СОДЕРЖАНИЕ

Том 47, номер 1, 2021

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

Синтетические аналоги капсулярных полисахаридов *Streptococcus pneumoniae* и иммуногенная активность гликоконъюгатов (обзорная статья)

М. Л. Генинг, Е. А. Курбатова, Н. Э. Нифантьев 3

Гликоконъюгатные вакцинные препараты для иммунопрофилактики заболеваний, вызываемых *Haemophilus influenzae* типа *b* (обзорная статья)

Е. А. Хатунцева, Н. Э. Нифантьев 29

Защитные группы как стереоконтролирующий фактор в реакциях гликозилирования (обзорная статья)

А. И. Токатлы, Д. З. Винницкий, Н. Е. Устюжанина, Н. Э. Нифантьев 57

Направленная доставка с применением углеводных систем: ожидания и реальность (обзорная статья)

Е. С. Щегравина, А. А. Сачкова, С. Д. Усова, А. В. Нючев, Ю. А. Грачева, А. Ю. Федоров 76

Селективное ацетилирование первичной гидроксильной группы в метил-*D*-гексопиранозидах смесью уксусного ангидрида и уксусной кислоты

Ю. Е. Цветков, Д. В. Яшунский, Н. Э. Нифантьев 106

Гетероциклические аналоги ресвератрола – синтез и физиологическая активность. Часть 1. Аналоги, полученные заменой арильных фрагментов на гетероциклические структуры

А. В. Семенов, Е. В. Семенова, О. И. Балакирева 111

Превращения хромофора при созревании хромобелка из *Actinia equina*

А. А. Пахомов, А. А. Пастухова, Г. В. Тишкин, В. И. Мартынов 128

Физико-химические свойства фотоконвертируемого флуоресцентного белка из *Montastraea cavernosa*

А. Ю. Фролова, А. А. Пахомов, В. И. Мартынов 135

Влияние субхронического введения пептида HLDF-6 на эффективность исследовательского поведения мышей линий Balb/c и C57Bl/6

Г. И. Ковалев, Е. В. Васильева, Р. М. Салимов, Ю. А. Золотарев, А. К. Дадаян, А. П. Богачук, В. М. Липкин 144

Галлоцианин как флуороген для выявления NADPH-зависимой продукции супероксидного анион-радикала клетками крови

О. М. Панасенко, В. Е. Реут, И. В. Бородина, Д. С. Матюшкина, В. А. Иванов, Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, А. В. Соколов, С. Н. Черенкевич 153

Противоопухолевая активность монасникотиновой кислоты, выделенной из гриба *Aspergillus cavernicola*

Г. К. Рысцов, Т. В. Антипова, К. В. Зайцев, М. Ю. Земскова 162

Письмо редактору

Стирольные производные индола и пиранона как флуорогенные субстраты для белка FAST

А. И. Соколов, И. Н. Мяснянко, Н. С. Балеева, М. С. Баранов 173

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 3–28

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 612.017.12:579.862.1:57.083.3

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Streptococcus pneumoniae* И ИММУНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОКОНЪЮГАТОВ

© 2021 г. М. Л. Генинг*, Е. А. Курбатова, Н. Э. Нифантьев*,#**

**Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский проспект, 47*

***НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а*

Поступила в редакцию 30.07.2020 г.
После доработки 14.08.2020 г.
Принята к публикации 15.08.2020 г.

Грамположительные бактерии *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) вызывают тяжелые заболевания у взрослых и детей. Установлено, что некоторые капсулярные полисахариды клинически значимых серотипов *S. pneumoniae* в составе коммерческих полисахаридных и конъюгированных пневмококковых вакцин обладают низкой иммуногенностью. В обзоре рассмотрены методы получения и структурные особенности синтетических олигосахаридов “проблемных” серотипов пневмококка, характеризующихся низкой иммуногенностью вследствие деструкции или нежелательной модификации в процессе их выделения и очистки; серотипов, вызывающих тяжелые пневмококковые заболевания, а также серотипов, не входящих в состав конъюгированных пневмококковых вакцин. Показано, что синтетические олигосахариды, соответствующие протективным гликотопам капсулярных полисахаридов различных серотипов *S. pneumoniae*, индуцируют образование протективных опсонизирующих антител и формирование иммунологической памяти. Представлены оптимальные конструкции олигосахаридов эпидемиологически значимых серотипов *S. pneumoniae*, которые могут быть использованы для создания синтетических пневмококковых вакцин и диагностических тест-систем для обнаружения заражений *S. pneumoniae*, а также контроля эффективности вакцинации.

Ключевые слова: пневмококки, *вакцина*, *олигосахарид*, *лиганд*, *иммуноген*, *антитела*, *опсонофагоцитоз*, *протективная активность*

DOI: 10.31857/S0132342321010073

ВВЕДЕНИЕ

Грамположительные бактерии *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) вызывают тяжелые инвазивные и неивазивные заболевания у детей и взрослых и способны персистировать на слизистой оболочке носоглотки здоровых носителей, не вызывая клинических проявлений инфекции. Большая часть штаммов пневмококка окружена полисахаридной капсулой. На основе структурно различающихся между собой капсулярных полисахаридов (КП), экспрессируемых *S. pneumoniae*, идентифицировано более 90 серотипов пневмококка [1–3].

По критерию тяжести течения пневмококковые инфекции можно разделить на инвазивные и неинвазивные. К инвазивным пневмококковым инфекциям традиционно относят бактериемию, менингит, пневмонию и другие патологические состояния, при которых возбудитель выделяют из обычно стерильных органов и тканей (кровь, цереброспинальная жидкость, реже – синовиальная, плевральная и перикардиальная жидкости). Среди неинвазивных форм болезни выделяют инфекции верхних дыхательных путей (средний отит, параназальный синусит), нижних дыхательных путей (бронхит), а также другие относительно редко регистрируемые инфекции (конъюнктивит, перитонит, артрит, полиартрит и др.). Инвазивные пневмококковые заболевания могут завершаться летально, особенно у детей младшего возраста, пожилых людей и иммунокомпрометированных лиц [4, 5]. Тяжесть течения пневмококковой ин-

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin); CD – антиген кластеров дифференцировки клеток; CRM197 – нетоксичная форма рекомбинантного дифтерийного анатоксина (белок-носитель); *D*-AAT – 2-ацетамидо-4-амино-2,4,6-тридеокси-*D*-галактоза; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IFNγ – интерферон гамма; IL – интерлейкин; KLH – гемоцианин лимфы улитки; mAb – моноклональные антитела; MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; NK – натуральные киллеры; TLR – Toll-подобный рецептор; TNFα – фактор некроза опухолей альфа; КП – капсулярный полисахарид.

[#] Автор для связи: (тел./факс: +7 (499) 135-87-84; эл. почта: nen@ioc.ac.ru).

фекции зависит от серотипа *S. pneumoniae* [6–11]. Так, *S. pneumoniae* серотипов 3, 6B, 19A, 19F и 23F имеют хорошо развитую капсулу, относятся к серотипам с низкой инвазивной активностью и вызывают заболевания, ассоциированные с высоким риском летального исхода, преимущественно у иммунокомпрометированных лиц. Серотипы 1, 7F, 4, 9N, 9V и 14 со средним или высоким инвазивным потенциалом и тонкой капсулой наиболее часто вызывают заболевания у здоровых лиц, действуя как первичные патогены [12, 13].

Эпидемиология *S. pneumoniae*. Частота распространения различных серотипов пневмококка зависит от локализации инфекции, географического местоположения, возраста [6]. Серотипы пневмококка значительно различаются по вирулентности [6, 7, 14–17]. По данным ВОЗ, в 2007 г. ~80–90% всех пневмококковых заболеваний вызывали 20 серотипов *S. pneumoniae* [18, 19].

В ряде публикаций приведены данные о распространенности различных серотипов пневмококка в США, Азии, Африке, Европе, Латинской Америке, Австралии, Новой Зеландии, Беларуси, Украине и России в разные годы среди детей и взрослых [20–28]. В 2012 г. проведено масштабное эпидемиологическое исследование в шести странах Юго-Восточной Азии по изучению распространенности различных серотипов *S. pneumoniae*. Наиболее часто выделяли серотипы 1, 3, 6B, 14, 19A, 19F и 23F. Существенных различий в доминировании того или иного серотипа в зависимости от региона не выявлено [29].

Показано, что из крови пациентов выделяли преимущественно серотипы 1 и 14, из цереброспинальной жидкости – серотипы 6, 10 и 23, из отделяемого среднего уха детей – серотипы 3, 19 и 23 [8]. Серотипы 6A, 6B, 14, 19F и 23 рассматривают как основные “педиатрические” штаммы пневмококка [4, 30]. В США у детей младшего возраста 80% менингитов вызывали серотипы 14, 6B, 19F, 18C, 23F и 9V, а у детей старше 6 лет на их долю приходилось лишь 50% всех изолятов [6, 31–34].

В Японии с 2011 по 2013 гг. у взрослых с заболеваниями респираторного тракта обнаруживали серотипы 3, 4, 19F и 23F [35]. В двух других исследованиях, проведенных в этом же географическом регионе, доминировал серотип 3 [36, 37]. В 2014–2016 гг. на юго-востоке Аравийского полуострова при инвазивных пневмококковых заболеваниях преобладали серотипы 3, 12, 15, 19A и 19F [38].

В Корее и Испании наиболее часто выявляли штаммы серотипов 3, 6, 11, 19 и 23 [39, 40]. В другом исследовании показано, что в Испании с 2001–2014 гг. преобладали серотипы 1, 3, 7F и 19A. Чаще всего у пациентов с осложнениями, развившимися в период пребывания в стационаре, выявляли *S. pneumoniae* серотипа 3. Наиболее часто из серотипов, не входящих в состав вакцины Prevnar 13® (Pfizer), выявляли серотип 22F. Показано, что значительная часть взрослых, вакцинированных в детстве против пневмококка, болела внебольничной пневмонией, вызванной серотипами, входящими в состав вакцин, которыми они были привиты в детском возрасте. Это определяет необходимость разработки стратегии вакцинации для снижения заболеваемости у взрослых [41]. В США причиной среднего отита чаще всего были серотипы 3, 6, 14, 18, 19 и 23 [30, 42].

При оценке распространенности различных серотипов пневмококка на территории России у детей при носительстве доминировали серотипы 3, 6, 9, 14, 19, 23, в меньшей степени – серотипы 7 и 18 [21]. При остром среднем отите с наибольшей частотой обнаруживали серотип 19, реже серотипы 3, 4, 6, 8, 9, 14, 15, 20, 22 и 23. Преобладающими у детей с внебольничной пневмонией были серотипы 19, в меньшей степени – серотипы 6, 14 и 23; при инвазивной пневмококковой инфекции – серотипы 5 и 1, выделенные из ткани легкого. Преобладающими серотипами, вызывающими инвазивные инфекции, были 8, 19 в заметно меньшей степени, 1, 5 и 23. Распространение серотипов 3, 6, 15 и 19 среди детей с пневмококковыми инфекциями также было отмечено и в других исследованиях [43]. Штаммы были чувствительны к пенициллину, за исключением всех штаммов, относящихся к серотипу 19 [21]. Это согласуется с данными других авторов, которые свидетельствуют о том, что современные штаммы *S. pneumoniae* чувствительны к пенициллину, но устойчивы к макролидам (эритромицин) [38].

Сведения о серотиповом пейзаже пневмококков в Москве ограничены. В Москве в 2000–2007 гг. среди штаммов пневмококка, полученных от больных пневмококковым менингитом, во всех возрастных категориях доминировали серотипы 3, 6 и 19. Ведущими серотипами на территории Москвы являлись серотипы 1, 3, 4, 6B, 6A, 7F, 15A, 15B, 18C и 19F, на долю которых приходилось 63% исследованных штаммов. Сравнение серотипового пейзажа возбудителей, выделенных в 1980–1999 гг., со штаммами 2000–2012 гг. показало различие структуры и долевого участия доминирующих серотипов. Если среди штаммов 1980–1999 гг. преобладающими серотипами (в порядке уменьшения значимости) были 1, 3, 19F, 6A, 7F, 12F, 18C и 19A, то среди культур 2000–2012 гг. доминировали серотипы 3, 19F, 6B, 7F, 15A, 15B, 1, 4 и 6A [44].

Таким образом, сегодня в мире наибольшее клиническое значение имеют серотипы **1**, 2, **3**, 4, 5, **6A/B**, 7F, 8, 9, 11, 12, **14**, 15A/B, 18C, **19A/F**, 20, 22 и **23F**, в России – серотипы **1**, **3**, **4**, **6A/B**, **7F**, 12, 14, **15A/B**, **18C** и **19F** (серотипы, выделенные жирным шрифтом, встречаются с наибольшей частотой). Очевидно, что этот набор штаммов может со временем изменяться, в том числе расширяться

из-за увеличения эпидемиологической значимости других серотипов пневмококков.

Вакцинопрофилактика пневмококковой инфекции. Успех вакцинопрофилактики инфекций, вызываемых *S. pneumoniae*, во многом зависит от степени соответствия серотипного состава вакцины спектру циркулирующих штаммов пневмококка в регионе применения вакцины. В контролируемом испытании 13-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины у детей уровни сывороточных антител ко всем серотипам, входящим в состав вакцины, увеличивались после иммунизации во всех возрастных группах. Образование антител, индуцированных к КП серотипов 6A, 14, 19F и 23F, было слабым у детей до 4.5 лет [45].

При проведении первой фазы клинических испытаний 20-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины, содержащей семь новых серотипов пневмококка (8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F и 33F) и предназначенной для расширения спектра действия уже существующих конъюгированных вакцин (Prevnar 7®, Synflorix® (GSK) и Prevnar 13®), отмечено повышение опсонофагоцитарной активности и концентрации IgG-антител к КП всех серотипов пневмококка, входящих в состав соответствующей вакцины [46].

При проведении клинических испытаний у детей 10-валентной конъюгированной пневмококковой вакцины Synflorix® (зарегистрирована в России), содержащей в своем составе КП *S. pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F и 23F, каждый из которых был индивидуально конъюгирован с протеином D, выделенным из *Haemophilus influenzae*, существенно повышалась концентрация IgG-антител к КП серотипов, входящих в состав вакцины [47]. Вакцинация способствовала уменьшению количества эпизодов инфекции, вызванных вакцинными штаммами, но существенно не влияла на возникновение заболеваний, вызванных невакцинными серотипами пневмококка.

Наибольшее количество эпизодов пневмококкового отита вызвали серотипы 3 (37 случаев), 6B (27 случаев), 14 (23 случая), 19F (67 случаев) и 23F (23 случая). В отношении всех серотипов, за исключением серотипа 3, установлен существенный защитный эффект вакцинации, который варьировал от минимального (в отношении серотипа 19F – 44.4%) до максимального (в отношении серотипа 14 – 95.5%). Что касается серотипа 3, то общее количество эпизодов острого среднего отита в группе, получавшей пневмококковую вакцину, и в контрольной группе составило 20 и 17 соответственно [48]. Отмечено повышение титров антител к КП пневмококка и их опсонизирующей активности [49]. Показано, что в предупреждении острого среднего отита ключевое значение имеют антитела IgG с высокой опсонофагоцитарной активностью, тогда как титр антител не является достаточно информативным показателем [50]. Shiramoto et al. показали, что иммуногенность вакцин Prevnar 13® и Pneumovax® 23 (Merck) у лиц пожилого возраста, которую оценивали по титру антител и их опсонофагоцитарной активности, была ниже для КП серотипа 3 по сравнению с другими серотипами пневмококка, причем при введении обеих исследованных вакцин [51]. При иммунизации полисахаридной пневмококковой вакциной не наблюдалось повышения титра антител к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 у лиц старше 65 лет и взрослых лиц молодого возраста, тогда как к другим исследованным серотипам (1, 5, 6B, 8, и 14) титр антител в обеих группах повышался [52]. На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что иммуногенность КП различных серотипов пневмококка неодинакова [53].

СТРОЕНИЕ КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *S. pneumoniae* И СИНТЕЗ РОДСТВЕННЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН

Разрешенные сегодня к применению пневмококковые вакцины производят при использовании бактериальных КП актуальных серотипов пневмококка или конъюгируют КП с белком-носителем с последующим добавлением адъюванта. КП выделяют из культуральной среды после инактивации патогена [54]. Недостатком традиционных вакцин на основе КП пневмококка является необходимость работы с микробной культурой вирулентных штаммов пневмококка. Очистка КП от бактериальных примесей является весьма трудоемкой, а конъюгация с белком-носителем, необходимая для индукции Т-зависимого иммунного ответа с образованием опсонизирующих IgG-антител и иммунологической памяти – не всегда успешной. Выделенный из культуральной среды КП, даже после проведения очистки, содержит примесь антигенов бактериальной клетки, таких как полисахарид клеточной стенки (тейхоевая кислота или С-полисахарид), нуклеиновые кислоты и др. В результате получают продукт, который химически неоднороден, что может служить препятствием при последующей его конъюгации с белком-носителем [54, 55].

Бактериальные КП состоят из повторяющихся олигосахаридных звеньев различной длины [56], состоящих в случае *S. pneumoniae*, например, из двух (серотип 3) или восьми (серотип 17A) моносахаридных остатков [57]. Антитела, индуцированные к одному эпитопу КП, могут быть протективными, а к другому – нет. Низкая эффективность КП может быть связана в ряде случаев с индивидуальными особенностями отдельных КП, в том числе с возможными различиями конфор-

мационных характеристик КП в составе бактериальной капсулы и в составе вакцины. Это, в свою очередь, может приводить к различию эпитопной специфичности антител, индуцируемых пневмококком и вакциной.

Эпитопы КП *S. pneumonie* могут быть представлены на синтетических олигосахаридах [30], которые также конъюгируют с белком-носителем традиционными химическими методами для получения полусинтетической вакцины. В настоящее время синтезированы олигосахариды для серотипов 1–4, 6A/B, 7F, 8, 9A/V, 12, 14, 17F, 18C, 19A/F, 22F, 23F, 27 и 29 [58, 59]. Для получения олигосахаридов, содержащих несколько повторяющихся единиц, соответствующих структуре КП, используют методы гидролиза КП, химический синтез и биосинтез [58, 59]. Некоторые олигосахариды успешно получены путем гидролиза. Недостатком этого метода являются трудности контролируемого получения олигосахаридов с точки зрения химической структуры, длины олигосахарида и присутствия бактериальных примесей. Химический синтез нескольких повторяющихся звеньев олигосахарида стал доступным, но он достаточно сложный и требует проведения большого количества стадий синтеза. Комбинация химического синтеза и биосинтеза является альтернативным методом, который позволяет получать большие количества олигосахаридов с большой длиной цепи. Информация о биосинтезе синтетических аналогов КП серотипов 3, 14 и 19F известна [58].

Иммунный ответ на олигосахариды является высокоспецифичным. Интересно, что некоторые олигосахариды, конъюгированные с белком-носителем, индуцируют даже более высокий титр антител к КП, чем соответствующие конъюгаты КП [60]. Идентификация иммуногенных гликотопов КП *S. pneumoniae*, обеспечивающих протективные свойства гликоконъюгатных пневмококковых вакцин, является способом повышения их эффективности. Использование коротких олигосахаридов, полученных путем химического синтеза, дает лучшую, чем в случае крупных олигосахаридов или полисахаридов, возможность провести контролируемую конъюгацию и оценить иммуногенность вакцин при варьировании их специфических структурных параметров, например, длины олигосахаридного фрагмента и соотношения углевод/белок [61]. Таким образом, синтетические олигосахариды являются привлекательной альтернативной гетерогенным препаратам очищенных бактериальных КП, на основе которых получены первые коммерческие пневмококковые вакцины [62, 63]. Иммуногенные свойства гликоконъюгатов могут быть оптимизированы за счет использования синтетических антигенных структур, способных вызывать образование протективных антител [52].

В 2015 г. нами был опубликован обзор, посвященный подходам к созданию пневмококковых вакцин на основе синтетических олигосахаридных лигандов, относящихся к углеводным вакцинам третьего поколения [55]. В последние годы работы в данном направлении активно развиваются, и в настоящем обзоре мы рассматриваем все серотипы пневмококка, для которых получены синтетические фрагменты КП и проводятся иммунологические исследования с их участием. Особое внимание уделено наиболее “проблемным” КП некоторых актуальных серотипов пневмококка с большим акцентом на исследования последних лет.

***S. pneumoniae* серотипа 1.** КП высокоинвазивного серотипа 1 имеет особое химическое строение и содержит редкий моносахарид – 2-ацетамидо-4-амино-2,4,6-тридеокси-*D*-галактозу (*D*-AAT) (**1**) [64] (рис. 1). Отмечают, что КП серотипа 1 в составе пневмококковых вакцин является недостаточно эффективным [65]. Показано, что коммерческая гликоконъюгатная вакцина Prevnar 13® индуцирует низкий уровень функциональных антител к КП серотипа 1 (**1**) вследствие возможной модификации протективных эпитопов КП (в частности, аминогрупп) в процессе химической активации и конъюгации с белком-носителем. При химической обработке КП серотипа 1 (**1**) может происходить его деполимеризация и, как следствие, снижение эффективности КП (**1**) в составе пневмококковых вакцин. Установлено, что при конъюгации белка-носителя с моносахаридом (**1**) существует риск деструкции иммуногенных эпитопов [54, 66].

Синтетические олигосахаридные антигены могут быть получены таким образом, что при конъюгации с белком-носителем протективные эпитопы остаются интактными. Олигосахариды (**2**–**5**), соответствующие фрагментам цепи КП серотипа 1 (рис. 1), были синтезированы рядом авторов [67–71]. Показано, что остаток *D*-AAT важен для распознавания КП (**1**). Так, в опытах по изучению взаимодействия синтетических лигандов (**2**–**5**) с антителами сыворотки, специфичной к КП (**1**), установлено, что наилучшим образом связывался именно трисахарид (**4**), соответствующий полному повторяющемуся звену, в то время как дисахарид (**5**), не содержащий остатка *D*-AAT, связывался значительно слабее, а моносахариды (**2**) и (**3**) не связывались совсем.

Восстановлением дисульфидной группы в трисахаридном производном (**4**) до тиольной и последующим взаимодействием с белком CRM197 был получен вакцинный гликоконъюгат (**6**). В используемых условиях не затрагивается аминогруппа в составе *D*-AAT. При иммунизации кроликов конъюгат (**6**) индуцировал образование высоких титров антител, специфичных к КП (**1**), трисахари-

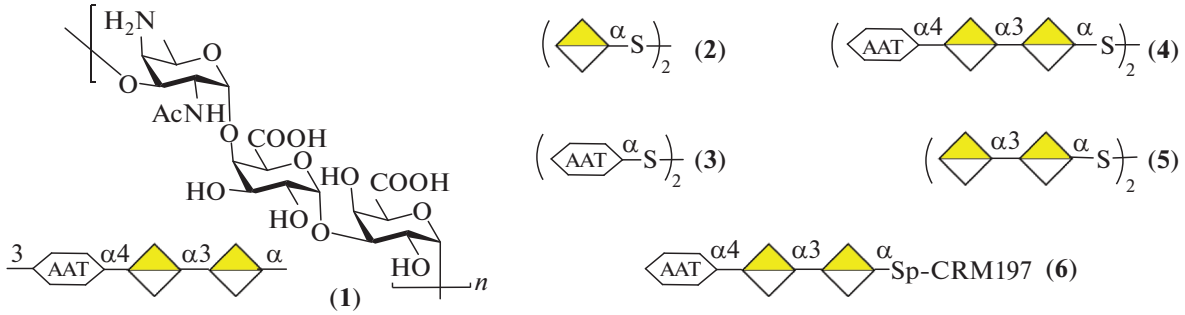


Рис. 1. Строение капсулярного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 1 (повторяющееся звено (**1**)), синтезированных родственных олигосахаридных производных (**2**–**5**) и конъюгата с CRM197 (**6**). Здесь и далее для изображения олигосахаридных последовательностей использованы символьные обозначения моносахаридных остатков.

ду (**4**), а также связывающихся непосредственно с *D*-ААТ (**3**). При этом титры антител к КП (**1**) при иммунизации конъюгатом (**6**) оказались выше, чем в контрольных опытах с Prevnar 13® [64]. С помощью проточной цитометрии показано, что антитела, индуцированные конъюгатом (**6**), лучше связываются с пневмококками серотипа 1, чем антитела, полученные после иммунизации с помощью Prevnar 13®. Антигенсвязывающая способность антител коррелировала с опсонофагоцитарной киллерной активностью. Так, пуловая сыворотка кроликов к конъюгату (**6**) обладала более высокой активностью в отношении пневмококков серотипа 1, чем сыворотка к Prevnar 13®. Более того, антитела, индуцированные конъюгатом (**6**), обладали лучшей опсонизирующей способностью, чем стандартная сыворотка 007sp, рекомендуемая ВОЗ для оценки эффективности пневмококковых вакцин [72]. Антитела к белку-носителю (CRM197) не связывались с *S. pneumoniae* серотипа 1.

Протективную активность иммунных сывороток оценивали в опытах по пассивной иммунизации мышей, подсчитывая количество бактериальных клеток в крови и в бронхоальвеолярной лаважной жидкости после заражения. В качестве групп сравнения использовали сыворотку кроликов, иммунизированных Prevnar 13® и CRM197. При анализе крови и бронхоальвеолярной лаважной жидкости введение сыворотки к конъюгату (**6**) выявило существенное снижение бактериальной нагрузки по сравнению с сыворотками к Prevnar 13® и CRM197. Таким образом, синтезированный конъюгат (**6**) является перспективным кандидатом для вакцины против *S. pneumoniae* серотипа 1 и превосходит по своим протективным характеристикам конъюгат соответствующего КП в составе коммерческой вакцины Prevnar 13® [64].

***S. pneumoniae* серотипа 2.** *S. pneumoniae* серотипа 2 относится к инвазивным штаммам пневмококка, но его КП (**7**) не входит в состав коммерческих конъюгированных пневмококковых вакцин. Для определения структуры протективного олигосахаридного эпитопа была синтезирована серия фрагментов (**8a**–**13a**) повторяющегося звена, а также гексасахарид (**14a**), соответствующий одному повторяющемуся звену КП серотипа 2 [73] (рис. 2). В экспериментах по связыванию этих олигосахаридов с сыворотками, специфичными к КП серотипа 2 (**7**), было показано, что для эффективного взаимодействия важно присутствие боковой цепи α-*D*-GlcA-(1→6)-α-*D*-Glc-(1→2) (**8a**). Был получен конъюгат гексасахарида (**14a**) с CRM197 (**14b**), который стимулировал Т-зависимый и В-клеточный ответ с образованием опсонизирующих антител у мышей, что приводило к киллингу инкапсулированных бактерий вследствие усиления активности фагоцитов. Подкожная имммунизация гликоконъюгатом (**14b**) защищала мышей от интраназального заражения высоковирулентным штаммом серотипа 2 NCTC 7466, снижая бактериальную нагрузку в легочной ткани и крови [73].

***S. pneumoniae* серотипа 3.** КП этого серотипа пневмококка (**15**) характеризуется низкой иммуногенностью [52, 53, 74]. Одной из причин низкой иммуногенности КП серотипа 3, по мнению Choi et al., является необычный путь синтеза его КП (**15**) [75] (рис. 3). В настоящее время установлен механизм синтеза КП для всех известных 94 серотипов пневмококка. Существуют два пути синтеза КП: синтаза-зависимый и *wzy*-зависимый [76–79]. Главное различие между ними состоит в том, что при *wzy*-зависимом синтезе КП ковалентно связан с пептидогликаном клеточной стенки бактерий, тогда как при синтаза-зависимом пути он может отделяться от клеточной стенки. Для большинства серотипов *S. pneumoniae* синтез КП происходит по *wzy*-зависимому пути, и штаммы только двух серотипов 3 и 37 синтезируют КП по синтаза-зависимому пути [77, 80]. *S. pneumoniae* серотипа 37 крайне редко встречается у человека, тогда как серотип 3 является клинически значимым [81]. Показано, что КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (**15**) может быть связан с бакте-

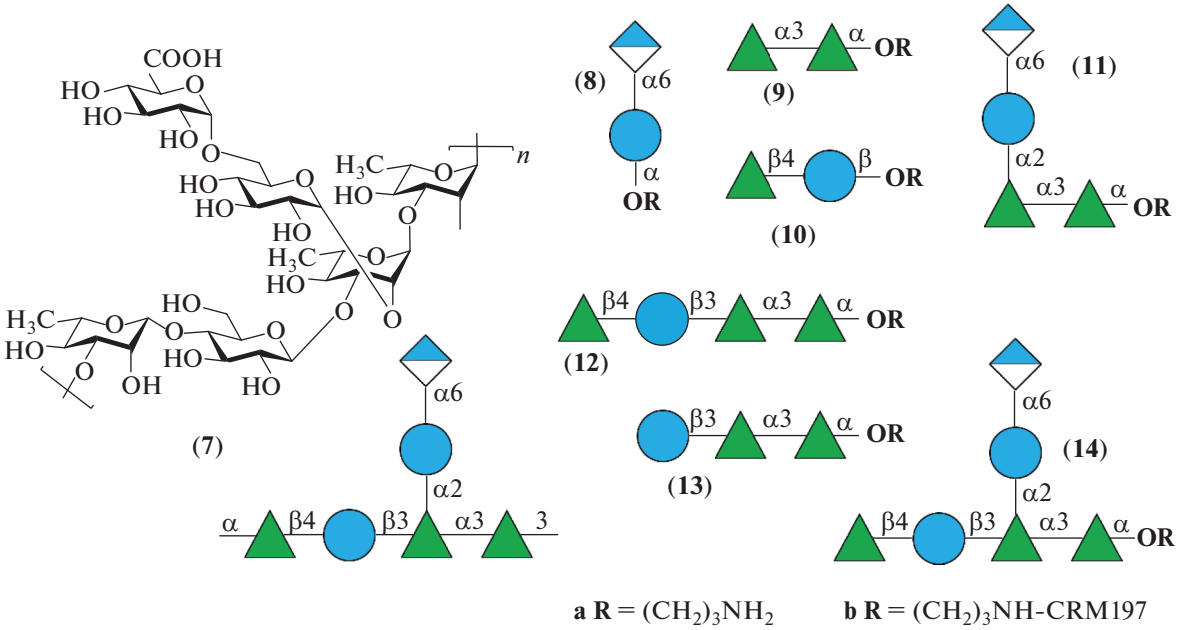


Рис. 2. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 2 (повторяющееся звено (**7**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**8a**–**14a**) и конъюгатов с CRM197 (серия b).

риальной стенкой и одновременно находится в растворенном состоянии в культуральной среде [82]. При культивировании *in vitro S. pneumoniae* серотипа 3 и при заражении мышей происходит высвобождение в окружающую среду большего количества КП по сравнению с другими серотипами пневмококка, что приводит к уменьшению антителозависимого киллинга бактерий и снижению защиты от заражения путем связывания свободных антител с КП. Не исключено, что КП, с которым связались антитела, также может отделиться от бактерии и поступить в окружающую среду, снижая защитные свойства антител.

Изменения в структуре бактериального КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (**15**) могут отразиться на качестве вакцинных препаратов. Для устранения этого недостатка перспективным является использование синтетических олигосахаридов – фрагментов КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (**15**), конъюгированных с белком-носителем.

Работы по синтезу фрагментов КП пневмококков серотипа 3 (**15**) были фактически первыми исследованиями в области полусинтетических конъюгированных углеводных вакцин [55]. Показано, что для выработки протективного иммунитета необходимо присутствие в вакцинном конъюгате остатка глюкуроновой кислоты [55, 83]. Позднее были получены конъюгаты с белком-носителем CRM197 синтетических моносахаридов (**16a**) и (**17a**), дисахарида (**19a**), трисахарида (**20a**) и тетрасахарида (**22a**), соответствующих фрагментам повторяющихся звеньев КП *S. pneumoniae* серотипа 3 [61] (рис. 3). Все мыши, иммунизированные синтезированными конъюгатами (**20b**) и (**22b**), продуцировали IgG-антитела, способные связываться с КП (**15**). Сравнимые титры специфичных антител в случае конъюгата дисахаридного лиганда (**19b**) наблюдались у 75% исследованных мышей. Все животные, в сыворотке которых присутствовали антитела к КП (**15**), выжили после заражения летальной дозой *S. pneumoniae* серотипа 3. Таким образом, было подтверждено, что дисахаридный фрагмент (**19**) достаточен для выработки защитного иммунитета к пневмококкам серотипа 3 у мышей.

Следует отметить, что в отличие от мышей, для индукции оптимального иммунного ответа у человека требуются более длинные олигосахариды, в первую очередь потому, что конформационные эпитопы лучше презентируются клеткам иммунной системы [84]. В то же время возможность индукции Т-зависимого иммунного ответа увеличивается с уменьшением длины олигосахаридной цепи. Поэтому для наилучшей презентации олигосахаридные эпитопы должны иметь и иммуногенную конформацию, и оптимальную длину. При этом длина олигосахаридов должна быть, с одной стороны, достаточной для экспрессии конформационных эпитопов, с другой стороны – не слишком большой для индукции Т-зависимого ответа [30].

В другом исследовании была синтезирована группа лигандов (**16a**–**22a**), которые были иммобилизованы на подложке с образованием соответствующего гликоряда (GlycoArray). С использованием этого инструмента был проведен автоматизирован-

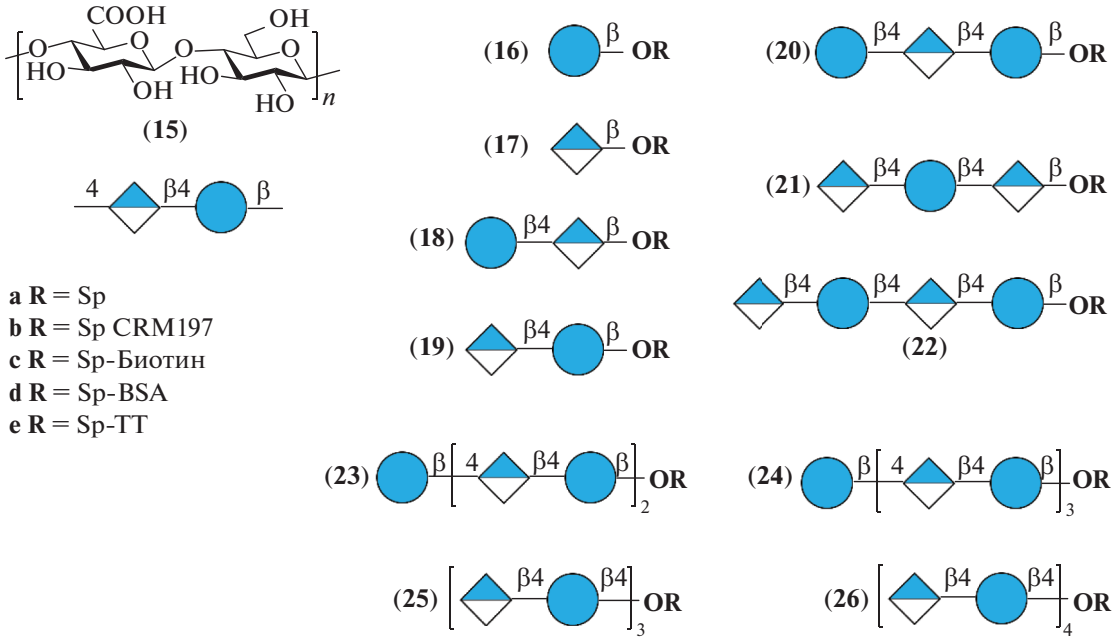


Рис. 3. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 (повторяющееся звено (**15**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**16**–**26**) и гликоконъюгатов на их основе (серии b–e).

ный скрининг (Glucan Array Assay) двух протективных моноклональных антител (mAb), специфичных к КП *S. pneumoniae* серотипа 3 (**15**) [62]. Оба антитела распознавали КП *S. pneumoniae* серотипа 3 в ходе автоматизированного скрининга, а наилучшее связывание обоих mAb наблюдали в случае тетрасахарида (**22a**). Несколько слабее рассматриваемые mAb связывались с трисахаридами (**20a**) и (**21a**), при этом наблюдалось различие в специфичности между двумя mAb. Однако ни одно из mAb не связывалось с дисахаридами (**18a**) и (**19a**). Поэтому в дальнейшем в качестве возможной вакцины исследования были проведены с тетрасахаридным конъюгатом (**22b**).

Иммунизация конъюгатом (**22b**) приводила к выработке защитных антител, что было показано в тестах на опсонизирующую способность и на модели экспериментальной пневмонии при пассивной иммунизации мышей с последующим заражением *S. pneumoniae* серотипа 3. По данным MALDI-TOFF-масс-спектрометрии, полученный конъюгат (**22b**) содержал в среднем шесть тетрасахаридных гаптенов на одну молекулу CRM197 [85]. Для определения иммуногенности тетрасахарида мышей иммунизировали подкожно с интервалом 28 дней двумя дозами гликоконъюгата (**22b**) с адъювантом Фрейнда или с гидроксидом алюминия. Использование гидроксида алюминия является предпочтительным по сравнению с фосфатом алюминия, который входит в состав гликоконъюгатных вакцин, т.к. гидроксид при нейтральных значениях pH лучше адсорбирует конъюгат CRM197, содержащий отрицательно заряженные олигосахариды *S. pneumoniae* серотипа 3 [86].

Иммунизированные мыши вырабатывали IgG-антитела, которые специфически связывались с тетрасахаридом (**22c**), что демонстрирует иммуногенность выбранного лиганда. Переключение иммунного ответа с IgM на IgG в ответ на введение бустерной дозы указывали на образование Т-зависимого иммунного ответа. Однако иммуногеннность конъюгированного тетрасахарида в значительной степени зависела от использованного адъюванта. Гликоконъюгат (**22b**) с адъювантом Фрейнда индуцировал образование более высокого титра антител по сравнению с использованием гидроксида алюминия [62].

Сыворотка, полученная от мышей, иммунизированных конъюгатом (**22b**), вызывала дозозависимый киллинг пневмококка, демонстрируя, что гликоконъюгат индуцирует образование опсонизирующих антител. Титр антипневмококковых антител, так же как и опсонофагоцитарная активность, зависел от использованного адъюванта. Адъювант Фрейнда вызывал образование более высокого титра антител с высокой киллерной активностью в тесте опсонофагоцитоза по сравнению с использованием гидроксида алюминия. Протективную активность тетрасахаридного конъюгата (**22b**) в отношении пневмококковой пневмонии исследовали при использовании известной модели [87, 88].

Поскольку адъювант Фрейнда не используют при создании вакцин, авторы вводили гликоконъ-

югат (**22b**), адсорбированный на гидроксиде алюминия, и гликоконъюгат (**22b**) без адъюванта. Иммунизация конъюгатом (**22b**), адсорбированным на гидроксиде алюминия, значительно уменьшала тяжесть течения заболевания. Пневмококковая пневмония существенно увеличивала проницаемость легких у контрольных животных и мышей, иммунизированных конъюгатом (**22b**) без адъюванта. Использование конъюгата (**22b**), адсорбированного на гидроксиде алюминия, сохраняло целостность альвеолярного барьера, снижало бактериальную нагрузку в легких, а также практически полностью предотвращало развитие бактериемии по сравнению с контролем и гликоконъюгатом (**22b**) без адъюванта. Антибактериальная защита сопровождалась увеличением количества лейкоцитов и снижением продукции цитокинов в альвеолярном компартменте (compartment) у инфицированных пневмококком мышей. Индукция длительного иммунитета является важным показателем успешной вакцинации. Через 4 месяца защита от инфекции была меньше, чем при заражении на 35-й день после иммунизации. Для изучения способности конъюгата (**22b**) индуцировать длительную иммунную защиту в отношении пневмококков серотипа 3 проводятся дополнительные испытания. Ранее было показано, что в некоторых случаях для возникновения длительной иммунной памяти необходимо удлинение углеводного лиганда [62].

Авторами данного обзора были также синтезированы олигосахариды (**19a**), (**20a**), (**22a**) и их конъюгаты с биотином (**19c**), (**20c**) и (**22c**) соответственно (статья готовится к печати). Было показано, что биотинилированные производные (**19c**), (**20c**) и (**22c**), предварительно иммобилизованные на покрытых стрептавидином микропланшетах, стимулировали продукцию IL-1α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFNγ, IL-17A и TNFα, но не IL-6 и GM-CSF, в монокультуре спленоцитов мышей. Конъюгат тетрасахарида (**22c**) наиболее эффективно стимулировал выработку IL-4, IL-5, IL-10 и IFNγ, которые способствуют экспрессии специфических изотипов иммуноглобулинов. Конъюгат с BSA (**22d**), адсорбированный на гидроксиде алюминия, вызывал образование высоких уровней антител классов IgM, IgG1, IgG2a и IgG2b. Определить содержание анти-КП-индуцированных антител можно было только с помощью биотинилированного тетрасахарида (**22c**). Конъюгат (**22d**) обладал самой высокой способность связывать IgG-антитела в иммунных сыворотках мышей к гликоконъюгатам и антибактериальной сыворотке кроликов. Сыворотки к конъюгату (**22d**) способствовали большему фагоцитозу бактерий нейтрофилами и моноцитами, чем антисыворотка к конъюгату полисахарида (**15**) КП–CRM197. Сыворотка мышей, иммунизированных конъюгатом тетрасахарида (**22d**), демонстрировала самый высокий титр IgG1-антител к КП по сравнению с сыворотками мышей, иммунизированных теми же дозами конъюгатов ди- (**19d**) и трисахарида (**20d**). При внутрибрюшинном заражении летальной дозой *S. pneumoniae* серотипа 3 конъюгаты три- (**20d**) и тетрасахарида (**22d**) защитили мышей с большей степенью достоверности по сравнению с конъюгатом дисахарида (**19d**). На основании проведенных исследований показано, что тетрасахаридный лиганд (**22a**) является оптимальным кандидатом для разработки полусинтетической вакцины против *S. pneumoniae* серотипа 3 и диагностических тест-систем.

Были также синтезированы более длинные фрагменты КП серотипа 3 (**15**), включающие в себя до четырех повторяющихся звеньев этого полисахарида (соединения (**23a**–**26a**)) [89]. Среди этих лигандов были олигосахариды, содержащие на невосстанавливающем конце как остаток глюкозы (**23a**, **24a**), так и остаток глюкуроновой кислоты (**25a**, **26a**). Были получены конъюгаты этих соединений с BSA (**23d**–**26d**) и столбнячным анатоксином (**23e**–**26e**). Конъюгаты (**23e**–**26e**) и свободные олигосахариды (**23a**–**26a**) были использованы для иммунизации мышей, в то время как конъюгаты с BSA (**23d**–**26d**) применялись как покрывающие антигены при анализе полученных после иммунизаций сывороток методом ИФА. Сыворотки мышей, иммунизированных конъюгатами столбнячного анатоксина (**23e**–**26e**), содержали гораздо большие титры специфичных антител, чем антисыворотки к свободным олигосахаридам (**23a**–**26a**). Примечательно, что титры специфичных антител, индуцированных пента- и гексасахаридными конъюгатами (**23e** и **25e** соответственно), существенно превосходили аналогичные титры, полученные в случае окта- и гептасахаридных конъюгатов (**24a** и **26a** соответственно), что свидетельствует о том, что дальнейшее увеличение длины углеводных лигандов отрицательно сказывается на иммунологических свойствах конъюгатов [89].

***S. pneumoniae* серотипа 4.** В структуре КП пневмококков серотипа 4 (**27**) содержится редкий и лабильный заместитель (циклический пируватный кеталь) на терминальном остатке галактозы на восстанавливающем конце. Недавно Seeberger et al. синтезировали большой набор фрагментов этого полисахарида (**28a**–**35a**) (рис. 4), среди которых были олигосахариды разной длины, а также соединения, с помощью которых предполагалось установить, насколько критичным является наличие пируватного заместителя [90, 91].

Антитела в референсной сыворотке человека, специфичной к КП серотипа 4 (**27**), распознавали в равной степени как олигосахариды, содержащие пируватный фрагмент, так и олигосахариды с незамещенными остатками галактозы. Тетрасахарид (**35a**) обладал наивысшей аффинностью и

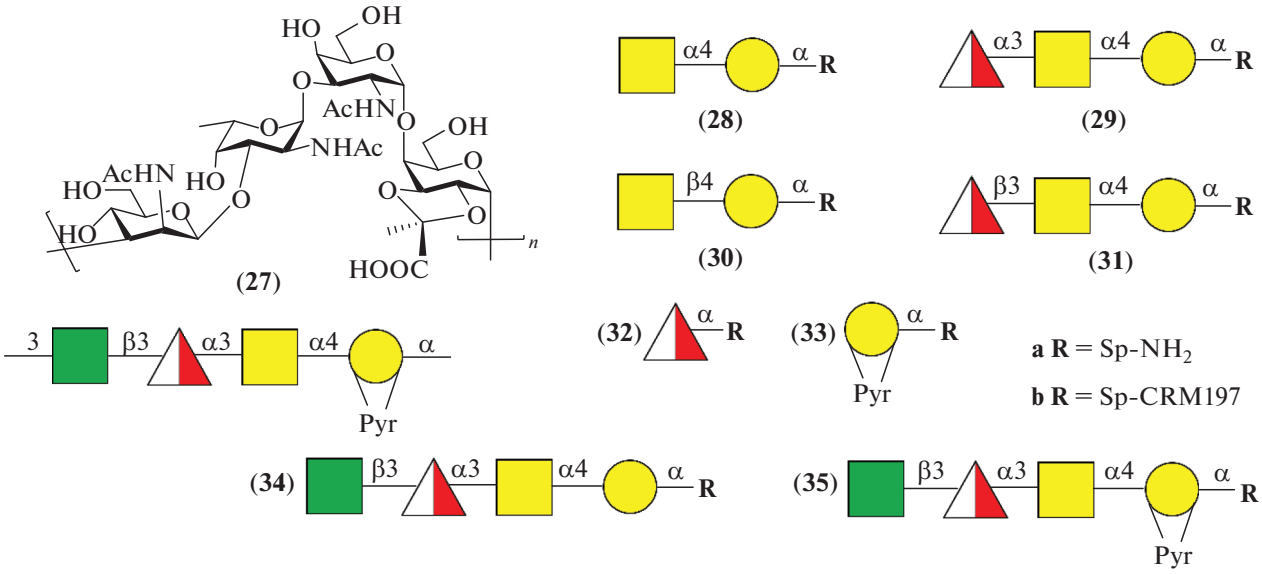


Рис. 4. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 4 (повторяющееся звено (**27**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**28a**–**35a**) и конъюгатов с CRM197 (серия b).

кросс-реактивностью в отношении КП (**27**) при исследовании сывороток мышей и человека, иммунизированных КП серотипа 4 (**27**). Поскольку антитела сыворотки человека распознавали также олигосахариды без пируватного заместителя (**29a**, **34a**), исследователи предположили, что в природном КП также могут встречаться звенья, не несущие пируватного заместителя в остатке галактозы. Однако не содержащие пирувата эпитопы могут быть менее иммуногенными, о чем свидетельствует более слабое связывание антител с олигосахаридами (**29a**) и (**34a**) по сравнению с тетрасахаридом (**35a**), содержащим пируват. Для проверки этой гипотезы были синтезированы конъюгаты (**29b**) и (**34b**), лиганды которых не содержали пируватного заместителя. Антитела, полученные при иммунизации мышей конъюгатами (**29b**) и (**34b**), не распознавали КП серотипа 4, что свидетельствует о важности присутствия пирувата для выработки специфичного иммунитета [90, 91].

***S. pneumoniae* серотипа 5.** Серотип 5 вызывает инвазивные пневмококковые заболевания у детей во всем мире [11, 92]. Коммерческие гликоконъюгатные вакцины производят из нативных или деполимеризованных КП [93] и конъюгируют с белком-носителем. Однако была выявлена их недостаточная эффективность в предупреждении инфекций, вызываемых серотипом 5 [94]. Повторяющееся звено КП серотипа 5 (**36**) (рис. 5) содержит два редких моносахаридных остатка: 2-ацетамидо-2,6-дидеокси-*D*-ксилоза-гексоза-4-улоза (Sugp) и *N*-ацетил-*L*-пневмозамин (*L*-Pneup-*N*Ac). КП серотипа 5 (**36**), так же как КП серотипа 1 (**1**), является слабым звеном существующих пневмококковых вакцин (он входит в состав 10- и 13-валентных вакцин), т.к. в процессе его выделения из бактериальных источников и очистки для получения конъюгированной вакцины кетогруппа остатка Sugp подвергается частичному или полному восстановлению, что приводит к получению гетерогенного продукта со сниженной иммуногенностью по сравнению с нативным КП серотипа 5 (**36**) [95, 96].

Предварительные исследования с использованием большой группы моно- и дисахаридных фрагментов повторяющегося звена полисахарида (**36**) и стандартных сывороток кролика и человека для типирования пневмококков серотипа 5 показали, что наиболее важным для распознавания является ответвление GlcA-PneuNAc [95]. Попытки синтезировать повторяющееся звено КП (**36**) оказались неудачными, т.к. кетогруппа в остатке Sugp крайне нестабильна, и продукт не удалось выделить в чистом виде.

По данным проведенного автоматизированного скрининга, остаток Sugp не являлся иммунодоминантным, поэтому для получения вакцинных конъюгатов были синтезированы более стабильные олигосахариды с восстановленной кетогруппой (**37a**–**39a**), два из которых (**38a**, **39a**) содержали остаток фукозамина, а также тетрасахарид (**37a**) с остатком хинавозамина на восстанавливающем конце [95] (рис. 5). Антитела в сыворотках, специфичных к КП серотипа 5 (**36**) (были использованы сыворотки кролика и человека для типирования данного серотипа, а также антисыворотка кролика к вакцине Prevnar 13®), хорошо связывались с обоими пентасахаридами (**37a**, **38a**) и несколько хуже – с тетрасахаридом (**39a**).

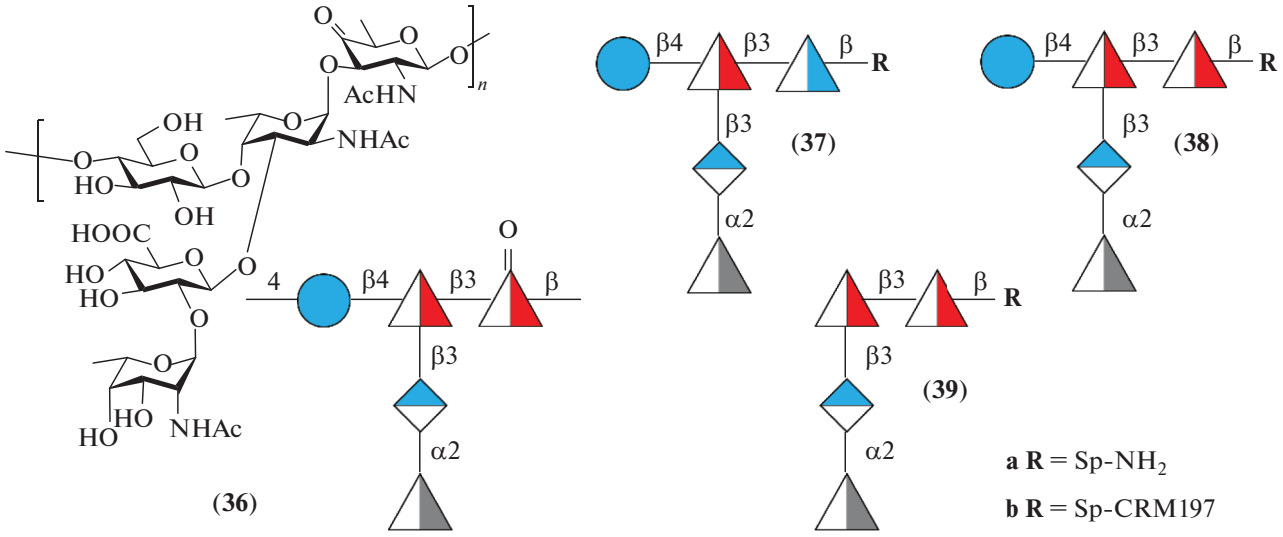


Рис. 5. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 5 (повторяющееся звено (**36**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**37a**–**39a**) и конъюгатов с CRM197 (серия b).

Поскольку химический синтез лиганда (**37a**) был достаточно трудоемким, для иммунологических экспериментов были получены только конъюгаты (**38b**) и (**39b**). Конъюгат (**38b**) стимулировал образование у кроликов более высоких титров кросс-реактивных антител, чем конъюгат тетрасахарида (**39b**). Индуцированные конъюгатом (**38b**) антисыворотки распознавали помимо самого пентасахаридного лиганда (**38a**) также пентасахарид (**37a**) и КП (**36**). Эти данные подчеркивают, что для получения иммуногенного вакцинного конъюгата необходимо использование полного повторяющегося звена КП серотипа 5 (**36**).

Оба конъюгата (**38b**, **39b**) вызывали у кроликов образование антител, превосходящих по опсонизирующей способности антитела в сыворотке к мультивалентной вакцине Prevnar 13®, при этом антитела к пентасахариду в составе конъюгата (**38b**) обладали более сильным антибактериальным действием *in vitro*, чем антитела к тетрасахаридному конъюгату (**39b**). Однако защитные функции антисывороток определяются не только титрами опсонизирующих антител, но и их авидностью по отношению к нативному КП на поверхности бактерий. Количественно определенные значения авидности к КП (**36**) в тестах с ингибированием связывания цианатом аммония показали, что авидность антител, индуцированных конъюгатом (**38b**), более чем в 4 раза превосходит авидность антисывороток к конъюгату (**39b**) и вакцине Prevnar 13®.

Хотя активность полусинтетических конъюгатов (**38b**) и (**39b**) была сопоставлена со сравнимой дозировкой конъюгата КП серотипа 5 (**36**) в составе вакцины Prevnar 13®, возможно, что присутствие дополнительных серотипов в мультивалентной вакцине снижает активность индивидуальных КП других серотипов, и поэтому такое сравнение не вполне корректно [97, 98]. Эффективные вакцины приводят к выработке длительного иммунного ответа и формированию В-клеток памяти. В данном исследовании титры специфичных антител у кроликов, иммунизированных конъюгатом (**38b**), снижались к 119-му дню после первичной иммунизации, однако введение бустерной дозы приводило к быстрому возрастанию уровня антител, что свидетельствует о сильной иммунологической памяти. Таким образом, пентасахаридный конъюгат (**38b**) является перспективным кандидатом для вакцины против пневмококков серотипа 5.

***S. pneumoniae* серотипа 6.** *S. pneumoniae* серотипа 6B является частой причиной пневмококковых заболеваний, особенно у детей [99, 100], и его также ассоциируют с антибиотикорезистентностью [101–103]. КП *S. pneumoniae* серотипа 6B (**41**) (рис. 6) входит в состав как 23-валентных полисахаридных вакцин первого поколения Pneumovax 23® (Merck Sharp & Dohme Corp.) и Pneumo 23® (Sanofi), так и в состав всех конъюгированных пневмококковых вакцин, выпускаемых в настоящее время. КП (**41**) содержит в своем составе фосфатную группу, и его конъюгация с белком-носителем не всегда проходит успешно. Индуцированные КП (**41**) антитела характеризуются медленным созреванием аффинности по сравнению с КП других серотипов пневмококка [104], и в связи с этим количество КП серотипа 6B (**41**) пневмококка в конъюгированных вакцинах увеличено в 2 раза по сравнению с КП других серотипов. *S. pneumoniae* серотипа 6B относится к серогруппе 6, включающей еще три сероварианта, полисахариды которых обладают незначительными раз-

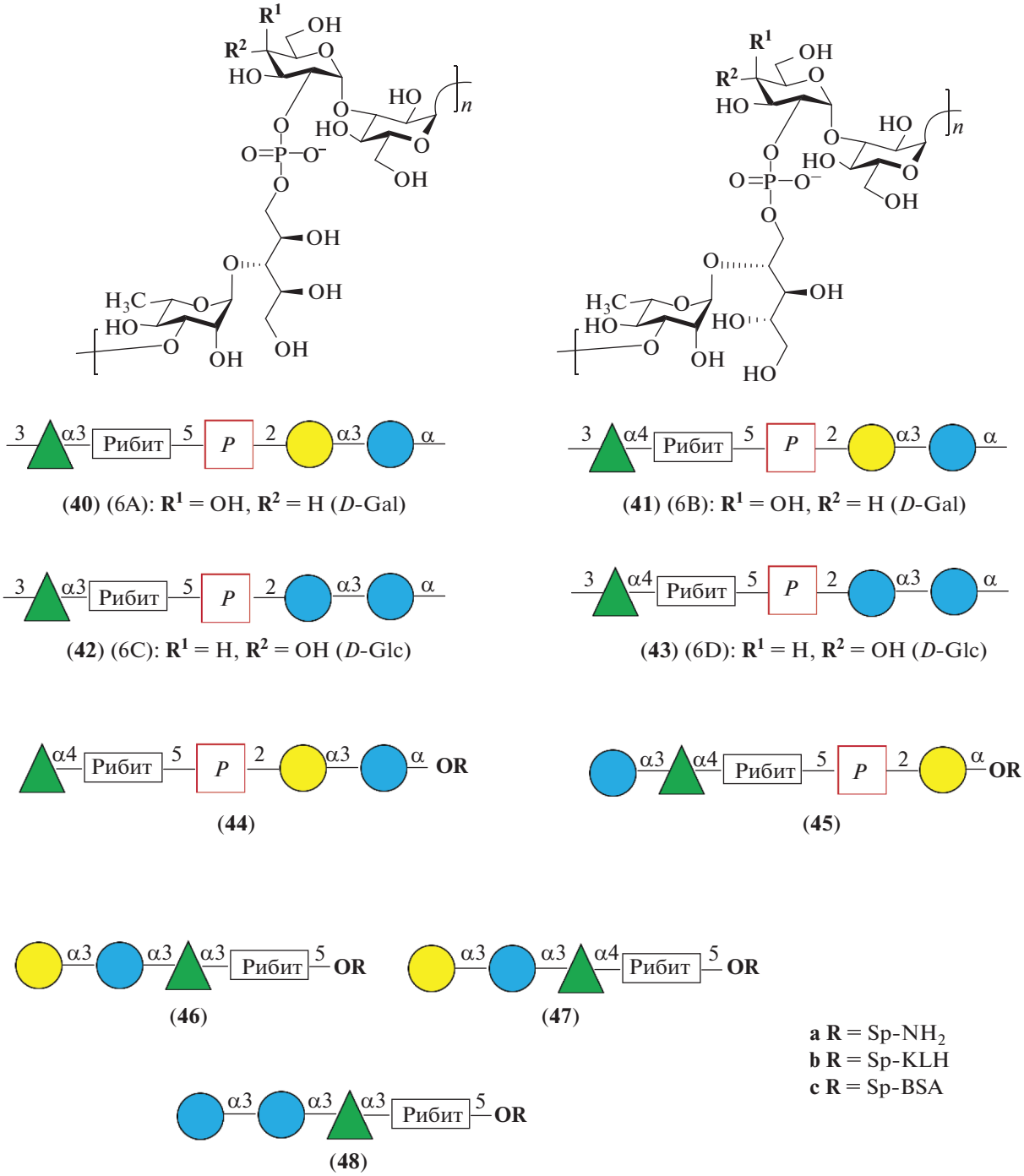


Рис. 6. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипов 6A, 6B, 6C и 6D (повторяющиеся звенья (**40**–**43**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**44a**–**48a**), а также конъюгатов с KLH (серия b) и BSA (серия c).

личиями: 6A (**40**), 6C (**42**) и 6D (**43**) (рис. 6), однако наибольшее клиническое значение имеют *S. pneumoniae* серотипов 6A и 6B.

Вследствие незначительных структурных различий между КП серогруппы 6 антитела к КП *S. pneumoniae* серотипа 6B обладают перекрестной антигенной активностью в отношении *S. pneumoniae* серотипов 6A, 6D и 6C [105–107]. Это подтверждается тем, что случаи выявления серотипа 6A стали реже после начала применения конъюгированной пневмококковой вакцины, содержащей в своем составе КП 6B [55]. Однако это может быть связано и с тем, что генные мутации способны приводить к синтезу нескольких типов повторяющихся звеньев в составе одного КП. Так, были обнаружены пневмококки, способные продуци-

ровать “смешанный” КП серотипа 6A/6B [108], что зависит от штамма-продуцента КП, состава питательной среды и условий культивирования штаммов *S. pneumoniae*.

Конъюгированные с белком-носителем синтетические аналоги КП, содержащие протективные эпитопы соответствующих серотипов пневмококка, могут приводить к образованию более высокого титра специфических антител, чем конъюгаты бактериальных КП [109, 110]. Это было продемонстрированно и с использованием олигосахаридов, соответствующих фрагментам цепи КП *S. pneumoniae* серогруппы 6, синтез которых был проведен несколькими исследовательскими лабораториями. Наиболее активными оказались олигосахариды, имеющие размер не менее полных повторяющихся звеньев [55]. Так, были синтезированы содержащие фосфаты тетрасахариды (**44a**) и (**45a**), а также тетрасахариды без фосфатной группы (**46**), (**47**) и (**48**) (рис. 6), имитирующие повторяющиеся звенья КП серотипов 6A, 6B и 6C соответственно [111–113]. Показано, что конъюгат фосфатсодержащего тетрасахарида с белком KLH (**44b**) вызывал у мышей и кроликов образование антител, способных перекрестно связываться с КП как серотипа 6B (**41**), так и серотипа 6A (**40**), а также стимулировать фагоцитоз микробных клеток пневмококка серотипов 6A и 6B [60].

