P. 1876/1–1876/16.
- Kacprzak K., Skiera I., Piasecka M., Paryzek Z. // Chem. Rev. 2016. V. 116. P. 5689–5743.
- Czuk R., Deigner H.-P. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2019. V. 29. P. 949–958.
- Lipeeva A.V., Khvostov M.V., Baev D.S., Shakirov M.M., Tolstikova T.G., Shults E.E. // Med. Chem. 2016. V. 12. P. 674–683.
- Lipeeva A.V., Pokrovsky M.A., Baev D.S., Shakirov M.M., Bagryanskaya I.Y., Tolstikova T.G., Pokrovsky A.G., Shults E.E. // Eur. J. Med. Chem. 2015. V. 100. P. 119–128.
- Lipeeva A.V., Zakharov D.O., Burova L.G., Frolova T.S., Baev D.S., Shirokikh I.V., Evstropov A.N., Sinityna O.I., Tolstikova T.G., Shults E.E. // Molecules. 2019. V. 24. P. 21261–212623.
- Haider S., Alam M.S., Hamid H., Shafi S., Nargotra A., Mahajan P., Nazreen S., Kalle A.M., Kharbanda C., Ali Y., Alam A., Panda A.K. // Eur. J. Med. Chem. 2013. V. 70. P. 579–588.
- Reddy A.L.V.K., Kathale N.E. // Orient. J. Chem. 2017. V. 33. P. 2930–2936.
- Govdi A.I., Vasilevsky S.F., Sokolova N.V., Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Nenajdenko V.G. // Mendeleev Commun. 2013. V. 23. P. 260–261.
- Осадчий С.А., Шульц Э.Э., Шакиров М.М., Толстикова Г.А. // Изв. РАН. Серия хим. 2006. С. 362–366. [Osadchii S.A., Shul'ts E.E.; Shakirov M.M., Tolstikov G.A. // Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.), 2006, 55, 375–379].
- Lipeeva A.V., Shults E.E. // Chem. Heterocycl. Compd. 2017. V. 53. P. 1302–1309.
- Creary X., Anderson A., Brophy C., Crowell F., Funk Z. // J. Org. Chem. 2012. V. 77. P. 8756–8759.
- Petrenko N.I., Elantseva N.V., Petukhova V.Z., Shakirov M.M., Shul'ts E.E., Tolstikov G.A. // Chem. Nat. Compd. 2002. V. 38. P. 331–339.
- Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.W. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1963. V. 141. P. 369–376.

Study of Plant Coumarins. 18. Coumarin Conjugates with Lupane Triterpenoids and 1,2,3-triazoles: Synthesis and Anti-inflammatory Activity

A. V. Lipeeva*, M. P. Dolgikh*, T. G. Tolstikova**, and E. E. Shults*, **, #

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Lavrent'ev Avenue 9, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 1, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

#Phone: +7 (383) 330-85-33; fax: +7 (383) 330-97-52; e-mail: schultz@nioch.nsc.ru

The reaction of peuruthenicin with α,ω -dibromoalkanes afforded 7-(ω -bromoalkoxy)coumarins by treatment of which with sodium azide yielded 7-(ω -azidoalkyl)substituted derivatives of peuruthenicin, which showed high activity in CuAAC reaction with betulonic acid propargyl ether. As a results of the reaction, 28-O-(chromenoalkyl-triazolylmethyl)-20(29)-lupen-3-ones were synthesized. The interaction of betulonic acid propargyl ether with 2-azidooreoselones in the presence of aq. copper sulfate and sodium ascorbate in DMF led to the corresponding (furocoumarin-triazolyl)-20(29)-lupen-3-ones. The newly synthesized hybrid compound (**Xa**) possessed anti-inflammatory properties in a histamine inflammation model.

Keywords: Triterpenoids, Betulin, Coumarin, Furocoumarin, Azides, CuAAC-reaction



УДК 577.113.3.017

5-АЛКИЛТИОМЕТИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2'-ДЕЗОКСИУРИДИНА: СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2020 г. С. Д. Негря*, Д. А. Макаров*, П. Н. Сольев*, И. Л. Карпенко*, О. В. Чехов*, ***,
А. А. Глухова**, Б. Ф. Васильева**, И. Г. Сумарукова**, О. В. Ефременкова**,
С. Н. Кочетков*, Л. А. Александрова*,#

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

**Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе,
Россия, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11

***Московский физико-технический институт (государственный университет),
Россия, 141700, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер., 9

Поступила в редакцию 27.05.2019 г.

После доработки 24.06.2019 г.

Принята к публикации 05.08.2019 г.

С целью создания 5-алкилтиометильных производных 2'-дезоксинуридина, проявляющих антибактериальную активность, предложено три варианта их синтеза на основе конденсации 3',5'-диацетил-5-бромметил-2'-дезоксинуридина с соответствующими 1-меркаптанами. Синтезированы 5-гексилтиометил-, 5-октилтиометил-, 5-бис(октилтио)метил-2'-дезоксинуридин, а также α и β аномеры 5-децилтиометил-2'-дезоксинуридина. Показана выраженная цитотоксичность ряда синтезированных соединений в культуре клеток A549. 5-Гексилтиометил-2'-дезоксинуридин подавлял *in vitro* рост штамма *Mycobacterium smegmatis* mc²155 со значением МПК 200 мкг/мл. Остальные соединения не проявили антибиотического действия в отношении двух штаммов *M. smegmatis* и не ингибировали рост *Staphylococcus aureus*.

Ключевые слова: нуклеозиды, радикальное бромирование, 5-алкилтиометил-2'-дезоксинуридины, 1-меркаптаны, антибактериальная активность, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S013234232001008X

ВВЕДЕНИЕ

В двадцатом веке выделены из природных источников и/или синтезированы антибиотики и противовирусные препараты, позволившие значительно снизить смертность от инфекционных заболеваний. К настоящему времени большинство патогенных микроорганизмов и вирусов выработали резистентность к основному пулу используемых для их терапии лекарств, что делает необходимым поиск новых классов соединений, ингибирующих патогены, обладающих направленностью действия и низкой токсичностью [1].

Нам представлялось целесообразным синтезировать новые производные природных нуклеозидов и изучить их возможную антибактериальную эффективность. Нуклеотиды и нуклеозиды, являясь основными структурными единицами ДНК и РНК, участвуют в биосинтезе белков, выступают

как кофакторы многих биохимических циклов, регулируют активности ферментов метаболизма нуклеотидов. В связи с этим даже небольшие модификации нуклеинового основания или сахарного фрагмента нуклеозидов могут оказывать существенное влияние на узнавание и ингибирование соответствующих ферментов, и, таким образом, на его активность как антипатогена. В настоящий момент аналоги и производные компонентов нуклеиновых кислот являются важными элементами противораковой, противовирусной и, в значительно меньшей степени, противогрибковой терапии [3–7]. В то же время, среди представителей природных нуклеозидов [8, 9] и их синтетических аналогов антибактериальная активность обнаружена лишь недавно [10, 11], и эта область активно развивается [12].

Только в начале XXI века появились сообщения о нескольких группах модифицированных нуклеозидов, продемонстрировавших заметное антимикобактериальное действие *in vitro* [13–16]. В частности, 5-модифицированные пиримиди-

Сокращения: МПК – минимальная подавляющая концентрация, ЦД₅₀ – цитотоксическая доза.

Автор для связи: (тел.: +7 (499)-135-60-65; факс +7 (499) 135-14-05; эл. почта: ala2004_07@mail.ru).

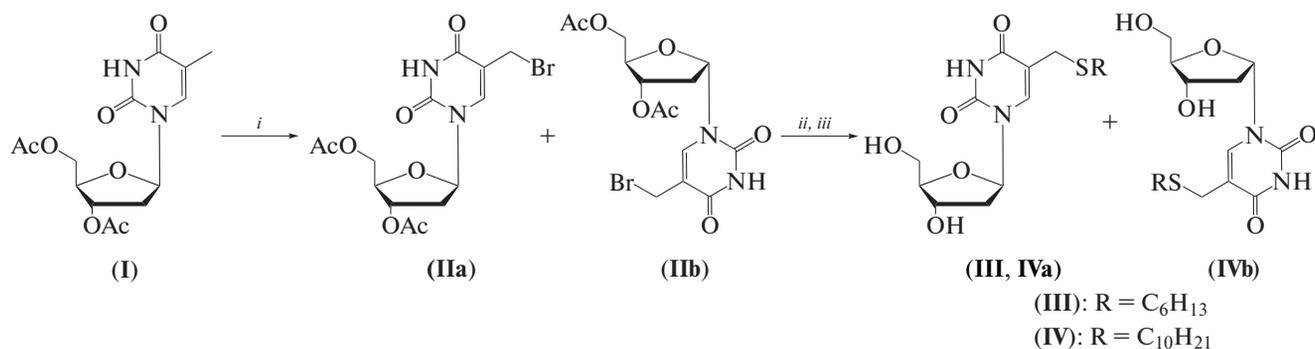
новые нуклеозиды с протяженными 1-алкинильными, алкилоксиметильными и алкилтриазолилметильными заместителями в гетероциклическом основании обладают *in vitro* ингибирующей активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis* и/или *M. avium* и *M. bovis* [17–23]. Несмотря на интенсивные исследования, биологические мишени и механизм действия этой группы соединений пока не выявлены. Гердевайн и сотр. показали, что 5'-монофосфаты 5-модифицированных 2'-дезоксинуридинов эффективно ингибируют уникальный фермент – флаavin-зависимую тимидилатсинтазу *M. tuberculosis* ThyX, практически не затрагивая основной фермент тимидилатсинтазу *M. tuberculosis* ThyA [24–27]. Поэтому можно предположить, что одной из возможных мишеней действия 5-модифицированных 2'-дезоксинуридинов является этот фермент [24–27]. С другой стороны, нами было показано, что неспособные фосфорилироваться 5'-иод-, азидо- и амино-производные 5-додецилоксиметил-2'-дезоксинуридина [21] и карбоциклические d4-5'-нор-5-(1-алкинил)уридины с протяженными 1-алкинильными [22], алкилоксиметильными и алкилтриазолилметильными [23] заместителями обладают значительной ингибирующей активностью *in vitro* в отношении микобактерий *M. tuber-*

culosis, связанной, скорее всего, с разрушением клеточной стенки микобактерии [23]. Молекулярный докинг 5'-монофосфатов 5-алкилтиометильных производных 2'-дезоксинуридина продемонстрировал их возможное связывание в активном сайте фермента *M. tuberculosis* ThyX. Поэтому мы предположили, что 5-алкилтиометильные производные 2'-дезоксинуридина могут ингибировать рост *M. tuberculosis*. Настоящая работа посвящена синтезу и изучению антибактериальной активности неизвестных ранее 5-алкилтиометильных производных 2'-дезоксинуридина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химический синтез

Ключевым соединением в синтезе соединений (III) и (IVa) (схема 1) являлся 5-бромметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридин (IIa), который получали радикальным бромированием 3',5'-ди-*O*-ацетилтимидина по опубликованному ранее методу [28]. Нуклеофильное замещение брома на соответствующие 1-меркаптаны по аналогии с разработанным нами ранее методом [29] и последующее удаление защитных групп позволили получить целевые соединения.



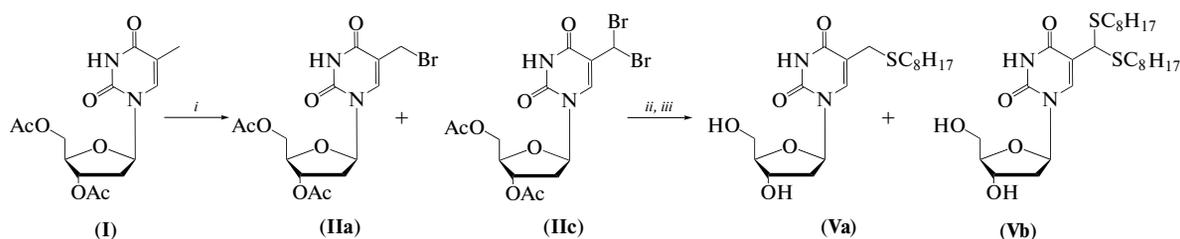
i: Br₂, дихлорэтан, hν, Δ; *ii*: RSH, DMF, 37°C; *iii*: NH₃(водн.), этанол, 20°C

Схема 1. Синтез 5-тиоалкилметильных производных 2'-дезоксинуридина (III) и (IVa, b).

Обычно в стандартных условиях проведения реакции радикального бромирования действием Br₂ в кипящем дихлорэтано в атмосфере аргона образуется, наряду с целевым β-производным (IIa), незначительное количество α-аномера 5-бромметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксинуридина (IIb), который легко отделяется при последующей хроматографической очистке. Конденсацией соединения (IIa) с 1-гексилмеркаптаном и последующим деблокированием продукта водно-спиртовым раствором аммиака нами был синтезирован 5-гексилтиометил-2'-дезоксинуридин (III).

Нам представлялось также целесообразным синтезировать α-аномер 5-децилтиометил-2'-дезоксинуридина (IVb), поскольку ранее было показано, что в ряде случаев α-аномеры модифицированных нуклеозидов проявляют антибактериальную активность не только сравнимую с действием β-производных [21], но иногда и значительно превышающую ее [30, 31]. Проведение бромирования в более концентрированном растворе брома позволило нам получить смесь α,β аномеров в соотношении 1 к 2. Конденсация смеси аномеров (IIa, b) с 1-децилмеркаптаном, последующее деблокиро-

вание водно-спиртовым раствором аммиака, и хроматография на силикагеле позволили синтезировать и выделить индивидуальные β - и α -аномеры 5-децилтиометил-2'-дезоксисуридина (**IVa**) и (**IVb**) (схема 1).



i: *N*-бромсукцинимид, азобисизобутиронитрил, дихлорэтан, Δ ; *ii*: $C_8H_{17}SH$, DMF, $37^\circ C$; *iii*: NH_3 (водн.), этанол, $20^\circ C$

Схема 2. Синтез 5-моно- и 5-бис(октилтио)метильных производных 2'-дезоксисуридина.

Данный метод является более удобным для синтеза только производных β -аномера, т.к. в ходе реакции не образуется HBr , способствующий процессу аномеризации. Более того, в качестве побочного продукта образуется 5-дибромметил-3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксисуридин (**Vb**), который может служить исходным соединением для синтеза 5-бис(алкилтио)метильных производных. Нами было показано, что использование избытка *N*-бромсукцинимид при проведении реакции позволяет получить 5-дибромметильное производное в качестве основного продукта. Таким образом, нами были разработаны условия синтеза различных 5-алкилтиометильных производных 2'-дезоксисуридина и синтезированы 5-алкилтиометильные производные 2'-дезоксисуридина (**III**), (**IVa**), (**IVb**), и (**Va**) и 5-бис(октилтио)метил-2'-дезоксисуридин (**Vb**).

Структура и чистота всех полученных соединений подтверждена с помощью УФ-, 1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии высокого разрешения.

Цитотоксичность синтезированных соединений. Цитотоксичность липофильных соединений с протяженным децильным заместителем (**IVa**), (**IVb**) и 5-бис(октилтио)метил-2'-дезоксисуридин (**Vb**), растворенных в DMSO, не удалось определить, поскольку они выпадали в осадок при добавлении к культуральной среде. Соединения (**III**) и (**Va**) продемонстрировали выраженную цитотоксичность со значениями IC_{50} 14 и 58 мкг/мл соответственно.

Антибактериальное действие полученных соединений изучали по их способности ингибировать рост микроорганизмов разработанным ранее методом [32]. В качестве тест-объектов для предва-

При синтезе 5-тиооктилового производного **5a** нами был применен альтернативный метод с использованием *N*-бромсукцинимид в качестве бромлирующего агента и азобисизобутиронитрила в качестве инициатора реакции (схема 2).

рительной оценки антимикобактериальной активности и отбора перспективных соединений для последующего тестирования против штаммов возбудителей туберкулеза *M. tuberculosis* использовали два коллекционных тест-штамма *M. smegmatis*: mc²155 и VKPM Ac 1339. Для этих штаммов при лечении туберкулеза минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков первого ряда рифампицина и изониазида различны. Из-за низкой растворимости исследуемых веществ в воде использовали смесь вода–метанол (1 : 1) или вода–метанол–Твин-80 (50 : 45 : 5). Растворы исследуемых соединений в данных смесях не превышали 10 об. % в питательной среде и сами смеси в данной концентрации не оказывали воздействия на рост бактерий. Соединения (**IVa**), (**IVb**) и (**Vb**) были нерастворимы в концентрациях, необходимых для проведения экспериментов. Растворимые соединения были активны только в максимальных исследованных концентрациях, являющихся МПК. Для соединения (**Va**) не удалось достигнуть активной концентрации. Установлено, что только 5-гексилтиометил-2'-дезоксисуридин (**III**) подавлял *in vitro* рост штамма *M. smegmatis* mc²155 со значением МПК 200 мкг/мл, но был неактивен в отношении штамма VKPM Ac 1339. Однако, значение МПК получено на пределе растворимости этого вещества и в 14 раз превышает цитотоксическую концентрацию, что делает невозможным его использование в качестве противобактериального препарата. Структура соединений (**III**) и (**Va**) будет принята нами во внимание при разработке антибактериальных средств.

В работе также использовали два штамма золотистого стафилококка, широко применяемые для

определения антибиотической активности: тест-штамм *S. aureus* FDA 209P и клинический изолят данного вида INA 00761 с множественной лекарственной устойчивостью. Исследованные соединения не проявили антибиотического действия в отношении указанных штаммов.

Таким образом, осуществлены три варианта синтеза 5-алкилтиометильных производных 2'-дезоксинуридина, позволившие синтезировать α - и β -аномеры 5-алкилтиометил-2'-дезоксинуридина. Показана противобактериальная активность соединения (III) с наименьшим из использованных (гексилным) углеводородным заместителем. Удобный метод синтеза 5-модифицированных производных 2'-дезоксинуридина позволит в дальнейшем получить новые серии нуклеозидов для создания эффективных ингибиторов репликации бактерий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие реактивы фирм "Fluka" (Германия), "Aldrich", "Sigma" (США) и "Acgus" (Бельгия). Растворители очищали по стандартным методикам.

Колоночную хроматографию проводили с использованием силикагеля Kieselgel 60 (40–63 мкм) (Merck, Германия). Спектры ЯМР (δ , м.д., КССВ, Гц) регистрировали в DMSO- d_6 на спектрометре Avance III (Bruker, США) с рабочей частотой 300 МГц для ^1H -ЯМР (внутренний стандарт – Me_4Si), 75 МГц для ^{13}C -ЯМР (внутренний стандарт – Me_4Si). УФ-спектры снимали на спектрофотометре Perkin Elmer lambda 25 (Perkin Elmer, США) в метаноле. Масс-спектры высокого разрешения получали на приборе Bruker Daltonics micrOTOF-Q II методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных ионах, в соответствии с примененными ранее условиями [32].

Цитотоксичность синтезированных соединений в культуре клеток человека A549 (линия клеток легочной аденокарциномы) оценивали методом МТТ-теста [33] с применением среды DMEM (Gibco, США) с 10% содержанием эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США). Для стерилизации растворов использовали мембраны с диаметром пор 0.22 мкм MILLEX® GP (Millipore, Ирландия).

Антибактериальную активность определяли методом серийных двукратных разведений [34]. В качестве тест-штаммов использовали *S. aureus* (FDA 209P и INA 00761) и *M. smegmatis* (VKPM Ac 1339 и mc² 155). Бактерии инкубировали при 37°C в течение 20 ч (*S. aureus*) и 48 ч (*M. smegmatis*). Об антибактериальной активности судили по наличию или отсутствию роста бактерий.

Синтез 3',5'-ди-О-ацетил-5-бромметил-2'-дезоксинуридина (IIa,b)2, и 3',5'-ди-О-ацетил-5,5-дибромметил-2'-дезоксинуридина (IIc)

Метод 1: Синтез β - и α -аномеров (IIa) и (IIb) проводили по модифицированному методу [28]. К кипящему раствору 3',5'-ди-О-ацетилтимидина (I) (6.7 г, 20 ммоль) в дихлорэтаноле (100 мл) добавляли по каплям раствор Br_2 (1.86 мл, 7.5 ммоль) в 40 мл дихлорэтанола в течение 3 ч под током сухого аргона и освещении лампой 300 В. При необходимости получения смеси аномеров поддерживали высокую концентрацию Br_2 в растворе. Затем реакционную смесь охлаждали, продували аргоном еще 1 ч и упаривали в вакууме. Полученную смесь использовали без выделения в следующей стадии.

Метод 2: Синтез 5-моно- и 5-дибромпроизводных (IIa) и (IIc) проводили по аналогии с методом [35]. К раствору 3',5'-ди-О-ацетилтимидина (1.5 г, 4.6 ммоль) в дихлорэтаноле (70 мл) добавляли *N*-бромсукцинимид (2.5 г, 13.8 ммоль) и азобисизобутиронитрил (189 мг, 1.15 ммоль). Реакционную смесь кипятили под током сухого аргона в течение 3 ч. Затем реакционную смесь охлаждали, продували аргоном еще 1 ч и упаривали в вакууме. Полученную смесь использовали без выделения в следующей стадии.

Общий метод синтеза 5-алкилтиометил-2'-дезоксинуридинов (III)–(V)

Реакционную смесь, содержащую соединение (IIa), растворяли в 5 мл DMF и добавляли соответствующий тиол (4.5–6.4 мл, 30 ммоль – для метода 1; 1.2 мл, 6.9 ммоль – для метода 2). Реакционную смесь оставляли на 24 ч при 37°C в атмосфере аргона. Затем растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в этаноле (20 мл), добавляли водный раствор аммиака (20 мл) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Полученную реакционную смесь упаривали в вакууме, остаток растворяли в системе хлороформ–этанол (5–10 мл) наносили на колонку (3 × 20 см) с силикагелем, элюировали смесью растворителей хлороформ–этанол 20 : 1.

5-Гексилтиометил-2'-дезоксинуридин 3

5-Гексилтиометил-2'-дезоксинуридин (III) получен взаимодействием β -3',5'-ди-О-ацетил-5-бромметил-2'-дезоксинуридина (IIa) и гексантиола с выходом 2.94 г (41%). ^1H -ЯМР: 11.37 (1H, с, H3), 7.83 (1H, с, H6), 6.17 (1H, т, *J* 6.8, H-1'), 5.23 (1H, уш. с., 3'-ОН), 5.00 (1H, уш.с., 5'-ОН), 4.25 (1H, дт, *J* 6.3, 3.4, H3'), 3.79 (1H, тд, *J* 3.7, 3.7, H4'), 3.62–3.52 (2H, м, H5'), 3.32 (2H, с, H5), 2.43 (2H, т, *J* 7.2, SCH₂), 2.15–2.03 (2H, м, H2'), 1.50 (2H, тт, *J* 7.5,

6.9, SCH_2CH_2), 1.34–1.22 (6H, м, $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3$), 0.85 (3H, т, J 7.1, $\text{S}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР: 162.95 (C4), 150.68 (C2), 137.53 (C6), 111.50 (C5), 87.87 (C4'), 84.50 (C1'), 70.97 (C3'), 61.87 (C5'), 40.01 (C2'), 31.45–22.50 ($\text{S}(\text{CH}_2)_5 + \text{C5}$), 14.36 ($\text{S}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$). MS (ESI) рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 359.1512 $[M + H]^+$, найдено 359.1508. УФ: λ_{max} 269.6 нм (ϵ 9800).

5-Октилтиометил-2'-дезоксинуридин (Va) получен взаимодействием производного (IIa) и октантиола с выходом 0.8 г (45%). ^1H -ЯМР: 11.36 (1H, с, H3), 7.83 (1H, с, H6), 6.17 (1H, т, J 6.8, H1'), 5.25 (1H, д, J 4.2, 3'-ОН), 5.01 (1H, т, J 5.1, 5'-ОН), 4.25 (1H, тд, J 5.8, 3.7 H3'), 3.80 (1H, тд, J 3.6, 3.6, H4'), 3.63–3.51 (2H, м, H5'), 3.32 (2H, с, H5), 2.43 (2H, т, J 7.2, SCH_2), 2.16–2.02 (2H, м, H2'), 1.49 (2H, тт, J 7.4, 7.0, SCH_2CH_2), 1.32–1.24 (10H, м, $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5$), 0.84 (3H, т, J 7.0, $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР: 162.96 (C4), 150.67 (C2), 137.54 (C6), 111.51 (C5), 87.88 (C4'), 84.54 (C1'), 70.99 (C3'), 61.87 (C5'), 40.07 (C2'), 31.69–22.52 ($\text{S}(\text{CH}_2)_7 + \text{H5}$), 14.38 ($\text{S}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$). MS (ESI) рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 387.1948 $[M + H]^+$, найдено 387.1950. УФ: λ_{max} 267.2 нм (ϵ 9800).

5-Бис(октилтио)метил-2'-дезоксинуридин (Vb) получен взаимодействием 3',5'-ди-*O*-ацетил-5,5-дибромметил-2'-дезоксинуридина (IIc) и октантиола с выходом 0.69 г (39%). ^1H -ЯМР: 11.34 (1H, с, H3), (1H, с, H3), 8.00 (1H, с, H6), 6.19 (1H, т, J 6.8, H1'), 4.90 (1H, с, H5), 4.25 (1H, дт, J 5.5, 2.7, H3'), 3.84 (1H, дт, J 3.4, 2.5, H4'), 3.61–3.51 (2H, м, H5'), 2.62–2.42 (4H, м, $(\text{SCH}_2)_2$), 2.16 (1H, ддд, J 13.2, 6.0, 2.9, H2'a), 2.03 (1H, ддд, J 13.2, 7.7, 5.7, H2'b), 1.56–1.47 (4H, м, $(\text{SCH}_2\text{CH}_2)_2$), 1.38–1.23 (20H, м, $(\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5)_2$), 0.88–0.83 (6H, т, J 7.0, $(\text{S}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3)_2$). ^{13}C -ЯМР: 161.81 (C4), 150.18 (C2), 138.08 (C6), 113.60 (C5), 88.09 (C4'), 85.06 (C1'), 71.36 (C3'), 62.10 (C5'), 44.11 (C5), 40.41 (C2'), 31.95–22.56 ($(\text{S}(\text{CH}_2)_7)_2$), 14.34 ($(\text{S}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3)_2$). MS (ESI) рассчитано для $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ 531.2802 $[M + H]^+$, найдено 531.2805. УФ: λ_{max} 267.7 нм (ϵ 9800).

5-Децилтиометил-2'-дезоксинуридин (β -аномер) (IVa) получен взаимодействием β -аномера 3',5'-ди-*O*-ацетил-5-бромметил-2'-дезоксинуридина (IIa) и декантиола с выходом 2.98 г (36%). ^1H -ЯМР: 11.34 (1H, с, H3), 7.84 (1H, с, H6), 6.18 (1H, т, J 6.8, H1'), 5.19 (1H, уш. с., 3'-ОН), 4.98 (1H, уш. с., 5'-ОН-), 4.25 (1H, дт, J 6.1, 3.1, H3'), 3.80 (1H, тд, J 3.5, 3.4, H4'), 3.62–3.52 (2H, м, H5'), 3.31 (2H, с, H5), 2.42 (2H, т, J 7.2, SCH_2), 2.15–2.02 (2H, м, H2'), 1.50 (2H, тт, J 7.4, 7., SCH_2CH_2), 1.36–1.24 (14H, м, $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7$), 0.88–0.84 (3H, т, J 6.9 Гц,

$\text{S}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР: 162.93 (C4), 150.65 (C2), 137.50 (C6), 111.49 (C5), 87.91 (C-4'), 84.54 (C1'), 71.02 (C-3'), 61.87 (C-5'), 40.16 (C2'), 31.77–22.57 ($\text{S}(\text{CH}_2)_9 + \text{H5}$), 14.39 ($\text{S}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$). MS (ESI) рассчитано для $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 415.2240 $[M + H]^+$, найдено 415.2242. УФ: λ_{max} 271.8 нм (ϵ 9800).

5-Децилтиометил-2'-дезоксинуридин (α -аномер) (IVb) получен взаимодействием α -аномера 3',5'-ди-*O*-ацетил-5-бромметил-2'-дезоксинуридина (IIb) и декантиола с выходом 2.65 г (32%). ^1H -ЯМР: 11.29 (1H, с, H3), 7.84 (1H, с, H6), 6.11 (1H, дд, J 7.6, 2.6, H1'), 4.25 (1H, дт, J 6.1, 1.9, H3'), 4.16 (1H, тд, J 4.6, 1.7 Гц, H4'), 3.40 (2H, д, J 4.5 Гц, H5'), 3.31 (2H, с, H5), 2.61–2.54 (1H, м, H2'(a)), 2.47–2.41 (3H, м, H2'(b) + SCH_2), 1.50 (2H, тт, J 7.9, 7.1, SCH_2CH_2), 1.36–1.24 (14H, м, $\text{SCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7$), 0.85 (3H, т, J 6.9, $\text{S}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$). ^{13}C -ЯМР: 163.17 (C4), 150.69 (C2), 138.53 (C6), 110.45 (C5), 89.92 (C4'), 86.24 (C1'), 70.94 (C3'), 62.21 (C5'), 40.66 (C2'), 31.79–22.58 ($\text{S}(\text{CH}_2)_9 + \text{H5}$), 14.38 ($\text{S}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$). MS (ESI) рассчитано для $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 415.2240 $[M + H]^+$, найдено 415.2237. УФ: λ_{max} 272 нм (ϵ 9800).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 17-04-00536, 17-00-00395, 17-00-00393 и 18-29-0810 и Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (тема № 01201363818).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ventola C.L.* // P. T. 2015. V. 40. P. 277–283.
2. *Brown E.D., Wright G.D.* // Nature. 2016. V. 529. P. 336–343.
3. *Jordheim L.P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C.* // Nat. Rev. Drug. Discov. 2013. V. 12. P. 447–464.
4. *Matsuda A., Sasaki T.* // Cancer Sci. 2004. V. 95. P. 105–111.
5. (a) *De Clercq E.* // Curr. Opin. Virol. 2012. V. 2. P. 572–579. (b) *De Clercq E., Li G.* // Clin. Microbiol. Rev. 2016. V. 29. P. 695–747.

6. Winn M., Goss R.J.M., Kimura K., Timothy D.H., Bugg T.D.H. // Nat. Prod. Rep. 2010. V. 27. P. 279–304.
7. Yssel A.E.J., Vanderleyden J., Steenackers H.P. // J. Antimicrob. Chemother. 2017. V. 72. P. 2156–2170.
8. Cui Z., Wang X., Koppermann S., Thorson J.S., Ducho C., Van Lanen S.J. // J. Nat. Prod. 2018. V. 81. P. 942–948.
9. Abbas M., Elshahavi S.I., Wang X., Ponomareva L.V., Sajid I., Shaaban K.A., Thorson J.S. // J. Nat. Prod. 2018. V. 81. P. 2560–2566.
10. Seydlova G., Pohl R., Zbornikova E., Ehn M., Simak O., Panova N., Kolar M., Bogdanova K., Vecerova R., Fiser R., Sanderova H., Vitovska D., Sudzinova P., Pospisil J., Benada O., Krizek T., Sedlak D., Bartunek P., Krasny L., Rejman D. // J. Med. Chem. 2017. V. 60. P. 6098–6118.
11. Bockman M.R., Engelhart C.A., Dawadi S., Larson P., Tiwari D., Ferguson D.M., Schnappinger D., Aldrich C.C. // ACS Inf. Dis. 2018. V. 4. P. 1102–1113.
12. Serpi M., Ferrari V., Pertusati F. // J. Med. Chem. 2016. V. 59. P. 10343–10382.
13. Van Calenbergh S., Pochet S., Munier-Lehmann H. // Curr. Top. Med. Chem. 2012. V. 12. P. 694–705.
14. (a) Duckworth B.P., Nelson K.M., Aldrich C.C. // Curr. Top. Med. Chem. 2012. V. 12. P. 766–796. (b) Duckworth B.P., Wilson D.J., Nelson K.M., Boshoff H.I., Barry C.E. 3rd, Aldrich C.C. // ACS Chem. Biol. 2012. V. 7. P. 1653–1658.
15. Shmalenyuk E.R., Kochetkov S.N., Alexandrova L.A. // Russ. Chem. Rev. 2013. V. 82. P. 896–915.
16. Ferrari V., Serpi M. // Future Med. Chem. 2015. V. 7. P. 291–314.
17. Rai D., Johar M., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D.Y., Kumar R. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 7012–7017.
18. Johar M., Manning T., Tse C., Desroches N., Kunimoto D.Y., Agrawal B., Kumar R. // J. Med. Chem. 2007. V. 50. P. 3696–3705.
19. (a) Srivastav N.C., Manning T., Kunimoto D.Y., Kumar R. // Bioorganic & Medical Chemistry. 2007. V. 15. P. 2045–2053. (b) Srivastav N.C., Manning T., Kunimoto D.Y., Kumar R. // Med. Chem. 2006. V. 2. P. 287–293.
20. Александрова Л.А., Шмаленюк Э.Р., Кочетков С.Н., Ерохин В.В., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н. // Acta Naturae. 2010. T. 3. C. 89–92.
21. Shmalenyuk E.R., Chernousova L.N., Karpenko I.L., Kochetkov S.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Efremenkova O.V., Alexandrova L.A. // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. P. 4874–4884.
22. Matyugina E., Khandazhinskaya A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Chizhov A., Karpenko I., Kochetkov S., Alexandrova L. // Bioorg. Med. Chem. 2012. V. 20. P. 6680–6686.
23. Khandazhinskaya A.L., Alexandrova L.A., Matyugina E.S., Solyev P.N., Efremenkova O.V., Buckheit K.W., Wilkinson M., Buckheit R.W., Jr., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L. // Molecules. 2018. V. 23. pii: E3069. <https://doi.org/10.3390/molecules23123069>
24. Kögler M., Vanderhoydonck B., De Jonghe S., Rozenski J., Van Belle K., Herman J., Louat T., Parchina A., Sibley C., Lescrinier E., Herdewijn P. // J. Med. Chem. 2011. V. 54. P. 4847–4862.
25. Kögler M., Busson R., De Jonghe S., Rozenski J., Van Belle K., Louat T., Munier-Lehmann H., Herdewijn P.S. // Chem. Biodiv. 2012. V. 9. P. 536–556.
26. Parchina A., Froeyen M., Margamuljana L., Rozenski J., De Jonghe S., Briers Y., Lavigne R., Herdewijn P., Eveline Lescrinier E. // Chem. Med. Chem. 2013. V. 8. P. 1373–1383.
27. Alexandrova L.A., Chekhov V.O., Shmalenyuk E.R., Kochetkov S.N., Abu El-Asrar R., Herdewijn P. // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 7131–7137.
28. Barwolff D., Langen P. // Nucleic Acid Chemistry. 1978. V. 1. P. 359–366.
29. (a) Levina A.S., Tabatadse D.R., Khalimskaya L.M., Prichodko T.A., Shishkin G.V., Alexandrova L.A., Zarytova V.P. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 319–325. (б) Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.Г., Табатадзе Д.Р., Халимская Л.М., Александрова Л.А. // Биоорган. химия. 1991. T. 17. C. 1059–1065. [Zarytova V.F., Komarova N.I., Levina A.S., Lokhov S.G., Tabatadze D.R., Khalimskaya L.M., Alexandrova L.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 1991. V. 17. P. 1059–1065.] (c) Alexandrova L.A., Skoblov A.Y., Jasko M.V., Victorova L.S., Krayevsky A.A. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 778–786.
30. Negrya S.D., Efremenkova O.V., Solyev P.N., Chekhov V.O., Ivanov M.A., Sumarukova I.G., Karpenko I.L., Kochetkov S.N., Alexandrova L.A. // J. Antibiotics. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0158-z>
31. Van Daele I., Munier-Lehmann H., Froeyen M., Balzarini J., Van Calenbergh S. // J. Med. Chem. 2007. V. 50. P. 5281–5292.
32. Александрова Л.А., Ефременкова О.В., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Сольев П.Н., Карпенко И.Л., Кочетков С.Н. // Биоорган. Химия. 2016. T. 42. C. 746–754. [Aleksandrova L.A., Efremenkova O.V., Andronova V.L., Galegov G.A., Sol'ev P.N., Karpenko I.L., Kochetkov S.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2016. V. 42. P. 677–684.]
33. Niks M., Otto M. // J. Immunol. Methods. 1990. V. 130. P. 149–151.
34. Engelkirk P., Duben-Engelkirk J. // Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Eds.: Sabatini P., Dietz K.C., Montalbano J. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, 2008. P. 168–169.
35. Jeong I.H., Park Y.S., Chung M.W., Kim B.T. // Synthetic Communications. 2001. V. 31. P. 2261–2270.

5-Alkylthiomethyl Derivatives of 2'-Deoxyuridine: Synthesis and Antibacterial Activity

S. D. Negrya*, D. A. Makarov*, P. N. Soljev*, I. L. Karpenko*, O. V. Chekhov*. ***,
A. A. Glukhova**, B. F. Vasilyeva**, I. G. Sumarukova**, O. V. Efremenkova**,
S. N. Kochetkov*, and L. A. Alexandrova*.,#

*Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bol'shaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119021 Russia

***Moscow Institute of Physics and Technology, Inctitutckij per. 9, Mockovckaya oblact', Dolgoppudnyj, 141700 Russia

In order to make nucleoside derivatives exhibiting antibacterial activity, we have proposed three ways of 5-alkylthiomethyl derivatives of 2'-deoxyuridine synthesis based on condensation of 3',5'-diacetyl-5-bromomethyl-2'-deoxyuridine with the corresponding 1-mercaptans. 5-Hexylthiomethyl-, 5-octylthiomethyl-, 5-bis(octylthio)methyl-2'-deoxyuridine and α and β anomers of 5-decylthiomethyl-2'-deoxyuridine were synthesized. A notable cytotoxicity of a number of the synthesized compounds in A549 cell culture was shown. 5-Hexylthiomethyl-2'-deoxyuridine inhibited in vitro growth of the *Mycobacterium smegmatis* mc²155 strain with a MIC value of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The remaining compounds did not inhibit the growth of two strains of *Mycobacterium smegmatis* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: nucleosides, radical bromination, 5-alkylthiomethyl-2'-deoxyuridines, 1-mercaptans, antibacterial activity, cytotoxicity



СИНТЕЗ НОВЫХ L-ГОМОСЕРИН ЛАКТОНОВ НА ОСНОВЕ ХАЛКОНА И ОЦЕНКА ИХ СПОСОБНОСТИ ИНГИБИРОВАТЬ ЧУВСТВО КВОРУМА¹

© 2020 Chunying Luo*, **, ***, Pan Li*, **, ***, Haoyue Liu*, **, ***, Pengxia Feng*, **, ***, Jieming Li*, **, ***, Liutao Zhao*, **, ***, and Chun-Li Wu*, **, ***, #

*School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450001 China

**Key Laboratory of Technology of Drug Preparation (Zhengzhou University), Ministry of Education of China, Zhengzhou, 450001 China

***Key Laboratory of Henan Province for Drug Quality and Evaluation, Zhengzhou, 450001 China

Поступила в редакцию 14.05.2019 г.

После доработки 25.06.2019 г.

Принята к публикации 15.11.2019 г.

Получены две серии новых гомосерин лактонов на основе халкона и исследована их способность ингибировать чувство кворума *in vitro* в штамме *Pseudomonas aeruginosa*. В частности, исследована способность полученных соединений модулировать *LasR*-зависимую систему чувства кворума у *P. aeruginosa*. Среди полученных соединений (*S*)-2-((4-(3-(4-бромо-2-флуорофенил)акрилоил)фенид)амино)-*N*-(2-оксотетрагидрофуран-3-ил)ацетамид ингибировал *LasR*-зависимую систему чувства кворума, в отличие от бромированного фуранона C30. Стоит отметить, что результатом работы стали новые эффективные ингибиторы систем чувства кворума (QSIs, quorum sensing inhibitors), которые ингибировали продукцию вирулентных факторов в штамме *P. aeruginosa* дикого типа.

Ключевые слова: халкон, L-гомосерин лактон, *Pseudomonas aeruginosa*, ингибиторы чувства кворума

DOI: 10.31857/S0132342320020141

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (тел.: +86 371 67781894; эл. почта: kedi2009@126.com).



ВЛИЯНИЕ АГЕНТОВ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К КВОРУМУ, ПРОТИВ *Pseudomonas aeruginosa*¹

© 2020 М. Asif*, # and M. Imran**

*Department of Pharmaceutical Chemistry, Himalayan Institute of Pharmacy Research,
Dehradun (Uttarakhand), 248007 India

**Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Northern Border University,
PO Box 840, Rafha, 91911 Saudi Arabia

Поступила в редакцию 26.08.2019 г.

После доработки 31.10.2019 г.

Принята к публикации 11.11.2019 г.

Злоупотребление антибиотиками в терапии привело к развитию резистентности в организмах-мишенях. Неспособность представленных антибиотиков бороться с инфекциями делает необходимым поиск варианта доступных в настоящее время лекарств. Чувство кворума (QS) используется многими бактериями для регулирования экспрессии генов в соответствии с плотностью популяции посредством использования сигнальных молекул или аутоиндукторов. QS используется популяциями бактерий для координации их групповых взаимодействий, которые применяются патогенами в инфекционных процессах. Пути QS в бактериях состоят из нескольких частей, включая популяции бактерий, сигнальные молекулы, белковые активаторы и гены-мишени. Патогенность многих бактерий регулируется сигнальными системами QS. Система ингибирования QS может вызывать снижение вирулентности и защиту от бактериальных инфекций. QS является основным регулятором вирулентности и образования биопленок у *Pseudomonas aeruginosa* и других соответствующих бактерий. У *P. aeruginosa* экспрессия многих факторов вирулентности, по-видимому, контролируется с помощью QS. Таким образом, в соответствии с ролью этого механизма в регуляции и выработке многих факторов вирулентности, чтобы вызвать заболевание и инфекцию для *P. aeruginosa* требуется функция QS. В этой статье мы обсуждаем механизм QS у грамотрицательных и положительных бактерий, рассматривая подробнее *P. aeruginosa*. Разнообразные растения показали свое влияние на вирулентность *P. aeruginosa*. Экстракт различных растений контролирует регуляторные гены QS и факторы, оказывающие незначительное влияние на рост бактерий. Механизмы кворума (QQ) не связаны со статическими или цидальными эффектами. На самом деле, анти-QS уже показали многообещающие результаты в борьбе с инфекциями *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: противомикробные препараты, аутоиндукторы, этноботаники, кворум-зондирование, *Pseudomonas aeruginosa*, бактериальные инфекции, терапевтическая мишень

DOI: 10.31857/S0132342320020050

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

Автор для связи: (тел.: +91-9897088910; эл. почта: aasif321@gmail.com).



МОДИФИКАЦИЯ ОЛИГОПЕПТИДОВ С ЦЕЛЮ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-8 В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. О. В. Грибовская*.,#, В. П. Мартинович*, Д. А. Макаревич*,
В. П. Голубович*, Т. В. Рябцева**, В. В. Кирковский**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
Беларусь, 220141, Минск, ул. Ак. Купревича, 5/2

**Белорусский государственный медицинский университет,
Беларусь, 220116, Минск, пр. Дзержинского, 83

Поступила в редакцию 21.06.2019 г.

После доработки 02.09.2019 г.

Принята к публикации 24.10.2019 г.

С целью поиска соединений, способных уменьшать концентрацию интерлейкина-8 в плазме крови человека проведено молекулярное моделирование, позволившее выявить ряд пептидных последовательностей. Показано, что замена остатка глутаминовой кислоты в пептидах Glu-His-OMe и Glu-His-Trp-OMe на ее циклическую форму, а также введение остатков DTyr и DAla в последовательность Asp-Tyr-Ala-Pro, приводит к двукратному увеличению способности их связывания интерлейкина-8.

Ключевые слова: пептидный синтез, интерлейкин-8, связывание в плазме крови, молекулярный докинг

DOI: 10.31857/S0132342320020104

ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин 8 (IL-8) — альфа-хемокин, продукт многих клеток, включая кератиноциты, фибропласты и макрофаги, который стимулирует хемотаксис нейтрофилов, базофилов, лимфоцитов, кератиноцитов, а также стимулирует освобождение ферментов нейтрофилами [1, 2]. В настоящее время он включается в семейство хемокинов. Основные биологические эффекты хемокинов связаны с их хемотрактантной активностью, особенно это касается IL-8. Так, у больных идиопатическим фиброзом легких была обнаружена повышенная экспрессия mRNA для IL-8, что коррелировало с содержанием IL-8, числом нейтрофилов в бронхоальвеолярной жидкости и с тяжестью заболевания. Высокий уровень IL-8 в легких обнаружен при остром воспалении. У больных респираторным дистресс-синдромом содержание IL-8 и количество нейтрофилов коррелировало со смертностью. Хемокины

также являются медиаторами аллергического воспаления. У больных бронхиальной астмой наблюдается повышенная экспрессия IL-8 эпителиальными клетками бронхов [3, 4]. В научной литературе имеется также информация об участии IL-8 в патогенезе сепсиса [5, 6].

Таким образом, поиск способов регулирования концентрации IL-8 в плазме крови является актуальной и перспективной задачей современной медицинской науки. Это подтверждается результатами эффективного применения следующих известных ингибиторов:

1. Репариксин (химическая формула — (αR) - α -метил-4-(2-метилпропил)- N -(метилсульфонил)-бензенацетамид L -лизина) является неконкурентным аллостерическим ингибитором активации рецепторов хемокинов CXCR1 и CXCR2 под действием IL-8 ($IC_{50} = 1$ и 100 нМ соответственно). Он блокирует ряд активностей, связанных с передачей сигналов IL-8, включая рекрутирование лейкоцитов ($IC_{50} = 1$ нМ) и другие воспалительные реакции [7].

2. NuMax-IL8 — полностью гуманизованное моноклональное антитело, которое связывает и ингибирует IL-8 [8]. Сейчас проходит 1-я фаза клинических испытаний данного препарата.

Сокращения: IL-8 — интерлейкин 8; Вос — *трет*-бутилоксикарбонил; DCC — N,N' -дициклогексилкарбодиимид; DMF — N,N -диметилформамид; HOBT — N -гидроксисбензотриазол; Bzl — бензил; TEA — триэтиламин; Rfr — пентафторфенил; ESI — ионизация распылением в электрическом поле.

Автор для связи: (тел.: +375-(17)2678263; эл. почта: olymelnik@yandex.ru).

Таблица 1. Значения свободной энергии связывания экспериментальных олигопептидов с IL-8

| Пептид | Структура | Энергия связывания IL-8, ккал/моль |
|--------|-----------------|------------------------------------|
| (1) | Gly-Ser | 6.05 (5.57; 6.25) |
| (2) | Glu-His | 6.30 (6.02; 6.47)* |
| (3) | Pro-Gly | 5.40 (5.40; 5.50) |
| (4) | Glu-His-Trp | 6.45 (6.30; 6.52)* |
| (5) | Тур-Phe-Val | 5.90 (5.55; 6.30) |
| (6) | Phe-Glu-Gly | 5.40 (5.27; 5.42) |
| (7) | Phe-Gly-Gln-Gly | 5.90(5.55; 6.30) |
| (8) | Trp-Ala-Thr-His | 6.20 (6.00; 6.22)* |
| (9) | Asp-Тур-Ala-Pro | 5.40 (5.20; 5.40) |

* Разница достоверна с $p = 0.0069$.

3. Пептидные ингибиторы [9]. Находятся на стадии доклинических испытаний.

Пептидные ингибиторы наиболее предпочтительны из соображений безопасности и стоимости продукции. Однако применение синтетических пептидных ингибиторов имеет существенный недостаток: пептидные молекулы чрезвычайно быстро метаболизируются пептидазами в организме человека. Поэтому необходима разработка способов защиты пептидных молекул от ферментативного разрушения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью настоящей работы являлся поиск и исследование пептидов, способных уменьшать концентрацию IL-8 в плазме крови человека, а также разработка способов их защиты от разрушения пептидазами.

Этапы исследований включали анализ структуры комплексов IL-8 с лигандами и выбор возможных участков связывания, модификацию, синтез отобранных соединений, изучение их биологической активности.

На первом этапе работы в ProteinDataBank осуществили поиск пространственных структур IL-8 и его комплексов с лигандами различной природы. Отобрали структуру, которая по своим свойствам наилучшим образом подходила для расчетов и прогноза потенциальных участков связывания белка-лиганда с IL-8 (1ILQ, комплекс IL-8 с цитокинсвязывающей областью CXCR-1). С использованием программного комплекса были рассчитаны предполагаемые участки связывания белка-лиганда и цитокинов. На основании этих расчетов были смоделированы олигопептиды, потенциально способные связывать IL-8. Молекулярный докинг (или молекулярные стыковки) — это метод молекулярного моделирова-

ния, который позволяет предсказать наиболее выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и положение одной молекулы по отношению к другой. Для докинга указывается область структуры белка, в которой будет происходить поиск места для связывания. Задают его как куб с центром. Координаты центра и размеры куба определяются визуально исходя из структуры изучаемого цитокина. В данной работе использовали pdb-файл 1IKL — мономерная форма IL-8. Координаты центра — $S_x:0 S_y:-5 S_z:0$. Размеры куба — $S_x:60 S_y:60 S_z:50$. В табл. 1 представлены результаты математических расчетов свободной энергии связывания IL-8 с пептидами.

Для дальнейшей модификации и химического синтеза были выбраны следующие пептидные последовательности: Glu-His (2), Glu-His-Trp (4), Asp-Тур-Ala-Pro (9). Модификацию пептидов (2) и (4) осуществляли заменой остатка глутаминовой кислоты Glu на остаток пироглутаминовой кислоты, что согласно работе [10], является известным способом защиты против атак протеаз. Последовательность Asp-Тур-Ala-Pro (9) модифицировали введением *D*-аминокислот — *D*Тур и *D*Ala вместо их *L*-аналогов.

Основными моментами, которые должны быть учтены при синтезе модифицированных олигопептидов Glp-His-OMe (I) и Glp-His-Trp-OMe (III), являются специфические свойства гистидина и пироглутаминовой кислоты: повышенная склонность остатка His к рацемизации и возможность протекания побочных реакций по имидазольному кольцу, лабильность пирролидинового цикла при кислых и сильно щелочных значениях pH [11]. Приемлемыми растворителями для исходных включаемых соединений (пироглутаминовая кислота и метиловый эфир гистидина) оказались ацетонитрил и хлористый метилен. Использование гидроксibenзотриазола (HOBT) совместно с DCC позволило обеспечить высокий выход дипептида Glp-His-OMe (I) и высокий уровень его удельного оптического вращения (80%) и $-17^\circ \dots -19^\circ$. Очистка дипептида (I) состояла в избирательном растворении компонентов смеси, содержащей неочищенный дипептид. Выделенный из реакционной смеси осадок, состоящий в основном из Glp-His-OMe и дициклогексилмочевины, промывали метанолом для перевода дипептида в раствор. Полученный после упаривания метанола кристаллический осадок дипептида обрабатывали хлороформом и смесью эфир-метанол для очистки от примесей исходных соединений. Такие процедуры позволили получить хроматографически однородный дипептид. При синтезе трипептида (III) для конденсации *N*-концевого дипептида с метиловым эфиром триптофана мы выбрали азидный способ, который обеспечивает отсутствие рацемизации, позволяет из-

бежать стадии щелочного гидролиза Glp-His-OMe для отщепления метильной защиты (схема 1).

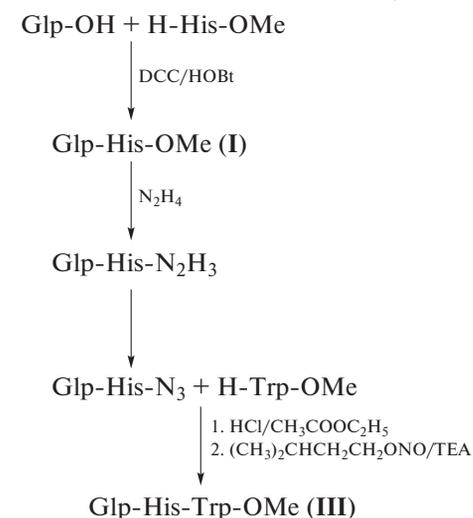


Схема 1. Схема синтеза Glp-His-OMe (I) и Glp-His-Trp-OMe (III).

Вторая стадия синтеза трипептида Glp-His-Trp-OMe – получение гидрозида Glp-His-N₂H₃. Для полного перевода метилового эфира в гидразид использовали пятикратный избыток гидразингидрата, выход продукта практически количественный. Азидную конденсацию Glp-His-N₃ и Trp-OMe проводили в DMF – растворителе, обеспечивающем хорошую растворимость всех компонентов и способствующем протеканию реакции. Для перевода гидрозида в азид использовали изоамилнитрит, необходимую реакцию среды создавали добавлением HCl в этилацетате и триэтиламина. Реакцию проводили при температуре –15...–20°C. Для получения хроматографически однородного пептида (III) проводили очистку путем многократных переосаждений на первом этапе, заключительной стадией являлась колоночная хроматография на силикагеле с использованием в качестве элюэнта смеси хлороформ–метанол 2 : 1.

Тетрапептиды Asp-DТур-Ala-Pro (IX) и Asp-DТур-DAla-Pro (X) синтезировали по схеме 2 + 2 (схема 2).

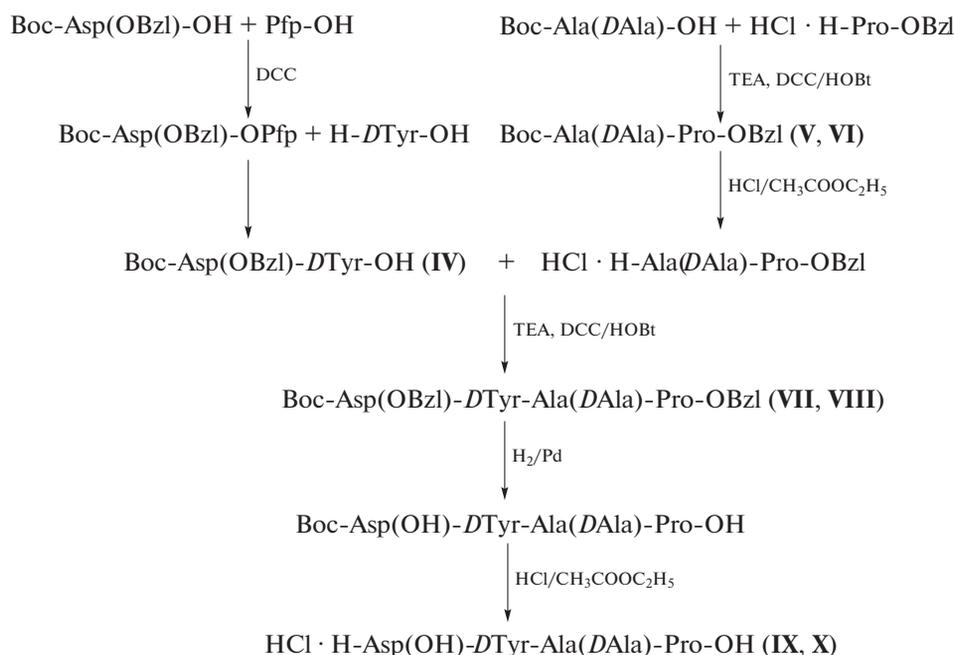


Схема 2. Схема синтеза тетрапептидов Asp-DТур-Ala-Pro (IX) и Asp-DТур-DAla-Pro (X).

Дипептид Boc-Asp(OBzl)-DТур-OH (IV) получали методом активированных эфиров, пентафторфениловый эфир эфира β-бензилового эфира трет-бутилоксикарбонил-аспарагиновой кислоты вводили в реакцию с DТур без выделения. C-Концевой пролин в виде бензилового эфира вводили в синтез с Boc-Ala-OH или Boc-DAla-OH для получения Boc-Ala-Pro-OBzl и Boc-DAla-Pro-OBzl соответственно. В качестве основного кон-

денсировочного агента использовали DCC с добавлением NOBt. Для блокирования α-аминогрупп применяли Boc-защитную группу. Ее отщепление проводили обработкой 4.5 М раствором HCl в этилацетате. Гидрохлориды пептидов после отщепления Boc-защитной группы, которое протекало с выходами, близким к количественным (93–98%), использовали в синтезе после определения их однородности методом тонкослойной

Таблица 2. Эффективность связывания IL-8 из плазмы крови экспериментальными олигопептидами *in vitro* (результаты представлены в виде Me (25%о; 75%о))

| № п/п | Олигопептид | Эффективность связывания IL-8, % |
|-------|-------------------|----------------------------------|
| 1 | Glu-His-OMe | 12.36 (10.47; 15.38) |
| 2 | Glu-His-Trp-OMe | 13.25 (8.35; 15.46) |
| 3 | pGlu-His-OMe | 35.72 (23.11; 37.24)* |
| 4 | pGlu-His-Trp-OMe | 21.54 (8.33; 48.51)* |
| 5 | Asp-Tyr-Ala-Pro | 44.41 (32.60; 51.47) |
| 6 | Asp-DTyr-Ala-Pro | 46.63 (40.12; 50.32) |
| 7 | Asp-DTyr-DAla-Pro | 84.00 (75.14; 88.11)* |

хроматографии. Полной характеризации гидрохлоридов не проводили, так как кислотный гидролиз Вос-группы протекает, как правило, без рацемизации и изменения структуры пептидной цепи [12]. β -Бензильные группы аспарагиновой кислоты и С-концевого пролина удаляли гидрированием пептида над катализатором – палладиевой чернью, в растворе уксусной кислоты.

Идентификацию целевых соединений выполняли методом масс-спектрометрии, гомогенность подтверждали хроматографическими методами.

Иммунологическое тестирование пептидов заключалось в исследовании их связывания с IL-8. Оценку связывания пептидов проводили с использованием плазмы крови 5 условно здоровых доноров ($N = 35$) с IL-8 в концентрации >300.00 нмоль/мл. Концентрацию IL-8 определяли методом ИФА с применением иммуноферментного набора Интерлейкин-8-ИФА-Бест (Вектор Бест, Россия). Работу проводили согласно утвержденной для набора инструкции от 30.06.2017. Эффективность олигопептидов оценивали как процент уменьшения концентрации интерлейкина в опытной пробе по сравнению с контролем. Результаты представлены в табл. 2.

Из табл. 2 следует, что модификация пептидов существенно увеличивает их эффективность связывания IL-8. Замена двух аминокислот в последовательности Asp-Tyr-Ala-Pro на D-форму увеличивает процент связывания в 2 раза. Аналогичный результат наблюдается при замене в пептиде Glu-His-OMe глутаминовой кислоты на ее циклическую форму.

Таким образом, полученные результаты позволяют считать доказанным связывание синтезированных соединений с IL-8. Мы предполагаем, что на основе исследуемых соединений возможно создание эффективного гемосорбента, способного элиминировать IL-8 при ряде патологических процессов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов

В работе были использованы аминокислоты, реагенты, растворители (Sigma, США, Fluka, Швейцария, Acros Organics, Бельгия). Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil, Россия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–20%-ный аммиак, 60 : 40 : 10 (А); бутанол–уксусная кислота–вода, 40 : 10 : 10 (Б), этилацетат–пиридин–уксусная кислота–вода, 50 : 30 : 30 : 10 (В). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1200 с масс-детектором QQQ (Triple Quadrupole) Agilent 6410, колонка Vydac 201HS52 RP C18 (2.1×250 мм). Использовали градиент концентраций ацетонитрила от 10 до 95% в 8 мМ растворе ацетата аммония. Скорость потока 1 мл/мин.

Масс-спектры с химической ионизацией при атмосферном давлении (APCI-MS) регистрировали на масс-хроматографе Accela-LCQ Fleet (Thermo Scientific, США).

Температуры плавления (некорректируемые) определяли на приборе Кофлера. Удельное вращение соединений измеряли на спектрополяриметре J-20 “Jasco” (Япония). Аминокислотный состав пептидов, гидролизированных 6 М HCl в запаянных ампулах при 110°C в течение 20 ч, проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе LMV (Швеция).

Glp-His-OMe (I). К охлажденной до 3°C взвеси 0.65 г (5.0 ммоль) пироглутаминовой кислоты в 18.0 мл хлористого метилена прибавляли 0.68 г (5.0 ммоль) NOVt и охлажденный раствор 1.24 г (6.0 ммоль) DCC в 2.5 мл хлористого метилена. После перемешивания в течение 30 мин к реакционной смеси добавляли 1.21 г (5.0 ммоль) His-OMe · 2HCl и прикапывали 1.38 мл (10.0 ммоль) TEA, продолжали перемешивание при 4–8°C в течение 1 и 15 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, промывали хлористым метиленом (2×3.0 мл), затем метанолом (5×3.0 мл). Метанольный фильтрат упаривали, твердый остаток переносили на фильтр и промывали хлороформом (5×3.0 мл), смесью эфир–метанол, 3 : 1 (4×3.0 мл). Сушили в вакууме над P₂O₅. Выход Glp-His-OMe – 0.91г (65%) с т. пл. 193–195°C, $[\alpha]_D^{20} - 20^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.45 (А), 0.62 (В). Данные аминокислотного анализа: Glu 1.02 (1), His 0.97 (1).