В экспериментах по пассивной и активной иммунизации мышей антисыворотка кроликов к конъюгату (**44b**) защищала мышей от заражения пневмококком серотипов 6A и 6B. Это позволило сделать вывод о том, что тетрасахарид (**44a**), конъюгированный с белком-носителем (конъюгат **44b**), является эффективным компонентом вакцины, способным индуцировать образование защитных антител к *S. pneumoniae* серотипов 6A и 6B [60]. Противоречащие данному выводу результаты получены в экспериментах по исследованию тетрасахарида (**46a**), в составе которого нет фосфатной группы. КП серотипа 6B не ингибировал взаимодействие антител кролика с конъюгатом (**46b**). Это может означать, что эпитопы, представленные в КП серотипа 6B, отличаются от представленных в нефосфорилированном тетрасахариде (**46a**) [114–116]. Таким образом, для получения эффективной конъюгированной вакцины против *S. pneumoniae* серогруппы 6 необходимо использовать фосфатсодержащие тетрасахариды, соответствующие повторяющемуся звену КП *S. pneumoniae* серотипов 6A и 6B.

***S. pneumoniae* серотипа 7F.** *S. pneumoniae* серотипа 7F до 2012 г. был пятым по распространенности среди 97 серотипов, вызывающих инвазивные пневмококковые заболевания в Европе, однако с введением 13-валентной вакцины, в состав которой входит КП серотипа 7F (**49**) (рис. 7), количество пневмоний, обусловленных этим серотипом, уменьшилось [117]. Повторяющееся звено КП (**49**) содержит семь моносахаридных остатков, среди которых четыре в основной цепи, а также присутствуют два ответвления. Для определения минимального гликотопа, способного вызывать образование специфичного иммунного ответа в отношении КП серотипа 7 (**49**), был синтезирован ряд спейсерированных олигосахаридов (**51**–**56**) [117] (рис. 7), которые были выбраны таким образом, чтобы определить вклад каждого из ответвлений во взаимодействие со специфичными антителами. Гептасахарид, соответствующий полному повторяющемуся звену, не планировали синтезировать ввиду трудоемкости введения остатка α-*N*-ацетилглюкозамина.

Для установления эпитопов, ответственных за связывание с антителами человека, была использована автоматизированная система микроанализа, с помощью которой изучали взаимодействие олигосахаридов (**51**–**56**) с антителами референсной сыворотки человека 007sp [72]. Эта сыворотка связывалась с олигосахаридами (**51**–**55**), однако не связывалась с трисахаридом (**56**). Добавление КП серотипа 7F эффективно ингибировало взаимодействие сыворотки 007sp с олигосахаридами (**51**–**56**), нанесенными на поверхность микрочипа (наименьшее ингибирование наблюдали в случае тетрасахарида (**52**)). Родственный КП серотипа 7A (**50**), в котором отсутствует остаток галактозы в боковой цепи, также был способен ингибировать взаимодействие сыворотки 007sp с олигосахаридами (**51**–**56**), однако в меньшей степени, чем КП серотипа 7F (**49**). Авторами был сделан вывод, что оба боковых ответвления в структуре углеводного лиганда играют важную роль при распознавании специфичными антителами, и это нужно учитывать при дальнейшем конструировании полусинтетической конъюгированной вакцины. Кроссреактивность, которую наблюдали в экспериментах ингибирования, дает основания полагать, что синтетические антигены, являющиеся фрагментами КП серотипа 7F (**49**), будут вызывать образование антител как к серотипу 7F, так и к серотипу 7A [117].

***S. pneumoniae* серотипа 8.** Полисахарид этого серотипа был включен в состав 23-валентных полисахаридных вакцин Pneumovax 23® и Pneumo 23®, однако не является компонентом конъюгированных полисахаридных вакцин, выпущенных позднее. Встречаются штаммы данного серотипа, устойчивые к таким антибиотикам, как эритромицин, клиндамицин, тетрациклин и ципрофлоксацин [118]. Более того, этот мультирезистентный серотип наиболее часто обнаруживают у ВИЧ-инфицированных пациентов [119].

Повторяющееся звено КП серотипа 8 (**57**) (рис. 8) представляет собой линейный тетрасахарид, который содержит дисахаридный фрагмент,

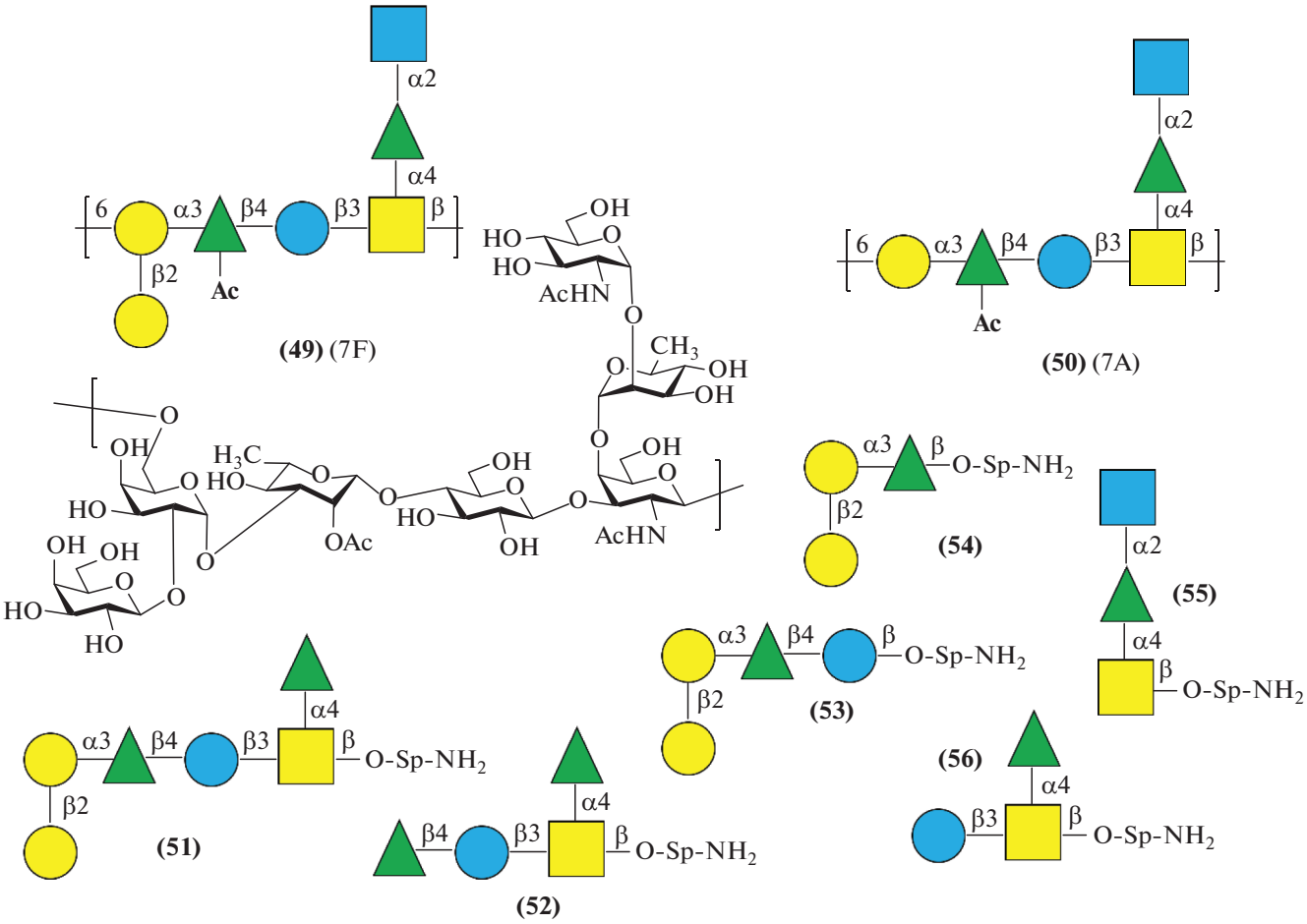


Рис. 7. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 7F (повторяющееся звено (**49**)) и синтезированных родственных олигосахаридов (**50**–**56**).

соответствующий целлобиуроновой кислоте [β-*D*-GlcA-(1→4)-β-*D*-Glc], представленный также в КП пневмококков серотипа 3.

Для определения структуры протективного эпитопа Seeberger et al. была синтезирована серия тетрасахаридов (**58a**–**61a**) [119] (рис. 8), которые представляли все возможные моносахаридные последовательности (получены путем сдвига рамки считывания) для тетрасахаридного повторяющегося звена КП (**57**). С помощью автоматизированного микроанализа для панели антигенов (**58a**–**62a**) было установлено, что тетрасахарид (**60a**) наилучшим образом связывается с протективными моноклональными антителами, направленными на нативный полисахарид КП серотипа 8 (**57**).

Дальнейшее картирование защитных эпитопов в тетрасахариде (**60a**) было выполнено при помощи моноклональных антител, специфичных к лиганду (**60a**), отобранных после иммунизации мышей конъюгатом (**60b**). Оказалось, что наличие остатка глюкуроновой кислоты не играет решающей роли, т.к. тетрасахарид (**62a**), содержащий остаток глюкозы на невосстанавливающем конце, обладал профилем связывания, аналогичным тетрасахариду (**60a**). Конъюгаты (**60b**) и (**62b**) оказались малоиммуногенными у мышей, однако у кроликов оба конъюгата вызывали образование высоких титров антител, которые связывались как с КП серотипа 8 (**57**), так и с обоими тетрасахаридами (**60a**, **62a**) [119].

Также были получены экспериментальные смешанные вакцины [119], состоящие из конъюгатов (**60b**) или (**62b**) в комплексе с коммерческой полисахаридной конъюгированной вакцине Prevnar 13®, которая не содержит КП серотипа 8 (**57**). Оба 14-валентных вакцинных препарата вызывали у кроликов образование антител, связывающихся с КП серотипа 8 (**57**), чего не происходило в случае иммунизации отдельно вакциной Prevnar 13®. Сыворотка кроликов, иммунизированных 14-валентными вакцинами, обладала опсонизирующей способностью в отношении пневмококков серотипа 8 *in vitro*, в отличие от сыворотки кроликов, иммунизированных только с

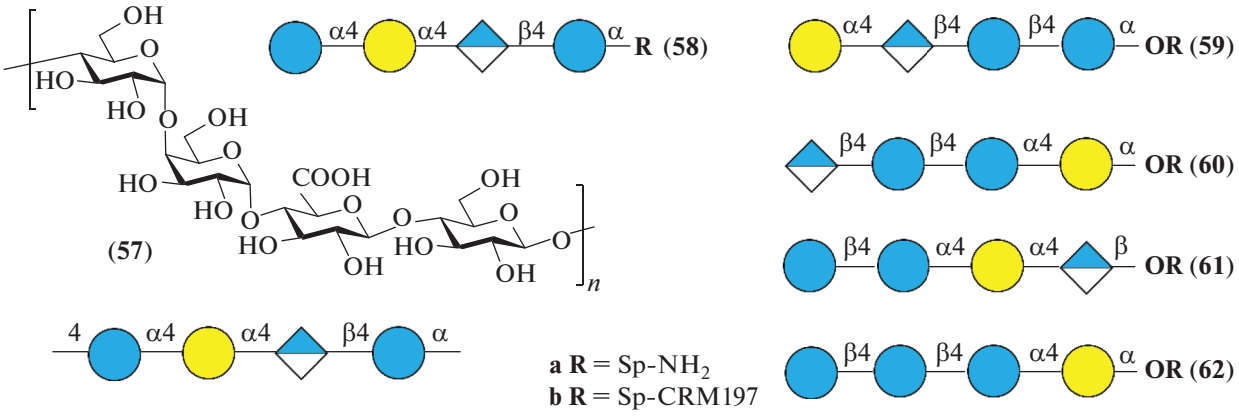


Рис. 8. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 8 (повторяющееся звено (**57**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**59a**–**62a**) и конъюгатов с CRM197 (серия b).

помощью Prevnar 13®. Также было показано, что одновременное введение полусинтетических конъюгированных вакцин (**60b**) или (**62b**) с вакциной Prevnar 13® не приводит к снижению иммуногенности КП в составе коммерческой вакцины [119]. Таким образом, была продемонстрирована возможность эффективного применения конъюгатов синтетических олигосахаридных лигандов в сочетании с конъюгированными полисахаридными вакцинами. Это может быть полезно для наиболее проблемных серотипов, КП которых в составе вакцин недостаточно активны из-за структурных особенностей этих полисахаридов.

***S. pneumoniae* серотипа 9V.** КП пневмококков серотипа 9V (**64**) (рис. 9) входит в состав вакцины Prevnar 13®. В структуре этого КП присутствует лабильный *O*-ацетильный заместитель в остатке *N*-ацетилманнозамина (см. повторяющееся звено (**63**), не содержащее *O*-ацетильную группу), что осложняло выделение гомогенного полисахарида из бактериальных источников и долгое время не позволяло однозначно определить его химическое строение. Антитела, полученные против нативного КП (**64**), распознают как *O*-ацетилированную форму (**64**), так и ее *O*-деацетилированный аналог (**63**). Однако только антисыворотка, распознающая *O*-деацетилированный полисахарид (**63**), обладала опсонофагоцитарной активностью, что свидетельствует о том, что присутствие *O*-ацетата в данном случае не является необходимым для выработки протективного иммунитета [120].

В другом исследовании [121] было показано, что моноклональные антитела к КП серотипа 9V (**64**) в равной степени связываются с обеими формами (**63**, **64**), обладают опсонофагоцитарной активностью и при пассивной иммунизации способны защищать мышей от заражения пневмококком серотипа 9V. Для того чтобы прояснить влияние *O*-ацетилирования КП серотипа 9V на специфичность иммунного ответа, были синтезированы и исследованы пентасахариды как с *O*-ацетильной группой (**66**), так и без нее (**65**) [122] (рис. 9).

Структуры данных соединений, в которых на “невосстанавливающем” конце находится остаток глюкуроновой кислоты, были выбраны с учетом результатов исследований олигосахаридов, родственных КП серотипов 3 и 8, в которых была обнаружена необходимость присутствия именно концевого остатка глюкуроновой кислоты для наилучшего распознавания антителами, специфичными к соответствующим КП. С помощью полученных олигосахаридов (**65**, **66**) было спектрально подтверждено наличие *O*-ацетильной группы при C6 остатка *N*-ацетилманнозамина в нативном полисахариде (**64**), и эти олигосахариды будут теперь использованы для иммунологических исследований [122].

***S. pneumoniae* серотипа 12F.** КП серотипа 12F входит в состав пневмококковых 23-валентных полисахаридных вакцин Pneumovax 23® и Pneumo 23®, а также является компонентом готовящейся к лицензированию 20-валентной полисахаридной конъюгированной вакцины Prevnar 20®. Серотипы 12F и 12A суммарно ответственны за 4% пневмококковых заболеваний [3]. Для проведения детальных иммунологических исследований (на момент написания данного обзора о них еще не сообщалось) был получен спейсерированный гексасахарид (**68**), представляющий собой одно повторяющееся звено полисахарида (**67**) [123] (рис. 10).

***S. pneumoniae* серотипа 14.** Капсулярный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 14 (**69**) построен из разветвленных тетрасахаридных повторяющихся звеньев (рис. 11). К настоящему моменту получен ряд синтетических олигосахаридов, соответствующих участкам цепи КП *S. pneumoniae* серотипа 14, в том числе конъюгированных с белком-носителем [124–127]. Был также синтезирован капсулярный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 14 [125],

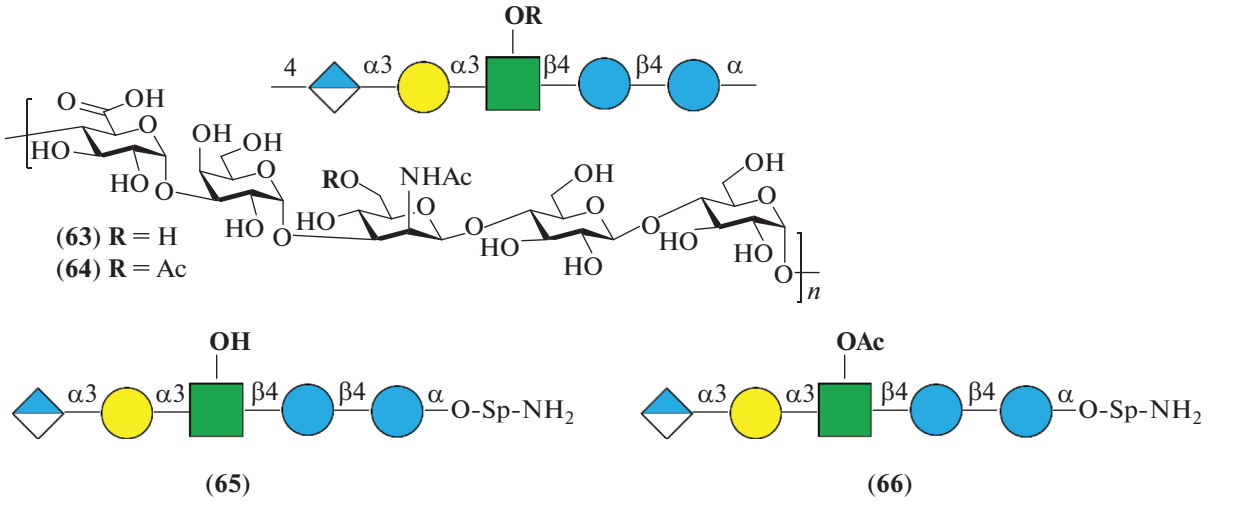


Рис. 9. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 9V (повторяющееся звено (**64**)), его *O*-деацетилированного производного (повторяющееся звено (**63**)) и синтезированных родственных олигосахаридов (**65**) и (**66**).

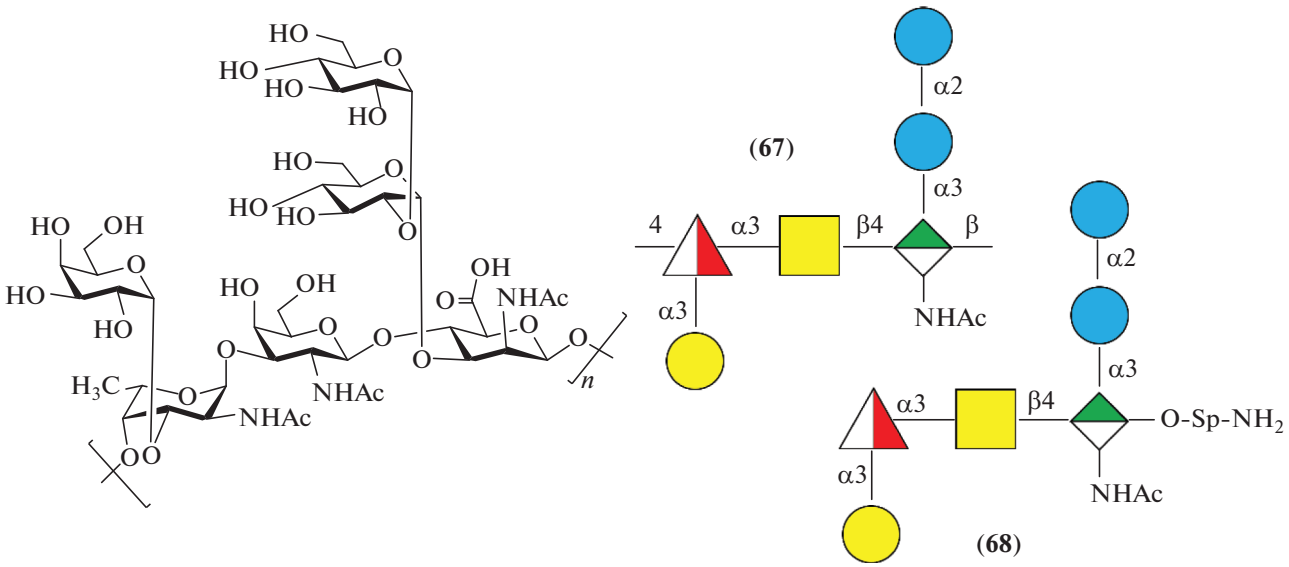


Рис. 10. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 12F (повторяющееся звено (**67**)) и синтезированного родственного олигосахарида (**68**).

который использовался в иммунологических исследованиях [128, 129].

В ходе исследования большой группы синтетических олигосахаридных фрагментов полисахарида (**69**) было установлено, что присутствие фрагмента β-Gal-(1→4)-β-Glc на невосстанавливающем конце олигосахаридного лиганда является необходимым для выработки антител, связывающихся с нативным КП (**69**) [55]. Так, конъюгаты (**70b**–**74b**) (рис. 11) в присутствии различных адъювантов (MPL и Quil-A) вызывали у мышей образование высоких титров антител, специфичных к КП (**69**), при этом фагоцитарная активность полученных антител находилась в прямой зависимости от величины титров антител к КП серотипа 14 (**69**). Было специально показано, что сыворотки, не содержащие антител, специфичных к полисахариду (**69**), не проявили никакой фагоцитарной активности в отношении пневмококков серотипа 14. По результатам сравнительных экспериментов были сделаны выводы, что тетрасахаридный лиганд в составе конъюгата (**70b**) содержит эпитопы, необходимые для выработки защитных антител, и является минимальным структурным мотивом для выработки опсонизирующих антител к повторяющемуся звену КП (**69**) [130]. В случае, если антитела к конъюгату (**70b**) будут обладать также и протективными свойствами в экс-

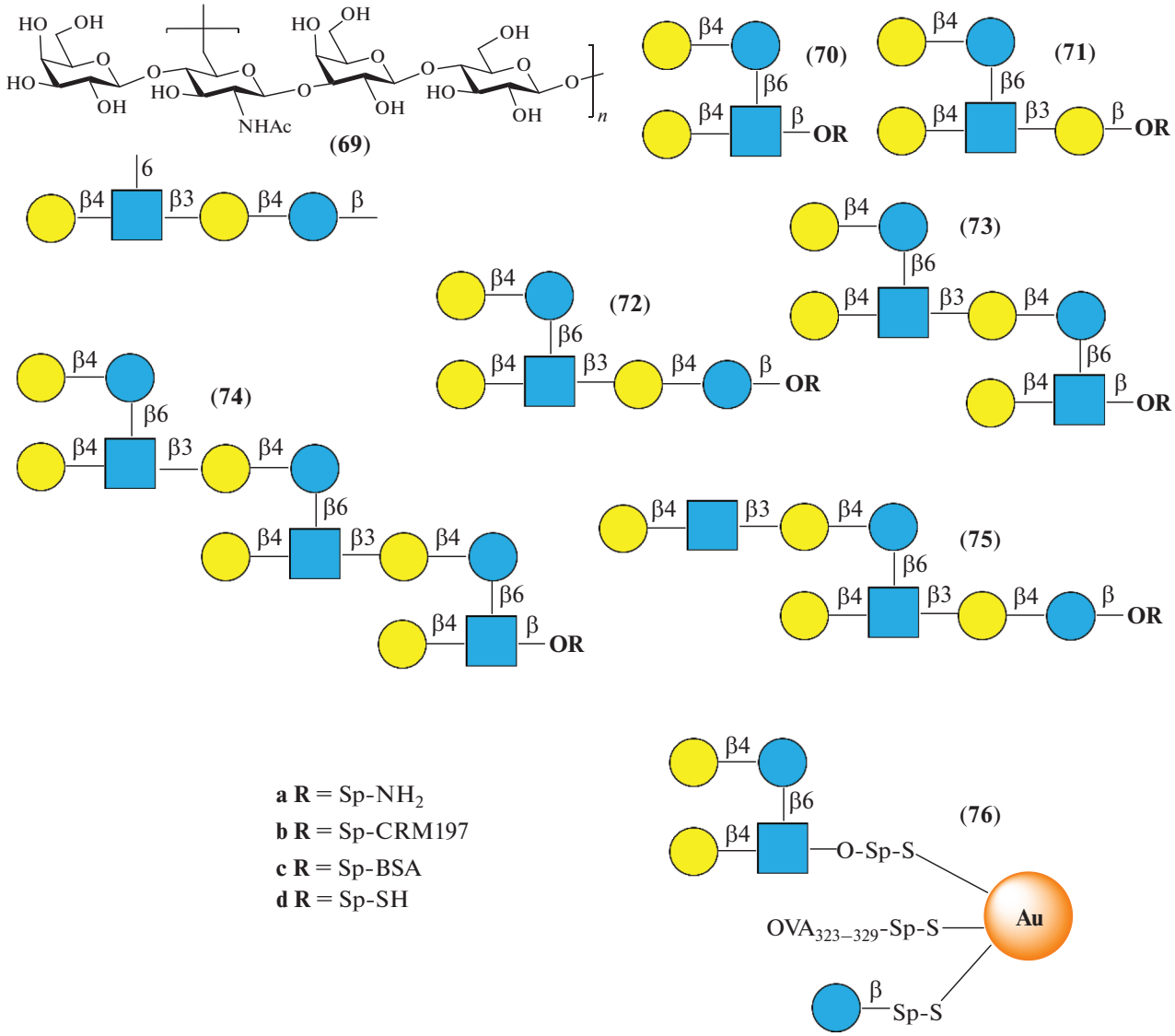


Рис. 11. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 14 (повторяющееся звено (**69**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**70a**–**75a**) и конъюгатов (серии b–d и (**76**)).

периментах на животных, такой конъюгат можно будет рассматривать в качестве перспективного кандидата на роль соответствующего серотипу 14 компонента поливалентной пневмококковой вакцины.

При исследовании эффекта второй иммунизации мышам сначала вводили конъюгат (**70b**), а вторую иммунизацию проводили этим же гликоконъюгатом или неконъюгированным бактериальным КП (**69**). В 1-й день после повторного введения конъюгированного тетрасахарида в сыворотке крови мышей повышался уровень IL-5, а на 7-е сутки появлялись специфические IgG-антитела в высоком титре. После иммунизации КП (**69**) не отмечали повышения уровня IL-5 и антител к КП. В опытах *in vitro* стимуляция спленоцитов конъюгатом (**70b**) приводила к продукции IL-4 и IL-5, что не отмечали при иммунизации неконъюгированным КП (**69**). Однако при стимуляции спленоцитов мышей, двукратно иммунизированных инактивированными клетками *S. pneumoniae* серотипа 14, уровень IFNγ и IL-17 был выше при иммунизации бактериальным КП, чем у мышей, повторно иммунизированных конъюгатом синтетического тетрасахарида, и у неиммунизованных мышей. Это позволило заключить, что после второй иммунизации конъюгированным тетрасахаридом (**70b**) происходит активация клеток памяти и формируется выраженный иммунитет к *S. pneumoniae* серотипа 14, тогда как повторная иммунизация конъюгированным бактериальным КП не приводит к образованию опсонизирующих анти-

тел, хотя и участвует в определенных регуляторных иммунологических механизмах [131].

Авторами данного обзора были получены и исследованы конъюгаты (**70c**), (**72c**) и (**75c**) [127, 128]. Способность иммунных сывороток мышей к конъюгатам тетра- (**70c**) и октасахарида (**75c**) индуцировать опсонофагоцитоз убитых нагреванием клеток *S. pneumoniae* серотипа 14 была выше, чем активность антисывороток к конъюгированному гексасахариду (**72c**). Впервые защитная активность BSA-гликоконъюгатов, адсорбированных на гидроксиде алюминия, была продемонстрирована на модели септической пневмококковой инфекции у мышей, зараженных *S. pneumoniae* серотипа 14. Наибольшую защитную активность проявлял конъюгат (**70c**), меньшую – конъюгат (**75c**), а наименьший защитный эффект получен при иммунизации конъюгатом (**72b**). После инокуляции неиммунизированным мышам пуловых сывороток, полученных от мышей, иммунизированных самой высокой испытуемой дозой каждого гликоконъюгата, различий в пассивной защите мышей от инфекции в зависимости от гликоконъюгата обнаружено не было. Показано, что в ответ на вакцинацию мышей CRM197–КП (**69b**) происходило образование IgG1-антител к тетрасахариду (**70a**). Образование большого количества специфических антител к тетрасахариду (**70a**) и его защитные свойства подтверждают, что тетрасахарид (**70a**) является перспективным кандидатом для создания конъюгированной вакцины против заболеваний, вызванных *S. pneumoniae* серотипа 14 [127, 128].

Для оценки действия гликоконъюгатов на молекулярно-клеточном уровне был выбран конъюгат (**72c**) с синтетическим гексасахаридным лигандом. Показано, что иммунизация конъюгатом (**72c**) без адъюванта увеличивала количество TLR2-экспрессирующих клеток и индуцировала созревание дендритных клеток ($CD11c^+$, $CD80^+$ и $MHCII^+$), которые секретировали IL-1β, IL-6 и TNFα в культуральную среду. Уровень IL-1β, IL-10, IFNγ и TNFα в крови мышей повышался в течение 24 ч после однократного введения гликоконъюгата (**72c**) мышам. На 7-й день увеличивалось количество $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитов в селезенке и В-лимфоцитов. Через 14 суток после второй иммунизации уровни $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитов были ниже, чем в контроле, в то время как количество В-клеток, NK-клеток и MHCII-экспрессирующих клеток оставалось повышенным.

Добавление гидроксида алюминия к гликоконъюгату (**72c**) стимулировало выработку GM-CSF, IL-1β, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFNγ и TNFα. Титры IgG1-антител к КП *S. pneumoniae* серотипа 14 через 7 дней после второй иммунизации гликоконъюгатом с адъювантом были высокими. В этот период сохранялись нормальные уровни $CD4^+$-Т-лимфоцитов в селезенке, тогда как наблюдалось снижение количества $CD8^+$-Т-лимфоцитов и повышение уровня В-лимфоцитов, NK-клеток и клеток, экспрессирующих MHCII. Уровень IgG1-антител снижался к 92-му дню наблюдения. Бустерная иммунизация гликоконъюгатом (**72c**), адсорбированным на гидроксиде алюминия, стимулировала выработку IgG1-антител к КП, которые определялись в течение 97 дней. Выяснение специфических особенностей влияния синтетического гексасахаридного конъюгата (**72c**) на стимуляцию врожденного, клеточно-опосредованного иммунитета и антительного ответа может способствовать оптимизации конструкции гликоконъюгатной пневмококковой вакцины [129].

При создании синтетических вакцин против пневмококка также проводятся работы с использованием золотых нанокластеров в качестве носителей. В частности, были получены наночастицы (**76**) (рис. 11), несущие тетрасахаридный лиганд, являющийся повторяющимся звеном КП пневмококков серотипа 14 (**69**) [132]. Тетрасахарид (**70d**), содержащий терминальную тиольную группу для функционализации наночастицы, был конъюгирован вместе со стимулирующим Т-клетки пептидом ($OVA_{323–329}$) и *D*-глюкозным лигандом с образованием гибридных наночастиц (**76**) размером ~2 нм. Иммунологические исследования на мышах показали, что гликокластер (**76**) вызывает образование антител, специфичных к КП серотипа 14 (**69**). Полученные при иммунизации мышей наночастицами (**76**) антисыворотки были способны к опсонофагоцитозу пневмококков серотипа 14, однако менее эффективно, чем сыворотки мышей, иммунизированных конъюгатом бактериального КП (**69**) с CRM197.

***S. pneumoniae* серотипа 17F.** Капсулярный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 17F (**77**) (рис. 12) входит только в состав 23-валентных полисахаридных вакцин Pneumovax 23® и Pneumo 23®. Его повторяющееся звено содержит семь моносахаридных остатков и имеет достаточно сложное строение, в результате чего первоначально определение структуры (**77**) было сделано с ошибками. На основе ошибочной структуры КП серотипа 17F были синтезированы олигосахаридные лиганды (**78a**–**80a**) [133] (рис. 12). Также были получены соответствующие конъюгаты (**78b**–**80b**), которые использовали для иммунизаций мышей и кроликов. Конъюгаты ди- (**78b**) и трисахарида (**79b**) у обоих видов животных вызывали образование антител, специфичных к КП серотипа 17F (**77**), а также защищали мышей от инфицирования инкапсулированными штаммами *S. pneumoniae* серотипа 17F в опытах по активной иммунизации. Конъюгат тетрасахарида (**80b**) не был способен индуцировать специфичных к КП антител, а также не проявлял защитных свойств. Позднее, ко-

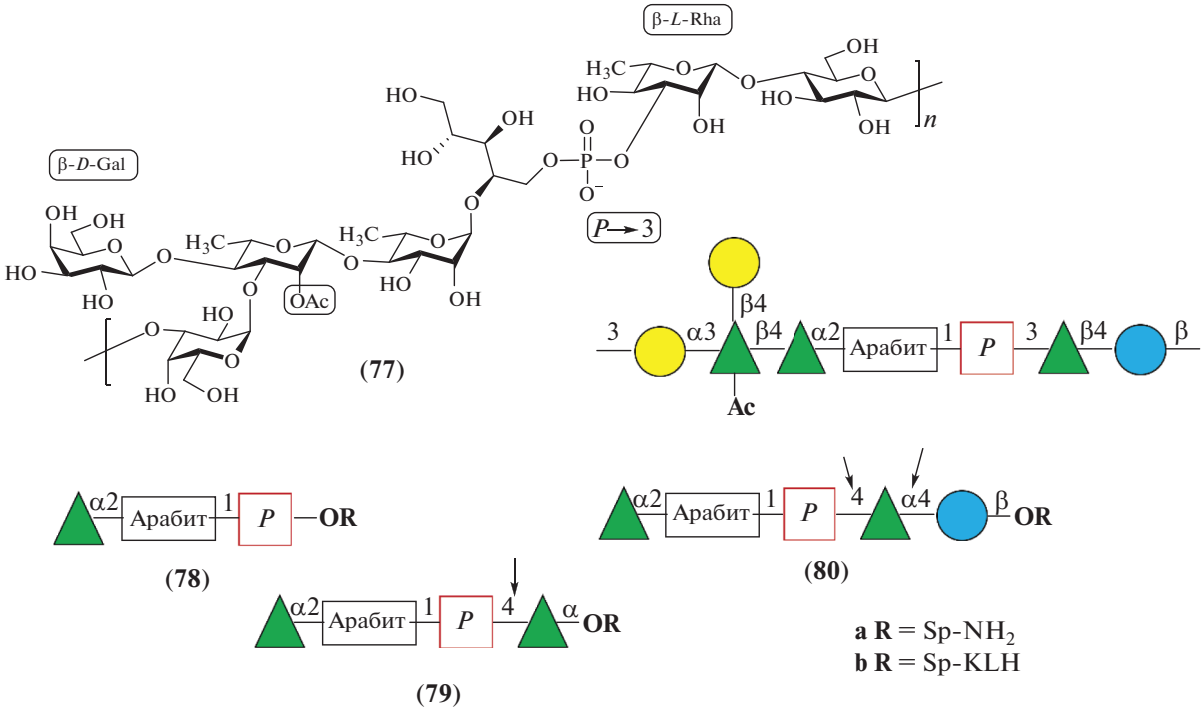


Рис. 12. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 17F (повторяющееся звено (**77**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**78a**, **79a**) и конъюгатов с KLH (серия b).

гда структура КП серотипа 17F (**77**) была уточнена, стало понятно, что в структуре тетрасахаридного лиганда (**80a**) присутствовали две ошибки (указаны стрелками на схеме) по сравнению с правильной химической структурой (**77**). Для трисахаридного лиганда (**79a**) наличие одной ошибки не сыграло роли. Это позводило сделать вывод, что в дисахариде (**78a**) уже содержится ключевой протективный эпитоп [134]. Для проверки этого предположения, конечно, требуется проведение более детальных исследований.

***S. pneumoniae* серотипа 19F.** КП *S. pneumoniae* серотипа 19F (**81**) (рис. 13) входит в состав всех лицензированных пневмококковых вакцин. Был получен гликоконъюгатный нанокластер (**83**), который наряду с тетрасахаридным лигандом (**70d**) (отвечает серотипу 14) включает трисахаридный лиганд (**82b**), соответствующий повторяющемуся звену КП (**81**) [135]. При иммунизации мышей гликонаночастицами (**83**) были получены антитела, специфичные к КП серотипа 14 (**69**). При этом титры были более высокими, чем в случае частиц (**76**), содержащих только лиганд серотипа 14, однако выработки антител, специфичных к КП серотипа 19F, не наблюдали. Исследования в этом направлении продолжаются.

***S. pneumoniae* серотипа 23F.** КП пневмококков серотипа 23F (**83**) (рис. 14) построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев и входит в состав 23-валентных пневмококковых полисахаридных вакцин Pneumovax 23® и Pneumo 23®. Для поиска оптимального олигосахаридного лиганда, применимого в создании соответствующего вакцинного кандидата, были синтезированы трисахаридный (**84a**) и тетрасахаридный (**85a**) (соответствует полному повторяющемуся звену) лиганды, а также их конъюгаты с белком-носителем KLH (**84b**, **85b**) [136, 137] (рис. 14). Для анализа их иммуногенности использовался и конъюгат KLH с КП серотипа 23F.

Результаты иммунизации кроликов и мышей показали существенные различия в иммуногенности конъюгатов. Так, у кроликов конъюгат с тетрасахаридом (**85b**) вызывал образование антител, специфичных к КП серотипа 23F (**83**), в то время как в экспериментах на мышах тот же самый конъюгат оказался совершенно неиммуногенным [137]. В свою очередь, конъюгат трисахарида (**84b**) оказался малоиммуногенным у кроликов и не вызывал образования антител, связывающихся с бактериальным КП (**83**). С помощью экспериментов с перекрестным ингибированием было показано, что антитела, индуцируемые у кроликов конъюгатами КП серотипа 23F (**83b**) и его полного повторяющегося звена (**85b**), обладают одинаковой эпитопной специфичность, но отличаются по специфичности от антител человека, которые были получены в ответ на иммунизацию полисаха-

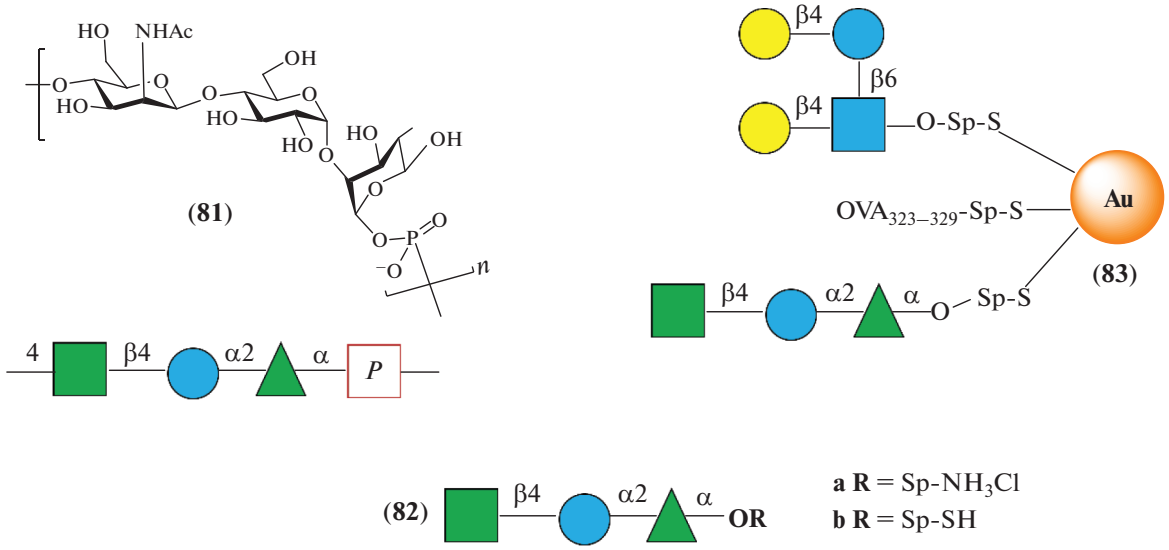


Рис. 13. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 19F (повторяющееся звено (**81**)), синтезированных родственных трисахаридных производных с агликоном-спейсером (**82a**, **82b**) и гибридной наночастицы (**83**).

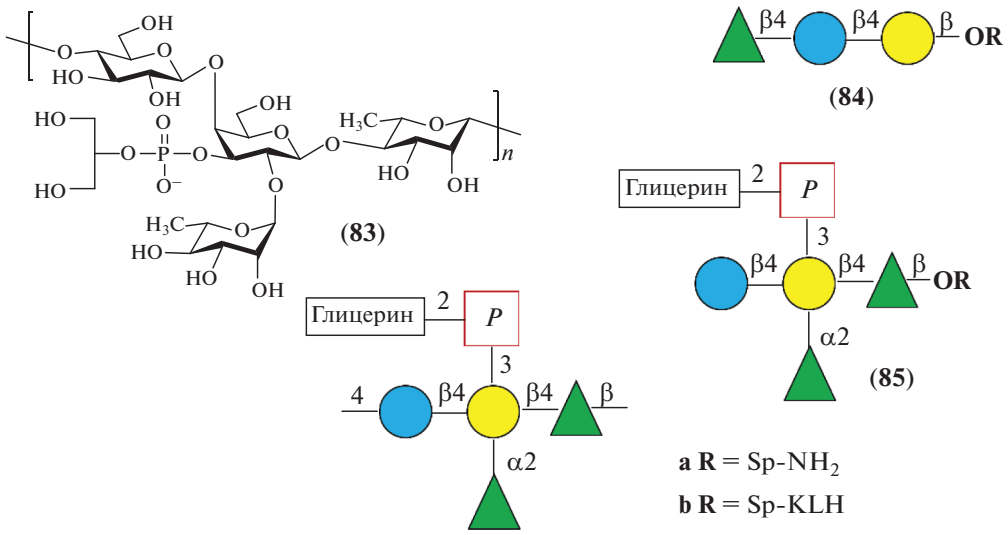


Рис. 14. Строение капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 23F (повторяющееся звено (**83**)), синтезированных родственных олигосахаридов (**84a**, **85a**) и конъюгатов с KLH (серия b).

ридом (**83**) в составе коммерческой 23-валентной полисахаридной пневмококковой вакцины [138].

Антисыворотки людей, иммунизированных КП (**83**), содержат высокие титры антител, связывающихся с КП серотипа 23F (**83**), однако это взаимодействие может лишь в незначительной степени быть проингибировано конъюгатами синтетических олигосахаридов (**84b**) и (**85b**). При этом рассматриваемая антисыворотка человека обладала в 5 раз более высокой опсонизирующей способностью в тестах *in vitro*, чем антисыворотка кролика к конъюгату полисахарида (**83b**). Сыворотка кроликов, иммунизированных конъюгатом тетрасахарида (**85b**), в этих же тестах оказалась в 2 раза менее активной, чем антисыворотка к конъюгату полисахарида (**83b**). Антитела, индуцированные конъюгатом трисахарида (**84b**), не вызывали опсонизации пневмококков серотипа 23F, что полностью согласуется с тем фактом, что антисыворотка к трисахаридному конъюгату (**84b**) не связывалась с нативным КП серотипа 23F (**83**) [138].

Результаты этой серии работ наглядно показывают, что иммуногенность, а также эпитопная специфичность иммунного ответа у различных

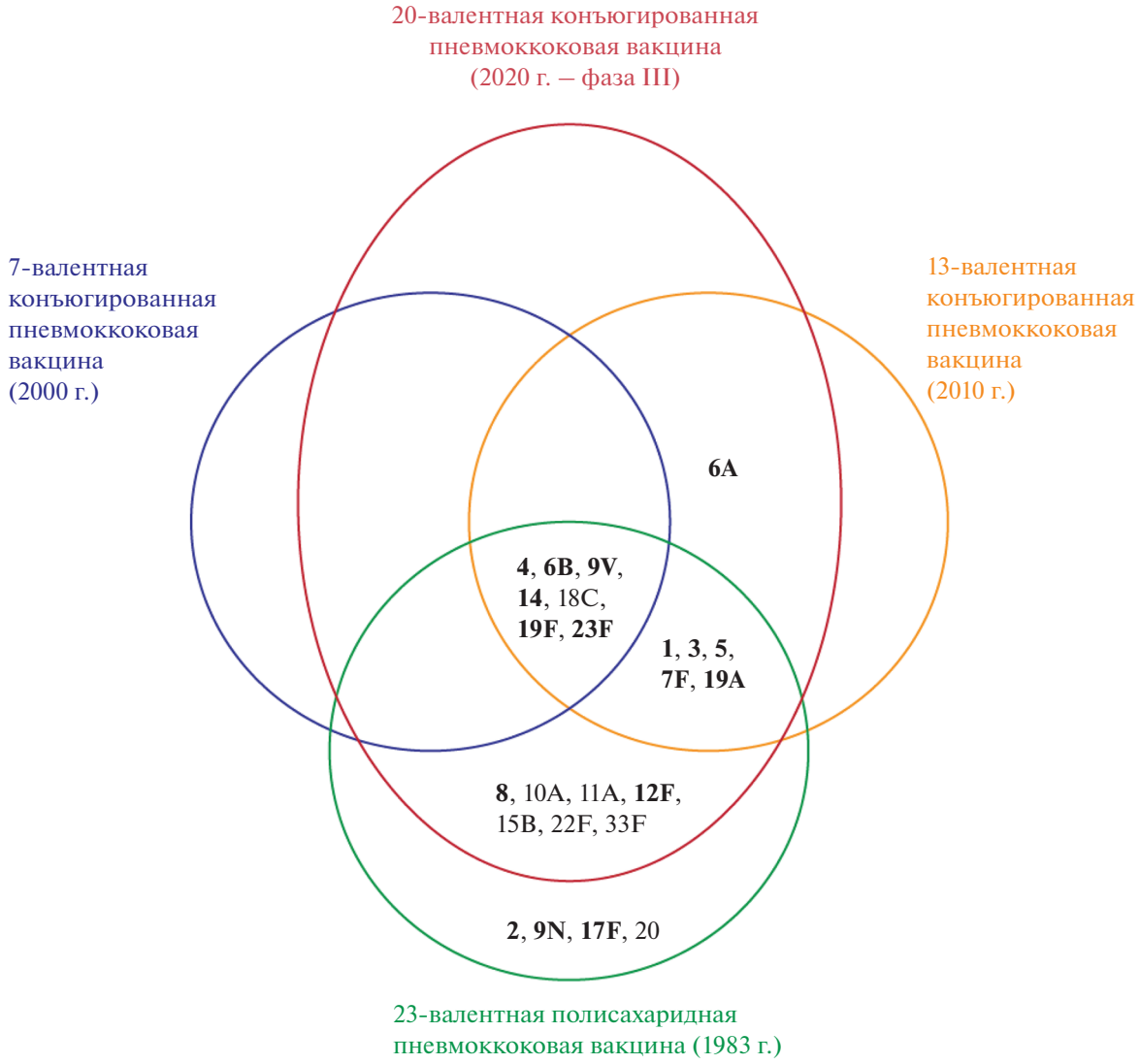


Рис. 15. Распределение серотипов в составе пневмококковых вакцин. Жирным шрифтом выделены рассмотренные в данном обзоре серотипы *S. pneumoniae*, для которых проводятся исследования с использованием синтетических олигосахаридных фрагментов, соответствующих капсулярным полисахаридам.

лабораторных животных и человека могут существенно отличаться. Авторы высказали предположение, что IgG человека способны распознавать эпитопы большего размера (в том числе конформационные эпитопы у крупных углеводных антигенов), в отличие от антител кролика, которые распознают эпитопы меньшего размера, присутствующие в том числе в коротких олигосахаридных лигандах. Поэтому для оценки эффективности вакцин необходимо проводить детальное изучение иммунного ответа у людей [138].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные в обзоре серотипы *S. pneumoniae* широко распространены во всех географических регионах и относятся к числу серотипов пневмококка, наиболее часто вызывающих заболевания у детей и взрослых. Капсулярные полисахариды почти всех этих серотипов *S. pneumoniae* включены в состав лицензированных полисахаридных и конъюгатных пневмококковых вакцин. Однако, несмотря на эффективность используемых в настоящий момент вакцин, требуется постоянный контроль за распространением различных серотипов пневмококка и своевременное введение вакцинных препаратов, содержащих антигены для наиболее актуальных серотипов.

В настоящее время активно продолжается разработка полисахаридных конъюгированных вакцин, и компания Pfizer готовит к лицензированию 20-валентную вакцину (Prevnar 20®, препарат про-

ходит третью фазу клинических испытаний), которая содержит конъюгаты полисахаридов семи дополнительных серотипов по сравнению с активно используемой в настоящее время вакциной Prevnar 13®. Распределение серотипов пневмококка в составе 7-, 13-, 20- и 23-валентных вакцинных препаратов суммировано на рис. 15.

Использование для получения конъюгированных вакцин полисахаридов, получаемых биотехнологическими методами, по-прежнему сопряжено с техническими сложностями. Среди рассмотренных в данном обзоре серотипов пневмококка многие КП содержат лабильные заместители или функциональные группы, которые модифицируются при выделении или в процессе конъюгации с белком-носителем, что ведет к искажению активных эпитопов и снижению иммуногенности соответствующих компонентов вакцины. Поэтому активно ведутся работы по синтезу фрагментов КП наиболее эпидемиологически актуальных серотипов и поиску эпитопов, ответственных за выработку защитных антител. Большой опыт исследований в этой области позволил создать определенные алгоритмы для эффективного отбора наиболее активных углеводных лигандов. Современные методы позволяют проводить автоматизированный скрининг углеводных лигандов, нанесенных на чипные слайды [54, 59, 62] и другие носители [139–145], для изучения эпитопной специфичности антител. Также были разработаны новые эффективные методы синтеза наиболее сложных типов олигосахаридов (см., например, работы [146–149]), в том числе автоматизированного синтеза олигосахаридов [150, 151], что существенно упрощает получение широких библиотек углеводных лигандов.

Проблемы, которые приходится решать при создании синтетических углеводных вакцин, во многом схожи со сложностями при разработке конъюгированных вакцин на основе бактериальных полисахаридов. Это и поиск оптимального метода конъюгации, и влияние связующего линкера на иммуногенность конъюгата, и правильный выбор адъюванта, а также несовпадение иммунных реакций на вводимые препараты у различных лабораторных животных и человека. Тем не менее в большинстве случае удается найти нужные условия для создания высокоиммуногенных конъюгатов синтетических олигосахаридов, вызывающих образование защитных антител.

Иммунологически активные олигосахариды вызывают выработку антител к капсулярным полисахаридам и усиливают комплемент-зависимый опсонофагоцитоз. Показано, что некоторые олигосахаридные конъюгаты вызывают даже более сильный антительный ответ, чем конъюгаты бактериальных КП отдельных серотипов. Это важное положение приводит к выводу о возможности замены КП таких серотипов в коммерческих вакцинах на синтетические олигосахариды с созданием поливалентной синтетической пневмококковой вакцины. Так, уже известен удачный пример совместного применения 13-валентной конъюгированной вакцины и конъюгата синтетического олигосахарида, отвечающего фрагменту капсулярного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 8 [119]. Тем не менее сегодняшний уровень возможностей олигосахаридного синтеза позволяет получать фактически любые олигосахаридные производные, что позволит в достаточно скором времени создать пневмококковую вакцину только на основе синтетических олигосахаридных лигандов. Немаловажно и то, что оперирование такими производными лучше соответствует стандартам качества фармацевтического производства GMP как на этапе получения вакцинных лигандов, так и их конъюгатов с белками-носителями или иными функциональными компонентами, включая адъювантные гликолипиды [152].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-73-30017).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Henrichsen J.* // J. Clin. Microbiol. 1995. V. 33. P. 2759–2762. https://doi.org/10.1128/JCM.33.10.2759-2762.1995
2. *Lund E., Henrichsen J.* // Methods in Microbiology / Eds. Bergan T., Norris J.R. Academic Press, London, United Kingdom, 1978. P. 241–262.
3. *Calix J.J., Nahm M.H.* // J. Infect. Dis. 2010. V. 202. P. 29–38. https://doi.org/10.1086/653123
4. *Alonso De Velasco E., Verheul A.F., Verhoef J., Snippe H.* // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. P. 591–603.
5. *Rijkers G.T., Sanders L.A., Zegers B.J.* // Immunodeficiency. 1993. V. 5. P. 1–21.
6. *Hausdorff W.P., Bryant J., Paradiso P.R., Siber G.R.* // Clin. Infect. Dis. 2000. V. 30. P. 100–121. https://doi.org/10.1086/313608
7. *Hausdorff W.P., Bryant J., Kloek C., Paradiso P.R., Siber G.R.* // Clin. Infect. Dis. 2000. V. 30. P. 122–140. https://doi.org/10.1086/313609

8. *Hausdorff W.P., Yothers G., Dagan R., Kilpi T., Pelton S.I., Cohen R., Jacobs M.R., Kaplan S.L., Levy C., Lopez E.L., Mason E.O., Jr., Syriopoulou V., Wynne B., Bryant J.* // Pediatr. Infect. Dis. J. 2002. V. 21. P. 1008–1016. https://doi.org/10.1097/00006454-200211000-00007
9. *Hausdorff W.P.* // Eur. J. Pediatr. 2002. V. 161 (Suppl. 2). P. S135–S139. https://doi.org/10.1007/s00431-002-1066-x
10. *Joffe M.D., Alpern E.R.* // Pediatr. Emerg. Care. 2010. V. 6. P. 448–454. https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e3181e15e36
11. *Johnson H.L., Deloria-Knoll M., Levine O.S., Stoszek S.K., Freimanis Hance L., Reithinger R., Muenz L.R., O'Brien K.L.* // PLoS Med. 2010. V. 7 (10). Article e1000348. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000348
12. *Athlin S., Kaltoft M., Slotved H.C., Herrmann B., Holmberg H., Bossen Konradsen H., Strålina K.* // Clin. Vaccine Immunol. 2014. V. 21. P. 1541–1549. https://doi.org/10.1128/CVI.00259-14
13. *Littorin N., Udden F., Ahl J., Resman F., Slotved H.-C., Athlin S., Riesbeck K.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 2746. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02746
14. *Hyams C., Yuste J., Bax K., Camberlein E., Weiser J.N., Brown J.S.* // Infect. Immun. 2010. V. 78. P. 716–725. https://doi.org/10.1128/IAI.01056-09
15. *Melin M., Trzciński K., Antonio M., Meri S., Adegbola R., Kaijalainen T., Käyhty H., Väkeväinen M.* // Infect. Immun. 2010. V. 78. P. 5252–5261. https://doi.org/10.1128/iai.00739-10
16. *Melin M., Jarva H., Siira L., Meri S., Kayhty H., Vakevainen M.* // Infect. Immun. 2009. V. 77. P. 676–684. https://doi.org/10.1128/IAI.01186-08
17. *Weinberger D.M., Harboe Z.B., Sanders E.A., Ndiritu M., Klugman K.P., Rückinger S., Dagan R., Adegbola R., Cutts F., Johnson H.L., O'Brien K.L., Scott J.A., Lipsitch M.* // Clin. Infect. Dis. 2010. V. 51. P. 692–699. https://doi.org/10.1086/655828
18. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper // 2007. V. 82. P. 93–104.
19. Pneumococcal vaccines – WHO position paper // Wkly Epidemiol. Rec. 2012. V. 87. P. 129–144.
20. *Козлов Р.С.* // МАКМАХ. 2010. С. 25. [*Kozlov R.S.* // Scientific and Practical Journal of the Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2010. P. 25.]
21. *Козлов Р.С., Чагарян А.Н., Козлова Л.В., Муравьев А.А.* // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2011. Т. 13. С. 177–187. [*Kozlov R.S., Chagaryan A.N., Kozlova L.V., Muraviev A.A.* // Klin. Microbiol. Antimicrobial Chemotherapy. 2011. V. 13. P. 177–187.]
22. *Миронов К.О., Платонов А.Е., Козлов Р.С.* Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2011. Т. 13. С. 104–113. [*Mironov K.O., Platonov A.E., Kozlov R.S.* // Klin. Microbiol. Antimicrobial Chemotherapy. 2011. V. 13. P. 104–113.]
23. *Муравьев А.А., Чагарян А.Н., Братусь Е.В., Перцева Т.А., Карпов И.А., Качанко Е.Ф.* // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2013. Т. 15. С. 147–158. [*Muravev A.A., Chagaryan A.N., Brothers E.V., Pertseva T.A., Karpov I.A., Kachanko E.F.* // Klin. Microbiol. Antimicrobial Chemotherapy. 2013. V. 15. P. 147–158.]
24. *Alexandre C., Dubos F., Courouble C., Pruvost I., Varon E., Martinot A.* // Acta Paediatr. 2010. V. 99. P. 1686–1690. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2010.01914.x
25. *Jamal F., Pit S., Isahak I., Abdullah N., Zainal Z., Abdullah R., Henrichsen J.* // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 1987. V. 18. P. 79–84.
26. *Lin T.Y., Shah N.K., Brooks D., Garcia C.S.* // Vaccine 2010. V. 48. P. 7589–7605. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.053
27. *McIntosh E.D., Fritzell B., Fletcher M.A.* // Epidemiol. Infect. 2007. V. 135. N. 4. P. 644–656. https://doi.org/10.1017/S0950268806007199
28. *Rusen I.D., Fraser-Poberts M.D.* // Pediatr. Infect. Dis. 1997. V. 16. P. 656–662. https://doi.org/10.1097/00006454-199707000-00007
29. *Jauneikaitea E., Jefferies J.M., Hibberdb M.L., Clarkea S.C.* // Vaccine. 2012. V. 30. P. 3503–3514. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.066
30. *Jansen W.T., Snippe H.* // Indian J. Med. Res. 2004. V. 119. (Suppl). P. 7–12.
31. *Butler J.C.* // Microb. Drug Resist. 1997. V. 3. P. 125–129. https://doi.org/10.1089/mdr.1997.3.125
32. CDC // MMWR. 1997. V. 46. No. RR-08. P. 1–24.
33. CDC // MMWR. 2008. V. 57. P. 1148–1151.
34. *Inostroza J., Vinet A.M., Retamal G., Lorca, Ossa G., Facklam R.R., Sorensen R.U.* // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001. V. 8. P. 556–559. https://doi.org/10.1128/CDLI.8.3.556-559.2001
35. *Akata K., Chang B., Yatera K., Kawanami T., Yamasaki K., Naito K., Noguchi S., Ishimoto H., Mukae H.* // J. Infect. Chemother. 2015. V. 21. P. 723–728. https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.07.002
36. *Chiba N.* // Jpn. J. Chemother. 2011. V. 59. P. 561–572.
37. *Kuroki T., Ishida M., Suzuki M., Furukawa I., Ohya H., Watanabe Y., Konnai M., Aihara Y., Chang B., Ariyoshi K., Oishi K., Ohnishi M., Morimoto K.* // Am. Geriatr. Soc. 2014. V. 62. P. 1197–1198. https://doi.org/10.1111/jgs.12863
38. *Al-Jardani A., Al Rashdi A., Al Jaaidi A., Al Balushi M., Al Mahruqi S., Al-Abri S., Al-Maani A., Kumar R.* // Int. J. Infect. Dis. 2019. V. 85. P. 135–140. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.05.027
39. *Lee S., Lee K., Kang Y., Bae S.* // Microb. Drug Resist. 2010. V. 16. P. 135–142. https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0114
40. *Coffey T., Derron S., Daniels M., Garcia-Leoni M.E., Cercenado E., Bouza E., Fenoll A., Spratt B.G.* // Microbiology. 1996. V. 142. P. 2742–2757. https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2747
41. *España P.P., Uranga A., Ruiz L.A., Quintana J.M., Bilbao A., Aramburu A., Serrano L., Ayarza R., Marti-*

nez A.P., Zalacain R. // Vaccine. 2019. V. 37. P. 3840–3848.
https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.052

42. *Reinter R.R., Kaufhold A., Kuhnemund O., Luttichen R.* // Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis. 1994. V. 281. P. 481–490.
43. *Таточенко В.К., Катосова Л.К., Уланова М.А.* // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1994. С. 3–10. [*Tatochenko V.K., Katosova L.K., Ulanova M.A.* // Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1994. P. 3–10.]
44. *Белошицкий Г.В., Королева И.С.* // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014. Т. 1. С. 90–97. [*Beloshitsky G.V., Koroleva I.S.* / / Epidemiologia i Vaccinoprophylaktika. 2014. V. 1. P. 90–97.]
45. *Douglas R.M., Paton J.C., Duncan S.J., Hansman D.J.* // J. Infect. Dis. 1983. V. 148. P. 131–137.
https://doi.org/10.1093/infdis/148.1.131
46. *Thompson A., Lamberth E., Severs J., Scully I., Tarabar S., Ginis J., Jansen K.U., Gruber W.C., Scott D.A., Watson W.* // Vaccine. 2019. V. 37. P. 6201–6207.
https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.08.048
47. *Nurkka A., Joensuu J., Henckaerts I., Peeters P., Poolman J., Kilpi T., Käyhty H.M.* // Pediatr. Infect. Dis. J. 2004. V. 11. P. 1008–1014.
https://doi.org/10.1097/01.inf.0000143640.03214.18
48. *Prymula R., Peeters P., Chrobok V., Kriz P., Novakova E., Kaliskova E., Kohl I., Lommel P., Poolman J., Prieels J.-P., Schuerman L.* // Lancet. 2006. V. 367. P. 740–748.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68304-9
49. *Schuerman L., Prymula R., Chrobok V., Dieussaert I., Poolman J.* // Vaccine. 2007. V. 25. P. 1953–1961.
https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.007
50. *Schuerman L., Prymula R., Henckaerts I., Poolman J.* // Vaccine. 2007. V. 25. P. 1962–1968.
https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.008
51. *Shiramoto M., Hanada R., Juergens C., Shoji Y., Yoshida M., Ballan B., Cooper D., Gruber W.C., Scott D.A., Schmoele-Thoma B.* // Hum. Vaccine Immunother. 2015. V. 11. P. 2198–2206.
https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1030550
52. *Simonsen V., Brandão A.P., Brandileone M.C.C., Yara T.I., Di Fabio J.L., Lopes M.H., Jacob Filho W.* // Braz. J. Med. Biol. Res. 2005. V. 38. P. 251–260.
https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000200014
53. *Andrews N.J., Waight P.A., Burbidge P., Pearce E., Roalfe L., Zancolli M., Slack M., Ladhani S.N., Miller E., Goldblatt D.* // Lancet Infect. Dis. 2014. V. 14. P. 839–846.
https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70822-9
54. *Schumann B., Anish C., Pereira C.L., Seeberger P.H.* Chapter 3. Carbohydrate vaccines // Biotherapeutics / Eds. Jones L., McKnight A.J. Royal Society of Chemistry, 2013. P. 68–104.
55. *Генинг М.Л., Курбатова Е.А., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э.* // Успехи химии. 2015. Т. 8. С. 1100–1113. [*Gening M.L., Kurbatova E.A., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Rus. Chem. Rev. 2015. V. 84. P. 1100–1113.]
https://doi.org/10.1070/RCR4574
56. *Yu X.H., Sun Y., Frasch C., Concepcion N., Nahm M.H.* // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1999. V. 6. P. 519–524.
57. *van Dam J.E., Fleer A., Snippe H.* // Antonie Van Leeuwenhoek. 1990. V. 58. P. 1–47.
https://doi.org/10.1007/BF02388078
58. *Kamerling J.P.* Pneumococcal Polysaccharides: a Chemical View // *Streptococcus pneumoniae*, Molecular Biology and Mechanisms of Disease / Ed. Tomasz A. New York: Mary Ann Liebert, 1999. P. 81–114.
59. *Kaplonek P., Khan N., Reppe K., Schumann B., Emmadi M., Lisboa M.P., Xu F.-F., Calow A.D.J., Parameswarappa S.G., Witzenrath M., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 13353–13358.
https://doi.org/10.1073/pnas.1811862115
60. *Jansen W.T., Hogenboom S., Thijssen M.J., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F., Verhoef J., Snippe H., Verheul A.F.M.* // Infect. Immun. 2001. V. 69. P. 787–793.
https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.787-793.2001
61. *Benaissa-Trouw B., Lefeber D.J., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G., Kraaijeveld K., Snippe H.* // Infect. Immun. 2001.V. 69. P. 4698–4701.
https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4698-4701.2001
62. *Parameswarappa S.G., Reppe K., Geissner A., Ménová P., Govindan S., Calow A.D.J., Wahlbrink A., Weishaupt M.W., Monnanda B.P., Bell R.L., Pirofski L.-A., Suttorp N., Sander L.E., Witzenrath M., Pereira C.L., Anish C., Seeberger P.H.* // Cell Chem. Biol. 2016. V. 23. P. 1407–1416.
https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.09.016
63. *Astronomo R.D., Burton D.R.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2010. V. 9. P. 308–324.
https://doi.org/10.1038/nrd3012
64. *Schumann B., Reppe K., Kaplonek P., Wahlbrink A., Anish. C, Witzenrath M., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // ACS Cent. Sci. 2018. V. 4. P. 357–361.
https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00504
65. *Gessner B.D., Mueller J.E., Yaro S.* // BMC Infect. Dis. 2010. V. 10. Article 22.
https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-22
66. *Poolman J., Frasch C., Nurkka A., Käyhty H., Biemans R., Schuerman L.* // Clin. Vaccine Immunol. 2011. V. 18. P. 327–336.
https://doi.org/10.1128/CVI.00402-10
67. *Schumann B., Pragani R., Anish C., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // Chem. Sci. 2014. V. 5. P. 1992–2002.
https://doi.org/10.1039/C3SC53362J
68. *Wu X., Cui L., Lipinski T., Bundle D.R.* // Chem. Eur. J. 2010. V. 16. P. 3476–3488.
https://doi.org/10.1002/chem.201090046
69. *Christina A.E., van den Bos L.J., Overkleeft H.S., van der Marel G.A., Codee J.D.C.* // J. Org. Chem. 2011. V. 76. P. 1692–1706.
https://doi.org/10.1021/jo102363d
70. *Pfister H.B., Mulard L.A.* // Org. Lett. 2014. V. 16. P. 4892–4895.
https://doi.org/10.1021/ol502395k
71. *Emmadi M., Kulkarni S.S.* // Nat. Prod. Rep. 2014. V. 31. P. 870–879.
https://doi.org/10.1039/C4NP00003J
72. *Goldblatt D., Plikaytis B.D., Akkoyunlu M., Antonello J., Ashton L., Blake M., Burton R., Care R., Durant N.,*

Feavers I., Fernsten P., Fievet F., Giardina P., Jansen K., Katz L., Kierstead L., Lee L., Lin J., Maisonneuve J., Nahm M.H., Raab J., Romero- Steiner S., Rose C., Schmidt D., Stapleton J., Carlone G.M. // Clin. Vaccine Immunol. 2011. V. 18. P. 1728–1736. https://doi.org/10.1128/CVI.05252-11

73. *Emmadi M., Khan N., Lykke L., Reppe K., Parameswarappa S.G., Lisboa M.P., Wienhold S.M., Witzenrath M., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 14783–14791. https://doi.org/10.1021/jacs.7b07836
74. *Gruber W.C., Scott D.A., Emini E.A.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2012. V. 1263. P. 15–26. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06673.x
75. *Choi E.H., Zhang F., Lu Y-J., Malleya R.* // Clin. Vaccine Immunol. 2016. V. 23. P. 162–167. https://doi.org/10.1128/CVI.00591-15
76. *Cartee R.T., Forsee W.T., Schutzbach J.S., Yother J.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 3907–3914. https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.3907
77. *Dillard J.P., Vandersea M.W., Yother J.* // J. Exp. Med. 1995. V. 181. P. 973–983. https://doi.org/10.1084/jem.181.3.973
78. *Guidolin A., Morona J.K., Morona R., Hansman D., Paton J.C.* // Infect. Immun. 1994. V. 62. P. 5384–5396. https://doi.org/10.1128/IAI.62.12.5384-5396.1994
79. *Kolkman M.A., Wakarchuk W., Nuijten P.J., van der Zeijst B.A.* // Mol. Microbiol. 1997. V. 26. P. 197–208. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5791940.x
80. *Arrecubieta C., Lopez R., Garcia E.* // J. Exp. Med. 1996. V. 184. P. 449–455. https://doi.org/10.1084/jem.184.2.449
81. *Moore M.R., Link-Gelles R., Schaffner W., Lynfield R., Lexau C., Bennett N.M., Petit S., Zansky S.M., Harrison L.H., Reingold A., Miller L., Scherzinger K., Thomas A., Farley M.M., Zell E.R., Taylor T.H., Jr., Pondo T., Rodgers L., McGee L., Beall B., Jorgensen J.H., Whitney C.G.* // Lancet Infect. Dis. 2015. V. 15. P. 301–309. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)71081-3
82. *Cartee R.T., Forsee W.T., Yother J.* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 4470–4479. https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4470-4479.2005
83. *Goebel W.F.* // J. Exp. Med. 1940. V. 72. P. 33–48. https://doi.org/10.1084/jem.72.1.33
84. *Pichichero M.E., Porcelli S., Treanor J., Anderson P.* // Vaccine 1998. V. 16. P. 83–89. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)00146-1
85. *Laferrière C.A., Sood R.K., de Muys J.M., Michon F., Jennings H.J.* // Vaccine. 1997. V. 15. P. 179–186. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00148-X
86. *Lindblad E.B.* // Immunol. Cell Biol. 2004. V. 82. P. 497–505. https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01286.x
87. *Reppe K., Tschernig T., Lührmann A., van Laak, V., Grote K., Zemlin M.V., Gutbier B., Müller H.C., Kursar M., Schutte H., Rosseau S., Pabst R., Suttorp N., Witzenrath M.* // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2009. V. 40. P. 474–481. https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0071OC
88. *Witzenrath M., Pache F., Lorenz D., Koppe U., Gutbier B., Tabeling C., Reppe K., Meixenberger K., Dorhoi A., Ma J., Holmes A., Trendelenburg G., Heimesaat M.M., Bereswill S., van der Linden M., Tschopp J., Mitchell T.J., Suttorp N., Opitz B.* // J. Immunol. 2011. V. 187. P. 434–440. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003143
89. *Xiong C., Feng S., Qiao Y., Guo Z., Gu G.* // Chem. Eur. J. 2018. V. 24. P. 8205–8216. https://doi.org/10.1002/chem.201800754
90. *Pereira C.L., Geissner A., Anish C., Seeberger P.H.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2015. V. 54. P. 10016–10019. https://doi.org/10.1002/anie.201504847
91. *Geissner A., Pereira C.L., Leddermann M., Anish C., Seeberger P.H.* // ACS Chem. Biol. 2016. V. 11. P. 335–344. https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00768
92. *Ginsburg A.S., Alderson M.R.* // Drugs Today (Barc). 2011. V. 47. P. 207–214. https://doi.org/10.1358/dot.2011.47.3.1556471
93. *Ravenscroft N., Costantino P., Talaga P., Rodriguez R., Egan W.* // Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control (eBook). Springer. 2015. P. 301–381.
94. *Cipollo J.F.* // 2009 Review of Manufacturing Process – Prevnar13 [Pneumococcal 13-Valent Conjugate Vaccine (Diphteria CRM197 protein)] (Food Agric Org, Rome). Available at https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM570727.zip. Accessed September 22, 2017.
95. *Lisboa M.P., Khan N., Martin C., Xu F-F., Reppe K., Geissner A., Govindan S., Witzenrath M., Pereira C.L., Seeberger.PH.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 11063–11068. https://doi.org/10.1073/pnas.1706875114
96. *Sucher A.J., Chahine E.B., Nelson M., Sucher B.J.* // Ann. Pharmacother. 2011. V. 45. P. 1516–1524. https://doi.org/10.1345/aph.1Q347
97. *Khatun F., Stephenson R.J., Toth I.* // Chemistry. 2017. V. 23. P. 4233–4254. https://doi.org/10.1002/chem.201603599
98. *Dagan R., Poolman J., Siegrist C.-A.* // Vaccine. 2010. V. 28. P. 5513–5523. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.026
99. *Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C.J., Jr.* // Infect. Dis. 1979. V. 140. P. 979–983. https://doi.org/10.1093/infdis/140.6.979
100. *Siber G.R.* // Science. 1994. V. 265. P. 1385–1387. https://doi.org/10.1126/science.8073278
101. *Breiman R.F., Butler J.C., Tenover F.C., Elliott J.A., Facklam R.R.* // JAMA. 1994. V. 271. P. 1831–1835.
102. *Novak R., Henriques B., Charpentier E., Normark S., Tuomanen E.* // Nature. 1999. V. 399. P. 590–593. https://doi.org/10.1038/21202
103. *Parkinson A.J., Davidson M., Fitzgerald M.A., Bulkow L.R., Parks D.J.* // J. Infect. Dis. 1994. V. 170. P. 461–464. https://doi.org/10.1093/infdis/170.2.461
104. *Borgono J.M., Mclean A.A., Vella P.P.* // Proc. Soc. Biol. Med. 1978. V. 157. P. 148–154. https://doi.org/10.3181/00379727-157-40010
105. *Kim H.W., Lee S., Kim K.-H.* // Medicine (Baltimore). 2016. V. 95. P. e4854.
106. *Lee H., Cha J.H., Nahm M.H., Burton R.L., Kim K.H.* // BMC Infect. Dis. 2013. V. 13. P. e474. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-474
107. *Kim K.H.* // Korean J. Pediatr. 2005. V. 48. P. 506–551.
108. *Park I.H., Geno K.A., Yu J., Oliver M.B., Kim K.H., Nahm M.H.* // Clin. Vaccine Immunol. 2015. V. 22.

P. 313–318.
https://doi.org/10.1128/CVI.00647-14

109. *Peeters C.C.A.M., Evenberg D., Hoogerhout P., Kayhty H., Saarinen L., van Boeckel C.A.A., van der Marel G.A., van Boom J.H., Poolman J.T.* // Infect. Immun. 1992. V. 60. P. 1826–1833. https://doi.org/10.1128/IAI.60.5.1826-1833.1992
110. *Pozsgay V., Chu C., Pannell L., Wolfe J., Robbins J.B., Schneerson R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 5194–5197. https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5194
111. *Thijssen M.J.L., Bijkerk M.H.G., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G.* // Carbohydr. Res. 1998. V. 306. P. 111–125. https://doi.org/10.1016/s0008-6215(97)10013-1
112. *Thijssen M.J.G., Halkes K.M., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G.* // Bioorg. Med. Chem. 1994. V. 2. P. 1309–1317. https://doi.org/10.1016/s0968-0896(00)82081-7
113. *Thijssen M.J.G., van Rijswijk M.N., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G.* // Carbohydr. Res. 1998.V. 306. P. 93–109. https://doi.org/10.1016/s0008-6215(97)00271-1
114. *Parameswar A.R., Park I.H., Saksena R., Kováč P., Nahm M.H., Demchenko A.V.* // ChemBioChem. 2009. V. 10. P. 2893–2899. https://doi.org/10.1002/cbic.200900587
115. *Parameswar A.R., Pornsuriyasak P., Lubanowski N.A., Demchenko A.V.* // Tetrahedron. 2007. V. 63. P. 10083–10091. https://doi.org/10.1016/j.tet
116. *Sukhova E.V., Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E., Kurbatova E.A.* // J. Carbohydr. Chem. 2018. V. 37. P. 1–17. https://doi.org/10.1080/07328303.2017.1420797
117. *Ménová P., Sella M., Sellrie K., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // Chem. Eur. J. 2018. V. 24. P. 4181–4187. https://doi.org/10.1002/chem.201705379
118. *Ardanuy C., de la Campa A.G., García E., Fenoll A., Calatayud L., Cercenado E., Pérez-Trallero E., Bouza E., Liñares J.* // Emerg. Infect. Dis. 2014. V. 20. P. 1848–1856. https://doi.org/10.3201/eid2011.131215
119. *Schumann B., Hahm H.S., Parameswarappa S.G., Reppe K., Wahlbrink A., Govindan S., Kaplonek P., Pirofski L.A., Witzenrath M., Anish C., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // Sci. Transl. Med. 2017. V. 9. Article eaaf5347. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf5347
120. *McNeely T.B., Staub J.M., Rusk C.M., Blum M.J., Donnelly J.J.* // Infect. Immun. 1998. V. 66. P. 3705–3710. https://doi.org/10.1128/iai.66.8.3705-3710.1998
121. *Lee C.-J., Karpas A., Wang T.R., Kosaka T., Koizumi K.* // Microbiol. Immunol. 1996. V. 40. P. 857–865. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1996.tb01151.x
122. *Parameswarappa S.G., Pereira C.L. Seeberger P.H.* // Beilstein J. Org. Chem. 2020. V. 16. P. 1693–1699. https://doi.org/10.3762/bjoc.16.140
123. *Seeberger P.H., Claney L., Govindan P., Govindan S.* // Beilstein J. Org. Chem. 2017. V. 13. P. 164–173. https://doi.org/10.3762/bjoc.13.19
124. *Mekada E., Uchida T.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 12148–12153.
125. *Kochetkov N K., Nifant'ev N E., Backinowsky L.V.* // Tetrahedron. 1987. V. 43. P. 3109–3121. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86852-6
126. *Crane D.T., Bolgiano B., Jones C.* // Eur. J. Biochem. 1997. V. 246. P. 320–327. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00320.x
127. *Tsvetkov Y.E., Gening M.L., Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Nifantiev N.E.* // Pure Appl. Chem. 2017. V. 89. P. 1403–1411. https://doi.org/10.1515/pac-2016-1123
128. *Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Akhmatova E.A., Egorova N.B., Yastrebova N.E., Sukhova E.V., Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Gening M.L., Nifantiev N.E.* // Front. Immunol. 2017. V. 8. Article 659. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00659
129. *Akhmatova N.K., Kurbatova E.A., Akhmatov E.A., Egorova N.B., Logunov D.Y., Gening M.L., Nifantiev N.E.* // Front. Immunol. 2016. V. 7. Article 248. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00248
130. *Safari D., Dekker H.A., Joosten J.A., Michalik D., de Souza A.C., Adamo R., Lahmann M., Sundgren A., Oscarson S., Kamerling J.P.* // Infect. Immun. 2008. V. 76. P. 4615–4623. https://doi.org/10.1128/IAI.00472-08
131. *Safari D., Dekker H.A., de Jong B., Rijkers G.T., Kamerling J.P., Snippe H.* // Vaccine. 2011. V. 29. P. 6498–6504. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.013
132. *Safari D., Marradi M., Chiodo F., Th Dekker H.A., Shan Y., Adamo R., Oscarson S., Rijkers GT., Lahmann M., Kamerling J.P.* // Nanomedicine. 2012. V. 7. P. 651–662. https://doi.org/10.2217/nnm.11.151
133. *Alonso de Velasco E., Verheul A.F., Veeneman G. H., Gomes L.J., van Boom J.H., Verhoef J., Snippe H.* // Vaccine. 1993. V. 11. P. 1429–1436. https://doi.org/10.1016/0264-410x(93)90172-t
134. *Jansen W.T.M., Verheul A.F., Veeneman G.H., van Boom J.H., Snippe H.* // Vaccine. 2002. V. 20. P. 19–21. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00263-8
135. *Vetro M., Safari D., Fallarini S., Salsabila K., Lahmann M., Penadés S., Lay L., Marradi M., Compostella F.* // Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 13–23. https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0306
136. *van Steijn A.M., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G.* // Carbohydr. Res. 1991. V. 211. P. 261–277. https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)80096-6
137. *van Steijn A.M., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G.* // J. Carbohydr. Chem. 1992. V. 11. P. 665–689. https://doi.org/10.1080/07328309208020085
138. *Alonso de Velasco E., Verheul A.F.M., van Steijn A.M.P., Dekker H.A.T., Feldman R.G., Fernández I.M., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G., Verhoef J., Snippe H.* // Infect. Immun. 1994. V. 62. P. 799–808. https://doi.org/10.1128/IAI.62.3.799-808.1994
139. *Hyun J. Y., Pai J., Shin I.* // Acc. Chem. Res., 2017. V. 50. P. 1069–1078. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00043
140. *Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Beau R., Aimanianda V., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // Chem. Eur. J. 2015. V. 21. P. 1029–1035. https://doi.org/10.1002/chem.201404770
141. *Крылов В.Б., Петрук М.И., Григорьев И.В., Лебедин Ю.С., Глушко Н.И., Халдеева Е.В., Аргунов Д.А., Хатунцева Е.А., Топлишек М.В., Комарова Б.С.,*

Карелин А.А., Юдина О.Н., Меньшов В.М., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 78–86. [*Krylov V.B., Petruk M.I., Grigoryev I.V., Lebedin Y.S., Glushko N.I., Khaldeeva E.V., Argunov D.A., Khatuntseva E.A., Toplishek M.V., Komarova B.S., Karelin A.A., Yudina O.N., Menshov V.M., Yashunskii D.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 80–89.]
https://doi.org/10.1134/S1068162017060073

142. *Argunov D.A., Trostianetskaia A.S., Krylov V.B., Kurbatova E.A., Nifantiev N.E.* // Eur. J. Org. Chem. 2019. V. 2019. P. 4226–4232.
https://doi.org/10.1002/ejoc.201900389

143. *Laverde D., Romero-Saavedra F., Argunov D.A., Enotarpi J., Krylov V.B., Kalfopoulou E., Martini C., Torelli R., van der Marel G.A., Sanguinetti M., Codée J.D.C., Nifantiev N.E., Huebner J.* // ACS Infect. Dis. 2020. V. 6. P. 1816–1826.
https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00063

144. *Matveev A.L., Krylov V.B., Emelyanova L.A., Solovev A.S., Khlusevich Y.A., Baykov I.K., Fontaine T., Latgé J.-P., Tikunova N.V., Nifantiev N.E.* // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0193938.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193938

145. *Krylov V.B., Nifantiev N.E.* // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2020, V. 425. P. 1–16.
https://doi.org/10.1007/82_2019_187

146. *Komarova B.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Chem. Rec. 2016. V. 16. P. 488–506.
https://doi.org/10.1002/tcr.201500245

147. *Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2014. V. 384. P. 70–86.
https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.11.016

148. *Krylov V.B., Argunov D.A., Vinnitskiy D.Z., Verkhnyatskaya S.A., Gerbst A.G., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S., Huebner J., Holst O., Siebert H.-C., Nifantiev N.E.* // Chem. Eur. J. 2014. V. 20. P. 16516–16522.
https://doi.org/10.1002/chem.201405083

149. *Токатлы А.И., Винницкий Д.З., Устюжанина Н.Е., Нифантьев Н.Э.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 57–75. [*Tokatly A.I., Vinnitskiy D.Z., Ustyuzhanina N.E., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 52–68.]
https://doi.org/10.31857/S0132342321010255

150. *Pardo-Vargas A., Delbianco M., Seeberger P.H.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2018. V. 46. P. 48–55.
https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.04.007

151. *Louçano J., Peter B., Marchesi A., del Bino L., Adamo R., Flitsch S., Salwiczek M.* // RSC Adv. 2020. V. 10. P. 23668–23674.
https://doi.org/10.1039/d0ra01803a

152. *Cavallari M., Stallforth P., Kalinichenko A., Rathwell D.C.K., Gronewold T.M.A., Adibekian A., Mori L., Landmann R., Seeberger P.H., De Libero G.* // Nature Chem. Biol. 2014. V. 10. P. 950–956.
https://doi.org/10.1038/nchembio.1650

Synthetic Analogues of Capsular Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* and Immunogenic Activities of Glycoconjugates Thereof

M. L. Gening*, E. A. Kurbatova, and N. E. Nifantiev*, #**

 # Phone/fax: +7 (490) 135-87-84; e-mail: nen@ioc.ac.ru

**N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Leninskij prospekt 47, Moscow, 119991 Russia*

***Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, ul. Malyj Kazennyj per. 5a, Moscow, 105064 Russia*

Streptococcus pneumoniae is a cause of severe diseases in adults and children. It was found that some capsule polysaccharides of clinically significant pneumococcal serotypes have low immunogenicity as part of commercial polysaccharide and conjugated pneumococcal vaccines. The review considers methods for obtaining and structural features of synthetic oligosaccharides of problematic pneumococcal serotypes characterized by low immunogenicity due to destruction or undesirable modification in the process of their preparation and purification; serotypes that cause severe pneumococcal diseases, as well as serotypes that are not part of conjugated pneumococcal vaccines. It is shown that synthetic oligosaccharides corresponding to protective glycotopes of capsular polysaccharides of various pneumococcal serotypes induce the formation of protective opsonizing antibodies and immunological memory. Optimal designs of oligosaccharides of epidemiologically significant pneumococcal serotypes that can be used to develop synthetic vaccines and diagnostic test systems to prevent and detect infections *S. pneumoniae* and monitor the vaccination efficiency which described in present review.

Keywords: pneumococci, vaccine, oligosaccharide, ligand, immunogen, antibodies, opsonophagocytosis, protective activity

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 29–56

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 612.017.12:579.843.94:57.083.3

ГЛИКОКОНЪЮГАТНЫЕ ВАКЦИННЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *Haemophilus influenzae* ТИПА *b*

© 2021 г. Е. А. Хатунцева*, Н. Э. Нифантьев*, #

**Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский проспект, 47*

Поступила в редакцию 27.07.2020 г.
После доработки 10.08.2020 г.
Принята к публикации 11.08.2020 г.

Обзор посвящен лабораторному и промышленному синтезу гликоконъюгатных вакцин, направленных на профилактику заболеваний, вызываемых бактерией *Haemophilus influenzae* типа *b*, с применением линейного капсулярного полисахарида поли-3-β-*D*-рибозил-(1→1)-*D*-рибит-5-фосфата (PRP) или синтетических олигосахаридных лигандов, структурно родственных фрагментам PRP. Также рассмотрены методы синтеза указанных олигосахаридных производных и результаты исследований влияния их длины на иммунные свойства соответствующих конъюгатов с белками-носителями.

Ключевые слова: конъюгированные вакцины, конъюгация, синтез, поли-3-β-D-рибозил-(1→1)-D-рибит-5-фосфат, PRP, Haemophilus influenzae типа b, Hib

DOI: 10.31857/S0132342321010103

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические углеводные вакцины на основе конъюгатов адъювантных белков-носителей с бактериальными полисахаридами (углеводные вакцины второго поколения [1, 2]) или синтетическими олигосахаридами (углеводные вакцины третьего поколения), структурно родственными иммунодетерминантным фрагментам антигенных полисахаридов, находят в настоящее время все более широкое применение для профилактики бактериальных инфекций [3–9]. К этому типу препаратов относится одна из наиболее важных вакцин в истории здравоохранения – вакцина против опасного бактериального патогена *Haemophilus influenzae* типа *b* (Hib, гемофильная палочка). Заболевания, вызываемые Hib, являются главной причиной бактериальных менингитов и пневмоний у детей младшего возраста. Для борьбы с Hib-инфекциями создан ряд вакцин, включение которых в календарь прививок позволило практически полностью исключить вызываемые этой бактерией заболевания из статистики смертности и инвалидизации. По оценке ВОЗ, конъюгированные вакцины против Hib относятся к наиболее безопасным и эффективным, предотвращая до 90% инвазивных случаев гемофильной инфекции.

В России вакцинопрофилактика инфекций, вызываемых Hib, с 2011 г. введена в национальный календарь профилактических прививок. На сегодняшний день предусматривается трехкратная вакцинация для детей, входящих в группы риска, в 3, 4, 5 месяцев и ревакцинация в возрасте 18 месяцев [10]. Это связано с опасностью, которую данный патоген представляет для детей млад-

Сокращения: ADH – дигидразид адипиновой кислоты; BCR – мембранный рецептор В-клеток, специфично узнающий антигены; BSA – бычий сывороточный альбумин; CDAP – 1-циано-4-диметиламинпиридиний тетрафторборат (1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate); CDD – карбонилдиимидазол; CRM197 – дифтерийный рекомбинантный токсоид, содержащий остаток глицина вместо глутаминовой кислоты в положении 52; D – дифтерийный токсин *Corynebacterium diphtheriae*; DSP – дитиобис(сукцинимидил пропионат); DT – дифтерийный анатоксин, детоксифицированный формальдегидом токсин *Corynebacterium diphtheriae*; DTT – дитиотреитол; EDAC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide); HBV – вакцина против вируса гепатита В; Hib – *Haemophilus influenzae* типа *b*, гемофильная палочка; HSA – сывороточный альбумин человека; IL-4 – интерлейкин 4; IPV – инактивированная вакцина против полиомиелита; MBS – *м*-малеимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимид; MHC-II – главный комплекс гистосовместимости, который экспрессируется в профессиональных антиген-презентирующих клетках; OMPC – протеин внешней мембраны менингококка группы В (outer membrane protein complex of *Neisseria meningitidis* group B); PRP – поли-3-β-*D*-рибозил-(1→1)-*D*-рибит-5-фосфат (poly-3-β-*D*-ribosyl-(1→1)-*D*-ribitol-5-phosphate); PRP_{lmw} – низкомолекулярный PRP; SATA – *N*-сукцинимидил-*S*-ацетилмеркаптоацетат; SMP – *N*-гидроксисукцинимидный эфир 3-малеимидопропионовой кислоты; SPDP – *N*-сукцинимидил 3-(2-пиридилтио)пропионат; TI-2 – Т-независимый иммунный ответ 2-го типа; TT – столбнячный анатоксин, представляющий собой детоксифицированный формальдегидом токсин *Clostridium tetani*; АКДС – адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина; ИФА – иммуноферментный анализ; КПС – капсулярный полисахарид; ПЭГ – полиэтиленгликоль.

Автор для связи: (тел./факс: +7 (499) 135-87-84; эл. почта: nen@ioc.ac.ru).

шего возраста, вызывая у них инвазивные инфекционные состояния: гнойный менингит (до 55% от всех инвазивных форм), эпиглоттит, пневмонию, бактериемию и сепсис [11]. Наиболее тяжелым заболеванием, вызванным Hib-инфекцией, является гнойный менингит. При этом заболевании средний мировой показатель летальности достигает 43% [12], а у 14.5% переболевших детей наблюдаются долгосрочные неврологические осложнения, такие как ментальные расстройства (до 13%), нарушения моторики (до 8%) и глухота (до 8%) [13].

По данным ВОЗ, в довакцинный период у детей от 0 до 5 лет среднемировой и европейский показатели доли гнойных менингитов, вызванных Hib, среди всех гнойных менингитов выявленной этиологии составляли 38–40%, при этом в Европе их годовая частота составляла 11–40 случаев на 100 тыс. детей в возрасте до одного года [14]. К настоящему времени мировому сообществу удалось существенно уменьшить [12] количество инвазивных Hib-инфекций благодаря широкому распространению конъюгированных вакцин, которые успешно применяются во всем мире уже более 30 лет. Во всех странах, включивших Hib-вакцину в национальный календарь обязательных прививок, наблюдалось резкое сокращение случаев инвазивных заболеваний [12, 15].

Внесение рутинной Hib-вакцинации в национальный календарь прививок началось в 1986 г. с Канады, к 2002 г. вакцинацией против Hib были охвачены страны Северной и Южной Америки, а к 2014 г. вакцинопрофилактика Hib была введена на практически всем африканском континенте, как и в странах Западной и Восточной Европы. К концу 2018 г. более 190 стран-участниц ВОЗ внесли вакцинацию против Hib в национальные программы иммунизации, причем 72% реципиентов были привиты трехкратно [16]. Исключение составили две большие территории евразийского континента: Российская Федерация и Китайская Народная Республика (КНР), в которых эпидемическая ситуация по Hib существенно различается. Так, в КНР годовая летальность заболеваний Hib у детей до 5 лет составляет 10–25 случаев на 100 тыс. детей, и по данным на 2018 г. только ~30% детей младшего возраста получают три дозы вакцины против Hib [17].

В России показатель годовой смертности от инвазивных Hib-инфекций составляет в среднем менее 10 случаев на 100 тыс. детей этой возрастной группы [18]. Как показал микробиологический анализ 89 штаммов *H. influenzae*, выделенных из крови и спинномозговой жидкости больных инвазивной гемофильной инфекцией из лечебно-профилактических учреждений ряда российских городов, 95.5% этих случаев вызвано именно Hib [19]. Показатель годовой заболеваемости менингитом гемофильной этиологии на территории России в 2017 г. составлял 5.0–16.9 случаев [20], а по другим данным – 3–20 случаев на 100 тыс. детей первых пяти лет жизни [11, 21, 22]. Для Москвы этот показатель в 2005 г. составлял 5.7 случаев [23], по другим данным – 6.5 случаев на 100 тыс. детей до 5 лет [11]. Эти цифры можно было бы существенно уменьшить путем внесения обязательной вакцинации против Hib в национальный календарь прививок. Опыт зарубежных стран свидетельствует о том, что частота инвазивных заболеваний, вызванных Hib, может быть снижена до 0.2 случаев на 100 тыс. детей [14, 24].

Гемофильные палочки входят в состав биоценоза носоглотки у здоровых взрослых и детей, которая, таким образом, является естественным резервуаром для этих бактерий, способных долгое время присутствовать в организме человека как сапрофиты. В России уровень носительства бактерией *H. influenzae* типа *b* у детей находится обычно в диапазоне 1–10%, а в условиях скученности и в младших классах школы возрастает до 40% [11]. У взрослого населения носительство может достигать 10% [25]. На фоне вирусных инфекций или сниженного иммунитета эти бактерии вызывают острые респираторные заболевания. Характерный для таких заболеваний воздушно-капельный путь передачи обеспечивает их широкое распространение. Анализ фарингеального носительства *H. influenzae* у детей дошкольного возраста с диагнозами аденоиды, хронические тонзиллит и фарингит показали, что оно составляет 11–12% микрофлоры ротоглотки [26].

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ИММУНИЗАЦИЮ КАПСУЛЯРНЫМ ПОЛИСАХАРИДОМ (КПС) Hib И СООТВЕТСТВУЮЩИМИ КОНЪЮГИРОВАННЫМИ ВАКЦИНАМИ

Главным фактором вирулентности Hib является полисахаридная капсула, препятствующая фагоцитозу [12]. Ее ключевой компонент – линейный капсулярный полисахарид PRP (поли-3-β-*D*-рибозил-(1→1)-*D*-рибит-5-фосфат), строение повторяющегося звена которого показано на рис. 1. В организме человека PRP, как и КПС других патогенов человека (например, *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus pneumoniae*), индуцирует преимущественно Т-независимый иммунный ответ 2-го типа (TI-2), который не предполагает презентацию пептидов в составе белков главного комплекса гистосовместимости (MHC-II) и стимулирует выработку защитных антител без участия Т-хелперов.

Основная задача TI-2-ответа – распознавание в кровотоке КПС, свидетельствующих о начале бактериемии, и быстрая выработка защитных антител изотипа IgM. Иммунный ответ такого типа обеспечивают расположенные в маргинальной зоне селезенки В-клетки, на поверхности которых экспрессируются специальные рецепторы BCR, включающие в себя мембранные антитела изотипа IgM. Попавшие в кровоток КПС образуют комплекс с элементом врожденной иммунной систе-

мы – белковым фактором C3d. Ключевой стадией захвата КПС рецептором BCR является взаимодействие фактора C3d с корецептором CR2, который в больших количествах экспрессируется на В-клетках селезенки взрослого человека. В то же время у детей в возрасте до 2 лет этот ключевой для детекции бактериальных КПС корецептор экспрессируется слабо [27], тем самым снижая эффективность иммунного ответа по типу TI-2 и ослабляя защиту от инвазий бактерий, имеющих полисахаридную капсулу. Высокий уровень материнских антигемофильных антител, защищающий детей первых двух месяцев жизни, снижается к 3-месячному возрасту, и только к 4–5 годам иммунитет TI-2 достигает взрослого уровня, обеспечивая защитный уровень антител к КПС. Таким образом, целевой группой населения для вакцинации против Hib являются дети от 2 месяцев до 2 лет, наиболее подверженные инвазивным заболеваниям, вызванным данной инфекцией.

Т-Зависимый иммунный ответ (TD) у детей младшего возраста развивается быстрее [28], чем TI-2, и задача профилактических вакцин против заболеваний, вызываемых бактериями с полисахаридной капсулой, состоит в том, чтобы направить иммунный ответ по Т-зависимому пути [6]. Эту задачу решило появление конъюгированных вакцин, состоящих из КПС или их фрагментов, ковалентно связанных с адъювантным белком-носителем [29].

Механизм формирования Т-зависимого иммунного ответа представляет собой сложный процесс последовательных и параллельных событий [30], конкретные детали которого на современном этапе развития иммунологии невозможно однозначно запрограммировать на уровне физико-химических свойств конъюгированных вакцинных препаратов, но ключевые факторы, определяющие иммунный ответ к конъюгированным вакцинам, уже исследованы [31, 32].

После инъекции моновалентные конъюгированные вакцины, которые рекомендуется [33–36] растворять в изотоническом растворе, в значительных количествах попадают в кровоток и лимфатическую систему. В селезенке и лимфатических узлах резидентные В-клетки поглощают углевод-белковый конъюгат, расщепляют белок-носитель до пептидов и презентируют их в составе MHC-II для рецептора αβ-TCR белкового комплекса $CD4^+$ на поверхности Т-хелперов [37]. Стимулированные этим воздействием Т-клетки продуцируют цитокин IL-4, который катализирует созревание В-клеток, поглотивших антиген.

Другой путь формирования иммунного ответа на иммунизацию конъюгированными вакцинами реализуется с участием дендритных клеток. Инъекция Hib-вакцин проводится в четырехглавую мышцу бедра, а у более старших детей – в дельтовидную мышцу плеча, т.е. в скелетные мышцы, в которых присутствуют три типа дендритных клеток: незрелые дендритные клетки моноцитарного происхождения (Mo-DC) и два подтипа обыкновенных дендритных клеток, происходящие из общего моноцитарного предшественника $Gr1^+Ly\text{-}6C^{high}$. При микробной инфекции эти моноциты в больших количествах рекрутируются к месту воспаления, где превращаются в макрофаги с фенотипами $CD11b^+CD11c^-2MHCII^+$ и $CD11b^+CD11c^+MHCII^+$ [31]. Такие же процессы инициирует в месте инъекции гликан-белковый конъюгат. Макрофаги захватывают белковые антигены, деполимеризуют их с сохранением гликан-пептидных связей [38] и доставляют в лимфоузлы для презентации $CD4^+$-Т-клеткам. Праймированные Т-клетки далее инициируют созревание поглотивших антиген В-клеток с последующей пролиферацией и дифференцировкой [39]. Этот этап является ключевым для развития антиген-специфичного иммунного ответа и формирования иммунной памяти. На втором этапе созревшие В-клетки частично превращаются в плазматические клетки с развитыми эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи, которые начинают интенсивно синтезировать иммуноглобулины изотипов IgG1 и IgE, и частично – в В-клетки памяти [39]. Таким образом, дополнительный положительный эффект от иммунизации конъюгированными гликан-белковыми вакцинами состоит в том, что об эффективности формирования иммунной памяти можно судить по постиммунизационной концентрации антител изотипа IgG в сыворотке крови.

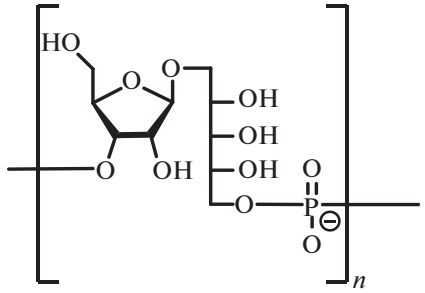


Рис. 1. Капсулярный полисахарид *Haemophilus influenzae* типа *b* (PRP).

Рекрутирование предшественника дендритных клеток $Gr1^+Ly\text{-}6C^{high}$ в мышцы многократно усиливается при использовании адъювантов [40]. Большинство современных конъюгированных поливалентных вакцин с Hib-компонентом используются в виде смеси с нерастворимыми адъювантами, представляющими собой гидроксид или фосфаты алюминия [41]. Известно, что, будучи введенными в организм в виде суспензии, адъюванты не только выполняют роль депо для адсорбированной на них вакцины, но и активируют систему врожденного иммунитета таким образом, что стимулируют иммунный ответ с участием T_H2-хелперов. В то же время адсорбция конъюгированных Hib-вакцин на солях алюминия не является обязательным условием эффективной иммуниза-

ции, включающей индукцию антител изотипа IgG и формирование иммунной памяти [42].

ИНДУКЦИЯ PRP-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ КАК КРИТЕРИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ Hib-ВАКЦИНАЦИИ

Клинические испытания, проведенные в Финляндии в 1977 г. [43, 44], продемонстрировали положительную связь между повышением уровня антител к PRP и защитным действием конъюгированной вакцины против Hib. Многочисленные исследования эффективности вакцинации конъюгированными Hib-вакцинами указывают на важность высоких постиммунизационных титров антител к PRP у детей младшего возраста [45–47]. В частности, это подтвердил 8-летний опыт Hib-иммунизации в Великобритании, в которой с 1992 г. введена обязательная трехкратная вакцинация детей в возрасте 2, 3 и 4 месяцев. После резкого снижения заболеваемости инвазивными формами Hib к 1994 г., она начала расти в 1999 г., при этом 85% заболевших детей были вакцинированными. Это связано с тем, что с 1996 г. для вакцинации начали использовать менее иммуногенную комбинированную вакцину, включающую не только Hib-компонент, но и вакцину АКДС с коклюшным ацеллюлярным компонентом [48, 49], что привело к образованию низкоавидных антител [50, 51]. Эта проблема была решена с помощью дополнительной иммунизации моновакциной Hib, существенно поднявшей концентрацию Hib-защитных антител [52].

В настоящее время критерием уровня эффективности применения вакцины против Hib служит количество пациентов, у которых в крови обнаруживаются специфичные к PRP антитела в низкой (менее 0.15 мкг/мл, не обеспечивают защиты от инфекции), средней (0.15–1.00 мкг/мл, обеспечивают неполную защиту) и высокой концентрации (более 1.0 мг/мл, обеспечивают надежную защиту от инфицирования) через месяц после первичного курса трехкратной иммунизации и через месяц после ревакцинации [45, 53].

Исследование эффективности образования PRP-специфичных антител у детей [54], которых вакцинировали конъюгатом PRP-CRM197 (синтез рассмотрен ниже), показало, что для формирования иммунной памяти необходимо провести как минимум две иммунизации конъюгированной вакциной. Стандартная схема иммунизации для вакцинопрофилактики Hib-заболеваний включает трехкратную иммунизацию конъюгированной вакциной в 3, 4 и 5 месяцев и, в ряде случаев, еще одну бустерную иммунизацию в 18 месяцев. Временные точки для трехкратной иммунизации выбраны таким образом, чтобы синхронизировать Hib-иммунизацию со схемой вакцинации и ревакцинации АКДС. Для эффективной иммунизации конъюгированными Hib-препаратами важно, чтобы ей не предшествовала преиммунизация белком-носителем, которая снижает концентрацию анти-PRP-антител в 2–3 раза [55].

Эффективность описанной выше схемы иммунизации подтверждена в ходе соответствующих клинических испытаний. Например, проведенные фирмой GSK (производитель Hib-вакцины Hiberix®) клинические испытания, включавшие трехкратную иммунизацию и бустерную дозу в 15–18 месяцев, показали, что у 95–100% младенцев через месяц после трехкратной иммунизации титр PRP-специфичных антител составил 0.15 мкг/мл. Через месяц после бустерной иммунизации титр антител 0.15 мкг/мл был выявлен у 100% детей, а титр 1 мкг/мл – у 94.7% детей [35]. Это позволило сделать вывод, что данная вакцина обеспечивают надежную защиту от инфицирования Hib. Схема вакцинации, включающая бустерную дозу, дороже, но существенно эффективнее в сравнении с трехкратной вакцинацией. Так, в США использование этой схемы иммунизации с 2002 г. привело к 99%-ному сокращению случаев инвазивных Hib-заболеваний у детей до 5 лет [24].

ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ КОНЪЮГИРОВАННЫХ Hib-ВАКЦИН

Вакцинология заболеваний бактериальной природы, активное развитие которой началось в 30-х гг. XX века, уже в 60–70-х гг. получила новый импульс после длительного перерыва, связанного с открытием антибиотиков. В числе первых ее успехов была разработка вакцины против Hib-инфекции [56]. В 1977 г. в Финляндии были проведены масштабные клинические испытания [43, 44], в ходе которых 50000 детей в возрасте от 3 месяцев до 5 лет были вакцинированы очищенным полисахаридом PRP и еще 50000 детей наблюдали в качестве контрольной группы. У всех получивших вакцину детей старше 18 месяцев выработались антитела и сформировался защитный иммунитет против Hib, тогда как в контрольной группе 11 детей заболели. В то же время эта вакцинация не оказала защитного действия на детей младше 18 месяцев (наиболее подверженную опасным состояниям возрастную группу) – для них PRP оказался слабым иммуногеном. Кроме того, полисахарид PRP не обеспечивал бустерного эффекта [57] и не оказывал влияния на микрофлору носоглотки [58]. Выводы о низкой иммуногенности PRP у детей до 18 месяцев подтвердило 4-летнее применение лицензированной в 1985 г. в США полисахаридной вакцины [59, 60]. Таким образом, вакцинопрофилактика заболеваний, вызываемых Hib, проводившаяся с использованием вакцины 1-го поколения – КПС PRP, оказалась неэффективной [61].

Логичным методом преодоления недостаточной иммуногенности полисахарида PRP является его замена на конъюгат с адъювантным белком-носителем, опираясь на пионерские работы лабораторий W.F. Goebel и K. Landsteiner, выполненные еще в 20–30-е гг. прошлого века [62–64].

Следуя этой логике, в лаборатории J.B. Robbins [65] была синтезирована серия ковалентно связанных конъюгатов PRP с белками BSA, HSA, гемоцианином мечехвоста *Limulus polyphemus* и дифтерийным токсином (T). Было показано, что иммунизация такими препаратами стимулирует образование антител, специфичных к Hib и обладающих бактерицидной активностью. Сравнение эффективности иммуностимулирующей способности этих белков исследователи не проводили. Аналогичный продукт был создан P. Anderson et al. [66], которые в 1985 г. опубликовали данные об успешной иммунизации младенцев конъюгированной Hib-вакциной, состоящей из PRP и дифтерийного анатоксина. Клинические испытания созданной вслед за этим конъюгированной вакцины, проводившиеся с участием 61 080 детей в 1988 и 1990 гг. в штате Северная Каролина в США, подтвердили 100%-ную эффективность вакцинации при введении двух или более доз [61]. С этих пионерских работ фактически началась новая эра в вакцинопрофилактике бактериальных заболеваний – эра конъюгированных вакцин, состоящих из бактериальных полисахаридов или синтетических олигосахаридов, структурно родственных иммунодетерминантным фрагментам полисахаридов, ковалентно связанных с адъювантными белками-носителями.

С 1980-х гг. резко возросло количество публикаций [3, 4, 37, 67, 68], описывающих синтез и иммуногенность конъюгированных Hib-вакцин, наиболее эффективные из которых начали выпускаться в промышленных масштабах [5, 69]. Но одна из первых коммерческих конъюгированных моновалентных вакцин против Hib, включающая дифтерийный анатоксин (DT) в качестве носителя – ProHIBiT® (PRP-DT, Connaught Laboratories Inc.), зарегистрированная в США в 1987 г., оказалась малоэффективной. Однако ей на смену была получена вакцина HibTITER® (PRP-CRM197, Wyeth Pharmaceuticals Inc.) на основе белка-носителя CRM197 и низкомолекулярного полисахарида PRP. HibTITER® была разрешена к применению Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 1990 г. и снята с производства только в 2007 г. В 1989 г. в США была зарегистрирована моновалентная вакцина PedvaxHIB® (PRP-OMP, MSD), которая содержала в качестве адъювантного носителя белок внешней мембраны менингококка группы B (сейчас ее производство тоже остановлено), конъюгированный также с низкомолекулярным PRP. На основе столбнячного анатоксина (TT) были созданы моновалентная вакцина PRP-TT (Pasteur Merieux) [70], зарегистрированная в 1993 г. в США как ActHIB® (Sanofi), и вакцина OmniHIB® (SmithKline Beecham Pharmaceuticals), зарегистрированная в 1996 г., но в настоящее время снятая с производства.

Значительным событием в области исследования углеводных конъюгированных вакцин явилось создание кубино-канадским коллективом исследователей, возглавляемых V. Verez-Bencomo и R. Roy, конъюгированной вакцины на основе TT и олигомерной смеси спейсерированных олигосахаридов, соответствующих фрагментам полисахарида PRP [71], которая фактически является одним из первых примеров углеводных вакцин третьего поколения [2] (ниже рассмотрен синтез этой вакцины, см. схему 13). Данный продукт был зарегистрирован на Кубе в 2003 г. под торговым названием Quimi-Hib® (Heber Biotec S.A.) и сегодня используется в ряде стран мира.

КОММЕРЧЕСКИЕ КОНЪЮГИРОВАННЫЕ Hib-ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ PRP

В настоящее время для профилактики Hib-инфекции применяются моно- и поливалентные Hib-вакцины. На рынке присутствуют следующие моновалентные конъюгированные Hib-вакцины: VaxemHIB® (GSK, представляет собой конъюгат низкомолекулярного PRP и CRM197), Hiberix® (PRP-TT, GSK, зарегистрирована в 2009 г.), Sii HibPRO® (PRP-TT, Serum Institute of India Ltd.) и PedvaxHIB® (PRP-OMPC, MSD). Они поставляются в виде раствора или лиофилизата, который перед использованием необходимо растворить в изотоническом растворе или суспензии других вакцинных препаратов.

Все большее распространение получают комбинированные вакцины, включающие конъюгированные вакцинные препараты против Hib, что связано в первую очередь с экономической целесообразностью. Помимо Hib-компонента они содержат комплекс АКДС, а также один или два регионально-ориентированных вакцинных компонента (HBV или IPV). При формулировании таких вакцин необходимо учитывать химические и иммунологические свойства Hib-конъюгатов. Конъюгаты PRP нестабильны в водных растворах и в присутствии адъювантов на основе алюминия, поэтому в большинстве случаев лиофильно высушенный Hib-компонент поливалентной вакцины упакован отдельно от остальных компонентов, которые представляют собой водную суспензию гидроксида или фосфата алюминия с адсорбированными на них белковыми иммуногенами. Кроме того, исследователи неоднократно отмечали [72], что включение конъюгированной Hib-вакцины в состав поливалентных вакцин, содержащих АКДС с бесклеточным коклюшным компонентом, при введении в одном шприце приводит к индукции низкоавидных к PRP антител, в связи с чем рекомендовано проводить инъекции препаратов АКДС и Hib-вакцины в разные части тела [33, 34].

Как правило, конъюгированные вакцинные препараты против Hib в составе комбинированных вакцин поставляются в виде лиофилизата Hib-субстанции в смеси со вспомогательными веществами. Лиофилизат PRP-TT входит в состав следующих комбинированных вакцинных препаратов:

TETRAct–HIB® (АКДС–Hib; Sanofi), ComBE Five® (АКДС–HBV–Hib; Biological E Ltd.), Quadrovax® (АКДС–Hib; Serum Institute of India Ltd.), Pentaxim® (АКДС–IPV–Hib; Sanofi) [73], Pentacel® (АКДС–IPV–Hib; Sanofi) [74], Pentavac®SD/PFS (АКДС–HBV–Hib; Serum Institute of India Ltd.), Tritanrix HB–Hib® (АКДС–HBV–Hib; GSK), EasySix® (АКДС–IPV–Hib; Panacea Biotec), Infanrix–IPV/Hib® (АКДС–IPV–Hib; GSK) и Infanrix Hexa® (АКДС–IPV–HBV–Hib; GSK).

Удобство поливалентных вакцин для массовой вакцинации стимулирует дальнейшие научные изыскания, направленные на разработку более безопасных компонентов, удобных форм и более эффективных методов применения. Так, были созданы полностью жидкие пентавалентная вакцина Pediacel® (АКДС–IPV–PRP-TT; Sanofi) [75, 76], EasyFour® (АКДС–PRP-TT; Panacea Biotec), EasyFive–TT® (АКДС–IPV–PRP-TT; Panacea Biotec), Quinvaxem® (АКДС–HBV–PRP-CRM197; GSK) [77] и гексавалентная вакцина Hexaxim® (АКДС–IPV–HBV–PRP-TT; GSK).

Иммуногенность и безопасность жидкой пентавалентной вакцины Pediacel® (Sanofi) соответствуют уровню других коммерческих поливалентных формулировок, таких как Quadracel® + + ActHIB® (АКДС–IPV–PRP-TT) [75], а также Infanrix–IPV/Hib® (GSK), а полностью жидкая форма существенно упрощает вакцинацию [76, 78].

Практическую целесообразность использования поливалентных вакцинных препаратов при иммунизации против Hib подтверждают многочисленные данные исследования результатов применения соответствующих вакцин в перенаселенных мегаполисах с невысоким уровнем жизни. Так, в Ченнайе (Тамил Наду, Индия) всего за три года (2012–2014 гг.) применения пентавалентной вакцины Pentavac® PFS (Serum Institute of India) [79], включающей Hib-компонент, количество опосредованных Hib менингитов, составлявшее в 2008 г. 19 случаев на 100 тыс. жителей в год [80], сократилось на 79% при охвате вакцинацией 69% детей до 2 лет [81]. Аналогично, начавшееся в 1998 г. применение тетравалентной вакцины АКДС–Hib в Йоханнесбурге (Южная Африка) за 6 лет позволило снизить количество случаев Hib-менингитов у детей до 1 года на 65% при том, что всего за 1994 г. регистрировалось в среднем 170 случаев этого заболевания на 100 тыс. детей [82].

Эффективность Hib-компонента пентавалентной вакцины АКДС–HepB–Hib подтвердило [83] ее применение в Бамако (~2 млн жителей), столице одной из беднейших стран мира Мали, в которой в довакцинный период регистрировали более 200 случаев инвазивных Hib-инфекций на 100 тыс. детей младшего возраста в год. Начавшаяся в 2002 г. вакцинация детей до двух лет к 2006 г. охватила 94% населения, что привело к 80%-ному сокращению частоты инвазивных Hib-заболеваний.

В России зарегистрированы две моновакцины против гемофильной инфекции, содержащие конъюгированные препараты (табл. 1): вакцина гемофильная тип *b* конъюгированная® (ФБУН “Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии” Роспотребнадзора, Россия) и Hiberix® (GSK). Отечественная вакцина гемофильная тип *b* конъюгированная, зарегистрированная в 2011 г., производится в количестве 200 тыс. доз в год, что позволяет привить не более 5% российских младенцев. Некоторое время назад широко применялась вакцина ActHIB® (Aventis Pasteur), однако сейчас государственная регистрация в России на этот препарат отменена.

На российском рынке присутствуют также комбинированные вакцинные препараты Pentaxim® (АКДС–IPV–Hib; Sanofi) [73] и Infanrix Hexa® (GSK) (табл. 1). Недавно в России зарегистрирована отечественная пентавалентная комбинированная вакцина АКДС–ГепВ–Hib® [84, 85] (Пермское НПО “Биомед”, входящее в состав АО “Национальная иммунобиологическая компания” – подразделение ГК “Ростех”), в состав которой в качестве Hib-компонента входит вакцина Quimi-Hib® (см. выше) [84]. Эффективность этого препарата подтверждена в ходе клинических испытаний [86].

СОСТАВ КОММЕРЧЕСКИХ КОНЪЮГИРОВАННЫХ Hib-ВАКЦИН НА ОСНОВЕ PRP

Коммерческие конъюгированные Hib-вакцины различаются между собой размером поли- или олигомерных цепей PRP, белком-носителем, методом конъюгации, а также наличием и строением спейсера. Структурные характеристики Hib-вакцин включены в Европейскую Фармакопею – периодическое издание, которое является руководящим документом, регламентирующим производство фармацевтических продуктов в странах Европейского сообщества. Рекомендованы к использованию следующие белки: дифтерийный анатоксин (DT), столбнячный анатоксин (TT), дифтерийный рекомбинантный белок CRM197 [87] и белок OMPC.

Сравнительный анализ эффективности конъюгированных вакцин, состоящих из PRP с разными белками-носителями, проведенный в 1992 г. M.D. Decker et al. [88], показал, что вакцинация конъюгатом на основе DT привела к образованию защитных антител, специфичных к PRP, только у 39% детей, а конъюгаты, включавшие TT, CRM197 и OMPC, показали существенно более высокую иммуногенность. Именно белки-носители TT, CRM197 [89] и OMPC [90] сегодня наиболее широко используются в современных коммерческих вакцинах, включая Hib-вакцины.

В связи с тем, что эффективность Hib-вакцины определяется не только белком-носителем, но и типом конъюгации и технологическими мето-

Таблица 1. Гемофильные вакцины, регистрировавшиеся на территории Российской Федерации

Вакцина	Субстанция Hib и лекарственная форма	Содержание КПС в активном веществе, мкг	Содержание белка-носителя в субстанции Hib, мкг	Вспомогательные вещества (мг на 1 дозу)	Регистрация в России, номер регистрационного удостоверения
Вакцина гемофильная тип *b* конъюгированная® (ФБУН "Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии" Роспотребнадзора России)	PRP-TT, лиофилизат для приготовления раствора*	9.5–14.3	19.0–28.6	Сахароза (20–30)	ЛП-000499 от 23.03.11 – действующее
Hiberix® (Хиберикс®, GSK)	PRP-TT, лиофилизат для приготовления раствора**	10	~30	Лактоза (10.08)	П N015829/01 от 18.05.09 – действующее, бессрочно
Act-Hib® (Акт-Хиб®, Aventis Pasteur)	PRP-TT, лиофилизат для приготовления раствора**	10	18–30	Сахароза (42.5) Трометамол (0.6)	П N013850/01 от 11.12.08 – отмена гос. регистрации
Pentaxim® (Пентаксим®, Sanofi)	PRP-TT, лиофилизат для приготовления суспензии*, вводится в смеси с вакциной АКДС–IPV	10	Не определено	Сахароза (42.5) Трометамол (0.6)	ЛСР-005121/08 от 01.07.08 – действующее, бессрочно; дата перерегистрации: 09.09.15
Infanrix Hexa® (Инфанрикс Гекса®, GSK)	PRP-TT, лиофилизат для приготовления суспензии*, вводится в смеси с вакциной АКДС–IPV–HBV	10	25	Лактоза (12.6) Алюминия фосфат (0.12)	ЛП-000877 от 18.10.11 – действующее
АКДС-ГепВ+Hib® (Пермское НПО "Биомед", АО "Национальная иммунобиологическая компания", ГК "Ростех")	PRP-TT, лиофилизат для приготовления суспензии*, вводится в смеси с вакциной АКДС–HBV	10	21–31	Сахароза (42.5) Натрия дигидрофосфат (0.16) Динатрия гидрофосфат (0.5)	ЛП-005412 от 20.03.19 – действующее

* Для внутримышечного введения.
** Для внутримышечного и подкожного введения.

дами, применяемыми при производстве вакцин, многочисленные исследования эффективности этих белков в качестве носителей не привели к однозначному выбору. Так, при сравнении иммуногенности коммерческих вакцин PRP-CRM197 (HibTITER®) и PRP-OMPC (PedvaxHIB®) на животной модели (макака резус) выяснилось, что конъюгат PRP-OMPC обладает существенно большей иммуногенностью по сравнению с конъюгатом PRP-CRM197 [91]. На этой модели PRP-CRM197 индуцировал PRP-специфичные антитела только при одновременной инъекции с DT. Сопоставление конъюгатов PRP с белками-носителями TT и CRM197, проводившееся в ходе клинических испытаний, показало отсутствие существенных различий в иммуногенности таких продуктов [92, 93]. В то же время недавно полученные данные продемонстрировали преимущество конъюгатов PRP-CRM197 по сравнению с конъюгатами PRP-TT [94].

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЪЮГИРОВАННЫХ Hib-ВАКЦИН НА ОСНОВЕ PRP

Для производства вакцин на базе PRP используется как получаемый биотехнологическим способом высокомолекулярный полисахарид, включая продукты его деполимеризации средней или высокой степени, так и синтетические олигосахариды, структурно родственные фрагментам PRP. На сегодняшний день разработано значительное количество методов конъюгации [95], которые позволяют эффективно связывать эти олиго- и полисахариды с белками-носителями.

Получение конъюгатов на основе нативного PRP или частично гидролизованного PRP_{lmw} основано на введении в молекулу полисахарида активных групп, позволяющих провести конденсацию с карбоксилами или аминогруппами белка-носителя. Один из первых подходов данного типа был реализован в работах J.B. Robbins et al. [65, 96–98], которые активировали PRP бромцианом с последующей конъюгацией с белком-носителем.

Так, под действием бромциана на PRP образуется его активированное производное (**1**) со случайным образом распределенными в полисахаридной цепи цианатными группами (схема 1, условия a). При взаимодействии продукта (**1**) с ADH образуется изомочевина (**2**). Конъюгация последней с белком-носителем проводится в присутствии водорастворимого конденсирующего агента EDAC за счет образования амидных связей между остатками гидразида и карбоксильными группами, что приводит к образованию кросс-сшитого высокомолекулярного продукта (**3**) с молекулярной массой до 5 МДа [99]. Процесс такого типа лежит в основе технологий производства конъюгированных вакцин против Hib на основе DT (ProHIBiT®) и TT (ActHIB®, OmniHIB®) [100, 101].

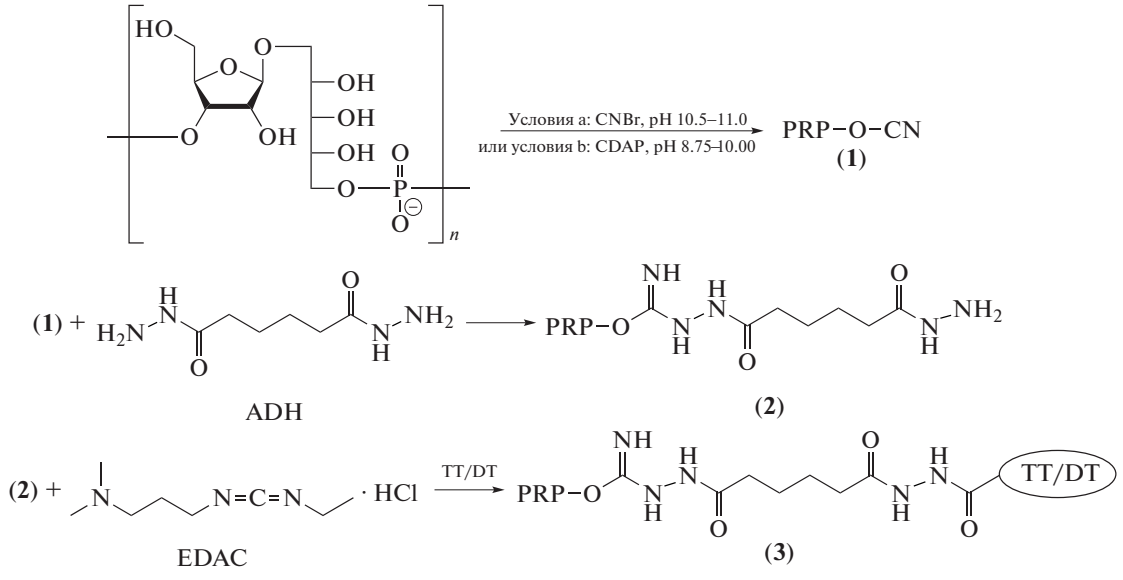


Схема 1. Конъюгация PRP с белком с предварительной активацией PRP.

Вместо ADH может быть использована 6-аминокапроновая кислота [102, 103]. В этом случае для конъюгации с белком также применяют EDAC. Процесс такого типа применяется при производстве другой вакцины строения PRP-TT–Hiberix® (GSK) [5].

К технологическим недостаткам бромцианового метода можно отнести необходимые для эффективной функционализации PRP щелочные условия (при pH 10.5–11.0), при которых протекает неконтролируемая деструкция фосфодиэфирных связей полисахарида. Кроме того, бромциан

также имеет плохую растворимость в водных средах, что делает необходимым использование органических растворителей, в которых, однако, нерастворим PRP. Кроме того, бромциан высокотоксичен и легко гидролизуется в используемых условиях реакции. Структура полученного таким методом PRP-белкового конъюгата вследствие неконтролируемой деструкции и полимеризации не может быть надежно охарактеризована физико-химическими методами и стандартизирована.