Glp-His-N₂H₃ (II). К раствору 0.84 г (3.0 ммоль) соединения (I) в 6.0 мл этанола, охлажденному до 3–5°C, прибавляли по каплям при перемешивании 0.73 мл (15.0 ммоль) гидразингидрата. Реак-

ционную смесь перемешивали 2 ч при охлаждении и оставили на 15 ч в холодильнике при 5°C. Выпавший осадок отделяли фильтрованием, промывали его изопропанолом, метанолом, эфиром. Получили 0.75 г (89%) Glp-His-N₂H₃ с т. пл. 241–244°C, $[\alpha]_D^{20} - 15^\circ$ (с 1, вода), R_f 0.14 (A), 0.28 (B).

Glp-His-Trp-OMe (III). К взвеси 0.56 г (2.0 ммоль) Glp-His-N₂H₃ в 15.0 мл DMF, охлажденной до –20°C, прибавляли по каплям 3.0 мл (12.0 ммоль) 4 М HCl в этилацетате при интенсивном перемешивании, при этом происходило растворение взвеси, затем 0.38 мл (2.8 ммоль) изоамиленитрита. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при –15...–20°C, затем прибавляли 1.66 мл (14.0 ммоль) TEA и 0.94 г (2.0 ммоль) H-Trp-OMe · HCl, следя за температурными границами. Реакционную смесь перемешивали при –10...–15°C 1 ч и 1 ч при –5°C. Осадок соли триэтиламина отделяли фильтрованием, к фильтрату прибавляли 55.0 мл эфира до полного осаждения продукта реакции. Выпавший осадок промывали эфиром, затем пересаждали из метанола эфиром и сушили в вакууме. Высушенный трипептид с примесями растворяли в 1.5 мл метанола и наносили на колонку с силикагелем Merk 40–60 mesh. В качестве элюента использовали смесь хлороформ–метанол, 2 : 1. Фракции, содержащие трипептид, объединяли, упаривали, пересаждали из метанола эфиром и сушили до постоянного веса. Выход Glp-His-Trp-OMe 0.57 г (59%), т. пл. 241–244°C, $[\alpha]_D^{20} - 20^\circ$ (с 1, вода), R_f 0.34 (A), 0.48 (B). Масс-спектр ESI, m/z : 485.2 $[M + H]^+$. Данные аминокислотного анализа: Glu 1.01 (1), His 0.98 (1), Trp не определяли.

Woc-Asp(OBzl)-DTyr-OH (IV). К раствору 1.61 г (5.0 ммоль) Woc-Asp(OBzl)-OH в 7.0 мл диоксана прибавляли 1.01 г (5.5 ммоль) пентафторфенола. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд прибавляли 1.23 г (6.0 ммоль) DCC. Перемешивали 1 ч при охлаждении и 2 ч при комнатной температуре. После окончания реакции осадок дициклогексимочевины отфильтровали, а полученный раствор пентафторфенилового эфира β-бензилового эфира *трет*-бутилоксикарбониласпарагиновой кислоты добавляли к 6.0 мл охлажденного водного раствора, содержащего 0.72 г (4.0 ммоль) *D*-тирозина и 1.0 мл 1 М NaOH. После окончания реакции (12 ч) диоксан упаривали, реакционную смесь нейтрализовали до pH 4–5 9% лимонной кислотой. Продукт экстрагировали этилацетатом трижды по 5.0 мл. Этилацетатный раствор сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а к маслообразному остатку добавляли 10.0 мл петролейного эфира. После сушки в вакууме над P₂O₅ получили 1.51 г (78%) кристаллического соединения (IV) с т. пл. 135–138°C, R_f 0.86 (B), 0.79 (B).

Woc-Ala-Pro-OBzl (V). К раствору 1.21 г (5.0 ммоль) хлоргидрата бензилового эфира пролина в 5.5 мл DMF прибавляли 0.73 мл (6.0 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 0.94 г (5.0 ммоль) Woc-Ala-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд прибавляли последовательно 0.70 г (5.2 ммоль) HOBT и 1.23 г (6.0 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 1.0 мл DMF. В фильтрат добавляли 15.0 мл этилацетата, и полученный раствор промывали 9% раствором лимонной кислоты, 5% раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся маслообразный остаток дважды пересаждали из эфира метанолом и сушили над P₂O₅. После сушки в эксикаторе получили 1.58 г (84%) маслообразного соединения (V). R_f 0.93 (A), 0.74 (B). Масс-спектр ESI, m/z : 276.93 $[M - 100]^+$, 377.4 $[M + H]^+$, 399.0 $[M + Na]^+$.

Woc-DAla-Pro-OBzl (VI). К раствору 1.21 г (5.0 ммоль) хлоргидрата бензилового эфира пролина в 5.5 мл DMF прибавляли 0.73 мл (6.0 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 0.94 г (5.0 ммоль) Woc-DAla-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд прибавляли последовательно 0.70 г (5.2 ммоль) HOBT и 1.23 г (6.0 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре. Очистку и выделение дипептида (VI) проводили аналогично описанному для соединения (V). Выход маслообразного продукта составил 1.45 г (77%). R_f 0.94 (A), 0.70 (B). Масс-спектр ESI, m/z : 276.93 $[M - 100]^+$, 377.40 $[M + H]^+$, 399.00 $[M + Na]^+$.

Woc-Asp(OBzl)-DTyr-Ala-Pro-OBzl (VII). К раствору 0.34 г (1.1 ммоль) хлоргидрата бензилового эфира аланилпролина (получен обработкой соединения (V) 4.5 М HCl в этилацетате) в 3.0 мл DMF добавляли 0.19 мл (1.4 ммоль) TEA, перемешивали в течение 20 мин и вносили 0.55 г (1.1 ммоль) соединения (IV). Охладив реакционную колбу до 0°C, в реакционный сосуд добавляли последовательно 0.13 г (1.1 ммоль) HOBT и 0.29 г (1.4 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 0°C и 10 ч при комнатной температуре. Очистку и выделение тетрапептида (VII) проводили как описано для соединения (V). Выход продукта составил 0.61 г (74%), т. пл. 86–89°C, R_f 0.93 (A), 0.74 (B). Масс-спектр ESI, m/z : 643.68 $[M - 100]^+$, 743.08 $[M - H]^+$, 767.04 $[M + Na]^+$.

Woc-Asp(OBzl)-DTyr-DAla-Pro-OBzl (VIII). К раствору 0.45 г (1.4 ммоль) хлоргидрата бензилового эфира *D*-аланил-пролина (получен обработкой соединения (VI) 4.5 М HCl в этилацетате) в

3.5 мл DMF добавляли 0.23 мл (1.7 ммоль) TEA, перемешивали в течение 20 мин и внесли 0.68 г (1.4 ммоль) соединения (IV). Охладив реакционную колбу до 0°C, в реакционный сосуд вносили последовательно 0.20 г (1.5 ммоль) HOBT и 0.35 г (1.7 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре. Очистку и выделение тетрапептида (VIII) проводили как описано для соединения (V). Выход продукта составил 0.78 г (75%) с т. пл. 90–92°C, R_f 0.93 (A), 0.74 (B). Масс-спектр ESI, m/z : 643.68 $[M - 100]^+$, 743.08 $[M - H]^+$, 767.04 $[M + Na]^+$.

HCl · H-Asp-DTyr-Ala-Pro-OH (IX). Через раствор 0.22 г (0.3 ммоль) соединения (VII) в смеси 1.0 мл уксусной кислоты и 2.0 мл метанола пропускали в течение 2 ч ток водорода в присутствии катализатора – 2.5 мг палладиевой черни – при постоянном перемешивании. После деблокирования пептида (контроль ТСХ) катализатор отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали, а к остатку добавляли 1.0 мл этилацетата и 1.7 мл 4.5 M раствора HCl в этилацетате. Перемешивали взвесь в течение 45 мин, растворитель упаривали, а остаток промывали этилацетатом, эфиром, сушили в эксикаторе над NaOH. Выход соединения (IX) составил 0.14 г (94%), R_f 0.90 (A), 0.82 (B). По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (IX) – 96%. Масс-спектр ESI, m/z : 465.16 $[M + H]^+$, 463.35 $[M - H]^+$, 929.54 $[2M]^+$, 950.00 $[2M - H + Na]^+$. Данные аминокислотного анализа: Asp 1.06 (1), Ala 1.00 (1), DTyr 0.94 (1), Pro 1.02(1).

HCl · H-Asp-DTyr-DAla-Pro-OH (X). Получали аналогично соединению (IX). Выход тетрапептида (X) составил 0.16 г (82.5%) в перерасчете на 0.23 г (0.4 ммоль) исходного соединения (VIII), R_f 0.60 (A), 0.86 (B). По данным ВЭЖХ содержание целевого пептида (X) – 98%. Масс-спектр ESI, m/z : 465.16 $[M + H]^+$, 463.35 $[M - H]^+$, 501.35 $[M + HCl]^+$, 929.54 $[2M]^+$, 950.00 $[2M - H + Na]^+$. Данные аминокислотного анализа: Asp 1.04 (1), DAla 1.02 (1), DTyr 0.96 (1), Pro 0.98 (1).

Молекулярное моделирование

Построение пептидной последовательности экспериментальных пептидов в PDB-формате проводили в программе PyMol. Визуализацию комплекса лиганд-рецептор – в программе Chimera. Молекулярный докинг осуществляли в программе Chimera с помощью программного обеспечения AutodockVina. Для решения задач докинга использовали модели белковых молекул, находящиеся в базе данных NCBI [13]. Для изучения и анализа использовали следующие структуры: 1ILQ (комплекс IL-8 с цитокинсвязывающей областью CXCR-1), 1IKL (мономерная форма IL-8) и 1IL8 (димерная форма IL-8).

Иммуноферментный анализ

Поскольку концентрация IL-8 в плазме крови практически здоровых доноров низкая, проводили предварительную активацию продукции IL-8 нейтрофилами крови человека. Для этого к 2.0 мл цельной крови человека добавляли 1.0 мл дрожжевого экстракта (гликопротеин клеточной стенки пекарских дрожжей), инкубировали в течение 90 мин при 37°C, затем центрифугировали, отбирали надосадок, содержащий плазму крови с высокой концентрацией IL-8, и замораживали для дальнейших исследований. Для определения эффективности олигопептидов размораживали заготовленную заранее фракцию, содержащую плазму крови человека с IL-8 в концентрации >300.00 нмоль/мл. Затем в опытной пробе к 100 мкл фракции добавляли 100 мкл раствора олигопептида (1.0 мг/мл), в контрольной – к 100 мкл фракции добавляли 100 мкл 0.9% раствора NaCl. Инкубировали 1 ч при 37°C и 18 ч при 20°C (для достижения термодинамического равновесия). Изменение концентрации IL-8 оценивали методом ИФА до и после контакта надосадочной фракции с исследуемыми пептидами на спектрофотометре Bio-rad T100 Termal (США). Статистическую обработку и построение графиков проводили с помощью программы Statistica 10.0 и Graph PadPrism 6. Разницу считали статистически достоверной при $p < 0.05$. Все данные представлены медианой (25–75 квартили).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы при работе с людьми были соблюдены.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pease J.E., Sabroe I. // Am. J. Respir. Med. 2002. V. 1. P. 19–25.
2. Caroline A.H., Baker J.B. // Cancer Investigation. 1993. V. 6. P. 743–750.
3. Baggolini M., Clark-Lewis I. // FEBS Letter. 1992. V. 307. P. 97–101.
4. Baggolini M. // J. Intern. Med. 2001. V. 250. P. 91–104.
5. Fujishima S., Sasaki J., Shinozawa Y., Takuma K., Kimura H., Suzuki M., Kanazawa M., Hori Sh., Aikawa N. // Intensive Care Med. 1996. V. 22. P. 1169–1175.
6. Charalampos P., Jean-Louis V. // Critical Care. 2010. V. 14. P. 1–18.

7. Bertini R., Allegretti M., Bizzarri C., Moriconi A., Locati M., Zampella G., Cervellera M.N., Di Cioccio V., Cesita M.C., Galliera E., Martinez F.O., Di Bitondo R., Troiani G., Sabbatini V., D'Anniballe G., Anacardio R., Cutrin J.C., Cavalieri B., Mainiero F., Strippoli R., Villa P., Di Girolamo M., Martin F., Gentile M., Santoni A., Corda D., Poli G., Mantovani A., Ghezzi P., Colotta F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 32. P. 11791–11796.
8. Collins J. M., Heery C.R., Donahue R.N., Palena C., Madan R.A., Strauss J., Gatti-Mays M.E., Schlom J., Gulley J.L., Bilusic M. // J. Clinical Oncology. Supp. 2018. V. 36. P. 3091.
9. Tekamp-Olson P., Mullenbach G., Wernette-Hammond M.E. Патент US, no. 6436390B1, 2002.
10. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. М.: Мир, 1985. 456 с. [Jakubke H.-D., Jeschkeit H. Aminosäuren Peptide Protein. Berlin: Academie, 1982].
11. Гершкович А.А., Кибурев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Навукова думка, 1987. 264 с.
12. Крит Н.А., Филатова Н.П., Ковальчук О.В., Бесчастная Н.В. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. С. 965–970. [Krit N.A., Filatova M.P., Kovalchuk O.V. Beschastnaya N.V. // Russ. J. of Bioorganic Chem. 1981. V. 7. P. 965–970.]
13. Sotriuffer C.A., Flader W., Winger R.H. Rode B.M., Liedl K.R., Varga J.M. // Methods. 2000. V. 20. P. 280–291.

Modification of Oligopeptides in Order to Increase the Effectiveness of Their Interaction with Interleukin-8 in Human Blood Plasma

O. V. Gribovskaya*., V. P. Martinovich*, D. A. Makarevich*, V. P. Golubovich*, T. V. Ryabtseva**, and V. V. Kirkovskiy**

[#]Phone: +375-(17) 2678263; e-mail: olymelnik@yandex.ru

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Ak. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

**Belarusian State Medical University, prosp. Dzerzhinskogo 83, Minsk, 220116 Belarus

In order to search for compounds capable of reducing the concentration of interleukin-8 in human blood plasma, molecular modeling was carried out, which made it possible to identify a number of peptide sequences. It is shown that the replacement of the glutamic acid residue in the compounds Glu-His-OMe and Glu-His-Trp-OMe by its cyclic form, as well as the introduction of the residues *DTyr* and *DAla* into the sequence Asp-Tyr-Ala-Pro, leads to double the ability to bind interleukin-8.

Keywords: peptide synthesis, interleukin-8, plasma binding, molecular docking



ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ *L*-АСПАРАГИНАЗЫ *Wolinella succinogenes* В КОМПЛЕКСАХ С АСПАРАГИНОВОЙ И ГЛУТАМИНОВОЙ АМИНОКИСЛОТАМИ

© 2020 г. В. И. Тимофеев*, **, Н. Е. Жухлистова*, И. П. Куранова*, **, #

*Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИИ “Кристаллография и фотоника” РАН,
Россия, 119333, Москва, Ленинский пр., 59

**НИЦ “Курчатовский институт”, Россия, 123098, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Поступила в редакцию 08.08.2019 г.

После доработки 21.10.2019 г.

Принята к публикации 31.10.2019 г.

Мутантная форма *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* (WASm), содержащая две замены V23Q и K24T в *N*-концевой подвижной петле, ограничивающей активный центр, имеет на порядок меньшую глутаминазную активность по сравнению с исходным ферментом (WAS). Пространственная структура WASm определена для апо-формы и комплексов WASm с *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой аминокислотами при разрешении 1.70, 1.65 и 2.0 Å соответственно. Аминокислотные остатки подвижной петли локализованы на картах электронной плотности только частично. В активных центрах тетрамерной молекулы фермента в соответствующих комплексах локализованы с полной заселенностью аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты и описано их окружение; их расположение в исходном и мутантном ферменте совпадает. Описано состояние активных центров в исследованных молекулах. Показано, что во всех субъединицах апо-фермента WASm и комплекса WASm/Glu активный центр находится в открытой конформации, в то время как в комплексе WASm/Asp активные центры трех субъединиц закрыты, а одной – открыты. Сравнение строения комплексов исходного и мутантного фермента позволяет предположить, что уменьшение глутаминазной активности WASm вызвано увеличением подвижности остатков *N*-концевой петли, что затрудняет образование каталитически активной закрытой формы при связывании менее специфичного субстрата (глутамин).

Ключевые слова: *L*-аспарагиназа, пространственная структура, фермент

DOI: 10.31857/S0132342320020165

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства аспарагиназ, широко распространенные среди микроорганизмов, относятся к классу амидогидролаз (КФ 3.5.1.1) и катализируют гидролиз аспарагина до аспарагиновой кислоты и аммиака [1]. При физиологических условиях эта реакция практически необратима. Большинство известных бактериальных аспарагиназ способно также гидролизовать *L*-глутамин с активностью, в некоторых случаях сравнимой с аспарагиназой [2, 3].

Замечательной особенностью *L*-аспарагиназ является их ярко выраженная антиопухолевая активность, связанная с тем, что в ряде опухолевых

клеток отсутствует фермент аспарагинсинтетаза, вследствие чего этот тип клеток не способен синтезировать аспарагин и зависит от доставки данной аминокислоты из внешних источников [4, 5]. Поэтому ряд представителей семейства *L*-аспарагиназ (*E. coli*, *E. chrisanthemi*, *E. carotovora*) находит широкое применение в качестве эффективных противоопухолевых агентов при лечении острых лимфобластных лейкозов, лимфо- и ретикулосарком [6, 7]. Однако антиопухолевая активность аспарагиназ сопровождается рядом побочных эффектов. Существенным недостатком аспарагиназ в качестве медицинских препаратов является их токсичность, частично связанная с присутствием глутаминазной активности. *L*-Глутамин играет важную роль в транспорте азота в крови, и длительное отсутствие этой аминокислоты при аспарагиназной терапии приводит к серьезным нарушениям в организме. Другим не-

Сокращения: WAS – *L*-аспарагиназа *Wolinella succinogenes*; WASm – мутантная форма *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 169 79 56; эл.почта: in-na@ns.crys.ras.ru).

достатком препарата аспарагиназ является относительно низкая стабильность фермента в условиях применения [8, 9].

L-Аспарагиназа *Wolinella succinogenes* (WAS) отличается от ферментов из *E. coli* и *E. chrisanthemi* предельно низкой глутаминазной активностью, демонстрирует низкие побочные эффекты и высокую антиопухолевую активность, что делает ее наиболее пригодной для создания на ее основе оптимального фермента для медицинского применения [10–14].

Е.П. Санниковой и др. были проведены эксперименты по созданию на основе WAS аспарагиназы, сочетающей низкую иммуногенность с продолжительным действием [15]. Введением двух мутаций (V23Q, K24T) в *N*-концевую подвижную петлю молекулы WAS, ограничивающую активный центр и содержащую два каталитически важных остатка (Thr14, Tyr27), был получен фермент, устойчивый к действию трипсина (в данной работе обозначен как WASm) [15]. Мутантный фермент практически полностью сохранил исходную аспарагиназную активность, имел большую устойчивость к трипсину, а его глутаминазная активность оказалась на порядок ниже исходной [15].

В настоящей работе, с целью исследования особенностей строения мутантной формы, приводящих к изменению соотношения глутаминазной и аспарагиназной активности, были установлены пространственные структуры аспарагиназы WASm в апо-форме и в комплексах с продуктами реакции: *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой кислотами. Проведен анализ полученных структур и их сравнение с соответствующими структурами исходной формы фермента WAS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная структура *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, установленная в 1996 г., была первой для бактериальных *L*-аспарагиназ [16]. В настоящее время пространственные структуры аспарагиназ, в том числе и в комплексах с продуктами реакции – *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой аминокислотами – известны для ферментов из разных источников [17–21]. Недавно была установлена пространственная структура комплексов с продуктами реакции для двух форм *L*-аспарагиназы *W. succinogenes*, которые отличаются только одной заменой в полипептидной цепи (WASPro121 и WASSer121), но имеют разную глутаминазную активность [22].

Интерес к изучению структуры и функции *L*-аспарагиназ в значительной степени связан с широким применением этих белков в медицине. Однако задача получения идеального фермента, обладающего повышенной устойчивостью и минимальной токсичностью, частично связанной с

побочной глутаминазной активностью, до сих пор не решена.

На рис. 1 приведено сравнение аминокислотных последовательностей ряда аспарагиназ. В ферменте, рассматриваемом в данной работе (WASm), аминокислотные остатки валина и лизина в положениях 23 и 24 заменены соответственно на глутамин и треонин. Аминокислотные последовательности аспарагиназ очень схожи и содержат консервативный участок TGGTIAG на *N*-конце молекулы. *N*-Концевые аминокислотные остатки (12–40 в WAS) образуют подвижную петлю, ограничивающую активный центр. В подвижной петле расположены два остатка, принимающие участие в катализе. В аспарагиназе *W. succinogenes* это Thr14 и Tyr27 [16].

Предполагается [5, 17], что гидролиз амидной связи осуществляется посредством нуклеофильной атаки амидного атома углерода аспарагина гидроксильной группой треонина (Thr14 для WAS) с образованием ацилированного фермента и последующим гидролизом промежуточного соединения молекулой воды, связанной в активном центре [5, 17]. Расположенный в петле консервативный остаток тирозина (Tyr27 в WAS) поддерживает ориентацию треонина, оптимальную для нуклеофильной атаки. Большая часть аминокислотных остатков активного центра, участвующих в связывании субстрата, расположены в строго фиксированных участках полипептидной цепи, в то время как ограничивающая активный центр петля (остатки 12–40) изменяет свое положение в процессе катализируемой реакции, обеспечивая переход между открытой и закрытой конформациями активного центра. При закрытой конформации каталитически важный остаток треонина сближается с субстратом, в то время как в открытом состоянии активного центра остаток треонина удаляется от субстрата, вследствие чего реакция прекращается. Таким образом, на последовательных стадиях катализируемой реакции подвижная петля закрывает активный центр, приближая атакующий нуклеофил к субстрату (закрытая активная конформация) или открывает его после гидролиза амидной связи, способствуя удалению образовавшегося продукта реакции.

До недавнего времени низкую по сравнению с аспарагиназой глутаминазную активность фермента связывали преимущественно с пространственными затруднениями, возникающими при связывании глутамина, имеющего больший объем по сравнению со специфическим субстратом – аспарагином. В работе [22] было показано, что глутаминазная активность *L*-аспарагиназы *W. succinogenes* зависит от природы аминокислотного остатка в положении 121. Две формы аспарагиназы, отличающиеся только этим остатком (WASPro121 и WASSer121), на порядок

Таблица 1. Статистические характеристики набора и уточнения структур аспарагиназы в апо-форме и в комплексах с аспарагиновой и глутаминовой кислотами

| PDB ID | 6RUD | 6RUE | 6RUF |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| Разрешение, Å | 30.0–1.7 (1.74–1.7)* | 30.0–1.65 (1.69–1.65) | 30.0–2.0 (2.07–2.0) |
| Количество рефлексов | 119 054 (8759) | 138 668 (10 211) | 76 386 (5543) |
| <i>R</i> _{cryst} , % | 16.2 (17.2) | 16.9 (20.0) | 21.5 (26.4) |
| <i>R</i> _{free} , % | 19.4 (20.4) | 19.9 (24.7) | 25.9 (31.1) |
| Средний В-фактор, Å ² | 10.97 | 17.17 | 18.59 |
| Количество уточненных атомов | | | |
| Белка | 9469 | 9412 | 9466 |
| Растворителя | 969 | 770 | 413 |
| Лигандов | – | 36 | 40 |
| | RMS | | |
| По длинам связей, Å | 0.012 | 0.012 | 0.007 |
| По углам, град | 1.747 | 1.768 | 1.529 |
| | Карта Рамачандрана | | |
| Наиболее благоприятные области, % | 98.5 | 99.0 | 98.0 |
| Допустимые области, % | 1.5 | 1.0 | 2.0 |
| Запрещенные области, % | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

* В скобках приведены значения для последней оболочки.

различаются по глутаминазной активности, несмотря на то, что остаток 121 не каталитический и не взаимодействует со связанным субстратом непосредственно. Авторы показали, что в WASPro121 закрытое состояние фермента дополнительно стабилизировано из-за СН/π-взаимодействия колец пролина 121 и каталитического тирозина [22, 23]. В результате повышается стабильность закрытой конформации активного центра и вероятность ее образования при связывании менее специфического субстрата глутамин, что и приводит к более высокой глутаминазной активности.

Е.Р. Санниковой и др. [15] в экспериментах по инженерии фермента, устойчивого к действию трипсина, на основе *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* (WAS, идентична WASPro121) было обнаружено, что замена двух аминокислотных остатков – V23Q и K24T в ограничивающей активный центр подвижной петле – не только обеспечивает большую устойчивость фермента к гидролизу трипсином, но и на порядок уменьшает его глутаминазную активность, несмотря на присутствие пролина в положении 121. Мутантная форма *L*-аспарагиназы WASPro121, содержащая замены V23Q и K24T, обозначена здесь как WASm.

Чтобы исследовать возможные причины понижения глутаминазной активности при замене двух аминокислотных остатков в подвижной петле и проследить влияние замен на конформацию активного центра, мы установили пространственные структуры WASm в апо-форме и в комплексах с *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой

аминокислотами – WASm/Asp и WASm/Glu. Кристаллы вырастили методом диффузии паров растворителя; дифракционные наборы собрали на источнике синхротронного излучения SPring 8 [25].

Кристаллы апо-формы и обоих комплексов фермента, принадлежащие к пространственной группе *P*₂₁, содержали тетрамерную молекулу фермента в независимой части ячейки. Пространственные структуры апо-формы и обоих комплексов WASm установлены методом молекулярного замещения с использованием в качестве модели координат *L*-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* (PDB_ID: 1WSA). Статистические параметры уточнения приведены в табл. 1.

Гомотетрамерная молекула WASm (а именно эта форма фермента обладает биологической активностью) показана на рис. 2. При совмещении субъединиц тетрамера по Cα-атомам среднеквадратичное отклонение между субъединицами незначительно и колеблется от 0.08 до 0.117 Å. Молекула состоит из двух димеров, каждый из которых содержит два полностью сформированных активных центра (так называемые интимные димеры, в WASm это димеры AC и BD). Каждый активный центр включает аминокислотные остатки из обеих субъединиц димера.

Как и в большинстве пространственных структур *L*-аспарагиназ, не все аминокислотные остатки подвижной петли были локализованы на картах электронной плотности. Не были локализованы и остатки Glu23 и Thr24, где произ-

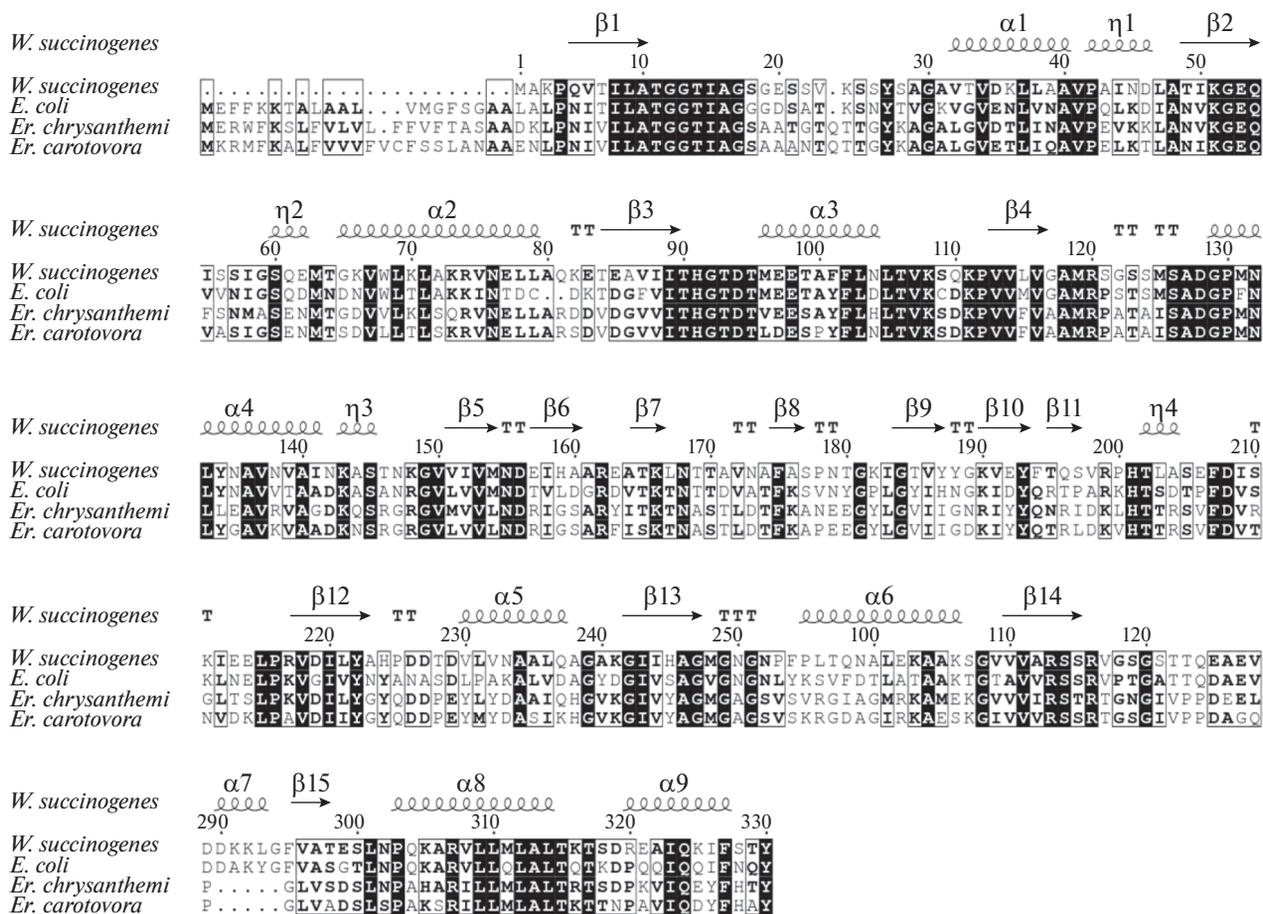


Рис. 1. Сравнение последовательностей некоторых бактериальных *L*-аспарагиназ. Стрелками и спиралями указаны соответствующие элементы вторичной структуры в *L*-аспарагиназе WASm.

ведены замены, а также каталитически важный остаток тирозина (Tyr27). Однако предполагаемый нуклеофил – Thr14 – виден во всех структурах.

Лиганды – *L*-аспарагиновая и *L*-глутаминовая аминокислоты, связанные в активных центрах соответствующих комплексов WASm/Asp и WASm/Glu, – локализованы с полной заселенностью (рис. 3). Конформация активного центра в каждой из субъединиц обоих комплексов была охарактеризована на основе анализа ближайшего окружения связанных лигандов.

На рис. 4а, 4б показана аспарагиновая кислота в активных центрах субъединиц А и С интимного димера АС комплекса WASm/Asp. В обеих субъединицах в связывании кислорода α -карбоксильной группы участвуют атом азота основной цепи и γ -гидроксил Ser60. α -Аминогруппа лиганда, являющаяся главным детерминантом специфичности аспарагиназ, имеет водородную связь с карбонильным кислородом Gln61 и карбоксильной группой Asp94. В связывании α -аминогруппы участвует также карбоксильная группа Glu287 из соседней субъединицы димера.

β -Карбоксильная группа связана с азотом основной цепи Ala118. Главное отличие в окружении лигандов в разных субъединицах касается расстояния между каталитически важным остатком треонина Thr14 и лигандом. В субъединице С, также как и в субъединицах В и D комплекса WASm/Asp, расстояние между OD2 атомом β -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты и OG1_Thr14 составляет 3.08 Å, т.е. лиганд и остаток треонина находятся на расстоянии водородной связи. В субъединице А соответствующее расстояние составляет 12.3 Å. Известно, что близкое расположение Thr14 и лиганда наблюдается только при закрытой конформации активного центра [22, 24]. Следовательно, в субъединицах В, С и D комплекса WASm/Asp активный центр находится в закрытой конформации и только в субъединице А – в открытой.

При совмещении субъединицы А комплекса WASm/Asp последовательно со всеми субъединицами комплекса WASm/Glu оказалось, что окружение глутаминовой кислоты во всех четырех активных центрах этого комплекса практически

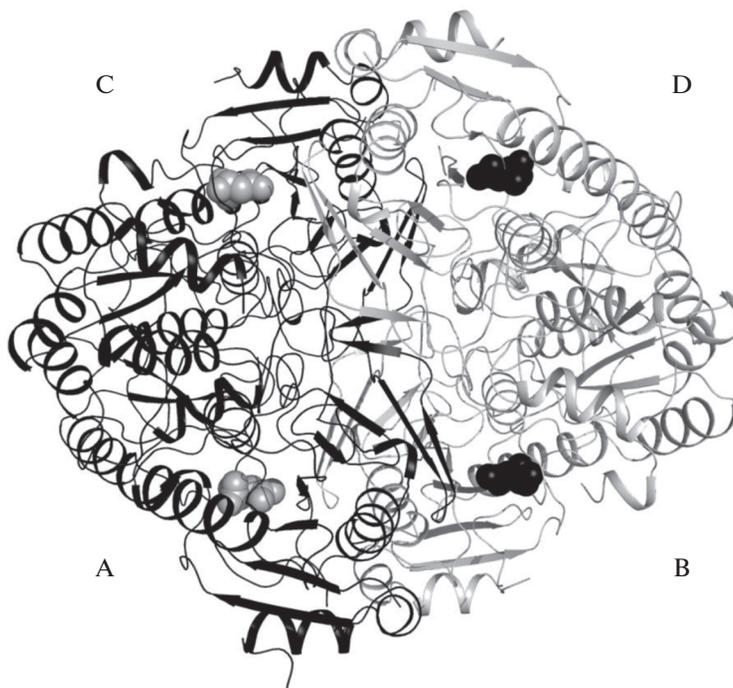


Рис. 2. Тетрамерная молекула мутантной формы *L*-аспарагиназы *W. succinogenes* (WASm). Темно-серым и светло-серым цветом обозначены два интимных домена, содержащих полностью сформированные активные центры. Сферами показан связанный в активных центрах лиганд (аспарагиновая кислота).

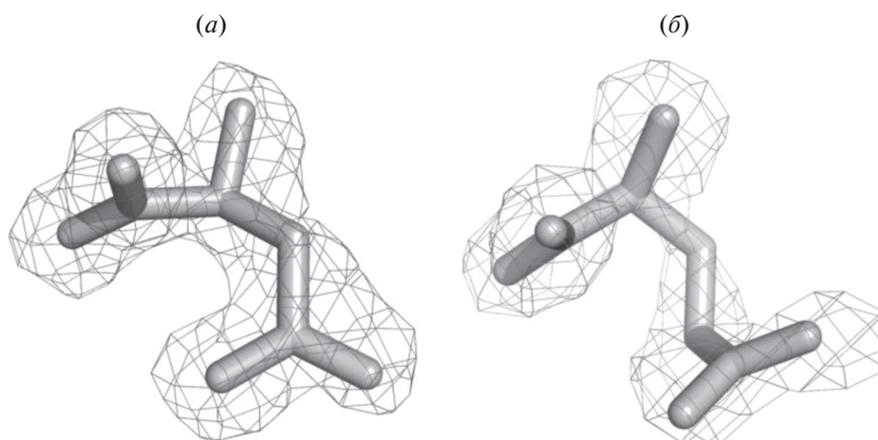


Рис. 3. Молекулы аспарагиновой (а) и глутаминовой (б) кислот, локализованные в активном центре *L*-аспарагиназы WASm. Электронная плотность рассчитана с коэффициентами $|Fo| - |Fc|$ при $\sigma = 2$. Лиганд был исключен при расчете карт электронной плотности.

совпадает с окружением аспарагиновой кислоты в субъединице А, имеющей открытую конформацию активного центра, хотя из-за большого объема глутаминовой кислоты расстояния между лигандом и группами ближайшего окружения в двух комплексах несколько отличаются (рис. 4б). При этом расстояние между атомами OE1_Glu и OG1_Thr14Å во всех субъединицах превышает 12 Å, что говорит об открытой конформации активного

центра в данном комплексе. Показано также, что все активные центры в апо-ферменте WASm находятся в открытой конформации.

Таким образом, в мутантном ферменте WASm, как и в других аспарагиназах, образование закрытой конформации активного центра при связывании глутаминовой кислоты и глутамина затруднено.

Установленное состояние активных центров подтверждается и сравнением данных структур

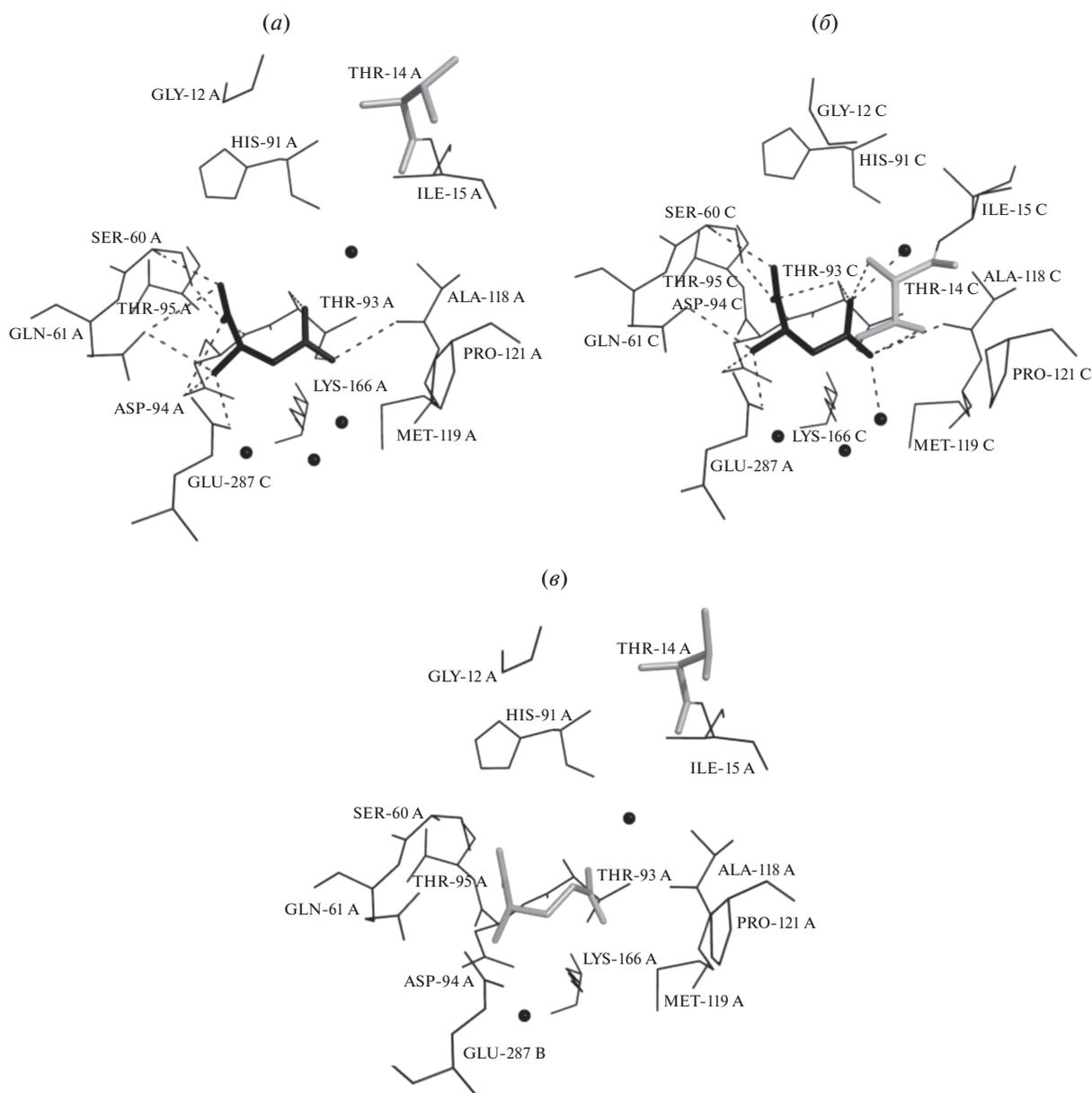


Рис. 4. Окружение лигандов в активном центре комплексов WASm с аспарагиновой (WASm/Asp) и глутаминовой (WASm/Glu) кислотой. (а) *L*-Аспартат в субъединице А (открытая конформация), (б) в субъединице С (закрытая конформация); (в) *L*-глутамат в субъединице А WASm/Glu (открытая конформация). Лиганды показаны утолщенными черными линиями. Черные сферы – молекулы воды. Светло серым показан аминокислотный остаток Thr14.

со структурами комплексов *L*-аспарагиназы WAS (WASPro121и WASSer121), описанными в работе [22], где впервые на картах электронной плотности были локализованы все аминокислотные остатки подвижной петли. В подвижной петле авторы выделили три ключевых шарнирных аминокислотных остатка Gly12, Ile15, Thr33, которые обеспечивают повороты этого участка полипептидной цепи и контролируют переходы между открытой и закрытой конформациями активного центра. Два первых остатка входят в консервативную для аспарагиназ последовательность TGGTIAG. Пер-

вый шарнирный остаток Gly12 позволяет петле поворачиваться к лиганду или от него. Около Ile15, который действует как внешний шарнир, полипептидные цепи в открытой и закрытой формах встречаются и снова расходятся у следующего остатка.

На рис. 5а, 5б показаны участки *N*-концевой подвижной петли в совмещенных по $C\alpha$ -атомам структурах исходной *L*-аспарагиназы (WAS) и мутантного фермента WASm, представляющих соответственно закрытую (а) и открытую (б) кон-

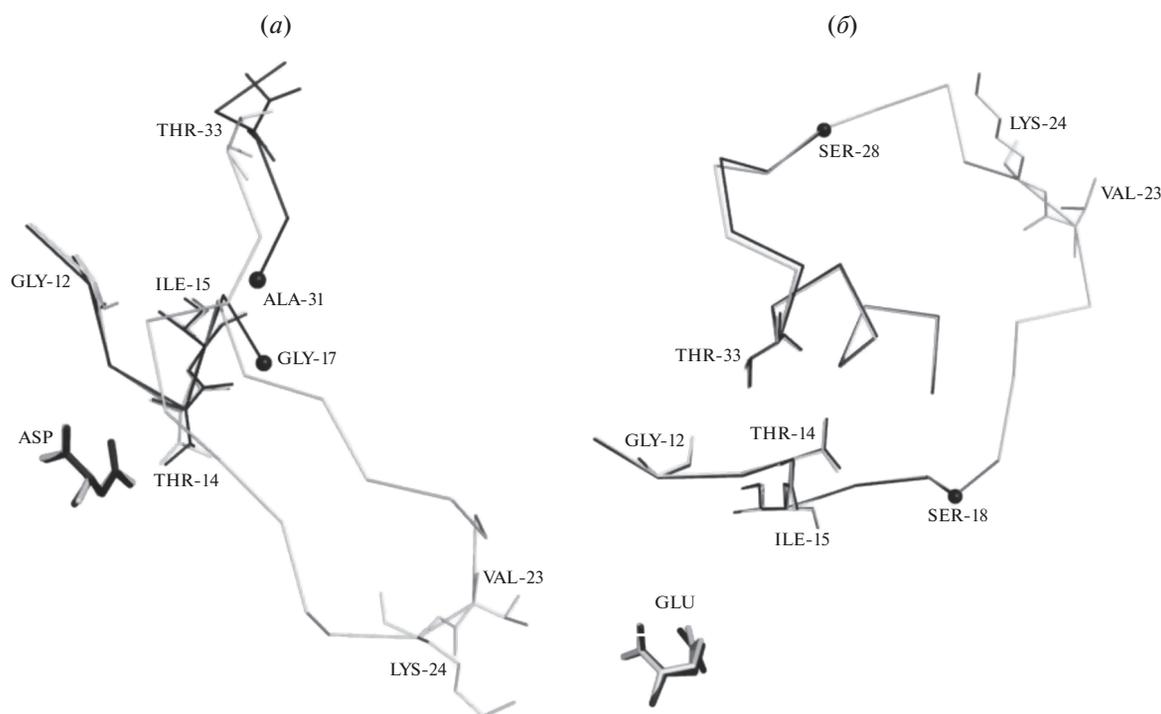


Рис. 5. Участки подвижных петель в совмещенных по $C\alpha$ -атомам субъединицах соответствующих комплексов исходной (WAS) и мутантной (WASm) *L*-аспарагиназы (а): WAS/Asp и субъединица С WASm/Asp (закрытые конформации); (б): WAS/Glu и субъединица А WASm/Glu (открытые конформации).

формации петли. Несмотря на то, что в мутантном ферменте WASm ряд аминокислотных остатков петли не локализован, первый и второй реперные остатки, Gly12 и Ile15, где меняет направление полипептидная цепь, следуя далее по открытому либо закрытому пути, хорошо видны. Как представлено на рис. 5, после реперного остатка Ile15 направление полипептидной цепи в мутантном ферменте меняется и следует по направлению, приводящему соответственно к закрытой (а) и открытой (б) конформации активного центра.

Сравнение структур комплексов мутантного фермента с соответствующими структурами исходной *L*-аспарагиназы (WAS), где локализованы все аминокислотные остатки подвижной петли, показывает, что замены в WASm расположены на участке, достаточно удаленном от связанного лиганда: расстояния между $C\alpha$ -атомами Val23, Lys24 и ближайшим атомом кислорода β -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты при закрытой конформации петли равны соответственно 16.00 и 14.65 Å. Следовательно, введенные замены не могут влиять на глутаминазную активность, непосредственно взаимодействуя с субстратом. Однако замены могут оказывать влияние на степень подвижности петли, поскольку изменяется характер взаимодействия остатков в положении 23 и 24 с ближайшим окружением.

Мутации остатков 23 и 24 были промоделированы с использованием координат *L*-аспарагиназы WAS. На рис. 6а–6г показано взаимодействие с ближайшим окружением остатков 23 и 24 в исходном ферменте и в модели мутантного фермента при открытой и закрытой конформации активного центра. Видно, что характер взаимодействия боковых цепей остатков 23 и 24 с ближайшим окружением в исходном и мутантном ферменте различны. Так, в закрытой форме при замене V23 на Q23 наблюдается короткий контакт (1.6 Å) с A43 из соседней субъединицы (рис. 6г), что делает невыгодной такую закрытую конформацию петли. Кроме того, после введения замен V23Q, K24T существенно меняется и электростатический потенциал поверхности на данном участке (рис. 7а–7б).

Таким образом, перечисленные факторы могут увеличить подвижность гибкой петли в мутантном ферменте и тем самым затруднить образование закрытой конформации активного центра в присутствии глутамин, испытывающего стерические препятствия при связывании. Об увеличении подвижности петли после введения замен можно судить и по отсутствию на картах электронной плотности WASm консервативного остатка тирозина (Tyr27), обычно хорошо определяемого в структурах аспарагиназ. Возможно, большая подвижность каталитически важного остатка тирозина препятствует СН/ π -взаимодействию

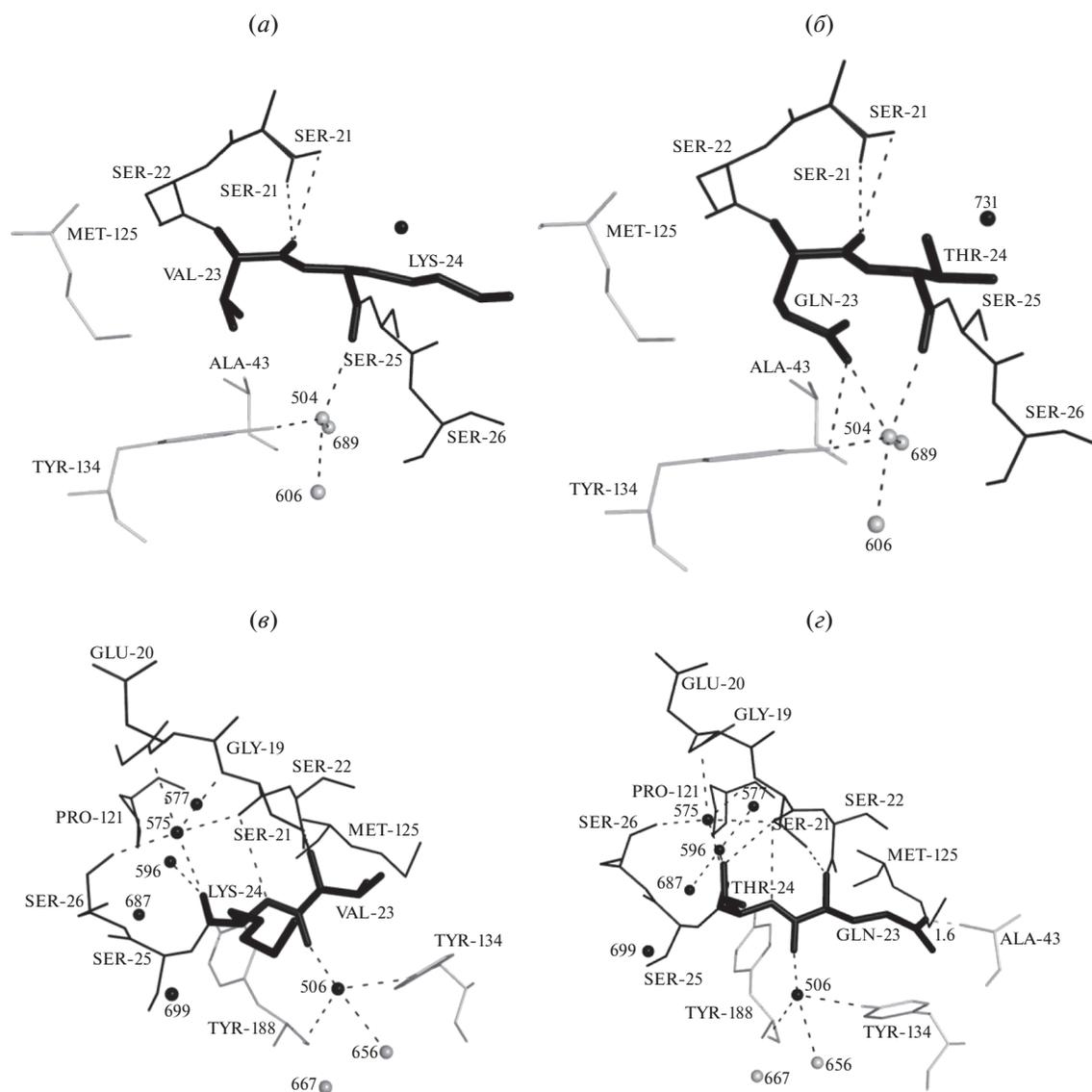


Рис. 6. Ближайшее окружение ($\geq 4 \text{ \AA}$) фрагмента петли 21–26, содержащего аминокислотные остатки 23 и 24, в исходной и мутантной формах *L*-аспарагиназы *W. succinogenes*: (а, в) открытая конформация, (б, г) закрытая конформация. Остатки 23 и 24 обозначены утолщенными линиями черного цвета. Серым цветом показаны аминокислотные остатки из соседней субъединицы. Серые сферы – молекулы воды.

между ароматическим кольцом тирозина и атомами водорода пролина 121. Отсутствие такого взаимодействия дестабилизирует закрытую форму и приводит к уменьшению глутаминазной активности мутантного фермента. Более точно определить поведение аминокислотных остатков подвижной петли в мутантном ферменте предполагается с использованием метода молекулярной динамики.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мутантная *L*-аспарагиназа V23Q, L24T (WASm) получена, как описано в [15, 16].

Кристаллы апо-формы и комплексов WASm с *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой аминокислотами выращены сокристаллизацией в присутствии соответствующих лигандов методом диффузии паров растворителя в висючей капле, как описано в [25]. Все кристаллы принадлежали пространственной группе $P2_1$ и содержали одну тетрамерную молекулу фермента в независимой части ячейки. Дифракционные наборы экспериментальных данных от предварительно замороженных кристаллов свободного фермента и его комплексов были собраны в токе паров азота при температуре 100 К на источнике синхротронного излучения SPring-8 (Япония), как описано в [16].

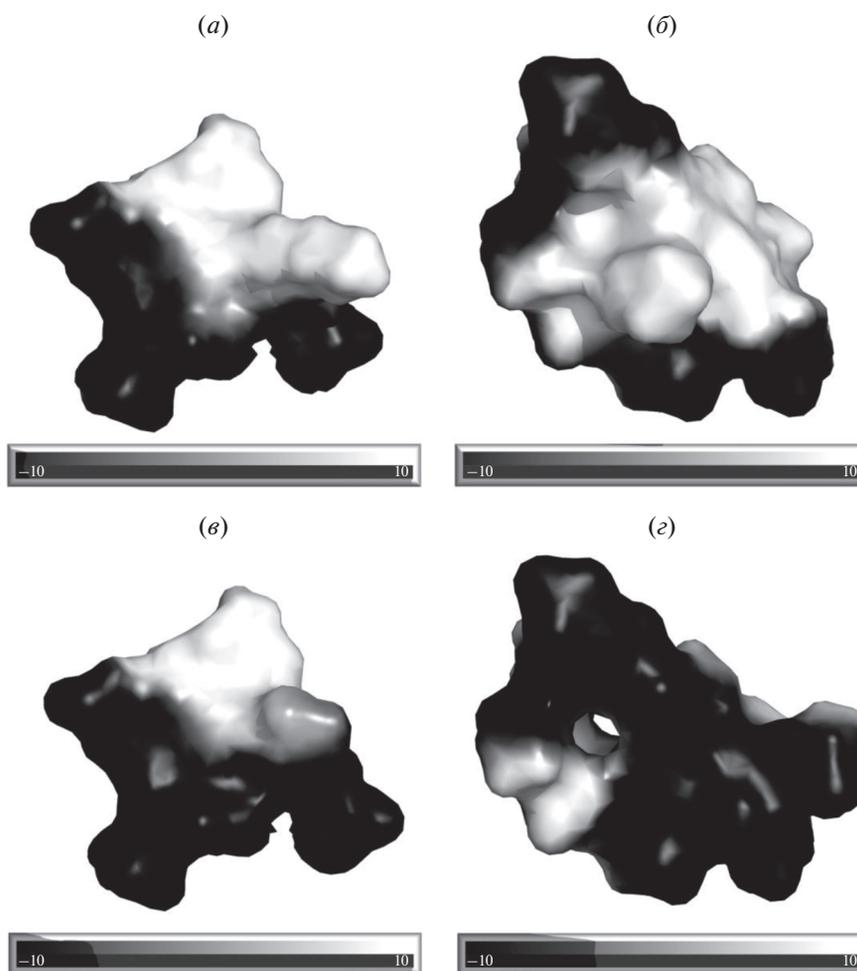


Рис. 7. Электростатический потенциал поверхности в окружении аминокислотных остатков 23 и 24 при открытой (слева) и закрытой (справа) конформации активного центра: (а) в исходном ферменте WAS, (б) в модели мутантного фермента WASm. Участки с отрицательным потенциалом обозначены черным, участки с положительным потенциалом – серым цветом. Шкала оттенков представлена в единицах kT/e в интервале от -10 до $+10$.

Структуры аспарагиназы в апо-форме и в комплексах с *L*-аспарагановой и *L*-глутаминовой кислотами решены методом молекулярного замещения с использованием программы Phaser [26] и координат аспарагиназы (PDB_ID: 1WSA) в качестве стартовой модели. Для уточнения структуры использовали программу Refmac [27]. Ручную правку моделей проводили при помощи программы Coot [28], используя карты электронной плотности, рассчитанные с коэффициентами $2|Fo|-|Fc|$ и $|Fo|-|Fc|$. На картах электронной плотности локализованы молекулы воды, а в активных центрах комплексов на разностных синтесах найдена электронная плотность, соответствующая аспарагиновой или глутаминовой кислоте (рис. 1а, 1б). На картах электронной плотности во всех структурах не были локализованы аминокислотные остатки 1–2, в структуре апо-формы в соответствующих субъединицах аминокислотные остатки 18А–27А, 21В–27В, 18С–28С, 20D–28D; в комплексе

с аспарагиновой кислотой – остатки 18А–27А, 18В–31В, 18С–30С, 20D–30D; в комплексе с глутаминовой кислотой – остатки 19–29 (субъединицы А, В, D), 17С–27С.

Статистические характеристики уточнения приведены в табл. 1. Координаты атомных моделей депонированы в Международный банк белковых данных (PDB_ID: 6RUD, 6RUE, 6RUF).

Анализ и сравнение пространственных структур проводили с использованием программ COOT, LSQ из пакета CCP4, PISA, PyMol [19–22]. Межмолекулярные и межсубъединичные контакты были определены с использованием программы CONTACT комплекса CCP4 и PISA [29, 30]. Моделирование замен 23 и 24-го остатков было проведено программой PyMol на основе координат исходного фермента [31]. Электростатический потенциал поверхности в окружении аминокислотных остатков 23 и 24 в открытой и закрытой конфор-

магии активного центра определен программой PyMol с использованием метода, описанного в [32].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-01148) в части решения и уточнения пространственных структур и при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части анализа пространственных структур.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Howard J.B., Carpenter F.J. // J. Biol. Chem. 1972. V. 217. P. 1020–1030.
- Lubkowski J., Wlodawer A., Ammon H.L., Copeland T.D., Swain A.L. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 10257–10265.
- Lubkowski J., Wlodawer A., Housset D., Weber T., Ammon H.L., Murphy K.C., Swain A.L. // Acta Crystallog. D. 1994. V. 50. P. 826–832.
- Broom J.D. // J. Exp. Med. 1968. V. 127. P. 1055–1072.
- Rohm K.H., Van Etten R.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 244. P. 128–136.
- Mc Credie K.B., Ho D.H., Freireich E.J. // CA. Cancer J. Clin. 1953. V. 23. P. 220–227.
- Chen S.-H. // Pediatr. Neonatol. 2014. V. 56. P. 1–7.
- Parmentier J.H., Maggi M., Tarasco E., Scotti C., Avramis V.I., Mittelman S.D. // Leuk. Res. 2015. V. 39. P. 757–762.
- Warrell R.P., Chou T.C., Gordon C., Tan C., Roberts J., Sternberg S.S., Philips F.S., Young C.W. // Cancer Res. 1980. V. 40. P. 4546–4551.
- Durden D.L., Distasio J.A. // Cancer Research. 1980. V. 40. P. 1125–1129.
- Durden D.L., Distasio J.A. // International Journal of Cancer. 1981. V. 27. P. 59–65.
- Van den Berg H. // Leuk. Lymphoma. 2011. V. 52. P. 168–178.
- Covini D., Tardito S., Bussolati O., Chiarelli L.R., Pasquetto M.V., Digilio R., Valentini G., Scotti C. // Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 2012. V. 7. P. 4–13.
- Shrivastava A., Khan A.A., Khurshid M., Kalam M.A., Jain S.K., Singhal P.K. // Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2015. V. 100. P. 1–10.
- Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E., Gubaydullin I.I., Chestukhina G.G., Ryabichenko V.V., Zalanin I.A., Kotlova E.K., Konstantinova G.E., Kubasova T.S., Shtil A.A., Pokrovsky V.S., Yarotsky S.V., Efremov B.D., Kozlov D.G. // Mol. Biotechnol. 2016. V. 58. P. 528–539.
- Lubkowski J., Palm G.J., Gilliland G.L., Derst Ch., Rohm K.H., Wlodawer K.-H.A. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 241. P. 201–207.
- Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 5655–5664.
- Nguyen H.A., Su Y., Lavie A. // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 17664–17676.
- Krasotkin Ju., Borisiva A.A., Gervaziev Yu.V., Sokolov N.N. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2004. V. 39. P. 215–221.
- Kravchenko O.V., Kislitsin Yu.A., Popov A.N., Nikonov S.V., Kuranova I.P. // Acta Cryst. 2008. V. D64. P. 248–256.
- Miller M., Rao J.K.M., Wlodawer A., Gribskov M.R. // FEBS Lett. 1993. V. 328. P. 275–279.
- Nguyen H.A., Durden D.L., Lavie A. // Scientific Reports. 2017. 7:41643.
- Palm G.J., Lubkowski J., Derst C., Schleper S., Rohm K.H., Wlodawer A. // FEBS Lett. 1996. V. 390. P. 211–216.
- Zondlo N.J. // Acc. Chem. Res. 2013. V. 46. P. 1039–1049.
- Тимофеев В.И., Булушова Н.В., Жухлистова Н.Е., Куранова И.П. // Кристаллография. 2019. Т. 64. С. 897–900.
- McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 658–674.
- Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. // Acta Cryst. D. 1997. V. 53. P. 240–255.
- Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126–2132.
- Collaborative Computational Project, Number 4. “The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography” // Acta Cryst. D. 1994. V. 50. P. 760–763.
- Krissinel E., Henrick K. // J. Mol. Biol. 2007. V. 372. P. 774–797.
- Schrödinger LLC. // The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.8. 2015.
- Baker N.A. // Methods in Enzymology. 2004. V. 383. P. 94–118.