В полученном бромциановым методом конъюгате высокомолекулярного PRP с DT номинальное содержание PRP в дозе составляло 25 мкг, а белка – 18 мкг [5]. Очевидным достоинством этого метода является высокое содержание PRP в конъюгате – до 58%. Однако этот препарат имеет относительно низкую иммуногенность, из-за чего он должен применяться в более высокой дозе (25 мкг по PRP), чем современные вакцины, в которых содержится только 10 мкг PRP.

Альтернативой бромциану является более технологичный [104] и водорастворимый реагент CDAP (схема 1, условия b), предложенный A. Lees et al. в 1996 г. [105]. Однако этот метод не нашел практического применения для промышленного выпуска вакцин из-за недостаточной активности конъюгатов цианированных производных PRP (см. выше).

Известно, что примесь неконъюгированного PRP может снижать эффективность иммунизации PRP-белковыми конъюгатами. Для удобства очистки вакцинных конъюгатов P. Anderson et al. в 1985 г. [106] предложили использовать низкомолекулярный PRP_{lmw} (**4**) (схема 2), состоящий из 3–10 повторяющихся звеньев 3-β-*D*-рибозил-(1→1)-*D*-рибит-5-фосфата со свободным остатком рибозы на восстанавливающем конце, образующийся при частичном гидролизе нативного полисахарида 0.1 M водным раствором HCl. Аналогичную смесь олигомеров можно получить и частичным гидролизом PRP в присутствии водной AcOH [107]. Конъюгацию олигомеров (**4**) проводят после предварительного восстановительного аминирования действием $NaCNBH_3$ в присутствии NH_4Cl [95] (показано на схеме 2) или этилендиамина [101]. При этом образуются гликозиламины (**5**) (или *N*-замещенные гликозиламины), которые непосредственно и вводятся в реакцию конъюгации с D, DT или CRM197 в присутствии EDAC, что приводит к образованию конъюгатов общей формулы (**6**) [106]. Процесс такого типа применяется при производстве вакцины VaxemHIB® (GSK), которая содержит CRM197 в качестве белка-носителя [5, 95].

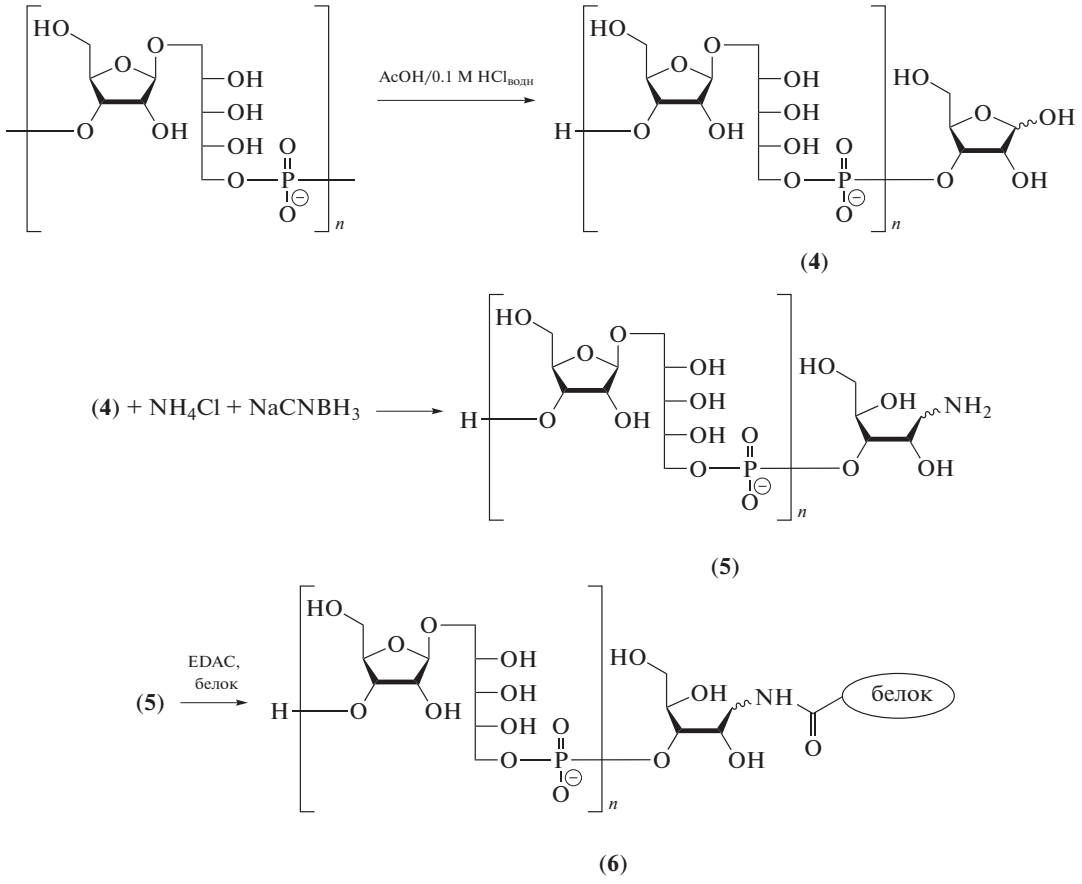


Схема 2. Получение низкомолекулярного PRP (**4**) (n = 3–8) и его конъюгатов (**6**) с белками-носителями с использованием восстановительного аминирования.

Для конъюгации PRP с другим адъювантным белком-носителем – OMPC – также применяют частично гидролизованный PRP_{lmw} (**4**) (схема 3). Для лучшей растворимости в ДМФ или ДМСО его переводят в тетрабутиламмонийную соль и подвергают взаимодействию с CDD, который превращает часть OH-групп PRP_{lmw} в олиго-имидазолилуретан (**7**) [108], как предложено S. Marburg et al. в 1986 г. (схема 3). Олиго-имидазолилуретан (**8**) действием избытка 1,4-бутандиамина переводят в амин, который далее обрабатывают бромацетилхлоридом (**9**) или *n*-нитрофенилбромацетатом (**10**) с получением бромацетильного производного (**11**). OMPC, представляющий собой кластер из 3–7 субъединиц со средней массой 40000 Да, обрабатывают подходящим тиоилирующим агентом, например, *N*-ацетилгомоцистеинтиолактоном (**12**), с получением тиоилированного производного (**13**). Последующая конъюгация осуществляется при взаимодействии бромацетильных групп модифицированного производного (**11**) с тиогруппами (**13**) с образованием конъюгата (**14**). Процесс такого типа используется компанией MSD при производстве вакцины PedvaxHIB® [101].

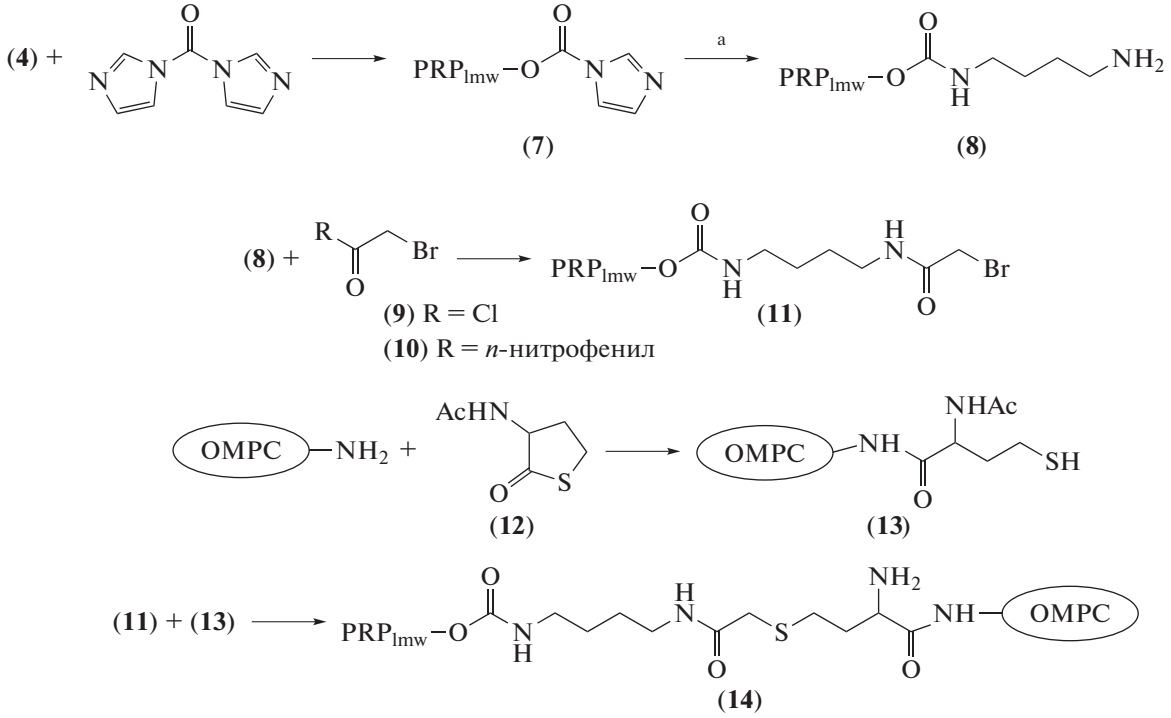
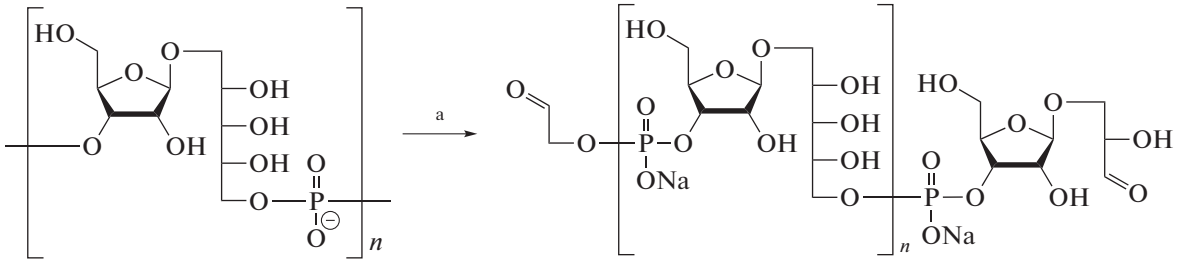


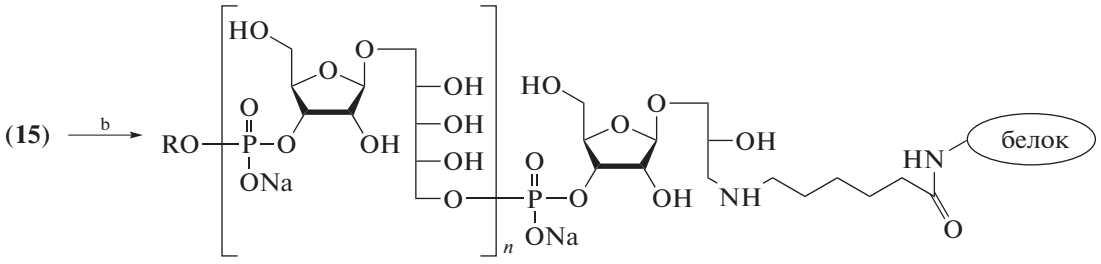
Схема 3. Синтез конъюгата OMPC с низкомолекулярным PRP – соединение (**14**). Использованные реагенты: а – 1,4-бутандиамин.

Другой способ получения функционализированных производных низкомолекулярного PRP_{lmw} для конъюгации с белками, предложенный в 1986 г. P. Anderson et al. [109], основан не на гидролитическом расщеплении полисахарида (см. выше на схеме 2), а на периодатном окислительном расщеплении (схема 4). Образующиеся в результате альдегидные продукты общей формулы (**15**) далее подвергают конденсации с белком-носителем по схеме восстановительного аминирования с участием аминогрупп аминокислот (например, лизина), входящих в состав белка-носителя. При этом образуются основания Шиффа, которые восстанавливают цианоборогидридом натрия с образованием конъюгатов общей формулы (**16**). Например, при использовании CRM197 образуется конъюгат, в котором к каждой молекуле белка присоединяется в среднем 6–20 олигосахаридных лигандов [110]. Этот метод успешно применяется компанией Pfizer при производстве вакцины HibTITER®, в которой Hib-олигосахариды фактически конъюгированы с CRM197 непосредственно, без каких-либо спейсерных вставок (схема 4) [95].

Для того чтобы ускорить процесс образования оснований Шиффа, метод был усовершенствован введением дополнительной стадии превращения карбоксильных групп белка в гидразиды, которые реагируют с альдегидными группами более эффективно и полно, чем с ε-аминогруппами остатков лизина [111].



(**15**)



(**16**)

Схема 4. Получение Hib-вакцины с использованием PRP_{lmw}, образующегося при периодатном расщеплении нативного PRP. Использованные реагенты: a – $NaIO_4$; b – белок, $NaCNBH_3$.

Использование низкомолекулярного PRP_{lmw} существенно упростило очистку, стерилизующую фильтрацию и определение физико-химических характеристик гликан-белкового конъюгата. Это важно для подтверждения идентичности вакцин при промышленном производстве. В то же время в ходе расщепления PRP для понижения молекулярного веса, так же как и при выделении и очистке, могут происходить дальнейшие структурные изменения [112], что затрудняет контроль и стандартизацию как исходного PRP, так и конъюгатов на его основе.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЪЮГИРОВАННЫХ Hib-ВАКЦИН НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ PRP

Для исключения всех технологических проблем при работе с нативным PRP и его низкомолекулярными фракциями была начата разработка препаративного синтеза спейсерированных олигосахаридных производных, структурно родственных иммунодоминантным фрагментам PRP. В качестве преимуществ синтетических аналогов PRP нужно отметить наличие в их структурах оптимальных спейсерных групп в требуемых положениях. Это важно для обеспечения эффективной конъюгации с белком-носителем и надежного подтверждения чистоты и структуры конечных конъюгатов и промежуточных продуктов методами углеводного анализа, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, что в итоге позволяет применять высокие стандарты для контроля качества. Кроме того, синтез вакцинных олигосахаридных лигандов исключает необходимость культивирования патогенных штаммов *H. influenzae*, трудоемкого выделения PRP и отделения примесей бактериального происхождения, например, токсичных липоолигосахаридов.

Первые примеры синтеза спейсерированных олигосахаридов, родственных PRP и предназначенных для конъюгации с белками-носителями, были опубликованы в 1987–1989 гг. Так, для синтеза спейсерированных олигосахаридов, состоящих из повторяющихся дисахаридных фрагментов 3-β-*D*-рибозил-(1→1)-*D*-рибит-5-фосфата, были разработаны три принципиальные схемы, включающие следующие три этапа: 1) удлинение цепи в жидкофазном процессе с выделением промежуточных олигомеров; 2) последовательное наращивание цепи на твердой (полимерной или стеклянной) подложке; 3) поликонденсацию с получением смеси олигомеров. Значительные усилия сразу нескольких ведущих научных групп, сконцентрированные на поиске удобных и экономичных методов синтеза спейсерированных олигосахаридов, родственных PRP, были простимулированы очевидными технологическими и иммунологическими преимуществами, которые име-

ют конъюгаты синтетических вакцинных лигандов по сравнению с конъюгатами нативного и низкомолекулярного PRP.

Первая серия спейсерированных олигосахаридов, родственных PRP, была синтезирована J.H. van Boom et al. при сборке олигосахаридных цепей последовательным наращиванием с фосфорилированием в качестве ключевой стадии. Так, димер (**17**), тример (**18**) [113, 114] и тетрамер (**19**) [115], содержащие *N*-глицил-тетраметиленаминовый спейсер, были получены линейным блочным синтезом из избирательно защищенного дисахарида (**20**) (схема 5). Для наращивания цепи использовали дисахаридный блок (**21**), который в присутствии *N*-метилимидазола присоединялся по свободной гидроксильной группе остатка рибита. Повторяющейся последовательностью реакций, включавших удаление пропенильной защитной группы и присоединение нового звена, получали тример и тетрамер, а спейсерный остаток вводили в конце синтетических схем при действии производного (**22**). После удаления всех защитных групп получали спейсерированные олигомеры (**17**–**19**).

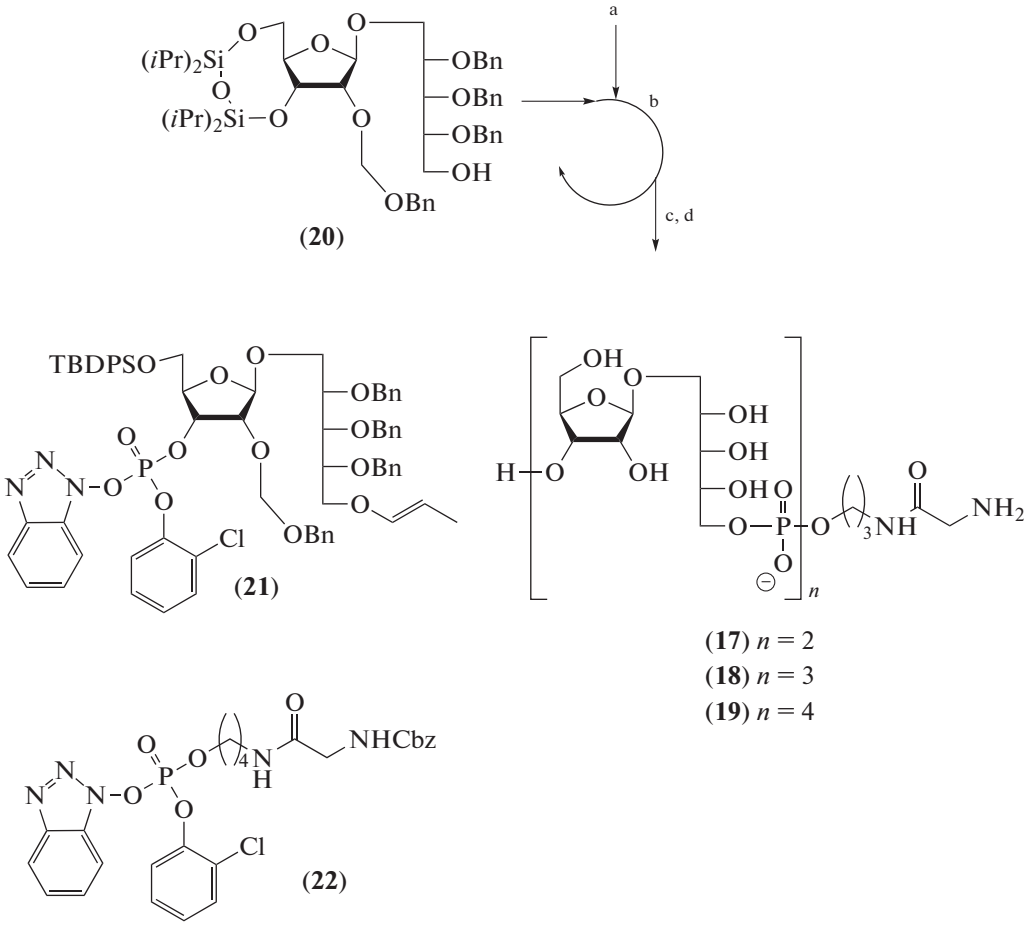


Схема 5. Ключевые синтетические блоки для синтеза спейсерированных олигомеров PRP (**17**–**19**). Использованные реагенты: a – *N*-метилимидазол/пиридин, (**21**), выход 72%; b – HgO, $HgCl_2$, ацетон, вода, выход 82%; c – *N*-метилимидазол, пиридин, (**22**), выход 50%; d – удаление защитных групп.

Одним из важнейших факторов, ограничивающих эффективность масштабирования синтезов спейсерированных олигосахаридов, родственных PRP, является необходимость хроматографического выделения промежуточных продуктов. Для того чтобы сократить количество стадий хроматографической очистки полупродуктов, в лаборатории J.H. van Boom был разработан твердофазный синтез [116] в условиях, используемых для твердофазного синтеза олигонуклеотидов. При отработке данной стратегии была также проведена оптимизация тактики использования защитных групп и разработан более удобный, чем в предыдущих работах этой лаборатории [113–115], способ обра-

зования фосфодиэфирной связи. Проведенный в результате синтез гексамера (**23**) [117] с гексаметиленаминовым спейсером на восстанавливающем конце начинался с получения избирательно защищенного дисахарида (**24**), иммобилизованного на аминированном пористом стекле (схема 6). Далее в присутствии 1*H*-тетразола присоединяли фосфорамидит (**25**) [116, 117], окисляли фосфит в фосфат и удаляли диметокситритильную группу. Последовательность этих реакций повторяли еще 4 раза, а затем вводили спейсерную группу при обработке 2-цианоэтил-6-[4-монометокситритил)-амино]гексил-*N*,*N*-диизопропилфосфорамидитом (соединение (**26**)). Удаление с подложки и деблокирование привели к образованию гексамера (**23**).

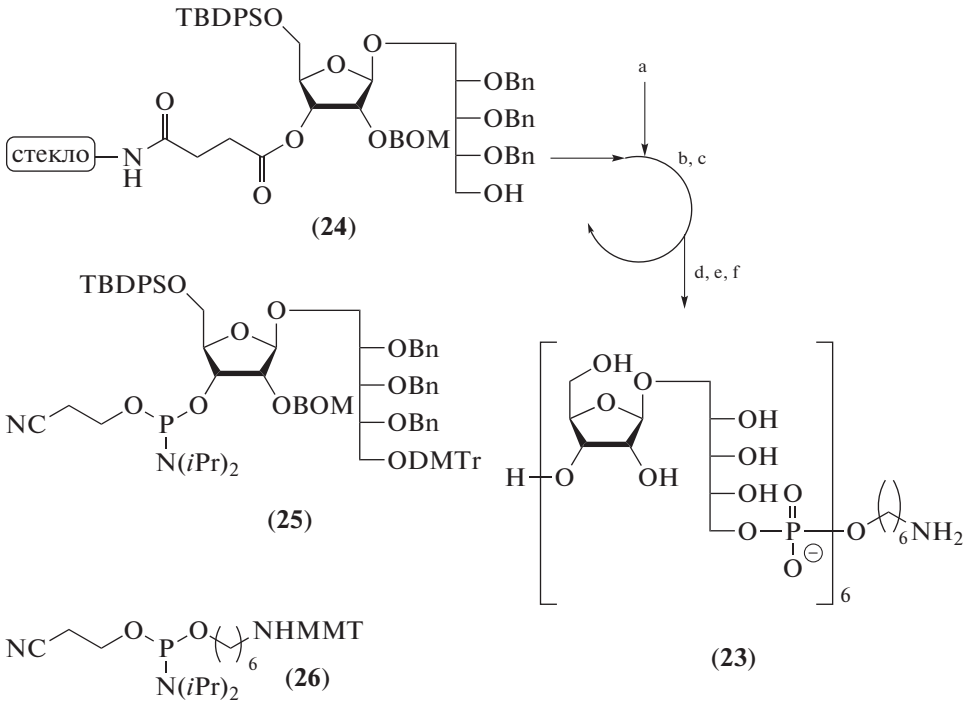


Схема 6. Ключевые синтетические блоки для синтеза спейсерированного гексамера PRP (**23**) [117]. Использованные реагенты: a – 1*H*-тетразол/ацетонитрил, (**25**); b – 0.02 M I_2, ацетонитрил, вода, 2,4,6-триметилпиридин; c – 2%-ная CCl_3COOH в CH_2Cl_2; d – 1*H*-тетразол, ацетонитрил, (**26**), 0.02 M I_2, ацетонитрил, вода, 2,4,6-триметилпиридин; 2%-ная CCl_3COOH в CH_2Cl_2; e – NH_3, H_2O, диоксан, 12 ч, 50°C; f – 0.5 M $(n\text{-Bu})_4NF$, диоксан, 10% Pd/C.

Серия из четырех гомологичных спейсерированных олигомеров (**27**–**30**) с альтернативным расположением спейсерного фрагмента – на невосстанавливающем конце – была получена L. Chan и G. Just [118] с использованием не только мономерного (**31**), но и димерного (**32**) фосфорамидитных блоков (рис. 2). В качестве спейсера применяли терминальный остаток рибозы с незащищенной OH-группой при C1.

Существенным ограничением при масштабировании синтеза олигосахаридов, родственных PRP, являлась невысокая емкость стеклянной подложки [117]. В качестве альтернативы A.A. Candil et al. [119, 120] (схема 7) использовали растворимую полимерную подложку на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), которую можно осаждать из реакционных смесей добавлением диэтилового эфира. Оптимальным образом функционализированный блок (**33**), иммобилизованный на ПЭГ-подложке через линкер на основе янтарной кислоты, наращивали дисахаридным фосфорамидитом (**34**) с последующим окислением фосфита *трет*-бутилгидропероксидом и детритилированием. Данные этапы повторяли необходимое число раз, а последний цикл наращивания цепи проводили с присоединением спейсерного реагента (**35**) с последующим удалением защитных групп и подложки. Таким образом были синтезированы димер (**36**), тример (**37**), пентамер (**38**) и гексамер (**39**).

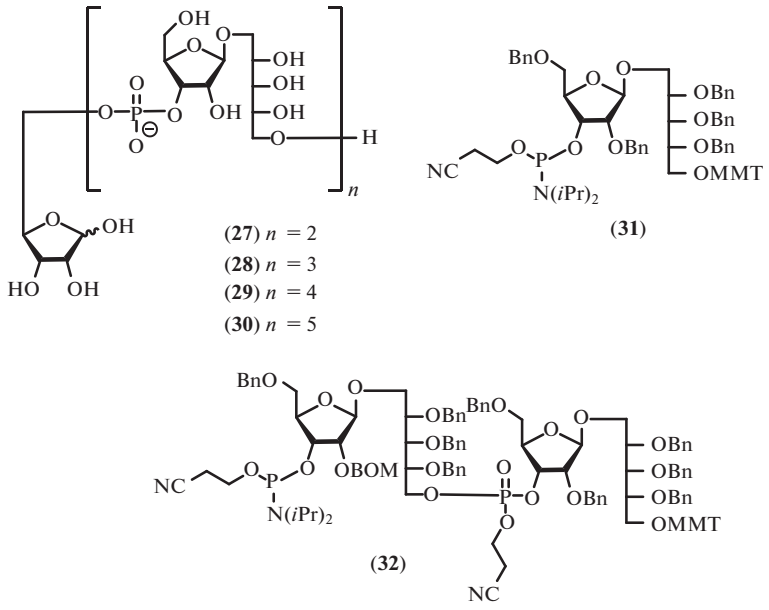


Рис. 2. Олигомеры PRP (**27**–**30**) и ключевые синтетические блоки (**31**) и (**32**) для их синтеза [118].

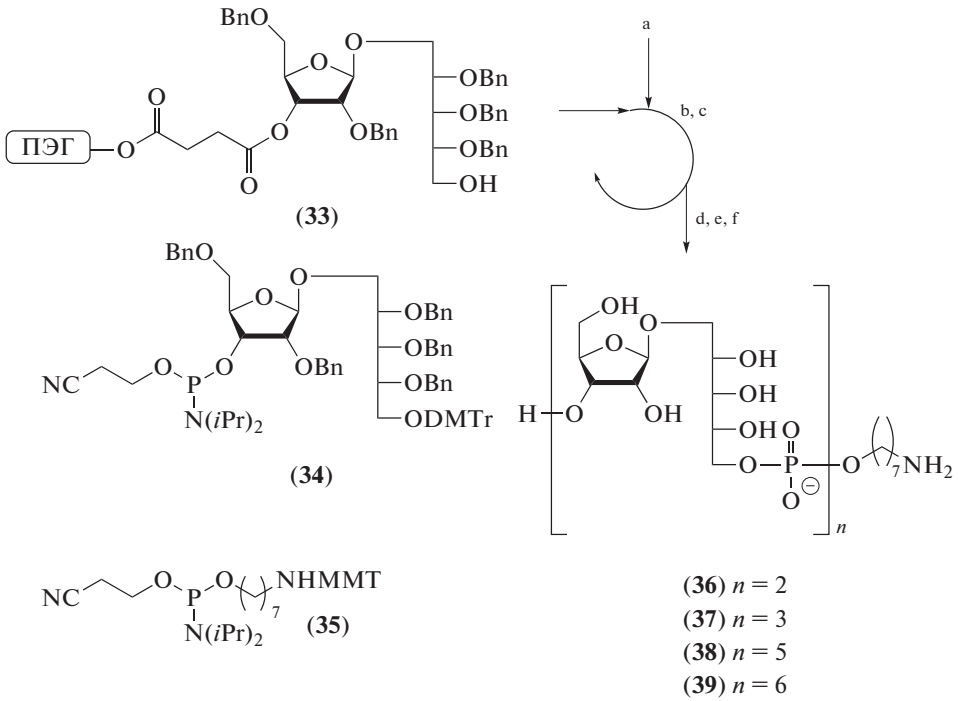


Схема 7. Ключевые синтетические блоки, использованные в синтезе спейсерированных олигомеров (**36**–**39**) [119]. Использованные реагенты: a – 1*H*-тетразол, ацетонитрил (**34**); b – *t*-BuOOH; c – *p*TsOH; d – 1*H*-тетразол, ацетонитрил, (**35**), *t*-BuOOH; e – NH_4OH, THF; f – 10% Pd/C.

Еще один вариант твердофазного синтеза спейсерированного олигосахарида, родственного PRP, был предложен S. Nilsson et al. [121] (схема 8). В этой работе к дисахариду (**33**) (схема 7), закрепленному на полистирольной подложке через сукцинатный линкер, присоединяли блок (**40**) в присутствии пивалоилхлорида с последующим детритилированием под действием 0.5%-ной трифторуксусной кислоты в дихлорметане. После четырех циклов на последнем этапе присоединяли фосфонат (**41**), содержащий преспейсерную группу. После окисления фосфоната до фосфата, восстановления азидной группы и удаления защит получали пентамер (**42**).

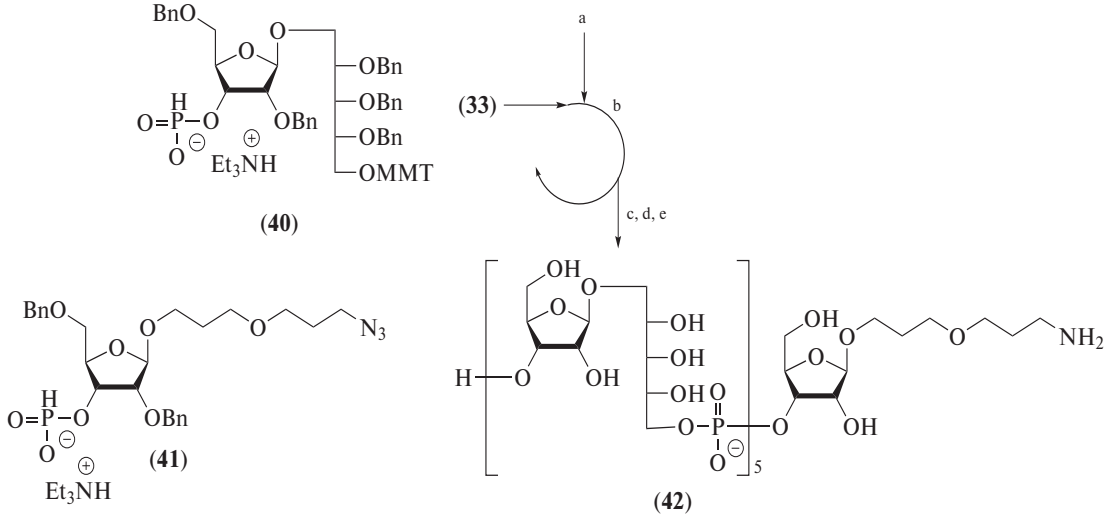


Схема 8. Ключевые синтетические блоки для синтеза пентамера (**42**) [121].
Использованные реагенты: a – PivCl, CH_2Cl_2, пиридин, (**40**); b – 0.5%-ная CF_3COOH в CH_2Cl_2;
c – PivCl, CH_2Cl_2, пиридин, (**41**); d – 1% I_2, пиридин, вода, NaOMe, MeOH, диоксан; e – 10% Pd/C.

Из приведенных выше примеров видно, что оптимизация синтезов спейсерированных олигосахаридов сопровождалась усовершенствованием синтетических приемов и сокращением количества хроматографических стадий, но степень конвергентности, являющаяся одним из самых важных параметров для успешного многостадийного синтеза, оставалась практически неизменной. Принципиально иной высококонвергентный подход к синтезу рассматриваемого типа соединений, основанный на поликонденсации гетеробифункционального мономера (**43**) (схема 9), содержащего свободную OH-группу при O5 рибита и фосфонатную группу при O3 рибозы, был разработан под руководством V. Verez-Bencomo и R. Roy [71, 122–124]. В предложенной схеме катализируемый пивалоилхлоридом процесс поликонденсации мономера (**43**) терминируется добавлением мономера (**44**), к которому фосфодиэфирной связью присоединен диэтиленгликольный спейсер. Окисление фосфита до фосфата, восстановление азидогруппы и деблокирование приводят к образованию смеси олигомеров (**45**), содержащих в среднем 8–11 повторяющихся звеньев. Оптимизированный одностадийный синтез спейсерированных олигомеров из мономерных предшественников был масштабирован до объемов промышленного производства, а полученный на их основе конъюгат входит в состав вакцины Quimi-Hib® (Heber Biotec S.A.).

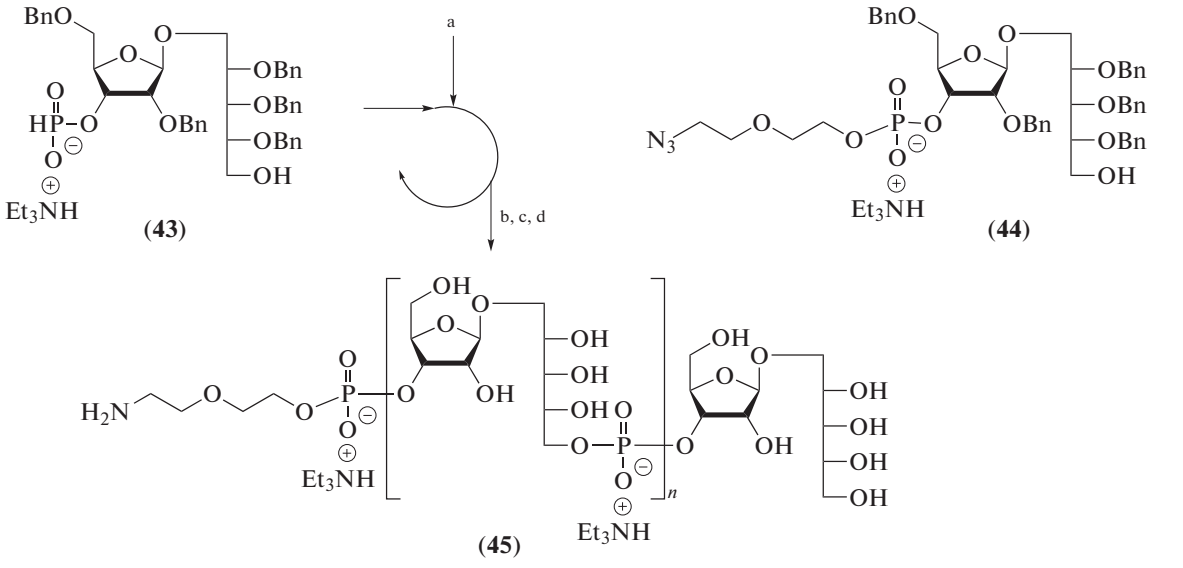


Схема 9. Ключевые синтетические блоки для синтеза [71] олигомеров (**45**), n = 8–11.
Использованные реагенты: a – PivCl, пиридин, (**43**); b – PivCl, пиридин, (**44**); c – I_2, пиридин; d – Pd/C.

Один из последних подходов к синтезу спейсерированных олигосахаридов, родственных PRP (схема 10), предложен P. Seeberger et al. [125]. Реализованная схема характеризуется высокой степенью конвергентности и в качестве базового исходного соединения использует избирательно защищенный тетрамер (**46**) с ортогональными защитными группами – левулиновой группой при O3 остатка рибозы на невосстанавливающем конце и 4,4'-диметокситритильной группы при O5 рибитного звена на восстанавливающем конце. Наращивание цепи осуществлялось присоединением димерных блоков (**47**), далее цепь терминировали спейсером (**48**). После удаления защитных групп получали спейсерированные производные тетра- (**49**), гекса- (**50**), окта- (**51**) и декамера (**52**).

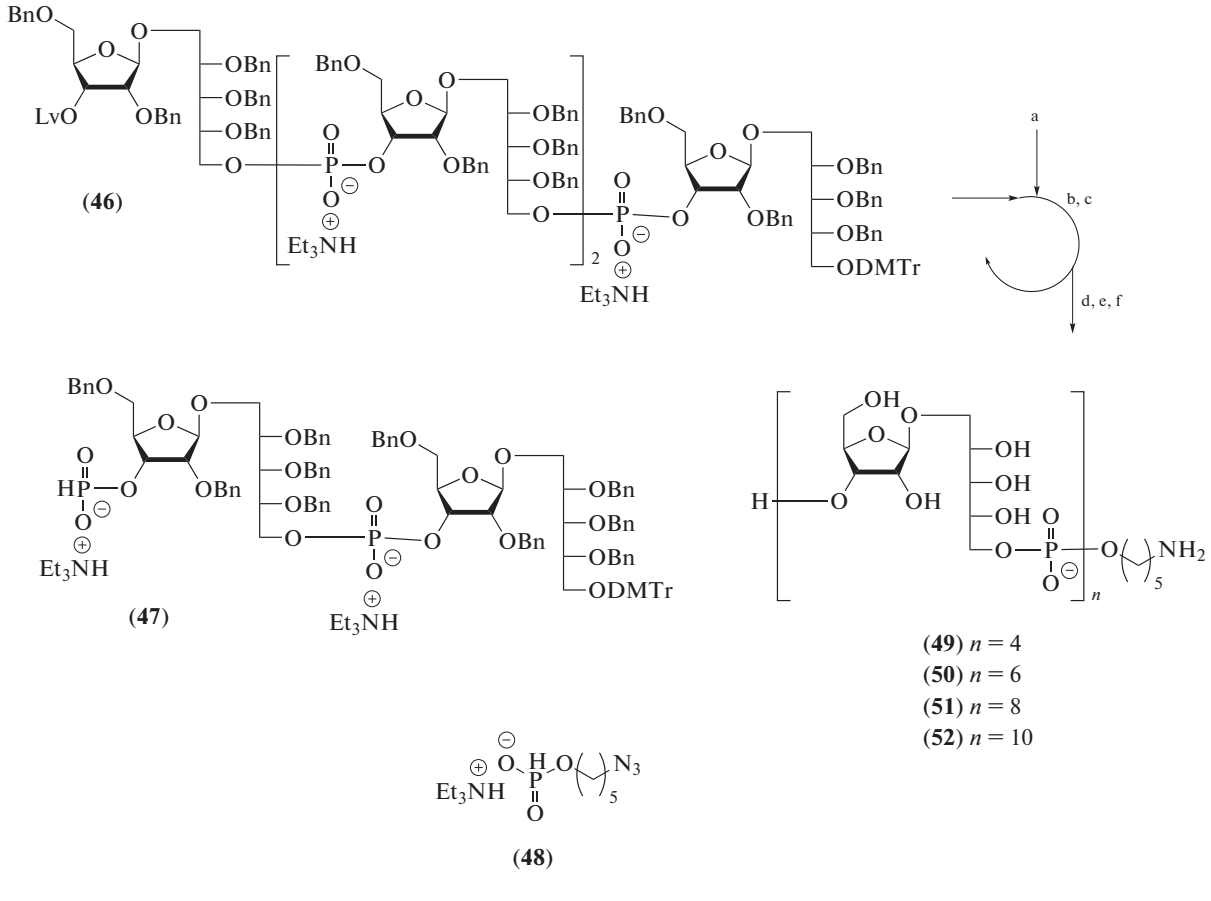


Схема 10. Ключевые синтетические блоки для синтеза олигомеров (**49–52**) [125].
Использованные реагенты: a – PivCl, пиридин, (**47**), 0°C; b – I_2, пиридин, H_2O, 20°C; c – CCl_3COOH/CH_2Cl_2, 0°C; d – PivCl, пиридин, (**48**), 0°C; e – гидразина ацетат, CH_2Cl_2, 20°C; f – Pd/C, H_2, EtOAc, MeOH, AcOH, вода.

СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ СПЕЙСЕРИРОВАННЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ, РОДСТВЕННЫХ PRP, В КАЧЕСТВЕ КАНДИДАТНЫХ ВАКЦИН

На основе синтетических олигосахаридов (**17–19**) в 1992 г. были получены первые конъюгаты спейсерированных олигосахаридов, родственных PRP, с белком внешней мембраны Hib (hibOMP) [126], TT [126] и CRM197 [115] (схема 11). Входящий в состав спейсера остаток глицина ацилировали SATA с получением *S*-ацетилированных продуктов (**53–55**), а белки-носители hibOMP и TT активировали действием SPDP. Активированные таким образом белки (**56**) и (**57**) вводили в реакцию с тиолами, получаемыми *in situ* при дезацетилировании соединений (**53**) и (**54**). Мольное соотношение PRP : hibOMP в конъюгатах (**58**) и (**59**) составило 5 : 1, а соотношение PRP : TT – 20 : 1 для конъюгата (**60**) и 13 : 1 для конъюгата (**61**).

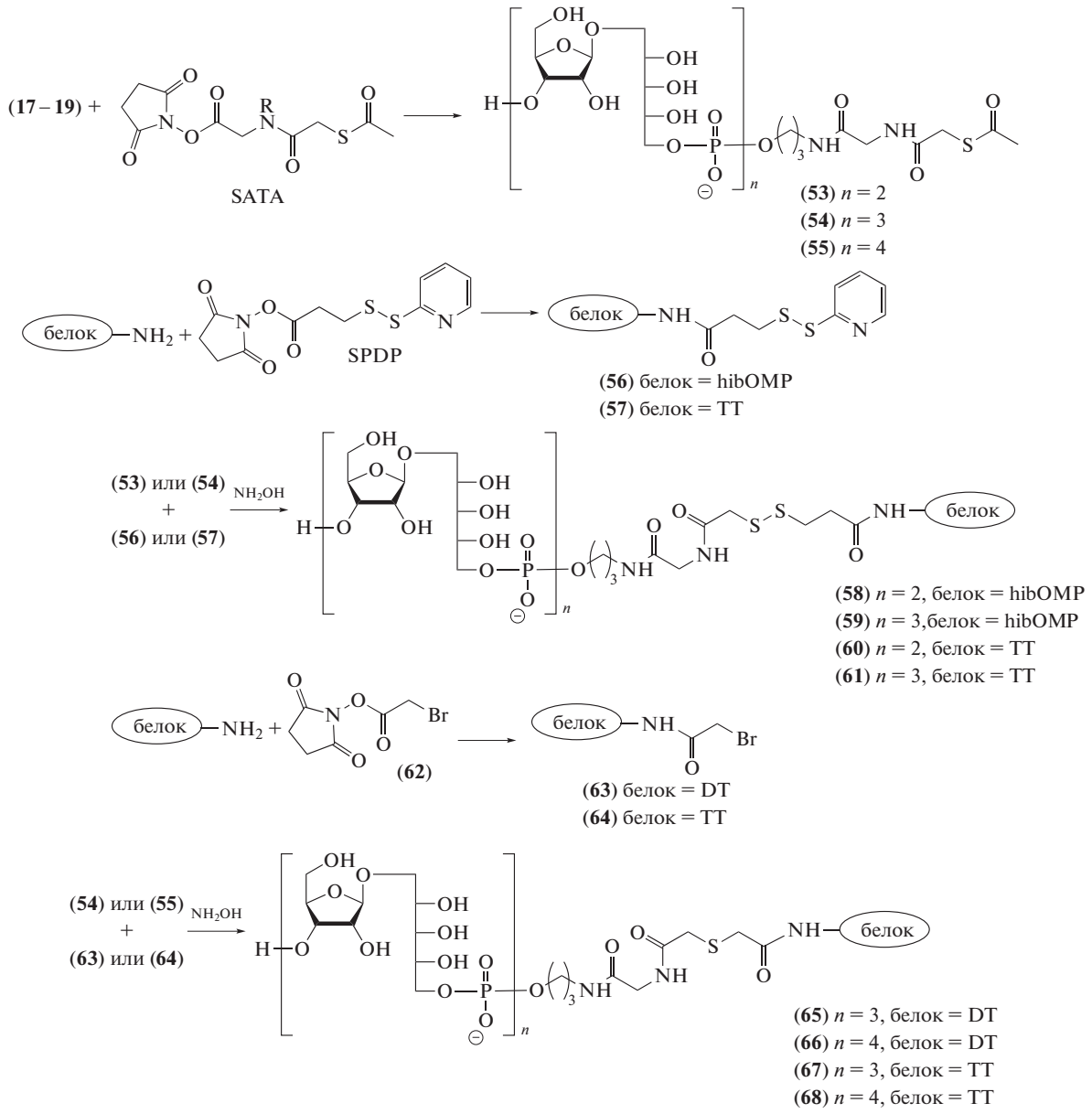


Схема 11. Синтез конъюгатов олигосахаридов (**17–19**) с белками-носителями hibOMP, TT и DT.

Для присоединения олигосахаридов (**54**) и (**55**) к токсоидам TT и DT эти белки предварительно бромацетилировали действием *N*-сукцинимидилбромацетата (**62**) [115]. Активированные таким образом производные (**63**) и (**64**) конъюгировали с олигосахаридами (**54**) и (**55**) в присутствии гидроксиламина. Мольное соотношение олигосахарид : белок для конъюгатов (**65**), (**66**), (**67**) и (**68**) составило 9.9 : 1; 6.5 : 1; 21 : 1 и 5.3 : 1 соответственно.

Конъюгаты олигосахаридных лигандов (**17**) и (**18**) с TT получали также с использованием глутарового альдегида в качестве гомобифункционального сшивающего агента [126]. В результате кроме присоединения олигосахаридных лигандов протекала также трудно контролируемая кросс-сшивка белка-носителя с образованием продуктов с большим разбросом молекулярных масс – от 160 до 1000 кДа, но весьма низким включением олигосахаридных лигандов. Их весовое содержание в конъюгатах составляло только 0.5–4.0%.

Другие химические методы конъюгации с белками использованы в случае олигосахаридных лигандов (**37–39**) с гептаметиленаминовым спейсером (схема 12). Сначала эти соединения были ацилированы с помощью MBS с образованием малеимидных производных (**69–71**) (схема 12) [119, 120]. Последние далее конъюгировали с тремя содержащими концевой остаток цистеина синтетическими олигопептидами, родственными белкам P1, P2 и P6 внешней мембраны Hib, что привело к получению конъюгатов общей формулы (**72**) (схема 12) [127].

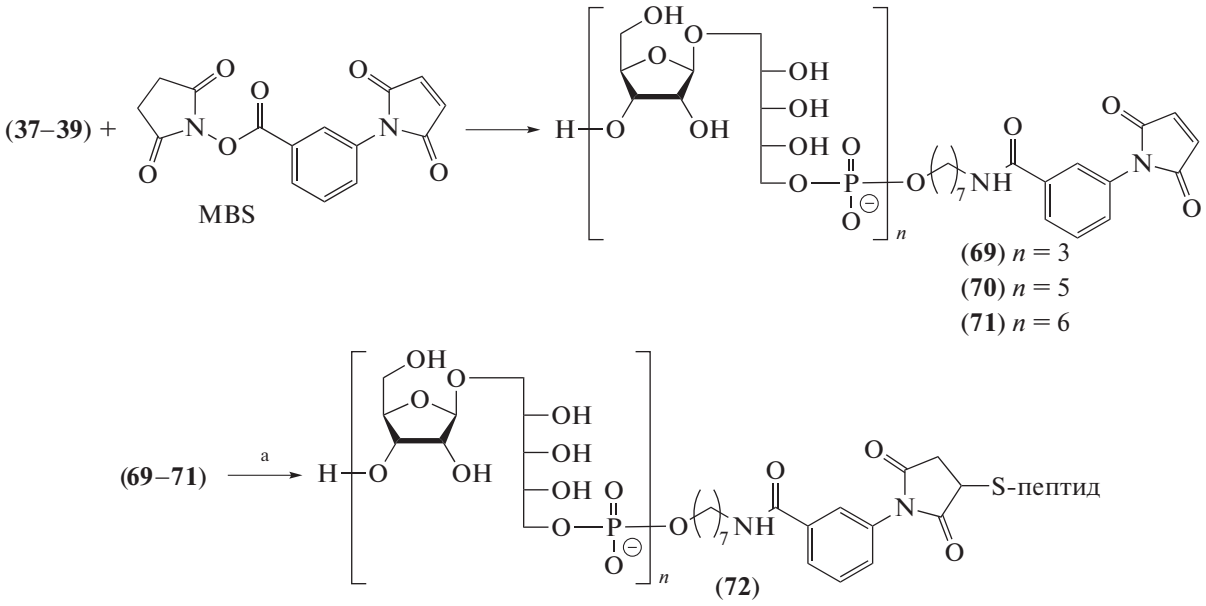


Схема 12. Синтез конъюгатов спейсерированных олигосахаридов (**37**–**39**) с синтетическими пептидами. Использованные реагенты: a – синтетические пептиды P1, P2 и P6 внешней мембраны Hib с концевым остатком цистеина [127].

Иная схема двухстадийной углевод-белковой конъюгации реализована для соединения смеси спейсерированных олигосахаридов (**45**) (схема 9) с анатоксином TT [71]. Сначала продукт (**45**) действием SMP переводили в малеимидные производные общей формулы (**73**) (схема 13). Конъюгация этого продукта с тиоилированным производным TT (**74**) по реакции Михаэля приводила к образованию смеси конъюгатов общей формулы (**75**), в которых к одной белковой единице присоединены олигосахаридные остатки разной длины. Этот продукт далее был использован в качестве основного компонента первой коммерческой Hib-вакцины Quimi-Hib® (Heber Biotec S.A.) с полностью синтетической углеводной составляющей.

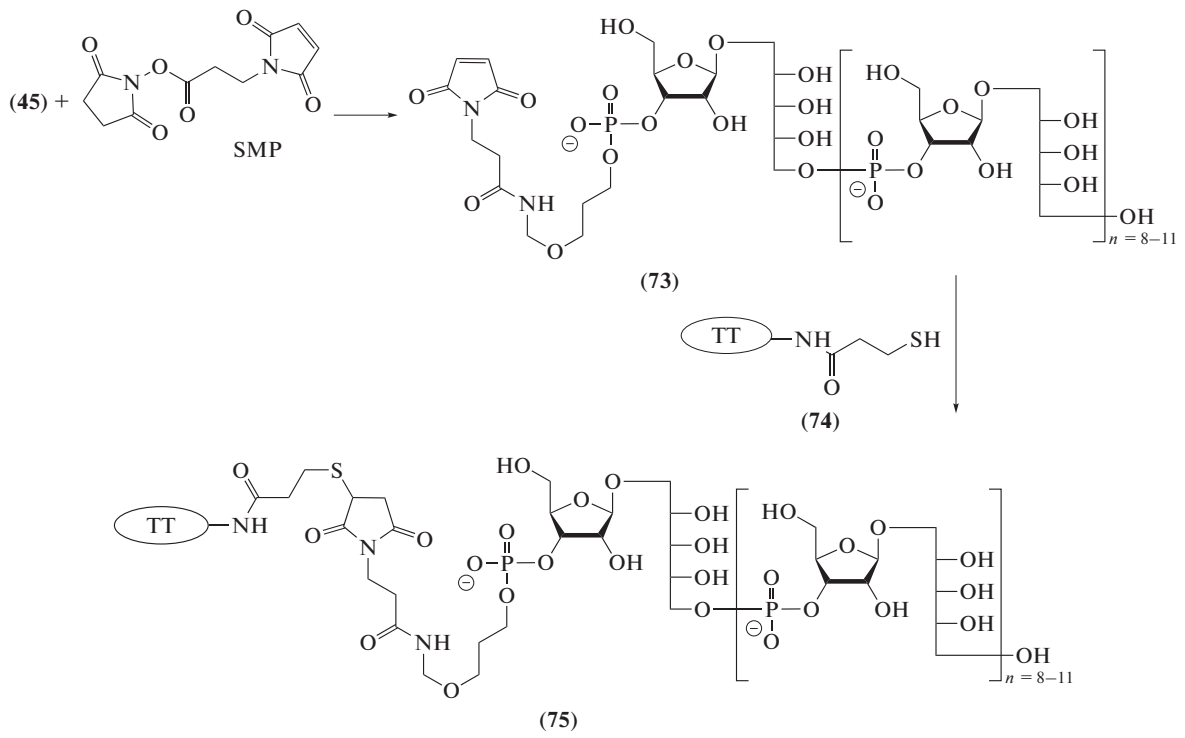


Схема 13. Общая схема синтеза конъюгата (**75**) – субстанции вакцины Quimi-Hib® (Heber Biotec S.A.) [71].

Аналогичный процесс присоединения тиола к двойной связи малеимида использован в работе P. Seeberger et al. для получения конъюгатов индивидуальных олигосахаридов (**49**–**52**) [125]. При действии DSP их сначала переводили в производные тиопропионовой кислоты (**76**–**79**), далее восстанавливали с помощью DTT до тиолов (**80**–**83**), как показано на схеме 14, а затем конъюгировали с активированным белком (**84**), который получали *N*-ацилированием адъювантного белка-носителя CRM197 с помощью SMP. В полученных в результате конъюгатах (**85**), (**86**), (**87**) и (**88**) содержание олигосахаридных лигандов составляло 4.9, 4.0, 3.1 и 2.7 соответственно.

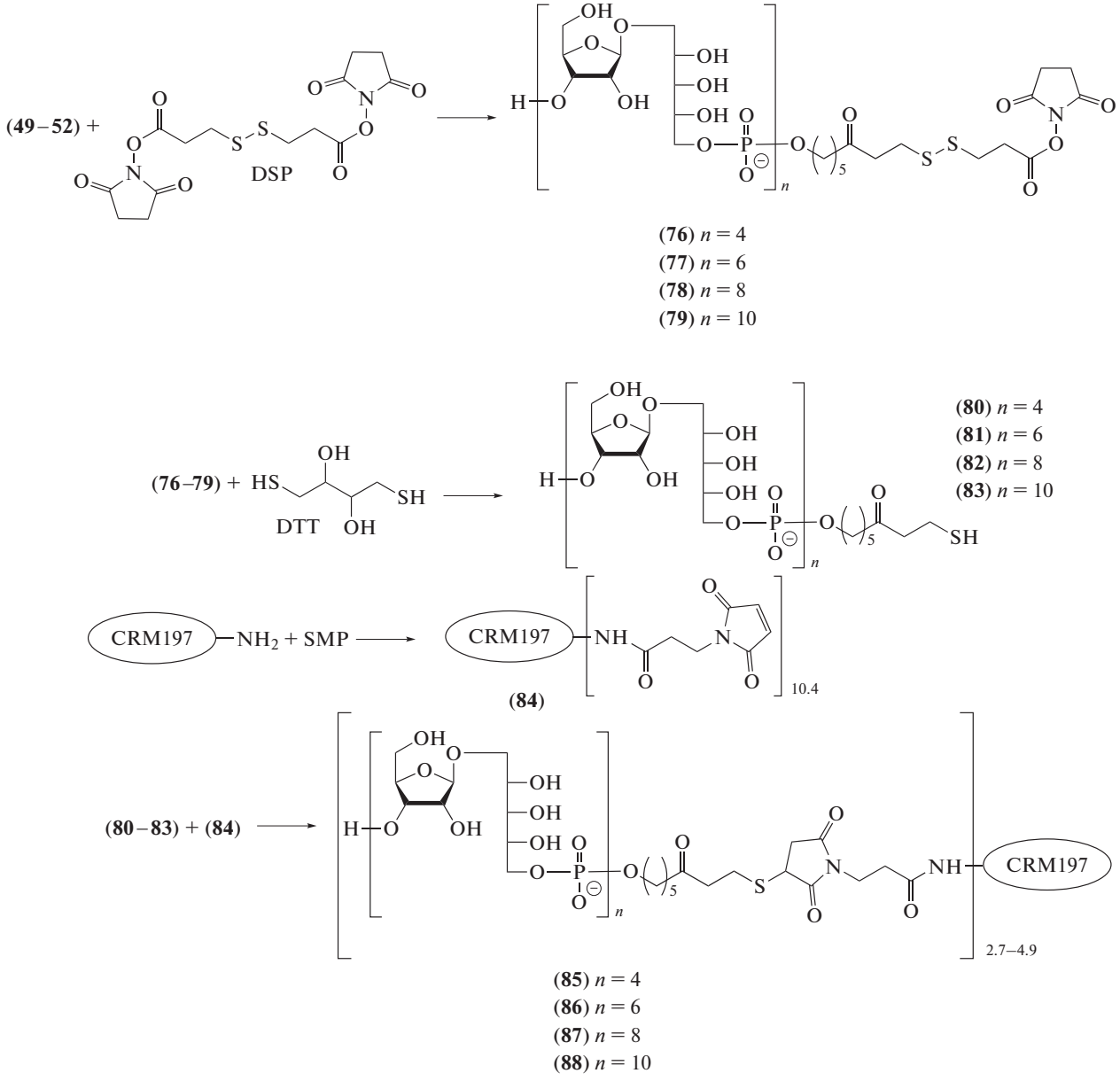


Схема 14. Синтез конъюгатов (**85**–**88**) из спейсерированных олигосахаридов (**49**–**52**) и CRM197.

ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ОЛИГОСАХАРИДОВ, РОДСТВЕННЫХ PRP, НА ИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Ключевыми структурными факторами, которые могут влиять на иммуногенность и протективные свойства индуцируемых антител при использовании конъюгатов олигосахаридных лигандов, родственных PRP, и адъювантными белками-носителями являются длина используемых олигосахаридных компонентов [109, 128, 129], степень конъюгации, а также тип использованного белка-носителя. К сожалению, из-за весьма

большой сложности и относительно малой доступности олигосахаридных производных рассматриваемого типа опубликованы только фрагментарные данные об их иммунологических свойствах, что ограничивает возможности для систематических исследований и заключений о взаимосвязи структур и биологических свойств обсуждаемых соединений. Тем не менее известные сегодня данные позволяют сделать некоторые выводы.

Длину B-эпитопа, т.е. минимальную длину олигосахаридной цепи, необходимой для связывания с PRP-специфичными антителами, можно определять с помощью конкурентного ИФА. Для проведения такого эксперимента гипериммунную сыворотку, полученную при иммунизации белковым конъюгатом полисахарида PRP или при заражении животных Hib, выдерживают с синтетическими гликоконъюгатами, содержащими родственные PRP олигосахариды известной длины и строения, либо непосредственно с олигосахаридами. При этом исследуется способность иммуноглобулинов сыворотки связываться с PRP-антигенами, иммобилизованными на поверхности полистирольных планшетов. Так, C.C. Peeters et al. при сравнении результатов ингибирования сывороточных антител с помощью олигосахаридных производных, родственных тримеру (**18**) и тетрамеру (**19**) повторяющегося звена PRP, а также их конъюгатов с белком-носителем TT (соединения (**67**, **68**)), показали, что как тетрамер (**19**), так и его конъюгат (**68**), но не производные тримера (**18**) и (**67**), эффективно ингибировали взаимодействие гипериммунной сыворотки человека с полисахаридом PRP, нанесенным на планшет в качестве покрывающего антигена [115].

В подобных экспериментах при ингибировании связывания полисахарида PRP (иммобилизован на планшете для ИФА) с PRP-специфическими поли- и моноклональными антителами человека с помощью олигомеров (**15**) (схема 4) повторяющегося звена PRP со средней степенью полимеризации 1, 2, 7, 21, 47, 80 и 262 ожидаемо показали [130], что степень ингибирования возрастает с увеличением длины олигосахаридных гаптенов. Однако такие исследования не дали представления об интенсивности потенциальной иммуногенности олигомеров, а также типе и протективных свойствах индуцируемых антител, как и о возможности формирования иммунной памяти.

Для выявления оптимальной величины гаптена для индукции антител, специфичных к PRP, проводились клинические эксперименты по иммунизации гликан-белковыми конъюгатами с олигосахаридными цепями разной длины. Для проведения такого исследования Anderson et al. получили конъюгаты DT с олигосахаридными фракциями PRP (**5**) со средним количеством повторяющихся звеньев 8 и 20 [109]. Степень конъюгации для конъюгата с октамером PRP составила 3.3 моль олигосахарида на моль DT, а для конъюгата с 20-мером – 2.1 моль/моль. Клинические испытания этих препаратов показали, что конъюгат с октамерным лигандом оказался слабым иммуногеном для детей 9–15 месяцев, тогда как использование вакцины, содержащей конъюгаты низкомолекулярного PRP со степенью полимеризации ~20, дало высокие титры PRP-специфичных антител уже после второй иммунизации. В то же время обе вакцины индуцировали интенсивный иммунный ответ у взрослых.

Аналогичное исследование было проведено на другой серии синтетических иммуногенов на основе олигосахаридных фрагментов PRP с остатком рибита на невосстанавливающем конце [128] и средней степенью полимеризации 4, 6 и 12. Для изучения иммуногенности использовали их конъюгаты с CRM197 с низким содержанием гаптена. Клинические испытания, проводившиеся с участием детей в возрасте 1 года, показали, что все эти препараты формировали иммунную память к PRP, но не позволили выявить зависимость иммуногенности от длины олигосахаридных лигандов. Для исследования влияния на иммуногенность других структурных факторов были получены аналогичные конъюгаты с олигосахаридами PRP, имеющие на невосстанавливающем конце остаток фосфата или рибозы, со средней степенью полимеризации 7 и более высоким содержанием олигосахаридных гаптенов. Иммуногенность этих соединений была в 20 раз выше, чем для конъюгатов с низким содержанием гаптена, но не зависела от структуры остатка на невосстанавливающем конце.

Преимущество более длинных лигандов подтвердили данные, которые были получены с использованием конъюгатов синтетических олигосахаридных лигандов с одинаковой невысокой степенью конъюгации. Иммунизация лабораторных животных полученными с использованием 0.1%-ного глутарового альдегида конъюгатами белка-носителя TT с синтетическими димером (**36**) и тримером (**37**) (схема 7), в которых мольное соотношение PRP : TT составляло 2 : 1, показала, что иммунный ответ на вакцинацию конъюгатом тримера (**37**) был до 200 раз выше, чем для конъюгата димера (**36**) [131].

Одна из самых последних опубликованных работ, посвященных созданию вакцины третьего поколения против Hib [125], суммирует результаты исследований конъюгатов (**85**–**88**) на основе белка-носителя CRM197, содержащих в качестве углеводных лигандов тетра- (**49**), гекса- (**50**), окта- (**51**) и декамер (**52**) повторяющегося звена PRP. При иммунизации лабораторных животных конъюгатами (**85**) и (**87**) наблюдали существенно более высокий уровень антител к PRP, чем в случае конъюгатов (**86**) и (**88**). На основании этих данных авторы предположили, что минимальным фрагментом PRP, включающим B-эпитоп анти-PRP-антител, является тетрамер, что можно

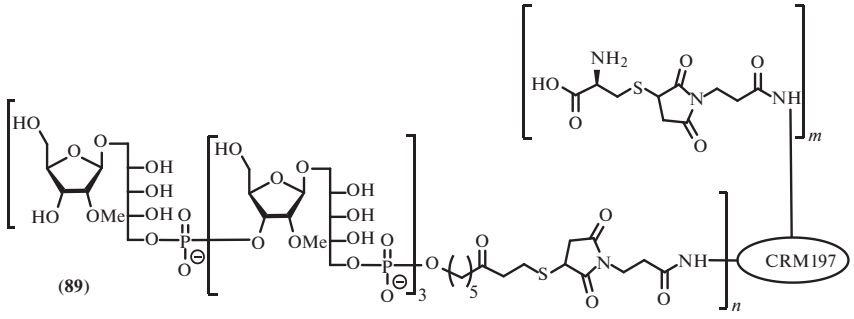


Рис. 3. Строение конъюгата CRM197 и тетрамерного лиганда с 2-*O*-метилированными рибозными звеньями [132].

принимать только как качественный результат, т.к. исследованные конъюгаты имели разную степень конъюгации лигандов, и их иммуногенность может из-за этого сопоставляться лишь условно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные выше работы убедительно свидетельствуют о том, что вакцины против Hib являются важным компонентом иммунопрофилактики населения. Несмотря на присутствие на рынке целого ряда достаточно эффективных вакцин на основе полисахарида PRP, которые используются и индивидуально, но обычно в составе комбинированных вакцин, актуальной задачей является разработка вакцин третьего поколения, основанных на синтетических олигосахаридных лигандах, структурно родственных фрагментам полисахарида PRP. Такие работы активно ведутся в специализированных лабораториях в разных странах мира, в том числе и авторами настоящего обзора. Применение синтетических олигосахаридных лигандов для получения вакцины против Hib позволяет исключить присутствие в конечных продуктах примесей биогенного происхождения, образующихся при биотехнологическом получении полисахарида PRP. Кроме того, использование синтетических олигосахаридных лигандов позволяет более точно и воспроизводимо получать конъюгированные препараты с заранее заданными структурными характеристиками, отвечающими современным высоким стандартам качества фармацевтического производства GMP.

Единственная на сегодняшний день коммерческая вакцина Quimi-Hib® против Hib, которую условно можно отнести к третьему поколению вакцин, содержит не один тип олигосахаридного лиганда, а набор гомологов с различным числом повторяющихся звеньев. Из-за этого вакцина Quimi-Hib® не обладает важным преимуществом данного класса продуктов – точно определенной структурой вакцинного лиганда. Тем не менее пионерские исследования, проведенные при создании вакцины Quimi-Hib®, и другие работы, рассмотренные выше, показали, что длина оптимального олигомера лежит в области небольших степеней полимеризации. Использование коротких олигомеров PRP (например, тетрамерного, а может быть, и меньших лигандов) для изготовления конъюгированных вакцин против Hib позволит существенно снизить затраты на их промышленное производство.

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день эффективные синтетические подходы к получению конъюгатов синтетических олигосахаридов, соответствующих фрагментам полисахарида PRP, и результаты оптимизации структуры углеводного вакцинного лиганда создали фундамент для разработки конъюгированных Hib-вакцин третьего поколения с заранее заданными структурными характеристиками, в которых практически не присутствуют примеси биогенного происхождения. Кроме того, синтетическая природа антигенного лиганда в составе таких конъюгированных препаратов позволяет оптимизировать строение лиганда, внося в него структурные изменения, направленные на улучшение физико-химических характеристик и иммунологических свойств. Первый шаг в этом направлении был сделан P. Seeberger et al., которые предложили введение метильной группы при O2 остатков рибозы для повышения устойчивости структуры вакцинного лиганда, как, например, в конъюгате (**89**) (рис. 3) [132].

Еще одним преимуществом синтетического подхода при создании вакцины против Hib является возможность варьирования структуры олигосахаридного лиганда, что присуще химическим схемам, но не микробиологическим процессам, жестко ограниченным штаммом-продуцентом КПС. Это означает, что только в химической схеме получения вакцины можно с минимальными затратами заменить часть ключевых синтетических блоков с целью оптимизации структуры вакцинного лиганда. Такая необходимость может возникать в связи с изменением эпидемиологически значимых штаммов гемофильной палочки. Это явление уже сейчас наблюдается в ряде стран, в которых широко применяются Hib-вакцины. Например, в последние 30 лет патоген *H. influenzae* типа *a* (Hia) все чаще является причиной инвазивных инфекций в Канаде, США, Австралии и

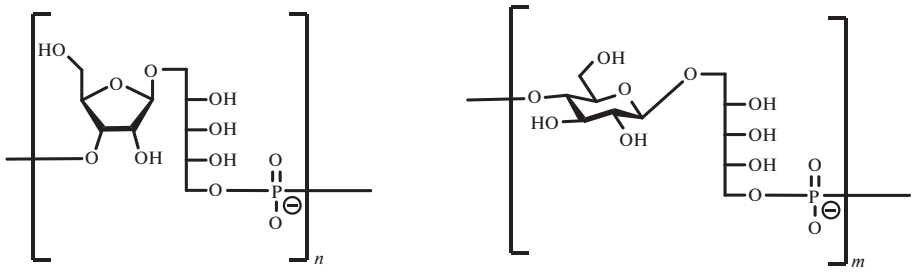


Рис. 4. Структура КПС *H. influenzae* типа *b* (слева) и *H. influenzae* типа *a* (справа).

Бразилии [133, 134]. В этой связи возник интерес к разработке Hia-вакцины на базе соответствующего КПС [134, 135], для чего потребуется создать ресурсоемкую микробиологическую технологию для наработки патогена. Благодаря тому, что КПС патогена *H. influenzae* типа *a* имеет структуру →4)-β-*D*-Glcp-(1→1)-*D*-рибит-5-OPO_2HO→, которая отличается от структуры только наличием остатка β-*D*-глюкозы на месте рибозы (рис. 4) [136], можно разработать универсальный подход к синтезу Hib- и Hia-олигосахаридов, что позволит получать конъюгированные вакцинные препараты против двух штаммов гемофильной палочки в рамках одного технологического процесса.

Вакцина против Hib была первой коммерческой конъюгированной углеводной вакциной и может стать первой конъюгированной вакциной, включающей синтетический олигосахаридный лиганд строго определенной структуры, эффективное применение которой даст импульс к развитию перспективной области вакцин третьего поколения. На сегодняшний день опубликовано множество работ, направленных на синтез антигенных олигосахаридов и создание на их основе вакцин для профилактики опасных инфекционных заболеваний человека, вызываемых бактериями *Streptococcus pneumoniae* [1–5, 8, 14, 137–141], *Enterococcus faecalis* [142, 143], *Shigella flexneri* серотипа *2a* [144], *Neisseria meningitidis* серотипа X [145], *Klebsiella pneumoniae* [146–148], *Clostridium difficile* [149], *Staphylococcus aureus* [150–153], а также грибами *Aspergillus fumigatus* (на основе олигосахаридных лигандов, родственных α-глюкану [154–157], галактоманнану [158–162] и α-(1→4)-галактозаминогалактану [163–165]), *Candida albicans* [166–170] и др. патогенами [171–173].

В Российской Федерации гемофильная вакцина внесена в национальный календарь прививок пока только для детей из групп риска, и эти потребности удовлетворяются в основном за счет импортируемых препаратов (табл. 1). Возможно, это связано с тем, что по сравнению со многими другими странами, уровень инвазивных Hib-инфекций в России невысок (см. выше). Однако экономические исследования показывают, что расширение охвата программ иммунизации против гемофильной инфекции до тотальной вакцинации новорожденных экономически выгодно даже в случае импорта вакцины, хотя и менее выгодно, чем при применении национальной вакцины, т.к. потребность в ней достигает сегодня уже очень больших величин. Проведенная с применением имитационной ретроспективной модели оценка социально-экономического ущерба от пяти вакциноуправляемых инфекций (коклюш, дифтерия, столбняк, полиомиелит и заболевания, вызванные инвазивными формами Hib-инфекции) на территории России и затрат на вакцины при варьировании доли вакцинного препарата АКДС–IPV–Hib, включающего бесклеточный коклюшный компонент, в общем объеме вакцинации АКДС–полиомиелит 28–100%, показала 15-кратное снижение таких ключевых экономических показателей эффективности вакцинных программ, как суммарный ущерб от потерянных лет жизни и суммарный монетарный эквивалент ущерба [174]. Это исследование подтверждает необходимость введения вакцины против Hib, например, в качестве компонента поливакцин на базе АКДС, в график обязательной вакцинации для всей популяции, а не только для групп риска.

Экономическую эффективность программ вакцинации современными вакцинами против Hib можно существенно повысить путем замещения импортируемого сегодня Hib-компонента в используемых в России комбинированных вакцинах на отечественный препарат, производимый по технологии полного цикла. Объединенные усилия научно-исследовательских организаций, располагающих требуемым арсеналом методов и технологий, применяемых в современной химии углеводов, и биотехнологических российских предприятий с необходимым производственным потенциалом, без сомнений, могут привести к появлению отечественной вакцины третьего поколения против Hib. Освоение ее производства позволит создать технологическую базу и для разработки других углеводных конъюгированных вакцин, требуемых сегодня для решения задач национальной безопасности и иммунопрофилактики.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-73-30017).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Генинг М.Л., Курбатова Е.А., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э.* // Успехи химии. 2015. Т. 84. С. 1100–1113. [*Gening M.L., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E., Kurbatova E.A.* // Russ. Chem. Rev. 2015. V. 84. P. 1100–1113.] https://doi.org/10.1070/RCR4574
2. *Tsvetkov Y.E., Gening M.L., Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Nifantiev N.E.* // Pure Appl. Chem. 2017. V. 89. P. 1403–1411. https://doi.org/10.1515/pac-2016-1123
3. *Mettu R., Chen C.-Y., Wu C.-Y.* // J. Biomed. Sci. 2020. V. 27. P. 9–30. https://doi.org/10.1186/s12929-019-0591-0
4. *Micoli F., Del Bino L., Alfini R., Carboni F., Romano M.R., Adamo R.* // Expert Rev. Vaccines. 2019. V. 18. P. 881–895. https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1657012
5. *Khatun F., Stephenson R.J., Toth I.* // Chem. Eur. J. 2017. V. 23. P. 4233–4254. https://doi.org/10.1002/chem.201603599
6. *Rappuoli R.* // Sci. Transl. Med. 2018. V. 10. Article eaat4615. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat4615
7. *Berti F., Adamo R.* // Chem. Soc. Rev. 2018. V. 47. P. 9015–9025. https://doi.org/10.1039/C8CS00495A
8. *Cavallari M., De Libero G.* // Vaccines. 2017. V. 5. Article 4. https://doi.org/10.3390/vaccines5010004
9. *Micoli F., Costantino P., Adamo R.* // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. P. 388–423. https://doi.org/10.1093/femsre/fuy011
10. Национальный календарь профилактических прививок. Приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 125н. URL: http://base.garant.ru/70647158/53f89421bbdaf741eb2d1ecc4ddb4c33/ (Accessed: 25.04.2020).
11. Эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа *b*: Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 32 с. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4604 (Accessed: 25.04.2020).
12. *Watt J.P., Wolfson L.J., O'Brien K.L., Henkle E., Deloria-Knoll M., McCall N., Lee E., Levine O.S., Hajjeh R., Mulholland K., Cherian T.* // Lancet. 2009. V. 374. P. 903–911. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61203-4
13. *Edmond K., Clark A., Korczak V.S., Sanderson C., Griffiths U.K., Rudan I.* // Lancet Infect. Dis. 2010. V. 10. P. 317–328. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70048-7
14. *Peltola H.* // Clin. Microbiol. Rev. 2000. V. 13. P. 302–317. https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.302
15. *Абрамцева М.В., Тарасов А.П., Немировская Т.И., Ковтун В.П., Волков В.А., Мовсесянц А.А.* // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2017. Т. 17. С. 78–86.
16. Охват иммунизацией в мире в 2019 г. URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage (Accessed: 25.04.2020).
17. *Yang Y., Yang Y., Scherpbier R.W., Zhu X., Chen Y., Zhou Y., Jiang Q.* // Pediatr. Infect. Dis. J. 2019. V. 38. P. 248–252. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002132
18. *Демина А.А.* // Международный медицинский журнал. 1998. Т. 4. С. 315–322.
19. *Королева М.А., Королева И.С., Грубер И.М., Черкасова Л.С.* // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017. Т. 16. С. 36–43.
20. *Харченко Г.А., Кимирилова О.Г.* Вопр. совр. педиатрии. 2017. Т. 16. С. 241–245. [*Kharchenko G.A., Kimirilova O.G.* // Vopr. sovr. pediatr. 2017. V. 16. P. 241–245.] https://doi.org/10.15690/vsp.v16i3.1735
21. *Платонов А.Е., Николаев М.К., Королева И.С., Миронов К.О., Платонова О.В., Яковенко М.Л., Кошелева Л.П., Честнова Т.В., Княгина О.Н., Корсакова Т.Г., Кириллова Т.А., Демин С.И., Тарасов М.Ю., Ибрагимова Е.М.* // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009. Т. 4. С. 33–42.
22. *Баранов А.А., Горелов А.В., Задорожная В.И., Идрисова Р.С., Матвеев В.А., Намазова Л.С., Платонов А.Е., Таточенко В.К., Фролов А.Ф., Шамшева О.В.* // Вопр. совр. педиатрии. 2006. Т. 5. С. 6–11. [*Baranov A., Gorelov A., Zadorozhnaya V., Idrisova R., Matveev V., Namazova L., Platonov A., Tatochenko V., Frolov A., Shamsheva O.* // Vopr. sovr. pediatr. 2006. V. 5. P. 6–11.]
23. *Platonov A.E., Griffiths U.K., Voeykova M.V., Platonova O.V., Shakhanina I.L., Chistyakova G.G., Robertson S.E.* // Vaccine. 2006. V. 24. P. 2367–2376. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.054
24. *Briere E.C., Jackson M., Shah S.G., Cohn A.C., Anderson R.D., MacNeil J.R., Coronado F.M., Mayer L.W., Clark T.A., Messonnier N.E.* // Pediatrics. 2012. V. 130. P. 414–420. https://doi.org/10.1542/peds.2012-0266
25. Measuring impact of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type *b* conjugate vaccination. WHO: WHO/IVB/12.08. World Health Organization, 2012. URL: https://apps.who.int/iris/handle/10665/75835 (accessed: 25.04.2020).
26. *Маркелова Н.Н., Хотько Н.И.* // Медицинские науки. 2013. Т. 1. С. 110–113.

27. *Zandvoort A., Timens W.* // Clin. Exp. Immunol. 2002. V. 130. P. 4–11. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01953.x
28. *Blanchard-Rohner G., Pollard A.J.* // Expert Rev. of Vaccines. 2011. V. 10. P. 673–684. https://doi.org/10.1586/erv.11.14
29. *Pérez-Melgosa M., Ochs H.D., Linsley P.S., Laman J.D., van Meurs M., Flavell R.A., Ernst R.K., Miller S.I., Wilson C.B.* // Eur. J. Immunol. 2001. V. 31. P. 2373–2381. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200108)31:8<2373::aid-immu2373>3.0.co;2-g
30. *Basha S., Surendran N., Pichichero M.* // Expert Rev. Clin. Immunol. 2014. V. 10. P. 1171–1184. https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.942288
31. *Langlet C., Tamoutounour S., Henri S., Luche H., Ardouin L., Grégoire C., Malissen B., Guilliams M.* // J. Immunol. 2012. V. 188. P. 1751–1760. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102744
32. *Zimmermann S., Lepenies B.* // Carbohydrate-Based Vaccines: Methods and Protocols / Ed. Lepenies B. New York, NY: Springer, 2015. P. 11–26.
33. *Haemophilus influenzae* type *b* (Hib): the green book, chapter 16. https://www.gov.uk/government/publications/haemophilus-influenzae-type-hib-the-green-book-chapter-16 (accessed: 26.04.2020).
34. *Озерецковский Н.А., Немировская Т.И.*: 1 (86) // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т. 15. С. 61–66. https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-1-61-66
35. HIBERIX® *Haemophilus influenzae* type *b* (Hib) conjugate vaccine (Tetanus Protein – Conjugate). Product monograph. 2019.
36. ActHib® *Haemophilus b* Conjugate Vaccine (Tetanus Protein – Conjugate). Product monograph. 2019.
37. *Micoli F., Adamo R., Costantino P.* // Molecules. 2018. V. 23. Article 1451. https://doi.org/10.3390/molecules23061451
38. *Avci F.Y., Li X., Tsuji M., Kasper D.L.* // Semin. Immunol. 2013. V. 25. P. 146–151. https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.05.005
39. *Jha V., Janoff E.N.* // Vaccines. 2019. V. 7. Article 18. https://doi.org/10.3390/vaccines7010018
40. *Kool M., Soullié T., van Nimwegen M., Willart M.A.M., Muskens F., Jung S., Hoogsteden H.C., Hammad H., Lambrecht B.N.* // J. Exp. Med. 2008. V. 205. P. 869–882. https://doi.org/10.1084/jem.20071087
41. *Marrack P., McKee A.S., Munks M.W.* // Nat. Rev. Immunol. 2009. V. 9. P. 287–293. https://doi.org/10.1038/nri2510
42. *Kanra G., Viviani S., Yurdakok K., Ozmert E., Anemona A., YalcIn S., Demiralp O., Bilgili N., Kara A., Cengiz A.B., Mutlu B., Baldini A., Marchetti E., Podda A.* // Pediatr. Int. 2003. V. 45. P. 314–318. https://doi.org/10.1046/j.1442-200X.2003.01706.x
43. *Mäkelä P.H., Peltola H., Käyhty H., Jousimies H., Pettay O., Ruoslahti E., Sivonen A., Renkonen O.-V.* // J. Infect. Dis. 1977. V. 136. P. S43–S50. https://doi.org/10.1093/infdis/136.Supplement.S43
44. *Peltola H., Käyhty H., Sivonen A., Mäkelä H.* // Pediatrics. 1977. V. 60. P. 730–737.
45. *Käyhty H., Peltola H., Karanko V., Mäkelä P.H.* // J. Infect. Dis. 1983. V. 147. Article 1100. https://doi.org/10.1093/infdis/147.6.1100
46. *Claesson B.A., Schneerson R., Robbins J.B., Johansson J., Lagergard T., Taranger J., Bryla D., Levi L., Cramton T., Trollfors B.* // Pediatrics. 1989. V. 114. P. 97–100. https://doi.org/10.1016/S0022-3476(89)80611-0
47. *McVernon J., Ramsay M.E., McLean A.R.* // Epidemiol. Infect. 2008. V. 136. P. 800–812. https://doi.org/10.1017/S0950268807009168
48. *McVernon J., Andrews N., Slack M.P.E., Ramsay M.E.* // Lancet. 2003. V. 361. P. 1521–1523. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13171-6
49. *McVernon J., Mitchison N.A., Moxon E.R.* // Lancet Infect. Dis. 2004. V. 4. P. 40–43. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00859-4
50. *Pichichero M.E., Voloshen T., Zajac D., Passador S.* // J. Infect. Dis. 1999. V. 180. P. 1390–1393. https://doi.org/10.1086/314989
51. *Lee Y.C., Kelly D.F., Yu L.-M., Slack M.P.E., Booy R., Heath P.T., Siegrist C.-A., Moxon R.E., Pollard A.J.* // Clin. Infect. Dis. 2008. V. 46. P. 186–192. https://doi.org/10.1086/524668
52. *Trotter C.L., McVernon J., Andrews N.J., Burrage M., Ramsay M.E.* // Lancet. 2003. V. 361. P. 1523–1524. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13172-8
53. *Anderson P.* // J. Infect. Dis. 1984. V. 149. P. 1034–1035. https://doi.org/10.1093/infdis/149.6.1034
54. *Rothstein E.P.* // Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 1991. V. 145. P. 898–900. https://doi.org/10.1001/archpedi.1991.02160080076024
55. *Barington T., Skettrup M., Juul L., Heilmann C.* // Infect. Immun. 1993. V. 61. P. 432–438. https://doi.org/10.1128/IAI.61.2.432-438.1993
56. *Robbins J.B.* // JAMA. 1996. V. 276. P. 1181–1185. https://doi.org/10.1001/jama.1996.03540140069031
57. *Käyhty H., Karanko V., Peltola H., Mäkelä P.H.* // Pediatrics. 1984. V. 74. P. 857–865.
58. *Takala A.K., Eskola J., Leinonen M., Käyhty H., Nissinen A., Pekkanen E., Mäkelä P.H.* // J. Infect. Dis. 1991. V. 164. P. 982–986. https://doi.org/10.1093/infdis/164.5.982
59. *Ward J.* // Vaccine. 1991. V. 9. P. S17–S24. https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90175-6
60. *Adams W.G., Deaver K.A., Cochi S.L., Plikaytis B.D., Zell E.R., Broome C.V., Wenger J.D.* // JAMA. 1993. V. 269. P. 221–226. https://doi.org/10.1002/cbic.201300785
61. *Black S.B., Shinefield H.R., Fireman B., Hiatt R., Polen M., Vittinghoff E.* // Pediatr. Infect. Dis. J. 1991. V. 10. P. 97–104. https://doi.org/10.1097/00006454-199102000-00004
62. *Goebel W.F.* // J. Exp. Med. 1936. V. 64. P. 29–38. https://doi.org/10.1084/jem.64.1.29
63. *Avery O.T., Goebel W.F.* // J. Exp. Med. 1929. V. 50. P. 533–550. https://doi.org/10.1084/jem.50.4.533

64. *Landsteiner K., van der Scheer J.* // J. Exp. Med. 1931. V. 54. P. 295–305.
65. *Schneerson R., Barrera O., Sutton A., Robbins J.B.* // J. Exp. Med. 1980. V. 152. P. 361–376. https://doi.org/10.1084/jem.152.2.361
66. *Anderson P., Pichichero M.E., Insel R.A.* // Pediatrics. 1985. V. 107. P. 346–351. https://doi.org/10.1016/S0022-3476(87)80237-8
67. *Zarei A.E., Almehdar H.A., Redwan E.M.* // J. Immunol. Res. 2016. V. 2016. Article 7203587. https://doi.org/10.1155/2016/7203587
68. *Colombo C., Pitirollo O., Lay L.* // Molecules. 2018. V. 23. Article 1712. https://doi.org/10.3390/molecules23071712
69. *Ravenscroft N., Costantino P., Talaga P., Rodriguez R., Egan W.* // Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control / Eds. Nunnally B.K., Sitrin R. D., Turula V.E. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2015. P. 301–381.
70. *Greenberg D.P., Vadheim C.M., Partridge S., Chang S.-J., Chiu C.-Y., Ward J.I.* // J. Infect. Dis. 1994. V. 170. P. 76–81. https://doi.org/10.1093/infdis/170.1.76
71. *Verez-Bencomo V., Fernández-Santana V., Hardy E., Toledo M.E., Rodríguez M.C., Heynngnezz L., Rodriguez A., Baly A., Herrera L., Izquierdo M., Villar A., Valdés Y., Cosme K., Deler M.L., Montane M., Garcia E., Ramos A., Aguilar A., Medina E., Toranō G., Sosa I., Hernandez I., Martínez R., Muzachio A., Carmenates A., Costa L., Cardoso F., Campa C., Diaz M., Roy R.* // Science. 2004. V. 305. P. 522–525. https://doi.org/10.1126/science.1095209
72. *Denoël P.A., Goldblatt D., de Vleeschauwer I., Jacquet J.-M., Pichichero M.E., Poolman J.T.* // Clin. Vaccine Immunol. 2007. V. 14. P. 1362–1369. https://doi.org/10.1128/CVI.00154-07
73. *Плоткин С.А., Лизе Й., Мадхи Ш.А., Ортис Е.* // Вопр. совр. педиатрии. 2012. Т. 11. С. 18–36. [*Plotkin S.A., Liese J., Madhi S.A., Ortiz E.* // Vopr. sovr. pediatr. 2012. V. 11. P. 18–36.] https://doi.org/10.1586/erv.11.72
74. *Guerra F.A., Blatter M.M., Greenberg D.P., Pichichero M., Noriega F.R., Pentacel Study Group* // Pediatrics. 2009. V. 123. P. 301–312. https://doi.org/10.1542/peds.2007-3317
75. *Lin T.Y., Wang Y.-H., Chang L.-Y., Huang Y.-C., Kao H.-T., Lin P.-Y., Lu H.-K., Chavand P., Ortiz E.* // Int. J. Infect. Dis. 2007. V. 11. P. 129–136. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.10.014
76. *Frampton J.E.* // Pediatr. Drugs. 2011. V. 13. P. 401–415. https://doi.org/10.2165/11608730
77. *Capeding M.R.Z., Alberto E., Versteilen A., Rauscher M., Bagchi P., de Palacios P.I.* // Int. J. Infect. Dis. 2016. V. 46. P. 71–78. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.015
78. *Reynolds D.L., Vidor E.* // Expert Rev. Vaccines. 2014. V. 13. P. 943–968. https://doi.org/10.1586/14760584.2014.933674
79. *Sharma H.J., Patil V.D., Lalwani S.K., Manglani M.V., Ravichandran L., Kapre S.V., Jadhav S.S., Parekh S.S., Ashtagi G., Malshe N., Palkar S., Wade M., Arunprasath T.K., Kumar D., Shewale S.D.* // Vaccine. 2012. V. 30. P. 510–516. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.067
80. *Minz S., Balraj V., Lalitha M., Murali N., Cherian T., Manoharan G., Kadirvan S., Joseph A., Steinhoff M.* // Indian J. Med. Res. 2008. V. 128. P. 57–64.
81. *Fitzwater S.P., Ramachandran P., Kahn G.D., Nedunchelian K., Suresh S., Santosham M., Chandran A.* // Vaccine. 2019. V. 37. P. 1608–1613. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.080
82. *von Gottberg A., de Gouveia L., Madhi S.A., du Plessis M., Quan V., Soma K., Huebner R., Flannery B., Schuchat A., Klugman K.* // Bull. World Health Organ. 2006. V. 84. P. 811–818. https://doi.org/10.2471/blt.06.030361
83. *Sow S.O., Tapia M.D., Diallo S., Keita M.M., Sylla M., Onwuchekwa U., Pasetti M.F., Kotloff K.L., Levine M.M.* // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009. V. 80. P. 1033–1038. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.1033
84. *Николаева А.М., Петровских В.П., Соснина О.Ю., Белякова О.В., Вязникова Т.В., Афанасьева Т.М.* // Биопрепараты. 2013. Т. 3. С. 41–44.
85. *Белякова О.В., Николаева А.М., Соснина О.Ю., Дрожжачих О.С.* // Пермский медицинский журнал. 2014. V. 31. P. 102–108.
86. *Фельдблюм И.В., Романенко В.В., Николаева А.М., Субботина К.А., Соснина О.Ю., Перминова О.А., Белякова О.В., Данилина Т.В., Ершов А.Е., Трофимов Д.М., Быкова Е.А., Мартиросян С.В., Анкудинова А.В.* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. Т. 2. С. 68–75. [*Feldblyum I.V., Romanenko V.V., Nikolaeva A.M., Subbotina K.A., Sosnina O.Yu., Perminova O.A., Belyakova O.V., Danilina T.V., Ershov A.E., Trofimov D.M., Bykova E.A., Martirosyan S.V., Ankudinova A.V.* // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2018. P. 68–75.]
87. *Bröker M., Costantino P., DeTora L., McIntosh E.D., Rappuoli R.* // Biologicals. 2011. V. 39. P. 195–204. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.05.004
88. *Decker M.D., Edwards K.M., Bradley R., Palmer P.* // Pediatrics. 1992. V. 120. P. 184–189. https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)80424-X
89. *Bröker M., Berti F., Schneider J., Vojtek I.* // Vaccine. 2017. V. 35. P. 3286–3294. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.078
90. *Donnelly J.J., Deck R.R., Liu M.A.* // J. Immunol. 1990. V. 145. P. 3071–3079.
91. *Vella P.P., Ellis R.W.* // Pediatr. Res. 1991. V. 29. P. 10–13. https://doi.org/10.1203/00006450-199101000-00003
92. *Peltola H., Eskola J., Käyhty H., Takala A.K., Mäkelä P.H.* // Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 1994. V. 148. P. 620–625. https://doi.org/10.1001/archpedi.1994.02170060074015
93. *Togashi T., Mitsuya N., Kogawara O., Sumino S., Takanami Y., Sugizaki K.* // Vaccine. 2016. V. 34. P. 4635–4641. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.050
94. *Akeda Y., Koizumi Y., Takanami Y., Sumino S., Hattori Y., Sugizaki K., Mitsuya N., Oishi K.* // Vaccine.

2018. V. 36. P. 1528–1532.
https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.011

95. *Costantino P., Rappuoli R., Berti F.* // Expert Opin. Drug Discov. 2011. V. 6. P. 1045–1066.
https://doi.org/10.1517/17460441.2011.609554

96. *Chu C., Schneerson R., Robbins J.B., Rastogi S.C.* // Infect. Immun. 1983. V. 40. P. 245–256.
https://doi.org/10.1128/IAI.40.1.245-256.1983

97. *Biemans R.L., Boutriau D., Capiau C., Denoël P.A., Duvivier P., Poolman J.T.* // Pat. US9358279B2, 2016. 36 pp.

98. *Gordon L.K.* Pat. US4496538A, 1985. 9 pp.

99. *Jones C.* // An. Acad. Bras. Ciênc. 2005. V. 77. P. 293–324.
https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000200009

100. *Fernandez Santana V., Peña Icart L., Beurret M., Costa L., Verez Bencomo V.* // Methods in Enzymology. Elsevier, 2006. V. 415. P. 153–163.

101. *Rodríguez Montero M.C., Ruíz García J.A., Valdés Balbín Y., Vérez Bencomo V.* // Drug Discovery / Eds. Jimenez-Barbero J., Canada F.J., Martin-Santamaria S. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015. P. 286–307.

102. *Tai J.Y., Vella P.P., McLean A.A., Woodhour A.F., McAleer W.J., Sha A., Dennis-Sykes C., Hilleman M.R.* // Exp. Biol. Med. 1987. V. 184. P. 154–161.
https://doi.org/10.3181/00379727-184-42460

103. *Hilleman M.R., Tai J.Y., Tolman R.L., Vella P.P.* // Pat. US4459286, 1984. 19 pp.

104. *Shafer D.E., Toll B., Schuman R.F., Nelson B.L., Mond J.J., Lees A.* // Vaccine. 2000. V. 18. P. 1273–1281.
https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00370-9

105. *Lees A., Nelson B.L., Mond J.J.* // Vaccine. 1996. V. 14. P. 190–198.
https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)00195-7

106. *Anderson P., Pichichero M.E., Insel R.A.* // J. Clin. Invest. 1985. V. 76. P. 52–59.
https://doi.org/10.1172/JCI111976

107. *Costantino P., Norelli F., Giannozzi A., D'Ascenzi S., Bartoloni A., Kaur S., Tang D., Seid R., Viti S., Paffetti R., Bigio M., Pennatini C., Averani G., Guarnieri V., Gallo E., Ravenscroft N., Lazzeroni C., Rappuoli R., Ceccarini C.* // Vaccine. 1999. V. 17. P. 1251–1263.
https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00348-X

108. *Marburg S., Jorn D., Tolman R.L., Arison B., McCauley J., Kniskern P.J., Hagopian A., Vella P.P.* // J. Am. Chem. Soc., 1986. V. 108. P. 5282–5287.
https://doi.org/10.1021/ja00277a037

109. *Anderson P.W., Pichichero M.E., Insel R.A., Betts R., Eby R., Smith D.H.* // J. Immunol. 1986. V. 137. P. 1181–1186.

110. *Anderson P., Pichichero M., Edwards K., Porch C.R., Insel R.* // Pediatrics. Elsevier, 1987. V. 111. P. 644–650.
https://doi.org/10.1016/S0022-3476(87)80237-8

111. *Laferriere C., Ravenscroft N., Wilson S., Combrink J., Gordon L., Petre J.* // Glycoconj. J. 2011. V. 28. P. 463–472.
https://doi.org/10.1007/s10719-011-9344-3

112. *Zon G., Robbins J.D.* // Carbohydr. Res. 1983. V. 114. P. 103–121.
https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88177-4

113. *Hoogerhout P., Evenberg D., van Boeckel C.A.A., Poolman J.T., Beuvery E.C., van der Marel G.A., van Boom J.H.* // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 1553–1556.
https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)81040-6

114. *Hoogerhout P., Funke C.W., Mellema J.-R., Wagenaars G.N., A. van Boeckel C.A., Evenberg D., Poolman J.T., Lefeber A.W.M., Van Der Marel G.A., Van Boom J.H.* // J. Carbohydr. Chem. 1988. V. 7. P. 399–416.
https://doi.org/10.1080/07328308808058933

115. *Peeters C.C., Evenberg D., Hoogerhout P., Käyhty H., Saarinen L., van Boeckel C.A., van der Marel G.A., van Boom J.H., Poolman J.T.* // Infect. Immun. 1992. V. 60. P. 1826–1833.

116. *Hermans J.P.G., Poot L., van der Marel G.A., Hoogerhout P., Kloosterman M., van Boom J.H., van Boeckel C.A.A., Evenberg D., Poolman J.T.* // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 2010. V. 106. P. 498–504.
https://doi.org/10.1002/recl.19871060905

117. *Elie C.J.J., Muntendam H.J., van den Elst H., van der Marel G.A., van Boom J.H., Hoogerhout P.* // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 2010. V. 108. P. 219–223.
https://doi.org/10.1002/recl.19891080604

118. *Chan L., Just G.* // Tetrahedron Lett. 1990. V. 46. P. 151–162.
https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)80414-1

119. *Kandil A.A., Chan N., Chong P., Klein M.* // Synlett. 1992. V. 1992. P. 555–557.
https://doi.org/10.1055/s-1992-21412

120. *Chong P., Hill R., Sia C., Klien M.* // Pat. US5679352, 1997. 59 pp.

121. *Nilsson S., Bengtsson M., Norberg T.* // J. Carbohydr. Chem. 1992. V. 11. P. 265–285.
https://doi.org/10.1080/07328309208017993

122. *Chiu Machado I., Madrazo Alonso O., Verez Bencomo V.* // J. Carbohydr. Chem. 1994. V. 13. P. 465–474.
https://doi.org/10.1080/07328309408009207

123. *Chiu-Machado I., Castro-Palomino J.C., Madrazo-Alonso O., Lopetegui-Palacios C., Verez-Bencomo V.* // J. Carbohydr. Chem. 1995. V. 14. P. 551–561.
https://doi.org/10.1080/07328309508005357

124. *Verez Bencomo V., Roy R.* // Pat. US6765091, 2004. 21 pp.

125. *Baek J.Y., Geissner A., Rathwell D.C.K., Meierhofer D., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // Chem. Sci. 2018. V. 9. P. 1279–1288.
https://doi.org/10.1039/C7SC04521B

126. *Evenberg D., Hoogerhout P., van Boeckel C.A.A., Rijkers G.T., Beuvery E.C., van Boom J.H., Poolman J.T.* // J. Infect. Dis. 1992. V. 165. P. S152–S155.
https://doi.org/10.1093/infdis/165-Supplement_1-S152

127. *Kandil A.A., Chan N., Klein M., Chong P.* // Glycoconj. J. 1997. V. 14. P. 13–17.
https://doi.org/10.1023/A:1018500712733

128. *Anderson P.W., Pichichero M.E., Stein E.C., Porcelli S., Betts R.F., Connuck D.M., Korones D., Insel R.A., Zahradnik J.M., Eby R.* // J. Immunol. 1989. V. 142. P. 2464–2468.

129. *Rana R., Dalal J., Singh D., Kumar N., Hanif S., Joshi N., Chhikara M.K.* // Vaccine. 2015. V. 33. P. 2646–2654. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.031

130. *Pillai S., Ciciriello S., Koster M., Eby R.* // Infect. Immun. 1991. V. 59. P. 4371–4376. https://doi.org/10.1128/IAI.59.12.4371-4376.1991

131. *Chong P., Chan N., Kandil A., Tripet B., James O., Yang Y.P., Shi S.P., Klein M.* // Infect. Immun. 1997. V. 65. P. 4918–4925. https://doi.org/10.1128/IAI.65.12.4918-4925.1997

132. *Seeberger P.H., Pereira C.L.* // Pat. US20190153015A1, 2019.

133. *Ribeiro G.S., Reis J.N., Cordeiro S.M., Lima J.B.T., Gouveia E.L., Petersen M., Salgado K., Silva H.R., Zanella R.C., Almeida S.C.G., Brandileone M.C., Reis M.G., Ko A.I.* // J. Infect. Dis. 2003. V. 187. P. 109–116. https://doi.org/10.1086/345863

134. *Boisvert A.-A., Moore D.* // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 2015. V. 26. P. 291–292. https://doi.org/10.1155/2015/613820

135. *Cox A., Barreto L., Ulanova M., Bruce M., Tsang R.* // Can. Commun. Dis. Rep. 2017. V. 43. P. 89–95. https://doi.org/10.14745/ccdr.v43i05a02

136. *Jin Z., Romero-Steiner S., Carlone G.M., Robbins J.B., Schneerson R.* // Infect. Immun. 2007. V. 75. P. 2650–2654. https://doi.org/10.1128/IAI.01774-06

137. *Akhmatova N.K., Kurbatova E.A., Akhmatov E.A., Egorova N.B., Logunov D.Yu., Gening M.L., Sukhova E.V., Yashunsky D.V., Tsvetkov Yu.E., Nifantiev N.E.* // Front. Immunol. 2016. V. 7. Article 248. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00248

138. *Kochetkov N.K., Nifant'ev N.E., Backinowsky L.V.* // Tetrahedron. 1987. V. 43. P. 3109–3121. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86852-6

139. *Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Akhmatova E.A., Egorova N.B., Yastrebova N.E., Sukhova E.V., Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Gening M.L., Nifantiev N.E.* // Front. Immunol. 2017. V. 8. Article 659. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00659

140. *Kaplonek P., Khan N., Reppe K., Schumann B., Emmadi M., Lisboa M.P., Xu F.-F., Calow A.D.J., Parameswarappa S.G., Witzenrath M., Pereira C.L., Seeberger P.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 13353–13358. https://doi.org/10.1073/pnas.1811862115

141. *Генинг М.Л., Курбатова Е.А., Нифантьев Н.Э.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 3–28. [*Gening M.L., Kurbatova E.A., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 1–24.] https://doi.org/10.31857/S0132342321010073

142. *Krylov V.B., Gerbst A.G., Argunov D.A., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Kaczynski Z., Huebner J., Holst O., Nifantiev N.E.* // Chem. Eur. J. 2015. V. 21. P. 1749–1754. https://doi.org/10.1002/chem.201405857

143. *Laverde D., Romero-Saavedra F., Argunov D.A., Enotarpi J., Krylov V.B., Kalfopoulou E., Martini C., Torelli R., van der Marel G.A., Sanguinetti M., Codée J.D.C., Nifantiev N.E., Huebner J.* // ACS Infect. Dis. 2020. V. 6. P. 1816–1826. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00063

144. *van der Put R.M.F., Kim T.H., Guerreiro C., Thouron F., Hoogerhout P., Sansonetti P.J., Westdijk J., Stork M., Phalipon A., Mulard L.A.* // Bioconjug. Chem. 2016. V. 27. P. 883–892. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00617

145. *Harale K.R., Dumare N.B., Singh D., Misra A.K., Chhikara M.K.* // RSC Adv., 2015. V. 5. P. 41332–41340. https://doi.org/10.1039/c5ra02993g

146. *Seeberger P.H., Pereira C.L., Khan N., Xiao G., Diago-Navarro E., Reppe K., Opitz B., Fries B.C., Witzenrath M.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2017. V. 56. P. 13973–13978. https://doi.org/10.1002/anie.201700964

147. *Verkhnyatskaya S.A., Krylov V.B., Nifantiev N.E.* // Eur. J. Org. Chem. 2017. V. 2017. P. 710–718. https://doi.org/10.1002/ejoc.201601413

148. *Argunov D.A., Trostianetskaia A.S., Krylov V.B., Kurbatova E.A., Nifantiev N.E.* // Eur. J. Org. Chem. 2019. V. 2019. P. 4226–4232. https://doi.org/10.1002/ejoc.201900389

149. *Oberli M.A., Hecht M.-L., Bindschädler P., Adibekian A., Adam T., Seeberger P.H.* // Chem. Biol. 2011. V. 18. P. 580–588. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.03.009

150. *Gening M., Tsvetkov Y., Titov D., Gerbst A., Yudina O., Grachev A., Shashkov A., Vidal S., Imberty A., Saha T., Kand D., Talukdar P., Pier G., Nifantiev N.* // Pure Appl. Chem. 2013. V. 85. P. 1879–1891. https://doi.org/10.1351/PAC-CON-12-09-06

151. *Gening M.L., Maira-Litrán T., Kropec A., Skurnik D., Grout M., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E., Pier G.B.* // Infect. Immun. 2010. V. 78. P. 764–772. https://doi.org/10.1128/IAI.01093-09

152. *Gening M.L., Tsvetkov Y.E., Pier G.B., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2007. V. 342. P. 567–575. https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.08.010

153. *Cywes-Bentley C., Skurnik D., Zaidi T., Roux D., DeOliveira R.B., Garrett W.S., Lu X., O'Malley J., Kinzel K., Zaidi T., Rey A., Perrin C., Fichorova R.N., Kayatani A.K.K., Maira-Litran T., Gening M.L., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E., Bakaletz L., Pelton S.I., Golenbock D., Pier G.B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. E2209–E2218. https://doi.org/10.1073/pnas.1303573110154

154. *Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2014. V. 384. P. 70–86. https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.11.016

155. *Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Beau R., Aimanianda V., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // Chem. Eur. J. 2015. V. 21. P. 1029–1035. https://doi.org/10.1002/chem.201404770

156. *Komarova B.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Chem. Rec. 2016. V. 16. P. 488–506. https://doi.org/10.1002/tcr.201500245

157. *Komarova B.K., Wong S.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Krylov V.B., Beauvais A., Bouchara J.-P., Kearney J., Aimanianda V., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // J. Org. Chem. 2018. V. 83. P. 12965–12976. https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01142

158. *Argunov D.A., Krylov V.B., Nifantiev N.E.* // Org. Biomol. Chem. 2015. V. 13. P. 3255–3267. https://doi.org/10.1039/c4ob02634a

159. *Paulovičová E., Paulovičová L., Hrubiško M., Krylov V.B., Argunov D.A., Nifantiev N.E.* // Front. Immunol. 2017. Article 1273. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01273

160. *Крылов В.Б., Петрук М.И., Григорьев И.В., Лебедин Ю.С., Глушко Н.И., Халдеева Е.В., Аргунов Д.А., Хатунцева Е.А., Топлишек М.В., Комарова Б.С., Карелин А.А., Юдина О.Н., Меньшов В.М., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э.* // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 80–89. [*Krylov V.B., Petruk M.I., Grigoryev I.V., Lebedin Y.S., Glushko N.I., Khaldeeva E.V., Argunov D.A., Khatuntseva E.A., Toplishek M.V., Komarova B.S., Karelin A.A., Yudina O.N., Menshov V.M., Yashunskii D.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 80–89.] https://doi.org/10.1134/S1068162017060073

161. *Krylov V.B., Argunov D.A., Solovev A.S., Petruk M.I., Gerbst A.G., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // Org. Biomol. Chem., 2018. V. 16. P. 1188–1199. https://doi.org/10.1039/c7ob02734f

162. *Wong S.S.W., Krylov V.B., Argunov D.A., Karelin A.A., Bouchara J.-P., Fontaine T., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // mSphere. 2020. V. 5. Article e5:e00688-19. https://doi.org/10.1128/mSphere.00688-19

163. *Mironov Y., Sherman A., Nifantiev N.* // Tetrahedron Lett. 2004. V. 45. P. 9107–9110. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.10.022

164. *Khatuntseva E.A., Sherman A.A., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Tetrahedron Lett. 2015. V. 57. P. 708–711. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.01.013

165. *Kazakova E.D., Yashunsky D.V., Krylov V.B., Bouchara J.-P., Cornet M., Valsecchi I., Fontaine T., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // J. Am. Chem. Soc. 2020. V. 142. P. 1175–1179. https://doi.org/10.1021/jacs.9b11703

166. *Карелин А.А., Цветков Ю.Е., Коган Г., Быстрицки С., Нифантьев Н.Э.* // Биоорган. химия. 2007. Т. 33. С. 119–130. [*Karelin A.A., Tsvetkov Yu.E., Kogan G., Bystricky S., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2007. V. 33. P. 110–121.] https://doi.org/10.1134/S106816200701013X

167. *Карелин А.А., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э.* // Успехи химии. 2017. Т. 86. С. 1073–1126. [*Karelin A.A., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Russ. Chem. Rev., 2017. V. 86. P. 1073–1126.] https://doi.org/10.1070/RCR4750

168. *Karelin A.A., Tsvetkov Y.E., Paulovičova L., Bystricky S., Paulovičova E., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2009. V. 344. P. 29–35. https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.09.016

169. *Paulovičová E., Paulovičová L., Pilišiová R., Jančinová V., Yashunsky D.V., Karelin A.A., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Cell. Microbiol. 2016. V. 18. P. 1294–1307. https://doi.org/10.1111/cmi.12631

170. *Bundle D.R., Nycholat C., Costello C., Rennie R., Lipinski T.* // ACS Chem. Biol. 2012. V. 7. P. 1754–1763. https://doi.org/10.1021/cb300345e

171. *Adamo R., Nilo A., Castagner B., Boutureira O., Berti F., Bernardes G.J.L.* // Chem. Sci. 2013. V. 4. P. 2995–3008. https://doi.org/10.1039/C3SC50862E

172. *Hu Q.-Y., Berti F., Adamo R.* // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. P. 1691–1719. https://doi.org/10.1039/c4cs00388h

173. *MacCalman T.E., Phillips-Jones M.K., Harding S.E.* // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2019. V. 35. P. 93–125. https://doi.org/10.1080/02648725.2019.1703614

174. *Брико Н.И., Попович Л.Д., Миндлина А.Я., Волкова О.И., Курилович Е.О.*// Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2020. Т. 19. С. 4–13. https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-1-4-13

Glycoconjugate Vaccines for Prevention of *Haemophilus influenzae* Type *b* Diseases

E. A. Khatuntseva* and N. E. Nifantiev*, #

#Phone/fax: +7 (499) 135-87-84; e-mail: nen@ioc.ac.ru

**N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 47, Moscow, 119991 Russia*

This review gives an overview of the laboratory and industrial preparation of glycoconjugate vaccines used to prevent infectious diseases caused by *Haemophilus influenzae* type *b* bacteria with the application of a linear capsular polysaccharide poly-3-β-*D*-ribosyl-(1→1)-*D*-ribitol-5-phosphate (PRP) or related synthetic oligosaccharide ligands. Special focus is given to synthetic methods for preparation of specified oligosaccharide derivatives and to the results of investigations aimed at the assessment of the correlation between their length and the immunogenic properties of their conjugates with carrier proteins.

Keywords: glycoconjugate vaccines, conjugation, synthesis, poly-3-β-D-ribosyl-(1→1)-D-ribitol-5-phosphate, PRP, Haemophilus influenzae type b, Hib

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 57–75

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 54.052:54.057

ЗАЩИТНЫЕ ГРУППЫ КАК СТЕРЕОКОНТРОЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР В РЕАКЦИЯХ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

© 2021 г. А. И. Токатлы*, Д. З. Винницкий*, Н. Е. Устюжанина*, Н. Э. Нифантьев*,#

**Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 47*

Поступила в редакцию 27.07.2020 г.
После доработки 11.08.2020 г.
Принята к публикации 12.08.2020 г.

Синтетические олигосахариды представляют интерес как модельные соединения для исследования биологической активности природных структур, а также как компоненты новых лекарственных препаратов, гликоконъюгатных вакцин, углеводных диагностикумов и других продуктов. Ключевым этапом синтеза олигосахаридов является реакция гликозилирования, приводящая к построению связи между углеводными остатками. Настоящий обзор посвящен актуальной проблеме современной гликохимии – методам стереоконтроля в реакции гликозилирования. В качестве стереоконтролирующих факторов рассмотрены защитные группы в структуре гликозил-доноров, способные влиять на механизм превращения тремя основными путями: 1) за счет соучастия или анхимерного содействия, 2) дезактивации аномерного центра, 3) предварительной пространственной координации гликозил-донора и гликозил-акцептора. Показан классический механизм соучастия защитной группы при O2 в синтезе 1,2-*транс*-гликозидов и его современные модификации, включающие активирующие простые эфирные и хиральные защитные группы, а также ахиральные бициклические гликозил-доноры. Подробно рассмотрены механизмы соучастия удаленных заместителей, расположенных при O3, O4 и O6 гликозил-донора. Помимо этого, представлены подходы к стереоконтролю с использованием дезактивирующей защиты: конформационно ограничивающих и электроноакцепторных групп. Наконец, рассмотрены синтетические подходы, основанные на предварительной координации гликозил-донора и гликозил-акцептора, включающие методы внутримолекулярного гликозилирования. Представлены как классические, так и новейшие защитные группы, применяемые для контроля стерического исхода гликозилирования, подробно рассмотрены механизмы, лежащие в основе представленных подходов, а также приведены примеры применения описанных стратегий в синтезе сложных олигосахаридных производных.

Ключевые слова: гликозилирование, стереоконтроль, защитные группы

DOI: 10.31857/S0132342321010255

ВВЕДЕНИЕ

Производные углеводов, которые из-за наличия в них гликозидной связи часто называют гликосоединениями, образуют один из четырех важнейших классов природных веществ (наряду с нуклеиновыми кислотами, белками и липидами), критически важных для протекания процессов жизнедеятельности практически у всех живых организмов [1]. Все известные клеточные формы жизни содержат в своих структурах олиго- и полисахариды, а также их конъюгаты с биополимерами и различными неуглеводными органическими соединениями [2]. Углеводные цепи входят в состав секретируемых и мембранных гликопротеинов и протеогликанов, а также таких важных компонентов клеточных мембран и межклеточного матрикса, как гликолипиды [3]. Хотя взаимосвязь структуры и функций углеводов изучается достаточно интенсивно и успешно на протяжении последних десятилетий, высокая разнородность и сложность строения в сочетании с минимальной эволюционной и межвидовой консервативностью значительно усложняют исследования в этой области [4]. Из-за сложности выделения природных гликосоединений в значимых количествах, необходимых для проведения испытаний, химический синтез их аналогов является перспективной альтернативой для получения молекулярных проб, применимых к изучению строения и биологической активности природных гликосоединений.

Центральной проблемой углеводного синтеза является стереонаправленное построение гликозидной связи между аномерным центром гликозил-донора и гликозил-акцептором, причем последний может быть представлен как углеводным соединением, так и неуглеводным, например, аминокислотой, полифенолом или другим функ-

Сокращения: ТИП – тесная ионная пара, СРИП – сольватно-разделенная ионная пара.

[#] Автор для связи: (тел./факс: +7 (499) 135-87-84; эл. почта: nen@ioc.ac.ru).

циональным производным. Продуктом данной реакции часто может быть не одно вещество, а несколько изомеров, отличающихся как местом присоединения гликозильного остатка к акцептору, так и конфигурацией новообразованной гликозидной связи [5].

При биосинтезе эта проблема решается с помощью специальных ферментов – гликозилтрансфераз, однозначно определяющих место присоединения и конфигурацию образующейся гликозидной связи. Таким образом, в природе данная реакция обычно проходит регио- и стереоспецифично. В случае же синтетических соединений решение проблем селективности является одной из базовых задач. И если региоспецифичность достигается оптимальной расстановкой защитных групп на нежелательных в реакции гидроксильных, амино- или иных реакционных фрагментах, то решение проблемы стереоспецифичности, или хотя бы стереоселективности, является гораздо более нетривиальной задачей. Для понимания возможных путей решения проблемы стереоконтроля рассмотрим обобщенный механизм реакции гликозилирования.

Ее начальным этапом является активация гликозил-донора (**I**) за счет взаимодействия с кислотой Льюиса (**A**) или иными агентами (схема 1). В результате после отщепления легко уходящей группы **LG** образуется карбокатион (**II**), который затем стабилизируется за счет формирования дополнительной связи между аномерным углеродом и эндоциклическим кислородом, что приводит к образованию более устойчивого катиона оксокарбения (**III**). Обычно в реакциях гликозилирования применяются активаторы с ненуклеофильным противоионом (трифлат, перхлорат и др.), который не конкурирует с относительно слабонуклеофильным гидроксилом гликозил-акцептора. Образующийся в результате активации гликозил-донора катион оксокарбения (**III**) доступен для нуклеофильной атаки по механизму S_N1 с двух сторон относительно плоскости пиранозного цикла с образованием двух возможных продуктов: α- и β-гликозидов [6].

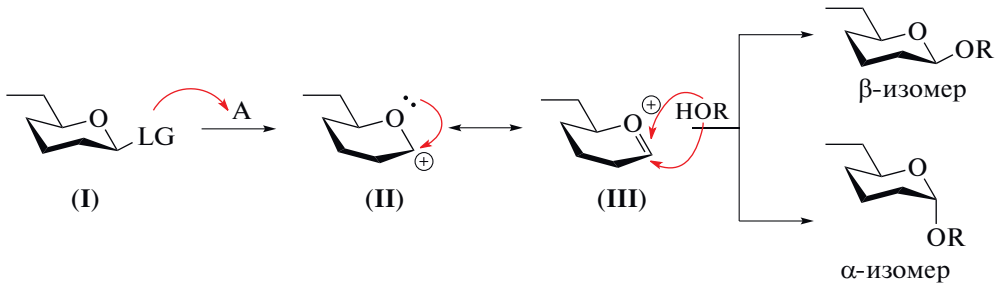


Схема 1. Общая схема протекания реакции гликозилирования. LG – уходящая группа, A — активатор, **(I)** – гликозил-донор, **(II)** – гликозил-катион, **(III)** – оксокарбениевый катион.

Реакция гликозилирования является сложным процессом, на протекание которого влияет множество факторов. Известно, что на стерический исход способны оказывать влияние растворитель, температура [7], концентрация реагентов [8], метод активации [9], а также химические, стерические и электронные свойства донора и акцептора. В настоящее время наиболее широко используются методы стереоконтроля, основанные на модификации гликозил-донора, в первую очередь за счет стратегического выбора защитных групп [10].

В рамках данного обзора мы ограничимся рассмотрением трех возможных путей, к которым можно отнести большинство методов стереоконтроля реакций гликозилирования посредством защитных групп: 1) соучастие защитных групп гликозил-донора (сопровождается блокированием нуклеофильной атаки с одной из сторон); 2) дезактивация аномерного центра (смещение механизма протекания реакции в сторону S_N2); 3) координация акцептора (пространственная предорганизация гликозил-акцептора с определенной стороны).

СОУЧАСТИЕ ЗАЩИТНЫХ ГРУПП ГЛИКОЗИЛ-ДОНОРА

Под соучастием защитных групп в реакции гликозилирования понимается внутримолекулярная стабилизация оксокарбениевого катиона (**III**) нуклеофильным фрагментом защитной группы. В результате указанного анхимерного содействия образуется бициклическая система, в которой одна из сторон пиранозного цикла становится недоступной для атаки гликозил-акцептора.

В зависимости от расположения соучаствующие группы подразделяют на “соседние” (neighboring participating groups – NPG), когда заместитель находится при O2, и “удаленные” (remote participating groups – RPG), когда заместитель находится при O3, O4 или O6. Кроме того, выделяют контроль реакции гликозилирования с помощью соучаствующих хиральных защитных групп. Далее каждый из видов соучастия будет рассмотрен более подробно.

Построение 1,2-*транс*-гликозидов с использованием соучаствующей защиты при O2. Исторически первым и наиболее подробно изученным ме-

ханизмом стереоконтроля реакции гликозилирования является соучастие ацильной защиты при O2. Так, еще в 1939 г. было отмечено, что взаимодействие полностью ацетилированного гликозилгалогенида с ацетатом серебра приводит к образованию исключительно 1,2-*транс*-гликозилацетата [11]. В качестве объяснения этого феномена в 1940 г. H.S. Isbell предложил механизм соучастия [12].

Отличительной особенностью данного механизма гликозилирования является нуклеофильная атака оксокарбениевого катиона (**IV**) карбонильным атомом кислорода ацильной защиты при O2 с образованием диоксолениевого (ацилоксониевого) иона (**V**) (схема 2). Последний намного более устойчив за счет наличия стабильного пятичленного цикла, и, в результате, равновесие практически полностью смещается в его сторону. Таким образом, для атаки нуклеофила более доступной становится *транс*-сторона, и, соответственно, предпочтительно образуется 1,2-*транс*-гликозид [6].

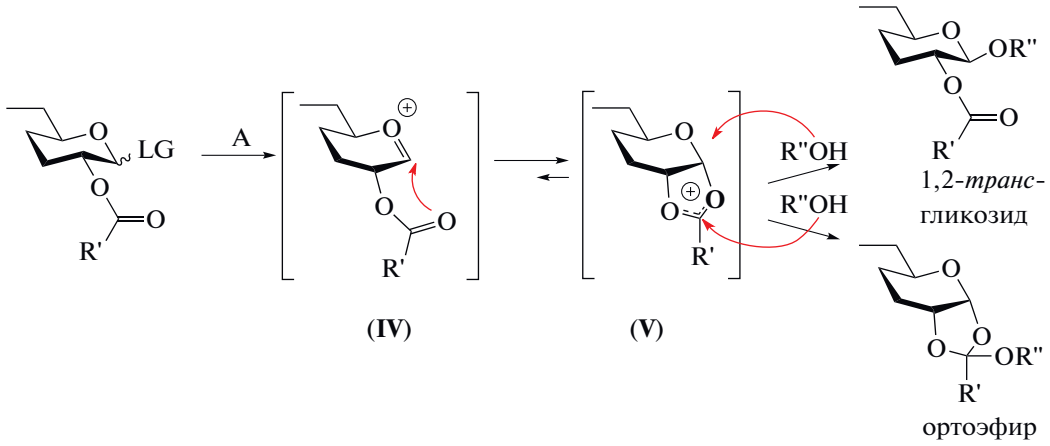


Схема 2. Образование 1,2-*транс*-гликозида и ортоэфира при соучастии 2-*O*-ацильной группы. LG – уходящая группа, A — активатор, (**IV**) – оксокарбениевый катион, (**V**) – диоксолениевый (ацилоксониевый) ион.

Благодаря относительной стабильности, диоксолениевый катион был зарегистрирован различными методами, такими как РСА [13], ЯМР [14], низкотемпературная ИК-спектроскопия [15]. Кроме того, стабилизация гликозил-катиона заместителем при O2 была подтверждена результатами теоретических расчетов [6].

В связи с относительной простотой и однозначностью, данный метод стереоконтроля на сегодняшний день является доминирующим подходом к получению 1,2-*транс*-гликозидов. Однако, несмотря на широкое применение, использование ацильных защит при O2 имеет ряд известных недостатков [16]. Во-первых, нуклеофильная атака ацилоксониевого катиона (**V**) акцептором может привести к образованию ортоэфира (схема 2). Ортоэфиры неустойчивы в кислой среде и, как правило, могут быть перегруппированы в целевой гликозид. Однако перегруппировка требует дополнительных синтетических действий, а иногда оказывается и вовсе невозможной [17]. Во-вторых, ацильные группы обладают электронно-акцепторными свойствами и, соответственно, снижают реакционную способность аномерного центра в гликозил-доноре (эффект дезактивации подробнее рассмотрен ниже в разделе “Регулирование реакционной способности гликозил-доноров”), что, особенно в сочетании с малоактивным акцептором, может привести к ингибированию гликозилирования, вплоть до невозможности осуществления реакции между данными субстратами. Наконец, большинство ацильных защит удаляется в относительно жестких основных условиях, что в ряде случаев препятствует реализации стратегии ортогональных манипуляций с защитными группами [16].

Для предотвращения образования ортоэфиров был разработан ряд ацильных защитных групп более сложного строения. Так, в 2005 г. H.E. Ensley et al. была предложена 4-ацетокси-2,2-диметилбутаноильная (ADMB) защита. Считается, что данная группа препятствует образованию ортоэфира за счет стерических эффектов, возникающих вследствие дополнительной циклизации [17]. Аналогичным эффектом обладает и предложенная в 2019 г. 2,2-диметил-2-(*o*-нитрофенил)-ацетильная группа (DMNPA) [18].

Полностью избежать нежелательных эффектов ацильной защиты при O2 позволяют разработанные в последнее время соучаствующие простые эфирные группы. Впервые такой подход был изучен группой А.В. Демченко в 2005 г. с использованием пиколильной (Pic) защиты. В данном случае внутримолекулярная нуклеофильная атака оксокарбениевого катиона (**VI**) осуществляется атомом азота пиколильной группы с образованием стабилизированного шестичленного циклического интермедиата (**VII**) (схема 3) [19].