The Peculiarity of Three Dimensional Structure of Mutant Form of *L*-Asparaginase *Wolinella succinogenes* Complexed with *L*-Aspartic and *L*-Glutamic Acid

V. I. Timofeev*, **, N. E. Zhukhlistova*, **, and I. P. Kuranova*, **, #

Phone: +7 (903) 169-79-56; e-mail: inna@ns.crys.ras.ru

*Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, Leninski pr. 59, Moscow, 119333 Russia

**National Research Center Kurchatov Institute, pl. Ak. Kurchatova 1, Moscow, 123098 Russia

The mutant form of *L*-asparaginase *Wolinella succinogenes* (WASm) which contains two replacements V23Q and K24T in the *N*-terminal flexible loop limiting an active site has a glutaminase activity one order of magnitude lower than original enzyme (WAS). The three dimensional structure was determined for apo form and complexes of WASm with *L*-aspartic and *L*-glutamic acids at resolution 1.70, 1.65 и 2.0 Å respectively. The residues of *N*-terminal flexible loop were partly localized. An aspartic and glutamic acids in corresponding complexes were localized with full occupancy in all active sites of the tetrameric enzyme molecules and their nearest vicinity was described. Using comparison with the structure of corresponding complexes of an original enzyme it was shown that positions of bound ligands in original and mutant enzymes coincide. The conformation of active sites in all molecules was considered. It was found that all active sites in apo enzyme and in complex of WASm with glutamate (WASm/Glu) have open conformation whereas the active sites in three subunits of WASm/Asp complex have closed conformation and only in one subunit the conformation is open. Based on the comparison of three dimensional structures of mutant and original enzyme and evaluating the impact of replacements, it was assumed that the decrease in glutaminase activity of WASm is caused by high mobility of the residues of *N*-terminal loop which complicates the formation of a catalytically active closed form of the active site after binding of less specific substrate (glutamine).

Keywords: *L*-asparaginase, protein spatial structure, enzyme



ДИМЕРЫ И ТРИМЕРЫ ХОНДРОИТИНА В МОЛЕКУЛЯРНОМ ДОКИНГЕ С БЫЧЬЕЙ ТЕСТИКУЛЯРНОЙ ГИАЛУРОНИДАЗОЙ

© 2020 г. А. В. Максименко*, #, Р. Ш. Библашвили*

*Институт экспериментальной кардиологии, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Россия, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А

Поступила в редакцию 12.09.2019 г.

После доработки 27.09.2019 г.

Принята к публикации 21.10.2019 г.

Выполнен молекулярный докинг 3D модели бычьей тестикулярной гиалуронидазы с димерами и тримерами хондроитина. Установлено наличие на поверхности глобулы фермента восьми мест присоединения его лигандов. При биологических концентрациях хондроитиновых лигандов наиболее значимыми центрами их присоединения к биокатализатору оказываются позиции, обозначенные 6, 3 и 1, в результате чего обратимо искажается 3D структура белка. Взаимодействия 3D модели гиалуронидазы с лигандами хондроитина обусловлены, в основном, электростатическими силами. Для молекулы свободной гиалуронидазы (без лигандов) при температурах выше 300 К отмечались конформационные переходы, ведущие к инактивации фермента. Ее доминирующее проявление определялось притяжением молекулярного участка около аминокислотного остатка Glu-105 и белковых областей вокруг Arg-59 и Arg-96, которое оказывалось необратимым, когда снижение температуры не вызывало восстановления исходного вида 3D структуры молекулы фермента. Присоединение к ней лигандов хондроитина по центрам 6, 3 и 1 повышало температуру денатурации биокатализатора примерно на десять градусов. Наиболее заметный эффект стабилизации структуры гиалуронидазы вызывало связывание лиганда хондроитина по центру 6. Отмеченный эффект превосходил эффекты тримеров хондроитинсульфата в отношении ингибирования фермента тетрамером гепарина, для чего требуется связывание четырех-пяти лигандов хондроитинсульфата на молекулярной поверхности биокатализатора.

Ключевые слова: бычья тестикулярная гиалуронидаза, пространственная структура белка, гликозаминогликановые лиганды, хондроитин, молекулярный докинг, стабилизация структуры фермента

DOI: 10.31857/S0132342320020153

ВВЕДЕНИЕ

Микроокружение гиалуронидаз предстает одним из факторов регуляции их активности. Такое рассмотрение интересно с позиций понимания функционирования гликозидаз (проявляющих эндогликозидазную и трансгликозилазную активность), а так же в отношении направленного изменения тканевой проницаемости в терапевтических целях. Моделировать микроокружение гиалуронидаз можно в результате ковалентного присоединения к ферменту гликанов. Ранее было продемонстрировано, что при глубоких степенях модификации декстраном (96–98% по поверхностным аминокетильным группам белка от их исходного

количества в нативном ферменте, главным образом, по Lys остаткам) гиалуронидаза приобретает выраженную резистентность к ингибированию гепарином [1]. Модификация аминокетильных групп биокатализатора декстрансульфатом (после его активации бензохиноном) уже при ее низких степенях (~15%) приводила к существенному снижению эндогликозидазной активности фермента, заметно ингибируемой избытком гепарина [2]. Можно полагать, что в результате сульфатирования нейтрального гомополимерного декстрана $[\text{Glc}(\alpha 1-6)]_n$ его структура становится более объемной и жесткой (с развитием в сульфатированном производном электростатических взаимодействий) и усиливается инактивирующее воздействие (посредством деформирующих конформационных и стерических затруднений) молекулы декстрансульфата на структуру гиалуронидазы [2]. Известно, что тестикулярная гиалуронидаза быстрее разрушает гиалуронан, чем хондроитинсульфат [3],

Сокращения: 3D – пространственная (третичная) структура белка; БТГ – бычья тестикулярная гиалуронидаза; ГАГ – гликозаминогликан; ГП – гепарин; ХН – хондроитин; ХС – хондроитинсульфат.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 414-60-25; эл. почта: alex.v.maks@mail.ru).

подчеркивая влияние эффекта сульфатирования взаимодействующих компонентов. Более того, отмечена сходная активность гиалуронидазы с гиалуронаном и хондроитином (ХН) без сульфогрупп в их составе [4]. Экспериментальные данные демонстрируют, что ковалентное присоединение к гиалуронидазе гликозаминогликанов (ГАГ) разного вида вызывает инактивацию фермента сополимерными ГАГ (как гепарин (ГП) и дерматансульфат), а связывание с хондроитинсульфатом (ХС, полимерный ГАГ) стабилизирует биокатализатор против гепаринового ингибирования. Разнонаправленное (стабилизация/инактивация) влияние декстрана и декстрансульфата на гиалуронидазу может предполагать наличие на молекулярной поверхности фермента участков/центров лимитирующих взаимодействий с этими полисахаридами [2].

Экспериментальное изучение взаимодействий в области поверхностных контактов гиалуронидазы с ГАГ весьма затруднено высокомолекулярной природой последних. В настоящее время обоснованным и продуктивным предстает выполнение молекулярного докинга короткоцепочечных фрагментов/лигандов ГАГ. Следует заметить, что для такого теоретического (расчетного) исследования взаимодействия одной молекулы фермента с лигандами их размер не должен превышать по длине линейный размер белковой молекулы (для нашего случая не более двенадцати глюкозных звеньев полимерной цепи). Докинг тримеров ХС и тетрамеров ГП на бычью тестикулярную гиалуронидазу (БТГ) был проведен нами и обнаружил на молекулярной поверхности фермента наличие восьми потенциальных мест связывания ГАГ лигандов [5]. В соответствии с расчетами ГП лиганд может инактивировать фермент (при вхождении в его активный центр), а ХС лиганды могут оказывать протективное действие (так при занятости ими четырех-пяти центров связывания на биокатализаторе полностью предотвращалась инактивация БТГ лигандом ГП). Проведенные вычисления указывали на возможную регуляцию стабильности БТГ в результате конкурентных взаимодействий разных ГАГ лигандов с биокатализатором, обусловленных, главным образом, электростатическими силами. Последовательное составление расширенной картины докинга, оценка влияния сульфатирования его небольших компонентов, выявление взаимодействий перспективных для модифицирования БТГ с целью дизайна новых белковых структур медицинского назначения обосновывали значимость и определили задачи последующего этапа выполнения молекулярного докинга БТГ с короткоцепочечными лигандами (димер, тример) ХН. В настоящей работе предпринята попытка анализа механизма тепловой денатурации БТГ и влияния на нее ГАГ лигандов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведение молекулярного докинга 3D-модели БТГ [6] с димерами и тримерами ХН (несульфатированная форма ГАГ вида $([-4)GlcA(\beta-3)GalNAc(\beta-1)_n$, где n равняется 2 или 3 соответственно [7]) выявило на поверхности глобулы фермента восемь потенциальных центров связывания этих лигандов (рис. 1). Отмеченные участки весьма близки, но не идентичны тем, по которым предсказывалось связывание тримера ХС и тетрамера ГП [5]. Следует напомнить об ограничениях построенной нами 3D модели БТГ, в которой отсутствуют 36 аминокислот с *N*-конца и несколько десятков аминокислот с *C*-конца [6]. Весьма вероятно, что *N* концев размещается в области между местами связывания ГАГ лигандов по центрам 1 и 2, тогда как расположение *C*-конца пока не определено даже предположительно.

Статистически, при 12 кратном избытке ХН над БТГ (в “большой” ячейке) при температуре 300 К (27°C) структура, показанная на рис. 1, никогда не наблюдалась. Большей частью отмечалось образование комплексов с четырьмя лигандами на одну молекулу БТГ. Остальные лиганды были в свободном состоянии. Осуществлялось связывание с молекулой белка и трех лигандов (25%), очень редко двух, и никогда — пяти. Почти всегда были заняты позиции, обозначенные 1, 3 и 6 (нумерация центров связывания та же, что и при докинге лигандов ХС [5]). Среди указанных на белковой поверхности позиций наибольшей величиной свободной энергии связывания отличался центр 6 (–(620–690) ккал/моль). Для центра 3 эта величина составляла –(310–420) ккал/моль, а для центра 1 –(280–320) ккал/моль (при последовательном насыщении центров 6, затем 3 и 1). В роли четвертого центра присоединения ХН лигандов с равной вероятностью могли выступать позиции 2 и 7, характеризующиеся величиной свободной энергии связывания –(150–180) и –(120–140) ккал/моль (при условии, что центры 6, 3 и 1 заняты, а при связывании со свободной БТГ величина свободной энергии связывания на 160–200 ккал/моль выше). Довольно редко были заняты центры 8 и 5, только один раз 4. Следует отметить, что величина энергии самих свободных ХН лигандов в водном растворе хлористого натрия (три катиона натрия вблизи тримера ХН и два катиона натрия около димера ХН) оказывается для тримера ХН ориентировочно как –320 ккал/моль, для его димера –(180–220) ккал/моль. Сравнение приведенных величин свидетельствует, что при биологических концентрациях ХН интерес представляют центры связывания ХН с БТГ по местам 6, 3 и 1, тогда как значимостью остальных вполне можно пренебречь.

БТГ в комплексе с природным субстратом (согласно расчетам [5]) стабильна против тепловой

денатурации до 340 К. В отсутствие субстрата или других ГАГ олигосахаридов она должна денатурировать уже при температуре 320 К. Основной движущей силой деформации молекулы БТГ, приводящей к денатурации, является разность потенциалов между положительно заряженной средней частью молекулы и отрицательно заряженными участками правой и левой периферийными зонами (рис. 1 и 2).

Вся система, изображенная на рис. 1 и 2, заключена в непроницаемое пространство, образованное 14 гексагональными гранями одинакового размера. Система состоит из молекулы гиалуронидазы при pH 7.5. При этом все Asp и Glu предполагаются электроотрицательными, Lys и Arg – положительно заряженными, а His, Cys и Tug – электронейтральными. Возможности реполяризации соседних аминокислот лизина и карбоксилатов Asp и Glu с переносом протона и нейтрализации обоих в данной работе не учитывались. Также игнорировался перенос протона между соседними His и Tug с Asp или Glu. Молекула фермента имеет заряд +8.5 ае (атомных единиц) и дипольный момент 631 дебай с направленным вверх вектором (по рис. 1). Он в основном складывается из двух векторов, направленных под углом 45° к вертикали справа от 426 и 427 аминокислот к центральной плоскости и слева от 171, 104 и 105 аминокислот к центральной поперечной к рисунку плоскости молекулы. Хондроитиновые лиганды заряжены отрицательно: тримеры –3.2, а димеры –2.5. Вся система, показанная на рис. 1, содержит 8600 молекул воды и электронейтральна за счет избытка 15 ионов Na над Cl. Слои воды при конструировании водной оболочки разделены на три слоя под разными именами. Первый слой 1200 молекул, заполняющий пространство, отстоящее от макромолекулы на 5 Å, второй слой 7400 молекул, заполняющий 14-гранное пространство (показано на рис. 1), и третий – самый обширный слой, заполняющий шестигранную коробку с прямоугольными гранями, размеры которых вдвое превышали размеры длины макромолекулы вдоль ее осей инерции (77.5; 51.9; 53.8 Å) или зеркальный шар с радиусом 56 Å, описанный вокруг Tug-265, локализованного вблизи центра инерции БТГ. Такая система содержит около 20000 молекул воды и позволяет разместить около 100 ионов Na и Cl и 12 молекул олигосахарида, способствуя последним находить свои места на поверхности БТГ в динамике при 300 К. Основные расчеты тепловой денатурации производились для системы с 14 гексагональными гранями с 8600 молекулами воды. Докинг или анализ занятости БТГ лигандами проводились в “большой” ячейке. Разные названия для молекул воды позволяли при демонстрации структур либо вовсе не показывать воду, либо показывать только внутреннюю воду (1200 молекул воды), либо 8600.

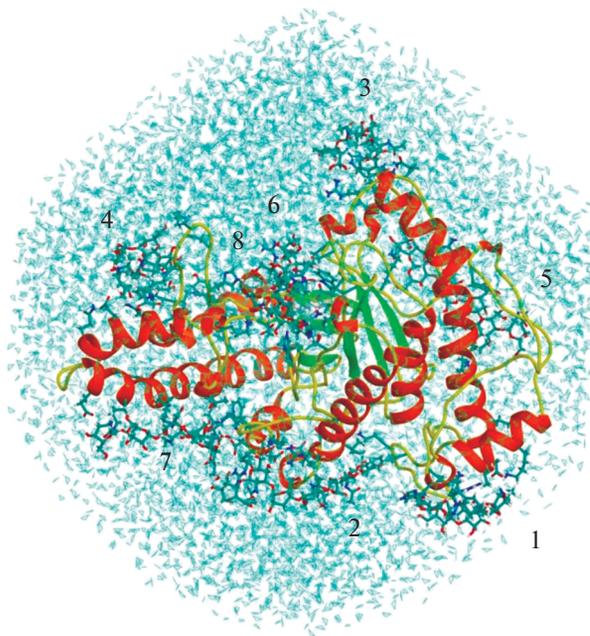


Рис. 1. Присоединение по восьми центрам/позициям связывания димеров и тримеров ХН (обозначенных как 1, 2, 3 и т.д.) на молекулярной поверхности БТГ. Молекула гиалуронидазы на рисунке ориентирована параллельно главной оси инерции белка вдоль горизонтальной оси, а субстратная долина так, что главная ось инерции додекамерного субстрата перпендикулярна плоскости рисунка. Молекула гиалуронидазы представлена в ленточной форме, альфа-спиральные участки показаны красным, бета-структура – зеленым, остальные желтым. ГАГ лиганды представлены в виде мелких шариков, соединенных цилиндрами, ионы Na и Cl – мелкими шариками, а молекулы воды – тонкими голубыми линиями. Участки 1, 2, 3 и 7 расположены в плоскости рисунка (1 и 7 посередине, 2 ближе к наблюдателю, а 3 дальше от наблюдателя), 4, 5 и 8 с дистальной стороны молекулы белка, а 6 занимает субстратную долину и его позиция перпендикулярна плоскости рисунка.

Слои воды в динамике, естественно, частично перемешивались.

Участки БТГ, ассоциированные с 1 участком вероятного связывания ГАГ, обогащены лизином (непосредственно K430, K446, K447 и R448 и в небольшом удалении R391, K392), ассоциированные со 2 участком – обогащены аргининами K244, R245, R246, R289 и K292, с 3 участком – аргининами (R59, R63 и R64). С 4 участком соседствуют K106, K109, K122, K127, с 5 – R72, K416, с 6 – R82, R96, K160, K162, R152, R307, с 7 – K152, R157, R166, K187, K190 и K198, с 8 – K122, K127, K129, K206, K209, R212.

Рис. 3 показывает динамику изменения структуры БТГ в отсутствие ГАГ при температуре выше 37°C. Деформация 3D структуры свободной БТГ без лигандов ХН была заметна уже при 37°C/310 К. С ростом температуры процесс сильно ускоряет-

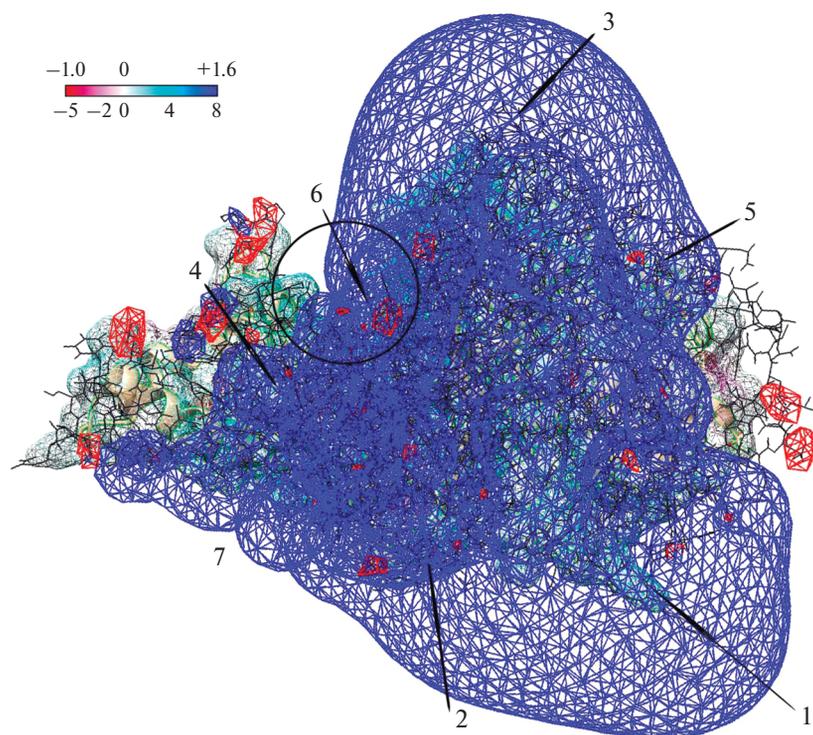


Рис. 2. Электростатический потенциал молекулы БТГ в воде (рН 7.5) без учета влияния ионов Na и Cl. Изопотенциальные поверхности обозначены синим +1.6 В и красным цветом –1.2 В. Между правой и левой стороной субстратной долины (выделена черной окружностью) имеется существенная разность потенциалов. При низкой температуре под влиянием ионов Na и Cl разность потенциалов существенно снижается, и молекула БТГ сохраняет структуру даже в отсутствие субстрата. Но при повышении температуры, благодаря увеличению подвижности ионов, происходит деформация молекулы, приводящая к инактивации фермента. На заднем плане зеленым цветом показана поверхность молекулы БТГ. Цифрами обозначены центры присоединения ХН лигандов (позиция 8 расположена с дистальной стороны молекулы белка, как показано на рис. 1).

ся. При температуре 320 К движение отрицательно заряженного белкового участка с Asp-104 и Glu-105 у его вершины по направлению к положительно заряженной зоне, образованной Arg-59, Arg-63, Arg-64 у участка 3 и Arg-96 в удаленном конце субстрат-связывающей долины, приводит к ее быстрому (за 35–40 пс) перекрыванию (рис. 3а, 3б, 3в). Такие конформационные изменения БТГ в отсутствие лигандов ХН были необратимы и снижение температуры не вызывало восстановления исходного вида структуры молекулы фермента (рис. 3з). Полученные данные внятно прогнозировали термоинактивацию биокатализатора. При этом интересны изменения расстояний между определенными аминокислотными остатками в 3D структуре БТГ (при 320 К в зависимости от времени наблюдения /пс/) (рис. 4). Наиболее заметным оказалось перемещение между позициями Glu-105 и Arg-59 (т.е. между пиком белковой цепи с Glu-105 на его вершине и положительным заряженным участком вокруг R59), представляющими важный начальный этап рассчитанной денатурации БТГ. Расстояния между другими аминокислотными остатками БТГ (ответственными за каталитическое действие аминокислотами Asp-147

и Glu-149, располагающимися в активном центре, и аминокислотами рядом и вокруг них Asp-147 и Asn-150, Glu-149 и Lys-162, Glu-149 и Trp-148) не оказались столь изменчивыми, но относительная ориентация отмеченных аминокислотных остатков изменялась значительно. Эти данные демонстрировали существенное искажение активного центра БТГ и полное закрытие входа для проникновения к нему субстрата, что определенно прогнозирует инактивацию фермента. Другие области БТГ также испытывали значительные изменения (рис. 3).

Симуляция поведения БТГ в комплексе с лигандами ХН обнаруживает их стабилизирующее действие на 3D структуру фермента при 320 и 340 К (рис. 5а–5в) в сравнении с рис. 3 для свободной БТГ. Присоединение лигандов ХН по центрам 6, 3 и 1 БТГ повышало виртуальную температуру денатурации фермента примерно на 10–15 К, значительно замедляло процессы деформации структуры БТГ и изменяло характер конформационных переходов в молекуле биокатализатора. Следует отметить значимый защитный эффект стабилизации структуры БТГ в результате присо-

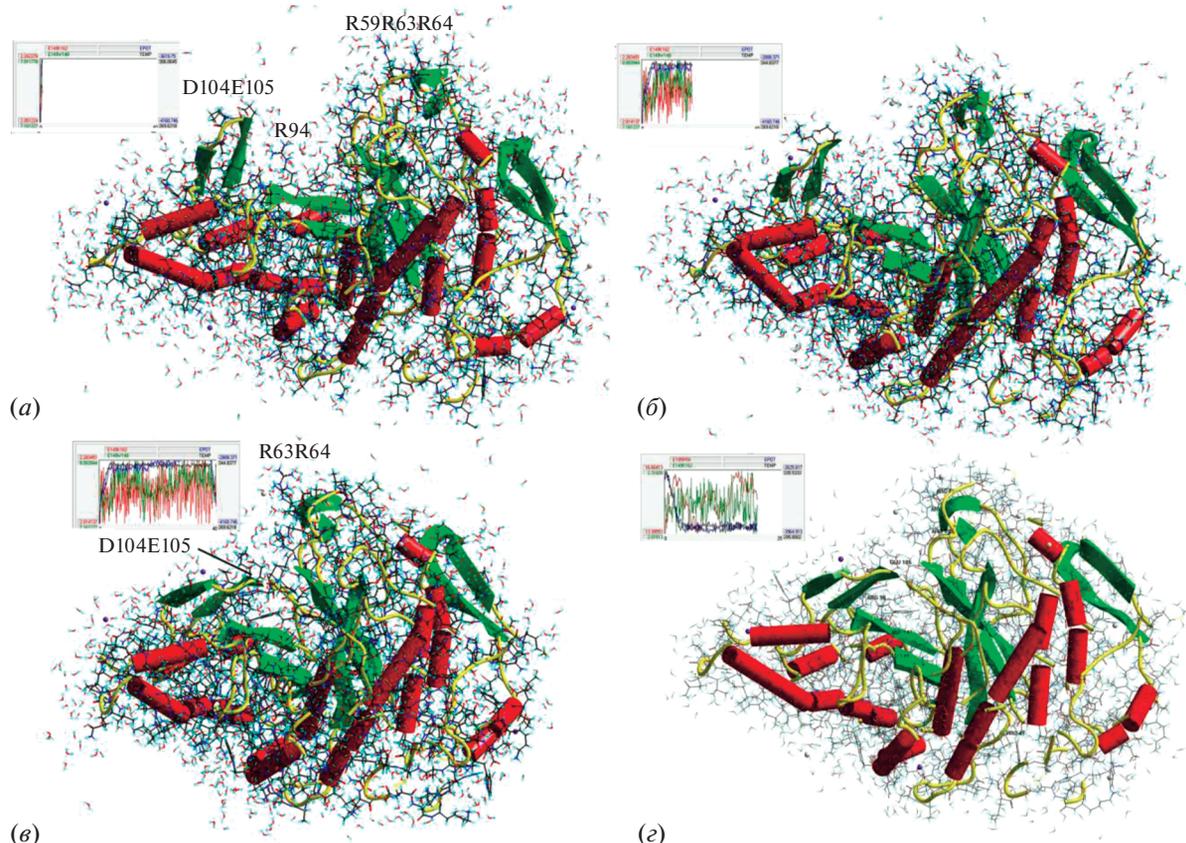


Рис. 3. Кинетика тепловой денатурации свободной от ГАГ лигандов гиалуронидазы при температуре 320 К со временем расчетного наблюдения: (а) 1 пс, (б) 17 пс, (в) 40 пс, (г) 20 пс после снижения температуры до 287 К.

единения лиганда ХН именно по центру 6 на белковой поверхности. Присутствие лиганда в позиции 6 не позволяло белковому пику с Glu-105 блокировать вход в субстратную долину, хотя движение в сторону смыкания с Arg-59, Arg-63, Arg-64 наблюдалось. Расчеты, симулирующие поведение системы при снижении температуры, в этом случае предсказывают высокую вероятность обратимости денатурации БТГ в присутствии ХН лиганда в субстратной долине (рис. 5г).

Необходимо отметить, что связывание ХН лигандов по центрам 6, 3 и 1 на молекуле БТГ (рис. 5а–5г) не вызывает заметных и необратимых конформационных изменений структуры фермента. Отметим, что ранее мы показали стабилизирующее действие субстрата (додекасахарида гиалуронана) БТГ на структуру фермента [5].

Интересно отметить, что малореалистичная (на экспериментальной практике) ситуация, когда ХН связан только по участкам 1, 2 и 3, виртуально также оказывает протективное действие на тепловую денатурацию БТГ, повышая температуру денатурации до 345 К и на порядок замедляя скорость реакции.

Учитывая, что в докинге БТГ с ХН лигандами с заметной вероятностью могут быть заняты на

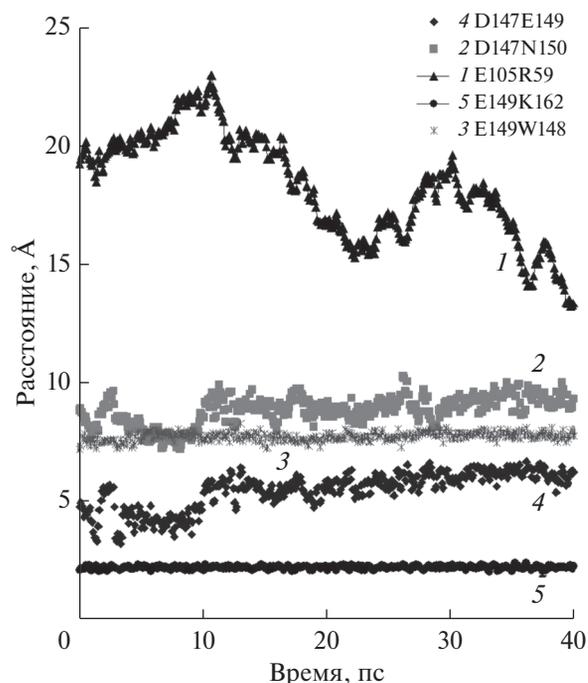


Рис. 4. Изменение расстояний между позициями аминокислотных остатков E105R59 – 1, D147N150 – 2, E149W148 – 3, D147E149 – 4, E149K162 – 5 в зависимости от времени расчетного наблюдения (пс) при 320 К.

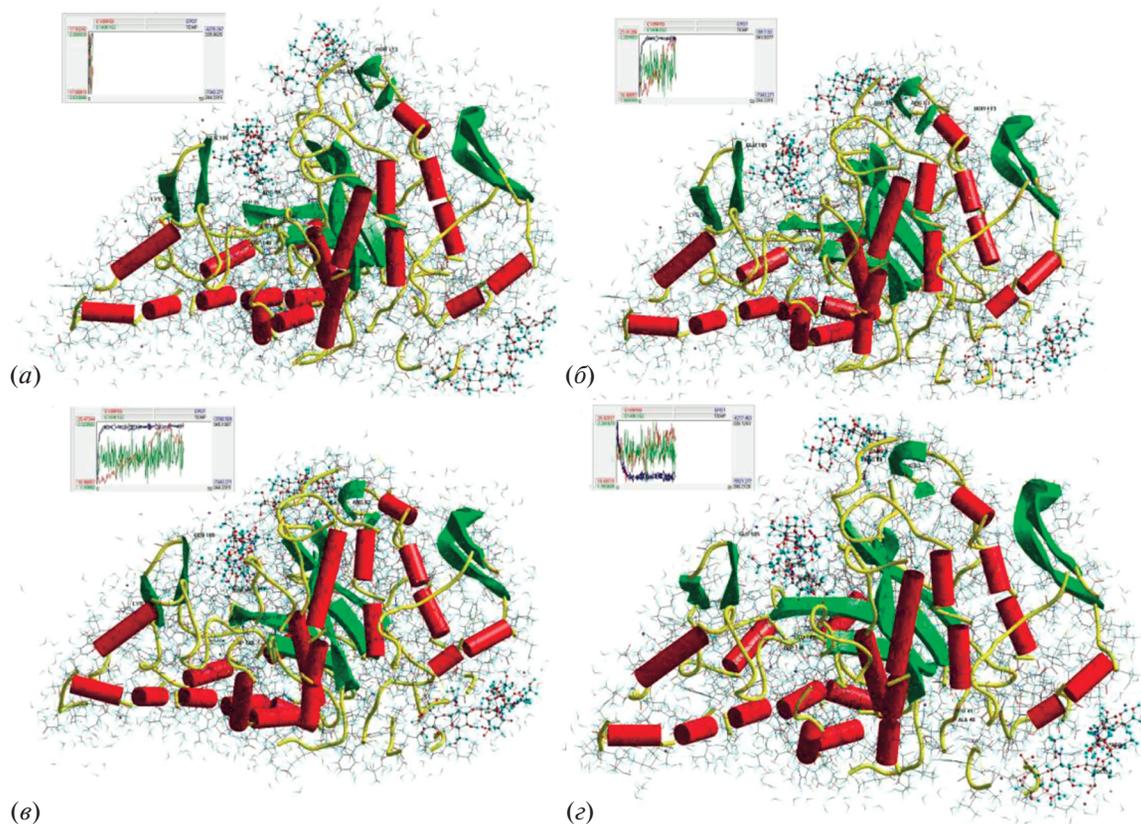


Рис. 5. Кинетика тепловой денатурации БТГ в комплексе с ХН в положениях 1, 3 и 6 при температуре 340 К со временем наблюдения: (а) 3 пс, (б) 18 пс, (в) 36 пс, (г) 36 + 18 пс после снижения температуры до 287 К.

глобуле биокатализатора только центры 1, 2, 3 и 6, целесообразно оценить влияние ХН лигандов на структуру фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стереоконфигурация специфического субстрата БТГ гиалуронана и использованного нами при выполнении молекулярного докинга ХН отличаются лишь конфигурацией атома С(4) в гексозаминовом остатке [8]. Предположительно, такие тонкие структурные различия лигандов могут заметно регулировать соотношение структура-функция гиалуронидаз. Полученные в работе данные демонстрируют, что ХН (в форме димера или тримера), *N*-ацетилированный по галактозному остатку, но несультатированный, обладает стабилизирующим эффектом на 3D структуру БТГ (благодаря присоединению лиганда к ней, главным образом, по центру б) при ее расчетной термоинактивации. Отметим, что влияние ХН лиганда превосходит влияние ХС лигандов в отношении ингибирования фермента тетрамером ГП, для чего необходимо присоединение четырех-пяти ХС лигандов по центрам их связывания на молекулярной поверхности биокатализатора [5]. Стаби-

лизирующее влияние на 3D структуру БТГ тримерных лигандов ХС и ХН против различных воздействий (ингибирование гепарином и термоинактивация биокатализатора соответственно) обуславливает актуальность прямого сравнительного теоретического изучения эффектов этих лигандов с учетом взаимодействий БТГ с другими ГАГ компонентами природного микроокружения фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3D-модель БТГ в свободном виде, построенная нами ранее [6], была использована в качестве исследуемой молекулы фермента для выполнения расчетного молекулярного докинга с димерными и тримерными лигандами ХН.

Программы UCSF Chimera, Amber и DOCK были использованы для осуществления молекулярного докинга [9–11]. Выбор ХН лигандов проводили с базы данных Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, используя димер и тример ($[-4)\text{GlcA}(\beta 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-)_n$), где n равняется 2 или 3 соответственно [7]) ХН. Их докинг на молекулярной поверхности БТГ (в виде смеси десяти димеров и десяти тримеров ХН на одну молекулу фермента) воспроизводили сто раз

(при pH 7.5, 0.1 М NaCl, 18 М H₂O (обычное значение концентрации воды), при 300, 310, 320, 330 и 340 К). Пояснение о различии слоев воды в ячейке для расчетного рассмотрения докинга указано в четвертом абзаце раздела Результаты и обсуждение. При таких же условиях рассчитывали термоинактивацию свободной молекулы БТГ (без лигандов ХН). За обратной динамикой 3D структуры БТГ следили после снижения температуры (от указанных выше величин) до 287 К.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-015-00056) и Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максименко А.В., Щечилина Ю.В., Тищенко Е.Г. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 4. С. 563–572. [Maksimenko A.V., Schechilina Y.V., Tischenko E.G. // Biochemistry (Moscow). 2001. V. 66. № 4. P. 456–463].
2. Максименко А.В., Щечилина Ю.В., Тищенко Е.Г. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 8. С. 1055–1062. [Maksimenko A.V., Schechilina Y.V., Tischenko E.G. // Biochemistry (Moscow). 2003. V. 68. № 8. P. 862–868].
3. Meyer K., Rapport M.M. // Arch. Biochem. 1950. V. 27. № 2. P. 287–293.
4. Hoffman P., Meyer K., Linker A. // J. Biol. Chem. 1956. № 2. 653–663.
5. Максименко А.В., Бибилашвили П.Ш. // Биоорганическая химия. 2018. Т. 44. № 2. С. 147–157. [Maksimenko A.V., Beabealashvili R.S. // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2018. V. 44. № 2. P. 165–172].
6. Максименко А.В., Турашев А.Д., Бибилашвили П.Ш. // Биохимия. 2015. Т. 80. № 3. С. 348–357. [Maksimenko A.V., Turashev A.D., Beabealashvili R.S. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. № 3. P. 284–295].
7. Yang J., Chi L. // Carbohydr. Res. 2017. V. 452. P. 54–63.
8. Максименко А.В., Бибилашвили П.Ш. // Изв. АН. Сер. Хим. 2018. № 4. С. 1–11. [Maksimenko A.V., Beabealashvili R.S. // Russ. Chem. Bull. Intl. Ed. 2018. V. 67. № 4. P. 1–11].
9. 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. № 13. P. 1605–1612.
10. Sanuer M.F., Olson A.J., Spehner J.C. // Biopolymers. 1996. V. 38. № 3. P. 305–320.
11. Lang P.T., Brozell S.R., Mukherjee S., Pettersen E.F., Meng E.C., Thomas V., Rizzo R.C., Case D.A., James T.L., Kuntz I.D. // RNA. 2009. V. 15. № 6. P. 1219–1230.

Dimers and Trimers of Chondroitin in Molecular Docking of Bovine Testicular Hyaluronidase

A. V. Maksimenko*^{*,#} and R. Sh. Beabealashvili*

[#]Phone: +7(495)414-60-25; e-mail: alex.v.maks@mail.ru

*Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center for Cardiology, 3-rd Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121552 Russia

Molecular docking of 3D model of bovine testicular hyaluronidase was been performed with dimers and trimers of chondroitin. Eight centers/positions of its ligands coupling was estimated on molecular surface of hyaluronidase globule. The most significant centers for chondroitin ligand coupling were positions in enzyme structure noted as 6, 3, 2 and 1. The 3D model of hyaluronidase structure was strained reversible alterations herewith. The interactions of enzyme structure with chondroitin ligands are determined by electrostatic forces in the main. Free hyaluronidase molecule (without ligands) at temperature above 300 K has been assayed the conformational transfers bringing to the enzyme inactivation. Its dominate display was determined with irreversible attraction of molecular site around aminoacid residue Glu-105 to protein area about Arg-59 and Arg-96, when temperature decrease did not induced the restoration of initial view of 3D structure of enzyme molecule. The binding to enzyme structure the chondroitin ligands (according to positions 6, 3 and 1) increased the denaturation temperature of biocatalyst approximately ten grades. The most significant effect of enzyme structure stabilization was provided with chondroitin ligand binding with hyaluronidase on site 6. This effect of protein structure stabilization was exceeded the chondroitin sulfate trimers effects against heparin tetramer inhibition of biocatalyst. For latter it is necessary the coupling of four-five chondroitin sulfate ligands on molecular surface of enzyme.

Keywords: bovine testicular hyaluronidase, tertiary protein structure, glycosaminoglycan ligands, chondroitin, molecular docking, stabilization of enzyme structure



УДК 547.853+544.165

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И СИНТЕЗ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗЫ BCR-ABL С МУТАЦИЕЙ T315I

© 2020 г. А. Н. Федоркевич*, #, О. Л. Шарко*, В. В. Шманай*

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

Поступила в редакцию 10.10.2019 г.

После доработки 29.10.2019 г.

Принята к публикации 14.11.2019 г.

Методом компьютерного моделирования проведен сравнительный анализ взаимодействия химерного белка BCR-ABL – нормального типа и с мутацией T315I, с известными ингибиторами, а также с предложенными соединениями, потенциально способными к ингибированию мутантного белка. Показано, что предложенные соединения встраиваются в структуру белка с сохранением основных водородных связей и межмолекулярных взаимодействий. Осуществлен синтез двух структур, содержащих пиррольный цикл, которые оказались наиболее перспективными на основании результатов компьютерного моделирования.

Ключевые слова: ингибиторы тирозинкиназы BCR-ABL, AutoDock Vina, производные пиррола

DOI: 10.31857/S0132342320020086

ВВЕДЕНИЕ

Тирозинкиназа BCR-ABL – гибридный белок, продукт гибридного гена *Bcr-Abl1*, формирующегося в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22 (филадельфийская хромосома). Белок BCR-ABL является конститутивно активной тирозинкиназой, ответственной за онкогенную трансформацию клеток онкобелком. Постоянная активность этой тирозинкиназы делает клетку нечувствительной к воздействию факторов роста и вызывает ее избыточную пролиферацию. Формирование белка BCR-ABL провоцирует 95% случаев хронического миелолейкоза и 20–50% случаев острого В-лимфобластного лейкоза взрослых [1].

Хронический миелоидный лейкоз поддается лечению таргетной (целевой) терапией ингибиторами тирозинкиназ: иматинибом, нилотинибом, дазатинибом и др. Терапия значительно улучшает показатели выживаемости. Однако использование данных препаратов со временем приводит к появлению резистентности у пациентов вследствие развития точечных мутаций в BCR-ABL-белке. Появление мутации T315I в тирозинкиназе BCR-ABL приводит к потере ключевой водородной связи между белком и ингибито-

ром и становится критичным для связывания белка с большинством известных ингибиторов. В настоящее время ведется поиск эффективных препаратов, которые способны ингибировать активность белка с наличием мутации T315I [2].

В работе представлены результаты моделирования взаимодействия белка BCR-ABL, в том числе с мутацией T315I, с основными известными ингибиторами тирозинкиназ, а также с предложенными новыми структурами. Были синтезированы перспективные для дальнейшего исследования соединения с наличием фрагмента пиррола в структуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым специфическим ингибитором тирозинкиназы BCR-ABL, прошедшим клинические испытания и в настоящее время используемым для лечения больных хроническим миелоидным лейкозом, является иматиниб (рис. 1).

Иматиниб связывается с неактивной конформацией белка [3] и образует при этом 6 водородных связей и большое число ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Ключевыми для связывания с ингибитором являются в белке остатки Met-318, Thr-315, Glu-286, Asp-381 (рис. 2) [4].

Появление мутации T315I ведет к потере одной из основных водородных связей между белком и молекулой иматиниба из-за исчезновения ОН-группы треонина. Также при появлении мутации возни-

Сокращения: DMF-DMA – диметилформамида диметил-ацеталь; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DCC – дициклогексилкарбодиимид; ПЭ – петролейный эфир.

Автор для связи: (тел.: +3 (754) 479-257-04; эл. почта: artem.fedorkevich@gmail.com).

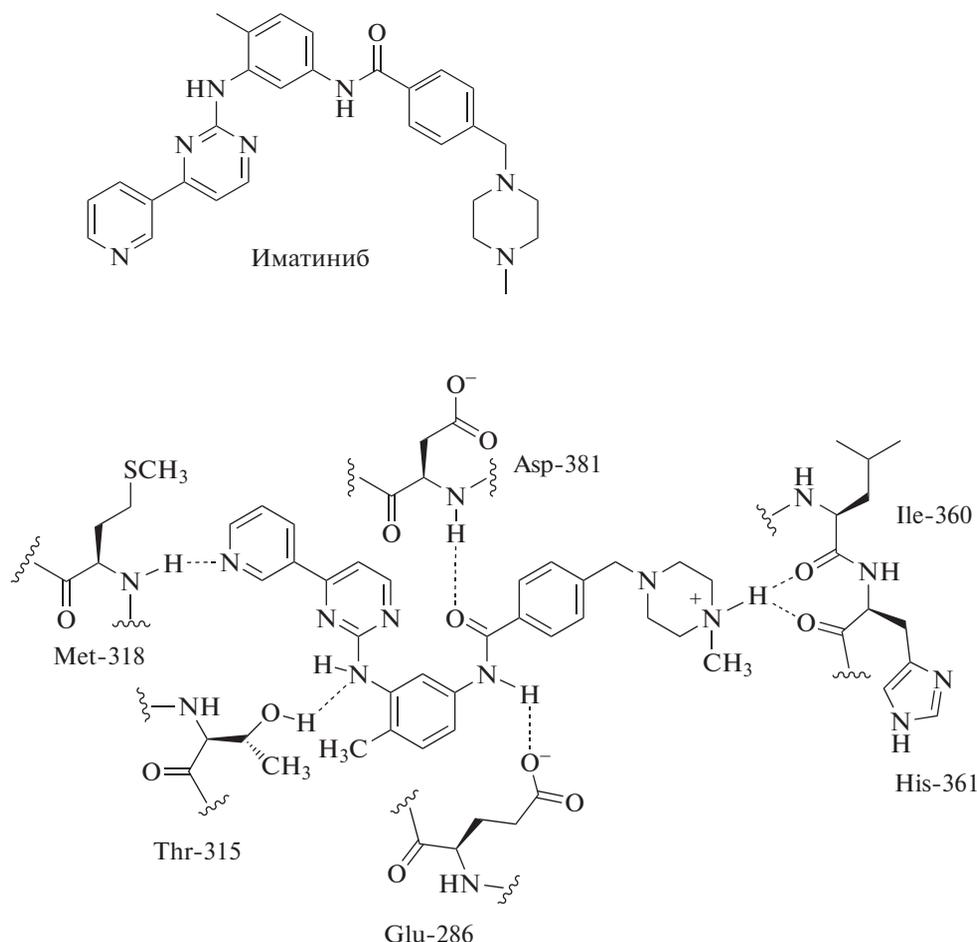


Рис. 1. Структура иматиниба.

кают серьезные стерические препятствия для встраивания ингибитора в активный центр белка. Иматиниб не встраивается в структуру такого мутантного белка, что критически влияет на его ингибирующую способность (рис. 3).

Основная идея данной работы состоит в том, чтобы сконструировать молекулу ингибитора таким образом, чтобы фрагмент молекулы, который вызывает стерические затруднения при встраивании в структуру белка, был более гибким и менее объемным. Это позволит ингибитору встраиваться в структуру белка с наличием мутации T315I с сохранением ингибирующей активности. Для этого один из шестичленных циклов в молекуле иматиниба был заменен на пятичленный пиррольный фрагмент, сочленение с пиридин-пиримидиновым фрагментом стало более гибким в случае структуры (2) (рис. 4). Оценку эффективности взаимодействия белка и лиганда проводили с помощью молекулярного докинга в программе AutoDock Vina.

Процесс молекулярного докинга может быть разделен на три стадии: подготовка молекулы белка, подготовка молекулы лиганда и расчет эф-

фективности взаимодействия белка и лиганда. Первый шаг предполагает оптимизацию структуры белка. В качестве исходной структуры была взята человеческая тирозинкиназа ABL в комплексе с иматинибом [5]. Структура комплекса получена методом дифракции рентгеновских лучей с разрешением 2.4 Å. Оптимизация была проведена с использованием силового поля AMBER, частичные заряды были получены из AMBER ff99SB, из структуры белка были удалены молекулы растворителя, ковалентно-несвязанные ионы, добавлены недостающие протоны аминокислот, присутствующие при физиологических значениях pH. Структура лигандов оптимизирована путем минимизации энергии структуры в программе ChemBio 3D в силовом поле MMFF94. Результаты расчета энергии взаимодействия белка и предложенных лигандов, в сравнении с известными ингибиторами, представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1 можно сделать вывод, что структуры (1) и (2) имеют более высокое абсолютное значение энергии связывания, чем ингибиторы, взятые для сравнения, и, следовательно, потенциально будут эффективнее взаимодейство-

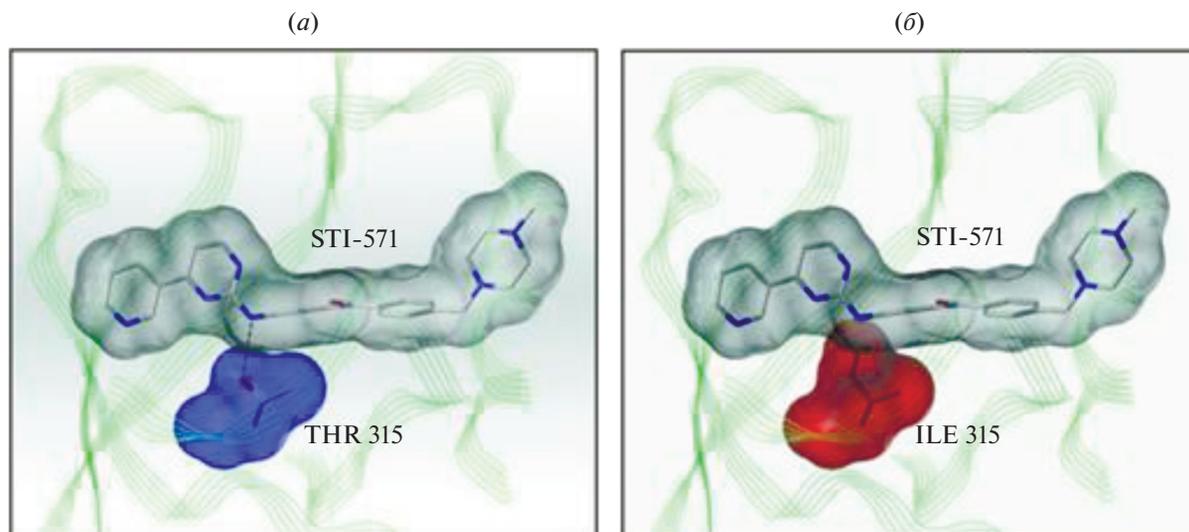


Рис. 2. Иматиниб в структуре комплекса с тирозинкиназой Vcr-Abl: в неактивной конформации “DFG-out” (а) и с T315I-мутацией (б).

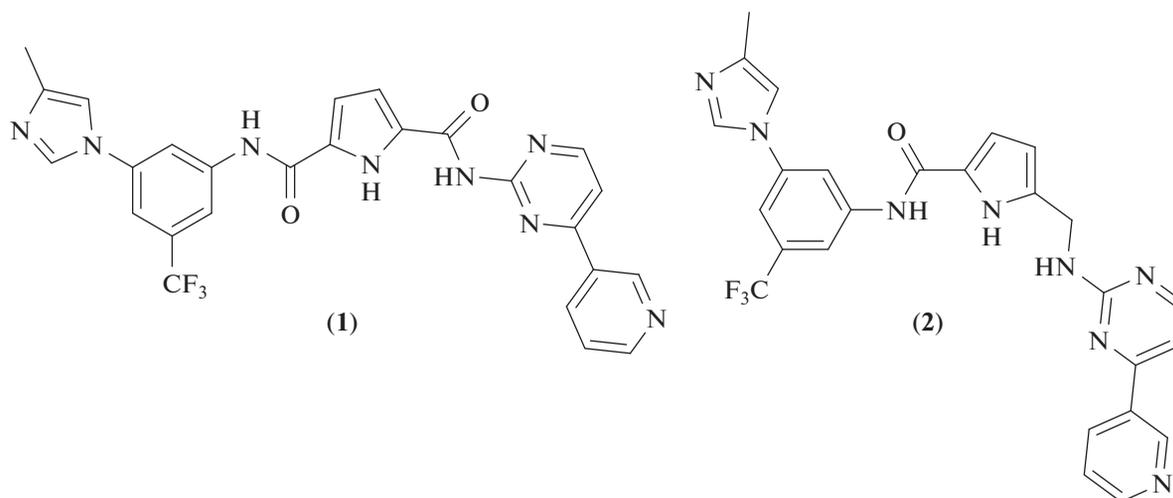


Рис. 3. Структуры потенциальных ингибиторов (1) и (2) Vcr-Abl-тирозинкиназы.

вать с молекулой белка. Анализ состояния лигандов в комплексе с молекулой белка указывает на сохранение для них основных водородных связей, характерных для иматиниба (рис. 4–7).

В отличие от известных ингибиторов, а именно иматиниба и нилотиниба [6], соединения (1) и (2) не образуют водородные связи с изолейцином-360 и гистидином-361 (рис. 4, 5). Так как данные связи не являются ключевыми [4], можно ожидать, что их отсутствие не будет критично сказываться на ингибирующей способности рассматриваемых соединений.

Результаты молекулярного докинга показывают, что предложенные структуры, в отличие от иматиниба и нилотиниба, способны встраиваться в тирозинкиназу BCR-ABL с мутацией T315I (рис. 8–11).

В рамках данной работы осуществлен синтез двух предложенных ингибиторов. Синтез ключевых блоков представлен ниже, на схеме.

Таблица 1. Результаты компьютерного моделирования взаимодействия Vcr-Abl-белка без мутаций и с T315I мутацией с иматинибом, нилотинибом и потенциальными ингибиторами (1) и (2)

| Vcr-Abl тирозинкиназа | ΔG , ккал/моль | | | |
|--------------------------|------------------------|-----------|-------|-------|
| | иматиниб | нилотиниб | (1) | (2) |
| Без мутаций | -9.9 | -10.4 | -11.7 | -11.5 |
| С T315I-мутацией | —* | —* | -10.6 | -10.8 |

* Иматиниб и нилотиниб не встраиваются в структуру белка с наличием мутации T315I.

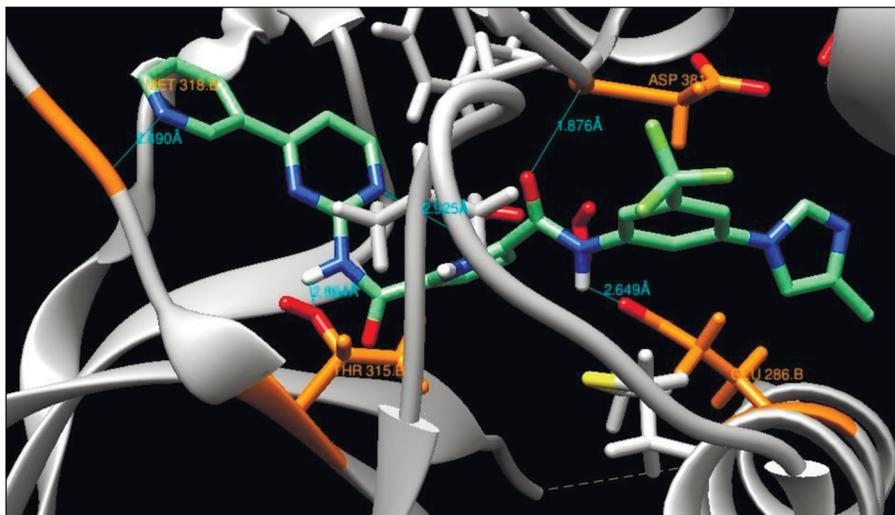


Рис. 4. Ингибитор (1) в модельном комплексе с тирозинкиназой Abl (водородные связи с Met-318, Thr-315, Glu-286, Asp-381).

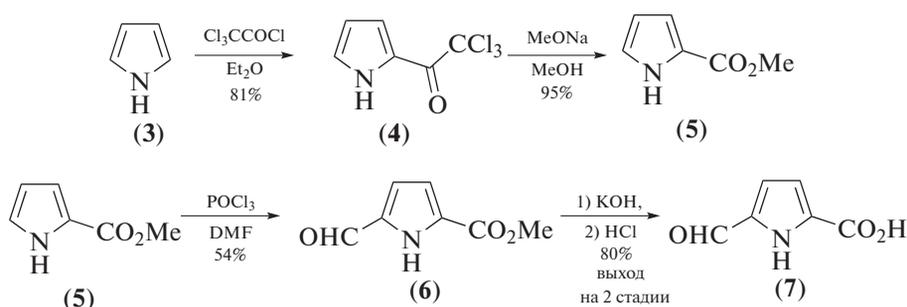


Схема 1.

Альдегидокислота (7) синтезирована из коммерчески доступного пиррола (3). Первая стадия предполагает ацилирование пиррола хлорангидридом трихлоруксусной кислоты. Выход соединения (4) оказался высоким (81%), несмотря на сильное обугливание реакционной смеси. Использование эквивалентного по отношению к хлорангидриду количества Et_3N для связывания выделяющегося HCl не изменяет данную тенденцию. Реакция соединения (4) с каталитическим количеством метилата натрия в метаноле проходит быстро при комнатной температуре и легко контролируется с помощью ТСХ. Очистка продукта на данной стадии не требуется. Очистка продукта, а также разделение образующихся изомеров обязательны на стадии формилирования соединения (5).

Соединение (5) получено с выходом 95%. В спектре ^1H -ЯМР присутствует синглет при 3.86 м.д. с интегральной интенсивностью, равной трем. Данный сигнал указывает на наличие метильной группы в полученном соединении. В целом, спектральные характеристики полученного соединения совпали с описанными в литературе [8].

Реакция формилирования по Вильсмейеру-Хааку, используемая для получения соединения (6), проходила достаточно легко. Средний выход в 54% на данной стадии можно объяснить побочным образованием 4-региоизомера альдегидоэфира (6). Выход основного 5-изомера значительно зависит от температуры проведения реакции. В данной работе раствор хлориминиевой соли, образующейся при смешивании диметилформамида и POCl_3 , в CH_2Cl_2 добавляли при -25°C , далее температуру реакционной смеси медленно довели до комнатной и затем кипятили полчаса. При -25°C хлориминиевая соль и эфир (5) практически не реагируют, поэтому пониженные температуры смешивания реагентов почти не влияют на выход целевого вещества (6). Если нагревание вести не плавно, а быстро нагревать реакционную смесь, то выход снижается до 40%. В ^1H -ЯМР-спектре соединения (6) присутствует сигнал протона альдегидной группы при 9.67 м.д.

Гидролиз метилового эфира (6) проходил в соответствии с описанными методиками [7]. ^1H -ЯМР-спектр показывает отсутствие сигнала метильной группы и наличие уширенного синглета карбок-

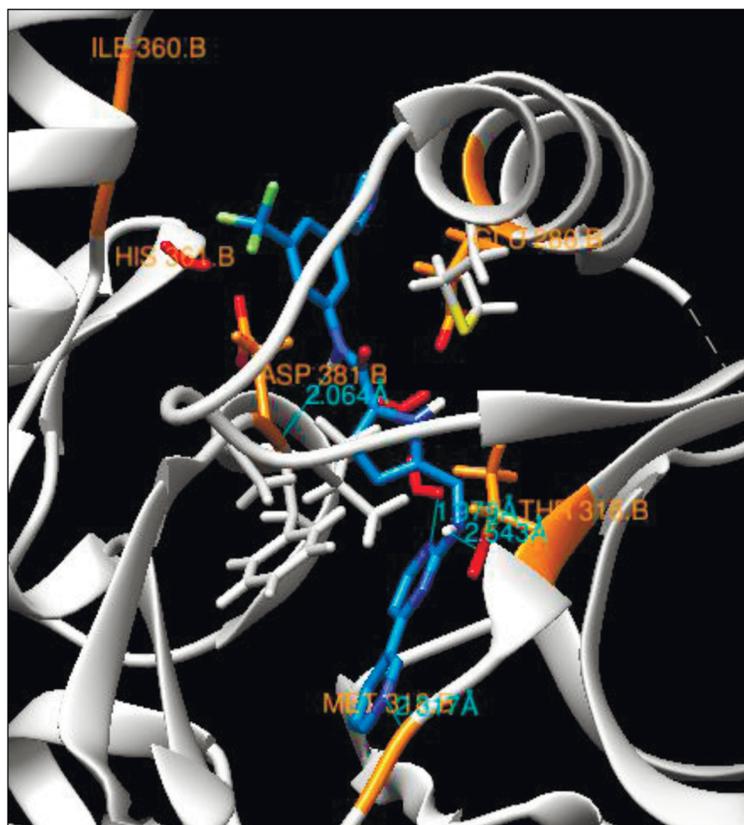


Рис. 5. Ингибитор (1) в активном центре тирозинкиназы BCR-ABL (водородные связи с Met-318, Thr-315, Glu-286, Asp-381). Ингибитор (2) в активном центре тирозинкиназы BCR-ABL (водородные связи с Met-318, Thr-315, Glu-286, Asp-381).

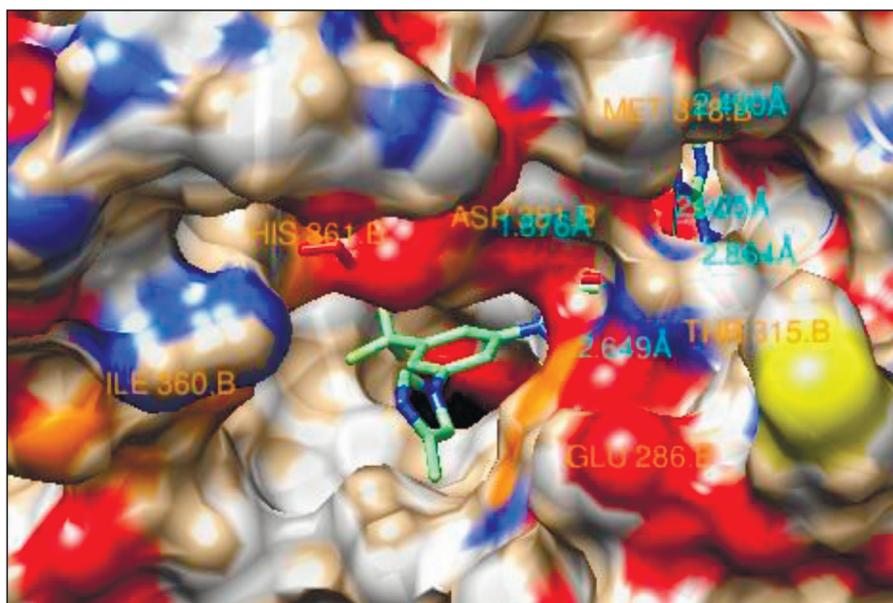


Рис. 6. Ингибитор (1) в активном центре тирозинкиназы BCR-ABL (показана поверхность потенциальной энергии белка).

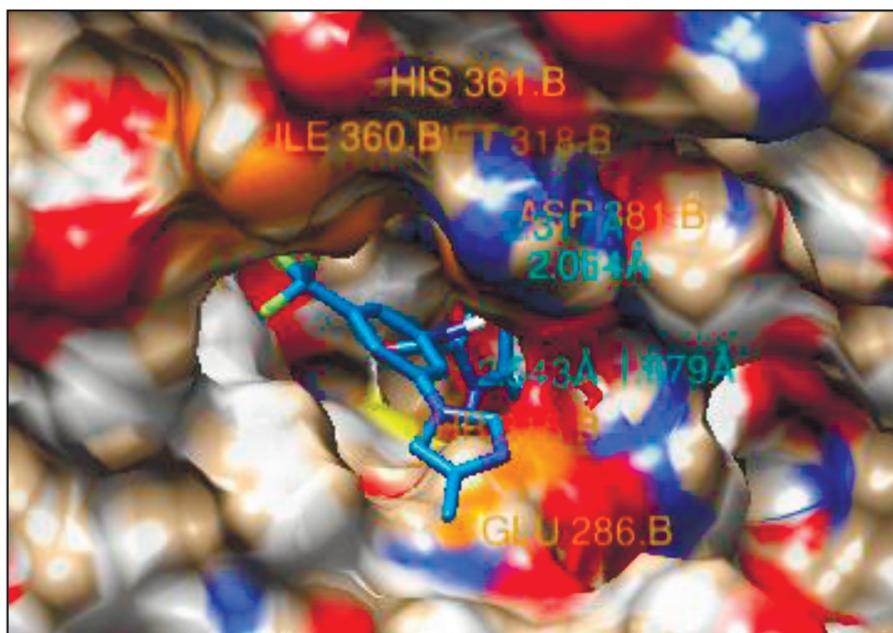


Рис. 7. Ингибитор (2) в активном центре тирозинкиназы BCR-ABL (показана поверхность потенциальной энергии белка).

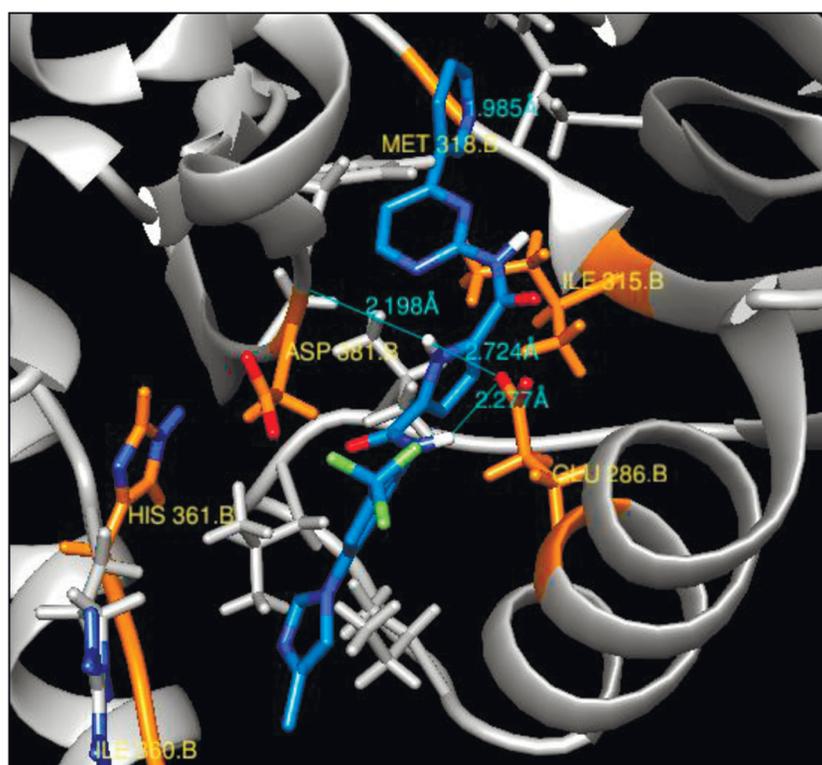


Рис. 8. Ингибитор (1) в активном центре тирозинкиназы BCR-ABL с мутацией T315I (водородные связи с Met-318, Glu-286, Asp-381).

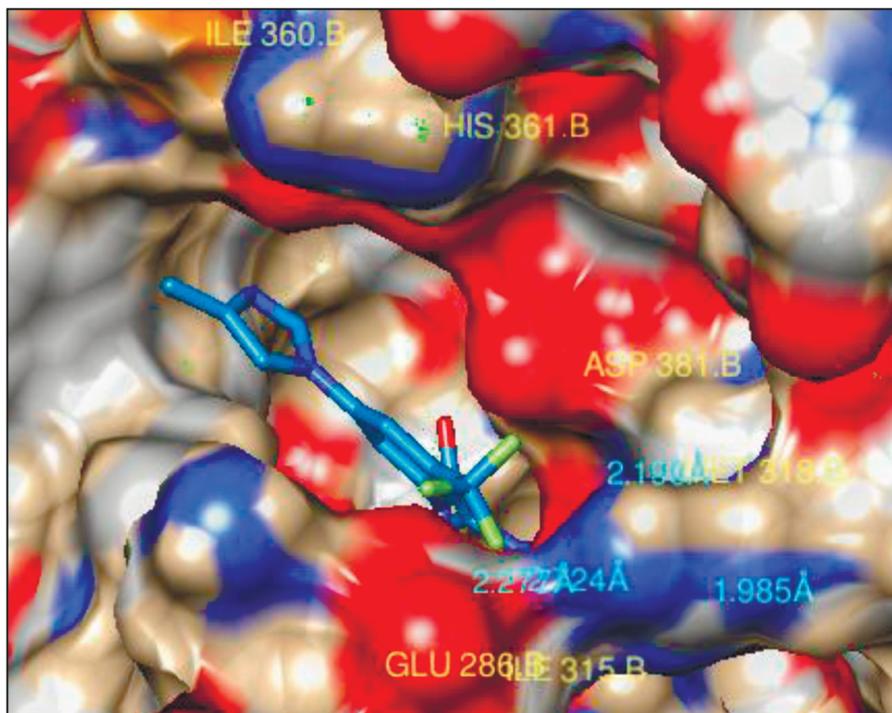


Рис. 9. Ингибитор (1) в активном центре тирозинкиназы BCR-ABL с мутацией T315I (показана поверхность потенциальной энергии белка).

сильной группы при 12.85 м.д. Общий выход кислоты (7) составил 33%.

Соединение (10) получено исходя из коммерчески доступного 3-ацетилпиридина (8) (схема 2). Кипячение в DMF-DMA приводит к образованию единственного продукта (9). В его спектре ^1H -ЯМР присутствуют два синглета от двух метильных групп при 2.95 и 3.18 м.д.; также присутствуют протоны при двойной связи при 5.68 и 7.84 м.д. Большая константа спин-спиновой взаимодей-

ствия, равная 12.5 Гц, указывает на *E*-конфигурацию двойной связи [8].

Образование амина (10) происходило путем кипячения в течение 12 ч раствора соединения (9) с 1 эквивалентом гуанидингидрохлорида и 1.1 экв. NaOH в *n*-бутаноле [9]. Соединение образуется практически чистым и не требует дополнительной очистки после реакции. Его ^1H -ЯМР-спектр совпал с описанным в литературе [9]. Выход соединения (10) в расчете на 3-ацетилпиридин составил 72%.

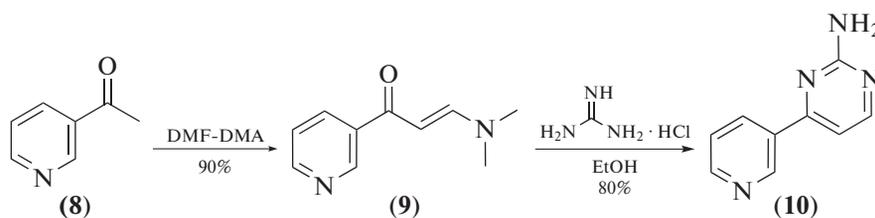


Схема 2.

Синтез ингибиторов (1) и (2) представлен на схемах 3 и 4.

Соединение (11) получено из амина (10) и альдегидокислоты (7). Умеренный выход на данной стадии (45%) можно объяснить низкой нуклеофильностью аминогруппы соединения (10). Дальнейшее окисление альдегидопиррола (11) в кислоту проходило с достаточно высоким выходом. Конденсация кислоты (12) с коммерчески доступ-

ным 3-(3-метил-1H-пиррол-1-ил)-5-(трифторметил)анилином (13), который используется в синтезе известного ингибитора Bcr-Abl-тирозинкиназы – нилотиниба [10], происходило в стандартных условиях с применением DCC в качестве конденсирующего реагента и бензотриазола в качестве активатора карбоксильной группы. Соединение (1) получено с общим выходом 11% в расчете на пиррол.

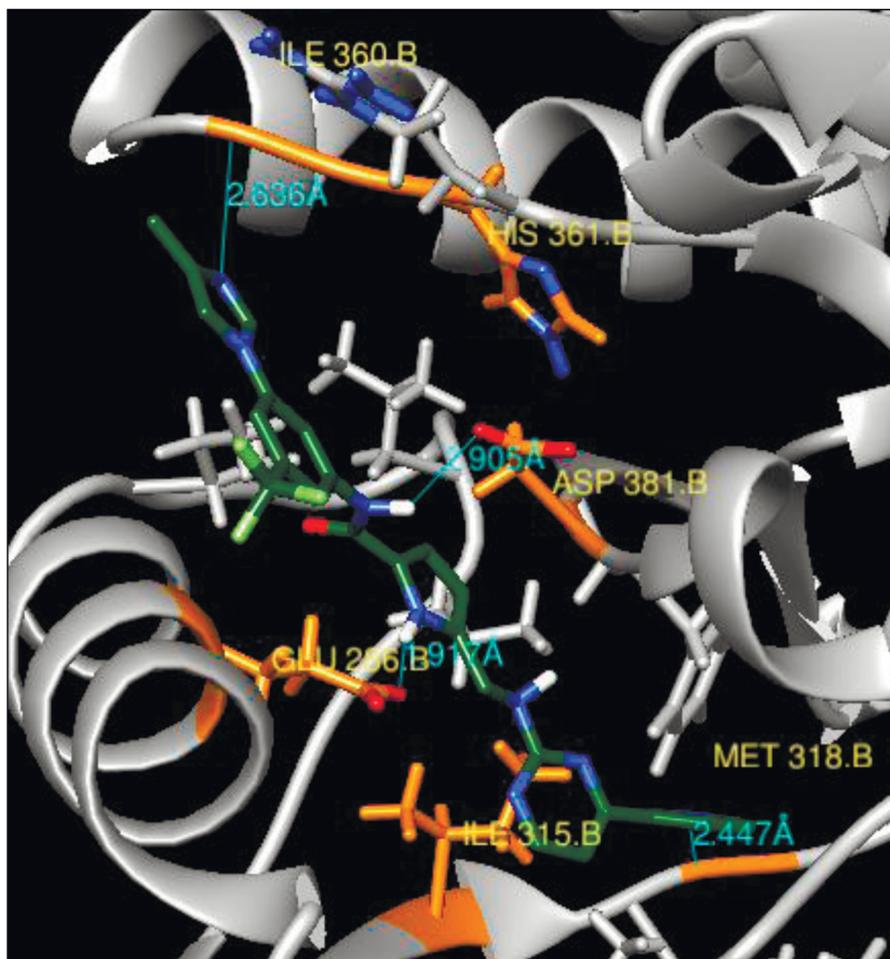


Рис. 10. Ингибитор (2) в активном центре тирозинкиназы BCR-ABL с мутацией T315I (водородные связи с Met-318, Glu-286, Asp-381).

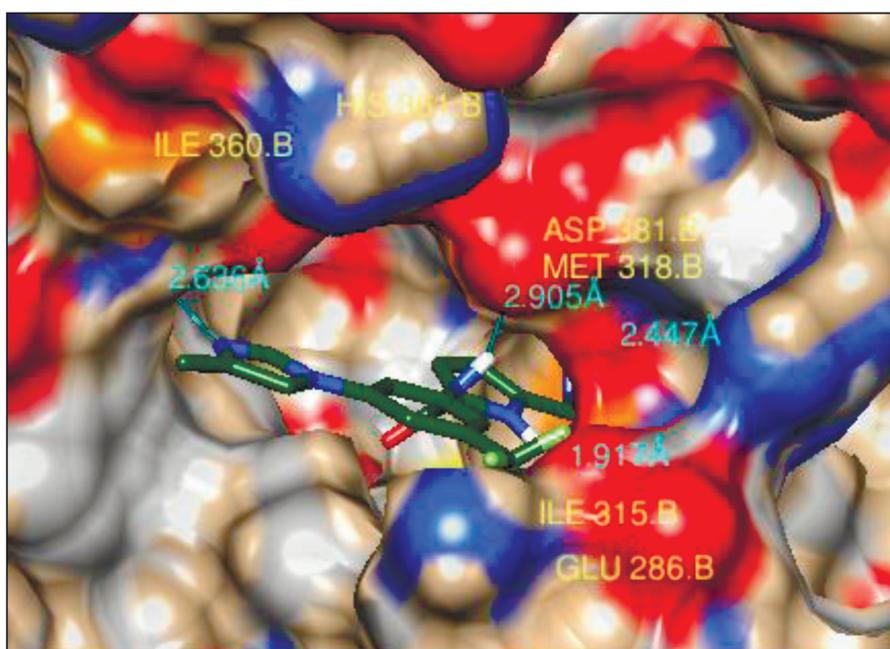


Рис. 11. Ингибитор (2) в активном центре тирозинкиназы BCR-ABL с мутацией T315I (показана поверхность потенциальной энергии белка).

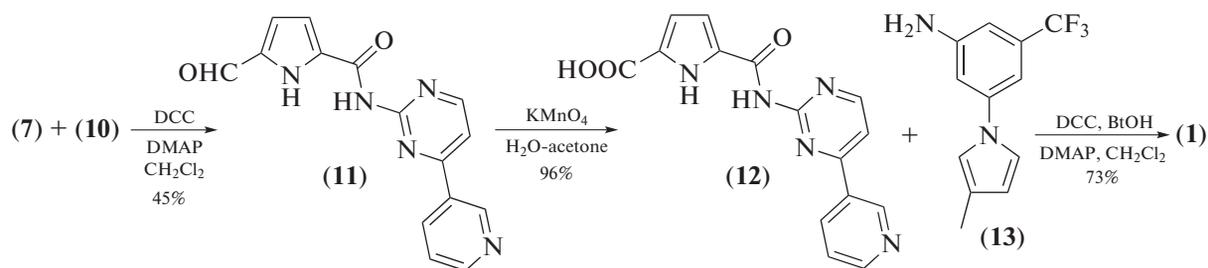


Схема 3.

Конденсация кислоты (7) с амином (10) проходила с достаточно низким выходом ввиду малой

нуклеофильности амина (10). Соединение (2) получено с общим выходом 12% исходя из пиррола.

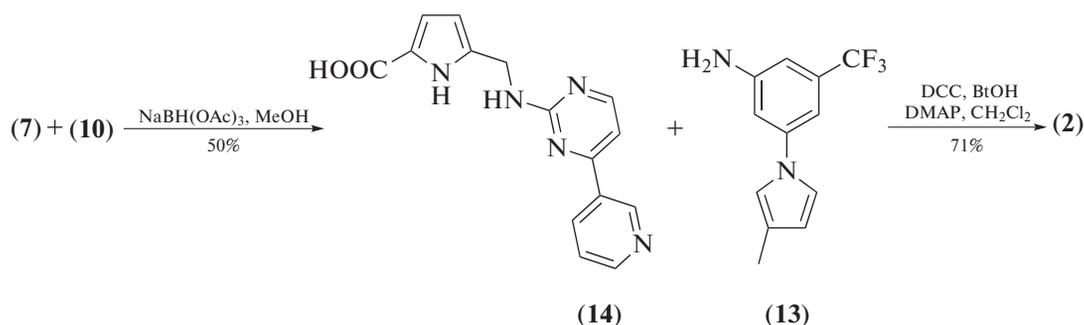


Схема 4.

Все устойчивые соединения были выделены и охарактеризованы с использованием ¹H-, ¹³C-ЯМР.

Таким образом, в работе методом компьютерного моделирования охарактеризованы структуры предложенных ингибиторов в комплексе с тирозинкиназой BCR-ABL как с наличием мутации T315I так и без нее. Показано, что сохраняются ключевые водородные связи с остатками Met-318, Thr-315, Glu-286, Asp-381. Предложенные соединения синтезированы и охарактеризованы. Результаты исследования биологической активности разработанных новых ингибиторов BCR-ABL-тирозинкиназы будут представлены в отдельном сообщении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

Исходные вещества. Использованные в ходе работы реактивы и растворители имели квалификацию “ч” и “чда”. Очистку и высушивание растворителей производили в соответствии с рекомендациями [11]. В качестве исходных соединений использовали пиррол, 3-ацетилпиридин и амин (13) фирмы “Acros”.

Методы анализа. Моделирование взаимодействия белка с лигандом осуществляли с использованием программы UCSF Chimera 1.10.2, модуль AutoDock Vina. Кристаллографические данные о

целевом белке взяты из базы RCSB Protein Data Bank. Файлы: “Human Abl kinase domain in complex with imatinib” – белок без мутаций в комплексе с иматинибом (ингибитор BCR-ABL-тирозинкиназы первого поколения). “The crystal structure of human abl1 kinase domain T315I mutant in complex with DCC-2036” – структура белка с T315I-мутацией в комплексе с потенциальным ингибитором. Данные файлы были загружены в формате *.pdb.

Оценку индивидуальности синтезируемых веществ и наблюдение за ходом проводимых реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254. При проявлении использовали ультрафиолетовую лампу с длиной волны 254 нм, 1% раствор KMnO₄ в воде, 5% раствор фосфомолибденовой кислоты в этаноле. В качестве элюента использовали смеси петролейного эфира, этилацетата, а также метанола и хлороформа, метанола и метилена, толуола и ацетона в различных соотношениях. Выделение и очистку индивидуальных веществ осуществляли с помощью перекристаллизации из петролейного эфира, а также методом колоночной хроматографии на силикагеле 60 Merck (70–230 mesh), с использованием в качестве элюента смесей тех же растворителей.

Спектры ¹H-ЯМР синтезированных соединений (δ , м.д.; J , Гц) записывали для растворов в CDCl₃ или DMSO-*d*₆ на приборе Bruker AC 500 с

рабочей частотой 500 МГц относительно сигнала остаточных протонов в дейтерохлороформе (δ 7.26 м.д.) и DMSO- d_6 (2.50 м.д.). Спектры ^{13}C -ЯМР записывали для растворов в CDCl_3 или DMSO- d_6 на приборе Bruker AC 500 с рабочей частотой 100.6 МГц. Химические сдвиги указаны относительно сигнала CDCl_3 (δ 77.00 м.д.) и DMSO- d_6 (39.43 м.д.). ИК-спектры снимали на FT-IR-спектрофотометре "PerkinElmer Spectrometer 100" в таблетке с KBr.

(2-Трихлороацетил)-1H-пиррол (4). К перемешиваемому раствору трихлорацетилхлорида (37.00 г, 0.23 моль) в сухом Et_2O (100 мл) добавляли пиррол (12.50 г, 0.18 моль) по каплям за 3 ч при комнатной температуре и далее реакцию смесь перемешивали 1 ч при комнатной температуре и нейтрализовали 20% водным раствором K_2CO_3 (100 мл) до pH 8–9. Органическую фазу отделяли, водную экстрагировали Et_2O (3×25 мл). Объединенную органическую фазу промывали последовательно насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным водным раствором NaCl , сушили Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт (4) очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ–EtOAc, 15 : 1–5 : 1) и получали в виде белых кристаллов (34.04 г, 89%). R_f 0.44 (ПЭ–EtOAc, 5 : 1), $T_{\text{пл}}$ 75.5°C. Спектральные характеристики совпали с описанными в литературе [7]. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 6.34–6.37 (м, 1H), 7.16–7.17 (м, 1H), 7.38–7.40 (м, 1H), 9.51 (уш. с., 1H).

Метил-1H-пиррол-2-карбоксилат (5). В сухом MeOH (64 мл) растворяли Na (0.223 г, 9.7 ммоль) при комнатной температуре. К полученному перемешиваемому раствору добавляли (2-трихлороацетил)-1H-пиррол (14.700 г, 69.2 ммоль) шестью порциями за 30 мин. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре (контроль ТСХ). Растворитель упаривали, остаток разбавляли Et_2O (80 мл). К раствору добавляли 3 M HCl (5 мл). Органическую фазу отделяли, водную экстрагировали Et_2O (3×15 мл). Объединенную органическую фазу промывали последовательно насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным водным раствором NaCl , сушили Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, растворитель упаривали при пониженном давлении. Продукт использовали в следующей стадии без дополнительной очистки. Эфир (5) получали в виде белых кристаллов (8.215 г, 95%). R_f 0.31 (ПЭ–EtOAc, 5 : 1). $T_{\text{пл}}$ 73.0°C. Спектральные характеристики совпали с описанными в литературе [6]. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 3.86 (с, 3H), 6.26–6.28 (м, 1H), 6.91–6.93 (м, 1H), 6.95–6.97 (м, 1H), 9.27 (м, 1H).

Метил-5-формил-1H-пирол-2-карбоксилат (6). К охлажденному до 0°C сухому DMF (2.890 г,

39.6 ммоль) добавляли POCl_3 (6.070 г, 39.6 ммоль) за 15 мин. Реакционную смесь перемешивали до полной кристаллизации (30 мин). Смесь отогревали до комнатной температуры; полученную иминиевую соль растворяли в сухом CH_2Cl_2 (20 мл) и охлаждали до -25°C . Раствор метил-1H-пиррол-2-карбоксилата (5) (3.536 г, 28.3 ммоль) в CH_2Cl_2 (20 мл) добавляли шприцом за 1 ч при 0°C. Раствор доводили до комнатной температуры и затем кипятили 30 мин при перемешивании. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли насыщенный водный раствора NaHCO_3 до pH 8–9 и кипятили 15 мин. Органическую фазу отделяли, водную экстрагировали Et_2O (3×10 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl , сушили Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, растворитель удаляли при пониженном давлении. Метил-5-формил-1H-пирол-2-карбоксилат (6) (2.770 г, 64%) выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле (ПЭ–EtOAc, 15 : 1–3 : 1) в виде белых кристаллов. R_f 0.37 (ПЭ–EtOAc, 65 : 35). $T_{\text{пл}}$ 96.2°C. Также был получен побочный продукт – метил-4-формил-1H-пирол-2-карбоксилат (0.736 г, 17%). Спектральные характеристики совпали с описанными в литературе [7]. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 3.92 (с, 3H), 6.94 (м, 2H), 9.67 (с, 1H), 9.88 (уш. с, 1H).

5-Формил-1H-пирол-2-карбоновая кислота (7). Раствор метилкарбоксилата (6) (1.00 г, 6.53 ммоль) и KOH (0.403 г, 7.18 ммоль) в EtOH (8 мл) и H_2O (2 мл) кипятили 3 ч. Растворитель упаривали, осадок растворяли в H_2O (8 мл). Раствор подкислили 3 M HCl до pH 4–6, осадок отфильтровали, промывали H_2O , сушили при 100°C до постоянной массы. Альдегидокислоту (7) получали в виде бледно-желтых кристаллов (0.817 г, 90%). R_f 0.44 (ПЭ–EtOAc, 1 : 1). $T_{\text{пл}}$ 188°C (с разложением). Спектральные характеристики совпали с описанными в литературе [7]. Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 6.82–6.84 (м, 1H), 6.93–6.95 (м, 1H), 9.69 (с, 1H), 12.85 (уш. с., 1H), 13.06 (уш. с., 1H).

(E)-3-(Диметиламино)-1-фенилпроп-2-ен-1-он (9). Смесь 3-ацетилпиридина (2.428 г, 20 ммоль) и DMF-DMA (4.760 г, 40 ммоль) кипятили при перемешивании до исчезновения 3-ацетилпиридина (контроль ТСХ) около 6 ч. Смесь охлаждали, растворитель упаривали. Осадок перекристаллизовывали из ПЭ. Продукт (9) получали в виде желтых кристаллов (3.115 г, 89%). R_f 0.43 (EtOAc). $T_{\text{пл}}$ 90.2°C. Спектральные характеристики совпали с описанными в литературе [10]. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 2.95 (с., 3H), 3.18 (с, 3H), 5.68 (д., J 12.3, 1H), 7.35 (м, 1H), 7.84 (д., J 12.3, 1H), 8.19 (д., J 7.9, 1H), 8.66 (д., J 4.8, 1H), 9.08 (д., J = 2.2, 1H).

4-(Пиридин-3-ил)пиримидин-2-иламин (10). Раствор продукта (9) (6.400 г, 36.3 ммоль), гуанидин-

гидрохлорида (3.056 г, 36.3 ммоль) и NaOH (1.595 г, 39.9 ммоль) в *n*-бутаноле (40 мл) кипятили 12 ч. Раствор охлаждали, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 96% этанолом, затем холодной водой. Полученные кристаллы сушили в вакууме при 40°C. Продукт (**10**) получали в виде серо-белых кристаллов (5.162 г, 82%). R_f 0.20 (EtOAc). $T_{пл}$ 188.2°C. Спектральные характеристики совпали с описанными в литературе [10]. Спектр ^1H -ЯМР (500 МГц, δ): 5.21 (с, 2H), 7.11 (д, J 5.2, 1H), 7.45 (дд, J 4.8, 8.0, 1H), 8.35 (д, J 8.0, 1H), 8.44 (д, J 5.2, 1H), 8.75 (д, J 4.8, 1H), 9.24 (д, J 2.2, 1H).

***N*-(4-(Пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)-5-формил-1*H*-пиррол-2-карбоксамид (11)**. К суспензии соединения (**7**) (139 мг, 1 ммоль), в 10 мл CH_2Cl_2 последовательно добавляли, DMAP (122 мг, 1 ммоль), раствор амина (**10**) (172 мг, 1 ммоль) в 5 мл CH_2Cl_2 . Далее в реакционную смесь всыпали DCC (227 мг, 1.1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 12 ч. Осадок отфильтровывали, промыли на фильтре CH_2Cl_2 . К реакционной смеси добавляли насыщенный раствор NaHSO_3 (20 мл). Водный слой отделяли, подкислили 2 М HCl до pH 4. Экстрагировали EtOAc (3 \times 20 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (1 \times 20 мл), сушили Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, растворитель упаривали при пониженном давлении. Продукт (**11**) (132 мг, 45%) выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле (толуол–ацетон, 7 : 3) в виде белых кристаллов. R_f 0.24 (толуол–ацетон, 7 : 3). $T_{пл}$ 174.3°C. Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 7.03–7.05 (м, 1H), 7.06–7.08 (м, 1H), 7.13 (д, J 5.3, 1H), 7.55 (дд, J 4.7, 8.1, 1H), 8.18 (д, J 8.1, 1H), 8.67 (д, J 5.3, 1H), 8.73 (д, J 4.7, 1H), 9.04 (с, 1H), 9.32 (с, 1H), 11.95 (уш. с., 1H), 12.26 (уш. с., 1H). Спектр ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 106.55, 107.98, 109.73, 115.28, 122.01, 124.55, 132.91, 135.645, 136.63, 147.32, 150.58, 157.53, 159.47, 160.12, 175.44.

5-((4-(Пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)карбамоил)-1*H*-пиррол-2-карбоновая кислота (12). К 2 мл раствора карбоксамид (**11**) (132 мг, 0.42 ммоль) в ацетоне добавляли суспензию перманганата калия (135 мг, 0.85 ммоль) в 8 мл смеси ацетон–вода (1 : 1) за 1 ч. Раствор перемешивали дополнительно 1 ч при 40°C и еще 1 ч при комнатной температуре. Тиосульфат натрия добавляли порциями до обесцвечивания раствора. Ацетон удаляли при пониженном давлении, водный слой подкисляли до pH 3–4 5% раствором HCl. Полученный осадок фильтровали, промывали водой на фильтре. Белый осадок сушили при пониженном давлении. Продукт (**12**) (130 мг, 96%) использовали в следующей стадии без дополнительной очистки. R_f 0.19 (MeOH– CHCl_3 , 1 : 8). $T_{пл}$ 197.3°C. Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 7.04–7.05 (м, 1H), 7.06–7.08 (м,

1H), 7.14 (д, J 5.2, 1H), 7.57 (дд, J 4.7, 8.0, 1H), 8.16 (д, J 8.0, 1H), 8.65 (д, J 5.2, 1H), 8.75 (д, J 4.7, 1H), 9.02 (с, 1H), 10.71 (с, 1H), 11.65 (уш. с., 1H), 12.06 (уш. с., 1H). Спектр ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 107.55, 110.98, 111.73, 115.08, 121.01, 124.55, 138.91, 139.58, 140.33, 149.47, 154.59, 155.88, 157.43, 160.12, 160.34.

5-(4-Пиридин-3-илпиримидин-2-ил)аминометил-1*H*-пиррол-2-карбоновая кислота (14). К суспензии NaNH_4 (2.00 г, 53 ммоль) в 22 мл CHCl_3 добавляли безводную AcOH (14 мл, 244 ммоль) при 0–5°C за 1 ч. Смесь перемешивали при 0–5°C дополнительно 1.5 ч. Альдегидокислота (**7**) (3.480 г, 25 ммоль) и раствор амина (**10**) (4.472 г, 26 ммоль) в CHCl_3 (12 мл) были добавлены к образованной суспензии. Смесь перемешивали при 0–5°C 1 ч, затем 12 ч при комнатной температуре. К смеси добавляли H_2O (15 мл) и Na_2CO_3 до pH 9–10. Водную фазу промывали CHCl_3 (3 \times 10 мл). Далее pH раствора доводили до 4 1 М раствором HCl. Осадок отфильтровывали, промывали H_2O на фильтре. Полученные желтые кристаллы сушили в вакууме при комнатной температуре. Выход 50% (3.688 г). R_f 0.23 (MeOH– CHCl_3 , 1 : 8). $T_{пл}$ 186.2°C. Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 2.48 (с, 2H), 4.52 (м, 1H), 6.01 (м, 1H), 6.60 (м, 1H), 7.23 (д, J 5.16, 1H), 7.55 (уш. с, 1H), 7.58 (дд, J 4.94, 8.03, 1H), 8.39 (д, J 5.00, 1H), 8.50 (м, 1H), 8.68 (д, J 5.00, 1H), 9.25 (м, 1H), 11.48 (уш. с, 1H). Спектр ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 37.70, 106.56, 107.99, 109.71, 115.27, 122.02, 124.56, 132.90, 135.65, 136.64, 147.33, 150.59, 159.47, 162.01, 164.45. ИК-спектр (в KBr, ν , cm^{-1}): 3436, 1668.

***N*²-(3-(4-Метил-1*H*-имидазол-1-ил)-5-(трифтометил)фенил)-*N*⁵-(4-пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)-1*H*-пиррол-2,5-дикарбоксамид (1)**. К раствору кислоты (**12**) (105 мг, 0.34 ммоль) в смеси CH_2Cl_2 –DMF (10 мл, 1 : 1) были последовательно добавлены бензотриазол (BtOH) (50 мг, 0.38 ммоль), DMAP (46 мг, 0.38 ммоль), раствор амина (**13**) (91 мг, 0.38 ммоль) в 5 мл CH_2Cl_2 . Далее в реакционную смесь всыпали DCC (79 мг, 0.38 ммоль) и перемешивали 16 ч. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре CH_2Cl_2 . Растворитель упаривали до объема в 5 мл при пониженном давлении, остаток выливали в 50 мл воды при перемешивании. Образующийся осадок отфильтровывали. Промывали на фильтре водой, 2 мл 96% EtOH. Кристаллы перекристаллизовывали из изопропанола. Продукт (**1**) получали в виде белого порошка (132 мг, 73%). $T_{пл}$ 228.6°C. R_f 0.29 (MeOH– CHCl_3 , 1 : 4). Спектр ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 3.34 (с, 3H), 4.68 (с, 2H), 6.06 (м, 1H), 6.28 (м, 1H), 7.30 (д, J 5.0, 1H), 7.41 (д, J 4.0, 1H), 7.53 (д, J 8.1, 1H), 7.65 (м, 1H), 7.78 (м, 1H), 7.90 (т, J 7.8, 1H), 8.04 (д, J 8.1, 1H), 8.45 (м, 2H), 8.69 (д, J 5.0, 1H), 9.29 (с, 1H), 12.35 (уш. с. 2H). Спектр ^{13}C ЯМР (DMSO- d_6): 13.62, 37.15, 88.03, 108.33, 109.88, 110.03, 110.20, 110.38, 112.84, 114.18, 115.36, 122.6,

125.45, 127.55, 128.80, 135.06, 135.96, 137.66, 140.39, 145.55, 149.47, 150.32, 153.77, 157.21, 160.50, 161.68.

N-(3-(4-Метил-1*H*-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил)-5-(((4-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)метил)-1*H*-пиррол-2-карбоксамид (2). Соединение (2) получали из килоты (14) по методике, аналогичной методике получения соединения (1), в виде бледно-желтого порошка (124 мг, 71%). $T_{пл}$ 204,2°C. R_f 0.35 (MeOH : CHCl₃, 1 : 4). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 3.32 (с, 3H), 6.08 (м, 1H), 6.20 (м, 1H), 7.26 (д, *J* 4.9, 1H), 7.39 (д, *J* 4.0, 1H), 7.33 (д, *J* 8.0, 1H), 7.64 (м, 1H), 7.78 (м, 1H), 7.90 (т, *J* 8.0, 1H), 8.06 (д, *J* 8.0, 1H), 8.43 (м, 2H), 8.54 (д, *J* 5.0, 1H), 9.31 (с, 1H), 11.98 (уш. с. 2H). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 13.62, 107.06, 108.36, 109.88, 110.04, 110.06, 112.23, 114.18, 114.63, 115.38, 122.06, 122.60, 125.71, 128.80, 129.73, 138.34, 140.33, 144.41, 149.47, 150.72, 154.59, 155.88, 156.90, 157.31, 157.40 158.28.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tanaka R., Kimura S. // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2008. V. 8 (9). P. 1387–1398.
2. Lin Y., Meng Y., Huang L. // *JACS.* 2014. V. 136. P. 14753–14762.
3. Breccia M., Alimena G. // *OncoTargets and Therapy.* V. 1. P. 49–58.
4. Lin Y., Meng Y., Huang L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 5. P. 1664–1669.
5. Cowan-Jacob S.W., Fendrich G., Floersheimer A. // *Acta Crystallogr., Sect. D.* 2007. V. 63. P. 80–93.
6. Jabbour E., El Ahdab S., Cortes J., Kantarjian H. // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2008. V. 17. № 7. P. 1127–1136.
7. Schmuck C., Bickert V., Merschky M. // *Eur. J. Org. Chem.* 2008. P. 324–329.
8. Zheng R., Zeng X., He H., He J. // *Synth. Commun.* 2012. V. 1. № 42. P. 1521–1531.
9. Koroleva E.V., Ignatovich Zh.V., Ignatovich S.V., Guskov K.N. // *Russ. J. Org. Chem.* 2011. V. 47. № 8. P. 1222–1226.
10. Deadman B.J., Hopkin M.D., Baxendale I.R. // *Org. Biomol. Chem.* 2013. Is. 11. P. 1766–1800.
11. Гордон А., Форд Р. // М.: Мир, 1976.

Computer Modeling and Synthesis of Potential Inhibitors of the BCR-ABL Tyrosine Kinase with T315I Mutation

A. M. Fedarkevich*, #, O. L. Sharko*, and V. V. Shmanai*

*Phone: +3 (754) 479-257-04; e-mail: artem.fedorkevich@gmail.com

#Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, ul. Surganova 13, Minsk, 220072 Belarus

A comparative analysis of the interaction of chimeric BCR-ABL protein of normal type and with mutation T315I with known inhibitors, as well as with the proposed compounds which potentially inhibit the activity of the protein with mutation was carried out by computer modeling. It is shown that the proposed compounds are incorporated in the structure of the protein with the saving of the basic hydrogen bonds and intermolecular interactions. The synthesis of two structures containing the pyrrole cycle, which showed the most promising results according to the data of computer modeling, was carried out.

Keywords: BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors, AutoDock Vina, synthesis of pyrrole derivatives



УДК 577.4.088:616.441-074:543.43

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА И СВОБОДНОГО ТИРОКСИНА В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОСФОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

© 2020 г. Н. И. Бекман^{*,#}, С. Ю. Ларичева^{*}, Т. А. Быченкова^{**}, В. Г. Помелова^{*}, Н. С. Осин^{**}

^{*}ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения”,
Россия, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75/1

^{**}ЗАО “ИММУНОСКРИН”, Россия, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75/1

Поступила в редакцию 21.06.2019 г.

После доработки 27.08.2019 г.

Принята к публикации 24.09.2019 г.

На основе технологии фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) разработана экспериментальная тестовая система для одновременного определения маркеров состояния функции щитовидной железы – свободного тироксина (fT_4) и тиреотропного гормона (TSH) – в высушенных образцах крови человека. Иммуноанализ гормонов проводили с использованием специфических микроэрреев (диаметр 0.35 мм), напечатанных на дне лунок полистиролового 96-луночного микропланшета, и системы детекции на основе полистироловых наночастиц (диаметр 46 ± 14 нм), содержащих инкорпорированную длительно люминесцирующую фосфоресцентную метку (1960 молекул на частицу) на основе хелатных комплексов Eu(III). Интенсивность флуоресценции измеряли в режиме временного разрешения. Исследованы значения аналитических параметров и возможные ограничения разработанной системы. Система обеспечивала одновременное обнаружение высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений в клинически значимых диапазонах концентраций – от 2.0 до 50 пмоль/л для fT_4 и от 0.8 до 50 мкМЕ/мл для TSH. Чувствительность анализа составила 1.0 ± 0.2 пмоль/л (fT_4) и 0.3 ± 0.1 мкМЕ/мл (TSH), что соответствовало порогам обнаружения 3×10^{-18} моль T_4 и 0.9×10^{-9} МЕ TSH. Тест правильно определил концентрации TSH и T_4 в стандартных образцах, используемых в программах оценки качества, а также тиреоидный статус исследованных пациентов ($n = 48$). Результаты определения гормонов в высушенных пятнах крови с помощью экспериментальной тестовой системы хорошо коррелировали с результатами определения гормонов в образцах сыворотки с использованием коммерческих наборов ($r = 0.9730$ для TSH и $r = 0.8585$ для свободного T_4). Основной недостаток системы состоит в высокой вариабельности результатов измерений (до 20%), что ограничивает возможность ее использования для количественного определения уровня гормонов в крови пациента. Мы считаем, что эта система может быть полезна для выявления нарушений функции щитовидной железы в рамках существующих программ неонатального скрининга на врожденный гипотиреоз, а также при массовых скрининговых обследованиях групп риска взрослого населения, в частности в экологически неблагоприятных регионах.

Ключевые слова: наночастицы, фосфоресцентный анализ (ФОСФАН, PHOSPHAN), микрозоны (microarrays), тиреотропный гормон (TSH), свободный тироксин (fT_4), сухие пятна крови (DBS)

DOI: 10.31857/S0132342320020074

ВВЕДЕНИЕ

Перспективное направление в развитии современных иммуноаналитических методов связано с созданием мультиплексных тестовых систем для одновременного определения в исследуемом

образце нескольких (множества) аналитов. Регистрация сигнала от каждого из аналитов в мультиплексном формате становится возможной благодаря использованию метчиков с различными спектрально-люминесцентными свойствами [1, 2] либо вследствие пространственного разделения

Сокращения: Bi – биотин; BSA – бычий сывороточный альбумин; DBS – сухие пятна крови (Dried blood spots); DMSO – диметилсульфоксид; EDC – водорастворимый карбодиимид; fT_4 – свободный тироксин; Lum – интенсивность люминесценции; SD – стандартное отклонение (standard deviation); Str – стрептавидин; TRF – флуоресценция (люминесценция) с временным разрешением (Time-resolved fluorescence); TSH – тиреотропный гормон (Thyroid stimulating hormone); TSH-эрреи – микроэрреи (microarrays) для выявления TSH; T_4 -эрреи – микроэрреи для выявления T_4 ; ИФА – иммуноферментный анализ; МКА – моноклональные антитела; ФОСФАН (PHOSPHAN) – фосфоресцентный анализ (Phosphorescence analysis).

[#] Автор для связи: (тел.: +7(903)180-52-85, эл. почта: nibeckman@mail.ru).

аналитов на твердой поверхности [3–8]. Второй подход был реализован нами при создании отечественной технологии фосфоресцентного анализа (ФОСФАН); в этом случае биочипы (микроэрреи) формируют на дне лунок многолуночного полистиролового микропланшета и используют длительно люминесцирующие метчики, сигнал от которых регистрируется в режиме временного разрешения (TRF) при сканировании поверхности лунки с помощью импульсного индикатора фосфоресценции [9]. Были предложены мультиплексные тестовые системы для выявления ряда биологически активных соединений [10, 11], в том числе при проведении скрининговых программ обследования населения [12, 13].

Применение мультиплексных тестов несомненно актуально для решения такой важной задачи, как ранняя диагностика дисфункции щитовидной железы человека. В качестве основных маркеров тиреоидных заболеваний обычно используют гормон щитовидной железы тироксин (T_4) и тиреотропный гормон гипофиза (TSH) [14]. Определение их уровня обычно проводится при исследовании сывороток венозной крови [15]. Однако для массовых скрининговых исследований более перспективным источником биологического материала могут служить высушенные на фильтровальной бумаге образцы капиллярной крови (DBS); это связано со снижением стоимости сбора, транспортировки и хранения таких образцов, а также снижением травматичности и инфекционной опасности проводимого исследования [16–18].

Ранее нами предложен подход к одновременному определению TSH и T_4 в сухих образцах крови человека с использованием технологии ФОСФАН и длительно люминесцирующего комплекса Pt-копропорфирина в качестве метчика биомолекул [19]. Метод позволял измерять уровни TSH и общего T_4 в диапазонах концентраций, применяемых при скрининге новорожденных на врожденный гипотиреоз. Однако чувствительность этого подхода оказалась недостаточной для обследования взрослых пациентов, что было обусловлено рядом причин. Во-первых, у взрослых пациентов концентрация TSH может быть очень низкой [20]. Кроме того, при обследовании таких пациентов большей диагностической ценностью обладает определение свободной, не связанной с белками фракции T_4 (fT_4), доля которой составляет лишь 0.03% от общего количества T_4 в крови [21]. Более того, поскольку для анализа используют бумажный диск диаметром 3.2 мм, способный впитать всего 3 мкл цельной крови человека, то экстрагируемый из него объем пробы примерно в 100 раз ниже, чем объем сывороточных проб. Попытки увеличить число исследуемых дисков приводили к снижению специфичности и необходимости введения стадии предварительной экстракции исследуе-

мой пробы из диска, что усложняло процедуру проведения анализа.

Повышение чувствительности теста для одновременного определения указанных гормонов в сухих пятнах крови взрослых пациентов стало возможным с появлением новых методов детекции на основе фосфоресцентных наночастиц [22, 23]. Синтезированы и детально охарактеризованы полистироловые наночастицы, покрытые стрептавидином и содержащие инкорпорированную фосфоресцентную метку (хелатные комплексы $Eu^{3+}/2$ -нафтоилтрифторацетон) [22]; продемонстрирована возможность их применения для создания высокочувствительной системы для определения TSH [23].

В настоящей работе исследована возможность совмещения в едином формате конкурентной (выявление fT_4) и неконкурентной (выявление TSH) схем анализа с применением детектирующей системы на основе фосфоресцентных наночастиц с целью создания тестовой системы для одновременного количественного определения уровня гормонов fT_4 и TSH в сухих пятнах крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки тестовой системы одновременного определения маркеров щитовидной железы TSH и fT_4 в сухих пятнах крови использовали технологию ФОСФАН [9]. На дне лунок стандартных полистироловых 96-луночных планшетов для микроанализа (рис. 1а) иммобилизовали микроэрреи (микрзоны диаметром 0.35 мм), предназначенные для выявления TSH (TSH-эрреи) или T_4 (T_4 -эрреи). На стадии иммуноанализа гормоны экстрагировали из исследуемого образца (пропитанного кровью бумажного диска диаметром 3.2 мм) в раствор, где взаимодействовали со специфическими биотинилированными антителами (рис. 1б). При этом в реакционном растворе одновременно осуществлялся сэндвич-анализ TSH и конкурентный анализ T_4 (рис. 1б). Образующиеся в результате иммунных реакций комплексы на микроэрреях TSH и T_4 детектировали с помощью универсального реагента, представляющего собой полистироловые наночастицы с инкорпорированным хелатом европия, покрытые ковалентно связанным стрептавидином (рис. 1в). Для регистрации результатов анализа дно лунки планшетета сканировали в режиме TRF с помощью специального прибора-индикатора.

В основу проведения иммуноанализа была положена схема, оптимизированная ранее для сэндвич-анализа TSH [23]. С учетом этого, было необходимо оценить пригодность выбранных для детекции TSH условий (длительность отдельных стадий иммуноанализа, концентрация биотини-

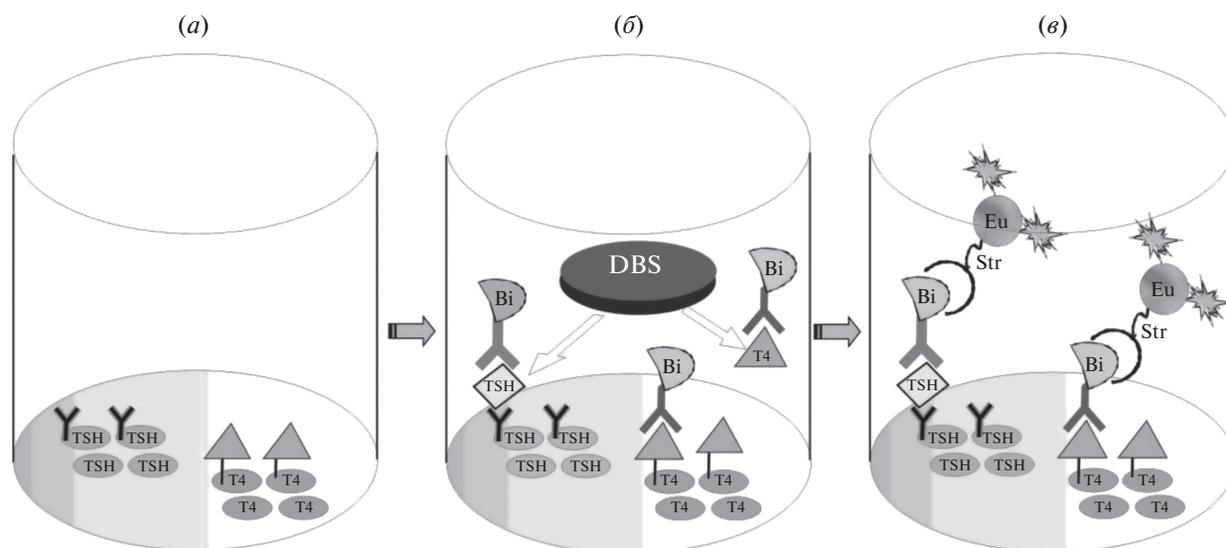


Рис. 1. Схема одновременного определения TSH и fT_4 методом ФОСФАН с использованием фосфоресцентных наночастиц, где (а) – лунка 96-луночного планшета с нанесенными на дне микроэрреями для выявления TSH и T_4 ; (б) – иммунореакции TSH и T_4 , экстрагирующихся из исследуемого сухого образца крови (DBS), с мечеными биотином (Bi) специфическими антителами и микроэрреями; (в) – детекция образовавшихся иммунных комплексов с помощью покрытых стрептавидином (Str) наночастиц с инкорпорированным европием (Eu).

лированных антител и детекторных наночастиц) для конкурентного анализа свободной фракции гормона T_4 . Определение данного низкомолекулярного гормона проводили с использованием биотинилированных моноклональных анти- T_4 -антител и T_4 -эреев, содержащих конъюгированный с белком аналит. Так как метод определения fT_4 в сухих пятнах крови должен обладать очень высокой чувствительностью (порог обнаружения не более 3×10^{-18} моль T_4 из образца, содержащего 3 мкл крови), мы использовали известный гетерологичный подход к построению иммуноанализа низкомолекулярных соединений [24].

На T_4 -эрреях иммобилизовали конъюгат триодтиронина T_3 -BSA, с которым используемые моноклональные анти- T_4 -антитела связывались несколько слабее, чем с T_4 , обеспечивая тем самым наиболее сильное ингибирование связывания при низких уровнях аналита в исследуемой пробе. Для оптимизации иммуноанализа fT_4 было изучено влияние количества анти- T_4 -антител в реакционной смеси на характер кривых ингибирования сигнала люминесценции, регистрируемого на T_4 -эрреях (рис. 2). Максимальный наклон кривых ингибирования достигался при добавлении 1 нг биотинилированных антител на лунку (рис. 2). Остальные условия, выбранные ранее для определения TSH, являлись оптимальными и для детекции fT_4 . При этом обеспечивался 1000-кратный динамический диапазон сигналов люминесценции, регистрируемых на T_4 -эрреях: от 100000 отн. ед. при исследовании образцов, не содержащих T_4 , до

фоновых значений менее 100 отн. ед. при исследовании образцов с высоким уровнем T_4 , обеспечивающим полное ингибирование специфического связывания анти- T_4 -антител с T_4 -эрреями. Измеряемые концентрации охватывали клинически важный диапазон 0 (2)–50 пмоль/л fT_4 (рис. 2).

Совмещение конкурентного иммуноанализа fT_4 и сэндвич-анализа TSH в едином формате не оказывало влияния на специфичность определения гормонов из сухих образцов цельной крови человека, что подтверждалось отсутствием перекрестной реактивности компонентов иммунореакции. Наличие в пробе TSH в высокой концентрации (до 250 мкМЕ/мл) не влияло на результат определения fT_4 (вариации в уровне сигнала не выходили за пределы приборной ошибки измерений); и наоборот, высокая концентрация fT_4 (до 200 пмоль/л) не оказывала влияния на результат определения TSH. Использование в реакционной смеси биотинилированных анти- T_4 -антител в выбранной концентрации (1 нг на лунку) не приводило к росту фонового сигнала, регистрируемого на TSH-эрреях. С другой стороны, для сохранения невысокого (не более 100 отн. ед.) уровня фонового сигнала на T_4 -эрреях требовалось некоторое снижение содержания биотинилированных анти-TSH-антител. Добавление в реакционную смесь бумажного диска, пропитанного кровью человека, не содержащей T_4 и TSH, не приводило к заметному изменению уровня сигнала, регистрируемого на T_4 - и TSH-эрреях; это свидетельствовало об отсутствии неспецифического влияния различных

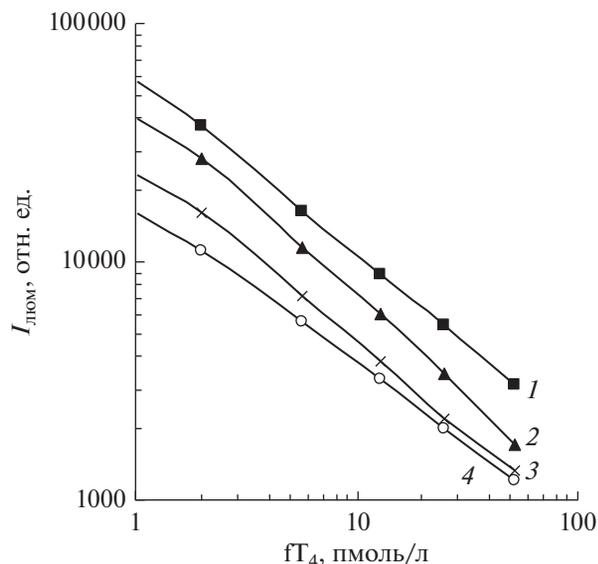


Рис. 2. Зависимость интенсивности регистрируемого сигнала на T_4 -эрреях от концентрации гормона fT_4 в исследуемом образце по результатам иммуноанализа в присутствии различных количеств биотинилированных анти- T_4 -антител (1 – 2.0 нг/лунка; 2 – 1.0 нг/лунка; 3 – 0.5 нг/лунка и 4 – 0.25 нг/лунка).

компонентов крови человека или бумажных волокон из диска на результат анализа.

При создании калибровочных проб для двойного теста (высушенные на бумаге пятна крови, содержащие смесь двух гормонов) возникла проблема выбора методов, способных правильно измерить содержание свободной (несвязанной с белками) фракции T_4 или очень низкие уровни TSH. Так как аттестованные наборы для решения этих задач отсутствуют, мы разработали свои подходы к ориентировочной оценке концентрации обоих гормонов в калибровочных пробах. При подготовке калибровочных проб путем добавления определенных количеств T_4 в раствор эритроцитарной массы, предварительно очищенной от гормонов и доведенной сывороточными белками, получаемые уровни свободной фракции T_4 не зависели линейно от уровня добавленного T_4 . При увеличении уровня T_4 в крови доля гормона, связанного с белками крови, снижалась, что вызвано, по-видимому, ограниченным количеством мест связывания с T_4 на соответствующих белках крови. Высушивание проб крови на бумаге и последующая экстракция гормона в реакционный раствор вносили дополнительные изменения в состоянии равновесия гормон-белок. В связи с этим, для правильной оценки уровня fT_4 в калибровочных пробах были приготовлены специальные стандарты в виде высушенных пятен крови, получаемой смешением отмытой эритроцитарной массы с сыворотками крови человека с из-

вестным содержанием fT_4 . Концентрацию TSH в изготовленных калибровочных пробах измеряли с помощью коммерческого набора реагентов для неонатального скрининга. Так как чувствительность этого набора недостаточна для измерения уровней TSH ниже 2 мкМЕ/мл, была применена модифицированная методика анализа [20], включавшая стадию предварительной экстракции гормона из 5 дисков с последующим измерением концентрации TSH в полученном экстракте. Диапазоны измеренных таким образом концентраций в калибровочных пробах составили 0 (2)–50 пмоль/л fT_4 и 0 (0.8)–50 мкМЕ/мл TSH.

Оценена возможность повышения чувствительности анализа обоих гормонов путем увеличения их концентрации в реакционном растворе за счет использования меньшего объема буфера, экстрагирующего гормоны из бумажного диска. Благодаря проведению реакции на микроэрреях, объем буферного раствора в лунке можно было снизить с 200 до 15 мкл. Однако, в ходе этих опытов было обнаружено, что наряду с ожидаемым повышением чувствительности анализа существенно возрастала вариабельность результатов. Яркость результирующего свечения микроэрреев, расположенных в центре дна некоторых лунок планшета, становилась заметно слабее или полностью исчезала, при этом доля таких лунок могла достигать 20%. Вероятно, наблюдаемый эффект вызван использованием интенсивного перемешивания при проведении реакции, что было необходимо для полной экстракции исследуемых гормонов из образца, но могло приводить к механическому стиранию микроэрреев бумажным диском в центре дна лунки планшета. В результате коэффициент вариации (КВ) измеряемых значений концентрации гормонов резко возрастал, особенно, при определении fT_4 , когда КВ мог превышать 50%. Существенное возрастание ошибки измерения fT_4 , по-видимому, свидетельствует о том, что конкурентный тип твердофазного иммуноанализа более чувствителен к вариациям в содержании иммобилизованных на твердой фазе аналитов, чем сэндвич-анализ. Выбранный объем реакционного буфера, при котором доля обнаруженных “дефектных” лунок не превышала 0.1%, составил 100 мкл. Увеличение объема не снижало вариабельность результатов, но приводило к пропорциональному уменьшению чувствительности анализа гормонов. Таким образом, в ходе проведенных исследований были выявлены определенные ограничения в использовании преимуществ метода микроэрреев при анализе высушенных на бумаге пятен биологических жидкостей.

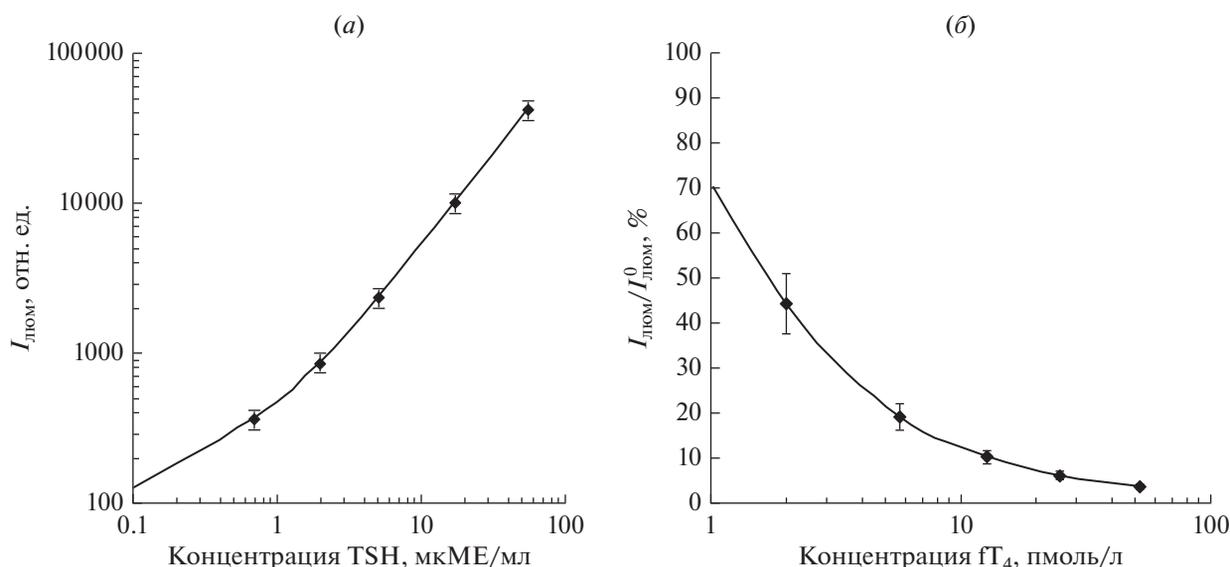


Рис. 3. Типичные калибровочные графики для одновременного определения TSH (а) и fT_4 (б) в сухих пятнах крови: кривая зависимости интенсивности люминесценции (I_{lum}) на TSH-эрреях от концентрации TSH в исследуемых образцах и кривая зависимости степени ингибирования интенсивности люминесценции (I_{lum}/I_{lum}^0) на T_4 -эрреях от концентрации fT_4 в исследуемых образцах. Приведены средние значения интенсивностей при 10 повторных измерениях.

Достигнутые параметры мультиплексной системы

Разработанная тестовая система позволяет проводить одновременное определение гормонов fT_4 и TSH в диапазонах концентраций, клинически важных для обследования как новорожденных, так и взрослых пациентов. Калибровочные кривые имеют линейный характер в диапазоне от 2 до 50 пмоль/л тироксина (рис. 3а) и от 0.8 до 50 мкМЕ/мл тиротропина (рис. 3б). Чувствительность анализа (рассчитана по формуле, описанной в эксперимент. ч.), составила 1.0 ± 0.2 пмоль/л fT_4 и 0.3 ± 0.1 мкМЕ/мл TSH, что соответствует порогам обнаружения в сухом образце 3×10^{-18} моль T_4 и 0.9×10^{-9} МЕ TSH. По данному параметру двойной тест значительно опережает коммерческие тестовые системы для анализа fT_4 (40×10^{-18} моль T_4), но уступает наиболее чувствительным из существующих в настоящее время тестам на TSH (0.1×10^{-9} МЕ TSH) [15]. Однако, следует учитывать, что коммерческие тесты предназначены для анализа жидких сывороток, а не высушенных образцов цельной крови.

Воспроизводимость и правильность измерений концентрации гормонов оценивали по результатам анализа контрольных проб с известным содержанием гормонов (процедура расчета этих показателей описана в эксперимент. ч.). Двойной тест позволил правильно определить концентрации TSH и T_4 в стандартных образцах, полученных в рамках международных и российских программ

внешней оценки качества измерений (табл. 1). Исследование воспроизводимости метода выявило значительную вариабельность (до 20%) результатов анализа обоих гормонов как в одной постановке, так и между постановками анализа. Согласно ГОСТ Р 51352-2013, допустимое значение коэффициента вариации результатов при количественном определении аналитов в высушенных на бумаге пятнах крови составляет 15%. Наблюдаемые в двойном тесте более высокие значения этого показателя связаны, по-видимому, с использованием меченых наночастиц, часть которых может десорбироваться с микроэрреев в составе крупных иммунных комплексов.

Таким образом, использование детекторной системы на основе фосфоресцентных наночастиц позволяет кардинально (более чем в 10 раз) повысить чувствительность анализа, однако приводит к существенному увеличению вариабельности его результатов. Экспериментальные подходы к улучшению воспроизводимости результатов прорабатываются нами в настоящее время.