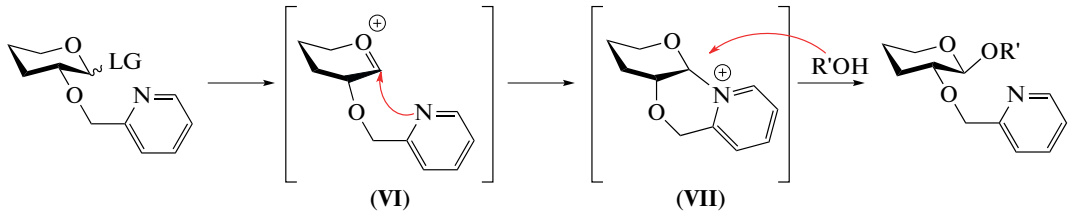


Схема 3. Образование 1,2-*транс*-гликозида при соучастии пиколильной группы при O2. LG – уходящая группа, **(VI)** – оксокарбениевый катион, **(VII)** – стабилизированный циклический интермедиат.

Впоследствии был разработан ряд альтернативных простых эфирных защитных групп, способных к соучастию с образованием 1,2-*транс*-гликозидов: *о*-нитробензильная (NBn) [20] и *о*-цианобензильная (CBn) [21], а также алкоксиметильные производные – метоксиметил (MOM), бензилоксиметил (BOM) и 2-нафтилметоксиметил (NAPOM) [22]. Все они не образуют ортоэфиров в качестве продуктов реакции гликозилирования и могут быть селективно удалены, когда это необходимо. Следует отметить, что рассмотренные в этом разделе защиты, альтернативные ацильным, не нашли заметного практического применения, и на сегодняшний день для построения 1,2-*транс*-гликозидов продолжают преимущественно использовать 2-*O*-ацилированные гликозил-доноры.

Стереоконтроль реакций гликозилирования с использованием хиральных защитных групп при O2 в гликозил-донорах. В то время как классический эффект соучастия 2-*O*-ацильных групп в гликозил-доноре в большинстве случаев решает проблему синтеза 1,2-*транс*-гликозидов, построение 1,2-*цис*-гликозидной связи является более сложной задачей. Исторически для этих целей использовались несоучаствующие группы при O2. Однако это приводило лишь к потере 1,2-*транс*-селективности, а не к 1,2-*цис*-стереонаправляющему эффекту. Достижение последнего осуществлялось посредством манипуляций с условиями реакции и попытками изменить электронные и стерические свойства гликозил-донора и гликозил-акцептора (см. следующий раздел), что, во-первых, являлось достаточно трудоемким процессом, зачастую значительно удлиняющим синтетическую схему, а во-вторых, требовало практически индивидуальной оптимизации условий в каждом отдельном случае.

Подход к использованию соучаствующей защиты при O2 для селективного получения 1,2-*цис*-гликозидов был впервые предложен в 2005 г. группой G.-J. Boons [23]. Предполагалось, что хиральная группа, несущая нуклеофильный фрагмент и объемный фенильный заместитель, в зависимости от конфигурации хирального центра, способна стабилизировать катион оксокарбения с селективным образованием *транс*- или *цис*-декалиновой системы (схема 4).

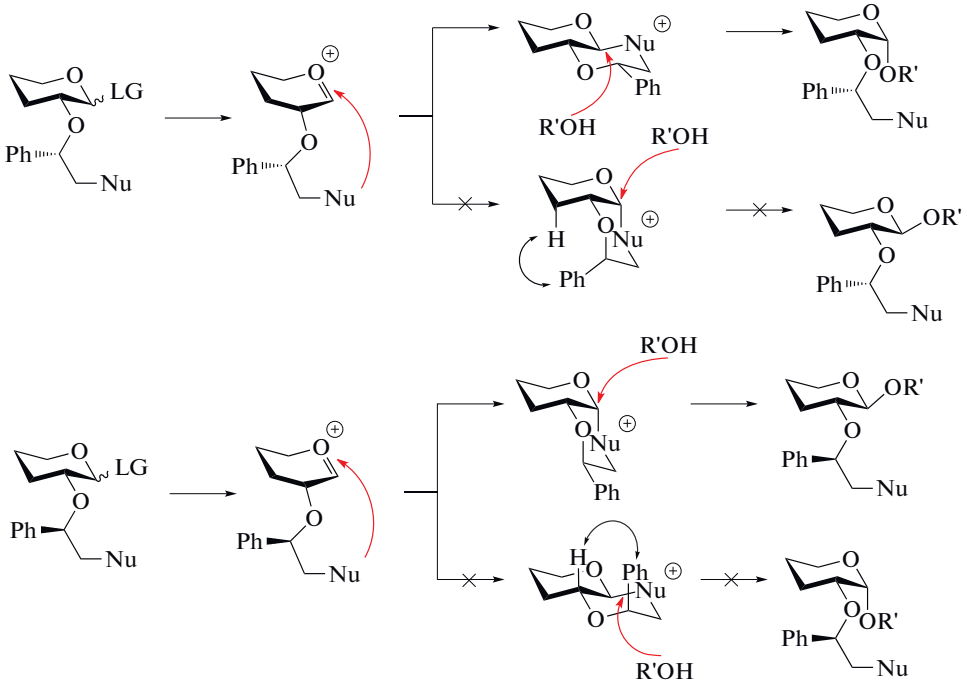


Схема 4. Стереоконтроль реакции гликозилирования с использованием хиральных защитных групп.

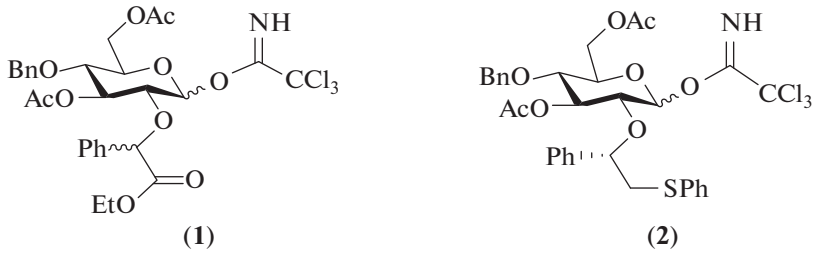


Рис. 1. Примеры гликозил-доноров, содержащих хиральные защитные группы при O2 [23, 24].

Первой разработкой в этой области стала защитная группа, полученная из этилового эфира миндальной кислоты, в которой в качестве нуклеофильного фрагмента выступал карбонильный атом кислорода. *S*-Изомер глюкозилтрихлорацетимидатного донора (**1**) проявлял высокую активность и 1,2-*цис*-селективность в реакциях гликозилирования с серией акцепторов (выход до 95%, соотношение *цис* : *транс* до 20 : 1) (рис. 1). В то же время *R*-изомер донора (**1**) оказался намного менее эффективным: максимально достигнутое соотношение *цис*- и *транс*-продуктов составило только 1 : 8 [23]. Такая разница в стереонаправляющем эффекте была объяснена меньшей устойчивостью *цис*-декалиновой системы в силу дестабилизирующих стерических эффектов [8].

Результаты вышеописанной работы послужили основой для разработки хиральных защитных групп второго поколения. При этом наиболее эффективной оказалась 1-*S*-фенил-2-фенилтиоэтильная группа, в которой в качестве нуклеофила выступает более активный атом серы (см. пример гликозил-донора (**2**) на рис. 1). Как и предполагалось авторами, усиление нуклеофильных свойств заместителя привело к достижению стереоспецифичности 1,2-*цис*-гликозилирования глюкозильными и галактозильными донорами. Кроме того, образование *транс*-декалинового сульфониевого интермедиата было подтверждено низкотемпературным экспериментом ЯМР *in situ* [24].

Основываясь на методах стереоконтроля при помощи хиральных групп, были предприняты попытки создания ахиральной защиты, также способной образовывать *транс*-декалиновый интермедиат. Таким образом предполагалось упростить синтез, т.к. не было бы необходимости получать оптически чистые хиральные доноры. Однако предложенная (2-тиофенил)-метильная группа проявила относительно низкую селективность: наилучшее соотношение 1,2-*цис*- и *транс*-гликозидов составило только 9 : 1 [25].

Более эффективным подходом является использование гликозил-доноров, в которых часть уходящей группы в аномерном положении одновременно является частью защиты при O2. Благодаря этому при активации донора сразу же образуется декалиновая стабилизированная система, и таким образом нет необходимости ее дополнительно генерировать *in situ* (схема 5). В 2010 г. был впервые разработан синтез оксотианового донора, при помощи которого осуществили стереоспецифичное глюкозилирование ряда гликозил-акцепторов с выходами до 62% [26].

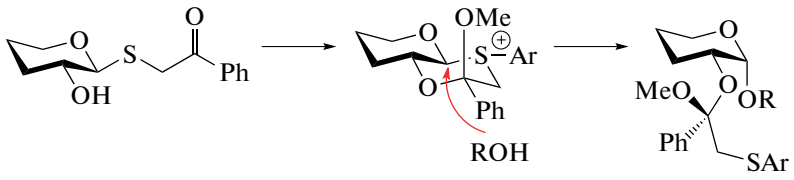


Схема 5. Гликозилирование оксотиановым донором.

Опираясь на вышеописанную работу, в 2012 г. были предложены бициклические доноры, содержащие сульфоксидный фрагмент при аномерном центре [27]. В реакциях гликозилирования в присутствии триметоксибензола подобного рода доноры обладают высокой 1,2-*цис*-селективностью при условии наличия дезактивирующих заместителей. При этом в процессе гликозилирования образуется арилированная триметоксифенилом хиральная группа при O2 донора, которая селективно удаляется воздействием трифторуксусной кислоты. Эффективность гликозил-доноров такого типа была продемонстрирована при селективном построении α-глюкозидных связей в процессе сборки тетрасахарида (**7**) – фрагмента полисахарида, выделенного из грибов вида *Pseudallescheria boydii* (схема 6) [27]. Так, с использованием тиогликозида (**3**) сначала был получен бициклический продукт (**4**), который переводили в сульфоксид (**5**), после чего последний вводили в реакцию гликозилирования с акцептором (**6**). В результате был получен α-связанный тетрасаха-

рид (**7**) с выходом 70%. Схожую стратегию использовали в синтезе гексасахаридного фрагмента гликозилфосфатидилинозитного якоря *Trypanosoma brucei* [28].

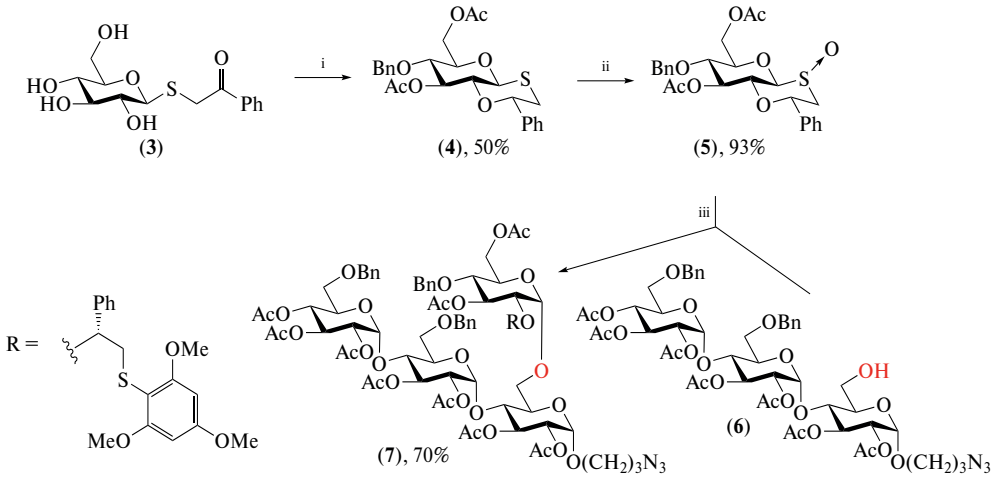


Схема 6. Олигосахаридный синтез с применением декалиновых доноров для построения 1,2-*цис*-гликозидной связи. (i) – 1) TMS_2O, TMSOTf, 0°C, 30 мин; 2) Et_3SiH, 3 ч; 3) $PhCH(OMe)_2$, CSA, пониж. давл., DMF, 50°C, 18 ч; 4) Ac_2O, Py; 5) Et_3SiH, $PhBCl_2$, –78°C; 6) Ac_2O, Py; (ii) метахлорнадбензойная кислота, CH_2Cl_2, –78°C; (iii) – 1) триметоксибензол, Tf_2O, 2,6-дитретбутил-4-метилпиридин, –10°C; 2) (**6**). Здесь и далее в процентах указан выход реакций.

Стереоконтролирующее соучастие удаленных защитных групп. Исходя из классического механизма соучастия из соседнего положения, можно предположить, что удаленные нуклеофильные группы также способны взаимодействовать с оксокарбениевым катионом. При реализации такого механизма, как и в классическом случае соучастия, вероятно, образуется бициклический интермедиат, атака которого нуклеофилом предпочтительна лишь с одной стороны. Таким образом, образующаяся гликозидная связь находится в *анти*-положении относительно соучаствующей группы. Исходя из этого можно ожидать, что при отсутствии соучаствующей группы при O2 ацильные защиты при O3 и O6 глюкозил-доноров, а также при O3, O4 и O6 галактозил-доноров будут обладать α-направляющим эффектом (схема 7). Возможность осуществления такого процесса позволяет использовать соучастие удаленных ацильных групп при планировании стереонаправленного построения 1,2-*цис*-гликозидных связей [29].

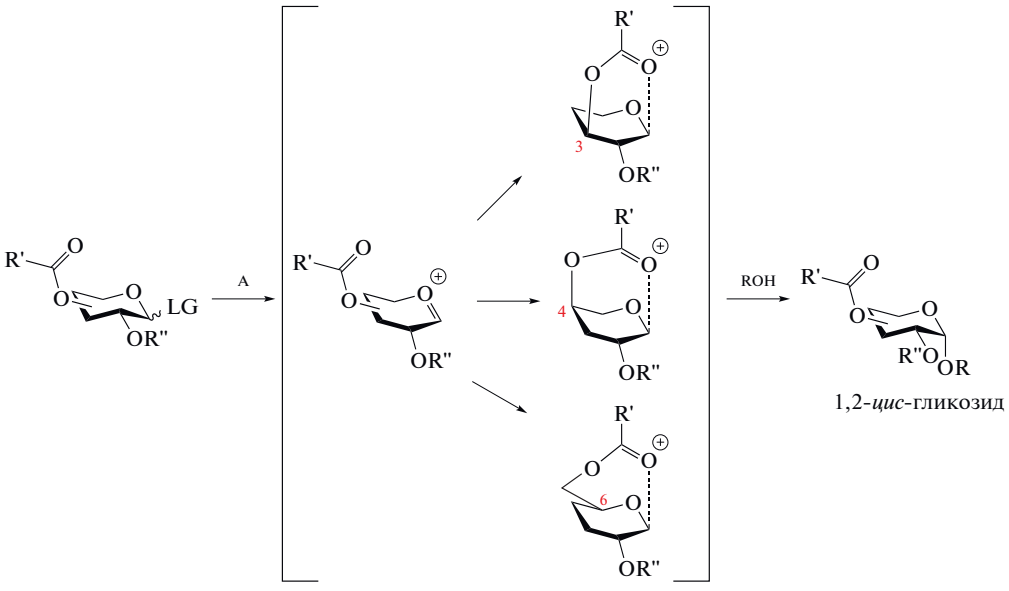


Схема 7. Стабилизация оксокарбениевого гликозил-катиона удаленными ацильными защитными группами. LG – уходящая группа, A – активатор.

Действительно, указанный подход показал отличные результаты при синтезе уже достаточно большого числа ранее труднодоступных олигосахаридов с 1,2-*цис*-гликозидными связями. В частности, 3,4-ди-*O*-ацилированные фукозил(6-дезоксигалактозил)-доноры были успешно использованы для стереоспецифичного построения α-связей в синтезе линейных [30–34] и разветвленных [35, 36] избирательно сульфатированных олигофукозидов, структурно родственных фукоиданам из бурых водорослей. Так, например, гликозилирование трихлорацетимидатом (**8**) гликозил-акцептора (**9**) приводило к образованию исключительно α-связанного тетрасахарида (**10**) (схема 8*а*).

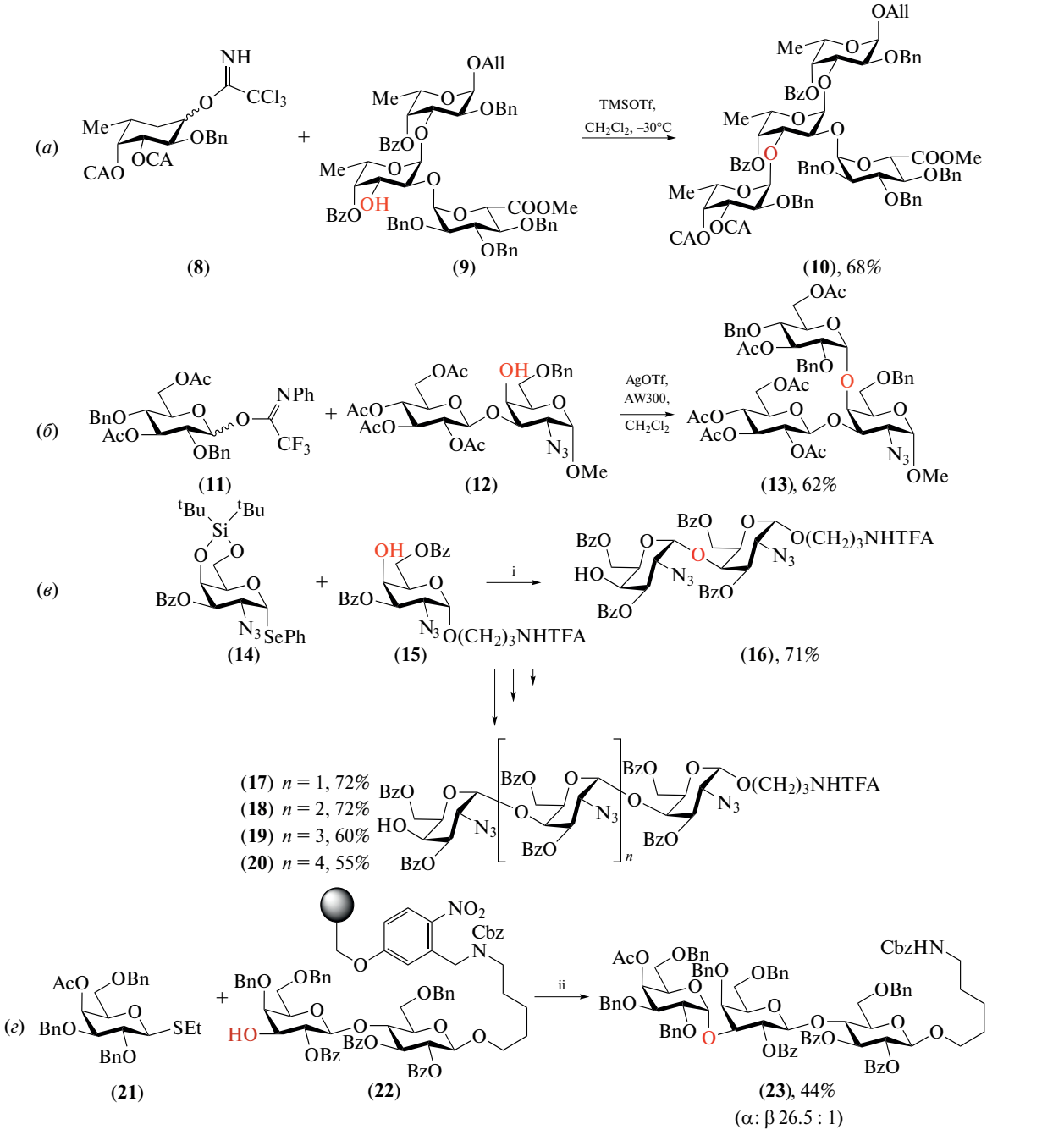


Схема 8. Примеры использования соучастия удаленных *O*-защитных ацильных групп в олигосахаридном синтезе. (i) – 1) Me_2S_2, MeOTf, MS 4 Å, CH_2Cl_2; 2) 40% aq. HF, Py; 3) BzCl, Py, 0°C; (ii) – 1) NIS, TfOH, CH_2Cl_2; 2) UV.

Глюкозил-доноры, содержащие ацильные заместители при O3 и O6, показали эффективность для селективного построения α-гликозидной связи в синтезе трисахаридного [37] и двух пентасахаридных фрагментов внешней области кора липополисахарида бактерии *Pseudomonas aeruginosa* [38, 39], а также для получения пентасахаридного фрагмента клеточной стенки *Aspergillus fumigatus* [40, 41] и (1→6)-α-связанных глюканов, характерных для ряда патогенных микроорганизмов [42]. Пример получения трисахаридного блока (**13**) из дисахарида (**12**) и 3,6-ди-*O*-ацетилированного *N*-фенил-трифторацетимидата (**11**) показан на схеме 8*б*.

Соучастие бензоильной группы при O3 в сочетании со стерически ограничивающей 4,6-*O*-ди-(*трет*-бутилсилиленовой) защитой 2-дезокси-2-азидогалактозного донора (**14**) привело к успешному получению олиго-α-галактозаминов (**16**–**20**) [43, 44] (схема 8*в*), в то время как соучаствующая защита при O4 галактозил-донора (**21**) способствовала эффективному образованию α-связанного олигосахарида (**23**) [45] (схема 8*г*). Соучастие 3-*O*-ацетильной группы в ксилозил-доноре было успешно использовано в синтезе ксилоолигосахаридов [46], структурно родственных олигосахаридным цепям рецептора Notch. Полученные олигосахариды были использованы при изучении двух ксилозилтрансфераз [47, 48], участвующих в биосинтезе данного гликопротеина.

Однако, несмотря на отличные результаты, полученные в вышеупомянутых работах, удаленное соучастие не является столь же универсальным подходом, как соучастие соседней группы при O2 [29]. Наряду с удачным применением удаленного соучастия, существует значительное количество примеров, когда ожидаемый стереонаправляющий эффект удаленных защитных групп на практике оказывался не столь велик, сильно зависел от конкретного донора и положения соучаствующей группы, а иногда и вовсе отсутствовал. Так, при использовании соучаствующей диэтилкарбомоильной группы при O6 глюкозного донора возможно достижение α-селективности [49], однако стереонаправляющий эффект данной защиты не сохраняется в случае галактозы. Оказывается, что соучаствующая группа при O6 галактозы имеет минимальный α-направляющий эффект [50], а в некоторых случаях даже повышает β-селективность по сравнению с несоучаствующей защитой [45]. Это может быть связано с конкурирующими типами внутримолекулярных взаимодействий между защитными группами, включая их пространственное расталкивание, влияющее на предпочтительную конформацию пиранозного кольца в гликозил-доноре [51].

Одним из методов решения проблемы недостаточного стереоконтролирующего влияния удаленной соучаствующей защиты может быть увеличение числа соучаствующих защитных групп в одном моносахаридном остатке. В частности, было показано, что в случае гликозилирования *N*-фенил-трифторацетимидатным глюкозным донором сочетание ацетильной защиты при O3 и O6 приводит к наилучшему выходу и селективности реакции по сравнению с моноацетилированными донорами [37]. В то же время увеличение количества *O*-ацильных групп в соответствующих положениях далеко не всегда способствует повышению селективности. Авторы вышеупомянутой работы [37] провели систематическое исследование моно- и диацетилированных доноров по O3 и O6 с серией акцепторов и установили, что в то время как диацетилированный донор приводит к максимальной α-селективности в реакции с первичным гидроксилом акцептора, в случае гликозилирования вторичного гидроксила оптимальный результат достигается при использовании соучаствующей защиты только при O6 [52].

Как видно из приведенных примеров, эффект соучастия удаленных групп иногда может оказаться нереализуемым. Для успешного применения синтетической стратегии, основанной на удаленном соучастии, зачастую необходима комбинация стереоконтролирующих удаленных защитных групп с другими инструментами, способными оказывать влияние на стереохимический исход реакции, такими как растворитель или температура. Именно их грамотное сочетание способно дать необходимый результат.

Ввиду столь нерегулярных, а иногда и противоречивых свидетельств стереоконтроля с помощью удаленных соучаствующих групп, сама его возможность долгое время оставалась дискуссионным вопросом, а отсутствие надежно зафиксированного интермедиата – ацилоксониевого иона, а также конкурирующего продукта реакции – ортоэфира, ставших надежными доказательствами соучастия из соседнего положения, вызывало лишь дополнительные сомнения. Однако в последние десятилетия был осуществлен ряд серьезных исследований, направленных на подробное изучение и доказательство существования механизма стереоконтролирующего соучастия удаленных *O*-ацильных групп в реакциях гликозилирования.

Систематическое исследование механизма соучастия удаленных *O*-ацильных заместителей было выполнено D. Crich et al. в 2008 г. В рамках данной работы был осуществлен эксперимент, направленный на получение стабильных бициклических продуктов взаимодействия удаленной *трет*-бутоксикарбонильной (Boc) защиты с аномерным центром (схема 9*а*). Таким образом предполагалось доказать способность удаленных карбонильных групп к соучастию. Как и ожидалось, бициклические продукты были получены для 2-*O*-Boc-защищенных доноров. Из удаленных положений были исследованы гликозил-доноры, содержащие ацильные заместители при O3 аллозы, O3 и O4 маннозы, O6 глюкозы и O4 галактозы, однако бициклический продукт (**25**) был получен лишь в первом случае [53]. Та-

ким образом, была подтверждена способность к соучастию аксиально расположенной защиты при O3 для аллозы, однако остальные положения оставались под вопросом.

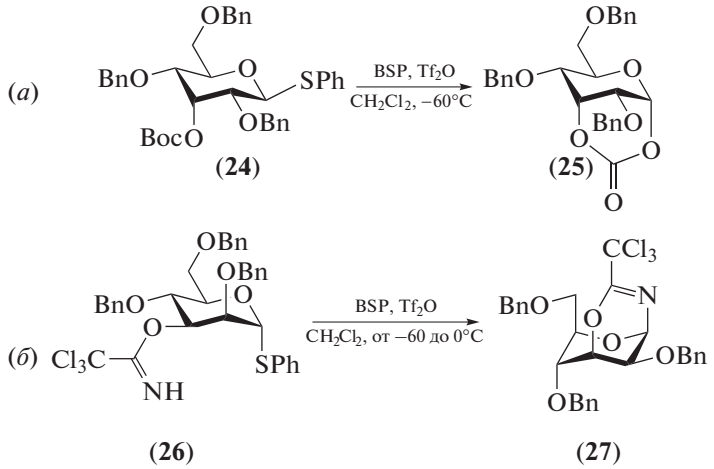


Схема 9. Бициклические продукты анхимерного содействия защитной группы при O3.

В 2009 г. исследование влияния ацильных заместителей на стерический результат гликозилирования было осуществлено группой K.S. Kim с использованием в качестве соучаствующей нуклеофильной группы трихлорацетимидатоила при O3, O4 и O6 маннозного донора. Стабильный бициклический продукт (**27**) был получен в случае защиты при O3 (схема 9*б*). Этот результат совпадает с экспериментально наблюдаемым α-направляющим влиянием *O*-ацильной защиты при O3 маннозы в реакции гликозилирования [54].

Наконец, в 2020 г. были опубликованы данные, подтверждающие способность к соучастию ацетильной группы при O4 галактозы. Эксперимент заключался в генерации гликозил-катионов физическими методами фрагментации и получении их низкотемпературных ИК-спектров. Полученные спектры подтверждают образование диоксолениевого катиона посредством взаимодействия карбонильного кислорода ацетильной группы при O4 с аномерным центром [55].

Возможность осуществления удаленного соучастия также подтверждается теоретическими работами, основанными как на полуэмпирических методах, так и на расчетах *ab initio*. Наиболее изученными в этом плане являются фукозильные доноры – бромиды и трихлорацетимидаты. В рамках серии работ были изучены моно- и диацилированные (бензоилированные, ацетилированные и хлорацетилированные) фукопиранозиды и даже несколько фукофуранозидов. Полученные в результате расчетов несколькими различными методами значения энергии стабилизации образующихся диоксолениевых ионов прекрасно коррелируют как между собой, так и с экспериментально полученными в реакциях гликозилирования соотношениями α- и β-изомерных продуктов [56, 57].

Еще одним примером комплексного исследования, сочетающего экспериментальные и теоретические методы, является вышедшая совсем недавно совместная работа групп J.D.C. Codée и T.J. Boltje [58]. В ней использованы ИК-ионная спектроскопия (IRIS), расчеты методом DFT и серия модельных реакций гликозилирования. На примере широкой серии 3-*O*-, 4-*O*- и 6-*O*-моноацетилированных производных глюкозы, галактозы и маннозы авторам удалось показать степень влияния удаленного соучастия для различных доноров. Например, показано, что удаленное соучастие может быть использовано в случае 3-*O*-ацилированных маннозил-доноров и в несколько меньшей степени в случае 4-*O*-ацилированных галактозил-доноров. Показано также, что соучастие 3-*O*-ацильных групп в глюкозных и галактозных производных оказывает относительно слабое влияние на стереохимический результат гликозилирования, в то время как значимого влияния соучастия 6-*O*-ацильной группы зафиксировано не было. Предложенный авторами подход представляется перспективным как для более подробного изучения удаленного соучастия, так и для надежного предсказания стереохимического результата реакции. Однако полученные результаты находятся в противоречии с опубликованными и рассмотренными выше экспериментальными данными, например, о стереоконтролирующем эффекте 6-*O*-ацильных заместителей [29, 52].

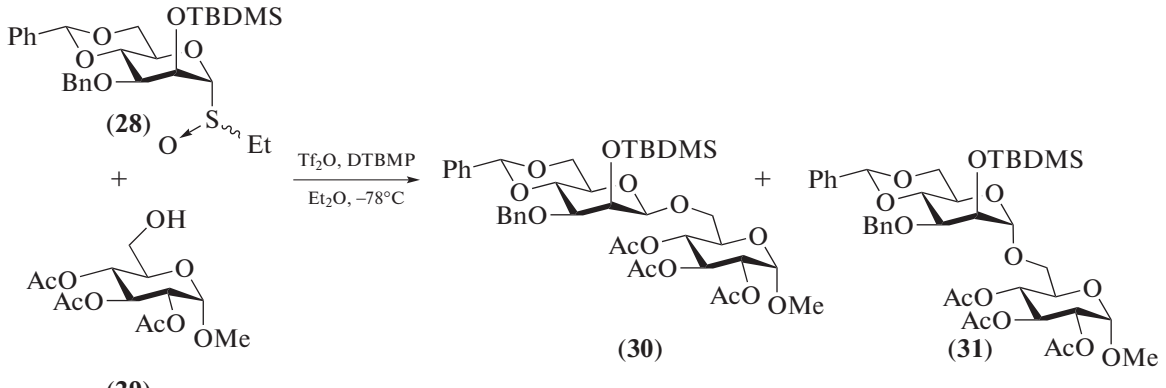
Таким образом, в то время как стереонаправляющее соучастие ацильной защиты при O2 является подробно изученным синтетическим подходом с подтвержденным механизмом, соучастие удаленных *O*-ацильных групп (при O3, O4 и O6) пока только всесторонне исследуется. И хотя работы последних лет не оставляют сомнений в принципиальной возможности реализации данного механизма, на практике, в отличие от классического соучастия групп при O2, удаленное со-

участие не является универсальным подходом. Тем не менее большое количество успешно проведенных синтезов показывает, что при должной проработке и применении сопутствующих инструментов стереоконтроля удаленное соучастие является основным, а в некоторых случаях и единственно возможным подходом при синтезе 1,2-*цис*-гликозидов, который есть в арсенале химии углеводов на сегодняшний день.

РЕГУЛИРОВАНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ГЛИКОЗИЛ-ДОНОРОВ

Защитные группы способны оказывать значительное влияние на стерические и электронные свойства гликозил-донора и гликозил-акцептора, а также на интермедиаты и продукты реакции гликозилирования. При этом некоторые классы защитных групп затрудняют образование карбокатиона и, соответственно, снижают реакционную способность гликозил-донора. Впервые дезактивирующее действие защитных групп было установлено B. Fraser-Reid: экспериментально показано, что сложноэфирные группы снижают активность донора по сравнению с простыми эфирами [59]. Этот принцип нашел широкое применение в различных подходах к контролю реакций гликозилирования. С одной стороны, возможна селективная активация ряда гликозил-доноров и осуществление серии последовательных реакций гликозилирования без выделения промежуточных продуктов [60]. С другой стороны, затруднение диссоциации уходящей группы может послужить методом стереоконтроля реакции, приближая механизм замещения к бимолекулярному S_N2 [61]. При этом, в зависимости от целевого стереохимического исхода реакции, решающим этапом в процессе гликозилирования может быть предактивация, которая проводится перед добавлением гликозил-акцептора в реакционную смесь. Для построения аксиально расположенной гликозидной связи, как правило, нет необходимости в предактивации, поскольку аномерный эффект и так способствует образованию продукта с аксиальным заместителем в аномерном положении. Но в случаях, когда формирование аксиального продукта нежелательно, предактивация позволяет изменить путь протекания реакции и достигнуть альтернативного стерического результата [9]. Некоторые работы в этой области рассмотрены ниже.

Использование конформационно-ограничивающих защитных групп для изменения реакционной способности гликозил-доноров. Впервые о возможности влияния на стереохимический результат реакции гликозилирования посредством конформационно-ограничивающих защитных групп стало известно в конце 90-х гг., когда метод гликозилирования с использованием сульфоксидных доноров, предложенный D. Kahne в 1989 г. [61], был применен группой D. Crich в работе с маннозными донорами [61]. В ходе исследований было обнаружено, что при изменении порядка добавления реагентов в реакции между соединением (**28**) и акцептором (**29**) происходит обращение стереоселективности с преимущественным образованием β-маннозида (**30**) в случае, когда активация донора трифторметансульфоновым ангидридом предваряет добавление акцептора (схема 10). Данное наблюдение быстро нашло применение для получения β-маннозидов, синтез которых до этого был затруднен.



(**28**) + (**29**) + DTBMP, затем Tf_2O, (**30**) : (**31**) = 6 : 58

(**28**) + DTBMP + Tf_2O, затем (**29**), (**30**) : (**31**) = 85 : 8

Схема 10. Обращение стереохимического результата реакции маннозилирования при изменении порядка добавления реагентов. DTBMP – 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилпиридин.

В результате дальнейших исследований данной реакции группой D. Crich было предложено объяснение наблюдаемого эффекта. При предактивации гликозил-донора образующийся оксокарбениевый катион атакуется трифлат-анионом с образованием устойчивого α-гликозил-трифлата (схема 11). При этом в случае моноциклической системы (на примере 4,6-ди-*O*-бензильного

маннозида) данный ковалентно-связанный трифлат находится в равновесии с тесной ионной парой (ТИП), образующейся из него при разрыве связи между аномерным углеродом и трифлатом, и сольватно-разделенной ионной парой (СРИП), образующейся, в свою очередь, из ТИП. Добавляемый затем акцептор атакует в первую очередь наиболее реакционноспособную сольватно-разделенную пару, при этом атака возможна с обеих сторон. В результате такой реакции образуется в основном наиболее выгодный продукт с α-гликозидной связью, что полностью согласуется с образованием α-трифлата на первом этапе. В случае бициклической декалиновой системы (например, наличия 4,6-*O*-бензилиденовой защиты в структуре донора) равновесие между ковалентным трифлатом, ТИП и СРИП сильно смещается в сторону первого. Таким образом, атака акцептором происходит только со свободной стороны по S_N2-механизму с образованием β-маннозида.

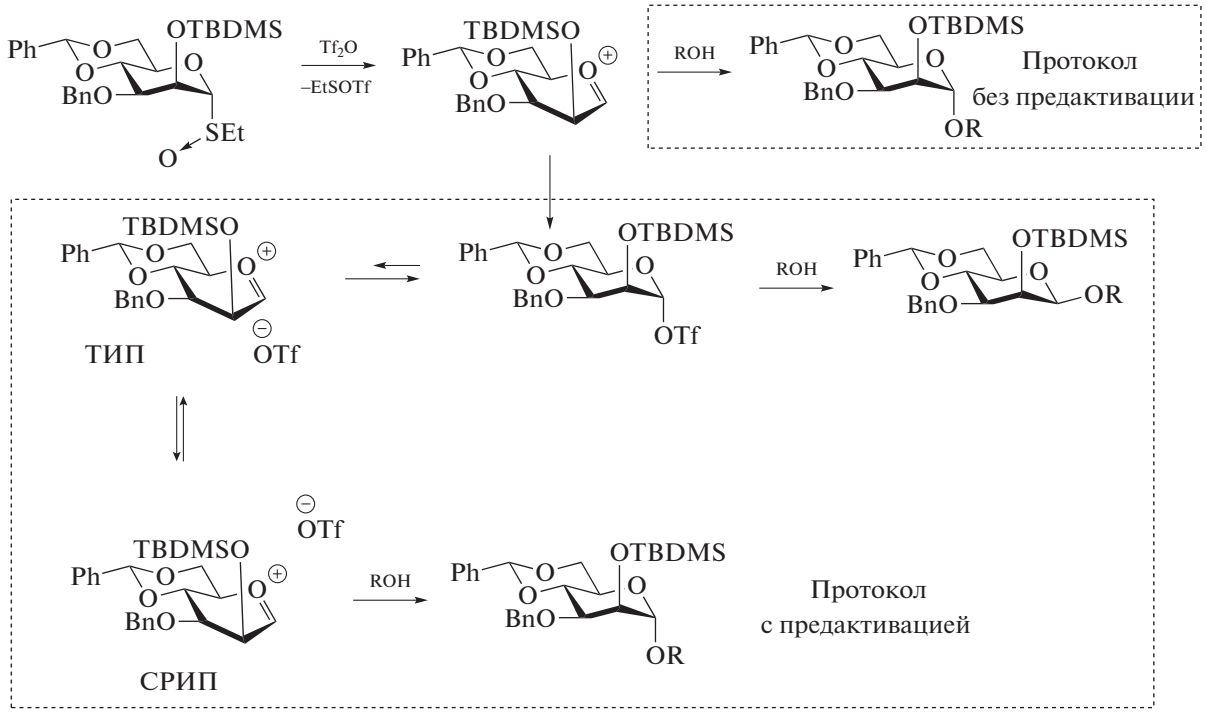


Схема 11. Предложенный механизм образования α- и β-маннозидов.

В том случае, когда перед активацией в реакционной смеси присутствует акцептор, последний перехватывает образующийся на начальном этапе активации оксокарбениевый катион до того, как он будет атакован трифлат-анионом. Таким образом, ковалентный трифлат не образуется, и реакция протекает по S_N1-механизму с образованием более выгодного α-маннозидного продукта.

Наличие ковалентно-связанного трифлата как ключевого интермедиата реакции в случае предварительной активации донора было подтверждено ЯМР-экспериментами *in situ*, в результате которых был описан ряд таких трифлатов, полученных как из исходных сульфоксидов, так и из соответствующих бромидов. Возможность существования в качестве основного интермедиата ТИП или СРИП была отвергнута по характерным химическим сдвигам сигналов аномерных углеродов.

Таким образом, воздействие, оказываемое бензилиденовой группой на стереохимический результат реакции, заключается в смещении равновесия между интермедиатами – ковалентно связанным трифлатом, ТИП и СРИП в сторону первого, что, в свою очередь, оказывает влияние на основной реализуемый в рамках реакции механизм – S_N2 либо S_N1. Суть данного эффекта связана с проявляемой бензилиденовой защитой торсионной дезактивацией – увеличением активационного барьера изменения конформации циклогексанового кольца из классического “кресла” за счет препятствования “уплощению” цикла, необходимого для образования оксокарбениевого иона. Впервые данный эффект был показан группой B. Fraser-Reid на примере гидролиза *н*-пентенилглюкозидов [63], а впоследствии подтвержден H.H. Jensen при исследовании скорости диссоциации уходящей группы ряда маннозил-доноров. Было установлено, что 4,6-*O*-бензилиденовая защита способствует меньшей склонности к диссоциации по сравнению с нециклическими формами [64].

Недавние исследования привели к некоторому усложнению трактовки рассмотренного механизма [65]. Во-первых, было обнаружено, что в тех же условиях глюкозильный донор проявляет, наоборот, α-селективность, хотя продолжает наблюдаться образование α-трифлата; во-вторых, исследования кинетического изотопного эффекта в реакции маннозилирования противоречат осуществлению механизма S_N2 в чистом виде.

Эти противоречия могут быть объяснены, если учесть, что свойства гликозил-донора способны смещать равновесие переходного состояния от СРИП к ТИП и ковалентному трифлату. Так, в настоящее время предполагается, что соединением, которое, собственно, подвергается атаке гликозил-акцептора, является ТИП, источником для генерации которой служит α-трифлат. Таким образом, трифлат-анион продолжает закрывать для атаки α-сторону аномерного центра, но реакция протекает по мономолекулярному механизму, что лучше согласуется с данными по исследованиям кинетического изотопного эффекта. В случае глюкозил-доноров предполагается, что гликозилирование акцептора осуществляется сольватированной ионной парой, и α-селективность объясняется аномерным эффектом [9]. Это различие аномерной селективности между глюкозильным и маннозильным донорами может быть объяснено конфигурацией хирального центра при C2. Так, изменение диэдрального угла (O2–C2)–(C3–O3) делает глюкозный катион оксокарбения более устойчивым за счет выгодного расположения диполя C2–O2 относительно оксокарбениевого фрагмента по сравнению с возможным маннозным катионом. Именно за счет этого и происходит смещение равновесия промежуточного состояния дальше от α-трифлата [65].

Впервые стереонаправляющий эффект 4,6-*O*-ацетальной защиты был обнаружен в реакции β-маннозилирования α-сульфоксидным донором с бензилиденовой защитой при активации трифторметансульфоновым ангидридом, однако с тех пор круг субстратов, в которых возможны подобные эффекты, был расширен. Помимо введения в данную реакцию глюкозидов и галактозидов, хорошие результаты были получены и с использованием иных циклических защит, образующих шестичленный цикл с O4 и O6, например, фенилборонатной [66] и ди-*трет*-бутилсилиленовой [67].

Последующие исследования структурных факторов, влияющих на реакционную способность гликозил-доноров, показали, что помимо сульфоксидной уходящей группы возможно использование тиогликозидов, причем активация может осуществляться трифторметансульфокислотой в присутствии *N*-иодсукцинимида [68]. Также были успешно использованы трихлорацетимидатные [69], пентенилгликозидные [70] и гликозилфосфатные [71] доноры в сочетании с подходящими трифторметилсульфонатными активаторами. В то же время классическое β-маннозилирование бензилиден-защищенными сульфоксидными донорами, предложенное D. Crich, в настоящее время успешно применяется в олигосахаридном синтезе. Так, в 2016 г. была синтезирована серия олигосахаридов, родственных фрагментам β-маннанов клеточной стенки патогенного гриба *Candida albicans*, с использованием как сульфоксидных, так и тиогликозидных доноров [72]. Пример синтеза пентасахаридного производного (**34**) представлен на схеме 12.

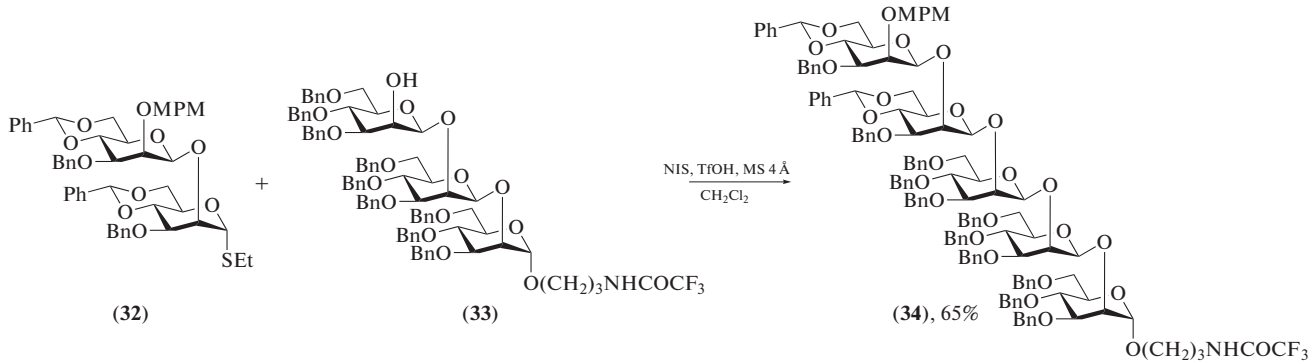
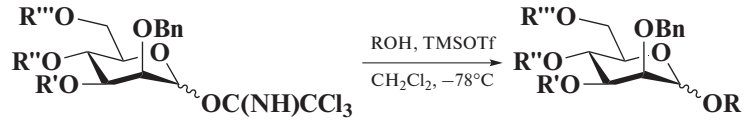


Схема 12. Синтез β-маннозида (**34**) с использованием гликозил-донора (**32**), содержащего 4,6-*O*-бензилиденовую защиту.

Влияние электроноакцепторных заместителей на реакционную способность гликозил-доноров. В процессе исследования дезактивирующего и стереонаправляющего действия 4,6-*O*-бензилиденовой защиты в реакции маннозилирования группой D. Crich также было изучено действие электроноакцепторных заместителей на результат реакции. Авторы предполагали, что электроноакцепторные группы, аналогично конформационно-ограничивающим, будут способствовать повышению энергетического барьера образования катиона оксокарбения и, соответственно, образованию β-маннозидов в условиях предактивации. Действительно, исследование реакции гликозилирования с серией 6-фторзамещенных рамнозных (6-дезоксиманнозных) доноров показало, что

Таблица 1. Влияние *O*-бензилсульфонильной защитной группы на стереохимический результат маннозилирования гликозил-донорами (**35**–**38**)



Номер соединения	Варьируемые защитные группы			β : α
	R'	R''	R'''	
(**35**)	Bn	Bn	Bn	1 : 2.7
(**36**)	SO_2Bn	Bn	Bn	15.9 : 1
(**37**)	Bn	SO_2Bn	Bn	10.7 : 1
(**38**)	Bn	Bn	SO_2Bn	13.8 : 1

β-селективность увеличивалась вместе с количеством атомов фтора [73].

В 2009 г. было проведено систематическое исследование влияния удаленных электроноакцепторных заместителей на стерический исход маннозилирования. В качестве контроля использовали полностью *O*-бензилированный маннозилтрихлорацетимидат (**35**), а также его аналоги с систематически замененными бензильными защитами при O3, O4, и O6 на серию электроноакцепторных сложноэфирных защит (табл. 1). Было установлено, что β-селективность возрастает с усилением электроноакцепторных свойств заместителя – самый сильный β-направляющий эффект проявила бензилсульфонильная (SO_2Bn) группа (доноры (**36**–**38**)). При этом порядок возрастания селективности в ряду изменявшихся защит в целом сохранялся независимо от положения рассматриваемой группы в углеводном кольце. Это позволяло исключить стерический фактор как определяющий эффект стереохимического исхода реакции. Кроме этого, в ходе проведенного исследования были подтверждены образование ковалентных α-трифлатов и повышенная устойчивость трифлата при наличии более электроноакцепторной защиты. В связи с предполагаемой значимостью генерации α-трифлата в β-маннозилировании, авторы также осуществили серию экспериментов с альтернативной активацией при помощи $AgClO_4$. При этом наблюдалось предпочтительное образование α-продукта, что подтверждает значимость предактивации при использовании доноров подобного типа [54].

Впоследствии авторы вышеописанного исследования расширили круг рассматриваемых гликозил-доноров и изучили влияние сложноэфирной защиты на глюкозилирование и галактозилирование. При этом было обнаружено, что ацильные заместители могут иметь как α-, так и β-направляющий эффект. α-Направляющими оказались ацильные группы при O3 глюкозил-донора, а также при O3 и O4 галактозил-донора. Это наблюдение в сочетании с тем, что неспособная к соучастию SO_2Bn-группа имела исключительно β-направляющий эффект независимо от расположения, послужило подтверждением возможности удаленного соучастия *O*-ацильной защиты [74] (см. выше подраздел “Стереоконтролирующее соучастие удаленных защитных групп”).

К дезактивированным за счет электронного эффекта маннозил-донорам также можно отнести маннуронозил-доноры, в которых электроноакцепторной группой является карбоксильный фрагмент при C5. β-Селективность маннуронил-доноров была успешно использована группой G. van der Marel в синтезе соответствующего трисахарида [75]. Опираясь на эту работу, в 2015 г. с высоким выходом и селективностью (в среднем 75% на цикл) был осуществлен автоматизированный синтез β-(1→4)-связанного маннуроногексасахарида [76], причем полученный продукт был затем успешно восстановлен до соответствующего β-(1→4)-связанного манногексозида, получение которого с использованием маннозил-доноров представляется весьма сложной задачей.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ КООРДИНАЦИЯ ГЛИКОЗИЛ-ДОНОРА И ГЛИКОЗИЛ-АКЦЕПТОРА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

В то время как наиболее распространенные подходы для стереоконтроля реакций гликозилирования можно упрощенно свести к блокированию подхода нуклеофила с определенной стороны гликозил-донора, существует противоположная стратегия. В ней проводится предварительное расположение гликозил-акцептора с требуемой стороны аномерного центра гликозил-донора при помощи ковалентного связывания посредством подходящего временного мостика.

Разработка внутримолекулярного гликозилирования в производных, содержащих соединенные гликозил-донор и гликозил-акцептор, может быть представлена как попытка воспроизвести химическими методами высокую эффективность

и специфичность природных процессов ферментативного гликозилирования, обеспечиваемых за счет взаимного расположения донора и акцептора в активном центре фермента [77]. При этом методы внутримолекулярного гликозилирования условно можно разделить на три категории в зависимости от расположения связывающего их спейсера (схема 13*а*) [78]. Первая является моделью "молекулярного зажима" (molecular clamp) или взаимного расположения реагентов (**VIII**). Во второй реализуется стратегия соединения гликозил-донорного и гликозил-акцепторного остатков через уходящую группу (**IX**), а в третьей осуществляется внутримолекулярная доставка агликона (**X**) при перегликозилировании атома кислорода, временно вовлеченного в межзвеньевой мостик.

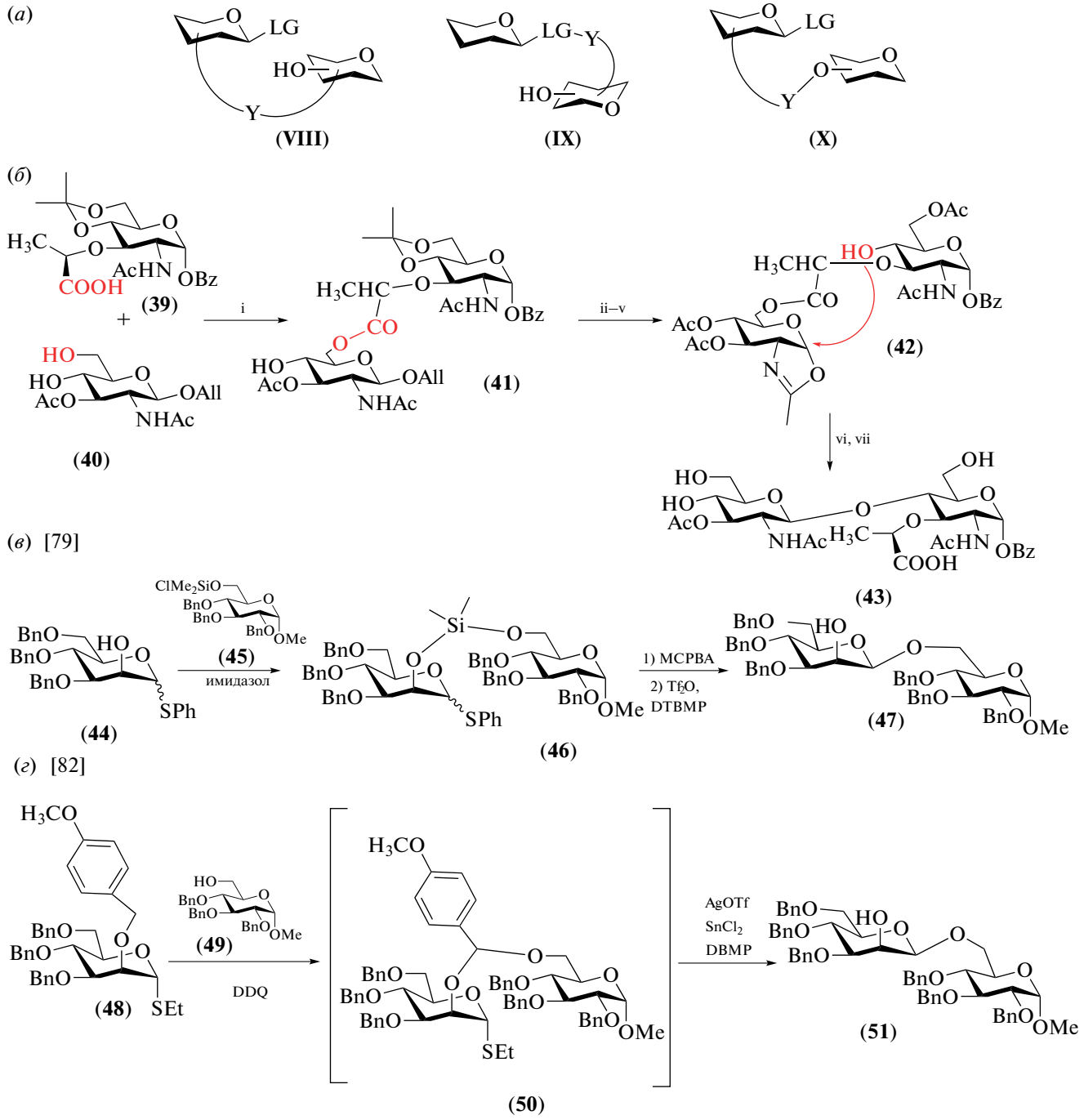


Схема 13. Внутримолекулярное гликозилирование. (i) – (**39**), (**40**), DCC, DMAP, THF : диоксан 1 : 5; (ii) – Ac_2O, Py; (iii) – AcOH, 90°C; (iv) – Ac_2O, Py, 0°C; (v) – $RhCl(PPh_3)_3$; (vi) – $CaSO_4$, $HgCl_2$, HgO, CH_3CN, 60°C; (vii) – NaOMe (0.1 M).

Впервые возможность предварительного ковалентного связывания гликозил-донора и гликозил-акцептора была предложена в 1986 г. T. Shiba [79] на примере хитобиозного производного (**43**). Так, из предшественников (**39**) и (**40**) был получен их конъюгат (**41**), в котором моносахаридные звенья соединены сложноэфирной связью (схема 13*б*). Замена *O*-защит, в том числе удаление аллильного агликона и формирование оксазолинового производного (**42**), а затем активация последнего, приводили к образованию целевого продукта (**43**). При этом наблюдалось стереоспецифичное образование исключительно β-гликозидной связи, присутствующей в продукте (**43**), а также весьма высокая эффективность гликозилирования: при попытке проведения реакции между соответствующими несоединенными моносахаридами образование продукта (**43**) не наблюдалось. Впоследствии рассмотренный подход был использован еще в некоторых случаях и стал известен как метод "молекулярного зажима". При таком подходе межмоносахаридный мостик располагается вдали от реакционного центра и обеспечивает необходимую пространственную сближенность свободной ОН-группы гликозил-акцепторной части и аномерного центра гликозил-донорной части. Таким образом, в зависимости от структуры мостика и участвующих моносахаридных частей, возможно селективное построение как α-, так и β-гликозидов. При этом был предложен ряд типов мостика, в первую очередь симметричные бифункциональные производные фталевой кислоты, ксилолы и бисфенол А [78].

Метод внутримолекулярной доставки агликона основывается на получении алкилиденового или силилиденового мостика между гидроксильными группами донора и акцептора при помощи спейсера. Таким образом достигается стереоспецифичное образование гликозидной связи в *син*-положении относительно спейсера. При этом наиболее распространенные и успешные подходы заключаются в получении 1,2-*цис*-гликозидов за счет образования ацеталя при реакции между О2 донора и гидроксилом акцептора (схема 13*в*). Примеры эффективных синтезов представлены в работах [80–82].

Последним подходом к внутримолекулярной доставке агликона является использование ариловых эфиров для получения временного мостика методом окисления в присутствии акцептора. Впервые этот метод был предложен в 1994 г. как очередной подход к получению β-маннозидов (схема 13*г*). Поскольку вышеописанные методы внутримолекулярной доставки агликона предполагают осуществление манипуляций с малоустойчивыми интермедиатами [83], а кроме того, условия получения алкилацеталей при помощи реагента Теббе несовместимы с использованием сложноэфирных защитных групп [84], авторы стремились разработать более простой и универсальный подход к получению необходимого ацеталя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За время, прошедшее с первых попыток осуществления стереоконтроля в реакциях гликозилирования с помощью защитных групп, достигнут заметный прогресс. На основе соучастия защитной группы при О2 разработан и практически досконально изучен высокоэффективный механизм построения 1,2-*транс*-гликозидной связи. Стереонаправленное 1,2-*цис*-гликозилирование на сегодняшний день также не является неразрешимой проблемой в подавляющем большинстве случаев. Созданы подходы на основе содействия удаленных *O*-защит, а также концепции "активации–дезактивации", позволяющей не только оказывать влияние на стереохимический результат реакций, но и осуществлять несколько последовательных реакций гликозилирования без промежуточного выделения продуктов. Для случаев же, когда данные подходы неприменимы или не работают, предложены методы, основанные на предварительной координации гликозил-донора и гликозил-акцептора. При этом в рамках каждого подхода существует возможность выбора конкретных защитных групп, различающихся по своим характеристикам. Помимо перечисленных подходов существует ряд многообещающих разработок, не получивших на настоящий момент широкого применения. Так, в последние годы были разработаны методы стереоконтроля, основанные на координировании донора и акцептора через водородную связь, образуемую акцепторным гидроксилом и защитной группой донора (схема 14) [85], а также на использовании объемных стерически ограничивающих групп при О6 для получения α-гликозидов [29, 86].

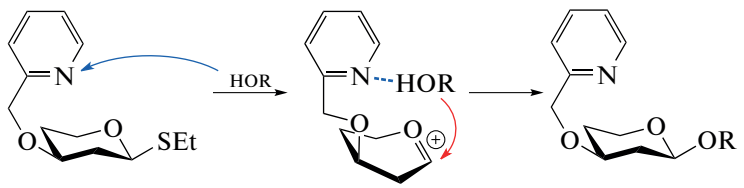


Схема 14. Координирование донора и акцептора через водородную связь с пиколильной группой.

Тем не менее разработанные на сегодняшний день методы стереоконтроля гликозилирования пока не являются совершенными, а все возрастающая сложность синтезируемых угле-

водных структур, включая конъюгаты с олигосахаридными векторными лигандами [87] и конъюгированные углеводные вакцины [88–92], а также появление технологий автоматизированного олигосахаридного синтеза [93, 94] требуют использования стереоспецифичных методов на каждой стадии гликозилирования. Это наглядно демонстрирует необходимость развития обсуждаемой области гликохимии как посредством модернизации и универсализации уже известных методов, так и за счет разработки принципиально новых подходов, а также типов стереоконтролирующих защитных групп. Исследования последнего десятилетия подтверждают эту тенденцию и позволяют рассчитывать на дальнейшее совершенствование методов стереоспецифичного гликозилирования в ближайшем будущем.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-73-20240).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Essentials of Glycobiology / Eds. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Stanley P., Hart G.W., Aebi M., Darvill A.G., Kinoshita T., Packer N.H., Prestegard J.H., Schnaar R.L., Seeberger P.H. 3rd ed. Cold Spring Harbor (N.Y.): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. 823 p.
2. *Varki A.* // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011. V. 3. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005462
3. *Moremen K.W., Tiemeyer M., Nairn A.V.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012. V. 13. P. 448–462. https://doi.org/10.1038/nrm3383
4. *Varki A.* // Glycobiology. 2016. V. 27. P. 3–49. https://doi.org/10.1093/glycob/cww086
5. *Бочков А.Ф., Афанасьев В.А., Заиков Г.Е.* // Образование и расщепление гликозидных связей. Москва: Наука, 1978. 179 с.
6. *Nukada T., Bereces A., Zgierski M.Z., Whitfield D.* // J. Am. Chem. Soc. 1998. V. 120. P. 13291–13295. https://doi.org/10.1021/ja981041m
7. *Chatterjee S., Moon S., Hentschel F., Gilmore K., Seeberger P.H.* // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140 I. 38. P. 11942–11953. https://doi.org/10.1021/jacs.8b04525
8. *Kim J.-H., Yang H., Khot V., Whitfield D., Boons G.-J.* // Eur. J. Org. Chem. 2006. P. 5007–5028. https://doi.org/10.1002/ejoc.200600440
9. *Yang B., Yang W., Ramadan S., Huang X.* // Eur. J. Org. Chem. 2018. V. 2018. P. 1075–1096. https://doi.org/10.1002/ejoc.201701579
10. *Leng W.-L. Yao H., He J.-X., Liu X.-W.* // Acc. Chem. Res. 2018. V. 51. P. 628–639. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00449
11. *Tipson S.* // J. Biol. Chem. 1939. V. 130. P. 55–59.
12. *Isbell H.S.* // Ann. Rev. Biochem. 1940. V. 9. P. 65–92.
13. *Paulsen H., Herold C.-P.* // Chem. Ber. 1970. V. 103. P. 2450–2462. https://doi.org/10.1002/cber.19701030817
14. *Crich D., Dain Z., Gastaldi S.* // J. Org. Chem. 1999. V. 64. P. 5224–5229. https://doi.org/10.1021/jo990424f
15. *Mucha E., Marianski M., Xu F.-F., Thomas D.A., Meijer G., von Helden G., Seeberger P. H., Pagel K.* // Nat. Commun. 2018. V. 9. 4174. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06764-3
16. *Boltje T.J., Liu L., Boons G.-J.* // In: Glycochemical Synthesis / Eds. Hung S.-C., Zulueta M.M.L. Hoboken New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2016. P. 97–130. https://doi.org/10.1002/9781119006435.ch4
17. *Yu H., Williams D.L., Ensley H.E.* // Tetrahedron Lett. 2005. V. 46. P. 3417–3421. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.03.099
18. *Liu H., Hansen T., Zhou S.-Y., Wen G.-E., Liu X.-X., Zhang Q.-J., Codée J.D.C., Schmidt R.R., Sun J.-S.* // Org. Lett. 2019. V. 21. P. 8713–8717. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b03321
19. *Smoot J.T., Pornsuriyasak P., Demchenko A.V.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2005.V. 44. P. 7123–7126. https://doi.org/10.1002/anie.200502694
20. *Buda S., Gołębiowska P. Mlynarski J.* // Eur. J. Org. Chem. 2013. P. 3988–3991. https://doi.org/10.1002/ejoc.201300123
21. *Le Mai Hoang K., Liu X.-W.* // Nat. Commun. 2014. V. 5. 5051. https://doi.org/10.1038/ncomms6051
22. *Karak M., Suenaga M. Oishi T., Torikai K.* // Org. Lett. 2019. V. 21. I. 4. P. 1221–1225. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b00220
23. *Kim J.-H., Yang H., Boons G.-J.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2005. V. 44. P. 947–949. https://doi.org/10.1002/anie.200461745
24. *Kim J.-H., Yang H., Park J., Boons G.-J.* // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 12090–12097. https://doi.org/10.1021/ja052548h
25. *Cox D.A., Fairbanks A.J.*// Tetrahedron: Asymmetry. 2009. V. 20. P. 773–780. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.02.018
26. *Fascione, M.A., Turnbull W.B.* // Beilstein J. Org. Chem. 2010. V. 6. https://doi.org/10.3762/bjoc.6.19
27. *Fang T., Mo K.-F., Boons G.-J.* // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134 P. 7545–7552. https://doi.org/10.1021/ja3018187
28. *Huang W., Gao Q., Boons G.-J.* // Chem. Eur. J. 2015. V. 21. P. 12920–12926. https://doi.org/10.1002/chem.201501844
29. *Komarova B.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Chem. Rec. 2016. V. 16. P. 488–506. https://doi.org/10.1002/tcr.201500245
30. *Khatuntseva E.A., Ustuzhanina N.E., Zatonskii G.V., Shashkov A.S., Usov A.I., Nifant'ev N.E.* // J. Carbohydr.