Исследование клинических образцов

Аналитические характеристики двойного теста оценивали при анализе клинических образцов крови от пациентов с различным тиреоидным статусом, в том числе от 24 пациентов с эутиреозом (TSH и T_4 в норме), 14 пациентов с гипотиреозом (T_4 снижен и/или TSH повышен) и 10 пациентов с гипертиреозом (T_4 повышен и/или TSH

Таблица 1. Результаты одновременного определения концентрации TSH и fT₄ в стандартных образцах сухих пятен крови человека

| Исследуемый материал | Концентрация TSH, мкМЕ/мл | | Концентрация fT ₄ , пмоль/л | |
|---|---------------------------|------------------------------|--|------------------------------|
| | заданная | измеренная тестовой системой | заданная | измеренная тестовой системой |
| Стандартный образец из тестовой системы | 6.5–11.2 | 7.8 ± 1.2 | 5.2–9.1 | 7.0 ± 1.1 |
| Стандартные образцы CDC* | | | | |
| лот 1411 | 8.0–14.3 | 9.3 ± 1.4 | | |
| лот 1412 | 14.9–23.6 | 18.3 ± 2.9 | | |
| лот 1413 | 30.2–49.1 | 39.4 ± 6.1 | | |
| лот 1302 | | | 5.0–8.6 | 7.4 ± 1.2 |
| лот 1303 | | | 8.8–14.1 | 11.4 ± 1.8 |
| Стандартные образцы ФСВОК** | | | | |
| лот 1–17 | 3.9–6.1 | 4.8 ± 0.8 | | |
| лот 2–17 | 18.5–28.1 | 24.2 ± 3.8 | | |
| лот 3–17 | 11.8–18.1 | 14.7 ± 2.3 | | |

* Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA).

** Федеральная система внешней оценки качества (Россия).

снижен). Сыворотки крови этих пациентов были аттестованы по содержанию тиреоидных гормонов соответствующими коммерческими наборами для ИФА. Сравнение результатов детекции гормонов в сухих пятнах и в сыворотках крови показало высокую степень корреляции при анализе ТТГ ($r = 0.9730$, $n = 48$) (рис. 4а). Корреляция результатов определения fT₄ была несколько ниже ($r = 0.8585$, $n = 48$) (рис. 4б); это можно объяснить тем, что разные методы определения уровня свободного, несвязанного с белками, гормона вносят свои искажения в равновесие гормон – белок, особенно при использовании различных типов исследуемых образцов (сывороток или высушенных на бумаге пятен цельной крови).

Важным условием для применения разработанного двойного теста для диагностики состояний функции щитовидной железы является способность правильно оценивать тиреоидный статус пациента по результатам исследования высушенных образцов крови. Было показано, что у здоровых пациентов измеренные концентрации обоих гормонов соответствовали нормальным значениям (3.0–8.0 пмоль/л fT₄ и 0.15–1.8 мкМЕ/мл TSH); у всех 4 пациентов с высоким уровнем fT₄ в сыворотке обнаружены повышенные значения fT₄ в сухих образцах; и, наконец, у всех 5 пациентов с пониженным содержанием fT₄ в сыворотке выявлены низкие уровни fT₄ в двойном тесте. Аналогичная корреляция результатов была выявлена при измерении концентрации TSH в сухих образцах и сыворотках крови от 9 и 6 пациентов с высоким и низким уровнем этого гормона соответ-

ственно. У 4 пациентов, в сыворотках которых (по данным ИФА) были определены очень низкие уровни ТТГ (менее 0.001 мкМЕ/мл), значения его концентрации в двойном тесте были существенно ниже расчетной чувствительности анализа. В целом, проведенные исследования показали, что использование двойного теста для измерения уровня TSH и fT₄ в сухих пятнах крови позволило правильно оценить тиреоидное состояние всех обследованных пациентов.

Таким образом, разработана тестовая система для одновременного определения основных маркеров состояния функции щитовидной железы (TSH и fT₄) в высушенных образцах крови человека. Исследованы возможности и ограничения таких систем для выявления высокомолекулярных (TSH) и низкомолекулярных (T₄) соединений при совмещении технологии микроэреев и детекторных фосфоресцентных наночастиц в многолуночном формате полистироловых планшетов. Аналитические параметры теста позволяют проводить измерение гормонов в клинически важных диапазонах концентраций. Используя результаты анализа, можно правильно диагностировать тиреоидный статус пациента – эутиреоз, гипотиреоз или гипертиреоз. Высокая вариабельность результатов ограничивает возможность использования тестовой системы для количественного обследования уровня гормонов у конкретного пациента. Предложенный подход более применим для массовых скрининговых исследований с целью выявления тиреоидных патологий как у новорожденных, так и в группах риска

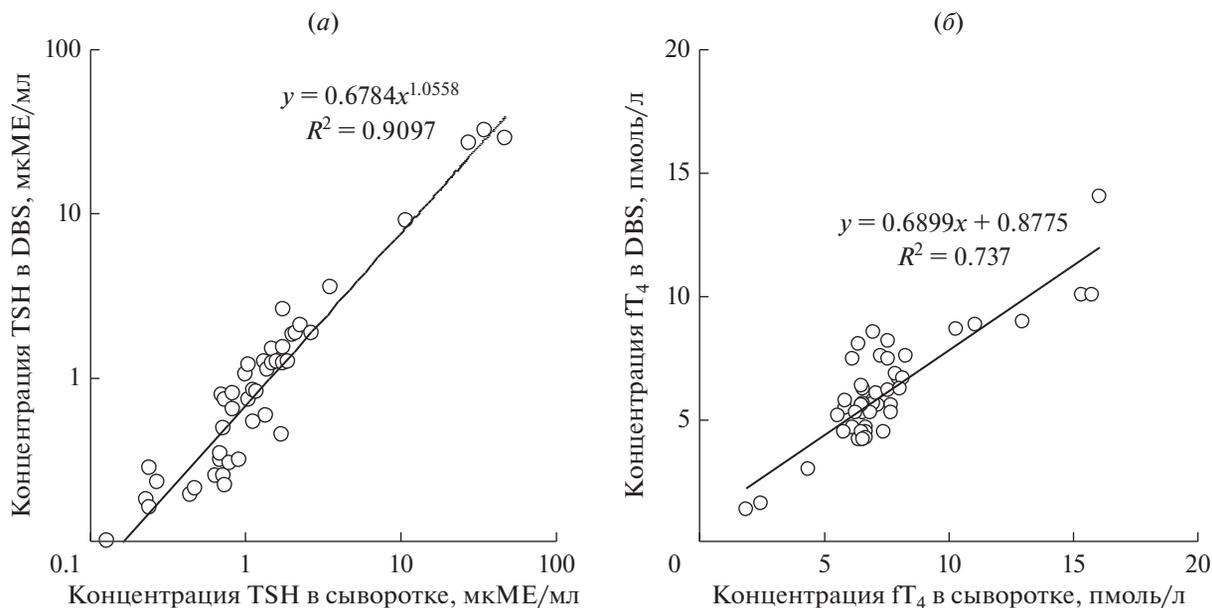


Рис. 4. Сравнение результатов одновременного определения гормонов TSH (а) и fT_4 (б) в высушенных образцах крови пациентов с результатами исследования сывороток крови этих пациентов коммерческими ИФА-тестами фирмы ХЕМА. Для удобства сравнения значения концентрации гормонов приведены в пересчете на содержание в крови.

взрослого населения, особенно в экологически неблагоприятных регионах, для которых характерен высокий уровень развития патологий щитовидной железы.

Полученные результаты могут быть использованы при создании мультиплексных систем для одновременного иммунохимического определения аналитов (TSH, иммунореактивный трипсин, T_4 и 17α -гидроксипрогестерон) в рамках существующих программ неонатального скрининга, а также при разработке других программ массового обследования населения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биологические материалы и реагенты, использованные в работе, перечислены ниже:

- стандартные образцы сухих пятен крови с известным содержанием TSH и T_4 , полученные из Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, USA) в рамках международной программы контроля качества измерений в неонатальном скрининге (NSQAP);

- стандартные образцы сухих пятен крови с известным содержанием TSH, полученные из Центра внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований (Россия) в рамках Федеральной системы внешней оценки качества (ФСВОК);

- стандартные образцы сывороток крови человека с известным содержанием fT_4 (Bio-Rad);

- пятна крови от 48 пациентов, сыворотки крови которых были предварительно охарактеризованы по содержанию TSH и fT_4 в лаборатории ХЕМА. Из них у 9 пациентов уровень TSH был повышен и у 6 пациентов – понижен, fT_4 повышен у 4 пациентов и понижен у 5 пациентов;

- первичные (немеченые) моноклональные антитела (МКА) к β -субъединице молекулы TSH (ИММУНОСКРИН, Россия) для иммобилизации в виде улавливающих микроэрреев в лунках планшета;

- детекторные МКА к другому эпитопу β -субъединицы молекулы TSH (ИММУНОСКРИН) и МКА к T_4 (ИММУНОСКРИН) в виде конъюгатов с биотином, синтезированных по стандартной методике в соответствии с инструкцией для биотин-*N*-гидроксисукцинимидному эфиру компании “Sigma”. Концентрация белка в конъюгатах – 1 мг/мл, нагрузка биотина – 5–10 моль/моль белка.

Получение конъюгированного антигена T_3 -BSA.

Для синтеза использовали T_3 – 3,3',5-трийодотиронин (triiodo-L-thyronine, Sigma, 95–98%), DMSO (Helicon, ACS Grade, 99.9%), BSA (Sigma, 99%) и водорастворимый карбодиимид EDC (Sigma). 5 мг T_3 растворяли в 5 мл смеси DMSO и дистиллированной воды (1 : 1) и приливали в раствор 5 мг BSA в 2 мл воды. Добавляли 20 мг EDC. Перемешивали в течение 24 ч при температуре 2–8°C, диализовали против дистиллированной воды и концентрировали до 1 мг/мл. Полученный конъюгат содержал 15 моль T_3 на 1 моль BSA.

Формирование эрреев. Для формирования эрреев использовали планшеты полистироловые 96-луночные с плоским дном (Nunc, MaxiSorb). Микроэрреи печатали контактным способом с помощью наноплоттера (ИММУНОСКРИН) с использованием игл диаметром 0.5 мм. На дне каждой лунки планшета формировали по 4 одинаковые микрозоны для TSH- и T₄-эрреев (схема расположения микрозон приведена на рис. 1а), с использованием, соответственно, первичных анти-TSH-МКА и T₃-BSA в концентрации 0.1 мг/мл. Планшет инкубировали в течение 18 ч при температуре 4°C, затем отмывали промывочным раствором (0.01 М Трис-НСl-буфер, рН 7.75, содержащий Tween-20 – 0.02%, NaCl – 8.7 мг/мл и NaN₃ – 0.02%), вносили блокировочный раствор (0.5% раствор BSA) по 100 мкл в лунку и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей аспирацией и высушиванием на воздухе.

Приготовление сухих калибровочных проб. Для приготовления проб использовали бланки из фильтровальной бумаги (Watman, 903), L-тироксин (Sigma), TSH (НИИ Эндокринологии, активность 7 МЕ/50 мкл) и эритроцитарную массу крови доноров, очищенную от гормонов T₄ и TSH (не более 5 нмоль/л T₄ и 0.001 мкМЕ/мл TSH). Для приготовления 6 калибровочных проб в раствор эритроцитарной массы (значение гематокрита 50–55%) добавляли TSH и L-тироксин в соотношении: 0/0; 0.8/2.5; 2/30; 5/60, 15/120; 50/240 мкМЕ/мл TSH/нмоль/л T₄, перемешивали и наносили по 100 мкл на бумажные бланки с последующим высушиванием на воздухе. Полученные пробы аттестовали по уровню TSH с помощью тест-системы TSH-НЕОСКРИН (ИММУНОСКРИН) с использованием методики постановки анализа, модифицированной, как описано ранее [23]. Для аттестации проб по уровню fT₄ использовали образцы сухих пятен крови, приготовленные добавлением сывороток крови человека с известным содержанием fT₄ в очищенную эритроцитарную массу (значение гематокрита 50–55%).

Характеристика наночастиц для детекции. В работе использованы биоспецифичные наночастицы, синтезированные по методике, подробно описанной в работе [22]. Диаметр синтезированных наночастиц находился в диапазоне от 40 до 60 нм (среднечисленный диаметр 46 ± 14 нм). Включение фосфоресцентной метки составило 1960 молекул на частицу. Для покрытия поверхности наночастиц стрептавидином применяли одностадийный метод с использованием EDC. Полученная нагрузка – 123 молекул стрептавиди-

на на частицу. Концентрация полученных биоспецифичных наночастиц 10¹² частиц/мл.

Одновременное определение TSH и fT₄ с использованием фосфоресцентных наночастиц. В лунки планшета с иммобилизованными эрреями вносили по 1 диску диаметром 3.2 мм, вырезанному панчером из калибровочных проб. Затем в лунку наливали по 100 мкл реакционного буфера (0.05 М Трис-НСl-буфер, рН 7.75, содержащий BSA – 0.5% и NaN₃ – 0.01%), инкубировали при встряхивании при 750 об./мин в течение 5 мин, добавляли в каждую лунку по 25 мкл смеси биотинилированных анти-TSH-МКА (2 нг на лунку) и анти-T₄-МКА (1 нг на лунку), инкубировали при встряхивании в течение 1 мин и продолжали процедуру инкубации в течение 18 ч при температуре 4°C. После удаления дисков (DiscRemover, Perkin Elmer) и промывки планшета в лунки добавляли суспензию покрытых стрептавидином фосфоресцентных наночастиц в реакционном буфере (4 × 10⁸ частиц на лунку). После завершения 2-часовой инкубации при встряхивании при 200 об./мин и проведения 6-кратной промывки (3 раза промывочным буферным раствором и 3 раза дистиллированной водой) планшет высушивали и измеряли интенсивность фосфоресценции путем последовательного сканирования отдельных участков дна лунки планшета лазерным лучом с длиной волны излучения 340 нм в режиме выделения длительной люминесценции с максимумом 615 нм. Использовали индикатор фосфоресценции импульсный ИФИ-03 “Диagem” (регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13913 от 08.08.2013 г., ИММУНОСКРИН). Результаты сканирования представляли в виде цветовой диаграммы пространственного распределения интенсивности регистрируемого сигнала по дну лунок планшета, а также в цифровом формате в виде средних значений сигналов, измеренных при сканировании 4 микрозон, предназначенных для выявления каждого аналита. Регистрируемая интенсивность люминесценции TSH-эрреев, была прямо пропорциональна, а интенсивность люминесценции T₄-эрреев, – обратно пропорциональна концентрации гормона в крови.

Чувствительность, воспроизводимость и правильность определения TSH и fT₄. Чувствительность и воспроизводимость рассчитывали в соответствии с ГОСТ Р 51352-2013. При оценке чувствительности для каждого исследуемого гормона на оси ординат соответствующего графика зависимости интенсивности люминесценции (I_{lum}) от концентрации гормона откладывали среднее арифметическое значение $I_{lum}(I_{lum}^{cp})$ для калибровоч-

ной пробы, не содержащей гормонов, плюс (в случае TSH) или минус (в случае T₄) удвоенное среднее квадратичное отклонение (SD) и по графику определяли соответствующее значение на оси абсцисс (минимально достоверно определяемая концентрация гормона). Воспроизводимость оценивали величиной коэффициента вариации, который рассчитывали (в процентах) как отношение среднее квадратичного отклонения к среднему арифметическому значению концентрации гормона в контрольных пробах (число повторных измерений не менее 10). Правильность измерений концентраций TSH и fT₄ проверяли по результатам исследования стандартных образцов сухих пятен крови человека. Если полученные значения находились в пределах заданного диапазона концентраций, то результат анализа считали правильным.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Для проведения исследования использовались образцы крови пациентов. Сведения о пациентах и полученные от них пробы анализировали ретроспективно, после удаления информации, позволяющей идентификацию результатов, следовательно, информированное согласие пациентов не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vignali D.A.* // *J. Immunol. Methods.* 2000. V. 243 (1–2). P. 243–255.
- Xu Y.Y., Pettersson K., Blomberg K., Hemmilä I., Mikola H., Lövgren T.* // *Clin. Chem.* 1992. V. 38. № 10. P. 2038–2043.
- Kricka L.J., Joos T., Fortina P.* // *Clin. Chem.* 2003. V. 49. P. 2109.
- Kingsmore S.F.* // *Nature Reviews Drug Discovery.* 2006. V. 5. P. 310–321.
- Kusnezow W., Syagailo Y.V., Rueffer S. et al.* // *Mol. Cell. Proteomics.* 2006. P. 1–53.
- Vasiliskov, A.V., Timofeev E.N., Surzhikov S.A., Drobyshev A.L., Mirzabekov A.D.* // *BioTechniques.* 1999. 27:592–600.
- Ekins R.P.* // *Clin. Chem.* 1998. V. 44. P. 2015–2030.
- FitzGerald S.P., Lamont J.V., McConnell R.I.* // *Clin. Chem.* 2005. V. 51. P. 1165–1176.
- Осин Н.С., Помелова В.Г., Соколов А.С., Быченкова Т.А., Бекман Н.И., Шарафудинова Т.Ю. и др.* // *Вестник РАМН.* 2007. № 12. С. 7–9.
- Pomelova V.G., Korenberg E.I., Kuznetsova T.I., Bychenkova T.A., Bekman N.I., Osin N.S.* // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. P. 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130048>
- Osin N.S., Pomelova V.G.* // *Frontiers in Research. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH / Eds. Georgiev V.S., Western K.A., McGowan J.J.* Totowa, NJ: Humana Press, 2008. P. 233–240.
- Бекман Н.И., Ларичева С.Ю., Быченкова Т.А., Помелова В.Г., Осин Н.С.* Мультианалитные фосфоресцентные иммуночипы для скрининга врожденных аномалий у новорожденных // I Международная научно-практическая конференция “Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине” 17–19 ноября 2010 г. Москва.
- Бекман Н.И., Помелова В.Г., Осин Н.С.* // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018. № 3. С. 173–178.
- Sterling K., Lazarus J.H.* // *Ann. Rev. Physiol.* 1977. V. 39. P. 349–371.
- Aoki Y., Belin R.M., Clickner R.J.* // *Thyroid.* 2007. V. 17. P. 1211–1223.
- Помелова В.Г., Осин Н.С.* // *Вестник РАМН.* 2007. Т. 12. С. 10–16.
- Lehmann S., Delaby C., Vialaret J., Ducos J., Christophe Hirtz C.* // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013. V. 51(10). P. 1897–1909.
- Bellisario R., Colinas R.J., Pass K.A.* // *Clin. Chem.* 2000. V. 46. P. 1422–1424.
- Бекман Н.И., Быченкова Т.А., Ларичева С.Ю., Канаева Т.А., Смирнова В.Г., Демина Л.А., Помелова В.Г.* Способ одновременного детектирования тиротропина и общего тироксина в сухих пятнах крови. Патент РФ № 2480772 // Б.И. 2013. № 12.
- Помелова В.Г., Бекман Н.И., Ларичева С.Ю., Быченкова Т.А., Осин Н.С., Злобин В.Н.* // *Медицина экстремальных состояний.* 2009. № 3. С. 43–50.
- Oppenheimer J.H.* // *N. Engl. J. Med.* 1968. V. 278. P. 1153–1162.
- Парамонов Д.В., Кострюкова Т.С., Быченкова Т.А., Помелова В.Г., Осин Н.С.* // *Биоорганическая химия.* 2016. № 6. С. 1–10. [*Paramonov D.V., Kostryukova T.S., Bychenkova T.A., Pomelova V.G., Osin N.S.* // *Russ. J. Biorgan. Chem.* 2016. № 6. P. 1–10].
- Помелова В.Г., Осин Н.С., Быченкова Т.А., Парамонов Д.В., Кострюкова Т.С.* // *Биоорганическая химия.* 2017. № 4. С. 367–376. [*Pomelova V.G., Osin N.S., Bychenkova T.A., Paramonov D.V., Kostryukova T.S.* // *Russ. J. Biorgan. Chem.* 2017. № 4. P. 367–376].
- Данилова Н.П., Мерц М.В., Локшин Д.Р., Васильев Р.Г.* // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. № 1. С. 34–38. [*Danilova N.P., Mertz M.V., Lokshin D.R., Vasilov R.G.* // *Russ. J. Biorgan. Chem.* 1996. V. 22. № 1. P. 34–38].

Simultaneous Detection of Thyroid-Stimulating Hormone and Free Thyroxin in Dried Spots of Human Blood by Using Phosphorescent Nanoparticles

N. I. Bekman^{*,#}, S. Yu. Laricheva^{*}, T. A. Bychenkova^{**}, V. G. Pomelova^{*}, and N. S. Osin^{**}

[#]Phone: +7 (903) 180-52-85; e-mail: nibeckman@mail.ru

^{*}State Research Institute of Biological Engineering, Volokolamskoe shosse 75/1, Moscow, 125424 Russia

^{**}Immunoscreen Closed Joint Stock Company, Volokolamskoe shosse 75/1, Moscow, 125424 Russia

A Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN) – based test system was developed for simultaneous detection of thyroid-stimulating hormone (TSH) and free thyroxin (fT₄), the markers of thyroid function, in dried human blood samples. The immunoassay was performed at the bottom of polystyrene 96-well microplate wells covered with analyte-specific microarrays (0.35 mm in diameter). The detection system consisted of polystyrene nanoparticles (46 ± 14 nm in diameter) with incorporated long luminescent Eu(III) chelate complexes (1960 molecules/particle). Fluorescence intensity was measured in time-resolved mode (TRF). Human blood – impregnated 3.2 mm paper disks were used as samples for analysis. Analytical parameter values and possible limitations of this experimental system were investigated. The system allowed for simultaneous detection of high-molecular weight and low-molecular weight compounds in clinically relevant concentration ranges, from 2.0 to 50 pmol/L for free T₄, and 0.8 to 50 μIU for TSH. The sensitivity of the analysis was 1.0 ± 0.2 pmol/L (fT₄) and 0.3 ± 0.1 μIU/mL (TSH), which corresponded to the detection thresholds of 3 × 10⁻¹⁸ mol T₄ and 0.9 × 10⁻⁹ IU TSH. The test determined correctly the TSH and T₄ concentrations in standard samples used in quality assessment programs, as well as the thyroid status of the patients investigated (n = 48). Results of hormone detection in dried blood spots with our experimental test system correlated well with the results of hormone detection in serum samples using commercial kits (r = 0.9730 for TSH and r = 0.8585 for fT₄). The main drawback of the system was associated with high variability of measurement results (up to 20%), which limits the possibility of its using to quantify the level of hormones in patient blood. We believe that this system can be useful for detecting thyroid disorders both in the existing programs of neonatal screening for congenital hypothyroidism and in mass screening surveys in risk groups of the adult population, in ecologically unfavorable regions in particular.

Keywords: nanoparticles, Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN), microarrays (microarrays), Thyroid Stimulating Hormone (TSH), free thyroxin (fT₄), dried blood spots (DBS)



ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА микроРНК *Batrachuperus karlschmidti* С ПОМОЩЬЮ ПЛАТФОРМЫ ГЛУБОКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ILLUMINA¹

© 2020 Yong Huang^{*,#}, Jianli Xiong^{*}, and Xihong Sun^{*}

^{*}College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, 471023 China

Поступила в редакцию 29.04.2019 г.

После доработки 29.07.2019 г.

Принята к публикации 18.11.2019 г.

МикроРНК играют критически важную роль в регуляции многих биологических процессов в эукариотах. *Batrachuperus karlschmidti* — вид саламандр под угрозой вымирания, эндемичный для Китая, который привлек внимание в силу его высокой ценности для палеонтологии и эволюционной истории, а также снижающейся численности популяции. Большая часть микроРНК была обнаружена в животных, однако микроРНК *B. karlschmidti* ранее не изучались. В данной работе с помощью технологии глубокого секвенирования идентифицированы и проанализированы микроРНК *B. karlschmidti*. Всего получено 13 377 954 прочтения. Из них 2724 630 уникальных прочтений соответствуют 866 известным и трем новым микроРНК. Все идентифицированные микроРНК были подтверждены с помощью метода ОТ-ПЦР шпилек. Дополнительно 5452 кандидатов генов-мишеней были предсказаны. Анализ терминов GO и KEGG показал, что большинство мишеней задействованы в широком спектре биологических и метаболических процессов. Также результаты свидетельствуют о том, что некоторые из генов-мишеней являются факторами транскрипции, которые могут быть связаны с адаптацией к экологическим условиям. В целом, полученные результаты представляют собой первый крупномасштабный анализ микроРНК *B. karlschmidti*. Характеристика микроРНК *B. karlschmidti* вносит вклад в понимание сложной роли микроРНК-зависимых регуляторных сетей в экспрессии генов для регуляции разнообразных биологических процессов и значительно облегчает дальнейшие исследования микроРНК этого вида.

Ключевые слова: *Batrachuperus karlschmidti*, микроРНК, глубокое секвенирование, мишень

DOI: 10.31857/S0132342320020207

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

[#] Автор для связи (тел.: +86 379-62480319; эл. почта: huangyong1979111@126.com).



ОПТИМИЗАЦИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА БЕТА-АМИЛОИДА (1-40) И ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ, ВЫЯВЛЯЮЩИХ ЕГО В УСЛОВИЯХ ИММУНОБЛОТА

© 2020 г. Т. Д. Волкова*., Д. О. Короев*, А. В. Камынина*,
М. П. Филатова*, А. В. Аветисян**, О. М. Вольпина*

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

**НИЦ ФХБ имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, 1с40

Поступила в редакцию 19.07.2019 г.

После доработки 28.08.2019 г.

Принята к публикации 14.10.2019 г.

Оптимизирован метод твердофазного синтеза и очистки бета-амилоида человека последовательно-сти 1-40, позволяющий получить продукт с высоким выходом и гомогенностью более 95%. Синтетический пептид способен формировать олигомеры, что подтверждено с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующим иммуноблотом и методом флуоресцентной спектрофотометрии с использованием красителя тиофлавина Т. Предложен доступный метод, позволяющий получать с высоким титром антитела, специфичные к бета-амилоиду (1-40) и распознающие как мономер, так и олигомеры пептида в иммуноблоте.

Ключевые слова: бета-амилоид, пептиды, синтез, антитела, противопептидные

DOI: 10.31857/S0132342320020189

ВВЕДЕНИЕ

Бета-амилоид (A β) — это общее название для группы пептидов, образующихся в результате протеолитического расщепления трансмембранного белка-предшественника, называемого APP (*amyloid precursor protein*), и проявляющих высокую способность к агрегации с образованием как растворимых олигомеров, так и нерастворимых фибрилл [1–4]. Фибриллы A β являются основными компонентами так называемых амилоидных бляшек — патологических образований, наблюдаемых при различных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром Дауна и др. [2]. Олигомеры A β считаются основным токсическим агентом, вызывающим гибель нейронов [5, 6]. A β продуцируется различными типами клеток, такими как нейроны, астроциты, фибробласты, тромбоциты, причем наиболее высокий уровень экспрессии наблюдается в нейронах и клетках гладкой мускулатуры. Это свидетельствует о важной роли A β в развитии

клеток, при этом его функции в норме до конца не выяснены [1–3].

Для изучения механизма патологического действия бета-амилоида исследователям необходимо располагать достаточным его количеством. Бета-амилоидные пептиды содержат от 37 до 43 а. о., что делает привлекательным их получение с помощью химического синтеза [4]. Однако такой синтез представляет собой трудную задачу. Бета-амилоидные пептиды характеризуются последовательностью, в которой 28 N-концевых аминокислотных остатков, в основном, являются полярными, а неполярные остатки сосредоточены в оставшейся C-концевой части. В результате при нейтральном значении pH пептиды проявляют высокую склонность к агрегации. Мономеры бета-амилоидов могут самоорганизовываться в димеры, тримеры и более высокомолекулярные олигомеры, которые формируют устойчивую вторичную структуру с преобладанием β -складчатой структуры и, в конечном итоге, образуют нерастворимые фибриллы. Трудность синтеза бета-амилоидных пептидов заключается в том, что даже растущая пептидная цепь на полимерной основе в органических растворителях склонна к агрегации, но особенно быстро агрегация происходит в водных растворах после деблокирования

Сокращения: A β — бета-амилоид; Fmoc — 9-флуоренилметилоксикарбонил, TBTU — тетрафторборат O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилмочевины; Ttt — тритил; Pbf — 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-57-77; эл. почта: tdvol@mx.ibch.ru).

Таблица 1. Аβ(1-40) и его укороченный фрагмент Аβ(1-17)

| Пептид | Аминокислотная последовательность |
|--------|--|
| 1-40 | DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV |
| 1-17 | DAEFRHDSGYEVHHQKL-G |

пептида, что чрезвычайно затрудняет очистку продукта. Все это приводит к низкому выходу целевого продукта.

В литературе описано несколько примеров синтеза бета-амилоидных пептидов, как Аβ(1-40), так и наиболее фибриллогенного Аβ(1-42) [7–10], а также C-концевых гидрофобных фрагментов пептида Аβ(1-42) [11] и ковалентно сшитых гомодимеров его различных фрагментов [12], однако сложность методики или неудовлетворительная степень гомогенности полученных продуктов делает разработку эффективного способа синтеза и очистки бета-амилоидных пептидов с помощью ВЭЖХ по-прежнему актуальной. Нами был принят синтез Аβ(1-40) человека, который вместе с Аβ(1-42) входит в состав амилоидных бляшек и при этом является более подходящей аллоформой для использования в экспериментах *in vitro*, поскольку обладает менее высокой гидрофобностью и не такой высокой скоростью агрегации, как Аβ(1-42).

Для широкомасштабных исследований, направленных на изучение молекулярных процессов с участием Аβ, необходимо также располагать большими количествами антител, способных связываться с ним как в условиях ИФА или вестерн-блота, так и в срезах тканей или на клетках. В настоящей работе представлен доступный метод, позволяющий с высоким выходом получать антитела, специфичные к β-амилоидам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аβ(1-40) был синтезирован твердофазным методом в автоматическом режиме на *n*-алкоксибензильном полимере с низким содержанием гидроксильных групп (0.2 ммоль/г). Аминокис-

Таблица 2. Характеристики синтетического Аβ(1-40) и фрагмента Аβ(1-17) по данным масс-спектрометрии и ВЭЖХ

| Пептид | $M_{\text{теор}}$ | $[M\text{H}]^+$ | Время удерживания*, мин |
|--------|-------------------|-----------------|-------------------------|
| 1-40 | 4327.15 | 4330.29 | 12.06 |
| 1-17 | 2124 | 2125 | 7.81 |

* ВЭЖХ на колонке Jupiter 10μ C18 300A 10 × 250 мм (Phenomenex, США) в градиенте концентрации ацетонитрила 10–70% в 0.1% TFA за 1 ч при расходе элюента 1 мл/мин.

лотная последовательность Аβ(1-40) приведена в табл. 1.

Использовали Fmoc-производные аминокислот с защитой боковых функций остатков Ser и Thr с помощью Bu^t-группы, Asp и Glu – OBu^t-группы, Lys – Boc-группы, His – Trt- и Arg – Pbf-группы. Нарастивание полипептидной цепи проводили при помощи однократных конденсаций TBTU-методом, применяя 7.5-кратные избытки защищенных аминокислот. Основной проблемой, обычно затрудняющей синтез Аβ-пептида, является его агрегация даже на полимере в органических растворителях. Для повышения солюбилизации растущей пептидной цепи и препятствия ее агрегации в растворитель для реакций конденсации, а также отщепления Fmoc-защитной группы, добавляли диметилсульфоксид. Кроме того, для минимизации агрегации молекул β-амилоида и побочных реакций конденсацию проводили 30 мин вместо стандартных 2 ч. Таким образом, синтез 40-членного пептида при помощи автоматического синтезатора продолжался 2 сут.

Отщепление пептида от полимера с одновременным удалением боковых защитных групп проводили смесью TFA со стандартными добавками, предотвращающими протекание побочных реакций. Сырой продукт синтеза высаживали этилацетатом. Зачастую после деблокирования Аβ-пептиды не подвергают ВЭЖХ, ограничиваясь гель-фильтрацией или только осаждением [7–9]. Описана ВЭЖХ очистка Аβ(1-42) на специальной колонке (PLRP-S) в основных условиях (5 mM ацетат аммония в ацетонитриле, pH 8.0) [10]. В настоящей работе была успешно проведена очистка методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на стандартной колонке Jupiter C4 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA. Для нанесения на колонку пептид растворяли в 50% DMSO в воде. Было получено, исходя из 100 мг полимера, 12.5 мг Аβ(1-40), то есть в расчете на содержание гидроксильных групп в исходном полимере выход составил 13%. Индивидуальность полученного пептида последовательности (1-40) была подтверждена данными масс-спектрометрии и аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ (табл. 2). Степень гомогенности по данным аналитической ВЭЖХ составила более 95%.

Следует отметить, что хроматография была результативной только для Аβ(1-40), осажденного этилацетатом после деблокирования. В случае попытки повторной ВЭЖХ лиофилизованного

продукта происходила необратимая сорбция пептида на колонке, что говорит, вероятно, о том, что во время пребывания в водном растворе после очистки пептид переходит в агрегированное состояние. Синтетический $A\beta(1-40)$ после лиофилизации дезагрегировали путем растворения в гексафторизопропанол, делили на аликвоты и растворитель упаривали. Дезагрегированный пептид использовали для дальнейших опытов.

Таким образом, сокращение времени синтеза благодаря использованию 7.5-кратных избытков аминокислот, добавление DMSO как в реакционную смесь при конденсации и деблокировании в ходе синтеза (30%), так и при нанесении на колонку (50%), а также минимизация пребывания пептида в водных растворах (после хроматографии) позволили получить продукт с высокой степенью гомогенности и высоким выходом.

Следующей задачей было получение антител, распознающих $A\beta(1-40)$ -пептид. Для этого был синтезирован *N*-концевой фрагмент 1-17 его последовательности (табл. 1). Синтез этого пептида проводили стандартным TBTU-методом на *n*-алкоксибензильном полимере со средним содержанием гидроксильных групп (0.5 ммоль/г), с использованием 3-кратных избытков Fmoc-производных аминокислот с соответствующими боковыми защитными группами. В качестве *C*-концевого аминокислотного остатка был использован дополнительный остаток Gly.

Отщепление пептида от полимера с одновременным удалением боковых защитных групп проводили смесью TFA со стандартными добавками, предотвращающими протекание побочных реакций. Сырой продукт синтеза осаждали диэтиловым эфиром. Очистку проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Jupiter C18 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA. Индивидуальность $A\beta(1-17)$ -фрагмента была подтверждена данными масс-спектрометрии и аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ (табл. 2). Степень гомогенности пептида составила более 98%.

Для получения антител к пептиду проводили иммунизацию кроликов его конъюгатом с гемоцианином улитки (KLH). У кроликов отбирали кровь и готовили иммунную сыворотку, которую анализировали на содержание противопептидных антител и подвергали аффинной хроматографии на сефарозе 4В с иммобилизованным пептидом $A\beta(1-17)$. В результате выделяли фракцию антител с высоким титром (разведение 1/1280000), строго специфичных к пептиду (1-17). Способность очищенных антител связываться с $A\beta(1-40)$ -пептидом была проверена в ИФА. Антитела связывались с синтетическим $A\beta(1-40)$ -пептидом с таким же титром, как и с пептидом $A\beta(1-17)$.

Известно, что β -амилоиды оказывают свое негативное воздействие при ряде нейропатологий

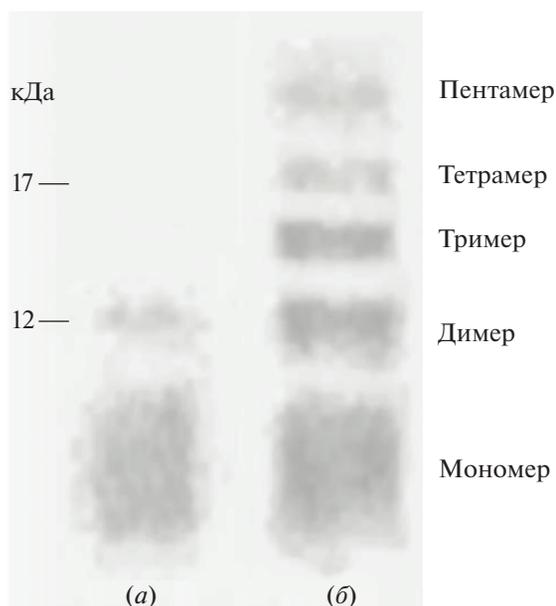


Рис. 1. Иммуноблот с антителами к $A\beta(1-17)$ -фрагменту для $A\beta(1-40)$ до инкубации (а) и после инкубации в Tris-буфере, pH 7.4 при 37°C в течение 48 ч (б).

за счет формирования олигомеров, проявляющих цитотоксические свойства в тканях головного мозга [13, 14]. Поэтому представляло интерес оценить способность синтетического $A\beta(1-40)$ образовывать стабильные олигомеры.

В ряде работ показано, что амилоидные олигомеры устойчивы к денатурирующим условиям SDS-электрофореза и вестерн-блота, что делает возможным использование этих методов для изучения олигомеризации и детекции конкретных типов олигомеров [15]. Раствор $A\beta(1-40)$ инкубировали в Tris-буфере pH 7.4 в течение 48 ч при 37°C, после чего подвергали электрофорезу и иммуноблоттингу с применением полученных антител к $A\beta(1-17)$ -фрагменту. Проводили сравнение результатов с данными, полученными для свежеприготовленного раствора $A\beta(1-40)$ (рис. 1).

Анализ результатов показал, что полученные антитела против фрагмента (1-17) обнаруживают как мономер $A\beta(1-40)$, так и его олигомеры. В результате иммуноблота исходного раствора $A\beta(1-40)$ были получены две белковые полосы, находящиеся в области масс ниже 12 кДа (рис. 1а). Основная зона соответствует мономеру $A\beta(1-40)$ (M 4.3 кДа). Размытость границ этой зоны обусловлена низкой разрешающей способностью стандартного SDS-электрофореза по Лэммли четко разделять белки с массой менее 10 кДа. Вторая полоса с меньшей интенсивностью окрашивания, вероятно, соответствует димеру $A\beta(1-40)$ (M 9 кДа). Наличие этой зоны показывает, что синтетический $A\beta(1-40)$ сразу после растворения в воде начинает агрегировать. Эти же полосы ниже уровня 12 кДа

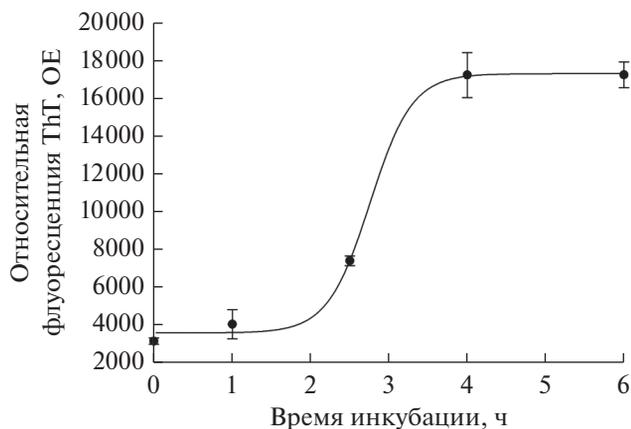


Рис. 2. Динамика агрегации Аβ(1-40) в Tris-буфере, pH 7.4 (анализ по реакции с тиофлавином Т). Каждая точка является средним значением, рассчитанным по результатам измерения флуоресценции для четырех проб, отобранных в одно время. Для каждого среднего показана стандартная ошибка (SEM).

можно наблюдать и в результате иммуноблота раствора после инкубации в течение 48 ч (рис. 1б). Однако кроме этих зон обнаруживаются полосы с большей массой, которые соответствуют тримеру (M 13.5 кДа), тетрамеру (M 18 кДа) и пентамеру (M 22.5 кДа) Аβ(1-40). При этом интенсивность окрашивания зон падает постепенно от мономера к пентамеру.

Основываясь на результатах иммуноблота, можно сделать несколько выводов. Во-первых, синтетический Аβ(1-40) в водном растворе способен формировать олигомеры, стабильные в денатурирующих условиях. Во-вторых, аффинно очищенные поликлональные антитела против фрагмента (1-17) можно использовать для детекции мономера и олигомеров Аβ(1-40) с помощью иммуноблота.

Способность синтетического Аβ(1-40) агрегировать с образованием характерных для бета-амилоидов высокомолекулярных олигомеров с β-структурой была доказана в опытах с использованием флуоресцентного красителя тиофлавина Т (ThT). Этот краситель повышает интенсивность своей флуоресценции при встраивании в β-складчатые структуры, которые формируются при агрегации мономеров Аβ в олигомеры и далее до протофибрилл и фибрилл [16]. Перед добавлением буфера к Аβ(1-40) его растворяли в небольшом объеме DMSO, то есть содержание амилоидных олигомеров в начале эксперимента было минимальным. Как видно из рис. 2, через 2.5 ч после начала инкубации происходил резкий рост интенсивности флуоресценции, который к 4 ч достигал максимума и выходил на плато. Эти данные подтверждают, что синтетический Аβ(1-40) за 4 ч формирует в водном растворе агрегаты с β-структурой, характерной для протофибрилл и фибрилл Аβ.

Таким образом, двумя методами было показано, что синтетический Аβ(1-40) образует как низкомолекулярные олигомеры (ди-, три-, тетра- и пентамеры), показанные на рис. 1, так и высокомолекулярные олигомеры, формирующие фибриллы, характерные для β-амилоидов.

В итоге, в настоящей работе представлен оптимизированный метод получения путем твердофазного химического синтеза Аβ-пептида человека последовательности (1-40) с высоким выходом и высокой гомогенностью. Кроме того, предложен метод получения очищенных антител, высоко специфичных к бета-амилоиду, распознающих как мономер, так и олигомеры Аβ(1-40) различными иммунохимическими методами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза пептидов использовали реактивы и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария). ВЭЖХ проводили при помощи хроматографа Стайер (Аквилон, Россия) с использованием колонок Jupiter 5μ C4 300A 4.6 × 250 мм и Jupiter 5μ C18 300A 4.6 × 250 мм (Phenomenex, США) для аналитической хроматографии, а также Jupiter 10μ C4 300A 10 × 250 мм и 10μ C18 300A 10 × 250 мм (Phenomenex, США) — для препаративной хроматографии. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ) после гидролиза пептидов смесью 6 М HCl—TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C.

Для иммунизации использовали самок кроликов породы Шиншила весом 2–3 кг (питомник “Алькона”, Россия).

Для аффинной хроматографии использовали колонку (Whatman, Англия) размером 10 × 100 мм, детектор (Uvicord LKB Bromma 2238, Швеция, λ 280 нм) и коллектор фракций (Multirack LKB Bromma 2111, Швеция).

Электрофорез проводили в мини-камере для гель-электрофореза (Hoefler-Mighty Small Vertical Electrophoresis system, США), перенос белков на мембрану осуществляли в камере для влажного электропереноса (Hoefler-TRANSPHOR, США), источник тока для электрофореза и электропереноса (Pharmacia Biotech, Швеция).

Твердофазный синтез и очистка пептидов. Синтез Аβ(1-40) проводили на *para*-алкоксипенилильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.2 ммоль/г. Нарастание пептидной цепи выполняли последовательно с использованием 7.5-кратных избытков защищенных аминокислот. Временную Fmoc-защиту удаляли 20% раствором 4-метилпиперидина в 30% DMSO—70% DMF. Конденсацию проводили при помощи TBTU, рас-

творенного в такой же смеси DMSO–DMF. Время реакции конденсации составляло 30 мин.

Синтез фрагмента Aβ(1-17) проводили на *para*-алкоксибензильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.5 ммоль/г. Для последовательного наращивания пептидной цепи применяли 3-кратные избытки защищенных аминокислот. Удаление временной Fmoc-защитной группировки и конденсацию выполняли так же, как для Aβ(1-40), но в чистом DMF, без добавления DMSO в реакционную смесь. Время реакции конденсации – 2 ч.

Отщепление пептидов от полимера с одновременным деблокированием функциональных групп боковых цепей проводили смесью TFA (94%), триизопропилсилана (1%), этандитиола (2.5%) и воды (2.5%) из расчета 1–2 мл смеси на 100 мг пептидполимера. Сырой Aβ(1-40) высаживали этилацетатом, осадок промывали этилацетатом, затем эфиром. Сырой фрагмент Aβ(1-17) высаживали эфиром.

Пептиды очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила 10–70% в 0.1% TFA за 1 ч при расходе элюента 3 мл/мин. Оптическое поглощение элюата измеряли при длине волны 226 нм. Очистку Aβ(1-40) выполняли на колонке Jupiter 10μ C4 300A 10 × 250 мм (Phenomenex, США). Для нанесения на колонку пептид растворяли в 50% DMSO в воде. Очистку фрагмента (1-17) выполняли на колонке Jupiter 10μ C18 300A 10 × 250 мм (Phenomenex, США). Пептид наносили на колонку в виде водного раствора.

Синтетические пептиды характеризовали данными аналитической ВЭЖХ, масс-спектрометрии MALDI и аминокислотного анализа. Аналитическую ВЭЖХ пептидов проводили в условиях, аналогичных препаративной ВЭЖХ, при расходе элюента 1 мл/мин.

Конъюгат пептида (1-17) с гемоцианином улитки KLN получали, как описано в работе [17]. К раствору 2.4 мг пептида в 2.1 мл раствора KLN в PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) с концентрацией белка 5.8 мг/мл при перемешивании в течение 1 ч добавляли 1.2 мл 0.25% раствора глутарового альдегида в PBS. Полученный раствор перемешивали 15 ч и диализовали против PBS в течение 20 ч с двукратной сменой буфера.

Противопептидные антитела к пептиду (1-17). Для получения антител к пептиду (1-17) двух кроликов иммунизировали двукратно с интервалом в 44 дня подкожно конъюгатами пептида с KLN в дозе 1 мг пептида на животное как описано ранее [18]. Для первой иммунизации суспензию KLN-конъюгата в PBS в концентрации 0.8–1.2 мг/мл (в пересчете на пептид) смешивали с равным объемом полного адъюванта Фрейнда до получения эмуль-

сии, для второй иммунизации суспензию KLN-конъюгата смешивали с равным объемом неполного адъюванта Фрейнда. Кровь отбирали из ушной вены на 14-е сутки после второго введения препаратов. Приготовленные сыворотки хранили при температуре –20°C.

Конъюгат пептида (1-17) с овалбумином (OVA) получали как описано в работе [17]. К 1 мг пептида добавили 2 мл водного раствора, содержащего 0.5 мл OVA. В течение 1 ч при перемешивании добавляли 50 мкл 0.2% раствора 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида в PBS. Полученный раствор перемешивали 15 ч и диализовали против PBS в течение 20 ч.

Титр противопептидных антител определяли с помощью твердофазного ИФА как описано в работе [18]. На планшет наносили конъюгат пептида (1-17) с OVA либо Aβ(1-40) в объеме 0.1 мл на лунку в концентрации 30 мкг/мл в расчете на пептид. За титр антител принимали значения наибольшего разведения сыворотки или антител, дающего окрашивание более 0.1 OЕ₄₉₂ и превышающего поглощение контрольных антител в 3 раза. В качестве контроля при определении титров противопептидных сывороток использовали преимунные сыворотки кроликов. При исследовании аффинно очищенных антител в качестве контроля использовали очищенные иммуноглобулины кролика.

Для получения аффинного сорбента с иммобилизованным (1-17)-пептидом 1 г CNBr-активированной сефарозы 4В суспендировали в 6 мл 1 mM HCl в течение 15 мин до образования прозрачного геля и промывали 1 mM HCl (5 × 10 мл). Пептид (2.8 мг) растворяли в 4 мл конденсирующего буфера (0.1 M NaHCO₃, 0.1 M NaCl, pH 8.0), добавляли к сефарозе и при периодическом перемешивании оставляли на 1 ч при 20°C. После промывки конденсирующим буфером (5 × 3 мл) к сефарозе добавляли блокирующий буфер (0.2 M Gly, 0.1 M NaCl, pH 8.0) и выдерживали в течение 2 ч. Затем сефарозу промывали поочередно ацетатным (0.1 M NaOAc, 0.1 M NaCl, pH 4.0) и боратным буферами (0.1 M Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 0.1 M NaCl, pH 8.1) (5 × 10 мл).

Аффинная хроматография противопептидных сывороток. При проведении аффинной хроматографии 2 мл сыворотки наносили на колонку с 3.5 мл аффинного носителя, промытую PBS₁ (0.15 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄, pH 7.4), и инкубировали при комнатной температуре в течение 40–60 мин. Затем колонку промывали 35 мл PBS₁ и 35 мл элюирующего буфера (0.2 M раствор глицина в 0.1 M NaCl, pH 2.5). В отобранных фракциях элюата значения pH доводили до 6.5–8.0 с помощью 1 M Tris, pH 10. Содержание белка определяли спектрофотометрически, измеряя OЕ₂₈₀ и исходя

из того, что оптическое поглощение раствора IgG с концентрацией 1 мг/мл равно 1.4 OE_{280} .

Электрофорез в ПААГ и иммуноблот

Приготовление образцов. 0.12 мМ раствор Аβ(1-40) в 200 мМ Tris-HCl, 200 мМ NaCl (pH 7.4) инкубировали 48 ч при 37°C либо использовали без инкубации. Для электрофореза образцы готовили стандартным образом по методу Леммли [19].

Электрофорез проводили на пластинках ПААГ (20% акриламида в разделяющем геле; 5% — в концентрирующем) в денатурирующих условиях при постоянной силе тока 10 мА/гель [19].

Электроперенос осуществляли на нитроцеллюлозные мембраны Immobilon-NC при 20°C и постоянной силе тока 400 мА в 0.025 М натрий-бикарбонатном буфере, pH 9.0, содержащем 20% метанола и 0.1% SDS, в течение 1 ч. Для иммуноокрашивания мембраны инкубировали в течение 10 ч с антителами к пептиду (1-17) в разведении 1 : 200 при 4°C. Затем мембраны обрабатывали овечьими антителами против суммарных иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma, Aldrich, USA), в разведении 1 : 1500. Для окрашивания белковых полос к мембранам добавляли 25 мл раствора 50 мМ Tris-HCl (pH 7.6), содержащего 12.5 мг диаминобензидина и 30 мкл 50% раствора перекиси водорода. Проявляли в течение 5–10 мин в темноте.

Определение олигомеризации Аβ(1-40) с помощью тиафлавина Т. Синтетический Аβ(1-40) растворяли в DMSO из расчета 1 мг пептида в 0.05 мл DMSO. К 10 мкл раствора Аβ(1-40) в DMSO добавляли при перемешивании 1500 мкл буфера (20 мМ Tris-Cl, 100 мМ NaCl, pH 7.4) и вносили по 75 мкл этого раствора в лунки планшета немедленно после приготовления раствора, а также через 1 ч, 2 ч 30 мин, 4 и 6 ч инкубации при 37°C. В эти же лунки вносили по 25 мкл 50 мкМ тиафлавина Т (Sigma) в том же буфере. Итоговая концентрация бета-амилоида составила 25 мкМ, ThT — 12.5 мкМ. Флуоресценцию образцов измеряли при $\lambda_{возб} = 450$ нм, $\lambda_{исп} = 486$ нм с помощью планшетного ридера Clariostar (BMG LABTECH).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 19-04-00624.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haass C., Selkoe D.J. // Cell. 1993. V. 75. P. 1039–1042.
2. Glenner G.G., Wong C.W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. V. 425. P. 534–539 (reprinted from Biochemical and Biophysical Research Communications. 1984. V. 120. P. 885–890).
3. Selkoe D.J., Hardy J. // EMBO Mol. Med. 2016. V. 8. P. 595–608.
4. O'Brien R.J., Wong P.C. // Annu. Rev. Neurosci. 2011. V. 34. P. 185–204.
5. Gandy S., Simon A.J., Steele J.W., Lublin A.L., Lah J.J., Walker L.C., Levey A.I., Krafft G.A., Levy E., Checler F., Glabe C., Bilker W., Abel T., Schmeidler J., Ehrlich M.E. // Ann. Neurol. 2010. V. 68. P. 220–230.
6. Kaye R., Lasagna-Reeves C.A. // J. Alzheimers Dis. 2013. V. 33 (Suppl. 1). P. S67–S78.
7. Choi J.W., Kim H.Y., Jeon M., Kim D.J., Kim Y. // Amyloid. 2012. V. 19. P. 133–137.
8. Tickler A.K., Barrow C.J., Wade J.D. // J. Pept. Sci. 2001. V. 7. P. 488–494.
9. Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Бушнев В.Н. // Биоорг. химия. 1997. Т. 23. С. 46–55. [M.V. Sidorova, A.S. Molokoedov, M.V. Ovchinnikov, Zh.D. Bespalova, V.N. Bushnev // Russ. J. Bioorgan. Chem. 1997. V. 23. P. 41–50].
10. Crescenzi O., Tomaselli S., Guerrini R., Salvadori S., D'Ursi A.M., Temussi P.A., Picone D. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 5642–5648.
11. Condron M.M., Monien B.H., Bitan G. // Open Biotechnol. J. 2008. V. 2. P. 87–93.
12. Kok W.M., Scanlon D.B., Karas J.A., Miles L.A., Tew D.J., Parker M.W., Barnham K.J., Hutton C.A. // Chem. Commun. (Camb). 2009. V. 41. P. 6228–6230.
13. Kreuzer A.G., Yoo S., Spencer R.K., Nowick J.S. // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 966–975.
14. Benilova I., Karran E., De Strooper B. // Nat. Neurosci. 2012. V. 15. P. 349–357.
15. Itkin A., Dupres V., Dufrene Y.F., Bechinger B., Ruysschaert J.-M., Raussens V. // PLoS One. 2011. V. 6 (3). e18250.
16. Xue C., Lin T.Y., Chang D., Guo Z. // R. Soc. Open Sci. 2017. V. 4 (1):160696.
17. Pfaff E., Mussgay M., Böhm H.O., Schulz G.E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869–874.
18. Ахидова Е.В., Волкова Т.Д., Короев Д.О., Ким Я.С., Филатова М.П., Владимировна Н.М., Кармакова Т.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Вольпина О.М. // Биоорг. химия. 2010. Т. 36. № 2. С. 178–186. [Akhidova E.V., Volkova T.D., Koroev D.O., Kim Ya.S., Filatova M.P., Vladimirova N.M., Karmakova T.A., Zavalishina L.E., Andreeva Yu.Yu., Vol'pina O.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. № 2. P. 164–171].
19. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

Optimization of Solid-Phase Synthesis of Beta-Amyloid (1-40) and Obtaining Antibodies Revealing It under Immunoblot Conditions

**T. D. Volkova*^{*,#}, D. O. Koroev*, A. V. Kamynina*, M. P. Filatova*,
A. V. Avetisyan**^{*}, and O. M. Volpina***

[#] Phone: +7 (495) 336-57-77; e-mail: tdvol@mx.ibch.ru

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, GSP-7, Moscow, 117997 Russia*

***Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU,
ul. Leninskie Gory 1, str. 40, Moscow, 119234 Russia*

The method of solid-phase synthesis and purification of human beta-amyloid sequence (1-40) allowing to obtain a product with a high yield and homogeneity more than 95%, has been optimized. The received synthetic peptide is capable to form oligomers, which was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis with subsequent immunoblot and fluorescence spectrophotometry using thioflavin T dye. An accessible method allowing to obtain highly specific anti-beta-amyloid antibodies able to recognize both monomeric and oligomeric forms of the beta-amyloid peptide (1-40) under immunoblot conditions, has been offered.

Keywords: beta-amyloid, synthetic peptides, antipeptide antibodies, oligomers



ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ, ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И СООТНОШЕНИЕ СТРУКТУРА– АКТИВНОСТЬ *N*-(2,3-ДИГИДРО-1,4-БЕНЗОДИОКСИН-6-ИЛ)-4-НИТРО- *N*-(ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗИЛ)БЕНЗЕНСУЛЬФОАМИДОВ¹

© 2020 Muhammad A. Abbasi*^{*,#}, M. Irshad**^{**}, Aziz-ur-Rehman*^{*},
Sabahat Z. Siddiqui*^{*}, Syed A. Ali Shah***^{***}, and M. Shahid****^{****}

*Department of Chemistry, Government College University, Lahore, 54000 Pakistan

**Division of Science and Technology, University of Education, Township Campus, Lahore, 54770 Pakistan

***Faculty of Pharmacy and Atta-ur-Rahman Institute for Natural Products Discovery (AuRIns), Universiti Teknologi MARA, Puncak Alam Campus, Bandar Puncak Alam, Selangor Darul Ehsan, 42300 Malaysia

****Department of Biochemistry, University of Agriculture, Faisalabad, 38040 Pakistan

Поступила в редакцию 29.05.2019 г.

После доработки 23.07.2019 г.

Принята к публикации 02.10.2019 г.

Получены новые соединения с антибактериальной активностью, которые в своей структуре сочетают сульфонамидный и бензодиоксанный фрагменты. Структуры полученных производных сульфонамида определены методами ИК, ¹H и ¹³C ЯМР, а также масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. Потенциальная антибактериальная активность соединений подтверждена методом ингибирования роста бактериальной биопленки *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Результаты показывают, что два из полученных соединений являются достаточно активными ингибиторами этих двух патогенных штаммов. Согласно данным исследования гемолитической активности, большинство из полученных молекул умеренно цитотоксичны и таким образом могут быть использованы как безопасные антибактериальные препараты.

Ключевые слова: 1,4-benzodioxine, 4-nitrobenzenesulfonamide, benzyl halides, spectral analysis, biofilm inhibition, cytotoxicity

DOI: 10.31857/S0132342320020037

¹ Полный текст статьи печатается в английской версии журнала.

[#] Автор для связи: (тел.: +92-42-111-000-010; эл. почта: abbasi@gcu.edu.pk).



ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НОВЫХ ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУРОДИГИДРОХИНОЛИНА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ФОТОТЕРАПИИ ПСОРИАЗА

© 2020 г. Е. Н. Ходот*, А. Б. Шевелев**, ***, А. В. Шибаета**,
М. С. Смирнова***, #, Н. В. Позднякова****, О. О. Рябая****, Е. С. Богданова***,
М. А. Гусева***, В. А. Волнухин*****, В. А. Кузьмин**

*Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН,
Россия, 119991, Москва, Ленинский пр., 47

**Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН,
Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

***Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 117971, Москва, ул. Губкина, 3

****Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина,
Россия, 115478, Москва, Каширское ш., 24

*****Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения
города Москвы,
Россия, 119071, Москва, Ленинский пр., 17

Поступила в редакцию 20.09.2019 г.

После доработки 31.10.2019 г.

Принята к публикации 14.11.2019 г.

Ранее нами был предложен способ синтеза триметилзамещенного фуродигидрохинолина (ФДГХ) – нового потенциального фотосенсибилизатора для лечения псориаза методом фотохимиотерапии (ФХТ). Предполагалось, что ФДГХ способен заменить используемые в настоящее время производные псораленов: 8-метоксипсорален (8-МОП), 5-метоксипсорален (5-МОР) и триметилпсорален (ТМП). Преимуществом ФДГХ перед псораленами является его большая безопасность для больного. Однако практическое применение ФДГХ оказалось невозможным в связи с недостаточной растворимостью его в разрешенных к клиническому применению растворителях. Для решения этой проблемы был выполнен синтез шести ранее неизвестных производных ФДГХ с боковыми заместителями в 5 положении бензольного ядра, повышающими растворимость соединения: с карбаматной, ацетамидной и сульфогруппами: N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуоро[3,2-h]хинолин-5-ил)ацетамид (W); трет-бутил (6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуоро[3,2-h]хинолин-5-ил)карбамат (K); трет-бутил ацетил (6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуоро[3,2-h]хинолин-5-ил)-карбамат (WK); N-метил-N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуоро[3,2-h]хинолин-5-ил) ацетамид (WC1); N-октил-N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуоро[3,2-h]хинолин-5-ил) ацетамид (WC8); ацетил (6,8,8-триметил 8,9-дигидрофуоро[3,2-h]хинолин-5-ил сульфамат натрия (S). Полученные на клеточных моделях Т-клеточного лимфолейкоза (Jurkat), В-клеточной лимфомы (Raji) и иммортализованных фибробластах человека данные показали наличие оптимальных фотосенсибилизирующих свойств у соединения S. По соотношению темновой и световой токсичности (облучение светом UVB диапазона с длиной волны 302 нм) на модельных линиях оно может рассматриваться в качестве кандидата на создание нового эффективного и безопасного соединения для фототерапии псориаза.

Ключевые слова: фуродигидрохинолин, ФДГХ, фотосенсибилизатор, терапия, псориаз, фототоксичность, Jurkat, Raji

DOI: 10.31857/S0132342320020116

ВВЕДЕНИЕ

Псориаз представляет собой системное хроническое заболевание, встречающееся примерно у 2% представителей населения Земли [1]. Наибо-

лее распространенной формой заболевания является обыкновенный (вульгарный) псориаз, на долю которого приходится 85–90% всех выявленных случаев [2].

Заболевание имеет системный характер: поражается не только кожа, но и суставы. Поражение

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

кожи при псориазе характеризуется появлением очагов воспаления и гиперплазии эпидермиса. Одним из характерных патоморфологических признаков поражения кожи при обыкновенном псориазе является инфильтрация дермы лимфоцитами и нейтрофилами [3].