Chem. 2000. V. 19. P. 1151–1173.
https://doi.org/10.1080/07328300008544140
31. *Gerbst A.G., Ustuzhanina N.E., Grachev A.A., Zlotina N.S., Khatuntseva E.A., Tsvetkov D.E., Shashkov A.S., Usov A.I., Nifantiev N.E.* // J. Carbohydr. Chem. 2002. V. 21. P. 313–324.
https://doi.org/10.1081/CAR-120013500
32. *Gerbst A.G., Ustuzhanina N.E., Grachev A.A., Tsvetkov D.E., Khatuntseva E.A., Shashkov A.S., Usov A.I., Preobrazhenskaya M.E., Ushakova N.A., Nifantiev N.E.* // J. Carbohydr. Chem. 2003. V. 22 P. 109–122.
https://doi.org/10.1081/CAR-120020481
33. *Ustyuzhanina N., Krylov V., Grachev A., Gerbst A., Nifantiev N.* // Synthesis. 2006. V. 23. P. 4017–4031.
https://doi.org/10.1055/s-2006-950333
34. *Krylov V.B., Kaskova Z.M., Vinnitskiy D.Z., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A., Chizhov A.O., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2011. V. 346. P. 540–550.
https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.005
35. *Гербст А.Г., Грачев А.А., Устюжанина Н.Е., Хатунцева Е.А., Цветков Д.Е., Усов А.И., Шашков А.С., Преображенская М.Е., Ушакова Н.А., Нифантьев Н.Э.* // Биоорг. химия. 2004. Т. 30. С. 1–12. [*Gerbst A.G., Grachev A.A., Ustyuzhanina N.E., Khatuntseva E.A., Tsvetkov D.E., Usov A.I., Shashkov A.S., Preobrazhenskaya M.E., Ushakova N.A., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2004. V. 30. P. 137–147.]
https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000023099.48598.9a
36. *Vinnitsky D.Z., Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S., Nifantiev N.E.* // Org. Biomol. Chem. 2016. V. 14. P. 598–611.
https://doi.org/10.1039/c5ob02040a
37. *Komarova B.S., Tsvetkov Y.E., Knirel Y.A., Zähringer U., Pier G.B., Nifantiev N.E.* // Tetrahedron Lett. 2006. V. 47. P. 3583–3587.
https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.03.045
38. *Komarova B.S., Tsvetkov Y.E., Pier G.B., Nifantiev N.E.* // J. Org. Chem. 2008. V. 73. P. 8411–8421.
https://doi.org/10.1021/jo801561p
39. *Komarova B. S., Tsvetkov Y.E., Pier G.B., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2012. V. 360. P. 56–68.
https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.019
40. *Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Beau R., Aimanianda V., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // Chem. Eur. J. 2015. V. 20. P. 1029–1035.
https://doi.org/10.1002/chem.201404770
41. *Komarova B.S., Wong S.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Krylov V.B., Beauvais A., Bouchara J.-P., Kearney J., Aimanianda V., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // J. Org. Chem. 2018. V. 83. P. 12965–12976.
https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01142
42. *Komarova B.S., Dorokhova V.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Org. Chem. Front. 2018. V. 5. P. 909–928.
https://doi.org/10.1039/c7qo01007a
43. *Kazakova E.D., Yashunsky D.V., Krylov V.B., Bouchara J.P., Cornet M., Valsecchi I., Fontaine T., Latgé J.-P., Nifantiev N.E.* // J. Am. Chem. Soc. 2020. V. 142. P. 1175–1179.
https://doi.org/10.1021/jacs.9b11703
44. *Kazakova E.D., Yashunsky D.V., Khatuntseva E.A., Nifantiev N.E.* // Pure Appl. Chem. 2020. V. 92. P. 1047–1056.
https://doi.org/10.1515/pac-2020-0105
45. *Hahm H.S., Hurevich M., Seeberger P.H.* // Nat. Commun. 2016. V. 7. 12482.
https://doi.org/10.1038/ncomms12482
46. *Krylov V., Ustyuzhanina N., Bakker H., Nifantiev N.* // Synthesis. 2007. P. 3147–3154.
https://doi.org/10.1055/s-2007-990784
47. *Sethi M.K., Buettner F.F.R., Krylov V., Takeuchi H., Nifantiev N., Haltiwanger R.S., Gerardy-Schahn R.* // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 1582–1586.
https://doi.org/10.1074/jbc.C109.065409
48. *Sethi M.K., Buettner F.F.R., Ashikov A., Krylov V.B., Takeuchi H., Nifantiev N.E., Haltiwanger R.S., Gerardy-Schahn R., Bakker H.* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 2739–2748.
https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302406
49. *Mukaiyama T., Suenaga M., Chiba H., Jona H.* // Chem. Lett. 2002. P. 56–57.
https://doi.org/10.1246/cl.2002.56
50. *Li Z., Zhu L., Kalikanda J.* // Tetrahedron Lett. 2011. V. 52. P. 5629–5632.
https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.08.091
51. *Komarova B.S., Gerbst AG., Finogenova A.M., Dmitrenok A.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // J. Org. Chem.2017. V. 82. P. 8897–8908.
https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01167
52. *Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2014. V. 384. P. 70–86.
https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.11.016
53. *Crich D., Hu T., Cai F.* // J. Org. Chem. 2008. V. 73. P. 8942–8953.
https://doi.org/10.1021/jo801630m
54. *Baek J.Y., Lee B.-Y., Jo M.G., Kim K.S.* // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 17705–17713.
https://doi.org/10.1021/ja907252u
55. *Marianski M., Mucha E., Greis K., Moon S., Pardo A., Kirschbaum K., Thomas D.A., Meijer G., von Helden G. Gilmore K., Seeberger P.H., Pagel K.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2020. V. 59. P. 6166–6171.
https://doi.org/10.1002/anie.201916245
56. *Gerbst A.G., Ustuzhanina N.E., Grachev A.A., Khatuntseva E.A., Tsvetkov D.E., Whitfield D.M., Bereces A., Nifantiev N.E.* // J. Carbohydr. Chem. 2001. V. 20. P. 821–831.
https://doi.org/10.1081/CAR-100108659
57. *Gerbst A.G., Krylov V.B., Nifantiev N.E.* // In: Carbohydrate Chemistry – a Specialist Periodical Reports / Eds.: Rauter A.P., Lindhorst T., Queneau Y. RSC. 2021. V. 44. P. 151–169.
https://doi.org/10.1039/9781788013864-00151
58. *Hansen T., Elferink H., van Hengst J.M.A., Houthuijs K.J., Remmerswaal W.A., Kromm A. Berden G., van der Vorm S., Rijs A.M., Overkleeft H.S., Filippov D.V., Rutjes F.PJ. van der Marel G., Martens J., Oomens J., Codée J.D.C., Boltje T.J.* // Nat. Commun. 2020. V. 11.
https://doi.org/10.1038/s41467-020-16362-x
59. *Mootoo D.R., Konradsson P., Udodong U., Fraser-Reid B.* // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 5583–5584.
https://doi.org/10.1021/ja00224a060
60. *Yang B., Yoshida K., Huang X.* // In: Glycochemical Synthesis / Eds. Hung S.-C., Zulueta M.M.L. Hoboken New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2016. P. 155–188.
https://doi.org/10.1002/9781119006435.ch6
61. *Crich D., Sun S.* // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 11217–11223.
https://doi.org/10.1021/ja971239r
62. *Kahne D., Walker S., Cheng Y., Van Engen D.* // J. Am. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 6881–6882.
https://doi.org/10.1021/ja00199a081

63. *Fraser-Reid B., Wu Z., Andrews C.W., Skowronski E.* // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 1434–1435. https://doi.org/10.1021/ja00004a066
64. *Jensen H.H., Nordstrom L.U., Bols M.* // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 9205–9213. https://doi.org/10.1021/ja047578j
65. *Crich D.* // Acc. Chem. Res. 2010. V. 43 I. 8. P. 1144–1153. https://doi.org/10.1021/ar100035r
66. *Crich D., de la Mora M., Vinod A.U.* // J. Org. Chem. 2003. V. 68. P. 8142–8148. https://doi.org/10.1021/jo0349882
67. *Kumagai D., Miyazaki M., Nishimura S.-I.* // Tetrahedron Lett. 2001. V. 42. P. 1953–1956. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00044-2
68. *Yun M., Shin Y., Chun K.H., Jen S.* // Bull. Korean Chem. Soc. 2000. V. 21. P. 562–566.
69. *Weingart R., Schmidt R.R.* // Tetrahedron Lett. 2000. V. 41. P. 8753–8758. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01497-0
70. *Baek J.Y., Choi T.J., Jeon H.B., Kim K.S.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2006. V. 45. P. 7436–7440. https://doi.org/10.1002/anie.200602642
71. *Tsuda T., Sato S., Nakamura S., Hashimoto S.* // Heterocycles 2003. V. 59. P. 509–515. https://doi.org/10.3987/COM-02-S80
72. *Karelin A.A., Tsvetkov Y.E., Paulovičová E., Paulovičová L, Nifantiev N.E.* // Eur. J. Org. Chem. 2016. P. 1173–1181. https://doi.org/10.1002/ejoc.201501464
73. *Crich D., Vinogradova O.* // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. P. 11756–11765. https://doi.org/10.1021/ja0730258
74. *Baek J.Y., Kwon H.-W., Myug S.J., Park J.J., Kim M.Y., Rathwell D.C.K., Jeon H.B., Seeberger P.H., Kim K.S.* // Tetrahedron. 2015. V. 71. P. 5315–5320. https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.06.014
75. *van den Bos L.J., Dinkelaar J., Overkleeft H.S., van der Marel G.*// J. Am. Chem. Soc. 2006. V. 128. P. 13066–13067. https://doi.org/10.1021/ja064787q
76. *Tang S.-L., Pohl N.L.B.* // Org. Lett. 2015. V. 17. P. 2642–2645. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01013
77. *Behrendt M.E., Schmidt R.R.* // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. P. 6733–6736. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61687-8
78. *Xiao G.J., Demchenko A.V.* // Beilstein J. Org. Chem. 2017. V. 13. P. 2028–2048. https://doi.org/10.3762/bjoc.13.201
79. *Kusomoto S., Imoto M., Ogiku T., Shiba T.* // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1986. V. 59. P. 1419–1423. https://doi.org/10.1246/bcsj.59.1419
80. *Barresi F., Hindsgau O.* // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 9376–9377. https://doi.org/10.1021/ja00024a057
81. *Stork G., Kim G.* // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 1087–1088. https://doi.org/10.1021/ja00029a047
82. *Bols M.* // Tetrahedron. 1993. V. 49. P. 10049–10060. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80200-3
83. *Ito Y., Ogawa T.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994. V. 33 P. 1765–1767. https://doi.org/10.1002/anie.199417651
84. *Ishiwata A., Ito Y.* // In: Selective Glycosylations: Synthetic Methods and Catalysts / Ed. Bennet C.S. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2017. P. 81–96.
85. *Yasomanee J.P., Demchenko A.V.* // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 20097–20102. https://doi.org/10.1021/ja307355n
86. *Zhang Y., Zhou S., Wang X., Zhan H., Guo Z., Gao J.* // Org. Chem. Front., 2019. V. 6. P. 762–772. https://doi.org/10.1039/C8QO01177J
87. *Щеравина Е.С., Сачкова А.А., Усова С.Д., Нючев А.В., Грачева Ю.А., Федоров А.Ю.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 76–105. [*Scchegravina E.S., Sachkova A.A., Usova S.D., Nyuchev A.V., Gracheva Yu.A., Fedorov A.Yu.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 69– 96.] https://doi.org/10.31857/S013234232101022X
88. *Генинг М.Л., Курбатова Е.А., Нифантьев Н.Э.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 3–28. [*Gening M.L., Kurbatova E. A., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 1–24.] https://doi.org/10.31857/S0132342321010073
89. *Хатунцева Е.А., Нифантьев Н.Э.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 29–56. [*Khatuntseva E.A., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 25–51.] https://doi.org/10.31857/S0132342321010103
90. *Adamo R., Nilo A., Castagner B., Boutureira O., Berti F., Bernardes G.J.L.* // Chem. Sci. 2013. V. 4. P. 2995–3008. https://doi.org/10.1039/C3SC50862E
91. *Hu Q.-Y., Berti F., Adamo R.* // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. P. 1691–1719. https://doi.org/10.1039/c4cs00388h
92. *MacCalman T.E., Phillips-Jones M.K., Harding S.E.* // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2019. V. 35. P. 93–125. https://doi.org/10.1080/02648725.2019.1703614
93. *Seeberger P.H.* // Acc. Chem. Res. 2015. V. 48. P. 1450–1463. https://doi.org/10.1021/ar5004362
94. *Pardo-Vargas A., Delbianco M., Seeberger P.H.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2018. V. 46. P. 48–55. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.04.007

Protecting Groups as a Factor of Stereocontrol in Glycosylation Reactions

A. I. Tokatly*, D. Z. Vinnitskiy*, N. E. Ustuzhanina*, and N. E. Nifantiev*, #

#Phone/fax: +7 (499) 135-87-84; e-mail: nen@ioc.ac.ru

**N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 47, Moscow, 119991 Russia*

Synthetic oligosaccharides are objects of interest as model compounds in studies on the biological activity of natural compounds, but also as components for new drugs, glycoconjugate vaccines, carbohydrate diagnostics agents and various other products. The key stage in oligosaccharide synthesis is the glycosylation reaction, which leads to the formation of a linkage between carbohydrate fragments. This review highlights a current

problem in modern glycochemistry – the methods of stereocontrol in the glycosylation reaction. Protecting groups within the structure of glycosyl donors are considered as stereocontrolling factors, affecting the reaction mechanism by means of (1) participation or anchimeric assistance, (2) deactivation, (3) intramolecular aglycone delivery. The classical mechanism of neighboring group participation at O2 for the synthesis of 1,2-*trans*-glycosides is shown, as well as its modern modifications, including activating ethers, chiral protecting groups and achiral bicyclic glycosyl donors. The mechanisms of remote participation from O3, O4 and O6 of the glycosyl donor are discussed in detail. In addition, approaches to stereocontrol using deactivating protection (conformation constraining and electron-withdrawing groups) are described. Finally, synthetic approaches based on intramolecular aglycone delivery are considered. Both classical and novel protecting groups used to control the steric outcome of glycosylation are presented, the mechanisms underlying the presented approaches are discussed in detail, while also showing how the described strategies apply to the synthesis of complex structures.

Keywords: glycosylation, *stereocontrol*, *protecting groups*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 76–105

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 547.455:547.455.62:547.458

НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА С ПРИМЕНЕНИЕМ УГЛЕВОДНЫХ СИСТЕМ: ОЖИДАНИЯ И РЕАЛЬНОСТЬ[1]

© 2021 г. Е. С. Щегравина*, А. А. Сачкова*, С. Д. Усова*, А. В. Нючев*, Ю. А. Грачева*, А. Ю. Федоров*, #

**Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Россия, 603950 Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23*

Поступила в редакцию 24.07.2020 г.
После доработки 05.08.2020 г.
Принята к публикации 07.08.2020 г.

В конце XX века мир вступил в эру высокотехнологичной и персонализированной медицины, которая характеризуется внедрением в клиническую практику таргетных препаратов. Селективная доставка лекарственных средств признана одним из самых эффективных методов повышения результативности и безопасности терапии. Данный обзор посвящен изучению возможностей использования углеводов для селективной доставки лекарственных средств, в частности в терапии онкологических заболеваний. Проанализированы работы, в которых исследовались возможности применения моно- и олигосахаридов в качестве векторных лигандов для взаимодействия с опухоль- и тканеспецифичными рецепторами, описаны примеры конъюгирования углеводов с химиотерапевтическими агентами, агентами фотодинамической терапии, субстратами для *in vitro* и *in vivo* имиджинга. Отдельные разделы данного обзора сфокусированы на возможности использования полисахаридов в качестве наноконтейнеров для селективной доставки активных веществ, в том числе нуклеиновых кислот, а также использованию углеводов в иммунотерапии опухолей. Рассмотрены проблемы и перспективы биомедицинского применения углеводов и их миметиков в качестве векторов для адресной доставки.

Ключевые слова: углеводы, адресная доставка, углеводные векторы, наночастицы, гликомиметики

DOI: 10.31857/S013234232101022X

ВВЕДЕНИЕ

Системы адресной доставки лекарств обладают значительным потенциалом для улучшения диагностических и терапевтических свойств препаратов, а также уменьшения их побочных эффектов [1]. Таргетные лекарственные средства могут избирательно доставлять терапевтические агенты в больные клетки, что способствует снижению неспецифического поглощения, приводящего к увеличению системной токсичности препарата. Это позволяет использовать терапевтические молекулы, которые неэффективны при введении в интактном, немодифицированном виде в максимально переносимой дозе. И, наконец, нацеливающие векторы можно одновременно использовать и для создания сопутствующего диагностического агента, который даст возможность отбирать пациентов с гиперэкспрессированными целевыми рецепторами на патологических клетках.

Углеводные лиганды и гликомиметики, наряду с пептидами и антителами, являются одними из самых перспективных векторов для направленной доставки [2]. Много десятилетий назад углеводы рассматривались преимущественно с позиций энергетического обмена клеток, но к настоящему времени установлено, что они играют одну из ключевых ролей в клеточном сигналинге, распознавании и коммуникации клеток с внеклеточными компонентами и друг с другом, а также являются неотъемлемыми участниками посттрансляционных изменений белковых структур [3]. В отличие от других биополимеров – белков или нуклеиновых кислот – углеводы могут иметь нелинейную структуру [4]. Их ветвление происходит за счет наличия нескольких гидроксильных

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S013234232101022X для авторизованных пользователей.

Сокращения: ASGPR – асиалогликопротеиновый рецептор; ASO – антисмысловая ДНК; CAR-T – Т-клетки с химерным антигенным рецептором; GalNAc – *N*-ацетил-*D*-галактозамин; HA – гиалуроновая кислота; MSC – мезенхимальные стволовые клетки; NK – натуральные киллеры; ON – олигонуклеотид; siRNA – малая интерферирующая РНК; sLe^X и sLe^A – изомерные тетрасахариды Sialyl Lewis X и Sialyl Lewis A; КЛ – клетки Лангерганса; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ФДТ – фотодинамическая терапия.

[#] Автор для связи (эл. почта: afedorovNN@yandex.ru).

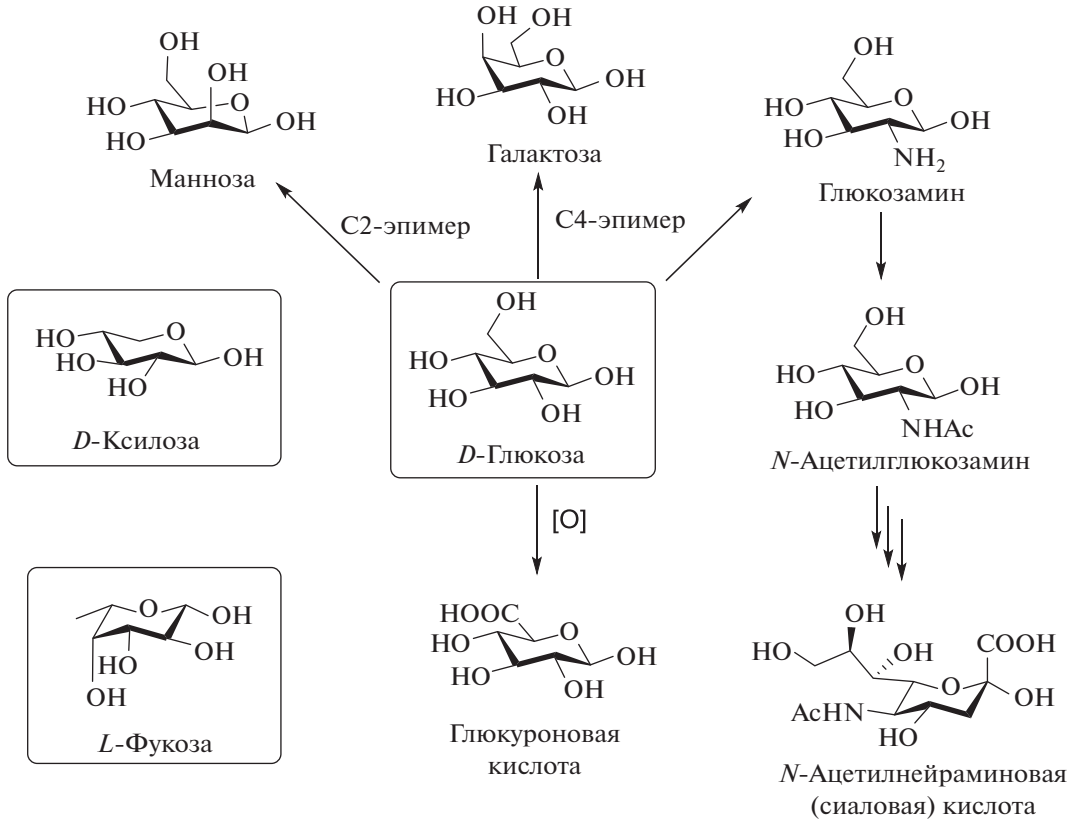


Рис. 1. Моносахариды, наиболее распространенные в клетках млекопитающих [6].

групп, что существенно увеличивает разнообразие возможных структур.

В качестве векторных компонентов углеводы имеют ряд преимуществ перед остальными природными и синтетическими материалами: 1) благодаря своему огромному структурному разнообразию, олигосахариды и их миметики обладают удивительной селективностью к белковым рецепторам; 2) структура углеводов может быть относительно легко определена; 3) они являются биосовместимыми и биоразлагаемыми материалами; 4) существует большое количество природных источников углеводов; 5) благодаря наличию множества гидроксильных групп, биосовместимые олигосахариды способны защищать терапевтические агенты или наночастицы от нежелательного взаимодействия с белками, например, предотвращать опсонизацию; 6) углеводы характеризуются хорошей растворимостью в воде и не склонны к агрегации, что является преимуществом при создании лекарств для внутривенного введения [4]. Несмотря на указанные преимущества, одной из ключевых задач остается оптимальный дизайн векторных конструкций для эффективного биологического распознавания углеводного лиганда [5].

Целью данного обзора является обобщение наиболее ярких примеров систем адресной доставки с применением лигандов, содержащих моносахаридные звенья, углеводных наночастиц, а также таргетирования лектинов углеводами и гликомиметиками.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОСАХАРИДОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В клетках млекопитающих присутствуют девять основных моносахаридов, из которых построена большая часть природных олиго- и полисахаридов: *D*-глюкоза, *D*-глюкозамин, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, *D*-галактоза, *D*-манноза, *D*-ксилоза, *L*-фукоза, глюкуроновая кислота и *N*-ацетилнейраминовая кислота, относящаяся к сиаловым кислотам (рис. 1) [6, 7]. Большинство указанных моносахаридов могут быть как получены из экзогенных источников с использованием транспортеров семейства SLC2A, так и синтезированы *de novo* из глюкозы.

Функции моносахаридов разнообразны. Например, *D*-глюкоза – основной источник энергии [8], а также субстрат для гликозилирования. *D*-Глюкуроновая кислота в организме человека задействована в биоконъюгировании с целью детоксикации и выведения ксенобиотиков [9]. *D*-Ман-

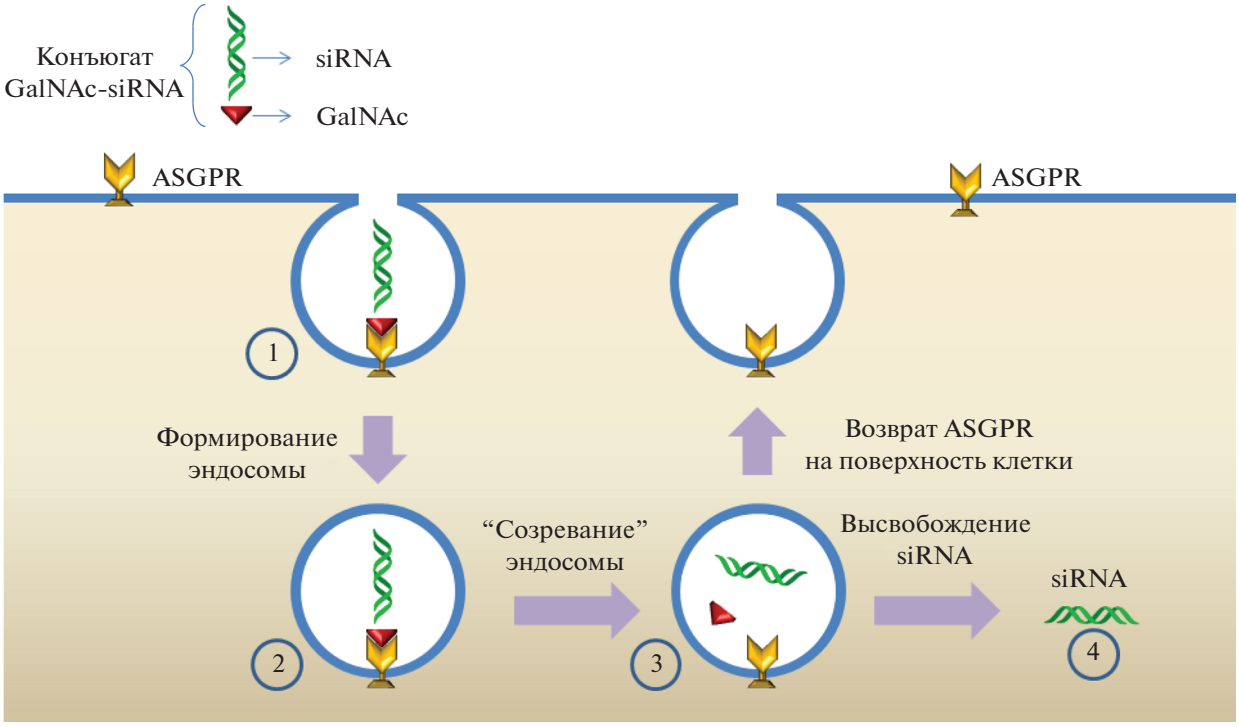


Рис. 2. Взаимодействие конъюгата GalNAc–ON с асиалогликопротеиновыми рецепторами гепатоцитов (ASGPR) [32].

ноза участвует в синтезе гликозилфосфатидилинозитола (GPI anchor) – "якоря", помогающего белкам закрепиться в плазматической мембране. *D*-Галактоза, образующая многие гликоконъюгаты, важна для роста и развития новорожденных [7]. *N*-Ацетил-*D*-глюкозамин задействован в биосинтезе гиалуроновой кислоты, выполняющей функции формирования структуры тканей и взаимодействия с различными молекулами и рецепторами [10]. Также он вовлечен в синтез сиаловых кислот [11]. Алкилфосфатные производные *N*-ацетил-*D*-глюкозамина обладают антибактериальной и противотуберкулезной активностью [12].

Манноза [13–15], галактоза [15–17] и фукоза [15, 18] исследуются в качестве лекарственных средств при лечении врожденных нарушений гликозилирования [15, 19, 20]. При онкологических заболеваниях существует возможность химиотерапии с использованием маннозы [21], эффект которой, вероятно, основан на накоплении в клетках *D*-маннозо-6-фосфата (Man-6P), ослабляющего гликолиз и вызывающего "голодание" клеток и их смерть [22]. Применение *D*-галактозы исследуют при стероид-резистентном нефротическом синдроме (СРНС) [23]. При муковисцидозе проведение ингаляций смесью галактозы и фукозы снижает заражение легких синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*) при отсутствии значительных побочных эффектов [24].

GalNAc-СОДЕРЖАЩИЕ ЛИГАНДЫ В АДРЕСНОЙ ДОСТАВКЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Некоторые лиганды, содержащие в составе моносахаридные звенья, рассматриваются в качестве векторов для доставки терапевтических агентов [23–28]. В частности, возможность направленной доставки обусловлена способностью фрагмента *N*-ацетил-*D*-галактозамина (GalNAc) к избирательному связыванию с асиалогликопротеиновыми рецепторами (ASGPR) [29]. Это рецепторы лектинов типа С, расположенные в плазматических мембранах гепатоцитов [30]. На рис. 2 приведен механизм действия биоконъюгатов GalNAc с олигонуклеотидами (ON). Достигая мембраны гепатоцита, конъюгат GalNAc–ON связывается с ASGPR (1) и оказывается в ранней эндосоме (2) через клатрин-зависимый механизм [31]. При дальнейшем "созревании" эндосомы и снижении pH происходят диссоциация комплекса GalNAc–ASGPR и распад конъюгата GalNAc–ON (3), после чего олигонуклеотид покидает эндосому (4) (рис. 2) [29, 32, 33].

Чаще всего GalNAc входит в состав биоконъюгатов в "трехантенной" форме (Tris-GalNAc), присоединенной к 3'- или к 5'-концу ON посредством фосфодиэфирной связи (рис. 3). Также GalNAc может быть включен в нуклеотидную последовательность как ненуклеозидный мономер [33, 34].

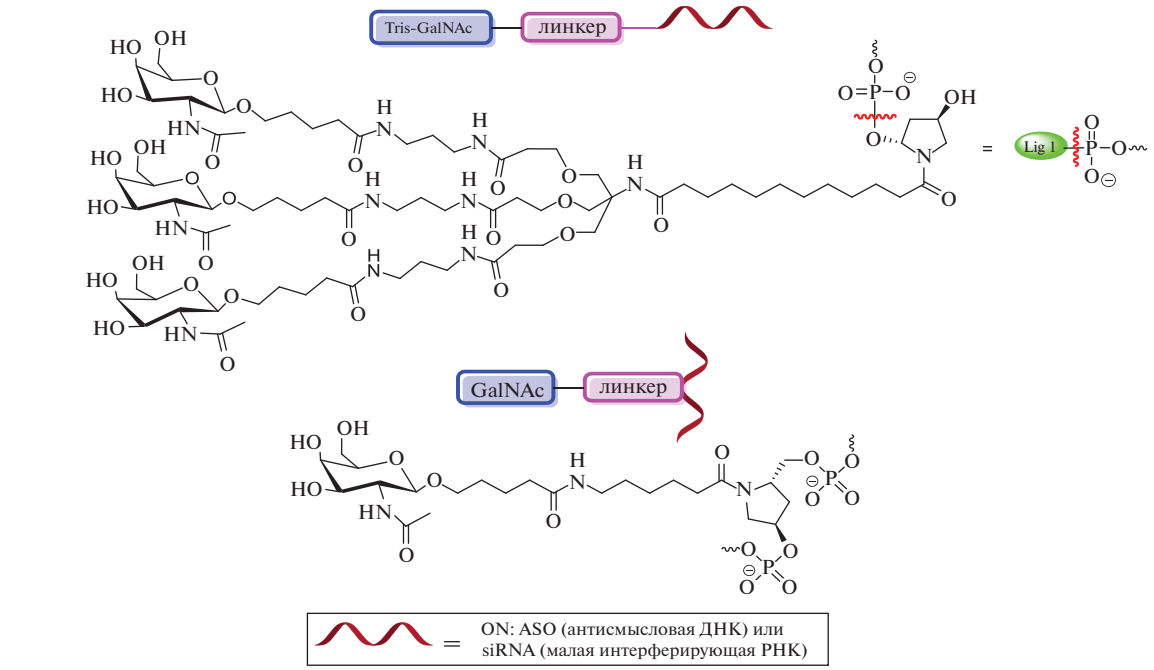


Рис. 3. Строение конъюгатов GalNAc–ON [34].

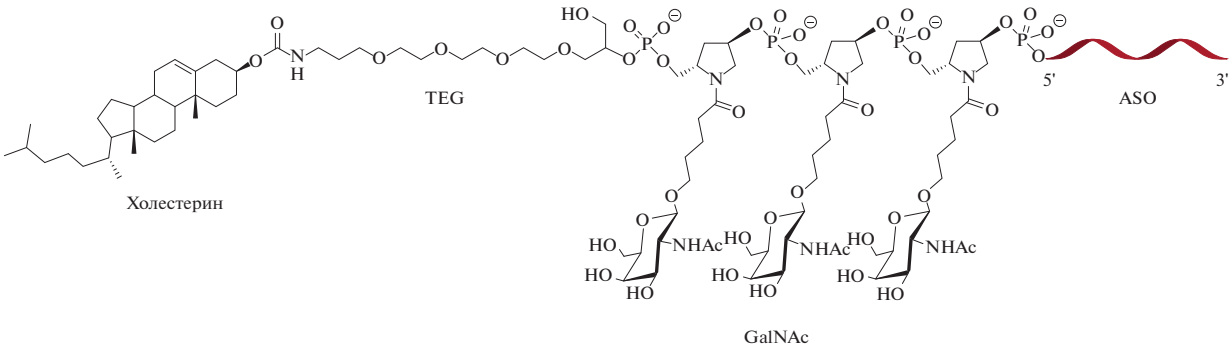


Рис. 4. Строение двойного конъюгата холестерин–GalNAc–ASO [38]. TEG – триэтиленгликоль, ASO – антисмысловая ДНК.

В настоящее время значительный интерес представляют конъюгаты GalNAc с такими ON, как антисмысловые ДНК (ASO), интерферирующие и малые интерферирующие РНК (RNAi и siRNA) [33]. ASO и RNAi представляют собой олигонуклеотидные последовательности, комплементарные гену, экспрессию которого необходимо подавить [35]. В состав биоконъюгатов входят модифицированные siRNA, где 2'-OH-группы рибозы замещаются на фтор (2'-F) либо метоксигруппы (2'-OMe) с целью защиты siRNA от действия нуклеаз [36, 37].

Эффективным методом влияния на свойства конъюгатов GalNAc–ON служит двойное конъюгирование. Иллюстрацией к этому может являться создание амфифильного конъюгата [38], где 5'-конец ASO модифицирован при помощи GalNAc и холестерина, связанных между собой триэтиленгликолевым мостиком (рис. 4). Подобные конъюгаты направлены на подавление экспрессии гена аполипопротеина B (ApoB), что служит терапией при гомозиготной семейной гиперхолестеринемии [39]. Применение конъюгата холестерин–GalNAc–ASO несколько снизило активность ASO в подавлении гена *apoB* по сравнению с конъюгатом GalNAc–ASO. Однако такой подход позволил уменьшить накопление ASO в почках, что является перспективной стратегией снижения нефротоксичности ASO.

Активность биоконъюгата можно повысить путем увеличения числа siRNA, переносимых одной единицей Tris-GalNAc. Это достигается исполь-

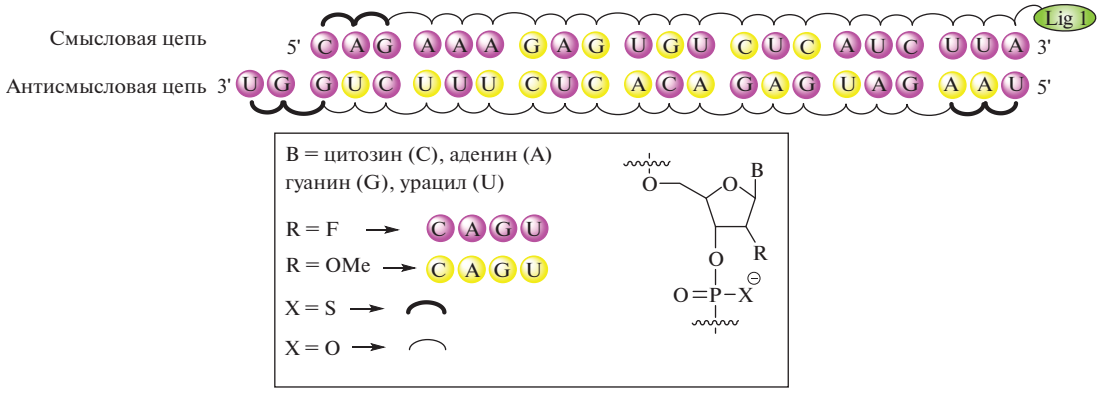


Рис. 5. Строение конъюгата в составе препарата Givosiran (GIVLAARI^{TM}) [47]. Структура Lig 1 изображена на рис. 3.

зованием “мультимерной” формы siRNA, содержащей несколько связанных между собой нуклеотидных последовательностей. Brown et al. [40] удалось создать не только конъюгаты с множественными копиями одной siRNA, но и конъюгаты, содержащие разные олигонуклеотидные последовательности, что обеспечивает подавление экспрессии нескольких генов одновременно. Был получен гетеротример, содержащий сразу три siRNA, действующие на гены фактора свертывания крови (FVII), аполипопротеина B (ApoB) и транстиретина (TTR). Эффект “нокдауна”, оказываемый одной единицей конъюгата гетеротримера с GalNAc, сопоставим с суммарным эффектом от применения трех конъюгатов, нацеленных отдельно на FVII, ApoB и TTR [40].

В настоящее время в разработку препаратов на основе конъюгатов GalNAc–ON вовлечено несколько фармацевтических компаний [30, 41–43], среди которых Arrowhead, Dicerna, Silence и Ionis. Компания Alnylam, ставшая первопроходцем в области препаратов на основе siRNA, перешла от исследования липосомальных частиц к конъюгатам GalNAc–ON в качестве средств доставки олигонуклеотидов к клеткам печени [41]. В 2019 г. FDA (Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США) одобрило первый препарат на основе конъюгата GalNAc–siRNA – Гивосиран (Givosiran, GIVLAARI^{TM}) [44, 45]. Он является вторым одобренным FDA препаратом на основе siRNA и используется при лечении острой печеночной порфирии (АНР). Гивосиран выпускается в форме натриевой соли двухцепочечной siRNA, где 3'-конец смысловой цепи связан с лигандом, содержащим фрагмент GalNAc (рис. 5). Наличие тиофосфатных линкеров между двумя крайними субъединицами в 5'-конце смысловой цепи и 3'-, 5'-концах антисмысловой цепи способствует дополнительной защите от действия ферментов и стабильности siRNA при подкожном введении [46, 47].

Проводятся доклинические и клинические испытания препаратов [32, 41–43, 48–50], направленных на борьбу с такими заболеваниями, как гепатит B (ARO-HBV, VIR-2218, AB-729 [51]), гемофилия (Fitusiran), талассемия (IONIS-TMPRSS6-LRx, SLN124), транстиретиновый амилоидоз (Revusiran, ALN-TTRSC02) (табл. 1, данные на 01.09.2020, полная версия таблицы и структуры терапевтических агентов приведены в дополнительном файле). Перспективы применения конъюгатов GalNAc–ON в лечении локализованных в печени раковых опухолей пока неясны [52, 53]. Несмотря на некоторый прогресс в данной области [52, 54–56], возможности препаратов ограничиваются тем, что клетки опухоли слабо дифференцированы. Число рецепторов ASGPR в клетках гепатоцеллюлярной карциномы зачастую существенно ниже, чем в здоровых гепатоцитах, что снижает эффективность адресной доставки [57, 58]. Также стоит отметить, что для многих препаратов на основе GalNAc–ON остаются актуальными задачи повышения стабильности, эффективности и снижения токсического влияния на организм.

Таким образом, моносахариды сами по себе не обладают векторными свойствами, однако включение их в состав адресных лигандов для последующей конъюгации с терапевтическими агентами позволило получить ряд перспективных молекул, одна из которых уже применяется в клинической практике (препарат Гивосиран).

УГЛЕВОДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Одним из распространенных методов адресной доставки является инкапсулирование терапевтического агента в наночастицы, в качестве которых могут выступать липосомы [59–64], полимерные частицы природного или синтетического происхождения [65–73], углеродные нанотруб-

Таблица 1. Данные о клинических испытаниях препаратов на основе конъюгатов олигонуклеотидов с лигандами направленной доставки, содержащих фрагменты GalNAc

Мишень	Заболевание	Препарат	Номер фазы испытаний, состояние	Номер испытания/ ссылка
Вирус гепатита B (HBV)	Гепатит B	VIR-2218	1, 2, активны	NCT03672188
α-1-Антитрипсин (AAT)	Дефицит α-1-антитрипсина	ALN-AAT02	1, 2, активны	NCT03767829
		ARO-AAT	2, 3, идет набор пациентов	NCT03945292
Липопротеин (a) (Lp(a))	Сердечно-сосудистые заболевания	AMG 890	1, активна, нет набора	NCT03626662
			2, идет набор	NCT04270760
Пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9)	Гиперхолестеринемия	Inclisiran (ALN-PCSSC)	3, завершена	NCT03397121
Ангиотензин (AGT)	Гипертензия	IONIS-AGT-LRx	2, активна	NCT04083222

Данные сайта clinicaltrials.gov на 01.09.2020, полную версию таблицы см. в дополнительных материалах к публикации.

ки [74–77], дендримеры [78–83], “металлические” [84–88] и вирусоподобные частицы [89, 90].

Дизайн наночастиц может являться одним из ключевых факторов успеха терапии. Основные требования для создания наночастиц включают инертность, нетоксичность и стабильность. Размер частиц и модификация их поверхности играют важную роль в механизме биотрансформации и утилизации наночастиц в организме [91, 92].

Частицы размером до 30 нм утилизируются преимущественно в почках, частицы большего размера претерпевают биодеградацию в печени либо захватываются фагоцитами [93].

Доставка инкапсулированных лекарственных средств может происходить по механизмам активного и пассивного таргетирования. Пассивная доставка наночастиц к опухолевым клеткам реализуется за счет проникновения через расширенные (100–600 нм) поры эндотелия сосудов (EPR-эффект) [94]. Активная доставка основана на связывании молекулы-лиганда, которым модифицирована поверхность наночастиц, с рецепторами, повышенно экспрессируемыми на мембранах опухолевых клеток [95–100].

Олиго- и полисахариды являются популярными скаффолдами для создания наноразмерных систем доставки различных терапевтических агентов. Созданию углеводных наночастиц посвящен ряд обзоров [4, 76, 101–103], поэтому в рамках данной статьи мы не будем останавливаться на всех вариантах углеводных наноконтейнеров и их биомедицинских приложений. На рис. 6 приведены наиболее распространенные поли- и олигосахаридные системы, применяемые для дизайна систем адресной доставки. По механизмам пассивного таргетирования функционируют системы доставки на основе хитозана, циклодекстрина, альгината, целлюлозы и декстрана. Активными векторными свойствами обладают гликозаминогликаны, в частности гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат.

Подавляющее большинство таких частиц обладает высокой биосовместимостью ввиду природного происхождения. Некоторые полисахариды (например, альгинат, пектин, целлюлоза, циклодекстрины) могут быть получены из растений. Ряд распространенных полисахаридов (хитозан, гиалуроновая кислота, гепарин, хондроитинсульфат) имеют животное происхождение. Амфифильность углеводов создает возможность для инкапсулирования как гидрофильных, так и липофильных субстанций. Наличие функциональных групп позволяет проводить модификацию наноконтейнеров, например, конъюгировать их с векторами селективной доставки. Разнообразие природных полисахаридов обеспечивает широкий спектр структур частиц (линейные полимеры, разветвленные, циклические), различную химическую композицию (различные моносахариды или α/β-формы в составе одного полимера), диапазон молекулярных масс и вариативность заряда частиц (положительные, отрицательные или нейтральные).

УГЛЕВОДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ И ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ, КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННЫЕ С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ

На начальном этапе разработки наноразмерных углеводных систем доставки акцент был

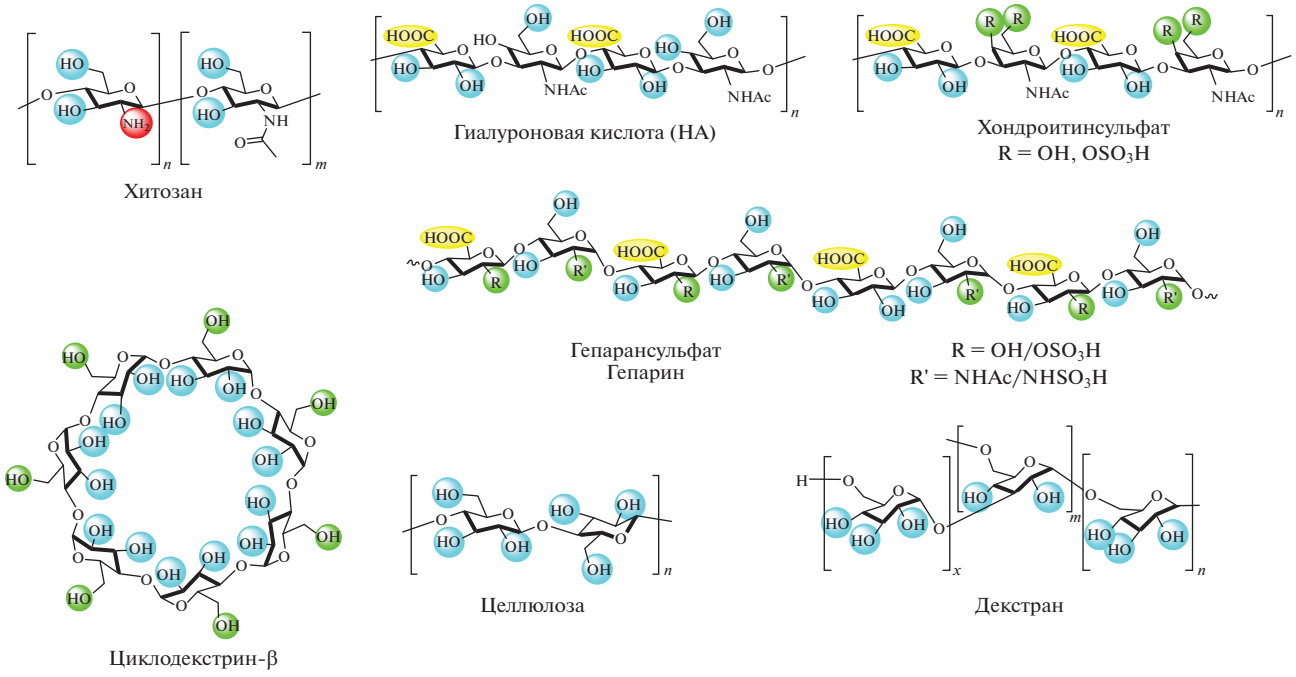


Рис. 6. Структура олиго- и полисахаридов, применяемых для создания систем адресной доставки лекарств.

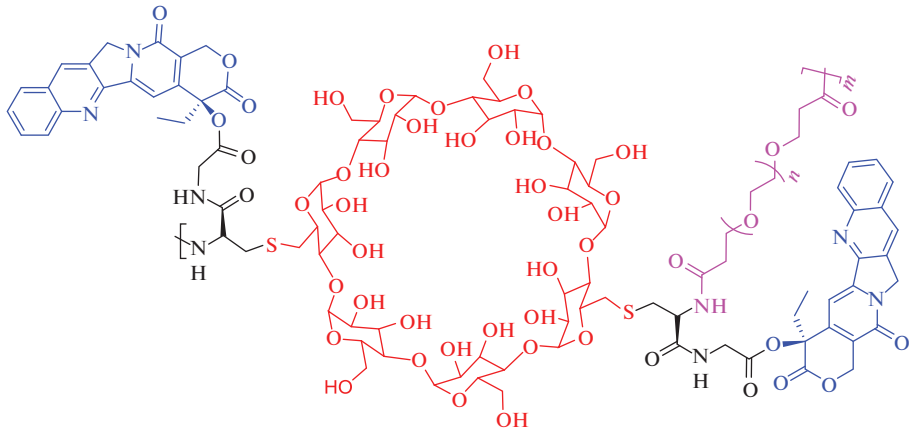


Рис. 7. Система доставки каптотецина, конъюгированного с ПЭГ-функционализированным циклодекстрином, предназначенная для терапии онкозаболеваний.

сделан на создании ковалентных конъюгатов “полисахарид – активное соединение”. В качестве терапевтических фрагментов в конъюгатах использовали доксорубицин [101, 104, 105], паклитаксел [106], доцетаксел [102, 103], цисплатин, метотрексат [107], меркаптопурин [108] и многие другие цитотоксические и цитостатические препараты и агенты фотодинамической терапии (ФДТ) [109–112]. Единственным примером подобных углеводных наночастиц, в настоящее время проходящих клинические испытания, является система доставки камптотецина, в которой он ковалентно сконъюгирован с ПЭГ-модифицированным циклодекстрином [113] (рис. 7).

Повышенная концентрация частиц в пораженных тканях (уровень наночастиц и высвобожденного каптотецина через 24 и 48 ч после введения был на 4 порядка выше, чем для модельного соединения) достигается за счет пассивного таргетирования, обусловленного EPR-эффектом. Данные наночастицы продемонстрировали высокую эффективность на *in vivo* моделях и к настоящему моменту завершили 2-ю стадию клинических испытаний (ClinicalTrials.gov: NCT00333502, NCT01612546).

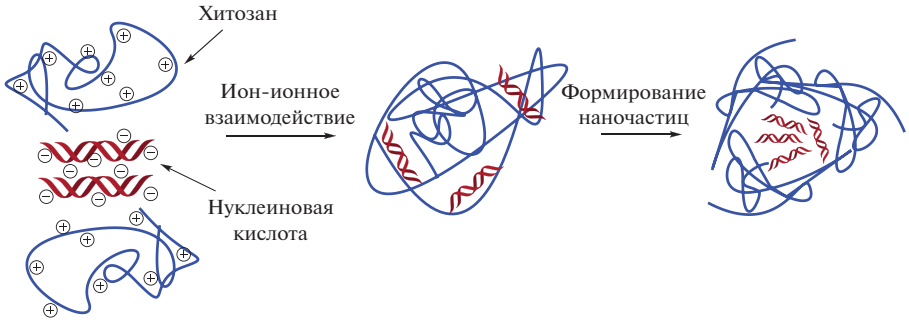


Рис. 8. Образование полиплексов нуклеиновых кислот с хитозаном.

АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В УГЛЕВОДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ЗА СЧЕТ НЕКОВАЛЕНТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Существуют многочисленные примеры нековалентного включения малых молекул в полисахаридные наночастицы. Для увеличения способности к инкапсулированию и мицеллообразованию в водной среде прибегают к модификации частиц при помощи малых молекул [114–119] (стероидов [120–123], длинноцепочечных алкильных заместителей [124–129], ароматических или гетероароматических фрагментов, фолиевой кислоты [130–134]) либо синтетических или природных полимеров [135–139] (полилактид, полияблочная кислота, ПЭГ [140, 141], CPP-пептиды (cell penetrating peptides) и др.). Такая модификация позволяет решить несколько задач:

– создать участки гидрофобности на поверхности полимера, за счет чего частицы приобретают амфифильный характер и самопроизвольно образуют мицеллы в водных средах;

– увеличить время циркуляции частиц и замедлить их опсонизацию;

– производить разгрузку активного соединения в очаге патологии под действием специфических внешних стимулов: pH среды, локальное повышение температуры, магнитное или УФ-воздействие, энзиматическое расщепление;

– увеличить захват клеткой наночастиц за счет CPP-пептидов или векторов адресной доставки;

– образовать полиэлектролитные комплексы, способные к захвату и переносу заряженных молекул.

Наиболее подходящую область биомедицинских приложений для конкретного полисахарида можно определить исходя из строения, состава и заряда макромолекулы. Например, модифицированный (тиолсодержащий) хитозан способен увеличивать проницаемость клеточных мембран, как полагают, из-за их способности к разрушению плотных межклеточных контактов (*tight junctions*) за счет взаимодействия с цистеиновыми аминокислотными фрагментами, входящими в состав мембранных каналов [142]. Это свойство модифицированного хитозана оказалось полезным для доставки в клетки субстратов АТФ-связывающих кассетных белков [143]. Таким образом, не обладая прямыми свойствами векторной молекулы, хитозан, применяемый в качестве носителя для активных молекул, может способствовать их доставке посредством иных механизмов. Кроме того, хитозановые наноконтейнеры ввиду наличия положительно заряженных аминогрупп активно применяют для доставки генного материала [144–147], например, плазмидной ДНК, антисмысловой РНК или олигонуклеотидов. Хитозан способен к образованию полиэлектролитных комплексов с молекулами нуклеиновых кислот (рис. 8).

На эффективность таких систем влияет множество факторов, таких как молекулярная масса хитозана, степень его деацетилирования, степень загрузки ДНК/РНК, pH среды, взаимодействие с компонентами плазмы. Более подробно эти особенности рассмотрены в ряде обзоров [145, 148–150].

Напротив, отрицательно заряженные гликозаминогликаны не применяются в интактном виде для доставки олигонуклеотидов, но, образуя полиэлектролитные комплексы с хитозаном или другими положительно заряженными полимерными молекулами (полиэтиленимин, полигистидин), способны доставлять генный материал [151].

Циклодекстрины представляют особый интерес ввиду способности к образованию комплексов по типу “хозяин–гость” [152]. Их преимуществом является высокий процент загрузки активного компонента и способность к самосборке в водной среде. Молекулы, играющие роль “гостя”, обычно конъюгируют с различными гидрофобными фрагментами, pH-чувствительными или редокс-чувствительными молекулами.

Привлекательным направлением является инкапсулирование фрагментов нуклеиновых кислот в полость циклодекстрина [153, 154]. Установлены основные закономерности эффективности

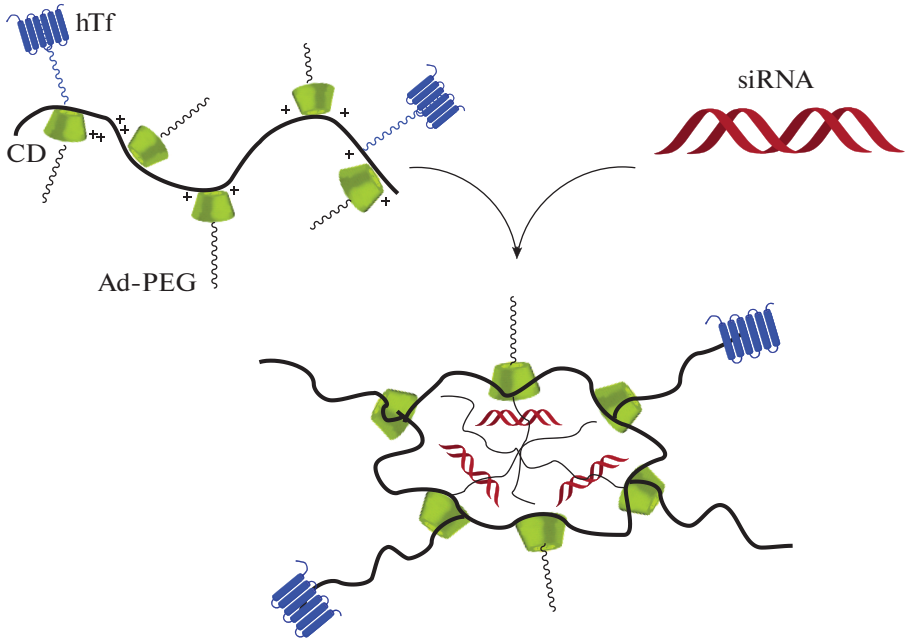


Рис. 9. Система селективной доставки siRNA на основе циклодекстринов. hTf – трансферрин человека, Ad-PEG – адамантилполиэтиленгликоль.

трансфекции в зависимости от размера макроцикла, количества формируемых водородных связей между нуклеиновой кислотой и циклодекстрином, декорирования макроциклов векторными и другими молекулами [155]. В 2014 г. была разработана четырехкомпонентная система (CALAA-01) на основе адамантан-ПЭГ-модифицированного циклодекстрина для доставки siРНК (рис. 9) [156]. В качестве вектора селективной доставки авторами был предложен белок трансферрин человека (hTf), связывающийся с hTf-рецепторами на поверхности опухолевых клеток, при этом циклодекстрины выполняют функцию молекул-носителей, способных к образованию мицелл в водном растворе. В настоящий момент эта разработка находится на 2-й стадии клинических испытаний.

Гиалуроновая кислота [157, 158] и хондроитинсульфат могут быть использованы для адресной доставки к опухолевым клеткам с повышенной экспрессией рецепторов CD44 и CD168 [159–162]. Как правило, гиперэкспрессия этих белков наблюдается при опухолях толстого кишечника, желудка и яичников. Помимо указанных рецепторов было идентифицировано несколько белков для потенциального таргетирования гиалуроновой кислотой, например, рецептор гиалуронат-опосредованной подвижности (RHAMM), HA-рецептор эндоцитоза (HARE) и эндотелиальный рецептор-1 лимфатических сосудов (LYVE-1) [163]. В свою очередь, модифицированный гепарин способен эффективно ингибировать процессы опухолевого ангиогенеза, метастазирования и роста [164, 165]. Однако сами носители в роли векторов не всегда бывают эффективны ввиду их неспецифического взаимодействия с компонентами плазмы крови. Поэтому разрабатываются более сложные системы, зачастую нацеленные на одновременное взаимодействие с несколькими типами рецепторов для адресной доставки и контролируемого высвобождения активного соединения [166–168]. Одним из таких примеров является создание систем для тераностики (фотодинамическая или фототермическая терапия совместно с флуоресцентным имиджингом) на основе золотых наночастиц, покрытых гиалуроновой кислотой и содержащих pH- и редокс-чувствительные фрагменты (рис. 10). Указанные системы показали себя особенно эффективными для терапии HER2-положительного рака молочной железы [169].

Менее популярными материалами для доставки активных препаратов являются целлюлоза [170, 171], декстраны [109, 172, 173] и альгинаты [174]. Их ограниченное применение, в частности, связано с недостаточной растворимостью целлюлозы и разветвленных декстранов в воде, а также непостоянством количественного состава указанных полисахаридов. Несмотря на немногочисленные примеры использования этих материалов для таргетной доставки по сравнению с другими полисахаридами, вышеперечисленные вещества находят применение в биомедицине и фармацевтике для предотвращения тромбообразования и поддержания давления в периферических сосудах [175],

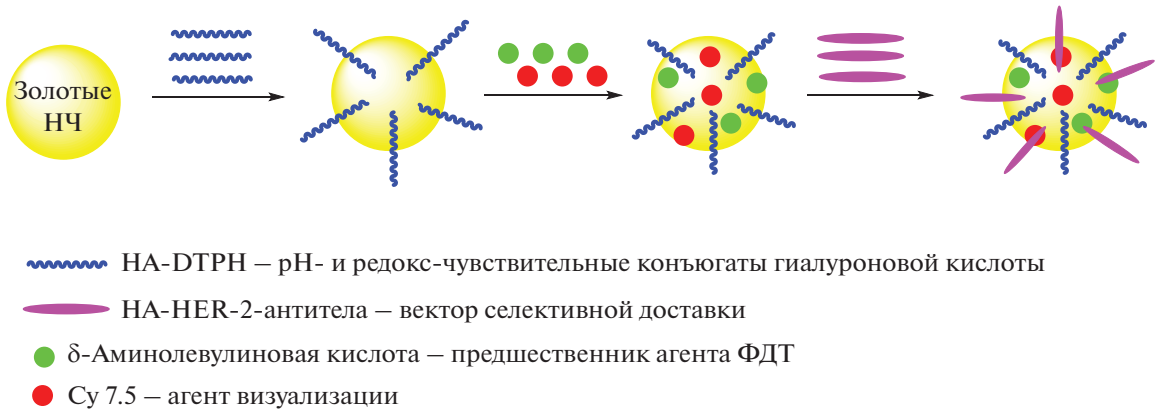


Рис. 10. Дизайн pH- и редокс-чувствительных комбинированных наночастиц (НЧ) для фотодинамической терапии (ФДТ) и имиджинга.

для производства мембран и оболочек таблетированных лекарственных средств [176], а также для комбинированной терапии гастроэзофагеальной рефлюксной болезни [177] и в качестве энтеросорбента.