Предполагается, что в формировании псориазных высыпаний принимают участие кератиноциты, дендритные клетки, моноциты (макрофаги), нейтрофилы, тучные клетки и Т-лимфоциты типа Th-17 и Th-1 [4]. Псориаз нередко рассматривают в качестве аутоиммунного заболевания, индуктором которого служит перенесенная бактериальная инфекция. При этом в качестве кандидатных аутоантигенов называют антибактериальные пептиды кателицидин (LL37), β -дефензины (hBD2 и hBD3), а также лизоцим, экспрессируемые лимфоцитами типа Th-17 (ключевой компонент антибактериального ответа на прорыв бактериальных патогенов через базальную мембрану), а в качестве ключевого сигнального фактора – IL-22, представляющий собой один из основных регуляторов местного ответа на бактериальную инфекцию [5]. Показано, что стимуляция дендритных клеток больших псориазом катионными антибактериальными пептидами LL37, hBD2 и hBD3 в культуре повышает уровень экспрессии в них рецептора TLR9, что делает их более чувствительными к активации внеклеточной ДНК.

В работе [6] приводятся данные, полученные на модели трансгенных мышей, экспрессирующих ген фактора роста TGF- β 1 человека, который в норме характерен исключительно для дермы. У этих животных наблюдаются поражения кожи, сходные с симптомами псориаза у человека. В частности, у них образуются субэпидермальные скопления лимфоцитов типа Th-17. Авторы высказывают гипотезу о том, что TGF- β 1, в краткосрочных экспериментах проявляющий противовоспалительную активность, при длительном воздействии на лимфоциты типа Treg (ответающие за поддержание иммунологической толерантности в отношении собственных антигенов) способен индуцировать их трансформацию в лимфоциты типа Th-17. Этот факт убедительно доказывает важную роль TGF- β 1 в развитии псориаза. Авторы рассматривают также важную роль в развитии псориаза таких цитокинов, как IL-23 (продуцируется дендритными клетками миелоидного ряда), IL-17 и IL-22 (продукты лимфоцитов типа Th-17), IL-12, IFN- γ и TNF- α (продукты лимфоцитов типа Th-1).

Хотя псориаз считается заболеванием, опосредованным Т-клетками, некоторые авторы ставили вопрос о роли В-клеток в индукции этого заболевания. Авторы [7] сообщают о более высоком уровне В-клеток с фенотипом CD19⁺ в периферической крови пациентов с псориазом, по сравнению с пациентами без патологии. Более того, доля таких клеток положительно коррелировала с

тяжестью заболевания. Однако, в исследовании, опубликованном в 2018 г. Томасом и др., сделан вывод, что повышение доли В-клеток в циркуляции является лишь эпифеноменом, который не должен рассматриваться в качестве этиотропного фактора развития псориаза [8].

Интересно, что ряд исследований показывает ключевую роль фибробластов кожи в инициации эпидермальных аномалий, наблюдаемых при псориазных поражениях [9, 10]. Так в работе [10] описывается роль фибробластов в дифференцировке кератиноцитов. На различных экспериментальных моделях показано, что фибробласты из пораженных псориазными бляшками участков кожи, а в меньшей мере, фибробласты из непораженных участков кожи от пациентов с псориазом выделяют растворимый фактор, способствующий гиперплазии и гиперпродукции кератина кератиноцитами, повышению в них уровня экспрессии фактора внутриклеточного фактора STAT3 [10]. Кроме того, было обнаружено снижение активности cAMP-зависимой протеинкиназы [11, 12] и повышение активности супероксиддисмутазы (SOD) в фибробластах пациентов с псориазом, по сравнению с фибробластами здоровых доноров [13].

Одним из широко распространенных методов лечения псориаза является ФХТ (синоним PUVA-терапия – сокращение от “psoralen – ultraviolet A”), основанная на сочетанном использовании псораленовых фотосенсибилизаторов длинноволнового ультрафиолетового излучения (UVA) с длиной волны 320–400 нм. Реже псораленовые фотосенсибилизаторы сочетают с облучением кожи средневолновым ультрафиолетовым излучением (UVB) [14]. Помимо псориаза ФХТ применяется для лечения таких заболеваний кожи, как витилиго, склеродермия, грибковидный микоз, красный плоский лишай, реакция “трансплантат против хозяина” и др. [15]. Псоралены применяются перорально, местно путем нанесения на пораженные участки кожи крема или спиртового раствора, а также в виде ванн с водным раствором. Облучению могут подвергаться либо отдельные области тела, либо весь кожный покров. Используется также принцип фотофереза, представляющего собой экстракорпоральное облучение полученной от больного лейкоцези (после предварительного введения псораленового фотосенсибилизирующего препарата) с последующим ее возвратом в кровотока.

Псоралены впервые были обнаружены в растениях, в частности в *Ammi majus* L. (Ariaceae). В настоящее время в фармакопею входят псораленосодержащие лекарственные средства как растительного (например, препарат Аммифурин производства ЗАО Фармцентр ВИЛАР), так и синтетического происхождения (препараты Оксорален и Меланоцил, Franco-Indian Pharmaceuticals Pvt Ltd).

Псоралены представляют собой линейные трициклические ароматические соединения класса

кумаринов, состоящие из фуранового пятичленного цикла, конденсированного с кумариновым бициклом, содержащим гетероатомы азота и кислорода. Основными псораленами, используемыми в настоящее время в клинической практике, являются 8-метоксипсорален (8-МОР), 5-метоксипсорален (5-МОР) и 4,5',8-триметилпсорален (ТМР) [16].

В ряде исследований установлено подавление пролиферации кератиноцитов и лимфоцитов периферической крови у больных, подвергавшихся облучению UVA после сенсibilизации 8-МОР [17–19].

В работе [18] показали, что ФХТ уменьшает инфильтрацию кожи иммунными клетками, в том числе Т-клеток, несущих рецептор IL-2 (CD25). Сайто и соавт. [20] утверждают, что ФХТ применением 8-МОР в виде погружения в ванну с 0.0001% водным раствором вещества вызывает массивный выход из лимфоузлов в кровотоки лимфоцитов типа Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. При этом при умеренных (но не максимальных) дозах облучения наблюдалось повышение доли активированных лимфоцитов Treg, несущих поверхностный маркер CTLA4, при одновременном уменьшении доли наивных лимфоцитов Treg с фенотипом CD45RA. В работах [6] и [14] на мышиной модели и при испытаниях на пациентах показано, что PUVA-терапия снижает долю лимфоцитов Th-17 в периферической крови.

Кроме того, было показано, что клетки перемещаемой линии лимфобластной лимфомы в результате облучения в присутствии псоралена погибли преимущественно за счет апоптоза [21]. Сходные результаты были получены на линии клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60: сочетанное воздействие псораленов и UVA-излучения индуцировало апоптоз клеток, в частности, вызывало активацию каспазы-3 [22]. В погибающих клетках наблюдался высокий уровень продукции ROS и продуктов окисления кардиолипина [23].

В последнее время опубликован ряд данных, доказывающих, что ФХТ с использованием фурукумаринов приводит к возникновению опасных побочных эффектов: индукции плоскоклеточного и базальноклеточного рака кожи. Этот механизм обусловлен фотогенотоксичностью. С биохимической точки зрения существование фотогенотоксичности обусловлено наличием в молекулах псораленов двух независимых фотоактивных центров, ответственных за образование кросс-сшивок между комплементарными цепями ДНК, а также конъюгатов ДНК с белками под действием UVA [16, 24]. Предпринятые рядом групп попытки поиска соединений, способных подобно псораленам избирательно вызывать гибель Т-лимфоцитов кожи, но не обладающих фотогенотоксичностью, привели к обнаружению таких свойств у производных фурухинолона. По строению они напоминают фурукумарины, но

имеют в первом положении амидный атом азота вместо сложноэфирного кислорода. Испытания показали, что фурухинолоны незначительно отличаются от псораленов по механизму фотоиндуцированного действия: использование их в качестве фотосенсибилизаторов *in vivo* приводит к образованию конъюгатов белков с ДНК с ненулевой длиной линкера (DPC). Ввиду этого по показателям фотогенотоксичности они в 3–5 раз менее опасны для пациента, чем псоралены [16]. Кроме того, все известные фурухинолоны, в отличие от псораленов, отличаются высокой гидрофобностью, препятствующей их проникновению в очаги псориазического поражения кожи.

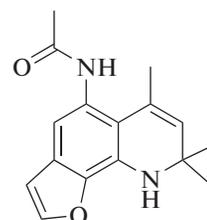
К соединениям, наиболее близким по строению к фурухинолонам, можно отнести фурудигидрохинолины (ФДГХ). В ходе изучения возможности использования фурудигидрохинолинов в качестве фотосенсибилизаторов в работе [25] впервые был разработан принцип получения производных фурудигидрохинолина, позволивший осуществить синтез 7,7,9-триметил-6,7-дигидрофуру[3,2-*h*]хинолина (ФДГХ-1). Предложенный принцип заключается в конденсации аминоксифурана с ацетоном в присутствии кислот Льюиса и H⁺ кислот, при температуре 105–120°C. Описанный в этой работе способ синтеза ФДГХ-1 является прототипным: именно он использован в настоящей работе для получения новых производных ФДГХ-1.

Поскольку терапевтическая активность и псораленов, и ФДГХ-1 обусловлена генерацией активных форм кислорода, вызывающих гибель лимфоцитов в коже, мы поставили цель провести сравнение световой и темновой токсичности вновь созданных производных на модели Т-клеточного лимфобластного лейкоза человека – линия Jurkat (ATCC – TIB-152), В-клеточного лейкоза человека – линия Raji (ATCC – CCL-86) и иммортализованной линии фибробластов человека hFB-hTERT6, сопоставив ее с аналогичными эффектами 8-МОР. Кроме того, была поставлена задача по оценке растворимости синтезированных соединений в воде, как наиболее доступном и безопасном растворителе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

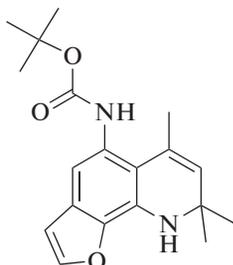
Методы синтеза и очистки производных ФДГХ-1

*Получение N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуру[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамида (W)*



Растворяли *N*-(7-амино-1-бензофуран-4-ил)ацетамида (3.8 г, 20 ммоль) в 30 мл сухого ацетона. К раствору прибавляли 1.0 г (2 ммоль) трифлата скандия и кипятили при перемешивании в течение 8 часов. Контролировали ход реакции методом ТСХ (силикагель sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, этилацетат). Растворитель отгоняли при пониженном давлении. Продукт очищали методом колоночной хроматографии (силикагель, элюент — этилацетат). Выход продукта после перекристаллизации из этилацетата составил 1.48 г (выход 27.4%).

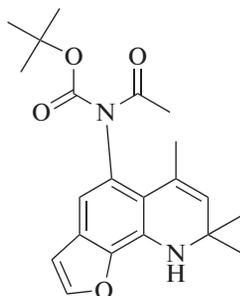
*Получение трет-бутил (6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)карбамата (К)*



К раствору трет-бутил ацетил (6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)-карбамата (3.17 г, 8.56 ммоль) в 64 мл ацетонитрила прибавили 0.85 г 100% гидразин гидрата при комнатной температуре и перемешивали при 50°C. Когда ТСХ (петролейный эфир : этилацетат/3 : 1) показала отсутствие исходного, растворитель отогнали при пониженном давлении. Остаток обработали метиленхлоридом (60 мл) и промыли водой (3 × 20). Органический слой сушили над сульфатом магния. Растворитель отогнали при пониженном давлении.

Остаток перекристаллизовывали из петролейного эфира. Получили 2.1 г (выход 75%). Т пл. 125°C.

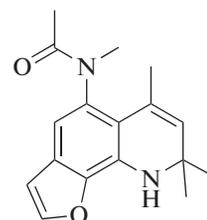
*Получение трет-бутил ацетил (6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)-карбамата (WK)*



Смесь 5.00 г (18.5 ммоль) *N*-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамида, 8.08 г Вос2 и 190 мг ДМАР в 250 мл метиленхлорида перемешивали при кипячении под аргоном 12 ч. Растворитель отгоняли при пониженном давлении, остаток обрабатывали петролейным

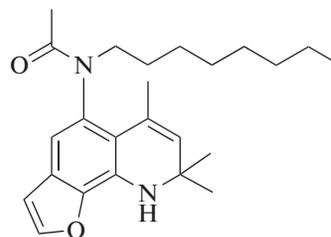
эфиром. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали петролейным эфиром. Получили 6.37 г (выход 93%). Т пл. 128°C.

*Получение N-метил-N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамида (WC1)*



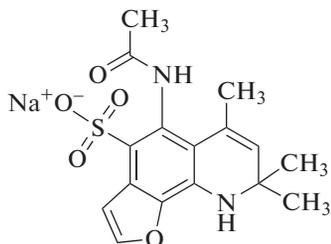
К раствору *N*-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамида (0.54 г, 2 ммоль) в 6 мл сухого ДМФА прибавляли 0.08 г 60% (0.02 моль) гидрида натрия после окончания выделения водорода смесь перемешивали еще 3 ч. К полученной Na соли прикапывали раствор метил иодида (0.284 г, 0.125 мл) в 3 мл метиленхлорида. Смесь перемешивали 25 ч, затем выливали в 30 мл воды, и экстрагировали этилацетатом. Экстракт трехкратно промывали 10 мл воды, высушивали под вакуумом над сульфатом магния. После отгонки растворителя, Остаток вакуумировали при 70°C/1 мм.рт.ст. Получили 0.48 г (выход 84.5%). Т пл. 152–153°C.

*Получение N-октил-N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамид (WC8)*



К раствору *N*-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамида (0.54 г, 2 ммоль) в 5 мл сухого ДМФА прибавляли 0.09 г 60% (1 ммоль) гидрида натрия после окончания выделения водорода смесь перемешивали еще 3 ч. К полученной Na соли прикапывали раствор 1-бром-октана (0.4 г, 2 ммоль) в 2 мл метиленхлорида. Смесь перемешивали 52 ч при комнатной температуре, затем выливали в 30 мл воды и экстрагировали петролейным эфиром, 20 мл. Экстракт промывали водой. Органический слой сушили над сульфатом магния. Растворитель отгоняли при пониженном давлении. В остатке легка желтое густое масло, которое чистили методом КЖХ на силикагеле. Элюент петролейный эфир : этилацетат 2 : 1. Остаток вакуумировали при 70°C/1 мм.рт.ст. Получили 0.68 г (выход 88.9%).

Получение ацетил (6,8,8-триметил 8,9-дигидрофуоро[3,2-*h*]хинолин-5-ил сульфамата натрия (S)



К смеси N-(6,8,8-триметил-8,9-дигидрофуоро[3,2-*h*]хинолин-5-ил)ацетамида [2] (2.70 г, 10 ммоль) и пиридина (0.8 мл, 10 ммоль) под аргоном, в 50 мл дихлорэтана, при 0°C прибавляли хлорсульфовую кислоту (1.17 г, 10 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре 24 часа, затем обрабатывали 30 мл воды. Водный слой промывали метилхлоридом и нейтрализовали бикарбонатом натрия до нейтральной реакции. Полученный раствор отфильтровывали, воду отгоняли при пониженном давлении. Остаток троекратно промывали 20 мл теплого этанола, высушивали в вакууме. Получили 1.2 г (выход 32%).

Подтверждение структуры производных ФДГХ-1 с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса

Спектры ЯМР были зарегистрированы на приборе Bruker AM 300. Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 В) или отрицательных (напряжение на капилляре 3200 В) ионах. Диапазон сканирования масс – m/z от 50 до 3000 Да, калибровка – внешняя или внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, Fluka). Использовался шприцевой ввод вещества для растворов в ацетонитриле, метаноле или воде, скорость потока – 3 мкл/мин. Газ-распылитель – азот (4 л/мин), температура интерфейса – 180°C.

W

Элементный анализ: обнаружено С (71.15%), Н (6.92%), N (10.24%). Вычислено С (71.09%), Н (6.71%), N (10.36%).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- D_6) δ , ppm 1.24 (s, ^6H), 1.97 (s, ^3H), 2.03 (s, ^3H), 5.24 (s, ^1H), 6.04 (s, ^1H), 6.59 (s, ^1H), 6.78 (d, $J = 2.4$ Hz, ^1H), 7.89 (d, $J = 2.6$, ^1H), 9.38 (s, ^1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (500 MHz, DMSO- D_6) δ , ppm 168.33, 145.65, 140.83, 130.43, 129.76, 129.45, 128.18, 126.07, 113.43, 107.03, 49.94, 29.05, 23.11, 21.60.

Масс-спектр $[\text{M} + \text{H}^+]$ 271 (ESI).

К

Элементный анализ: найдено С (69.49%) Н (7.37%) N (8.53%).

Вычислено С (69.61%), Н (7.46%), N (8.38%).

$^1\text{HNMR}$ (300 МГц, d_6 -DMCO) δ ppm 1.25 (s ^6H), 1.42 (ws 9H), 2.05 (s ^3H), 5.24 (s ^1H), 6.00 (^1H), 6.54 (^1H), 6.78 (^1H), 7.89 (^1H), 8.47 (ws ^1H).

HRMS 329.1858 ($\text{M} + \text{H}^+$)/ z , 351.1679 ($\text{M} + \text{Na}^+$)/ z , 367.1414 ($\text{M} + \text{K}^+$)/ z .

WK

Элементный анализ: найдено С (68.09%) Н (7.07%) N (7.56%).

Вычислено С (68.11%), Н (7.12%), N (7.52%).

$^1\text{HNMR}$ (300 МГц, d_6 -DMCO) δ ppm 1.20 (s ^3H), 1.30 (s ^3H), 1.33 (s ^3H), 2.46 (s ^3H), 5.33 (^1H), 6.07 (s ^1H), 6.54 (s ^1H), 6.82 (s ^1H), 7.94 (s ^1H).

HRMS 370.1877 (M), 393.1783 ($\text{M} + \text{Na}^+$)/ z , 409.1524 ($\text{M} + \text{K}^+$)/ z .

WC1

Элементный анализ: найдено С (71.81%) Н (7.09%) N (9.85%).

Вычислено С (71.93%), Н (7.15%), N (9.72%).

$^1\text{H NMR}$ (300 МГц, d_6 -DMCO) δ ppm 1.21 (s ^3H), 1.28 (s ^3H), 1.72 (s ^3H), 1.86 (s ^3H), 3.09 (s ^3H), 5.39 (s ^1H), 6.28 (s ^1H), 6.71 (s ^1H), 6.84 (s ^1H), 7.97 (s ^1H).

HRMS 420.1157 ($\text{M} + \text{H}^+$)/ z , 442.0975 ($\text{M} + \text{Na}^+$)/ z .

WC8

Элементный анализ: найдено С (75.35%) Н (8.96%) N (7.32%).

Вычислено: С (75.28%), Н (9.07%), N (7.45%).

$^1\text{HNMR}$ (500 МГц, CDCl_3) δ ppm 0.87 ($J = 7.5$ Гц, ^3H), 1.25 (m, ^{13}H), 1.39 (s ^3H), 1.68 (m, ^2H), 1.92 (^3H), 2.00 (s ^3H), 2.77 (m ^1H), 4.24 (m ^1H), 4.41 (s ^1H), 5.43 (s, ^1H), 6.65 (s ^1H), 6.71 ($J = 2.05$ Гц), 7.61 ($J = 2.05$ Гц).

HRMS 383.2684 ($\text{M} + \text{H}^+$)/ z , 405.2500 ($\text{M} + \text{Na}^+$)/ z .

S

$^1\text{HNMR}$ (500 МГц, d_6 -DMCO) δ ppm 1.14 (s, ^3H), 1.36 (s, ^3H), 1.85 (s, ^3H), 1.99 (s, ^3H), 5.19 (s, ^1H), 6.21 (^1H), 7.22 ($J = 1.95$ Гц, ^1H), 7.81 (d, $J = 1.91$ Гц, ^1H), 9.61 (s, ^1H).

$^{13}\text{CNMR}$ (500 МГц, d_6 -DMCO) δ ppm 20.77, 23.90, 27.52, 29.53, 49.91, 109.09, 114.49, 121.15, 123.97, 127.81, 128.82, 129.53, 131.00, 139.49, 144.52, 168.68.

HRMS 373.0812 (M + Na⁺)/z, 395.0636 (M + 2Na⁺ – H⁺)/z, 411,0380 (M + K⁺)/z.

Работа с клеточными культурами

В качестве модельных объектов для исследования токсичности производных ФДГХ-1 при облучении UVA и в отсутствие облучения использовали опухолевые клеточные линии: Т-клеточного лимфобластного лейкоза – Jurkat (ATCC – TIB-152), В-клеточной лимфомы Беркитта – Raji (ATCC – CCL-86) и фибробласты кожи человека hFB-hTERT6.

Клеточные линии Jurkat (Т-клеточный лимфолейкоз) и Raji (В-клеточная лимфома Беркитта) были получены из Американской типовой коллекции тканей и клеток (ATCC) и предоставлены О.С. Буровой (ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России). Иммуортализованная линия фибробластов кожи человека hFB-hTERT6 была получена путем лентивирусной трансдукции генно-инженерной ДНК-конструкции, содержащей полноразмерный ген TERT под контролем промотора CMV. Линия hFB-hTERT6 сконструирована и любезно предоставлена Э.Б. Дашинимавым (институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2743981/>).

Клеточные линии Jurkat и Raji культивировали на среде RPMI-1640 (Gibco, США), а фибробласты кожи человека линии hFB-hTERT6 – в среде DMEM с содержанием глюкозы 4.5 г/л (Gibco, США). Во всех случаях в среды добавляли также 10% телячьей эмбриональной сыворотки (NuClone, США), 2 мМ L-глутамина (Sigma, США), 10 МЕ/мл пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня при 37°C в атмосфере с содержанием CO₂ 5%.

Для исследования использовали конечные концентрации соединений ФДГХ в культуральной среде: 1, 10, 100, 1000 мкМ. Определение цитотоксической активности препаратов осуществлялось колориметрическим методом с использованием МТТ-теста [26].

Опухолевые клетки и фибробласты в концентрации 5 × 10⁴ клеток/мл засеивали в 96-луночные стерильные плоскодонные планшеты для культуральных работ (Sarstedt, Германия). В качестве растворителя для приготовления стоковых растворов использовали ДМСО. Стоковые растворы тестируемых соединений с концентрацией 0.5 М вносили в количестве 1/100 объема, затем разводили с шагом в 10 раз и инкубировали 1 ч в CO₂ инкубаторе. Каждую концентрацию каждого препарата исследовали в трех независимых повторностях.

Один из планшетов подвергали облучению UVB светом, длиной волны 302 нм, в течение 10 мин с использованием трансиллюминатора TR-302 (Spectroline, США), имеющего в составе люминесцентные лампы и рассеивающий светофильтр. Источник света закрепляли в штативе над поверхностью бокса на таком расстоянии, чтобы доза облучения у дна планшета составляла 0.65 Дж/см². Выбор такой дозы обусловлен обеспечением выживаемости клеток наиболее чувствительной линии Jurkat не менее 80%. В качестве контроля использовали три лунки, в которых клетки облучали светом в отсутствие фотосенсибилизирующего препарата. В ходе облучения контролировали изменение температуры в лунках с помощью ртутного термометра с точностью измерения 0.1°C. Клетки инкубировали в той же среде, в которой проводилось облучение, в течение 72 часов после его окончания. Со вторым планшетом выполняли все те же операции, что и с первым, за исключением стадии облучения.

По окончании инкубации проводили оценку доли выживших клеток с помощью МТТ-теста по стандартной методике [26]. Долю выживших клеток определяли по формуле (среднее значение ОП в опыте/среднее значение ОП в контроле) × 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подтверждение структуры новых соединений

Структура всех соединений была подтверждена с использованием масс-спектрометрического анализа, ЯМР и методом инфракрасной спектроскопии.

Оценка растворимости производных ФДГХ с целью приготовления растворов для тестирования биологической активности

Было установлено, что все тестируемые производные ФДГХ обладают хорошей растворимостью в диметилсульфоксиде, благодаря чему удалось добиться полного растворения каждого из них при концентрации 0.5 М. Эти растворы использовались в качестве маточных для проведения испытаний темновой и фотоиндуцированной фототоксичности на клеточных культурах.

Путем разведения маточных растворов в воде было установлено, что при концентрации 10 мМ все соединения кроме S, имеющего сульфогруппу в своей структуре, частично или полностью выпадают в осадок. При концентрации 1 мМ все соединения сохраняли стабильность в растворе, что было подтверждено сопоставлением A₄₄₀ водных растворов соединений, имеющих номинальную концентрацию 1 и 0.1 мМ.

Таким образом, было установлено, что растворимость тестируемых соединений в водных рас-

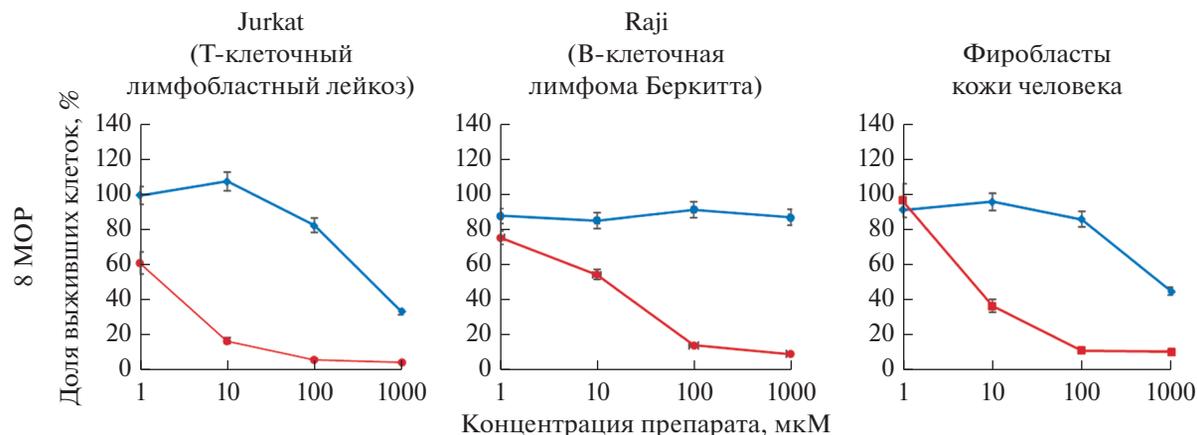


Рис. 1. Воздействие 8-МОР на клеточные линии. Синие кривые – доля выживших клеток в присутствии препарата без облучения (определение темновой токсичности), красные – доля выживших клеток после обработки препаратом и облучения UVB светом ($\lambda = 302$ нм) в течение 10 мин (определение световой токсичности).

творителях низка: единственным исключением является соединение S. Растворимость соединения S в воде превышает 0.5 М, что было подтверждено получением устойчивого раствора с этой концентрацией, A_{440} которого пропорционально снижалось при разведении раствора до концентрации 0.05 М.

Исследования темновой и фотоиндуцированной фототоксичности производных ФДГХ на клеточных культурах

В качестве клеточной модели использовались линии Т-клеточного лимфобластного лейкоза – Jurkat, В-клеточного лейкоза – Raji и иммортализованные фибробласты человека. Анализировалась как темновая токсичность препаратов, так и их фототоксический эффект после облучения светом длиной волны 302 нм в течение 10 минут. Поскольку температура среды может существенно влиять на жизнеспособность культивируемых клеток в стрессовых условиях и их физиологические реакции, в ходе облучения контролировали температуру в лунке планшета. До облучения она составляла $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$, после его окончания $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$, что не превышает допустимой физиологической нормы.

Эксперимент выявил наличие темновой токсичности 8-МОР в отношении клеток Т-клеточного лейкоза в диапазоне концентраций 100–1000 мкМ и фибробластов кожи – в концентрации 1000 мкМ. Клетки В-клеточного лейкоза были не чувствительны к 8-МОР даже при максимальной испытанной концентрации 1000 мкМ.

Ранее рядом авторов были опубликованы данные о гибели клеток лимфобластного лейкоза [21] и промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 [22] в результате облучения UVA в присутствии псоралена. Результаты МТТ-теста, полученные нами

на линии клеток Т-клеточного лейкоза при воздействии 8-МОР в сочетании с последующим облучением UVB светом (302 нм) (рис. 1), подтверждают сведения о высокой цитотоксической активности 8-МОР. Уже при концентрации 1 мкМ выживаемость клеток линии Jurkat составляла 62%, а при концентрациях 100 и 1000 мкМ в живых оставались только единичные клетки.

Чувствительность клеток Raji (В-клеточная лимфома Беркитта) к фотосенсибилизирующему действию 8-МОР оказалась значительно ниже, чем у клеток Jurkat. Выживаемость клеток Raji в отсутствии облучения оставалась неизменной при всех концентрациях псоралена, что говорит об отсутствии темнового токсического действия 8-МОР на клетки этого типа. При исследовании фотоиндуцированной токсичности IC_{50} 8-МОР для клеток Raji соответствовала концентрации псоралена 10 мкМ. При концентрации 100 мкМ в живых оставалось только 25% клеток.

Результаты, полученные на фибробластах кожи человека, качественно сходны с данными, полученными на клетках линии Jurkat, но выживаемость клеток была несколько выше, как в эксперименте с облучением, так и в отсутствие облучения.

Далее нами был проведен анализ результатов МТТ-теста, для всех соединений, производных ФДГХ-1 на тех же клеточных линиях. Выживаемость клеточных линий Jurkat, Raji и фибробластов кожи человека при воздействии соединений WK и WC1 как после облучения, так и в его отсутствие была одинаковой, что не позволяет рассматривать их как фотосенсибилизаторы. При этом при концентрации выше 100 мкМ оба соединения вызывают гибель всех исследуемых клеточных линий Jurkat и фибробластов человека. Клеточная линия Raji продемонстрировала устой-

чивость к соединению WK. Динамика гибели всех клеточных линий в зависимости от концентрации WC1 была сходной.

Близкие между собой значения темновой и световой токсичности были получены для соединений K и WC8. Для соединения K только при концентрации выше 100 мкМ доля выживших клеток после облучения оказалась значительно ниже доли выживших клеток в отсутствии облучения. В линейке производных ФДГХ наиболее сильный цитотоксический эффект показало соединение WC8, но чувствительность к нему различных клеточных линий была неодинаковой. При концентрации WC8 10 мкМ после облучения UVB (302 нм) доля выживших клеток линии Jurkat составляла 37%, фибробластов кожи человека – 68%, цитотоксичность по отношению к Raji проявлялась только при концентрации WC8 >100 мкМ. При этом надо отметить, что доля выживших клеток после облучения с 8-МОР была ниже для всех анализируемых клеточных линий.

В отсутствии облучения в диапазоне концентраций 1–1000 мкМ соединения K и S не проявляли цитотоксического эффекта: при максимальной концентрации наблюдалась гибель не более 20% клеток. Это справедливо для всех анализируемых клеточных линий. Вместе с тем, соединение K даже после облучения вызывало гибель клеток Jurkat и фибробластов кожи человека только при концентрации выше 100 мкМ. Клетки линии Raji даже после облучения в присутствии соединения K демонстрировали выживаемость на уровне 70%.

Наиболее интересные результаты были получены при испытаниях фотоиндуцированной цитотоксичности соединения S. Как уже упоминалось, в отсутствие облучения наблюдалась совсем незначительная гибель клеток (или 100% выживаемость – в случае Raji). Вместе с тем, наблюдалась заметная гибель клеток Jurkat после сочетанного воздействия соединения S и облучения UVB светом: доля выживших клеток при концентрации 100 мкМ составляла ~30%. Сопоставимый цитотоксический эффект 8-МОР отмечался при концентрации менее 10 мкМ. Однако, в отсутствие облучения гибель клеток наблюдалась уже при концентрации 8-МОР 100 мкМ.

Чувствительность фибробластов кожи человека к сочетанному воздействию соединения S и UVB (302 нм) оказалась промежуточной по сравнению с линиями Jurkat и Raji: соединение S вызывало заметное снижение количества живых клеток лишь при концентрации фотосенсибилизатора >100 мкМ. Клетки Raji продемонстрировали полную устойчивость как к темновому, так и к фотосенсибилизирующему действию соединения S.

Соединения K, WK и WC1 обладали выраженной темновой токсичностью для фибробластов кожи человека при концентрации 1000 мкМ, а со-

единение WC8 – при концентрации 100 мкМ и 1000 мкМ. Однако, все эти четыре соединения не могут рассматриваться в качестве фотосенсибилизаторов, так как темновая цитотоксичность при облучении практически не увеличивалась по сравнению с контрольной группой, не получавшей облучения. Соединение W, в отличие от соединений K, WK, WC8 и WC1, не проявляло ни темновой цитотоксичности, ни фотосенсибилизирующей активности.

Самая низкая темновая токсичность среди всех испытанных соединений (не более 20% погибших клеток при концентрации 1000 мкМ) получена для соединения S. По этому показателю соединение S превосходило даже малотоксичное соединение W. Эффект фотосенсибилизации по отношению к клеточной линии Raji у соединения S не обнаружен, а по отношению к человеческим фибробластам и клеткам линии Jurkat он находился на сопоставимом уровне с другими производными ФДГХ.

Таким образом, согласно полученным нами данным, соединение S по фотосенсибилизирующей способности уступало 8-МОР. Однако, благодаря существенно меньшей темновой токсичности и безопасности для нелимфоидных клеток оно предположительно может быть использовано в клинической практике в более высоких дозировках, что позволит в конечном итоге добиваться более эффективного воздействия на Т-лимфоциты. Важным преимуществом соединения S над аналогами является его высокая растворимость в воде, что упрощает разработку лекарственной формы.

Проведенные эксперименты показали, что клетки линии Jurkat проявляли наибольшую чувствительность к 8-МОР и всем производным ФДГХ как без воздействия света, так и при облучении. Чувствительность фибробластов кожи человека к соединению S оказалась несколько выше, чем у клеток линии Jurkat. Клетки линии Raji продемонстрировали наименьшую чувствительность ко всем испытанным соединениям: ФДГХ S, WK и K, которые оказались безопасными для этих клеток даже в максимальных концентрациях.

В результате проведенных экспериментов разработан оригинальный высокоэффективный метод синтеза производных фуридогидрохинолина (ФДГХ), которые могут быть использованы в качестве фотосенсибилизирующих средств при проведении фотохимиотерапии псориаза. Выход синтеза соединений настолько высок, что они могут использоваться для проведения биологического тестирования без дополнительной очистки.

В отличие от существующих фотосенсибилизаторов с двумя фотоактивными центрами, традиционно применяемых для фотохимиотерапии псориаза (8-метоксипсорален, 5-метоксипсорала-

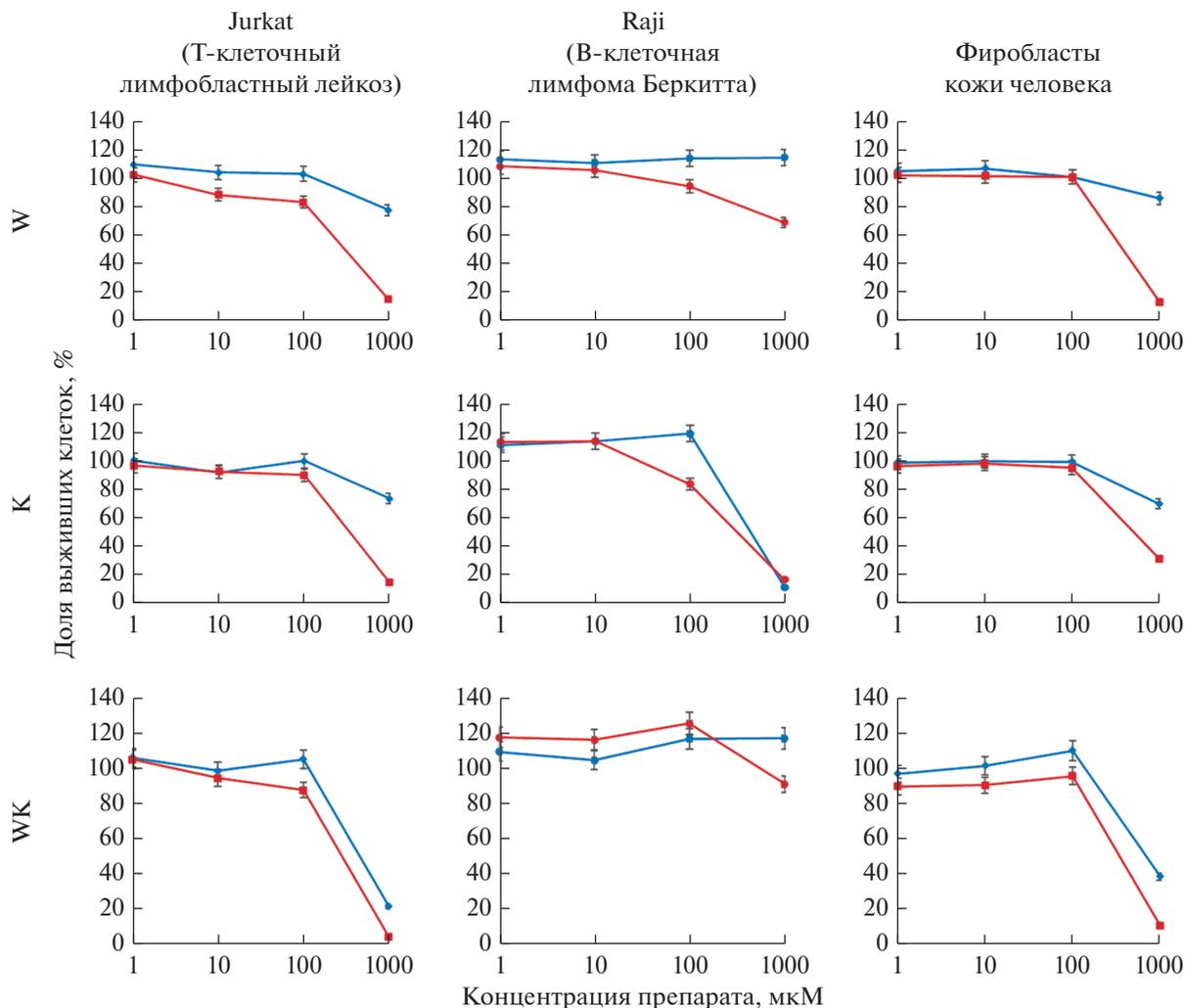


Рис. 2. Воздействие производных ФДГХ-1 на различные клеточные линии. Синие кривые – доля выживших клеток в присутствии препарата без облучения (определение темновой токсичности), красные – доля выживших клеток в присутствии препарата после десятиминутного облучения UVB светом ($\lambda = 302$ нм) (определение световой токсичности).

лен, триметоксипсорален), новые производные ФДГХ имеют один фотоактивный центр. Благодаря этому, при фотоактивации в комплексе с ДНК и белками они не способны вызывать образование кросс-сшивок цепей ДНК и конъюгатов белков друг с другом и ДНК, что позволяет ожидать у них полного отсутствия фотогенотоксичности.

Большинство полученных и испытанных производных ФДГХ: К, WK, WC1 и WC8 обладают темновой токсичностью в линии фибробластов кожи человека, что делает их потенциально опасными при использовании в качестве средств для фотохимиотерапии псориаза. Хотя применяемое в практике соединение 8-MOP, подобно К, WK, WC1 и WC8, также обладает выраженной темновой токсичностью, при достаточно низких концентрациях оно остается пригодным к терапевтическому применению благодаря своей высокой

фотосенсибилизирующей способности. Фотосенсибилизирующая способность соединений К, WK, WC1 и WC8 низка: цитотоксичность незначительно повышается при облучении UVB (302 нм). Соединение W существенно менее токсично, чем К, WK, WC1 и WC8, однако оно не обладает значительной фотосенсибилизирующей активностью, что не позволяет ожидать от него высокой эффективности в качестве средства для фотохимиотерапии псориаза.

Наиболее эффективным фотосенсибилизатором среди всех испытанных соединений оказалось соединение S. Оно обладает наименьшей темновой токсичностью ко всем трем испытанным типам клеток, существенно превосходя по этому показателю 8-MOP. При этом соединение S имеет наибольшую среди всех испытанных соединений избирательность действия к Т-клеткам по сравнению с фибробластами кожи чело-

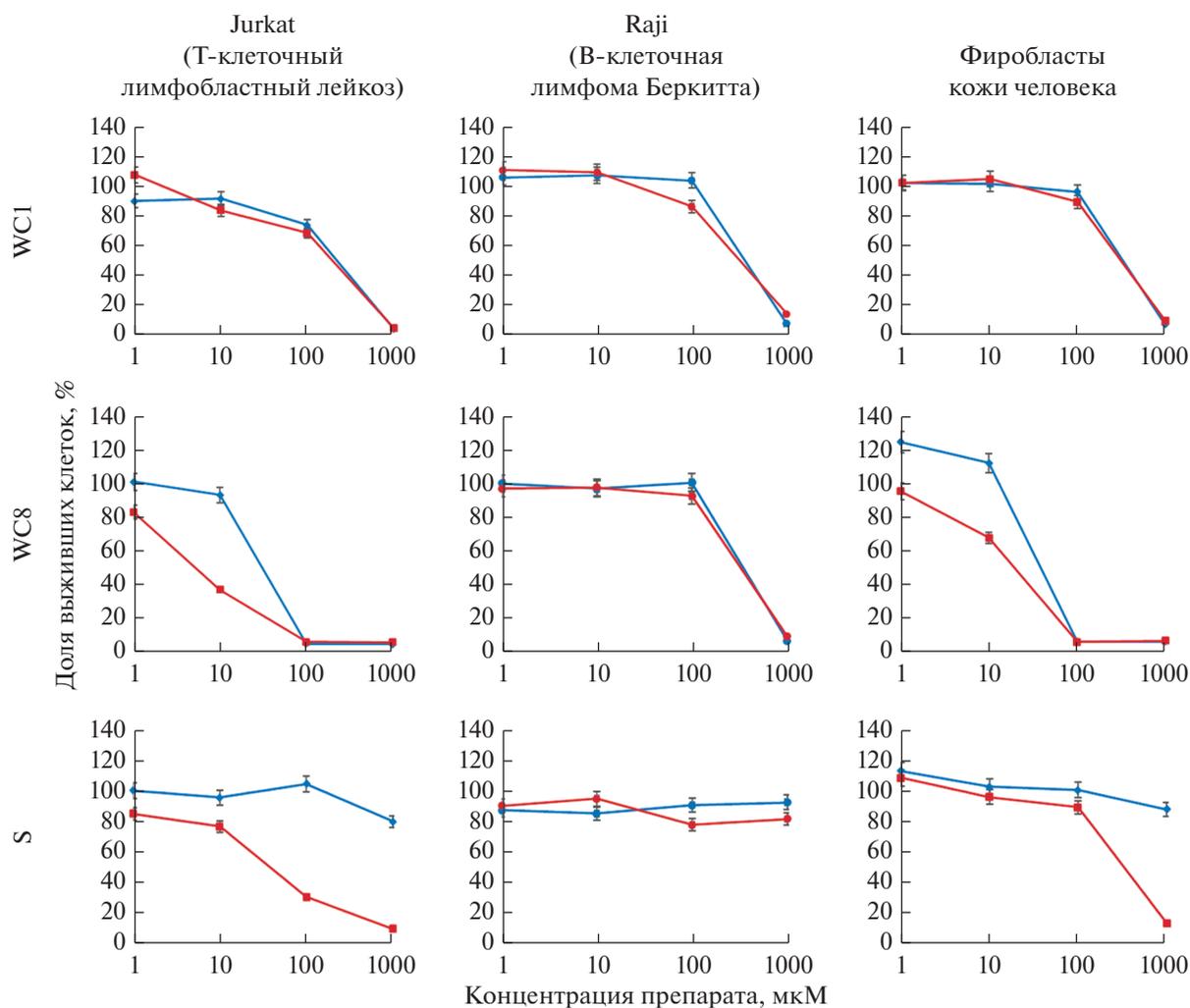


Рис. 2. Окончание

века: различие в IC_{50} составляет 15–20 раз (30 мкМ и 500 мкМ). Для сравнения, этот показатель для 8-MOP составляет всего 2–3 раза. Таким образом, можно ожидать, что соединение S будет безопаснее в применении в качестве средства для фотохимиотерапии псориаза, поскольку способно обеспечить гибель лимфоцитарных инфильтратов в дерме, не влияя на жизнеспособность кератиноцитов и фибробластов. Иными словами, терапевтический эффект будет заметен в случае применения дозы облучения кожи существенно ниже минимальной фототоксической. Следовательно, риск развития ожога кожи (эритемы) будет снижен.

Как для фурухинолонов, так и для большинства замещенных фуридогидрохинолинов характерна низкая растворимость в неполярных растворителях. Это не позволяет использовать их для создания готовых лекарственных форм фотосенсибилизирующих препаратов с применением фар-

мацевтически приемлемых растворителей: 10% водного диметилсульфоксида, 20% водного этанола или воды. Эта физико-химическая особенность практически не позволяет ввести их в клиническую практику. В связи с этим, практически важной особенностью соединения S является его высокая растворимость в воде.

Существенным различием избирательности фотосенсибилизирующего действия соединения S по сравнению с 8-MOP является практически полная неспособность вызывать гибель клеток линии Raji. Можно предполагать, что соединение S, в отличие от 8-MOP окажется полностью безопасным для В-лимфоцитов при использовании в качестве фотосенсибилизатора. С учетом недостаточности сведений о вкладе Т- и В-лимфоцитов в этиологию псориаза, в частности, представленности лимфоцитов этих классов с субэпидермальными скоплениями псориазических повреждений, вопрос желательности такой избирательности фототоксического у соединения S

остаётся открытым. Однако, необходимо отметить, что лимфоциты типа Th17, которые рассматриваются в качестве главного этиотропного фактора развития псориаза, относятся к классу Т-лимфоцитов, что позволяет надеяться на положительный результат испытаний соединения *S in vivo*.

Полученные данные позволяют рассматривать использованную модель трех клеточных линий (Jurkat, Raji и иммортализованные фибробласты человека) в качестве возможного прототипа универсальной тест-системы для экспресс-скрининга панелей перспективных средств терапии псориаза. Окончательный вывод о целесообразности использования такого подхода может быть сделан по результатам испытаний терапевтической эффективности соединения *S* в качестве средства фотохимиотерапии псориаза на животных моделях.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках тематики Государственного задания № 0112-2019-0001 “Геномные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции” (руководитель Н.К. Янковский).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Christophers E.* // Clin Exp Dermatol. 2001. V. 26. P. 314–320.
2. *Griffiths C.E., Barker J.N.* // Lancet 2007. V. 370. P. 263–271.
3. *Kim J., Krueger J.G.* // Dermatol. Clinics. 2015. V. 33 (1). P. 13–23.
4. *Georgescu S.R., Tampa M., Caruntu C., Sarbu M.I., Mitran C.I., Mitran M.I., Matei C., Constantin C., Neagu M.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20 (3). pii: E739. <https://doi.org/10.3390/ijms20030739>
5. *Lande R., Chamilos G., Ganguly D., Demaria O., Frasca L., Durr S., Conrad C., Schröder J., Gilliet M.* // Eur. J. Immunol. 2015. 45 (1). P. 203–213. <https://doi.org/10.1002/eji.201344277>
6. *Singh T.P., Schön M.P., Wallbrecht K., Michaelis K., Rinner B., Mayer G., Schmidbauer U., Strohmaier H., Wang X.J., Wolf P.* // J. Immunol. 2010. V. 184 (12). P. 7257–7267. PMID: 20488788 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903719>
7. *Lu J., Ding Y., Yi X., Zheng J.* // Braz. J. Med. Biol. Res. 2016. P. 49. e5374.
8. *Thomas J., Küpper M., Batra R., Jargosch M., Atenhahn A., Baghin V., Krause L., Lauffer F., Biedermann T., Theis F.J.* // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2019. V. 33. P. 115–122.
9. *Saiag P., B. Coulomb, Lebreton C., Bell E., Dubertret L.* // Science. 1985. V. 230. P. 669–672.
10. *Krueger G.G., Jorgensen C.M.* // J. Invest Dermatol. 1990. V. 95. P. 56–58. ISSN 0022-202X. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12505791>
11. *Evain-Brion D., Raynaud F., Laurent P., Plet A., Leduc B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 5272–5276.
12. *Raynaud F., Gerbaud P., Enjolras O., Gorin I., Anderson W.B., Evain-Brion D.* // Lancet. 1989. V. 1. P. 1153–1156.
13. *Thérond P., Gerbaud P., Dimon S., Anderson W.B., Evain-Brion D., Raynaud F.* // J. Invest. Dermatol. 1996. V. 106. P. 1325–1328.
14. *Kubo R., Muramatsu Sh., Sagawa Y., Saito Ch., Kasuya S., Nishioka A., Nishida E., Yamazaki S., Morita A.* // J. Dermatol. Science. 2017. V. 86 (1). P. 46–53. ISSN 0923–1811. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.01.001>
15. *Bethea D., Fullmer B., Syed S., Seltzer G., Tiano J., Rischko C., Gillespie L., Brown D., Gasparro F.P.* // J. Dermatol. Science. 1999. V. 19. P. 78–88.
16. *Marzano C., Chilin A., Bordin F., Baccichetti F., Guiotto A.* // Bioorg. Med. Chem. 2002. V. 10 (9). P. 2835–2844.
17. *Yoo E.K., Rook A.H., Elenitsas R., Gasparro F.P., Vowels B.R.* // J. Invest. Dermatol. 1996. V. 107 (2). P. 235–242.
18. *Vallat V.P., Gilleaudeau P., Battat L., Wolfe J., Nabeya R., Heftler N., Hodak E., Gottlieb A.B., Krueger J.G.* // J. Exp. Med. 1994. V. 180. P. 283–296.
19. *Wolf P., Nghiem D.X., Walterscheid J.P., Byrne S., Matsumura Y., Matsumura Y., Bucana C., Ananthaswamy H.N., Ullrich S.E.* // Am. J. Pathol. 2006. V. 169. P. 795–805.
20. *Saito C., Maeda A., Morita A.* // J. Dermatol. Sci. 2009. V. 53 (3). P. 231–233. PMID: 19070466 <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.09.01119070466>
21. *Canton M., Caffieri S., Dall'Acqua F., Di Lisa F.* // FEBS Lett. 2002. V. 522 (1–3). P. 168–172. PMID: 12095639
22. *Viola G., Facciolo L., Vedaldi D., Disarò S., Basso G., Dall'Acqua F.* // Photochem Photobiol Sci. 2004. V. 3 (3). P. 237–239. PMID: 14993937
23. *Viola G., Fortunato E., Ceconet L., Del Giudice L., Dall'Acqua F., Basso G.* // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2008. V. 227 (1). P. 84–96.
24. *Dall'Acqua S., Viola G., Cappelletti E.M., Innocenti G.* // Z. Naturforsch. C. 2004. V. 59 (5–6). P. 335–338. PMID: 18998397
25. *Кузьмин В.А., Мазалецкая Л.И., Некипелова Т.Д., Ходот Е.Н.* // Изв. Акад. наук. Сер. хим. 2008. № 11. С. 2356–2360.
26. *Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G.* // Cancer Com. 1991. V. 3 (7). P. 207–212. ISSN 0955-3541. PMID 1867954 <https://doi.org/10.3727/095535491820873191>

Study of Phototoxicity of the Novel Substituted Derivatives of Furodihydroquinoline, Putative Medicines for Phototherapy of Psoriasis

E. N. Khodot*, A. B. Shevelev**, ***, A. V. Shibaeva**, M. S. Smirnova***, #, N. V. Pozdniakova****, O. O. Ryabaya****, E. S. Bogdanova***, M. A. Guseva***, V. A. Volnukhin*****, and V. A. Kuzmin**

E-mail: mbarbotko@yandex.ru

*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskij pr. 47, Moscow, 119991 Russia

** Emanuel Institute of Biochemical Physics, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

*** Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 117971 Russia

**** Blokhin Russian Cancer Research Centre, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

***** Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Leninskij pr. 17, Moscow, 119071 Russia

Previously a method of synthesis of tremethyl substituted furodihydroquinoline (FDHQ), a putative photosensitizer for the therapy of the psoriasis was disclosed in patent RU #2614248. Presumably, FDHQ was able to substitute derivatives of the psoralen (8-methoxypsoralen – 8MOP, 5-methoxypsoralen – 5-MOP and trimethylpsoralen – TMP) actually applied for this purpose. FDHQ has an advantage over psoralens in safety for a patient. However, practical use of FDHQ was found to be impossible due to its insufficient solubility in any clinically permitted solvents. To solve this problem, a synthesis of six earlier unknown derivatives of FDHQ with side substitutes in position 5 of the benzene nucleus (carbamate, acetamide, and sulfuric moieties) were synthesized: N-(6,8,8-trimethyl-8,9-dihydrofuro[3,2-h]quinoline-5-yl)acetamide (W); tret-butyl (6,8,8-trimethyl-8,9-dihydrofuro[3,2-h]quinoline-5-yl)carbamate (K); tret-butylacetyl (6,8,8-trimethyl-8,9-dihydrofuro[3,2-h]quinoline-5-yl)-carbamate (WK); N-methyl-N-(6,8,8-trimethyl-8,9-dihydrofuro[3,2-h]quinoline-5-yl) acetamide (WC1); N-octyl-N-(6,8,8-trimethyl-8,9-dihydrofuro[3,2-h]quinoline-5-yl) acetamide (WC8); sodium acetyl (6,8,8-trimethyl dihydrofuro[3,2-h]quinoline-5-yl) sulfamate (S). *In vitro* testing on T-cell lympholeukosis (Jurkat), B-cell lymphoma (Raji) cell lines and immortalized human fibroblasts demonstrated optimal photosensitizing properties in S compound. Ratio between dark toxicity and phototoxicity of this compound (irradiation with UV light with $\lambda = 302$ nm) on the chosen model cell lines allows to suggest it as a putative efficient and safe medicine for phototherapy of the psoriasis.

Keywords: furodihydroquinoline, FDHQ, photosensitizer, therapy, psoriasis, phototoxicity, Jurkat, Raji



УДК 547.598.458.22

СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕНЗИЛИДЕНГИДРАЗИДОВ ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2020 г. Л. А. Балтина*., Р. М. Кондратенко**, А. К. Булгаков**

*Уфимский институт химии Уфимского Федерального Научного Центра РАН,
Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71

**ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России,
Россия, 450000, Уфа, ул. Ленина, 3

Поступила в редакцию 06.08.2019 г.

После доработки 23.08.2019 г.

Принята к публикации 21.10.2019 г.

Осуществлен синтез и проведена оценка противомикробной активности новых производных глицирретовой кислоты, содержащих гидразидные фармакофорные группы. Наибольшую противомикробную активность проявил 3-*O*-ацетил-*N*'-(4-гидроксibenзилиден)гидразид глицирретовой кислоты. Это соединение оказывало антибактериальное действие как в отношении бактерий *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ent. cloace*, так и противогрибковую активность в отношении грибка вида *Candida albicans*. Минимальные ингибирующие концентрации этого соединения и пимафуцина для *C. albicans* оказались аналогичны.

Ключевые слова: глицирретовая кислота, гидразиды, противомикробная активность

DOI: 10.31857/S0132342320020062

ВВЕДЕНИЕ

Поиск и разработка новых противомикробных препаратов остается одной из актуальных проблем современной медицинской химии и микробиологии, что обусловлено распространяющейся резистентностью патогенных микроорганизмов к существующим химиотерапевтическим препаратам, а также утратой клинической значимости ряда антибиотиков. Возникновение устойчивости к антибиотикам приводит к снижению эффективности и длительности лечения заболеваний, росту числа госпитализаций, и увеличению видов бактериальных инфекций, не поддающихся лечению известными антибиотиками [1, 2].

Одним из перспективных путей создания новых противомикробных препаратов служит химическая модификация структур известных антибиотиков, природных соединений, в том числе – выделенных из растений [3–6].

Показано, что основные биологически активные компоненты как самого экстракта корней солодки голой и уральской (*Glycyrrhiza glabra* L., *Gl. uralensis* Fisher) (Leguminosae), так и выделяе-

мые из них индивидуальные природные соединения, проявляют разнообразную биологическую и фармакологическую активность – противовирусную, противоопухолевую, противовоспалительную, противоязвенную, антиоксидантную, гепатопротекторную, антимикробную и др. [7]. Экстракты и компоненты экстрактов солодкового корня обнаружили противомикробную активность в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных патогенных микроорганизмов, а также противогрибковую активность в отношении ряда грибов, таких как *Phytium ultimum*, *Trichophyton mentagrophytes* и *Candida albicans* [8, 9].

Основной пентациклический тритерпеноид, выделенный из экстрактов солодкового корня, глицирретовая (глицирретиновая) кислота (ГЛК) (I), проявляет активность в отношении тест-микробов стафилококковой, кишечной и спорообразующей групп [7]. ГЛК обнаружила защитное действие при грибковой инфекции *C. albicans* в мышинных моделях [8], а также при стафилококковой пневмонии, вызванной бактериями *Staphylococcus aureus* [9].

Глицирренат натрия показал *in vitro* выраженную противомикробную активность относительно золотистого стафилококка и микобактерий [7]. Установлена антибактериальная активность сульфонамидных производных ГЛК в отношении грам-

Сокращения: ГЛК – глицирретовая кислота; МПБ – мясопептонный бульон; МИК – минимальная ингибирующая концентрация.

Автор для связи: (тел.: +7 (347) 235-52-88; эл. почта: baltina@anrb.ru).

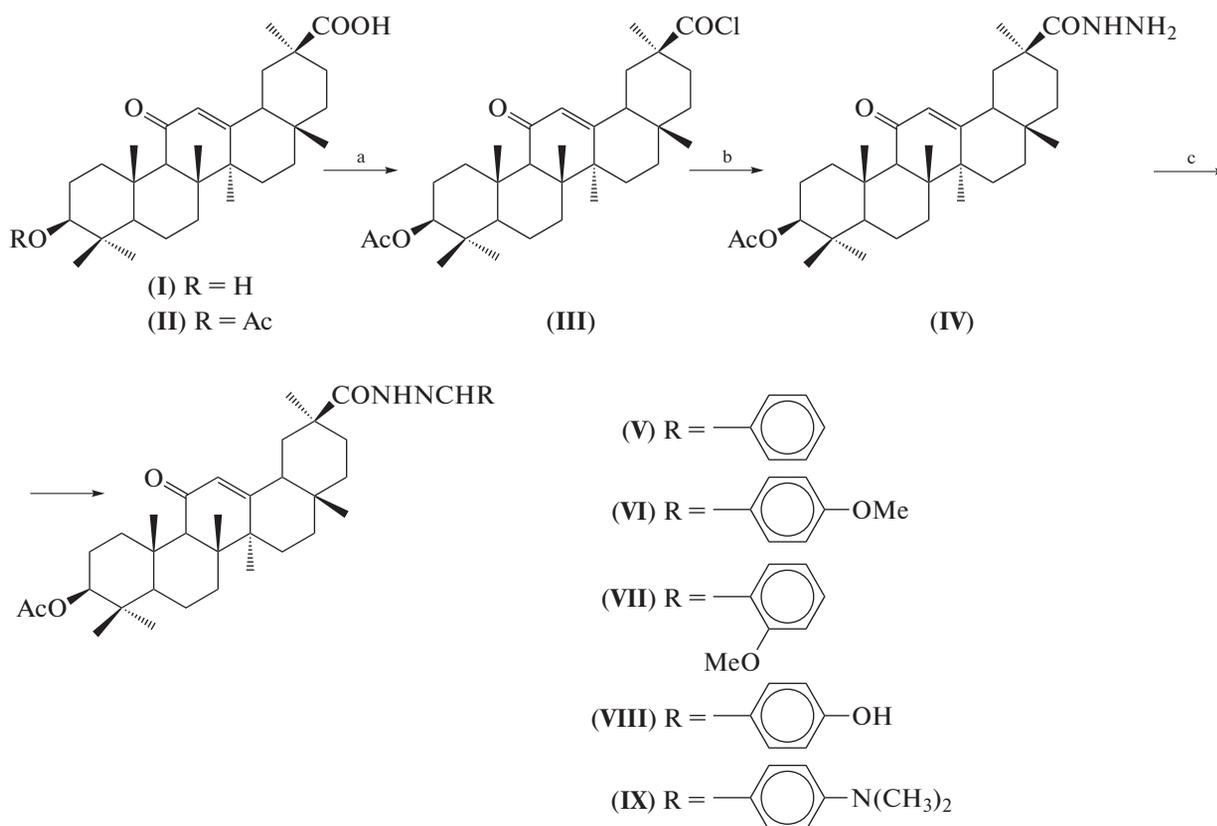
положительных (*St. aureus*, *Bacillus anthracis*, *Cryni-bacteria bovis*) и грамотрицательных (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*) бактерий [7]. Однако использование ГЛК в качестве базовой структуры (скаффолда) для синтеза ее биологически активных производных, а также изучение зависимости структура–активность до сих пор остаются малоизученным направлением.

Настоящая работа посвящена синтезу ряда азотсодержащих производных ГЛК, модифицированных по карбоксильной группе гидразидными фармакофорными группами, а также оценке их противомикробной и противогрибковой активности на панели штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов. О противомикробных свойствах данной группы производных ГЛК в литературе не сообщалось.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез исходного гидразида ГЛК (IV) (схема 1) проводили обработкой гидразингидратом в хлористом метиле полученного хлорангидрида 3-*O*-ацетата глицирретовой кислоты (III), (вы-

ход 75%) [7]. Взаимодействием ацилгидразида (IV) с ароматическими альдегидами в этаноле при кипячении в течение 6 ч получены бензилиденгидразида (V)–(IX) с выходами 70–75%, структура которых подтверждена спектрами ИК, ЯМР ^1H и ^{13}C , а также элементным анализом. В спектрах ЯМР ^1H соединений (V)–(IX) в области слабого поля присутствуют дополнительные сигналы протонов CONH- и N=CH-групп и ароматических протонов (9.9–7.3 м.д.). В спектрах ЯМР ^{13}C наблюдаются сигналы ароматических атомов углерода (132.2–111.0 м.д.). Для соединений (IV), (VI) и (VII) сняты ЯМР ^1H (500 МГц) и ^{13}C спектры высокого разрешения и проведено полное отнесение сигналов протонов и атомов углерода. Так, в спектрах ЯМР ^1H соединений (VI) и (VII) протоны OCH₃-группы ароматических остатков обнаруживаются при 3.88 и 3.86 м.д., протоны N=CH находятся в слабом поле (8.88–8.76 м.д.). Протоны N(CH₃)-группы в спектре соединения (IX) обнаруживаются при 3.07 и 2.99 м.д. соответственно.



Условия реакций: а) SOCl_2 , бензол; б) NH_2NH_2 , CH_2Cl_2 ; в) RCHO , EtOH, 78°C, 6 ч

Схема 1.

Проведена оценка противомикробной активности ГЛК и ее производных в отношении грам-

положительных и грамотрицательных бактерий *St. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*,

Таблица 1. Противомикробная (бактериостатическая и фунгиостатическая) активность ГЛК и ее производных

| Соединение | Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) (мг/мл) | | | | | | | | |
|-------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | <i>Ec</i> | <i>Pv</i> | <i>Kp</i> | <i>Sa</i> | <i>Cd</i> | <i>Ea</i> | <i>Pa</i> | <i>Ecl</i> | <i>Ca</i> |
| ГЛК (I) | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 1.0 |
| (IV) | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 | >10 |
| (V) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 10 |
| (VI) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| (VII) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| (VIII) | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.001 |
| (IX) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 10 |
| Цефтриаксон | 0.5 | 0.05 | 0.05 | 0.5 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | — | 0.05 |
| Пимафуцин | — | — | — | — | — | — | — | — | 0.001 |

Примечание. *Ec* – *Escherichia coli*; *Pv* – *Proteus vulgaris*; *Kp* – *Klebsiella pneumonia*; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Cd* – *Citrobacter diversus*; *Ea* – *Enterobacter aerogenes*; *Pa* – *Pseudomonas aeruginosa*; *Ecl* – *Enterobacter cloace*; *Ca* – *Candida albicans*. Приведены средние результаты двух измерений МИК.

Pr. vulgaris, *Citrobacter diversus*, *Ent. aerogenes*, *Ent. cloace* и патогенных грибов *C. albicans* согласно [10, 11]. В качестве препаратов сравнения использовали антибиотик цефтриаксон (Шрея, Индия) и противогрибковый препарат пимафуцин (Астеллас, Нидерланды). В табл. 1 представлены полученные нами данные по противомикробной активности исследованных соединений.

Результаты исследования показали, что модификация гидразида (IV) путем введения различных ароматических групп приводит к усилению противомикробной активности полученных бензилиденгидразидов. Наибольшей противомикробной активностью обладают ГЛК и *N'*-(4-гидроксibenзилиденгидразид) (VIII). Соединение (VIII) оказывало как антибактериальное действие в отношении всех исследованных грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и противогрибковую активность в отношении патогенных грибов *C. albicans*, что свидетельствует о широком спектре его действия. Величина минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении исследованных бактерий для ГЛК и соединения (VIII) оказалась выше, чем у препарата сравнения цефтриаксона. Величина МИК (VIII) в отношении грибов *C. albicans* (0.001 мг/мл) была равной величине МИК препарата сравнения – пимафуцина. Величины МИК гидразидов (V)–(VII) во всех случаях оказались значительно выше, чем соответствующая величина для ГЛК и соединения (VIII) (1 мг/мл). Исходный гидразид (IV) был неактивен (МИК > 10 мг/мл) как в отношении исследованных бактерий, так и грибов. Таким образом, введение бензилиденгидразидных фармакоформных групп по С30 положению ГЛК оказывает существенное влияние на противомикробную активность соединений. Выявленное соединение–лидер (VIII) перспективно для даль-

нейших исследований в качестве противогрибкового агента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали на импульсном спектрометре Bruker Avance-III (Германия) с рабочей частотой 500.13 (¹H) и 125.47 МГц (¹³C) или Bruker AMX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 (¹H) и 75.5 (¹³C) МГц в CDCl₃. Химические сдвиги приведены в м.д. относительно сигнала внутреннего стандарта – тетраметилсилана (ТМС), *J* – в герцах. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР проведены с использованием стандартного пакета программ спектрометра Bruker Avance-III и литературных данных для производных ГЛК и бензальгидразидов бетулиновой кислоты [12, 13]. ИК-спектры записаны на спектрофотометре IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония) в пасте с вазелиновым маслом. Оптическую активность измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 341 (США) в трубке длиной 1 дм при 20–22°C (λ_{Na} 546 нм). Температуры плавления определяли на микростолике Voetius (Германия) и не исправляли. Элементный анализ проводили на приборе CHNS-анализатор HeKatech (Германия).

Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках Сорбфил (Сорбополимер), используя систему растворителей бензол–этанол, 10 : 1 (А). Пятна веществ обнаруживали 5% раствором H₂SO₄ в этаноле с последующим нагреванием при 120–125°C в течение 2–3 мин. Для колоночной хроматографии использовали силикагель КСК (фракция 50–150, сухая классификация) (Сорбополимер). Очистку растворителей проводили по описанным методикам [14]. Растворители упаривали в вакууме при температуре 40–45°C. ГЛК (I) получали гидролизом глицирризиновой кислоты согласно

методике [7]. Т. пл. 293–295°C, $[\alpha]_D^{20} + 163^\circ$ (*c* 0.04, CHCl_3). (Лит. [7]: т. пл. 290–292°C, $[\alpha]_D^{20} + 165^\circ$ (*c* 0.04, CHCl_3)). 3-*O*-ацетат ГЛК (II) синтезировали обработкой ГЛК укусным ангидридом в пиридине [7]. Т. пл. 315–317°C. $[\alpha]_D^{20} + 165^\circ$ (*c* 0.4; CHCl_3). (Лит. [7]: т. пл. 317–321°C; $[\alpha]_D^{20} + 140$ – 145° (CHCl_3)). Хлорангидрид 3-*O*-ацетил-ГЛК (III) получали обработкой соединения (II) SOCl_2 в бензоле и использовали без дальнейшей очистки [7].

Гидразид 3-*O*-ацетил-глицерретовой кислоты (IV). К раствору 2.0 г (3.8 ммоль) хлорангидрида 3-*O*-ацетил-ГЛК (III) в 50 мл хлористого метилена при перемешивании и охлаждении в бане со льдом (0–5°C) прибавляли по каплям 11.0 мл (36 ммоль) гидразин-гидрата (85%) и перемешивали 1 ч. Затем промывали смесь 5% раствором NaHCO_3 (100 мл), водой (100 мл), сушили MgSO_4 и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с СГ, элюируя смесью бензол–этанол, 300 : 1, 200 : 1, 100 : 1 (по объему). Выход 1.5 г, 75%. R_f 0.60 (A). $[\alpha]_D^{20} + 175^\circ$ (*c* 0.04, CH_2Cl_2). ИК (ν , см^{-1}): 3387 (NH), 1733 (OAc), 1658 ($\text{C}=\text{O}$). Спектр ^1H -ЯМР (500 МГц): 8.52 (уш.с., 1H, CONH), 5.53 (с, 1H, H12), 4.50 (дд, 1H, J 11.6 и 4.5, H3), 2.80 (дд, 1H, J 10.6 и 3.4, H18), 2.32 (м, 1H, H1_b), 2.31 (с, 1H, H9), 2.18 (дт, 1H, J 12.8 и 2.5, H1_a), 2.06 (с, 3H, COCH₃), 2.05–1.85 (м, 3H, H16_b, H2_b), 1.80 (тд, 1H, J 13.7 и 4.1, H2_a), 1.70–1.52 (м, 7H, 2H6, H19_b, H15_b, H21_b, H22_b), 1.50–1.30 (м, 7H, H7_a, H15_a, H16_a, H19_a, H22_a, NH₂), 1.31 (с, 3H, C²⁷H₃), 1.25 (с, 3H, C²⁶H₃), 1.12 (с, 3H, C²⁵H₃), 1.09 (с, 3H, C²⁹H₃), 1.00 (м, 1H, H21_a), 0.88, 0.87 (2 с, 6H, C²³H₃, C²⁴H₃), 0.80 (м, 1H, H5), 0.75 (с, 3H, C²⁸H₃). Спектр ^{13}C -ЯМР (125 МГц): 200.1 (C11), 174.8 (C30), 171.0 (COCH₃), 170.0 (C13), 127.9 (C12), 80.6 (C3), 61.7 (C9), 55.0 (C5), 48.6 (C18), 45.4 (C20), 43.3 (C14), 43.2 (C8), 40.7 (C19), 38.8 (C1), 38.0 (C4), 37.4 (C22), 36.9 (C10), 32.7 (C7), 31.8 (C17), 31.3 (C21), 29.0 (C29), 28.5 (C38), 28.0 (C28), 26.5 (C16), 26.2 (C15), 23.5 (C2), 23.3 (C27), 21.4 (COCH₃), 18.9 (C26), 17.3 (C6), 16.6 (C24), 16.1 (C25). Найдено, %: С 72.65, Н 9.52, N 5.22. $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{N}_2$. Вычислено, %: С 72.96, Н 9.67, N 5.32. m/z 526.73 [M^+].

Общая методика получения *N*'-бензилиденгидразидов (V)–(IX). Смесь 0.5 ммоль (0.26 г) гидразида (IV) и соответствующего ароматического альдегида (0.5–0.6 ммоль) в 10 мл этанола кипятили 6 ч. Затем реакционную смесь разбавляли 1% раствором соляной кислоты (10 мл), осадок отфильтровывали, промывали водой, сушили и хроматографировали на колонке с СГ, элюируя бензолом и смесью бензол–этанол, 300 : 1, 200 : 1,

100 : 1 (по объему). Индивидуальные по ТСХ фракции объединяли и упаривали.

***N*'-Бензилиденгидразид 3-ацетокси-18βH-олеан-12-ен-11-он-30-овой кислоты (V).** Выход 0.22 г, 72%. R_f 0.60 (A), $[\alpha]_D^{20} + 144^\circ$ (*c* 0.06, CHCl_3). ИК (ν , см^{-1}): 3330 (NH), 1729 (Ac), 1652 ($\text{C}=\text{O}$), 1647, 1620 (C_6H_5). Спектр ^1H -ЯМР (300 МГц): 8.95, 8.50 (оба с., 2H, CONH, N=CH), 7.54–7.26 (м, 5H, C_6H_5), 5.67 (с, 1H, H12), 4.52 (м, 1H, H3), 2.04 (с, 3H, COCH₃), 1.85–1.1.50 (м, 3H, CH₂ в пентациклическом скелете), 1.30 (с, 3H, C²⁷H₃), 1.25 (с, 6H, C²⁶H₃, C²⁵H₃), 1.17 (с, 3H, C²⁹H₃), 1.00 (с, 3H, C²⁸H₃), 0.86 (с, 6H, C²³H₃, C²⁴H₃), 0.73 (с, 3H, C²⁸H₃). Спектр ^{13}C -ЯМР (75.5 МГц): 200.2 (C11), 175.0 (C30), 171.1 (COCH₃), 170.1 (C13), 149.0 (N=CH), 130.0–122.0 (C1'–C6', C12), 80.6 (C3), 61.6 (C9), 55.0 (C5), 48.4 (C18), 45.4 (C20), 43.3 (C14), 43.2 (C8), 40.7 (C19), 38.8 (C1), 38.0 (C4), 37.4 (C22), 36.8 (C10), 32.7 (C7), 31.9 (C17), 31.2 (C21), 29.2 (C29), 28.4 (C23), 28.0 (C28), 26.4, 26.3 (C16, C15), 23.5 (C2), 23.3 (C27), 21.8 (COCH₃), 18.7 (C26), 17.3 (C6), 16.6 (C24), 16.3 (C25). Найдено, %: С 75.95, Н 8.72, N 4.42. $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено, %: С 76.18, Н 8.85, N 4.56. m/z 614.83 [M^+].

***N*'-(4-Метоксибензилиден)гидразид 3-О-ацетокси-18βH-олеан-12-ен-11-он-30-овой кислоты (VI).** Выход 0.22 г, 70%. R_f 0.52, $[\alpha]_D^{20} + 152^\circ$ (*c* 0.05, CHCl_3). ИК-спектр, ν , см^{-1} : 3360 (NH), 1729 (Ac), 1658 ($\text{C}=\text{O}$), 1596, 1588 (C_6H_4). Спектр ^1H -ЯМР (500 МГц): 9.83, 8.76 (оба с., 2H, CONH, N=CH), 8.01, 7.83 (оба д, 2H, J 8.6, H2', H6'), 7.01, 6.90 (оба д, 2H, J 8.9, H3', H5'), 5.65 (с, 1H, H12), 4.50 (дд, 1H, J 11.8 и 4.5, H3), 3.88 (с, 3H, OCH₃), 2.75 (дд, 1H, J 11.6 и 3.5, H18), 2.29 (с, 1H, H9), 2.17 (дд, 1H, J 12.3 и 3.3, H1_b), 2.01 (с, 3H, COCH₃), 2.00–1.90 (м, 4H, H1_a, H2_b, H16_b), 1.73 (тд, 1H, J 13.1 и 4.5, H2_a), 1.70–1.50 (м, 7H, 2H6, H7_b, H19_b, H15_b, H21_b, H22_b), 1.45–1.30 (м, 5H, H7_a, H15_a, H16_a, H22_a, H19_a), 1.29 (с, 3H, C²⁷H₃), 1.23 (с, 3H, C²⁶H₃), 1.21 (с, 3H, C²⁵H₃), 1.15 (с, 3H, C²⁹H₃), 1.05 (с, 3H, C²⁸H₃), 0.95 (м, 1H, H21_a), 0.83, 0.81 (оба с, 6H, C²³H₃, C²⁴H₃), 0.75 (м, 1H, H5). Спектр ^{13}C -ЯМР (75.5 МГц): 200.0 (C11), 174.7 (C30), 171.0 (COCH₃), 169.8 (C13), 164.5, 159.5 (N=CH, C4'), 131.9–114.3 (C1'–C3', C5', C6', C12), 80.6 (C3), 61.7 (C9), 55.5, 55.0 (C5, OCH₃), 48.4 (C18), 45.4 (C20), 43.3 (C14), 43.2 (C8), 40.8 (C19), 38.8 (C1), 38.0 (C4), 37.4 (C22), 36.9 (C10), 32.7 (C7), 31.8 (C17), 31.3 (C21), 29.0 (C29), 28.5 (C23), 28.0 (C28), 26.5 (C16), 26.2 (C15), 23.5 (C2), 23.3 (C27), 21.3 (COCH₃), 18.9 (C26), 17.3 (C6), 16.6 (C24), 16.1 (C25). Найдено, %: С 74.30, Н 8.64, N 4.22. $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_6$. Вычислено, %: С 74.49, Н 8.76, N 4.34. M 644.86.

N'-(3-Метоксибензилиден)гидразид 3-O-ацетокси-18βH-олеан-12-ен-11-он-30-овой кислоты (VII).

Выход 0.24 г, 75%. R_f 0.65(A), $[\alpha]_D^{20} + 146^\circ$ (с 0.08, CHCl_3). ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 3214 (NH), 1727 (Ac), 1658 ($\text{C}=\text{O}$), 1609, 1600, 1586 (C_6H_4). Спектр ЯМР ^1H -ЯМР (500 МГц): 9.97, 8.88 (оба с., 2H, CONH , $\text{N}=\text{CH}$), 7.69 (д, 1H, J 7.7, H6''), 7.60 (с, 1H, H2'), 7.45 (д, 1H, J 7.5, H4'), 7.35 (т, 1H, J 7.9, H5'), 7.14 (д, 1H, J 7.8, H3'), 5.70 (с, 1H, H12), 4.50 (дд, 1H, J 11.5 и 4.7, H3), 3.86 (с, 3H, OCH_3), 2.78 (дд, 1H, J 13.3 и 3.4, H18), 2.30 (с, 1H, H9), 2.18 (м, 1H, H1_b), 2.04 (с, 3H, COCH_3), 2.00-1.93 (м, 3H, H1_a, H2_b, H16_b), 1.77 (тд, 1H, H2_a, J 13.3 и 4.4), 1.70-1.50 (м, 7H, 2H6, H7_b, H19_b, H15_b, H21_b, H22_b), 1.45-1.30 (м, 5H, H7_a, H15_a, H16_a, H19_a, H22_a), 1.32 (с, 3H, C^{27}H_3), 1.25 (с, 3H, C^{26}H_3), 1.15 (3H, с, C^{25}H_3), 1.08 (с, 3H, C^{29}H_3), 0.86, 0.84 (оба с, 6H, C^{23}H_3 , C^{24}H_3), 0.79 (м, 1H, H5), 0.75 (с, 3H, C^{28}H_3). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц): 200.0 (C11), 175.2 (C30), 171.0 (COCH_3), 169.7 (C13), 160.2, 159.6 ($\text{N}=\text{CH}$, C3'), 130.9-114.5 (C1', C2', C4'-C6', C12), 80.7 (C3), 61.7 (C9), 55.4, 55.1 (C5, OCH_3), 48.3 (C18), 45.4 (C20), 43.3 (C14), 43.2 (C8), 40.9 (C19), 38.8 (C1), 38.0 (C4), 37.4 (C22), 36.9 (C10), 32.7 (C7), 31.8 (C17), 31.5 (C21), 29.0 (C29), 28.5 (C23), 28.0 (C28), 26.5 (C16), 26.3 (C15), 23.5 (C2), 23.3 (C27), 21.2 (COCH_3), 18.8 (C26), 17.3 (C6), 16.6 (C24), 16.2 (C25). Найдено, %: С 74.25, Н 8.73, N 4.25. $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %: С 74.49, Н 8.76, N 4.34. M 644.86.

N'-(4-Гидроксибензилиден)гидразид 3-O-ацетокси-18βH-олеан-12-ен-11-он-30-овой кислоты (VIII).

Выход 0.23 г, 74%. R_f 0.55 (A), $[\alpha]_D^{20} + 162^\circ$ (с 0.04, CHCl_3). ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 3408 (NH), 1733 (Ac), 1661 ($\text{C}=\text{O}$), 1620, 1604 (C_6H_5). Спектр ЯМР ^1H (300 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 9.82, 8.85 (оба с, 2H, CONH , $\text{N}=\text{CH}$), 7.75-6.98 (м, 4H, H2', H3', H5', H6'), 5.65 (с, 1H, H12), 4.51 (дд, 1H, J 11.1 и 4.6, H3), 2.83 (д, 1H, J 12.9, H18), 2.30 (с, 1H, H9), 2.04 (с, 3H, COCH_3), 1.90-1.36 (м, CH, CH_2 в пентациклическом скелете), 1.31 (с, 3H, C^{27}H_3), 1.27 (с, 3H, C^{26}H_3), 1.16 (с, 3H, C^{25}H_3), 1.08 (с, 3H, C^{29}H_3), 0.86, 0.84 (с, 6H, C^{23}H_3 , C^{24}H_3), 0.72 (с, 3H, C^{28}H_3). Спектр ЯМР ^{13}C (75.5 МГц), 200.3 (C11), 175.0 (C30), 171.1 (COCH_3), 170.1 (C13), 162.8, 159.9 ($\text{N}=\text{CH}$, C4'), 132.2-116.1 (C1'-C3', C5', C6', C12), 80.7 (C3), 61.7 (C9), 55.1 (C5), 48.5 (C18), 45.5 (C20), 43.4 (C14), 43.2 (C8), 40.8 (C19), 38.8 (C1), 38.0 (C4), 37.4 (C22), 36.9 (C10), 32.7 (C7), 31.8 (C17), 31.3 (C21), 29.1 (C29), 28.5 (C23), 28.1 (C28), 26.5 (C16), 26.2 (C15), 23.5 (C2), 23.3 (C27), 18.9 (C26), 17.3 (C6), 16.6, 16.1 (C24, C25). Найдено, %: С 74.19, Н 8.62, N 4.26. $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено, %:

С 74.25, Н 8.63, N 4.44. M 630.83. m/z , 631.5 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 629.5 [$\text{M} - \text{H}$]⁻.

N'-(4,4-Диметиламино-бензилиден)гидразид 3-O-ацетокси-18βH-олеан-12-ен-11-он-30-овой

кислоты (IX). Выход 0.23 г, 72%. R_f 0.58 (A), $[\alpha]_D^{20} + 150^\circ$ (с 0.07, CHCl_3). ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 3408 (NH), 1733 (Ac), 1662 ($\text{C}=\text{O}$), 1620, 1599 (Ph). Спектр ЯМР ^1H (300 МГц): 9.73, 8.55 (2H, с, CONH , $\text{N}=\text{CH}$), 7.74-6.67 (2H, м, H2', H3', H5', H6'), 5.71 (1H, с, H12), 4.49 (1H, дд, J 11.0 и 4.0, H3), 3.07, 2.99 (6H, оба с, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.04 (3H, с, COCH_3), 1.80-1.50 (м, CH, CH_2 в пентациклическом скелете), 1.36 (3H, с, C^{27}H_3), 1.22 (3H, с, C^{26}H_3), 1.15 (3H, с, C^{25}H_3), 1.10 (3H, с, C^{29}H_3), 0.88 (6H, с, C^{23}H_3 , C^{24}H_3), 0.80 (3H, с, C^{28}H_3). Спектр ЯМР ^{13}C (75.5 МГц), 200.1 (C11), 174.8 (C30), 171.0 (COCH_3), 169.4 (C13), 154.4, 144.5 ($\text{N}=\text{CH}$, C4'), 132.0-111.0 (C1'-C3', C12), 80.7 (C3), 61.7 (C9), 55.0 (C5), 48.1 (C18), 45.4 (C20), 43.3 (C14), 43.2 (C8), 40.1 (C19), 38.8 (C1), 38.0 (C4), 37.4 (C22), 36.9 (C10), 32.7 (C7), 31.8 (C17), 31.3 (C21), 29.2 (C29), 28.5 (C23), 28.1 (C28), 26.5 (C16), 26.4 (C15), 23.6 (C2), 23.3 (C27), 21.3 (CH_3), 18.76 (C26), 17.4 (C6), 16.7 (C24), 16.3 (C25). Найдено, %: С 73.91, Н 8.82, N 6.50. $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_4$. Вычислено, %: С 74.13, Н 9.09, N 6.65. M 631.86.

Изучение противомикробной активности соединений

В работе были использованы депонированные штаммы микроорганизмов ГИСК (Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Тарасевича Минздрава России) музея кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* и *Candida albicans*.

Противомикробную активность исследуемых соединений определяли методом "диффузии в агар" и десятикратных серийных разведений в мясопептонном бульоне (МПБ) согласно [10, 11]. Предварительно готовили раствор, содержащий 100 мг изучаемого соединения в 1 мл DMSO с последующим разведением МПБ до рабочей концентрации 10 мг/мл. В ряд пробирок с последовательными десятикратными убывающими концентрациями исследованных соединений в МПБ вносили тестовые культуры микроорганизмов. При этом микробная нагрузка составила 2.0×10^6 микробных тел в 1 мл питательной среды. Посевы инкубировали при 37°C в течение 72 ч и при 25°C в течение 48 ч, после чего визуально оценивали наличие или отсутствие роста тест-культуры. Дан-

ные МИК выражены как среднее значение двух измерений. В качестве препаратов сравнения использовали цефтриаксон (Шрея, Индия) и пимафуцин (Астеллас, Нидерланды).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по теме № АААА-А17-11701191025-6 с использованием оборудования ЦПК “Химия”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rice L.B. // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 71. P. 991–995.
2. Barlocco D., Meneghetti F. // Molecules. 2017. V. 22. P. 1127.
3. Тевяшова А.Н., Олсуфьева Е.Н., Преображенская М.Н. // Успехи химии. 2015. Т. 84. С. 61–97.
4. Covan M.M. // Clin. Microbiol. Rev. 1999. V. 12. P. 564–582.
5. Cain R., Narramore S., McPhillie M., Simmons K., Fishwick C.W.G. // Bioorg. Chem. 2014. V. 55. P. 69–76.
6. Fontany S., Grare M., Mayer J., Finance Ch., Duval R.E. // J. Ethnopharm. 2008. V. 120. P. 272–276.
7. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П., Кондратенко Р.М., Толстикова Т.Г. Солодка: биоразнообразии, химия, применение в медицине. Новосибирск: Акад. Изд-во “Гео”, 2007. 311 с.
8. Wang L., Yang R., Yaun B., Liu Y., Liu Ch. // Acta Pharm. Sinica B. 2015. V. 5. P. 310–315.
9. Li H.-E., Qiu J.-Zh., Yang Zh.-Q., Dong J., Wang J.-F., Luo M.-J., Pan J., Dai X.-H., Zhang Y., Song B.-L., Deng X.-M. // Fitoterapia. 2012. V. 83. P. 241–248.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 672 с.
11. Балтина Л.А., Булгаков А.К., Губайдуллин А.Г., Кондратенко Р.М. // Евразийский Союз ученых. 2018. С. 36–39.
12. Baltina L.A., Jr., Khudobko M.V., Mikhailova L.R., Baltina L.A., Fedorova V.A., Orshanskaya Ya.A., Zarubaev V.V., Kiselev O.I. // Chem. Nat. Compd. 2014. V. 50. P. 473–477.
13. Flekhter O.B., Boreko E.I., Nigmatullina L.R., Pavlova N.I., Nikolaeva S.N., Savinova O.V., Eremin V.F., Baltina L.A., Galin F.Z., Tolstikov G.A. // Russian J. Bioorg. Chem. 2003. V. 29. P. 296–301.
14. Гордон А.Дж., Форд Р.А. Спутник химика. Пер. с англ. М.: Мир, 1976.

Synthesis and Anti-Microbial Activity of Glycyrethic Acid Benzylidenhydrazides

L. A. Baltina^{*,#}, R. M. Kondratenko^{**}, and A. K. Bulgakov^{**}

[#]Phone: +7 (347) 235-52-88; e-mail: baltina@anrb.ru

^{*}Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Science Center, Russian Academy of Sciences, pr. Octyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

^{**}Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of Russia, ul. Lenina 3, Ufa, 450000 Russia

The synthesis was carried out and the antimicrobial activity of the new derivatives of Glycyrrhetic acid containing hydrazide pharmacophore groups was evaluated. The greatest antimicrobial activity was shown by 3-*O*-acetyl-*N*-(4-hydroxybenzylidene) glycyrrhetic acid hydrazide. This compound had an antibacterial effect against *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloace*, as well as antifungal activity against the fungus *Candida albicans*. The minimum inhibitory concentrations of this compound and pimafulcin for *Candida albicans* were similar.

Keywords: glycyrrhetic acid, hydrazides, antimicrobial activity



ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ НА ВАСКУЛОГЕННУЮ МИМИКРИЮ

© 2020 г. А. А. Варганян*, Д. А. Хоченков*, Ю. А. Хоченкова*, Ю. С. Мачкова*,
Д. С. Хачатрян**, А. В. Колотаев**, А. Н. Балаев***, К. А. Охманович***, В. Н. Осипов*.*#

*НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

**НИЦ “Курчатовский институт” – Институт химических реактивов и особо чистых химических веществ,
Россия, 123098, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

***Акционерное общество “Фарм-синтез”, Россия, 121357, Москва, ул. Вавилова, 15

Поступила в редакцию 25.09.2019 г.

После доработки 08.11.2019 г.

Принята к публикации 14.11.2019 г.

Васкулогенная мимикрия – формирование васкулярных каналов, высланных опухолевыми клетками с высоко злокачественным фенотипом – сегодня рассматривается как дополнительная система кровоснабжения опухоли. Экспериментальные исследования *in vivo* неоднократно демонстрировали, что васкулярные каналы формируются в областях опухоли с низкой плотностью кровеносных сосудов. Предполагается, что формирование сети таких каналов внутри опухоли поддерживают гомеостаз и предотвращает ранний некроз внутри опухоли. В работе исследовались бифункциональные соединения на основе сочетания в одной молекуле хиназолина и гидроксамовой кислоты на их способность ингибировать миграцию опухолевых клеток и васкулогенную мимикрию.

Ключевые слова: гидроксамовые кислоты, производные хиназолина, меланома, рак молочной железы, рак почки, миграция, васкулогенная мимикрия

DOI: 10.31857/S0132342320020177

ВВЕДЕНИЕ

Концепция о том, что VEGF-индуцируемый ангиогенез действительно является фактором, лимитирующим рост опухоли, сегодня принята всеми. По данным ряда клинических исследований антиангиогенная терапия достоверно увеличивает общую выживаемость онкологических больных [1]. В то же время накапливаются факты, свидетельствующие о том, что большинство опухолей практически не отвечают на анти-VEGF терапию [2]. Одной из причин выживаемости опухолевых клеток в условиях антиангиогенной терапии может быть гетерогенность кровеносных сосудов. Формирование сосудов в опухоли происходит на фоне неконтролируемой митогенной стимуляции и измененного внеклеточного матрикса. Это приводит к замещению эндотелия в сосудах опухолевыми клетками, иногда эндоте-

лиальные клетки могут и вовсе отсутствовать. Термин “васкулогенная мимикрия” (ВМ) – формирование опухолевыми клетками васкулярных каналов, покрытых базальной мембраной, был введен в самом конце 1999 года [3]. Образование васкулярных каналов, высланных опухолевыми клетками, является уникальной способностью клеток с высоко злокачественным клеточным фенотипом. Обнаружена высокая статистическая корреляция между появлением в опухоли ВМ и частотой метастазирования [4]. Детальное исследование роли ряда используемых в клинике антиангиогенных препаратов на модулирование ВМ *in vitro* показало, что эти препараты не влияют на формирование васкулярной сети опухолевыми клетками [5].

Сегодня не известно ни одного физиологического процесса – аналога ВМ у взрослых или детей. Единственным примером ВМ, встречающимся у человека, является формирование в плаценте в ходе эмбриогенеза васкулярных каналов цитотрофобластами – и потому процесс ВМ можно считать опухолеспецифичным. Этот факт открывает новые возможности блокирования ро-

Сокращения: NOVt – N-гидроксибензотриазол; NMM – N-метилморфолин; TBVU – 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиний тетрафторборат; VEGF – васкулогенный эпителиальный фактор роста, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка, ВМ – васкулярная мимикрия, СПС – сосудистоподобные структуры.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 412-61-43; эл. почта: ovn65@yandex.ru).

ста опухоли с минимальным эффектом на нормальные физиологические процессы.

Одной из перспективных стратегий в создании новых фармацевтических препаратов в настоящее время является проектирование и синтез гибридных соединений, состоящих из двух или более различных биоактивных фрагментов, и действующих через активацию/блокирование нескольких мишеней. Совмещение двух активных групп в одной молекуле может приводить к более выраженному терапевтическому эффекту. Определенными преимуществами многоцелевые гибриды обладают также по сравнению с комбинированным терапевтическим подходом. Их отличает лучшая биодоступность, низкая токсичность, прогнозируемый фармакокинетический и фармакодинамический профиль, более простое соблюдение пациентом режима применения, более высокая эффективность лечения, а также снижение стоимости лечения (см. обзор [6]). Обладая способностью образовывать комплексы с ионами железа, цинка, магния и кальция, гидроксамовые кислоты блокируют активность многих металлсодержащих белков. Производные гидроксамовых кислот также проявляют гипотензивное [7], антималярийное [8], противотуберкулезное [9] и фунгицидное действие [10]. С другой стороны хиназолиновый цикл присутствует в молекулах более 100 лекарственных препаратов. В настоящее время в клинической практике уже применяются различные производные хиназолина и дигидрохиназолина [11].

Современные методы химического синтеза позволяют вводить гидроксаматную группу в разнообразные природные и синтетические соединения, в том числе и в известные фармацевтические препараты [12], увеличивая их терапевтический эффект. Мы предположили, что объединение в одной молекуле хиназолинового фрагмента и гидроксамовой кислоты позволит создать новые перспективные противоопухолевые препараты.

Целью данной работы является скрининг соединений, сочетающих в одной молекуле хиназолиновый цикл и гидроксаматную группу, на их способность влиять на миграцию опухолевых клеток и ВМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование микрососудов на основе уже существующей в ткани сети сосудов, или неоангиогенез, — необходимое условие для роста опухоли [13]. Большое количество микрососудов в опухоли способствует ее быстрой пролиферации в результате постоянного поступления питания и кислорода и выведению токсических продуктов

метаболизма. За последние годы более 40 антиангиогенных препаратов прошли II и III фазы клинических испытаний, и некоторые из них при комбинировании с химиотерапией оказались эффективными [1]. Однако большинство опухолей не отвечают на антиангиогенную терапию [2]. Гетерогенность опухолевых сосудов может быть ключевым фактором: в опухоли классический ангиогенез идет параллельно с формированием мозаичных сосудов, наблюдается также кооптация сосудов (vessel co-option), при которой опухоль растет вдоль уже существующих в ткани сосудов [14]. В многочисленных исследованиях, проводимых в последние годы, было показано, что присутствие компонентов ВМ в опухолевом материале больных коррелирует с быстрой прогрессией опухоли, повышением метастазирования и, как следствие, короткой выживаемостью больных [3]. Интересно отметить, что васкулярные каналы, высланные опухолевыми клетками, обнаруживаются в тех участках опухоли, где низкая плотность кровеносных сосудов. Полученные нами за последние годы результаты позволили сформулировать концепцию, что антиангиогенная терапия активирует формирование васкулярных каналов и переводит опухоль в фазу более агрессивного роста [15]. Учитывая тот факт, что васкулярные каналы формируют опухолевые клетки с высоко злокачественным фенотипом (убивать такие клетки сегодня мы не можем), вопрос поиска низкомолекулярного ингибитора ВМ становится все более актуальным. Задачами нашего исследования явились синтез бифункциональных соединений и скрининг на их способность блокировать ВМ.

Синтез

Мы предположили, что бифункциональные молекулы, состоящие из двух различных биоактивных фрагментов, и действующих через активацию/блокирование нескольких мишеней смогли бы эффективно ингибировать ВМ. Для этого нами синтезировано несколько групп соединений, содержащих хиназолиновый цикл и гидроксаматную функцию. Соединения (IV) и (VII) синтезированы общим методом (схема 1). Из аминокислот на первом этапе получали эфиры, затем взаимодействием с изатовым ангидридом получали производные амидов антраиловой кислоты, далее метиловые эфиры кислот переводили в гидроксаматы реакцией с гидроксиламином. На заключительной стадии проводили конденсацию гидроксамовых кислот с 4-хлорхиназолином с образованием целевых соединений (IV) и (VIII).

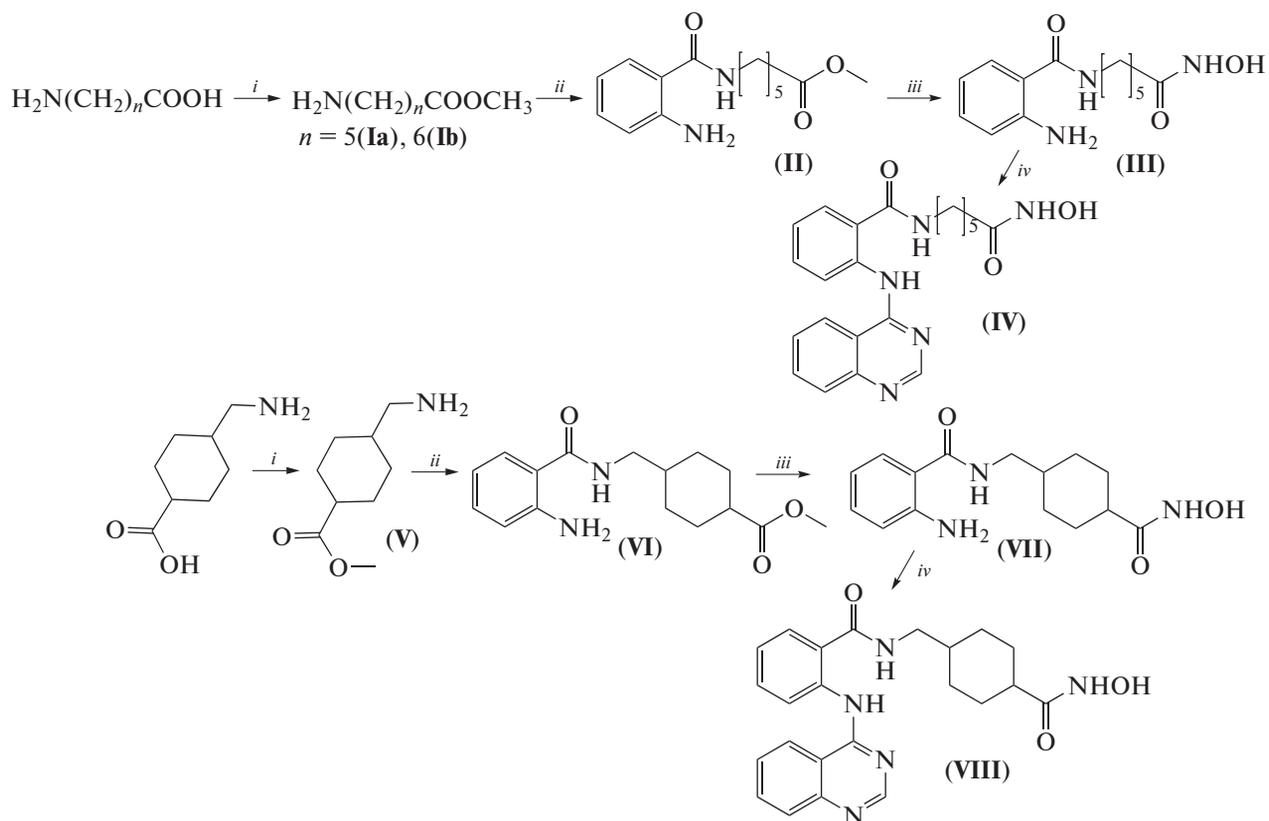


Схема 1. Реагенты и условия: (i) $\text{SOCl}_2/\text{MeOH}$; (ii) изотовый ангидрид/ $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$; (iii) $\text{HCl} \times \text{H}_2\text{NOH}/\text{MeONa}/\text{MeOH}$; (iv) 4-хлорхиназолин/ DMF/Δ .

Для синтеза соединений (**XIIa, b**) сначала конденсировали метил-4-аминобензоат с 4-хлорхиназолином, гидролизали эфир, затем присо-

единяли аминоэфиры (**Ia**) и (**Ib**), и на завершающей стадии получали гидроксамовые кислоты (схема 2).

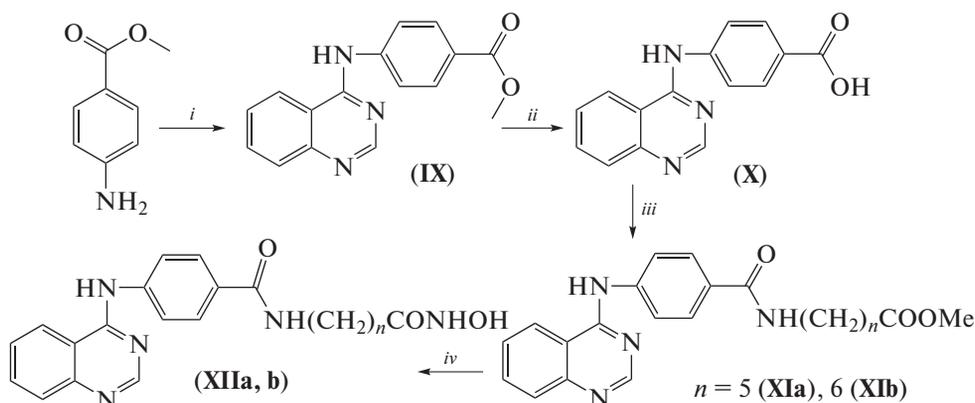


Схема 2. Реагенты и условия: (i) 4-хлорхиназолин/ DMF/Δ ; (ii) $\text{LiOH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; (iii) (**Ia**) или (**Ib**)/TBTU/NOBT/NMM/DMF; (iv) $\text{HCl} \times \text{H}_2\text{NOH}/\text{MeONa}/\text{MeOH}$.

Соединения (**XIIa–c**) получали конденсацией (**III**) с различными карбонильными соединениями (схема 3). Реакцию проводили в

кипящем метаноле или этаноле в присутствии каталитических количеств пара-толуолсульфокислоты (PTSA).

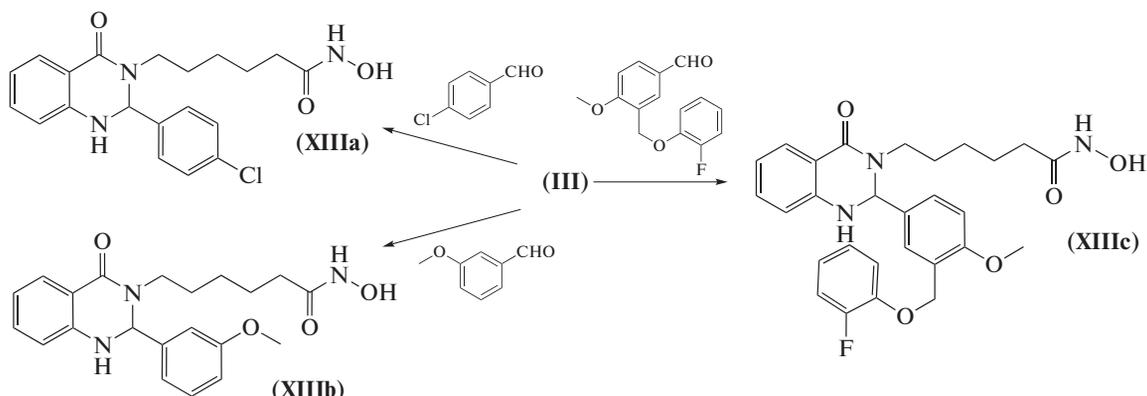


Схема 3. Реагенты и условия: MeOH или EtOH/PTSA.

Реакция 4,5-диметокси-2-формилбензойной кислоты с соединением (III) в этих условиях приводит к сложной смеси продуктов. Синтез в этом случае проводили в две стадии используя соединение (II) как

исходный реагент, при этом образовывался конденсированный тетрацикл (XIIIId) (схема 4), аналогичный описанным в работе [16].

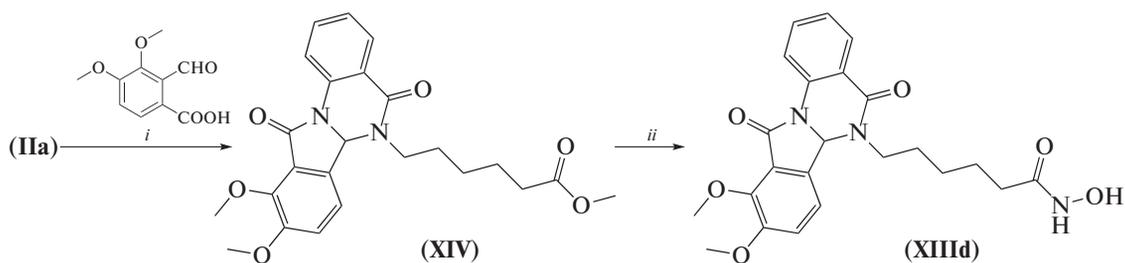


Схема 4. Реагенты и условия: (i) PhCl/PTSA/ Δ ; (ii) HCl \times H₂NOH/MeONa/MeOH.

Соединения (XVa–c) получали конденсацией гидроксиамида антраиловой кислоты с различными карбонильными соединениями, в результате получали производные циклической гидроксамовой

кислоты (схема 5). При использовании производных 2-формилбензойной кислоты также образовывались конденсированные тетрациклы.

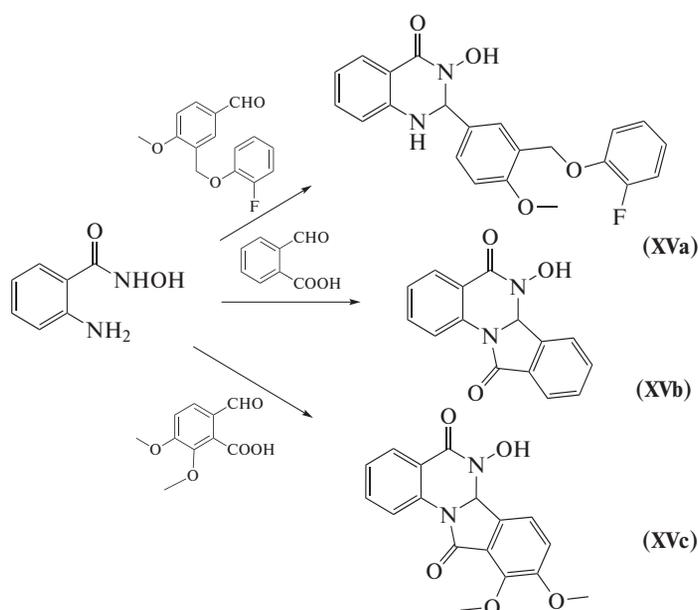


Схема 5. Реагенты и условия: MeOH или PhCl/PTSA/ Δ .

Определение цитотоксической активности

Васкулогенная мимикрия (ВМ) представлена неодинаково в разных типах опухолей. Так, при меланоме кожи более 60% кровоснабжения осуществляется через каналы ВМ; при тройном негативном раке молочной железы – 50%, при раке почки – около 40%, при саркоме мягких тканей – более 35%; при раке яичника более 15%; при раке толстой кишки – около 10% [15]. На фоне крайнего несовершенства циркуляции крови в опухоли каналы ВМ в количестве 10–15% вряд ли что-то изменят, однако 40–60% явно могут иметь существенное значение. Исходя из вышеизложенных аргументов, цитотоксическую активность соединений определяли для линий клеток меланомы, клеток рака молочной железы и клеток рака почки.

Соединения (IV), (XIIIa–d) с IC_{50} меньше 10 мкМ (табл. 1) были отобраны для дальнейших исследований функциональной активности.

Все остальные тесты (миграционный и формирование сосудоподобных структур) проводили на нецитотоксических концентрациях соединений – IC_{10} (90% живых клеток через 24 часа). Использование этого принципа позволяет избежать ложноположительного результата, когда, например, эффект блокирования миграции на 60% от контроля связан с гибелью клеток в течение 24 часов.

Ингибирование миграционной способности

В последние десятилетия усилия многих онкологов были направлены на исследование механизмов инициации и прогрессии злокачественной опухоли. Со временем стало понятно, что основная угроза рака – его распространение по всему организму. Больные со злокачественными опухолями умирают не от исходной опухоли, а от метастазов, дезорганизирующих функционирование пораженных ими тканей. Метастазирование, или процесс миграции клеток опухоли из первичного очага с последующим формированием вторичных опухолевых очагов (метастазов), – одна из главных трудностей в лечении онкологических заболеваний. Миграция опухолевых клеток сегодня рассматривается как ключевой этап процесса метастазирования. Поиск препаратов, ингибирующих перемещение опухолевых клеток из первичного очага в соседние или отдаленные органы, имеет фундаментальное значение и может позволить создание новых противоопухолевых препаратов, повышающих эффективность терапии.

Миграцию опухолевых клеток оценивали методом “заживления раны” с некоторыми модификациями. Монослой клеток разрушали скабливанием и ширину миграционной поверхности анализировали через 24 часа после до-

бавления соединений (IV), (XIIIa–d). В качестве положительного контроля использовали монослой клеток, инкубированных в культуральной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Отрицательным контролем, определяющим ширину “раны” – бесклеточного пространства на поверхности лунки, служили клетки, растущие в среде без сыворотки. Показано, что соединения (IV), (XIIIa–b, d) при нецитотоксических концентрациях (IC_{10}) блокируют миграцию клеток в область “раны” всех трех типов опухолевых клеток по сравнению с контролем в диапазоне от 35 до 65%. В качестве препарата сравнения был использован таргетный ингибитор VEGFR2 сунитиниб (Selleckchem) в нецитотоксической концентрации 1 мкМ, вызывающей торможение миграционной активности на уровне 22.3% для клеток Mel Z, 28.9% – для MCF-7, 38.5% – для SN-12C. На клетках меланомы Mel Z и на клетках рака почки SN-12C наибольшей ингибирующей активностью обладало соединение (IV) – торможение миграционной активности составило 63.5 и 65.4 соответственно (рис. 1). На клетках РМЖ MCF-7 соединения (XIIIa) и (XIIIb) вызывали торможение миграции 64.9 и 69.3% соответственно. Незначительное ингибирование миграции (28–30%) клеток меланомы и РМЖ наблюдалось соединением (XIIIc). На клетках рака почки SN-12C с соединением (XIIIc) ширина миграционной поверхности была сравнима с контрольным образцом (2.3%). Данные о влиянии соединений (IV), (XIIIa–d) на миграцию опухолевых клеток представлены в табл. 2. Блокирование миграции соединением (IV) было максимальным для клеток рака почки SN-12C (65.4%) и клеток меланомы Mel Z (63.5%). Эффективным ингибитором миграции клеток РМЖ MCF-7 оказалось соединение (XIIIb) – 64.9%. По всей видимости, соединения (IV) и (XIIIb) действуют на один из регуляторных путей, лежащих в основе перестройки актинового цитоскелета клетки. Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о целесообразности создания новых аналогов на основе соединения (IV), и возможно, соединения (XIIIb), как потенциальных ингибиторов миграции опухолевых клеток.

Ингибирование формирования сосудоподобных структур

Формирование васкулярных каналов опухолевыми клетками характеризуется рядом последовательных событий: миграцией клеток, узнаванием себе подобных, формированием контактов клетка-клетка, вытягиванием клетки и образованием структур, подобным пчелиным сотам (honey-like comb). Тестом для ВМ *in vitro* служит формирование опухолевыми клетками сосудоподобных структур (СПС) в 3D-культуре [17]. В

Таблица 1. Цитотоксическая активность соединений на клеточных линиях почечно-клеточного рака SN-12C, метастатической меланомы человека Mel Z и раке молочной железы MCF-7 *in vitro*

| Номера соединений | SN-12C | | Mel Z | | MCF-7 | |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | IC ₅₀ , мкМ | IC ₁₀ , мкМ | IC ₅₀ , мкМ | IC ₁₀ , мкМ | IC ₅₀ , мкМ | IC ₁₀ , мкМ |
| (IV) | 4.7 ± 1.5 | 2.1 ± 0.5 | 4.1 ± 0.8 | 0.9 ± 0.1 | 9.5 ± 1.58 | 2.8 ± 1.1 |
| (VIII) | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| (XIIa) | >50 | 25.0 ± 3.2 | >50 | 23.0 ± 4.8 | >50 | 28.6 ± 2.7 |
| (XIIb) | 41.7 ± 11.1 | 6.2 ± 0.6 | 28.7 ± 11.2 | 6.6 ± 2.7 | >50 | >50 |
| (XIIIa) | 3.8 ± 1.2 | 1.7 ± 0.2 | 8.1 ± 0.3 | 1.2 ± 0.3 | 7.6 ± 2.8 | 0.7 ± 0.2 |
| (XIIIb) | 4.8 ± 0.8 | 3.1 ± 0.9 | 8.9 ± 1.3 | >50 | 7.0 ± 0.1 | 0.7 ± 0.3 |
| (XIIIc) | 1.3 ± 0.6 | 0.7 ± 0.2 | 1.9 ± 0.3 | 0.9 ± 0.3 | 1.8 ± 0.5 | 0.7 ± 0.2 |
| (XIII d) | 5.7 ± 0.2 | 1.6 ± 0.3 | 5.7 ± 1.4 | 5.5 ± 1.2 | 24.4 ± 4.6 | 4.7 ± 1.8 |
| (XVa) | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| (XVb) | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| (XVc) | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| Сунитиниб | 2.4 ± 0.3 | 1.0 ± 0.5 | 2.7 ± 0.4 | 1.2 ± 0.3 | 2.9 ± 0.3 | 1.3 ± 0.2 |

своих исследованиях мы в качестве гелевой матрицы использовали Матригель, лиофилизированный природный внеклеточный матрикс. Как отмечалось ранее, соединения (IV) и (XIII d) обладали наибольшей ингибирующей миграцию клеток активностью. Эти соединения в той или иной степени должны блокировать и формирование СПС, так как миграция – основной этап ВМ. Однако в многоступенчатом процессе ВМ могли участвовать и остальные три соединения. И поэтому мы исследовали влияние всех пяти соединений на формирование СПС в 3D-культуре. В контроле, на Матригеле, три типа выбранных нами опухолевых клеток формировали СПС. Когда клетки меланомы росли с соединениями (IV) и (XIII a), формирование СПС ингибировалось на 54.4 и 47.4% соответственно. Сунитиниб ингибировал образование сети из клеток Mel Z – общая длина СПС 64.3% от контроля. На Матригеле можно было видеть наряду с формированием небольших кластеров клеток также “островки” сети, характерные для ВМ. Соединения (XIII b–d) практически не влияли на способность клеток меланомы участвовать в ВМ. Несколько неожиданно сильным оказалось влияние соединения (IV) на формирование СПС клетками рака почки SN-12C, оно ингибировало формирование СПС на 72.7% (рис. 2). Соединения (XIII a, b, d) на тех же клетках ингибировали формирование СПС от 56.4 до 5.3%. Сунитиниб вызывал блокирование СПС из клеток SN-12C – 47.2% от контроля (табл. 3).

Следует отметить, что ни одно из пяти соединений не влияло на формирование СПС клетками РМЖ (данные не приводятся).

Таким образом, синтезированы новые производные гидроксамовой кислоты, связанной с хи-

назолиновым циклом. Изучено их влияние на миграцию опухолевых клеток и формирование СПС. Нами показано, что соединение (IV) заметно блокирует миграцию клеток меланомы, РМЖ и рака почки, определенной по методу “заживления раны”. Также, в присутствии соединения (IV) значительно снижалась способность клеток рака почки к коммуникации, необходимой для формирования СПС. На клетках метастатической меланомы эффект этот был несколько ниже. Ни одно из пяти соединений не оказывало существенного влияния на формирование СПС клетками РМЖ. Становление ВМ – сложный биологический процесс, в котором кроме миграции и гомотипического узнавания клеток задействованы также несколько сигнальных путей. По всей видимости, соединение (IV) каким-то образом вовлекается в драйверные сигнальные пути, под контролем которых находится ВМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все реактивы и растворители получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки. Спектры ЯМР регистрировали на Фурье ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III NanoBay 300 МГц (для ¹H-ЯМР) и 76 МГц (для ¹³C ЯМР). Спектры регистрировали в режиме стабилизации по дейтерию, термостабилизация 25°C, внутренний стандарт – тетраметилсилан) в ДМСO-d₆. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (δ), КССВ – в герцах. Масс-спектры с ионизацией электроспреем (ESI-MS) получали на хроматографической системе Agilent LC/MS 1200 с масс-детектором Agilent Ion Trap 6310. Регистрацию масс-спектров высоко-

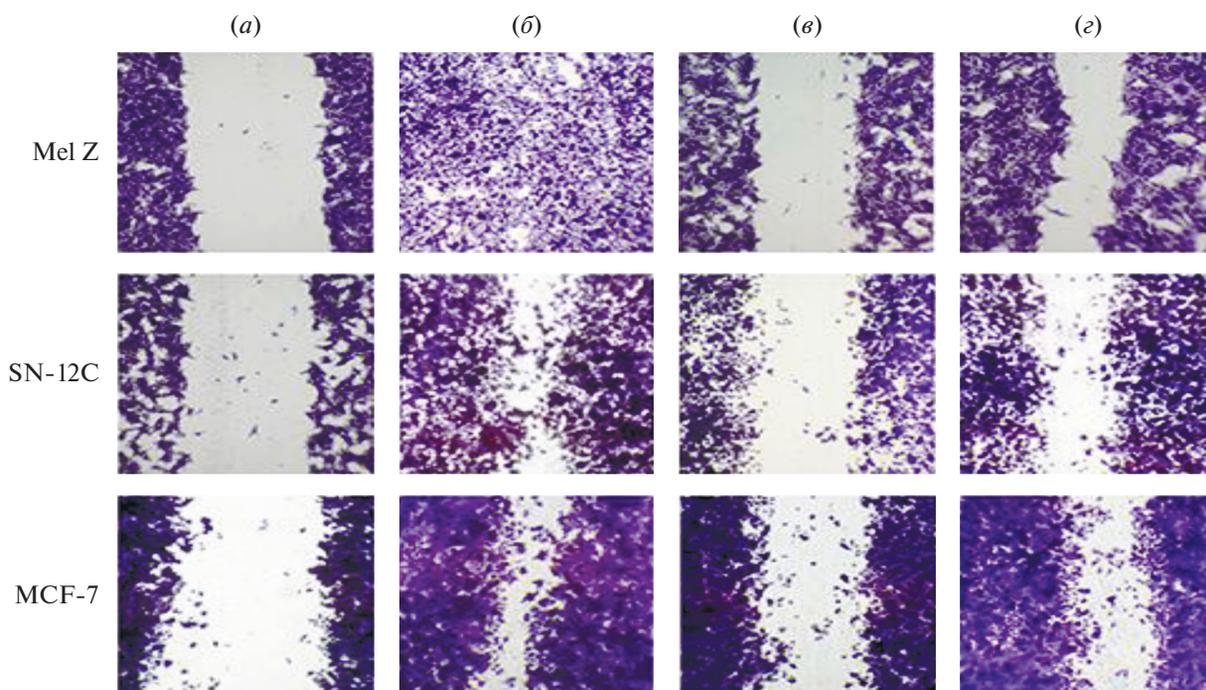


Рис. 1. Ингибирование миграции клеток меланомы Mel Z, рака почки SN-12C и рака молочной железы MCF-7 (окраска трипановым синим). *a* – отрицательный контроль – ширина “раны”; *b* – положительный контроль – прирост монослоя клеток в полной среде через 24 ч, *c* – прирост монослоя клеток в полной среде с соединением (IV) в концентрации IC_{10} через 24 ч, *d* – прирост монослоя клеток в полной среде с сунитинибом в концентрации IC_{10} через 24 ч.

го разрешения проводили с использованием аналитической станции ВЭЖХ-МС Agilent Infinity 1260/Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos в режиме электрораспылительной ионизации. Температуру плавления определяли в открытом капилляре на анализаторе температуры плавления Mettler Toledo MP 90.

Метил (6-аминогексаноат) хлоридрат (Ia). К 50 мл метанола при -5°C прикапывают 6.0 г (50 ммоль) хлористого тионила. Затем прибавляют 6.6 г (25 ммоль) 6-аминогексановой кислоты. Перемешивают при комнатной температуре 3 ча-

са. Отгоняют растворитель в вакууме, добавляют 20 мл метанола и еще раз отгоняют растворитель. Выход 6.9 г (95.0%), белые кристаллы. $^1\text{H-NMR}$: 8.17 (с, 3H), 3.57 (с, 3H), 2.71 (т, $J = 7.4$, 2H), 2.28 (т, $J = 7.4$, 2H), 1.65 – 1.42 (м, 4H), 1.36 – 1.20 (м, 2H). ESI-MS, m/z : 146.1 $[\text{M} + \text{H}^+]$.

Метил(7-аминогептаноат) хлоридрат (Ib). Получают аналогично из 7-аминогептановой кислоты. Выход 54.2%, белые кристаллы $^1\text{H-NMR}$: 8.11 (уш.с, 3H), 3.57 (с, 3H), 2.77–2.65 (м, 2H), 2.29 (т, 2H, $J = 7.4$), 1.61–1.44 (м, 4H), 1.36 – 1.18 (м, 4H). ESI-MS, m/z 160.1 $[\text{M} + \text{H}^+]$.

Таблица 2. Торможение миграционной активности опухолевых клеток под действием производных гидроксамовой кислоты в концентрациях IC_{10} на клеточных линиях метастатической меланомы человека Mel Z, почечно-клеточного рака SN-12C, раке молочной железы MCF-7

| Соединение OVFV | Торможение миграции для опухолевых клеточных линий (% от клеток без соединений) | | |
|-----------------|---|-------|-------|
| | SN-12C | Mel Z | MCF-7 |
| (IV) | 65.4 | 63.5 | 55.8 |
| (XIIIa) | 58.6 | 48.5 | 64.9 |
| (XIIIb) | 14.1 | 35.5 | 54.1 |
| (XIIIc) | 2.3 | 34.1 | 28.0 |
| (XIIIд) | 45.7 | 62.0 | 69.4 |
| Сунитиниб | 38.5 | 22.3 | 28.9 |

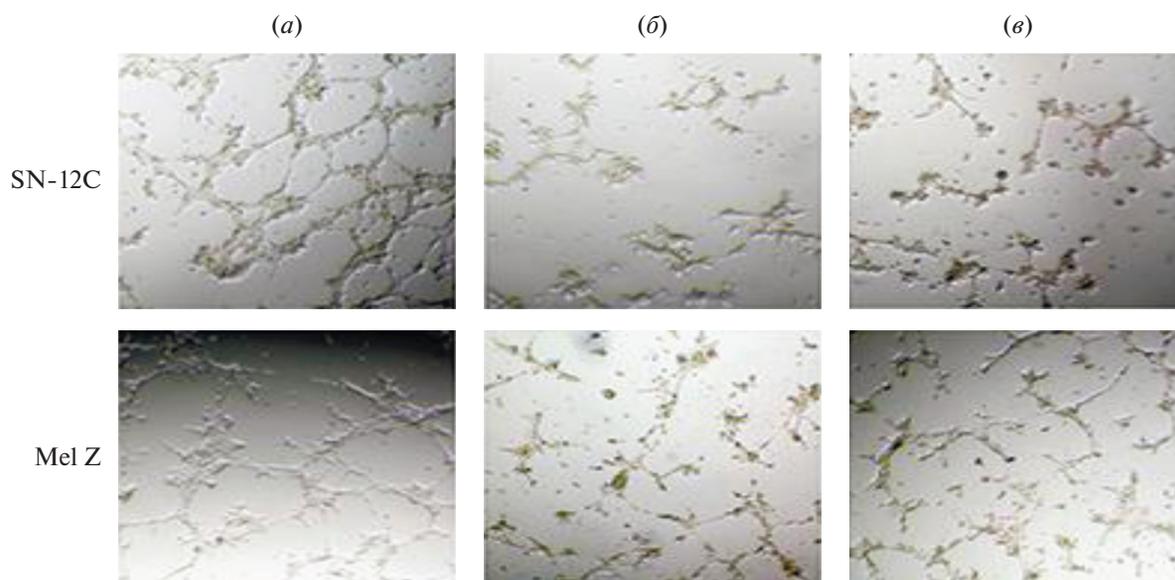


Рис. 2. Влияние соединения (IV) на формирование СПС на Матригеле клетками рака почки SN-12C и клетками меланомы Mel Z. *a* – клетки в полной среде RPMI-1640, *б* – клетки, в полной среде RPMI-1640 с соединением (IV) в концентрации IC₁₀, *в* – клетки, в полной среде RPMI-1640 с сунитинибом в концентрации IC₁₀.

Метил *trans*-4-аминометилциклогексан-1-карбоксилат хлоргидрат (V). Получают аналогично из *trans*-4-аминометилциклогексанкарбоновой кислоты (транексамовой кислоты). Выход 93.4%, белые кристаллы. ¹H ЯМР: 8.14 (уш.с, 3H), 3.57 (с, 2H), 2.60 (д, 2H, *J* = 6.9), 2.24 (тт, 1H, *J* = 12.2, 3.5), 1.97 – 1.75 (м, 4H), 1.64 – 1.47 (м, 1H), 1.28 (кд, 2H, *J* = 12.9, 3.2), 0.97 (кд, 2H, *J* = 12.9, 3.3). ESI-MS, *m/z* 172.1 [M + H⁺].

Метил 6-(2-аминобензамидо)гексаноат (II). Метиловый эфир 6-аминогексановой кислоты 15 г (83 ммоль) растворяют в 20 мл воды, 10%-ным раствором гидрокарбоната натрия доводят pH раствора до 7–8. Полученный раствор приливают к суспензии 10 г (61 ммоль) изатового ангидрида в 100 мл диметилформамида в плоскодонной колбе объемом 250 мл, полученную смесь перемешивают 2 часа при комнатной температуре. Смесь выливают в 200 мл воды, 10%-ным раствором ли-

монной кислоты доводят pH раствора до 3–4. Экстрагируют серным эфиром 2 по 100 мл, органический слой промывают 50 мл воды. Отгоняют растворитель, остаток кристаллизуют из 50 мл гексана. Выход 15.0 г (92%), белые кристаллы, т. пл. 53–55°C. ¹H ЯМР: 8.16 (т, 1H, *J* = 5.7), 7.46 (дд, 1H, *J* = 7.9, 1.5), 7.15–7.08 (м, 1H), 6.68 (дд, 1H, *J* = 8.3, 1.2), 6.36 (уш. с, 2H, NH₂), 3.58 (с, 3H), 3.26–3.13 (м, 2H), 2.30 (т, 2H, *J* = 7.4), 1.64–1.42 (м, 4H), 1.39–1.22 (м, 2H). ESI-MS, *m/z* 265.1 [M + H⁺].

Метил 4-((2-аминобензамидо)метил)циклогексан-1-карбоксилат (VI). Получают аналогично из метилового эфира транексамовой кислоты. Выход 14.3 г (89%), белые кристаллы, т. пл. 100–103°C. ¹H ЯМР: 8.17 (т, 1H, *J* = 5.8), 7.47 (дд, 1H, *J* = 8.0, 1.5), 7.15 – 7.08 (м, 1H), 6.67 (дд, 1H, *J* = 8.2, 1.2), 6.54 – 6.46 (м, 1H), 6.36 (уш. с, 2H, NH₂), 3.58 (с, 3H), 3.06 (т, 2H, *J* = 6.3), 2.33 – 2.17 (м, 1H), 1.90 (дд, 2H, *J* = 13.4, 3.5), 1.77 (дд, 2H, *J* = 13.2, 3.4), 1.59 – 1.40 (м, 1H), 1.28 (кд, 2H, *J* = 13.0, 3.3), 0.96 (кд, 2H, *J* = 12.9, 3.4). ESI-MS, *m/z* 292.2 [M + H⁺].

2-Амино-*N*-(6-(гидроксиамино)-6-оксогексил)-бензамид (III). К раствору 2.64 г (0.01 моля) соединения (II) в 30 мл метанола прибавляют 30 мл раствора гидроксиламина в метаноле, полученного из 1.15 г (0.05 моля) натрия и 2.10 г (0.03 моля) хлоргидрата гидроксиламина. Перемешивают реакционную смесь 6 часов при комнатной температуре. Отгоняют метанол в вакууме, добавляют 20 мл воды, подкисляют 5%-ной лимонной кислотой до pH 4, отфильтровывают осадок, промывают 10 мл воды. Выход 2.20 г (83.3%), белые кристаллы, т. пл. 125–126°C. ¹H ЯМР: 10.28 (с, 1H,

Таблица 3. Образование СПС под действием производных гидроксамовой кислоты

| Соединение OVFV | Длина СПС в составе сети, (% от контроля) | |
|-----------------|---|-------|
| | SN-12C | Mel Z |
| (IV) | 27.3 | 45.6 |
| (XIIIa) | 43.6 | 52.6 |
| (XIIIb) | 71.8 | 77.2 |
| (XIIIc) | 94.7 | 80.3 |
| Сунитиниб | 47.2 | 64.3 |

NH-OH), 8.60 (с, 1H, NH-OH), 8.11 (т, 1H, CH₂NH, $J = 5.6$), 7.44 (дд, 1H, Ar, $J = 8.0, 1.5$), 7.14–7.08 (м, 1H, Ar), 6.67 (дд, 1H, Ar, $J = 8.2, 1.2$), 6.55–6.45 (м, 1H, Ar), 6.30 (уш. с, 2H, NH₂), 3.19 (тд, 2H, NCH₂, $J = 7.5, 5.6$), 1.95 (т, 2H, COCH₂, $J = 7.5$), 1.51 (м, 4H, 2CH₂), 1.28 (п, 2H, CH₂, $J = 7.5$). ESI-MS, m/z 266.2 [M+H⁺].

4-((2-аминобензамидо)метил)циклогексан-1-гидроксиаминокарбамид (VII). Получают аналогично соединению (III) из 164 мг (1 ммоль) соединения (VI). Выход 97.4%, белые кристаллы. ¹H ЯМР: 10.33 (с, 1H, NH-OH), 8.62 (с, 1H, NH-OH), 8.16 (т, 1H, $J = 5.5$), 7.46 (дд, 1H, Ar, $J = 7.9, 1.1$), 7.12 (тд, 1H, Ar, $J = 8.2, 1.4$), 6.67 (дд, 1H, Ar, $J = 8.1, 1.3$), 6.50 (тд, 1H, Ar, $J = 8.0, 1.1$), 6.34 (уш. с, 2H, NH₂), 3.05 (т, 2H, CH₂, $J = 5.5$), 2.31–2.14 (м, 1H), 1.88 (дд, 2H, CH₂, $J = 13.2, 3.5$), 1.75 (дд, 2H, CH₂, $J = 13.2, 3.5$), 1.57–1.41 (м, 1H), 1.27 (кд, 2H, CH₂, $J = 13.0, 3.3$), 0.95 (кд, 2H, CH₂, $J = 12.9, 3.4$). ESI-MS, m/z 290.3 [M+H⁺].

N-(6-(Гидроксиамино)-6-оксогексил)-2-(хиразолин-4-иламино)бензамид (IV). К раствору 164 мг (1 ммоль) 4-хлорхиразолина в 5 мл ДМФА прибавляют раствор 265 мг (1 ммоль) соединения (III) в 5 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивают при температуре 40–50°C в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры. Осадок отфильтровывают, промывают 5 мл ДМФА, 2 × 10 мл серного эфира. Выход 384 мг (97.6%), светло-бежевые кристаллы, т. пл. 180.8–187.5°C. ¹H ЯМР: 12.60 (с, 1H, NH-OH), 10.33 (с, 1H, NH-OH), 8.98 (д, 1H, NH, $J = 1.2$), 8.90 (т, 1H, CH₂NH, $J = 5.6$), 8.72 (с, 1H, Ar), 8.66 (с, 1H, Ar), 8.17 (д, 1H, Ar, $J = 8.2$), 7.95–7.81 (м, 3H, Ar), 7.75 (т, 1H, Ar, $J = 7.5$), 7.60 (т, 1H, Ar, $J = 7.4$), 7.19 (тд, 1H, Ar, $J = 7.6, 1.2$), 3.18 (тд, 2H, $J = 6.9, 4.7$), 1.94 (т, 2H, COCH₂, $J = 7.3$), 1.62–1.45 (м, 4H, CH₂), 1.38–1.21 (м, 2H, CH₂). ¹³C ЯМР: 169.58, 169.24, 169.17, 157.23, 154.73, 149.78, 140.26, 140.11, 133.73, 132.38, 128.72, 128.55, 127.82, 122.73, 121.89, 121.34, 115.97, 32.65, 28.99, 26.54, 25.32. HRMS: m/z 394.1874 [M]⁺. Вычислено для (C₂₁H₂₃N₅O₃)⁺: 394.1877.

N-((4-(гидроксикарбамоил)циклогексил)метил)-2-(хиразолин-4-иламино)бензамид (VIII). Получают аналогично соединению (IV) из 164 мг (1 ммоль) 4-хлорхиразолина и 291 мг (1 ммоль) соединения (VII). Выход 97.4%, белые кристаллы, т. пл. 200.6–201.8°C. ¹H ЯМР: 12.48 (с, 1H, NH-OH), 10.32 (с, 1H, NH-OH), 8.94 (д, 1H, NH, $J = 1.2$), 8.87 (т, 2H, CH₂NH, $J = 5.0$), 8.71 (с, 1H, Ar), 8.62 (с, 1H, Ar), 8.16 (д, 1H, Ar, $J = 7.8$), 7.95–7.80 (м, 3H, Ar), 7.75 (т, 1H, Ar, $J = 7.2$), 7.60 (т, 1H, Ar, $J = 7.8$), 7.20 (т, 1H, Ar, $J = 7.6$), 3.18 (т, 2H, CH₂, $J = 6.3$), 2.01–1.85 (м, 1H, CH), 1.79 (д, 2H, CH₂, $J = 12.7$), 1.64 (д, 2H, CH₂, $J = 11.8$), 1.34 (кв, 2H, CH₂, $J = 12.6$), 0.95 (кв, 2H, CH₂, $J = 12.4$). ¹³C

ЯМР: 172.23, 172.15, 168.89, 156.87, 156.78, 154.36, 149.54, 139.72, 139.56, 133.22, 131.90, 128.33, 128.26, 127.29, 122.31, 121.38, 115.52, 45.33, 45.21, 41.18, 36.77, 29.67, 28.62. HRMS: m/z 420.2030 [M]⁺. Вычислено для (C₂₃H₂₅N₅O₃)⁺: 420.2034.

4-(Хиразолин-4-иламино)бензойная кислота (X). К раствору 230 мг (2 ммоль) 4-хлорхиразолина в 5 мл ДМФА прибавляют раствор 300 мг (2 ммоль) метил 4-аминобензоата в 5 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивают при температуре 40–50°C в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры. Осадок отфильтровывают, промывают 5 мл ДМФА, 2 × 10 мл серного эфира. К полученному соединению (IX) добавляют раствор 120 мг (3 ммоль) NaOH в смеси 5 мл воды и 10 мл метанола. Смесь кипятят 2 часа, добавляют 10 мл воды, подкисляют 5%-ной лимонной кислотой до pH 4, отфильтровывают осадок, промывают 10 мл воды. Выход 416 мг (78.5%), белые кристаллы, т. пл. 296.1–299.2°C (разл.). ¹H ЯМР: 10.67 (с, 1H, OH), 8.85 (с, 1H, NH), 8.68 (д, 1H, Ar, $J = 8.3$), 8.06–7.97 (м, 5H, Ar), 7.87 (д, 1H, Ar, $J = 7.2$), 7.79 (т, 1H, Ar, $J = 7.7$).

Метил 6-((4-(хиразолин-4-иламино)бензоил)амино)гексаноат (XIa). К раствору 642 мг (2 ммоль) ТВТУ, 304 мг (2 ммоль) гидрата гидроксибензотриазола и 606 мг (6 ммоль) N-метилморфолина в 20 мл ДМФА прибавляют 530 мг (2 ммоль) соединения (X), затем 362 мг (2 ммоль) хлоргидрата метил 6-аминогексаноата. Перемешивают 5 часов при комнатной температуре. Добавляют 30 мл воды и экстрагируют 2 × 25 мл этилацетата, органический слой промывают 20 мл 5%-ной лимонной кислоты, 10 мл воды, 10 мл 5%-ного раствора бикарбоната натрия, 10 мл воды. Отгоняют растворитель в вакууме. Выход 576 мг (73.5%) бежевые кристаллы. ESI-MS, m/z 393.2 [M + H⁺]. Без дополнительной очистки использовали в дальнейших синтезах.

Метил 7-((4-(хиразолин-4-иламино)бензоил)амино)гептаноат (XIb). Получали аналогично соединению (XIa) с использованием 390 мг (2 ммоль) хлоргидрата метил 7-аминогептаноата. Выход 610 мг (75.1%). ESI-MS, m/z 407.3 [M + H⁺]. Без дополнительной очистки использовали в дальнейших синтезах.

N-(6-(гидроксиамино)-6-оксогексил)-4-(хиразолин-4-иламино)бензамид (XIa). К раствору метилата натрия, полученному растворением натрия (92 мг, 4.00 ммоль) в метаноле (10 мл) при 0°C, добавляют гидрохлорид гидроксиламина (208 мг, 3.00 ммоль), перемешивают при 0°C в течение 20 мин, затем прибавляют соединение (XIa) (392 мг, 1 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5-ти часов (ТСХ контроль), добавляют 10 мл воды, подкисляют 5%-ной соляной кислотой до pH 4–5, отгоняют метанол. Выпавший осадок отфильтровывают.

вают, промывают водой, и сушат на воздухе. Выход 320 мг (81.2%), белые кристаллы, т. пл. 212.9°C. ^1H ЯМР: 10.34 (с, 1H, NH-OH), 9.94 (с, 1H, NH-OH), 8.67 (уш. с, 2H, NH + Ar), 8.59 (д, 1H, Ar, $J = 8.3$), 8.37 (т, 1H, CH₂NH, $J = 5.5$), 8.01 (д, 2H, Ar, $J = 8.5$), 7.93–7.79 (м, 4H, Ar), 7.67 (т, 1H, Ar, $J = 7.5$), 3.30–3.19 (м, 1H, CH₂NH), 1.96 (т, 2H, COCH₂, $J = 7.3$), 1.61 – 1.45 (м, 4H, CH₂), 1.38–1.20 (м, 2H, CH₂). HRMS: m/z 394.1800 [M]⁺. Вычислено для (C₂₁H₂₃N₅O₃)⁺: 394.1877.

***N*-(7-(гидроксиамино)-7-оксогептил)-4-(хиназолин-4-иламино)бензамид (XIIb)**. Получают аналогично соединению XIIa из 406 мг (1 ммоль) соединения XIIb. Выход 310 мг (76.1%), белые кристаллы, т. пл. 237.8–238.3°C. ^1H ЯМР: 10.34 (с, 1H, NHOH), 9.95 (с, 1H, NHON), 8.66 (уш. с, 2H, NH + Ar), 8.60 (д, 1H, Ar, $J = 8.4$), 8.37 (т, 1H, CH₂NH, $J = 5.6$), 8.01 (д, 2H, Ar, $J = 8.4$), 7.93–7.79 (м, 4H, Ar), 7.67 (т, 1H, Ar), 3.30–3.18 (м, 2H, CH₂), 1.95 (м, 2H, CH₂, $J = 7.3$), 1.60–1.41 (м, 4H, 2CH₂), 1.39–1.24 (м, 4H, 2CH₂). ^{13}C ЯМР: 169.19, 165.62, 157.49, 154.33, 149.74, 141.72, 133.21, 129.35, 127.88, 127.63, 126.47, 123.08, 121.00, 115.22, 32.25, 29.13, 28.39, 26.28, 25.12. HRMS: m/z 408.2030 [M]⁺. Вычислено для (C₂₂H₂₅N₅O₃)⁺: 408.2034.

***N*-Гидрокси-6-(2-(4-хлорфенил)-4-оксо-1,2-дигидрохиназолин-3(4H)-ил)гексамид (XIIIa)**. Раствор 265 мг (1 ммоль) соединения (III) и 147 мг (1.05 ммоль) 4-хлорбензальдегида в 5 мл этанола перемешивают при кипении в атмосфере аргона в течение 6 часов, отгоняют растворитель в вакууме. Полученный твердый остаток растирают в 5 мл диэтилового эфира и сушат на воздухе. Выход 289 мг (74.8%), т. пл. 111.4–112.3°C. ^1H ЯМР: 10.31 (с, 1H, NH-OH), 7.63 (д, 1H, Ar, $J = 7.4$), 7.45–7.29 (м, 4H, Ar), 7.19 (т, 1H, Ar, $J = 7.6$), 6.70–6.57 (м, 2H, Ar), 5.86 (с, 1H, N-CH-N), 3.96–3.79 (м, 1H, NCH₂), 2.79–2.64 (м, 1H, NCH₂), 1.91 (т, 2H, COCH₂, $J = 7.3$), 1.61–1.37 (м, 4H, 2CH₂), 1.33–1.16 (м, 2H, CH₂CH₂-CO). HRMS: m/z 388.1422 [M]⁺. Вычислено для (C₂₀H₂₂ClN₃O₃)⁺: 388.1426.

***N*-Гидрокси-6-(2-(3-метоксифенил)-4-оксо-1,2-дигидрохиназолин-3(4H)-ил)гексамид (XIIIb)**. Раствор 265 мг (1 ммоль) соединения (III) и 147 мг (1.05 ммоль) 4-хлорбензальдегида в 5 мл этанола перемешивают при кипении в атмосфере аргона в течение 6 часов, отгоняют растворитель в вакууме. Полученный твердый остаток растирают в 5 мл диэтилового эфира и сушат на воздухе. Выход 299 мг (78.1%), т. пл. 119.0–120.2°C. ^1H ЯМР: 10.31 (с, 1H, NH-OH), 7.66 (дд, 1H, Ar, $J = 7.9, 1.6$), 7.28 (тд, 1H, Ar, $J = 8.2, 1.8$), 7.18 (тд, 1H, Ar, $J = 7.6, 1.4$), 7.13 (д, 1H, Ar, $J = 7.6$), 7.05 (д, 1H, Ar, $J = 8.2$), 6.86 (т, 1H, Ar, $J = 7.5$), 6.70–6.60 (м, 2H, Ar), 6.14 (с, 1H, N-CH-N), 3.96–3.82 (м, 1H, NCH₂), 3.70 (с, 3H, OCH₃), 2.80–2.63 (м, 1H, NCH₂), 1.91 (т, 2H, CO-

CH₂, $J = 7.3$), 1.63–1.40 (м, 4H, 2CH₂), 1.37–1.17 (м, 2H, CH₂-CH₂-CO). ^{13}C ЯМР: 169.09, 162.22, 159.31, 146.18, 142.77, 133.13, 129.64, 127.34, 118.14, 117.15, 115.03, 114.22, 113.25, 112.36, 69.81, 55.05, 44.29, 32.17, 27.22, 25.94, 24.85. HRMS: m/z 384.1918 [M]⁺. Вычислено для (C₂₁H₂₅N₃O₄)⁺: 384.1922.

***N*-Гидрокси-6-(2-(4-метокси)-3-(2-фторфенокси)метилфенил)-4-оксо-1,2-дигидрохиназолин-3(4H)-ил)гексамид (XIIIc)**. Раствор 159 мг (0.60 ммоль) соединения (III) и 164 мг (0.63 ммоль) 4-метокси-3-(2-фторфенокси)метилбензальдегида в 5 мл метанола перемешивают при кипении в атмосфере аргона в течение 6 часов, отгоняют растворитель в вакууме. Полученный твердый остаток растирают в 5 мл диэтилового эфира и сушат на воздухе. Выход 301 мг (98.8%), т. пл. 102.8–104.7°C. ^1H ЯМР: 10.30 (с, 1H, NH-OH), 7.61 (дд, 1H, Ar, $J = 7.8, 1.6$), 7.42 (д, 1H, Ar, $J = 2.3$), 7.32–7.06 (м, 6H, Ar), 7.03 (д, 1H, Ar, $J = 8.6$), 6.98–6.88 (м, 1H, Ar), 6.67–6.58 (м, 2H, Ar), 5.79 (с, 1H, N-CH-N), 5.06 (с, 2H, OCH₂), 3.88–3.80 (м, 2H, NCH₂), 3.79 (с, 3H, OCH₃), 2.74–2.58 (м, 1H, NCH₂), 1.90 (т, 2H, CO-CH₂, $J = 7.3$), 1.60–1.33 (м, 4H, 2CH₂), 1.25–1.11 (м, 2H, 2CH₂). ^{13}C ЯМР: 169.11, 162.21, 157.04, 153.46, 150.24, 146.28, 146.23, 146.15, 133.06, 132.96, 127.41, 127.35, 124.78, 124.74, 124.23, 121.31, 121.22, 117.08, 116.15, 115.92, 115.42, 114.98, 114.19, 110.94, 69.64, 65.66, 55.68, 44.04, 32.19, 27.12, 25.97, 24.83. HRMS: m/z 508.2242 [M]⁺. Вычислено для (C₂₈H₃₀FN₃O₅)⁺: 508.2246.

Метил 6-(9,10-диметокси-5,11-диоксоиндоло[2,1-а]хиназолин-6(5H,6aH,11H)-ил)гексаноат (XIV). Раствор 264 мг (1.0 ммоль) соединения (IIa) и 242 мг (1.15 ммоль) 2,3-диметокси-6-формилбензойной кислоты в 5 мл хлорбензола в присутствии каталитического количества *n*-толуолсульфокислоты моногидрата кипятят в течение 4-х часов, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 мл диэтилового эфира. Выпавший осадок отфильтровывают, сушат на воздухе. Выход 392 мг (89%), белые кристаллы, т. пл. 123.9–124.4°C. ^1H ЯМР: 8.04–7.90 (м, 2H, Ar), 7.75–7.64 (м, 1H, Ar), 7.60 (д, 1H, Ar, $J = 8.3$), 7.46 (д, 1H, Ar, $J = 8.3$), 7.36 (т, 1H, Ar, $J = 7.6$), 6.40 (с, 1H, NCHN), 3.92 (с, 3H, OCH₃), 3.91 (с, 3H, OCH₃), 3.71–3.63 (м, 2H, NCH₂), 3.56 (с, 3H, CO₂CH₃), 2.22 (т, 2H, CH₂, $J = 7.3$), 1.56–1.35 (м, 4H, 2CH₂), 1.34–1.07 (м, 2H, CH₂). ESI-MS, m/z 439.5 [M + H⁺].

6-(9,10-диметокси-5,11-диоксоизоиндоло[2,1-а]хиназолин-6(5H,6aH,11H)-ил)-N-гидроксигексанамид (XIIIId). К раствору метилата натрия, полученному растворением 69 мг (3 ммоль) натрия в метаноле (7 мл) при 0°C, добавляют 139 мг (2 ммоль) гидрохлорида гидроксиламина, перемешивают при 0°C в течение 20 мин, затем прибавляют 378 мг (0.86 ммоль) соединения (XIV). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение

ние 3-х часов (ТСХ контроль), добавляют 5 мл воды, подкисляют 5%-ной соляной кислотой до рН 4–5, упаривают метанол. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой, и сушат на воздухе. Выход 200 мг (52.9%), белые кристаллы, т. пл. 136.1–141.8°C. ^1H ЯМР: 10.31 (с, 1H, NHON), 8.65 (с, 1H, Ar), 7.97 (д, 1H, Ar, $J = 6.9$), 7.94 (д, 1H, Ar, $J = 7.3$), 7.68 (т, 1H, Ar, $J = 7.9$), 7.59 (д, 1H, Ar, $J = 8.3$), 7.47 (д, 1H, Ar, $J = 8.3$), 7.36 (т, 1H, Ar, $J = 7.6$), 6.40 (с, 1H, NCHN), 3.92 (с, 3H, OCH_3), 3.91 (с, 3H, OCH_3), 3.79–3.54 (м, 2H, NCH_2), 1.88 (т, 2H, COCH_2 , $J = 7.3$), 1.54–1.36 (м, 4H, 2CH_2), 1.34–1.10 (м, 2H, CH_2). ^{13}C ЯМР: 169.05, 162.71, 162.58, 153.83, 147.09, 136.51, 133.07, 130.75, 128.32, 124.99, 123.82, 121.64, 120.46, 120.24, 117.53, 68.85, 61.84, 56.44, 41.97, 32.13, 27.66, 25.80, 24.80. HRMS: m/z 440.1816 $[\text{M}]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6)^+$: 440.1819.

3-Гидрокси-2-(3-(4-метокси-(2-фторфенокси)метил)-фенил)-2,3-дигидрохиназолин-4(1H)-он (XVa). Смесь 0.30 г (2 ммоль) 2-аминобензгидроксиамовой кислоты и 0.52 г (2 ммоль) 3-((2-фторфенокси)метил)-4-метоксибензальдегида в 7 мл метанола в присутствии каталитического количества пара-толуолсульфонокислоты моногидрата кипятят с обратным холодильником в течение 4-х часов в атмосфере аргона, охлаждают до температуры -15°C и оставляют на 8 часов. Выпавший осадок отфильтровывают, фильтрат упаривают в вакууме, полученный остаток растирают с 10 мл диэтилового эфира, сушат на воздухе. Выход 0.62 г (79%), кристаллы телесного цвета, т. пл. 209.7°C (разл.). ^1H NMR: 9.64 (с, 1H, NOH), 7.65 (дд, 1H, Ar, $J = 8.0, 1.6$), 7.54 (д, 1H, NH , $J = 2.3$), 7.41 (дд, 1H, Ar, $J = 8.5, 2.3$), 7.36 (д, 1H, $J = 1.8$), 7.28–7.15 (м, Ar, 4H), 7.15–7.03 (м, Ar, 2H), 7.01–6.88 (м, Ar, 1H), 6.76–6.63 (м, Ar, 2H), 5.87 (д, 1H, $J = 1.7$), 5.07 (с, 2H, CH_2), 3.81 (с, 3H). ^{13}C ЯМР: 162.94, 157.35, 153.41, 150.18, 146.48, 146.35, 146.22, 134.59, 133.35, 131.74, 131.70, 129.50, 128.52, 128.39, 127.28, 127.19, 127.10, 124.85, 124.80, 121.31, 121.23, 121.15, 117.34, 114.06, 110.75, 74.60, 65.80, 55.74. HRMS: m/z 395.1402 $[\text{M}]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{FN}_2\text{O}_4)^+$: 395.1405.

6-Гидрокси-6,6а-дигидроизоиндоло[2,1-а]хиназолин-5,11-дион (XVb). Раствор 0.45 г (3.30 ммоль) гидроксиамида антралиновой кислоты и 0.50 г (3.30 ммоль) 2-формилбензойной кислоты в присутствии каталитического количества пара-толуолсульфонокислоты моногидрата в 13 мл хлорбензола кипятят в течение 7-ми часов, реакционную смесь упаривают досуха и растирают с 10 мл диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают, сушат на воздухе до постоянного веса. Выход 0.77 г (96%), белые кристаллы, т. пл. $198–199^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР: 9.41 (с, 1H, NOH), 8.08 (дд, 1H, Ar, $J = 8.2, 0.6$), 7.97 (дд, 1H, Ar, $J = 7.8, 1.6$), 7.89 (уш. д, 2H,

Ar, $J = 8.1$), 7.79 (тд, 1H, Ar, $J = 7.4, 1.3$), 7.74–7.64 (м, 2H, Ar), 7.35 (тд, 1H, Ar, $J = 7.6, 1.1$), 6.52 (с, 1H, NCHN). ^{13}C ЯМР: 165.26, 164.88, 139.55, 136.41, 133.68, 133.22, 131.27, 130.58, 128.22, 126.72, 125.24, 123.85, 120.00, 119.25, 72.72. HRMS: m/z 267.0764 $[\text{M}]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3)^+$: 267.0769.

6-Гидрокси-9,10-диметокси-6,6а-дигидроизоиндоло[2,1-а]хиназолин-5,11-дион (XVc). Раствор 0.45 г (3.30 ммоль) амида антралиновой кислоты и 0.80 г (3.80 ммоль) 6-формил-2,3-диметоксибензойной кислоты в присутствии каталитического количества пара-толуолсульфонокислоты моногидрата в 15 мл хлорбензола кипятят в течение 7-ми часов, реакционную смесь упаривают досуха и растирают с 10 мл диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают, сушат на воздухе до постоянного веса. Выход 0.94 г (92%), белые кристаллы, т. пл. 240°C (разл.). ^1H ЯМР: 9.28 (с, 1H, NOH), 8.04 (д, 1H, Ar, $J = 7.8$), 7.95 (дд, 1H, Ar, $J = 7.8, 1.6$), 7.68 (тд, 1H, Ar, $J = 7.8, 1.6$), 7.52 (д, 1H, Ar, $J = 8.3$), 7.44 (д, 1H, Ar, $J = 8.3$), 7.33 (тд, 1H, Ar, $J = 7.6, 1.1$), 6.36 (с, 1H, NCHN), 3.91 (с, 3H, OCH_3), 3.88 (с, 3H, OCH_3). ^{13}C ЯМР: 164.76, 163.40, 153.81, 146.70, 136.47, 133.51, 131.79, 128.13, 125.16, 123.26, 122.27, 120.25, 119.39, 117.80, 71.65, 61.76, 56.50. HRMS: m/z 327.0903 $[\text{M}]^+$. Вычислено для $(\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5)^+$: 327.0979.

Культивирование клеточных линий

В работе были использованы линии клеток меланомы Mel Z, выведенных в клеточную линию из метастатических узлов большой меланомы кожи, проходившей лечение в “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России [18]. Клетки рака молочной железы MCF-7 (ATCC® HTB-22™) и клетки рака почки SN-12C [19] были получены из банка клеточных культур “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России.

Опухолевые клетки линии Mel Z и SN-12C культивировали на полной ростовой среде RPMI-1640 (Gibco), содержащей 10% ЭТС (HyClone), 2 мМ глутамина, 50 мг/мл пенициллина-стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) на культуральных флаконах (Eppendorf) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Клетки MCF-7 культивировали на полной ростовой среде DMEM (Gibco), содержащей 10% ЭТС (HyClone), 2 мМ глутамина, 50 мг/мл пенициллина-стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) на культуральных флаконах (Eppendorf) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 2–3 дня.

МТТ тест

Цитотоксическую активность соединений оценивали с помощью стандартного МТТ-теста с использованием МТТ-реагента (3,4,5-диметилтиа-

зол-2-ил-2,5-дифенилтетразолиум бромид), основанного на способности дегидрогеназ живых метаболически активных клеток восстанавливать МТТ-реагент до голубых нерастворимых кристаллов формазана. Для каждого соединения строили график зависимости “концентрация—эффект” и определяли IC_{50} и IC_{10} при помощи программы GraphPad Prism 5.0 (GraphPad). Ошибка измерений в экспериментах не превышала 5%.

Опухолевые клетки линий MCF-7, Mel Z и SN-12C (5×10^4 клеток/мл) вносили в лунки 96-луночного планшета (Nunc) в полной ростовой среде RPMI-1640 или DMEM (для MCF-7), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка – ЭТС (HyClone), 2 mM глутамин, 50 мг/мл пенициллина-стрептомицина (“ПанЭко”, Россия). Спустя 24 часа наносили соединения в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-10} и инкубировали в течение 48 часов, затем добавляли в каждую лунку по 10 мкл раствора МТТ в конечной концентрации 0.5 мг/мл, (Sigma, Chemical Co, США). Клетки инкубировали еще 4 часа, далее клетки осаждали центрифугированием планшетов при 1000 об./мин в течение 3 мин на центрифуге Hettich 460R (Hettich), среду отбирали и добавляли к клеткам 200 мкл ДМСО. Клетки ресуспендировали и инкубировали 10 мин при 37°C, после чего немедленно определяли оптическую плотность раствора формазана на микропланшетном фотометре Multiskan FC при 570 нм (Thermo Scientific), используя ДМСО как нулевой контроль.

Метод оценки блокирования миграционной способности клеток по методу “заживления раны”

Опухолевые клетки (3×10^5 клеток/мл) вносили в лунки 24-луночного планшета (Nunc) в среде RPMI-1640 или DMEM содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка – ЭТС (HyClone), 2 mM глутамин, 50 мг/мл пенициллина-стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) и инкубировали до образования монослоя. Затем монослой нарушали путем соскабливания части клеток по прямой через центр лунки (наконечником 200 мкл). В течение 24 часов клетки инкубировали в полной культуральной среде RPMI-1640 или DMEM, содержащей 10% ЭТС, 2 mM глутамин и нецитотоксические концентрации IC_{10} каждого из исследуемых соединений. В качестве отрицательного контроля, определяющего ширину “раны”, использовали клетки, культивируемые в бессывороточной среде RPMI-1640 или DMEM, положительным контролем, определяющим максимальный прирост монослоя клеток в область “раны”, являются клетки, растущие в полной среде RPMI-1640 или DMEM с 10% ЭТС без соединений. В качестве препарата сравнения использовали суни-

тиниб в нецитотоксической концентрации 1 мкМ (Selleckchem). После окончания инкубирования, монослой клеток на планшетах, дважды промывают PBS и окрашивают его красителем трипановым синим (“ПанЭко”). Результаты ингибирования миграционной активности определяли как соотношение (в процентах) прироста площади монослоя клеток под действием исследуемых соединений по отношению к приросту клеток в положительном контроле. Ширину раны в отрицательном контроле используют в качестве базового значения для расчета ширины “раны”.

Культивирование клеток в 3D-системе

Матригель (Corning) размораживали при 4°C и наносили по 100 мкл лунки 24-луночного планшета (Nunc) на лед и оставляли в стерильных условиях для полимеризации матрикса в течение 1 часа при комнатной температуре и 30 мин при 37°C в CO_2 инкубаторе. Клетки линий Mel Z и SN-12C в концентрации 4×10^5 клеток/мл в полной ростовой среде RPMI-1640 (Gibco), содержащей 10% ЭТС, наносили на гель и инкубировали при 37°C в течение 12 ч с добавлением исследуемых соединений в нецитотоксических концентрациях (IC_{10}). В качестве положительного контроля использовали клетки, инкубируемые в среде RPMI-1640 (Gibco), содержащей 10% ЭТС без добавления исследуемых соединений. После окончания инкубации делали серию фотоснимков образовавшейся сети сосудистоподобных структур при помощи цифровой фотокамеры (Canon) и оценивали длину сосудисто-подобных структур из опухолевых клеток в составе замкнутой сети при помощи программы Image J v.1.73 (NIH, USA, freeware).

Статистический анализ

Все эксперименты проводились 3 раза независимо друг от друга. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Различия считались статистически значимыми, когда значения P были менее 0.05. Все статистические анализы были выполнены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, Сан-Диего, Калифорния, США).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-11-2018-172 от 03.12.18). Уникальный идентификатор проекта RFME-FI62418X0051.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Persy I.S., Wick J.Y., Kaufman B.* // *Nature Rev. Clin. Onc.* 2009. V. 6. P. 569–577.
2. *Azam, F., Mehta, S., Harris, A.L.* // *Eur. J. Cancer.* 2010. V. 46. P. 1323–1332.
3. *Maniotis A., Folberg R., Hess A., Sefor E.A., Gardner L.M., Pe'er J., Trent J.M., Meltzer P.S., Hendrix M.J.* // *Am. J. Pathol.* 1999. V. 55. P. 739–752.
4. *Zhang S., Zhang D., Sun B.* // *Cancer Lett.* 2007. V. 254. P. 157–164.
5. *Van der Schaft W., Sefor R.E., Sefor E.A., Hess A.R., Gruman L.M., Kirschmann D.A., Yokoyama Y., Griffioen A.W., Hedrix M.J.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 2004. V. 96 (19). P. 1473–1477.
6. *Berube G.* // *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2016. V. 11(3). P. 281–305.
7. *Yoon S., Eom G. H.* // *Chonnam Medical Journal.* 2016. V. 52 (1). P. 1–11.
8. *Giannini G., Battistuzzi G., Vignola D.* // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2015. V. 25(3). P. 459–461.
9. *Rao M., Valentini D., Zumla A., Maeurer M.* // *The International Journal of Infectious Diseases.* 2018. V. 69. P. 78–84.
10. *Muri E.M., Nieto M.J., Sindelar R.D., Williamson J.S.* // *Current Medicinal Chemistry.* 2002. V. 9. P. 1631–1653.
11. *Ahmad S., Ahmad I.* // *Medicinal Chemistry Communications.* 2017. V. 8. P. 871–885.
12. *Asif M.* // *International Journal of Medicinal Chemistry.* 2014. Article ID 395637.
13. *Folkman J.* // *Curr. Mol. Med.* 2003. V. 3. P. 643–651.
14. *Hillen F., Griffioen A.W.* // *Cancer Metastasis Rev.* 2007. V. 26. P. 489–502.
15. *Vartanian A., Golubeva I., Shprakh Z.* // *Horizons in Cancer Res.* 2017. V. 65. P. 13–34.
16. *Sashidhara K.V., Palnati G.R., Dodda R.P., Avula S.R., Swami P.* // *Synlett.* 2013. V. 24. P. 105–113.
17. *Vailhe B., Vittet D., Feige J.* // *Lab. Invest.* 2001. V. 81. P. 439–452.
18. *Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Baryshnikov A.Yu. et al.* // *Vest. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2005. V. 7. P. 37–40.
19. *Naito S., von Eschenbach A.C., Giavazzi R., Fidler I.J.* // *Cancer Res.* 1986. V. 46. P. 4109–4115.

The Influence of Hydroxamic Acid Derivatives on Vasculogenic Mimicry

A. A. Vartanian*, **D. A. Khochenkov***, **Yu. A. Khochenkova***, **Yu. S. Machkova***, **D. S. Khachatryan****, **A. V. Kolotaev****, **A. N. Balaev*****, **K. A. Ohmanovich*****, and **V. N. Osipov***, #

#Phone: +7 (916) 412-61-43; e-mail: ovn65@yandex.ru

**Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe sh., 24, Moscow, 115478 Russia*

***National Research Center Kurchatov Institute – IREA, pl. Ak. Kurchatova 1, Moscow, 123098 Russia*

****JSC Pharm-Sintez, ul. Vavilova 15, Moscow, 121357 Russia*

In recent years, another mechanism of tumor vascularization has been identified that does not involve endothelial cells, a process called vasculogenic mimicry (VM). VM describes the unique ability of highly aggressive tumor cells to form vessel-like networks by virtue of their high plasticity. The formation of vascular channels lined with tumor cells is typical for those areas of the tumor where there is a low density of blood vessels. It is assumed that the formation of a channel network within the tumor is expected to maintain homeostasis and prevent premature necrosis within the tumor. Bifunctional compounds based on the combination of quinazoline and hydroxamic acid in one molecule on their ability to inhibit the migration of tumor cells and vasculogenic mimicry were studied.

Keywords: quinazoline, hydroxamic acid, melanoma, breast cancer, kidney cancer, migration, vasculogenic mimicry



УДК 577.151.35, 577.113.4:577.2.08

СПОСОБ ЭМУЛЬСИОННОЙ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ ДНК-БИБЛИОТЕК С ВЫРОЖДЕННОЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТЬЮ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ

© 2020 г. В. Е. Кузнецова*, В. Е. Шершов*, Р. А. Мифтахов*,
С. А. Лапа*, А. С. Заседателев*, Э. Н. Тимофеев*, А. В. Чудинов*.*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 27.09.2019 г.

После доработки 07.10.2019 г.

Принята к публикации 05.11.2019 г.

Для эмульсионной ПЦР-амплификации комбинаторных библиотек олигонуклеотидов оптимизированы условия стабильной генерации эмульсий “вода-в-масле” с каплями оптимального размера при использовании 3% силиконового эмульгатора ABIL EM 180 с добавлением 0.5% Triton X100 в минеральном масле в режиме контролируемого механического перемешивания.

Ключевые слова: аптамеры, SELEX, эмульсионная ПЦР, ePCR, ABIL EM 180

DOI: 10.31857/S0132342320020128

Аптамерами называются короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, обладающие определенной пространственной структурой и, благодаря этому, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами-мишенями различной природы [1]. Аптамеры получают направленным отбором *in vitro* из комбинаторных библиотек олигонуклеотидов, содержащих вырожденные последовательности длиной 40 нт, фланкированные константными участками длиной около 20 нт, которые при селекции используют в качестве зон отжига праймеров для ПЦР-амплификации [2].

Важным этапом при селекции аптамеров из библиотеки олигонуклеотидов является проведение реакции амплификации после раунда отбора (SELEX) связавшихся с молекулой-мишенью вариантов аптамеров [3]. Применение традиционного метода ПЦР приводит к избирательному накоплению ампликонов, а также к появлению длинноцепочечных ПЦР-продуктов [4–6], образование которых можно минимизировать проведением ПЦР в водно-масляной эмульсии. Высокоэффективная ПЦР в эмульсии предполагает проведение процесса в миллионах изолирован-

ных микрореакторов и позволяет получить тысячи копий единственного фрагмента ДНК. Принцип проведения эмульсионной ПЦР заключается в добавлении водного раствора компонентов ПЦР в смесь минерального масла и эмульгатора с таким расчетом, чтобы каждая молекула ДНК оказалась в изолированной водной микрокапле [6]. Этот подход позволяет минимизировать потери отдельных исходных матриц [7]. Для того чтобы выполнять манипуляции с эмульсией, такие, как воспроизводимая генерация, амплификация при высокой температуре, перенос эмульсии, важно использовать эмульгаторы, дающие стабильные эмульсии воды в масле. В большинстве случаев такие эмульгаторы являются амфифильными молекулами с гидрофобными и гидрофильными группами [8]. Наиболее простым решением этих задач является использование высокоэффективных биосовместимых эмульгаторов (Span 80, Tween 20, Triton X100 [6, 9]; ABIL EM 90 и Triton X100 [6, 10, 11]; ABIL EM 180 [12]; Span 80 и brij 35 [13], Span 80 и brij L4 [14]) и минерального, а также синтетического (Tegosoft Dec, ABIL WE09) масла [15, 16]. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) адсорбируются на границе раздела “масло–вода” и снижают поверхностное натяжение, что препятствует сливанию капель и придает им метастабильность [17]. Взаимодействие биологических молекул (белков, ДНК, РНК) с границей раздела “масло–вода” может привести к денатурации и локализации молекул на поверхности [18]. Диффузия молекул в масляную фазу может привести к

Сокращения: SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения); ПАВ – поверхностно-активные вещества; эПЦР – эмульсионная полимеразная цепная реакция.

* Автор для связи: (тел.: +7 (499) 135-98-00; факс (495) 135-14-05; эл. почта: chud@imbr.ru).

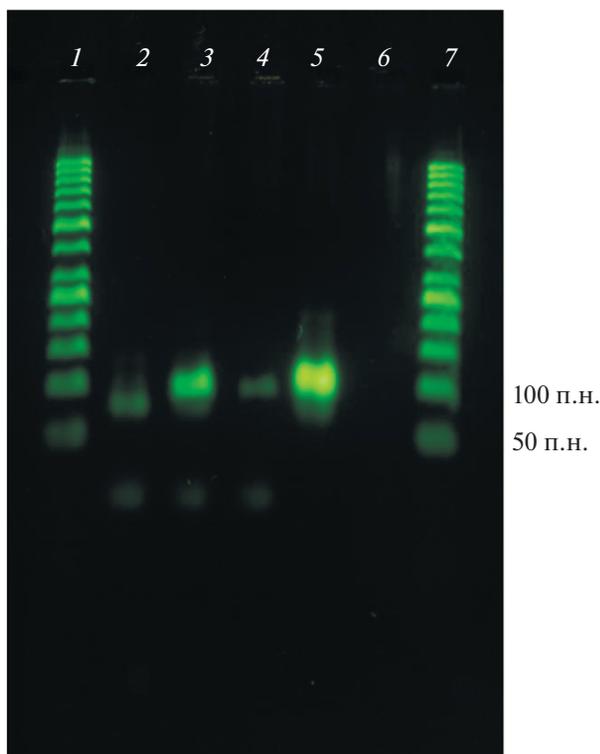


Рис. 1. Гель-электрофорез в 2% агарозном геле продуктов эмульсионной ПЦР-амплификации ДНК-библиотеки, полученных с добавлением BSA в концентрации 0, 0,5, 1 мг/мл (дорожки 2–4 соответственно). Положительный контроль, продукты традиционной ПЦР-амплификации ДНК-библиотеки (дорожка 5), отрицательный контроль – результаты эмульсионной ПЦР-амплификации ДНК-библиотеки, полученные при отсутствии матрицы (дорожка 6); маркеры длин дцДНК GeneRuler 50 п.н. (дорожки 1 и 7).

потере ПЦР-продукта и перекрестной контаминации в микрокаплях [19].

В качестве непрерывной фазы применяли минеральное масло (Sigma-Aldrich Corp., США) с добавлением ПАВ, представленных в табл. 1. ABIL EM 180 [12, 17] обладает хорошей термостабильностью и совместимостью с электролитами, а его применение в парфюмерной промышленности свидетельствует о хорошей биосовместимости. В качестве дисперсной фазы использовали раствор ПЦР-смеси постоянного состава. По результатам исследований определены режимы и условия стабильной генерации эмульсий с каплями оптимального размера, такие как температура, интенсивность перемешивания, концентрации ПАВ и дисперсной фазы.

Воспроизводимые результаты при формировании эмульсии получены при использовании ABIL EM 180 с концентрацией 3% с добавлением 0,5% Triton X100 в режиме механического перемешивания со скоростью 1400 об./мин. Было показано, что сочетание состава масляной фазы и раз-

ных видов магнитных перемешивающих элементов позволяет добиться устойчивой генерации эмульсии с микрокаплями оптимального размера (табл. 1).

Скорость перемешивания оказывает сильное влияние на размер микрокапель дисперсной фазы в эмульсиях, получаемых методом механического перемешивания. Экспериментально найдено, что при недостаточно высокой скорости перемешивания происходит коалесценция (слияние) капель в получаемой эмульсии, а увеличение интенсивности перемешивания (центрифуга – вортекс Микроспин FV-2400) приводит к уменьшению размера капель, что в свою очередь снижает выход продуктов амплификации ДНК в ходе эмульсионной ПЦР.

Нами изучено влияние концентрации эмульгатора и доли дисперсной фазы на эффективность амплификации комбинаторной библиотеки ДНК, которая непосредственно связана с размером микрокапель дисперсной фазы. С ростом концентрации ПАВ до определенного предела средний размер капель в эмульсиях уменьшается [20], в то время как низкая концентрация эмульгатора приводит к коалесценции капель. Такое же влияние оказывает высокая концентрация дисперсной фазы, при которой водные микрокапли находятся на более близком расстоянии друг от друга, что приводит к их слиянию и увеличению диаметра.

Для проведения эмульсионной ПЦР оптимизированы различные параметры, такие как начальная концентрация матрицы, температура отжига и концентрация праймеров, концентрация ДНК-полимеразы. Помимо температурной устойчивости капель начальная концентрация матрицы является наиболее важным параметром эмульсионной ПЦР. Слишком высокая концентрация ДНК-матрицы в реакционной смеси ингибирует ПЦР, а также приводит к неспецифической амплификации.

Другим важным параметром является концентрация бычьего сывороточного альбумина (BSA), который добавляют к дисперсной фазе [11, 16]. Присутствие глобулярного белка в водной микрокапле необходимо для предотвращения сорбции ДНК-полимеразы на поверхности раздела фаз “масло-вода” и ее денатурации. Экспериментально определена оптимальная концентрация BSA, составившая 0,5 мг/мл, для проведения ПЦР-амплификации с высокой эффективностью (рис. 1). Отсутствие BSA или его высокая концентрация в дисперсной фазе привела к резкому уменьшению эффективности ПЦР-амплификации.

Результаты исследований по изучению температурной стабильности эмульсии показали, что добавление 3% ABIL EM 180 и 0,5% Triton X100 в минеральное масло позволяет обеспечить температурную устойчивость эмульсии (72°C в течение,

Таблица 1. Условия получения водно-масляной эмульсии

| Состав эмульсии | Емкость | Каталожный номер | Магнитный перемешивающий элемент, тefлон | Каталожный номер | Стабильность эмульсии после проведения ПЦР | ПЦР продукт | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------------|--|------------------|--|-------------|--------------------------------------|-------------------------|---|-----|
| 3% ABIL EM 180— 0.5% Triton X100* | Пробирка 2 мл, типа Эппендорф, с замком Safe-Lock | Erpendorf-0030123344 | Круглый цилиндрический, 2 × 7 мм | Brand, 137106 | + | +/- | | | | |
| | | | | | | | Эллиптический, 5 × 10 мм | Brand, 137300 | + | +/- |
| | | | | | | | | | | |
| 3% ABIL EM 180— 0.05% Triton X100* | Пробирка 2 мл, с юбкой, с резьбой | SSI-2340-00 | Круглый цилиндрический, 3 × 8 мм | Brand, 137104 | + | +/- | | | | |
| | | | | | | | Nunc (Thermo Scientific) NC TSI-3-D2 | FV-2400 | + | +/- |
| | | | | | | | | | | |
| 5% Span 80—0.5% brjij L4* | Пробирка 2 мл, типа Эппендорф, с замком Safe-Lock | Erpendorf-0030123344 | Круглый цилиндрический, 3 × 8 мм | Brand, 137104 | + | +/- | | | | |
| | | | | | | | Nunc (Thermo Scientific) NC TSI-3-D2 | Sigma-Aldrich, 23226 | - | - |
| | | | | | | | | | | |
| 5% Span 80—0.5% brjij L4* | Пробирка 2 мл, с юбкой, с резьбой | SSI-2340-00 | Круглый цилиндрический, 3 × 8 мм | Brand, 137104 | + | - | | | | |
| | | | | | | | Nunc (Thermo Scientific) NC TSI-3-D2 | Sigma-Aldrich, 23226 | - | - |
| | | | | | | | | | | |

* В минеральном масле; +/- — ПЦР продукт присутствует в незначительном количестве.

как минимум, 4 ч), что необходимо для реализации ПЦР-амплификации. Таким образом, в работе продемонстрированы преимущества и условия проведения ПЦР в водно-масляной эмульсии для амплификации комбинаторных библиотек олигонуклеотидов с высокой степенью эффективности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Библиотеку одноцепочечных ДНК (оцДНК-библиотеку) получали стандартными методами синтеза однонитевых олигонуклеотидов, при синтезе вырожденной части в реакцию добавляли смесь всех четырех производных дезоксирибонуклеотидов. Для ферментативного получения немодифицированной универсальной иницирующей ДНК-библиотеки сконструированы и синтезированы матричные олигонуклеотиды с вырожденной центральной частью и взаимно комплементарными фланкирующими частями (5'–3'):

матрица GCT CCT GAC GAT CGA CGA CCG AG-(N)₄₀-GCA ACT GCA GCA TGC TTC GCA TT;

прямой праймер GCT CCT GAC GAT CGA CGA CCG AG;

обратный праймер AAT GCG AAG CAT GCT GCA GTT GC.

Для создания органической фазы эмульсионной ПЦР использовали минеральное масло (Sigma-Aldrich, США), эмульгатор Abil EM 180 (Evonik, Германия), Triton X100 (Sigma Aldrich, США). Предварительно получали эмульсию ABIL EM 180 с концентрацией 3% с добавлением 0.5% Triton X100 в минеральном масле в режиме механического перемешивания со скоростью 1000 об./мин при 50°C в течение 8 ч. Полученную эмульсию хранили при 5°C, перед использованием тщательно перемешивали на магнитной мешалке в течение 15 мин при комнатной температуре. Водно-масляную эмульсию получали при использовании пробирки типа Эппендорф с замком объемом 2 мл и магнитного перемешивающего элемента (Sigma-Aldrich, 23226, США). Охлажденный до 5°C раствор ПЦР-смеси (100 мкл) в течение 2 мин добавляли порциями по 13 мкл к раствору масляной фазы (600 мкл) при перемешивании на магнитной мешалке (Heidolph MR Hai-tes, Германия) при 1400 об./мин на льду и продолжали перемешивание в течение 6 мин.

Водная фаза содержала 10-кратный ПЦР-буфер (Sibenzyme, США), 2.5 mM MgSO₄, dATP, dCTP, dGTP и dTTP (Thermo Scientific, США), каждый в концентрации 0.4 mM, праймеры прямой и обратный, каждый в концентрации 0.6 мкМ, матрицу в концентрации 0.01 нМ, 0.5 мг/мл BSA (Fermentas, США) и ДНК-полимеразу Taq (Sibenzyme, США) в концентрации 0.1 ед. акт./мкл.

Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере (Bio Rad DNA Engine DYAD Thermal Cycler, США) с использованием активного точного режима регулирования температуры и следующего температурно-временного профиля: предварительный прогрев при 95°C в течение 5 мин, за которым следовали 30 циклов: 95°C – 30 с, 65°C – 30 с, 72°C – 1 мин. Завершающую элонгацию проводили при 72°C в течение 5 мин.

Полученные продукты ПЦР выделяли из водно-эмульсионной смеси последовательной экстракцией диэтиловым эфиром и н-бутанолом с переосаждением 2% раствором перхлората лития в ацетоне [6].

Для проведения электрофореза использовали 2% агарозный гель в буфере TBE (Sigma-Aldrich, США). Пробы смешивали с буфером для нанесения, содержащим краситель SYBRGreen (Sigma-Aldrich, США). Электрофорез проводили в буфере TBE при напряжении 110 В. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе (LKB, Швеция).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ МК № 18-29-09151\18.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vincent J.B. Ruigrok. Selection and characterization of DNA aptamers. 2013. 160 p.
2. Gold L., Ayers D., Bertino J., Bock C., Bock A., Brody E., Carter J., Dalby A., Eaton B., Fitzwater T., Flather D., Forbes A., Foreman T., Fowler C., Gawande B., Goss M., Gunn M., Gupta S., Halladay D., Heil J., Heilig J., Hicke B., Husar G., Janjic N., Jarvis T., Jennings S., Katilius E., Keeney T., Kim N., Koch T., Kraemer S., Kroiss L., Le N., Levine D., Lindsey W., Lollo B., Mayfield W., Mehan M., Mehler R., Nelson S., Nelson M., Nieuwlandt D., Nikrad M., Ochsner U., Ostroff R., Otis M., Parker T., Pietrasiewicz S., Resnicow D., Rohloff J., Sanders G., Sattin S., Schneider D., Singer B., Stanton M., Sterkel A., Stewart A., Stratford S., Vaught J., Vrkljan M., Walker J., Watrobka M., Waugh S., Weiss A., Wilcox S., Wolfson A., Wolk S., Zhang C., Zichi D. // PLoS One. 2010. V. 5. № 12. e15004.

3. *Sefah K., Shangguan D., Xiong X., O'Donoghue M.B., Tan W.* // *Nat. Protoc.* 2010. V. 5. № 6. P. 1169–1185.
4. *Nakano M., Komatsu J., Matsuura S., Takashima K., Katsura S., Mizuno A.* // *J. Biotechnol.* 2003. V. 102. № 2. P. 117–124.
5. *Musyanovych A., Mailänder V., Landfester K.* // *Bio-macromolecules.* 2005. V. 6. № 4. P. 1824–1828.
6. *Williams R., Peisajovich S.G., Miller O.J., Magdassi S., Tawfik D.S., Griffiths A.D.* // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. № 7. P. 545–550.
7. *Антонова О.С., Рудницкая Г.Е., Тупик А.Н., Буляница А.Л., Евстапов А.А., Курочкин В.Е.* // *Научное приборостроение.* 2011. Т. 21. № 4. С. 5–21.
8. *Baret J.C.* // *Lab on a Chip.* 2012. V. 12. № 3. P. 422–433.
9. *Keke Shao, Weifeng Ding, Feng Wang, Haiquan Li, Da Ma, Huimin Wang* // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 9. e24910.
10. *Schaerli Y., Wootton R.C., Robinson T., Stein V., Dunsby C., Neil M., French P., Demello A., Abell C., Hollfelder F.* // *Analyt. Chem.* 2008. V. 81. № 1. P. 302–306.
11. *Murgha Yu. E., Rouillard J.-M., Gulari E.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. e94752.
12. *Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Jr., Rubtsova M.P., Kartseva O.V., Gomzikova M.O., Moskovtsev A.A., Bukatin A.S., Dubina M.V., Kostryukova E.S., Babenko V.V., Vakhitova M.T., Manolov A.I., Malakhova M.V., Kornienko M.A., Tyakht A.V., Vanyushkina A.A., Ilina E.N., Masson P., Gabibov A.G., Altman S.* // *PNAS.* 2017. V. 114. № 10. P. 2550–2555.
13. *Chang Y.T., Hung C.H., Chou H.L.* // *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 2014. V. 49. № 14. P. 1672–1684.
14. *Pandit K.R., Rueger P.E., Calabrese R.V., Raghavan S.R., White I.M.* // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2015. V. 126. P. 489–495.
15. *Diehl F., Li M., He Y., Kinzler K.W., Vogelstein B., Dressman D.* // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. № 7. P. 551–559.
16. *Witt M., Phung N.L., Stalke A., Walter J.-G., Stahl F., von Neuhoff N., Scheper T.* // *Engineering in Life Sciences.* 2017. V. 17. P. 953–958.
17. *Белоусов К.И., Евстапов А.А., Кухтевич И.В., Посмитная Я.С.* Основы нанотехнологий. Часть 1, Часть 2. Учебное пособие. СПб: Университет ИТМО, 2015. 55 с.
18. *Roach L.S., Song H., Ismagilov R.F.* // *Analyt. Chem.* 2005. V. 77. № 3. P. 785–796.
19. *Derkach S.R.* // *Adv. Colloid and Interface Sci.* 2009. V. 151. № 1. P. 1–23.
20. *Liu W., Sun D., Li C., Liu Q., Xu J.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2006. V. 303. P. 557–563.

Amplification of Random DNA Libraries in Aptamer Selection by Water-in-Oil Emulsion

V. E. Kuznetsova*, V. E. Shershov*, R. A. Miftahov*, S. A. Lapa*, A. S. Zasedatelev*,
E. N. Timofeev*, and A. V. Chudinov*, #

#Phone: +7(499)135-98-00; fax: +7(495)135-14-05; e-mail: chud@eimb.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The conditions of stable generation of emulsions with drops of optimal size were selected using ABIL EM 180 silicone emulsifier with concentration of 3% with addition of 0.5% Triton X100 in mineral oil in the mode of controlled mechanical mixing for amplification of combinatorial libraries of oligonucleotides.

Keywords: aptamer, SELEX, emulsion PCR, ePCR, ABIL EM 180