Таким образом, вопреки обилию работ, посвященных созданию углеводных наночастиц, их использование в направленной доставке терапевтических агентов весьма ограничено и сводится в основном к пассивному накоплению за счет EPR-эффекта. Полагаем, что более перспективным является использование наночастиц или наноконтейнеров, содержащих адресные углеводные векторы (рассмотрены в следующем разделе).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИГАНДОВ ЛЕКТИНОВ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ

Лектины – белки, которые с очень высокой специфичностью распознают и связывают углеводные лиганды, присоединенные к белкам и липидам, на клеточной поверхности или внутри клеток [178]. Высокоселективное связывание углеводов с лектинами возможно благодаря наличию в их полипептидных цепях домена распознавания углеводов (Carbohydrate Recognition Domain, CRD). Несмотря на то что лектины не проявляют энзиматической активности, они обладают широким спектром функций, включая регулирование межклеточных и клеточно-матричных взаимодействий в нормальных и опухолевых тканях.

Лектины могут быть классифицированы в различные семейства [178]. К C-типу относят обширный класс лектинов, которым требуются ионы Ca^{2+} для связывания с белками. Например, для таргетирования селектинов (E-, L-, P-селектинов), относящихся к семейству лектинов C-типа, в качестве “наименьшей углеводной единицы” необходимы Sialyl Lewis X (sLe^X) и Sialyl Lewis A (sLe^A). К S-типу лектинов относятся белки, которым для стабилизации необходимы свободные тиолы. Они имеют значительную аффинность к β-галактазидам, и в современной химии их часто называют галектинами, причем не все они являются тиолзависимыми. Лектины, распознающие остатки Man-6-P, называют лектинами P-типа. В 1990-е гг. было установлено, что иммуноглобулины способны распознавать углеводы, что привело к открытию лектинов I-типа, которые являются частью суперсемейства иммуноглобулинов и важны для иммунной системы. В этом семействе I-лектинов белки, способные распознавать остатки сиаловых кислот, назвали сиглеками (Siglecs – sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins). Благодаря своим паттернам экспрессии, эндоцитическим свойствам и способности модулировать передачу сигналов рецепторами сиглеки стали привлекательными мишенями для клеточно-направленной терапии. Следует отметить, что в настоящее время, ввиду большого разнообразия, не существует единой и универсальной классификации лектинов.

Известны две основные стратегии использования лектинов для нацеливания лекарственных агентов на терапевтические мишени, связанные с применением олигосахаридов или самих лектинов в качестве фрагментов систем адресной доставки [179]. Подход с применением обратного таргетирования лектинами предполагает оснащение систем адресной доставки экзогенными лектинами, которые затем связываются с комплементарными гликопротеинами или гликолипидами, экспрессированными на поверхности соответствующих клеток. Как правило, для этих целей используются лектины, получаемые из растительных источников [180].

Прямое таргетирование лектинов или гликотаргетирование, интересующее нас в большей степени в рамках данного обзора, заключается в

декорировании систем адресной доставки углеводными векторами, которые распознаются и интернализируются эндогенными лектинами, расположенными на поверхности клеток.

К примеру, высокая экспрессия галектина-1 в опухолевых клетках положительно коррелирует с метастатическим фенотипом и слабо дифференцированной морфологией, при этом экспрессия галектина-3 сильно варьируется на разных стадиях развития многих опухолей [181]. Многочисленные сообщения подтверждают прямую корреляцию экспрессии галектина-3 с карциномами толстой кишки, молочной железы, желудка, эндометрия, языка и щитовидной железы. Не стоит забывать, что галектины-1 и 3 экспрессируются также и в нормальных клетках, но в значительно меньшей степени по сравнению с опухолевыми [97].

КОНЪЮГАТЫ ГАЛЕКТИНОВЫХ ЛИГАНДОВ С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ, ОБЛАДАЮЩИЕ СВОЙСТВОМ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ

Недавно были созданы разнообразные углеводные конъюгаты терапевтических агентов с высокой аффинностью к галектинам-1 и 3 (рис. 11). Например, галектин-специфичный лактозилированный стероид (**I**) при системном введении существенно увеличивает выживаемость мышей с привитой лимфомой или нейробластомой человека [182, 183]. Галактозилированные комплексы платины (**II**), так же как и цисплатин и его аналоги, обладают высокой противоопухолевой активностью [184, 185]. Использование полигалактозилированных хлоринов, порфиринов и фталоцианинов (например, соединения (**III**) и (**IV**)), обладающих аффинностью к галектину-1, приводит к повышению эффективности лечения опухолей методом ФДТ по сравнению с использованием негликозилированных фотосенсибилизаторов [186–188]. Синтезированы неогликопротеины (**V**) (рис. 11), имеющие высокую аффинность к галектину-3 человека [189].

Существует множество вариантов адресных гликоконъюгатов, нацеленных и на другие типы и семейства лектинов [190], однако такое таргетирование является далеко не “идеальным” ввиду того, что в подавляющем большинстве случаев лектины экспрессируются не только “пораженными”, но и здоровыми клетками, как и в случае с фолатными рецепторами, EGFR, VEGF и другими “опухолевыми” мишенями [191–194].

ПРИМЕНЕНИЕ Sialyl Lewis X И Sialyl Lewis A ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ

Хорошие перспективы имеет таргетирование селектинов с использованием sLe^X (Sialyl Lewis X) и sLe^A (Sialyl Lewis A) – изомерных тетрасахаридов, состоящих из *N*-ацетилглюкозамина, галактозы, нейраминовой кислоты и фукозы (рис. 12).

В организме человека sLe^X и sLe^A выполняют важные функции в работе иммунной системы. Они участвуют в инфильтрации лейкоцитов, нейтрофилов и моноцитов в очаг воспаления за счет взаимодействия между Е-селектином, экспрессируемым на активированных эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, и лигандами sLe^X и sLe^A, находящимися на поверхности циркулирующих клеток [195].

Одним из наиболее развитых биомедицинских приложений для указанных олигосахаридов является их использование в качестве маркеров диагностики некоторых аутоиммунных заболеваний и различных типов рака [196–199].

Способность sLe^X и sLe^A связываться с селектинами была использована при создании векторных липосом для направленной доставки малых молекул, таких как дексаметазон [200, 201], комбретастатин А4 [202], мелфалан [203, 204], метотрексат [205–207], цисплатин [208], моногалактозилдиацилглицерол [209], доксорубицин [210], а также антисмысловых олигонуклеотидов [211] и протеинов [212]. Общая структура таргетных липосом представлена на рис. 13, а вид липидного производного sLe^X может варьироваться.

Кроме того, векторные свойства sLe^X были использованы для доставки мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (MSCs) для регенерации тканей [213]. MSCs были соединены с биотинилированными липидными везикулами, что способствовало прививке биотина на поверхность стволовых клеток. Последующее биоконъюгирование с sLe^X проводилось посредством создания прочных нековалентных комплексов остатков биотина в MSC-модифицированных клетках и в производных sLe^X–биотин при добавлении в систему белка стрептавидина [214, 215] (рис. 14). Этот пример иллюстрирует возможность эффективной иммобилизации адгезивных лигандов и потенциального нацеливания sLe^X-декорированных клеток, системно вводимых в область воспаления.

Помимо указанных областей, sLe^X являются основой для разработки TACA-вакцин [216–218] для иммунотерапии опухолей, однако ни одна из них к настоящему времени не одобрена FDA [219].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФУКОИДАНОВЫХ ЛИГАНДОВ Р-СЕЛЕКТИНОВ В ТЕРАПИИ РАКА И НЕИНВАЗИВНОМ ИМИДЖИНГЕ

Р-селектин – мембранный протеин, является адгезионной молекулой и экспрессируется на поверхности эндотелия при атеротромботических поражениях. Установлено [220], что природный

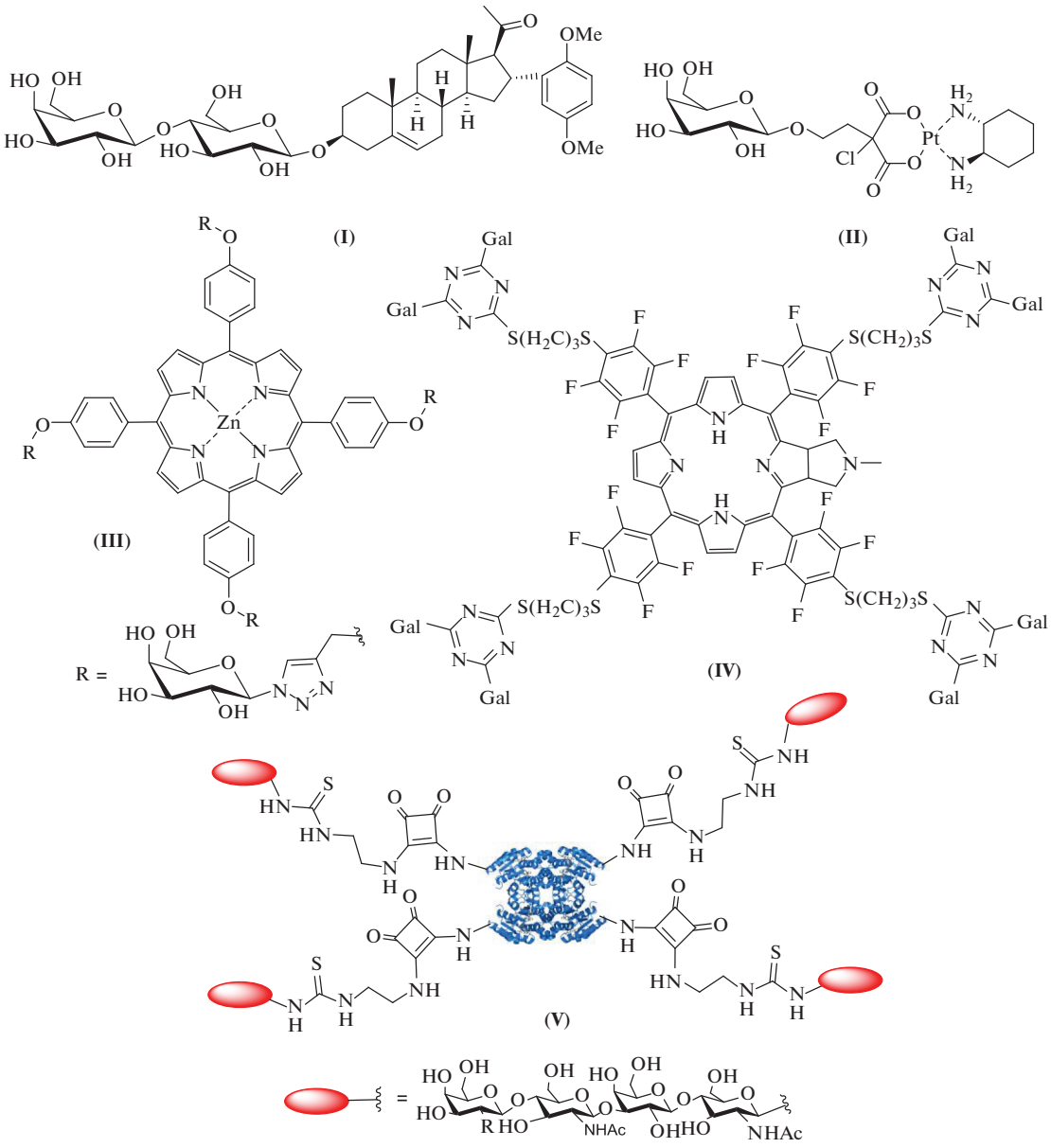


Рис. 11. Молекулы, нацеленные на галектины-1 и 3.

сульфированный полисахарид фукоидан (рис. 15), строение которого может варьироваться в зависимости от природного источника [221, 222], проявляет высокое сродство к Р-селектину и может применяться в качестве вектора адресной доставки.

Так, фукоидан был использован для доставки противоопухолевых агентов, например, доксорубицина и паклитаксола, являясь одновременно как носителем, так и векторной компонентой [223]. Помимо онкологических приложений, фукоидан применялся в качестве вектора для создания диагностических контрастеров при атеротромбических поражениях и инфаркте миокарда [220, 224]. Наночастицы, содержащие фукоидан и нацеленные на Р-селектин, демонстрируют значительный потенциал для терапии острых тромбозов, причем используемые наночастицы не вызывают нежелательных иммунных реакций [225]. Меченный технецием-99 фукоидан оказался эффективен при диагностике тромбоза брюшной аорты и эндокардита. Клинические испытания данного препарата были завершены в 2019 г. и показали его безопасность [226, 227]. Необходимо отметить, что фукоидан и сам по себе проявляет противоопухолевую активность [228]. В связи с этим исследуется эффективность его использования в качестве поддерживающей терапии при лечении различных типов рака (Clinicaltrials.gov: NCT04066660, NCT03130829, NCT04342949, данные на 01.09.2020).

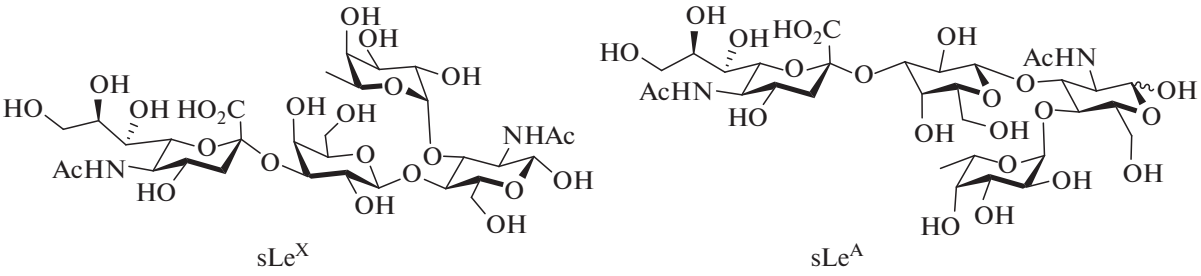


Рис. 12. Структуры Sialyl Lewis X (sLe^X) и Sialyl Lewis A (sLe^A).

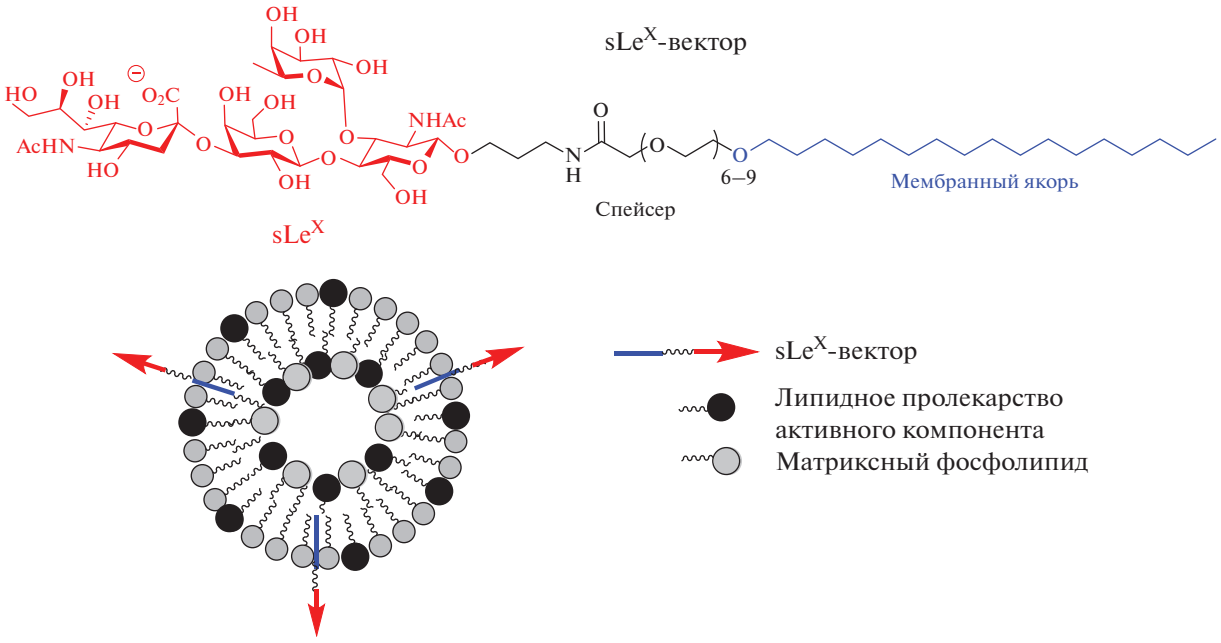


Рис. 13. Схематичное изображение sLe^X-липосом и пример sLe^X-вектора.

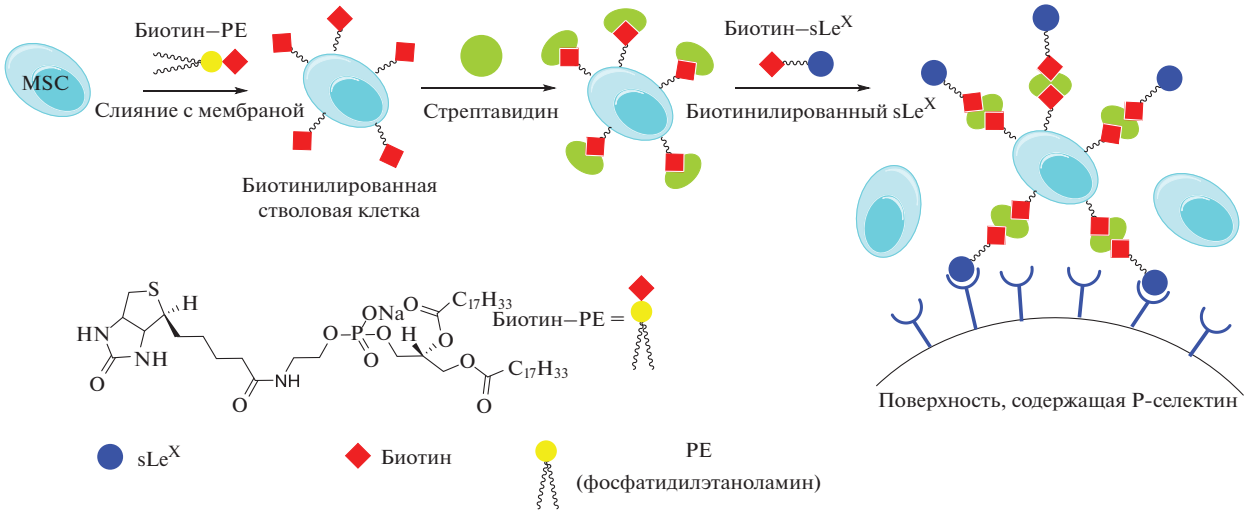


Рис. 14. Модификация мезенхимальных стволовых клеток (MSC) с помощью sLe^X.

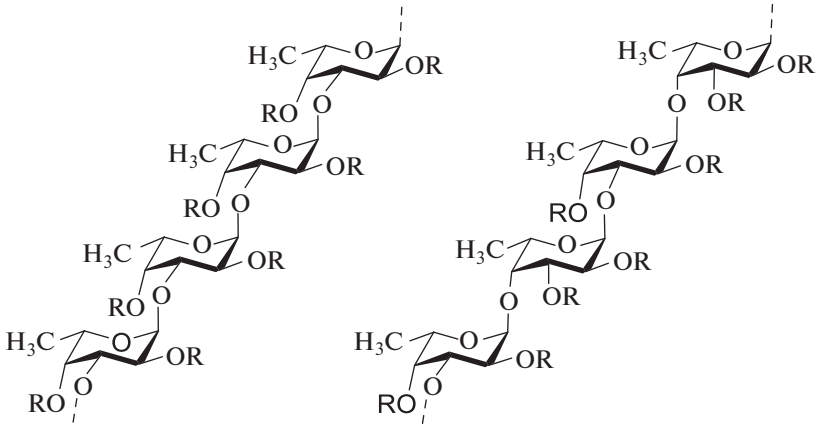


Рис. 15. Типы основных цепей фукоиданов, выделенных из бурых водорослей. Гомофукозный скелет молекулы может быть представлен в виде 1→3 звеньев фукозы либо содержит чередующиеся остатки 1→3 и 1→4. Символами R обозначены места для углеводных заместителей и сульфогрупп [222].

Разработка методов синтеза линейных и разветвленных несульфатированных [229] и сульфатированных олигосахаридов [230–232], родственных цепям фукоиданов, открывает возможность для получения векторов, отвечающих требованиям производства GMP, что проблематично в случае гетерогенных смесей низкомолекулярных фукоиданов.

ЛИГАНДЫ СИГЛЕКОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ И ИММУНОТЕРАПИИ

Эффекторные клетки, такие как естественные киллеры (natural killer, NK-клетки) или Т-киллеры, могут обнаруживать молекулы, иммунологически чуждые хозяину, и уничтожают их, чтобы защитить организм-хозяин. Опухолевые клетки экспрессируют аберрантные белки на поверхности клеток, которые могут распознаваться специфическими иммунными эффекторами, что приводит к разрушению злокачественных образований, поэтому иммунная система может играть критическую роль в подавлении первоначального образования опухоли. Тем не менее злокачественные опухоли обладают способностью избегать иммунного ответа [97, 233].

Особую роль в функционировании иммунной системы играют сиглеки – связывающие сиаловую кислоту лектины иммуноглобулинового типа, которые экспрессируются на большинстве белых кровяных клеток иммунной системы и критически важны для передачи сигналов иммунных клеток. Благодаря распознаванию гликанов, содержащих сиаловую кислоту в качестве лигандов, они помогают иммунной системе осуществлять дифференцирование “свой/чужой” [234]. Сиглеки экспрессируются на инфильтрирующих опухоль Т-клетках, NK-клетках, дендритных клетках, макрофагах и тем самым функционируют в качестве мишеней для иммунного контроля. Это свойство сиглеков может быть использовано при разработке терапевтических средств, направленных на усиление противоопухолевого иммунного ответа [235, 236]. Гиперсиалилирование раковых клеток является признаком плохого прогноза, и считается, что оно помогает опухолевым клеткам выходить из-под иммунного надзора [237]. Сиаловые кислоты, являющиеся лигандами для ингибирования сиглеков, могут рекрутировать сиглеки для подавления иммунных реакций. Для восстановления функций иммунных клеток необходимо вытеснение сиаловых кислот из сайта связывания с ингибиторными сиглеками с применением специфических лигандов.

Лиганд-опосредованное тагретирование сиглеков используется для доставки диагностических или терапевтических агентов в различные иммунные клетки [238–240]. Ключевой проблемой этой стратегии является идентификация лектиновых лигандов, способных с высокой аффинностью таргетировать целевой сиглек. Природные сиалилированные гликановые лиганды сиглеков имеют различную селективность и, как правило, весьма низкую аффинность [241]. При этом они могут служить отправной точкой для разработки более эффективных синтетических лигандов. Скрининг больших библиотек гликановых аналогов привел к разработке ряда синтетических лигандов к различным сиглекам – “точечно” модифицированных олигосахаридов, обладающих высокой аффинностью [242–244].

Например, синтетические разветвленные “трехантенные” лиганды (**VII**–**IX**) (рис. 16) демонстрируют на 3 порядка большую аффинность по отношению к CD22 (hCD22) или сиглеку-2 человека по сравнению с природным “моноантен-

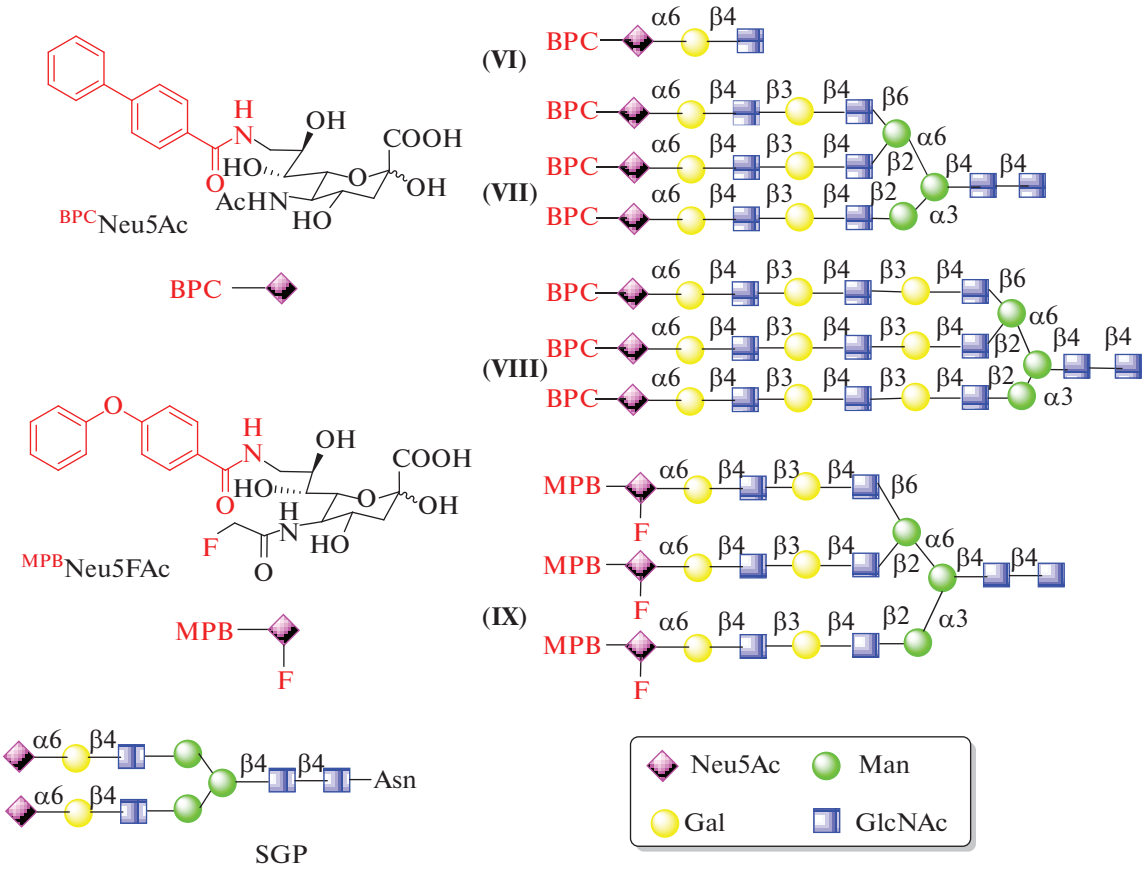


Рис. 16. Химическая структура лигандов CD22 – "точечно" модифицированных производных Neu. BPC – бифенилкарбоксамид, MPB – *м*-феноксибензамид, SGP – асиагликопротеин природного происхождения.

ным" модифицированным по C9 трисахаридным (Neu5Acα2–6Galβ1–4GlcNAc) лигандом CD22 (**VI**) или природным олигосахаридом SGP (рис. 16) [244]. Важным структурным элементом этих лигандов является модифицированный бензоатный амид в положении C9 и/или C5 сиаловой кислоты, наличие которого приводит к существенному увеличению авидности и селективности по отношению к CD22 [242, 243, 245].

Такая высокая аффинность "трехантенных" лигандов, очевидно, обусловлена одновременным связыванием различных ветвей с CD22-рецепторами на поверхности клеток. Для такого мультивалентного взаимодействия необходимо, чтобы сайты связывания лиганда с двумя молекулами CD22 находились друг от друга на расстоянии, не превышающем 30–50 Å [246].

Лиганды (**VII**–**IX**) (рис. 16) являются более эффективными по сравнению с эндогенными гликанами [244]. Показано, что они способны связываться и эндоцитироваться с помощью hCD22 с клетками лимфомы Дауди B, которые экспрессируют природные лиганды CD22, предотвращающие связывание слабых экзогенных лигандов с рецепторами hCD22 [247]. Конъюгаты лиганда (**IX**) с токсинами сапорином и ауристатином обладают цитотоксичностью в субнаномолярных концентрациях по отношению к клеткам лимфомы Дауди B и на несколько порядков превосходят эффективность конъюгатов токсинов с моноантенными лигандами или с сиаловой кислотой [244]. К сожалению, данных по исследованиям лигандов (**VII**–**IX**) *in vivo* в цитируемых работах не приводится.

Более современным подходом в противоопухолевой терапии является нацеливание иммунных клеток на опухолевые ткани. Так, использование химерных T-клеток (CAR-T) является прорывной технологией для лечения рака [248, 249]. Тем не менее CAR-T-терапия имеет ряд ограничений: 1) необходимость выделить собственные T-клетки пациента, модифицировать их генетически рецептором химерного антигена для распознавания опухоли с последующим введением обратно в организм пациента; 2) высокая стоимость CAR-T-терапии (~500000 долларов США на одного пациента); 3) невозможность получить достаточное количество аутологичных T-клеток для генерации CAR-T у пациентов после химио- и радиотерапии; 4) невозможность лечения пациен-

тов с быстро прогрессирующими онкологическими заболеваниями [250].

NK-клетки представляют собой другой тип цитотоксических иммунных клеток, которые способны убивать опухолевые клетки, являясь альтернативой Т-клеточной терапии [250]. Они могут быть получены в больших масштабах и легко доступны для пациентов. К сожалению, NK-клетки не обладают врожденными способностями нацеливания на раковые клетки. Для преодоления этого недостатка NK-клетки были генетически декорированы химерными антигенными рецепторами CAR–NK [251], что, однако, привело к невысокой экспрессии трансгена ввиду того, что NK-клетки неблагоприятно влияют на поглощение эндогенных генов [252].

В 2020 г. опубликована первая работа, посвященная декорированию NK-клеток углеводными лигандами сиглека-2 (CD22) – маркера В-клеточной лимфомы – путем метаболической инженерии либо инкорпорирования гликополимеров [111]. В качестве лигандов CD22 использовались производные на основе 9-*O*-модифицированной сиаловой кислоты (**X**) и (**XI**) или амфифильный полимер, содержащий трисахарид (**XII**) (~100 трисахаридных фрагмента на полимерную цепь), который может непосредственно вставляться в мембрану NK-92, придавая клеткам NK-92 таргетную способность по отношению к рецепторам CD22 (рис. 17).

Модифицированные таким образом NK-клетки проявляли значительно возросшую цитотоксичность по отношению к CD22-зависимым клеткам лимфомы $CD22^+$. С помощью сконструированных NK-клеток можно более эффективно ингибировать не только клеточные линии лимфомы $CD22^+$, но и клетки первичной лимфомы. И, наконец, применение модифицированных углеводными векторами NK-клеток для лечения мышей с привитой В-клеточной лимфомой демонстрировало значительно большую выживаемость животных по сравнению с контрольными группами. Таким образом, метаболическая гликоинженерия NK-клеток может быть расценена как перспективный подход для лечения онкологических заболеваний и хорошее дополнение к генной инженерии при создании химерных антигенных рецепторов.

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ГЛЮКОЗАМИН – СЕЛЕКТИВНЫЙ ЛИГАНД ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ С КЛЕТКАМИ ЛАНГЕРГАНСА ЧЕЛОВЕКА

Клетки Лангерганса (КЛ) представляют собой подвид дендритных клеток. Кожа содержит несколько наборов дендритных клеток – иммунных клеток, которые специализируются на интернализации патогенов для индуцирования Т-клеточных ответов [253]. КЛ составляют подвид дендритных клеток, находящихся во всех слоях кожи. После активации КЛ мигрируют в дренирующие лимфатические узлы, вызывая системные иммунные ответы [254]. Благодаря своей локализации в эпидермисе и способности перекрестно представлять экзогенные антигены цитотоксическим Т-клеткам, дендритные клетки стали перспективными мишенями для стратегий трансдермальной противоопухолевой вакцинации [255, 256]. Важно отметить, что индукция защитного Т-клеточного иммунитета этими вакцинами требует эффективной и специфичной доставки как опухолевых антигенов, так и адъювантов.

Для таргетирования клеток Лангерганса предложено сульфамидное производное глюкозамина (**XIII**) (рис. 18), способное с высокой аффинностью связываться с лангергином (CD207) – рецептором лектина С-типа [257, 258]. На основе этого лиганда был синтезирован соответствующий гликолипид (**XIV**), что позволило создать адресные липосомальные наночастицы, нагруженные белковыми антигенами. Показано, что полученные липосомы адресно доставляются в КЛ, интернализуются в эндосомах и лизосомах, после чего происходит разгрузка наночастиц.

Эти факты демонстрируют применимость иммунолипосом, содержащих адресные углеводные векторы, для создания белковых вакцин [258].

Приведенные выше примеры показывают, что конъюгирование с олигосахаридами и гликанами может с успехом использоваться в противоопухолевой терапии, как и конъюгирование с антителами.

ГЛИКОМИМЕТИКИ И МОДИФИЦИРОВАННЫЕ УГЛЕВОДЫ

Несмотря на огромное структурное разнообразие углеводных скаффолдов и практически неограниченные возможности для их использования в качестве селективных векторов для молекулярного распознавания, углеводные лиганды имеют ряд недостатков. Поскольку между углеводами и белками реализуются только низкоэнергетические взаимодействия (водородные связи, хелатирование металлов, солевые мостики и слабые гидрофобные контакты), эффективное связывание с лектинами (белками) обычно возможно в высоком микромолярном–миллимолярном диапазоне концентраций [259, 260]. Эти слабые взаимодействия не могут компенсировать энтальпийные потери, возникающие при десольватации полярного лиганда и сайта связывания, поэтому мультивалентные взаимодействия с лектинами, как правило, более выигрышны. Легкость, с которой растворитель способен вытеснять углеводный лиганд из белкового сайта, приводит к

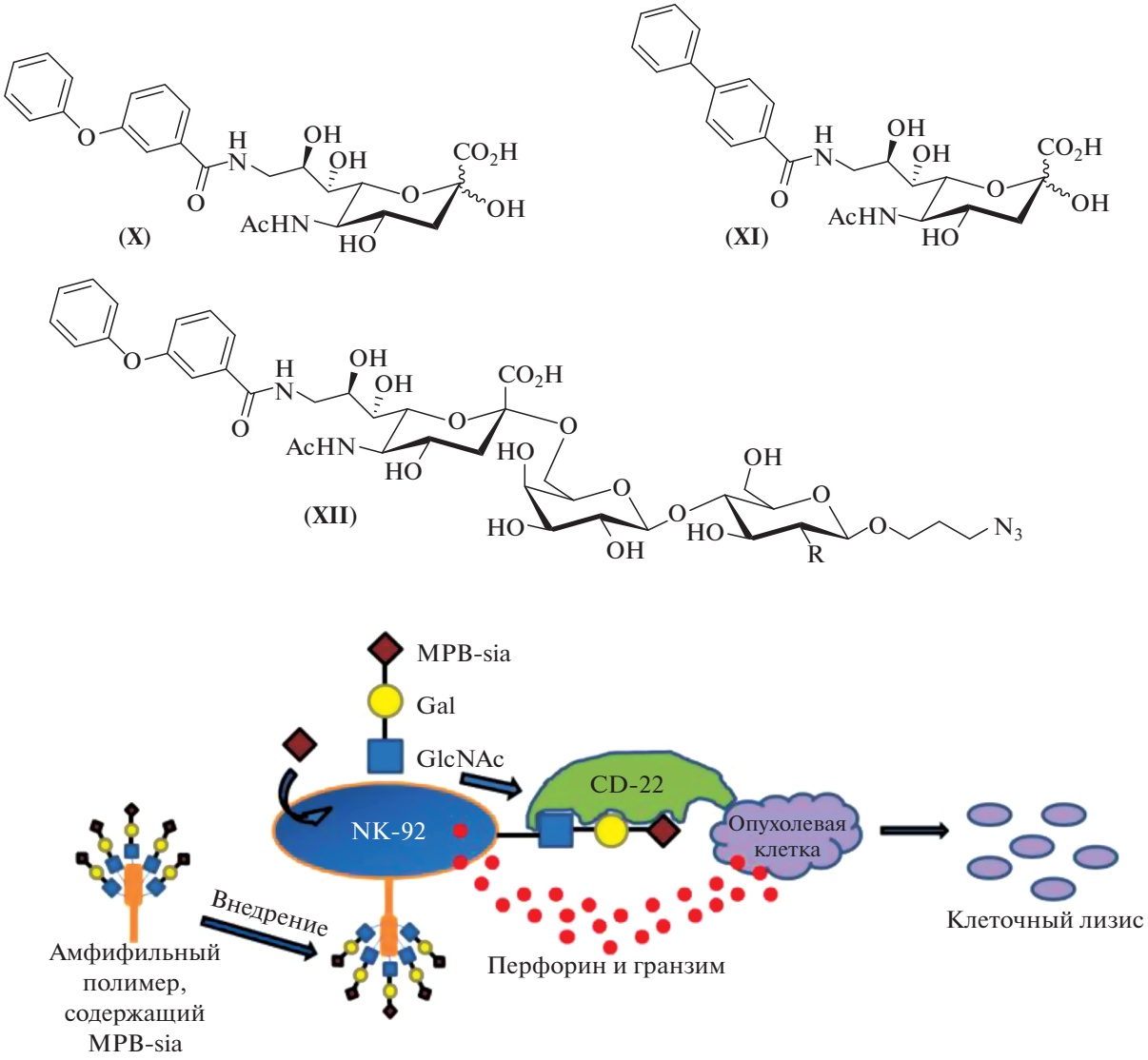


Рис. 17. Модификация клеток NK-92 лигандами CD22 (**X**–**XII**) с помощью гликоинженерии, приводящая к повышению способности нацеливания и связывания клеток NK-92 с CD22-позитивными клетками, что приводит к более эффективному лизису раковых клеток-мишеней.

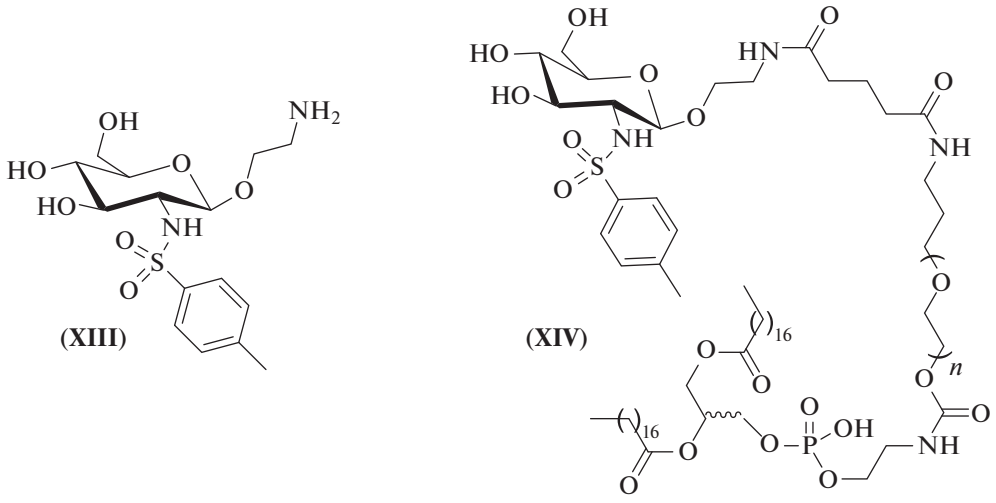


Рис. 18. Лиганды для таргетирования клеток Лангерганса.

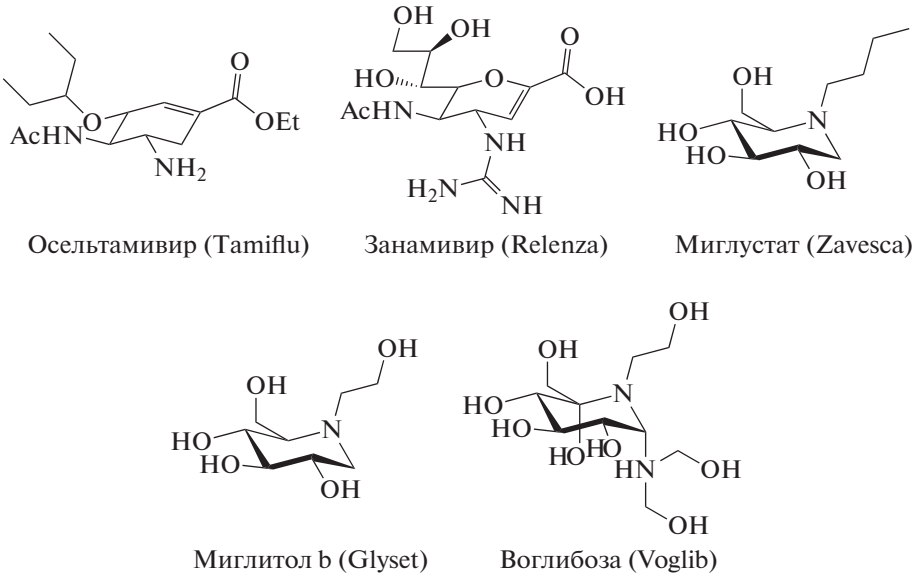


Рис. 19. Гликомиметики, применяемые в клинической практике.

серьезному уменьшению времени циркуляции – попав в кровоток, углеводы очень быстро подвергаются почечной экскреции.

И, наконец, природные углеводные лиганды ограниченно применимы в пероральной терапии, поскольку они имеют низкую способность к проникновению через слой энтероцитов в кишечнике. Такое пассивное проникновение характерно для молекул с низкой молекулярной массой, ограниченной полярной поверхностью и небольшим количеством доноров и акцепторов Н-связи (правила Липинского и Вебера) [261]. Исходя из этого, перспективным направлением является создание гликомиметиков и/или "точечно" модифицированных углеводов – соединений, способных имитировать структуру и функциональные группы природных углеводов при связывании с белковыми мишенями [229, 235], что было продемонстрировано в предыдущем разделе. По сравнению с природными углеводными лигандами, хорошо сконструированные гликомиметики имеют повышенную аффинность к мишени, большую биодоступность и длительные периоды полувыведения из организма. Эффективность этого подхода подтверждается успешными примерами клинического использования ряда препаратов. Например, осельтамивир (Tamiflu) и занамивир (Relenza) являются гликомиметическими ингибиторами нейраминидазы гриппа (рис. 19). Они способны ингибировать расщепление концевых остатков сиаловой кислоты (Neu5Ac) на клетках-хозяевах, останавливая тем самым размножение вируса [262, 263]. Миглустат – ингибитор глюкозилцерамидсинтетазы, используется при лечении болезни Гоше I типа для предотвращения накопления глюкозилцерамида [264]. Успешным семейством терапевтических гликомиметиков являются ингибиторы α-глюкозидазы (миглитол b, воглибоза), которые применяются для лечения диабета и лизосомальных нарушений [265].

Гликомиметики используются в качестве антигенов в углеводно-конъюгатных вакцинах [266]. Установлено, что синтетические гликомиметические структуры усиливают иммуногенность и при правильном дизайне могут вызывать выработку антител, которые перекрестно реагируют с природными гликанами.

ДИЗАЙН ГЛИКОМИМЕТИКОВ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕВОДОВ

Уменьшение площади полярной поверхности лиганда, как правило, усиливает связывание лиганда с мишенью путем создания новых гидрофобных контактов с белком, а также благодаря снижению энтальпийного вклада, обусловленного эффектами десольватации [267]. Удаление полярных функциональных групп, не вовлеченных в связывание с белками, чаще всего гидроксильных групп, усиливает эти взаимодействия. Для улучшения аффинности при создании гликомиметиков на основе углеводных молекул очень часто используют концепцию биоизостерного замещения функциональных групп (табл. 2).

Например, фторированные миметики гликопептидов (**XV**) на основе MUC-1 перекрестно реагируют с сывороточными антителами мышей, которые были вакцинированы природным антигеном (рис. 20) [268]. Атом фтора также можно использовать в качестве подходящей замены ато-

Таблица 2. Примеры биоизостерных групп

Исходная группа	Возможная биоизостерная группа
H	D, F
OH	F, SH, SeH, NH_2
	O, S, NH
Br	Cl, CN, CF_3
O, OH	O, NH_2; O, O, S, OH

ма водорода благодаря небольшому размеру и относительной гидрофобности; замена аксиального С3-протона на фтор в сиаловой кислоте (Neu5Ac) позволяет получить модифицированный моносахарид (**XVI**) – эффективный ингибитор сиалилтрансферазы [269].

Введение гидрофобной группы в “несвязывающее” положение лиганда нарушает сольватацию лиганда водой и, как следствие, уменьшает энтальпию десольватации [270]. Для лектинов с хорошо структурированными сайтами введение гидрофобных фрагментов часто создает термодинамически благоприятные возможности связывания. Например, модифицированные моносахариды – лиганды сиглека-2 (CD22), содержащие С9-амидный ароматический фрагмент, С4-ацильный заместитель и *н*-алкил в С2-положении Neu5Ac (соединения (**XVIII**), (**XIX**) и (**XX**)), обладают на несколько порядков большей аффинностью по отношению к белковым рецепторам по сравнению с лигандом (**XVII**) (рис. 20) [271].

Еще одной стратегией, используемой при создании гликомиметиков, является конструирование ковалентных ингибиторов [272, 273]. Например, модифицированный моносахарид (**XXI**) (рис. 20) эффективно таргетирует LecA *Pseudomonas aeruginosa*, ковалентно связываясь с Cys62, при этом увеличивается время циркуляции лиганда [274].

И, наконец, для улучшения эффективности связывания используются лиганды, способные имитировать мультивалентные взаимодействия, характерные для природных углеводных лигандов, как, например, в случае конструирования антагонистов DC-SIGN – производных соединения (**XXII**), эффективных в наномолярных концентрациях (рис. 21) [275, 276].

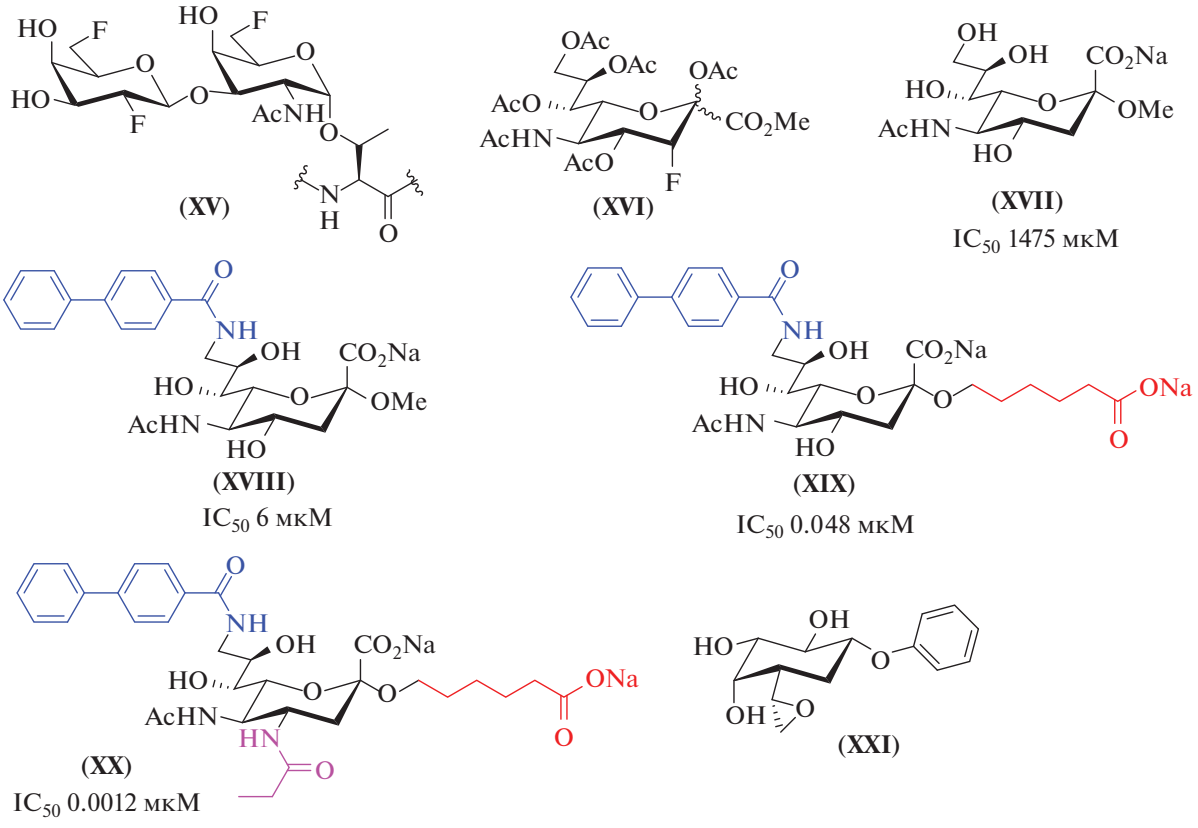


Рис. 20. Различные типы модифицированных углеводов.

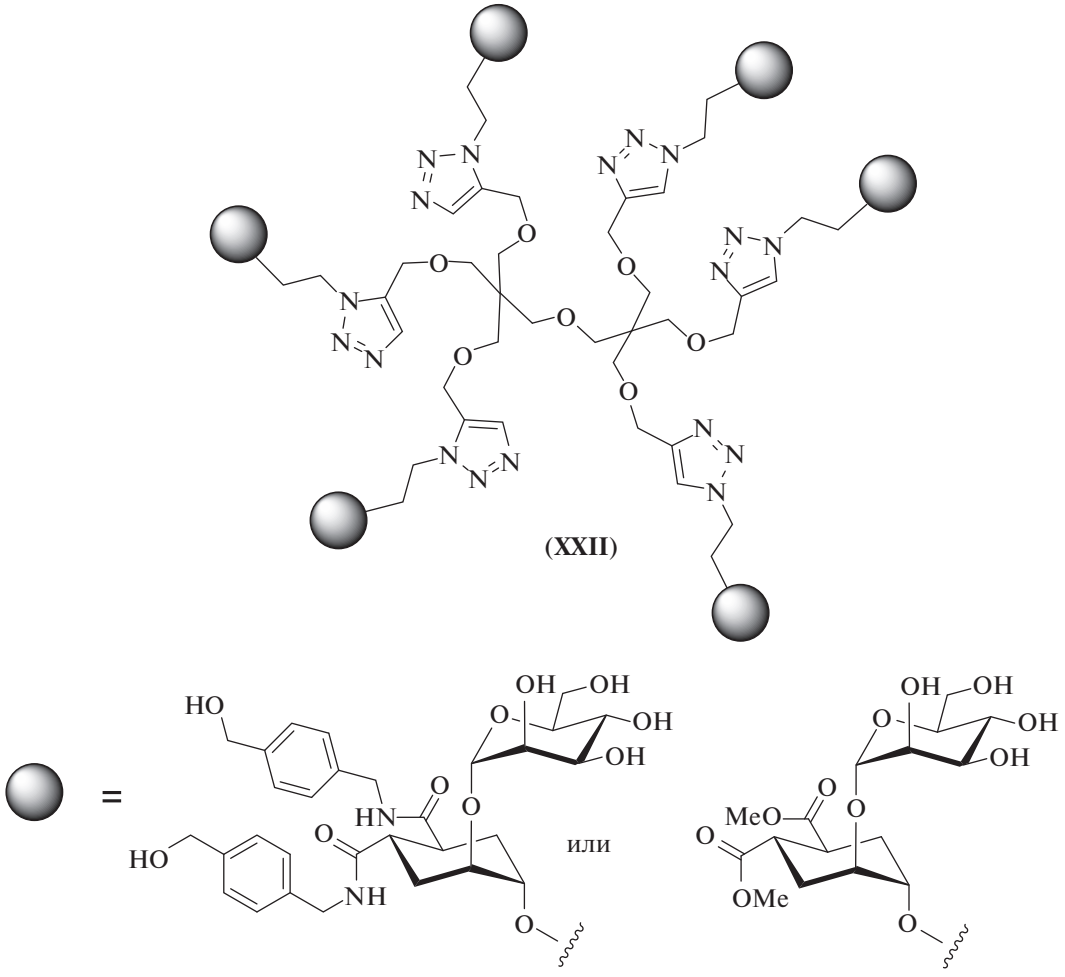


Рис. 21. Гексадентатный гликоконъюгат.

Применение гликомиметиков и модифицированных моно- и олигосахаридов вместо природных углеводов позволяет не только увеличить аффинность связывания таргетного вектора с белковой мишенью, но также улучшить фармакокинетические свойства лиганда: предотвратить его ферментативный гидролиз, улучшить биодоступность, увеличить времена выведения и циркуляции от секунд и минут (в случае природных углеводов) до часов (при использовании миметиков и “точечно” модифицированных углеводов) [270].

Таким образом, парадигма дизайна адресных углеводных или углеводоподобных лигандов, нацеленных на белковые мишени, сводится к поиску сложного набора компромиссов между селективностью, аффинностью и фармакокинетическими параметрами создаваемых векторов. Природные углеводные лиганды обладают несомненным преимуществом, обусловленным высокой селективностью по отношению к белковым рецепторам, причем различные олигосахариды способны предпочтительно таргетировать один сайт связывания при наличии множества структурно похожих рецепторов. При этом они обладают, как правило, невысокой аффинностью и неудовлетворительными фармакокинетическими профилями. Углеводные миметики и модифицированные углеводы, напротив, при некоторой потере селективности выигрывают благодаря аффинности связывания и улучшенным фармакокинетическим параметрам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Использование углеводных молекул, модифицированных углеводов и гликомиметиков не только в качестве векторов адресной доставки, но и в виде “независимых” терапевтических агентов может рассматриваться как одно из перспективных направлений медицинской химии. Эти соединения обладают уникальными способностями селективно и с высокой аффинностью связываться с белковыми рецепторами, имеют хорошую растворимость в воде, проявляют высокую биосовместимость и обеспечивают хорошую стабильность инкапсулирования. Приведенные в этом обзоре данные по адресной доставке с при-

менением моносахаридов, углеводных наночастиц, а также использованию олигосахаридов, гликомиметиков и точечно модифицированных углеводов в таргетировании лектиновых мишеней и иммунотерапии подчеркивают привлекательность и несомненную практическую востребованность этого направления исследований. При этом стоит учитывать, что несмотря на неоспоримые достоинства углеводных адресных систем, эта научная область таит в себе многие "подводные рифы", о которые "разбиваются мечты" о создании идеального таргетного препарата для персонализированной медицины.

Так, учитывая уникальные таргетные способности векторов, содержащих фрагменты GalNAc, биоконъюгаты GalNAc–ON и GalNAc–siRNA для лечения заболеваний печени заняли свое место на фармацевтическом рынке, а также проходят клинические испытания для терапии гепатита B, гемофилии, сердечно-сосудистых заболеваний, тромбоза и ряда других болезней. Наряду с этим нужно помнить, что моносахариды, как и другие малые терапевтические молекулы, обладают токсичностью и рядом побочных эффектов (например, галактоза наносит существенный вред больным с галактоземией [277], конъюгаты GalNAc–ON в некоторых случаях нефротоксичны [38, 278], *D*-галактозамин способен поражать клетки печени [279]).

В случае дизайна адресных углеводных наночастиц предложен ряд привлекательных концепций доставки терапевтических агентов к целевым тканям и органам. При этом к нерешенным проблемам относится преодоление механизмов выведения ксенобиотиков из организма, что приводит к неудовлетворительным временам циркуляции наноконтейнеров, нагруженных терапевтическими агентами. Большинство углеводных наночастиц обеспечивает доставку за счет пассивного, а не активного транспорта, обладая низкой адресностью нацеливания, при этом также наблюдается низкая воспроизводимость экспериментов ввиду неоднородности состава полисахаридов, формирующих наноструктуру, и проблемы с масштабированием. Отдельным вызовом в этой области является отсутствие релевантных биологических моделей для оценки эффективности препаратов, инкапсулированных в наночастицы. Из-за вышеупомянутых сложностей за последние 15 лет на клинические испытания было выведено только 13 наносистем с активным таргетированием для доставки лекарств, причем только одна из них на основе углеводов, а именно на основе ПЭГ-функционализированных циклодекстринов, инкапсулирующих siRNA [280]. Хорошей альтернативой углеводным наноконтейнерам являются неуглеводные наночастицы, декорированные адресными углеводными лигандами или точечно модифицированными сахаридами.

Известно множество успешных примеров терапевтических гликоконъюгатов, способных таргетировать различные семейства лектинов. Это направление исследований, несомненно, имеет существенный потенциал развития, однако нужно учитывать, что в подавляющем большинстве случаев лектины экспрессируются не только "пораженными", тканями, но и здоровыми клетками.

Еще одна сложность заключается в том, что вопреки высокой селективности углеводных лигандов к целевому рецептору, они, как правило, обладают низкими значениями аффинности и неудовлетворительными фармакокинетическими профилями. Эта проблема может эффективно решаться применением вместо природных углеводов гликомиметиков или модифицированных углеводов, которые, как правило, при некоторой потере селективности выигрывают благодаря значительно большей аффинности связывания и улучшенным фармакокинетическим параметрам. Кроме того, современные методы олигосахаридного синтеза позволяют осуществлять стереоконтролируемое построение гликозидных связей [281] и получать как пиранозидные, так и фуранозидные производные [282], что открывает возможности для создания углеводных векторов практически любой сложности [283]. Приведенные в обзоре примеры показывают, что конъюгирование терапевтического агента с "точечно" модифицированными углеводами может использоваться в противоопухолевой терапии, как минимум, не менее эффективно, чем конъюгирование с антителами.

Лечение многих болезней может быть направлено на контрольные иммунные точки, которые не дают иммунной системе вызывать сильный ответ против соответствующего патогена. В последнее десятилетие был достигнут большой прогресс в понимании роли сиглеков в функционировании иммунных клеток в качестве контрольных точек иммунитета, выполняющих важную роль при развитии различных видов рака, болезни Альцгеймера, аутоиммунных заболеваний и аллергии [234]. Поэтому появившееся в 2020 г. сообщение о возможности нацеливания NK-клеток на опухолевые ткани с применением модифицированных сахаридов – лигандов сиглека CD22 – является новым трендом в химии углеводов [111], и это направление, с нашей точки зрения, ожидает динамичное развитие в ближайшие годы.

И, наконец, при лечении рака возникает вопрос: как именно происходят посттрансляционные модификации опухолевых белков, включая их гликозилирование в ответ на иммунный отклик организма или на применение терапевтических средств? С развитием заболевания могут меняться профили опухолевых гликопротеиновых рецепторов, поэтому эффективные на первом

этапе лечения опухоли таргетные гликоконъюгаты могут оказаться бесполезными по мере ее роста. Можно ли как-то прогнозировать изменения, происходящие с опухолевыми рецепторами и своевременно разрабатывать новые системы их таргетирования? Очевидно, эти вопросы будут являться основными для медицинской химии углеводов в ближайшие годы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность член-корр. РАН Н.Э. Нифантьеву (Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН) за ценные консультации и дискуссии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-13-00158).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lu Z.-R., Qiao P.* // Mol. Pharm. 2018. V. 15. P. 3603–3616. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00037
2. *Yoo J., Park C., Yi G., Lee D., Koo H.* // Cancers (Basel). 2019. V. 11. P. 640. https://doi.org/10.3390/cancers11050640
3. *Costa A.F., Campos D., Reis C.A., Gomes C.* // Trends Cancer. 2020. V. 6. P. 757–766. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.002
4. *Kang B., Opatz T., Landfester K., Wurm F.R.* // Chem. Soc. Rev. 2015. V. 44. P. 8301–8325. https://doi.org/10.1039/C5CS00092K
5. *Ananikov V.P., Eremin D.B., Yakukhnov S.A., Dilman A.D., Levin V.V., Egorov M.P., Karlov S.S., Kustov L.M., Tarasov A.L., Greish A.A., Shesterkina A.A., Sakharov A.M., Nysenko Z.N., Sheremetev A.B., Stakheev A.Yu., Mashkovsky I.S., Sukhorukov A.Yu., Ioffe S.L., Terent'ev A.O., Vil' V.A., Tomilov Y.V., Novikov R.A., Zlotin S.G., Kucherenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Krylov V.B., Tsvetkov Y.E., Gening M.L., Nifantiev N.E.* // Mendeleev Commun. 2017. V. 27. P. 425–438. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.09.001
6. *Varki A., Cummings R.D., Esko J., Stanley P., Hart G.W., Aebi M., Darvill A.G., Kinoshita T., Packer N.H., Prestegard J.H., Schnaar R.L, Seeberger P.H. eds.* Essentials of Glycobiology, 3rd edition // New York. Cold Spring Harbor, 2017.
7. *Sosicka P., Ng B.G., Freeze H.H.* // Biochemistry. 2020. V. 59. P. 3064–3077. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00565
8. *Kleczkowski L.A., Decker D., Wilczynska M.* // Plant Physiol. 2011. V. 156. P. 3–10. https://doi.org/10.1104/pp.111.174706
9. *Iwamura A., Watanabe K., Akai S., Nishinosono T., Tsuneyama K., Oda S., Kume T., Yokoi T.* // Drug Metab. Dispos. 2016. V. 44. P. 888–896. https://doi.org/10.1124/dmd.116.069575
10. *Vigetti D., Karousou E., Viola M., Deleonibus S., De Luca G., Passi A.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 2452–2459. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.001
11. *Li Y., Chen X.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 94. P. 887–905. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4040-1
12. *Шарипова Р.Р., Гарифуллин Б.Ф., Сапунова А.С., Волошина А.Д., Кравченко М.А., Катаев В.Е.* // Биоорг. химия. 2019. V. 45. P. 315–325. [*Sharipova R.R., Garifullin B.F., Sapunova A.S., Voloshina A.D., Kravchenko M.A., Kataev V.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 155–164.] https://doi.org/10.1134/S1068162019020110
13. *Niehues R., Hasilik M., Alton G., Körner C., Schiebe-Sukumar M., Koch H.G., Zimmer K.P., Wu R., Harms E., Reiter K., Figura K., Freeze H.H., Harms H.K., Marquardt T.* // J. Clin. Invest. 1998. V. 101. P. 1414–1420. https://doi.org/10.1172/JCI2350
14. *Mention K., Lacaille F., Valayannopoulos V., Romano S., Kuster A., Cretz M., Zaidan H., Galmiche L., Jaubert F., de Keyzer Y., Seta N., de Lonlay P.* // Mol. Genet. Metab. 2008. V. 93. P. 40–43. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.08.126
15. *Péanne R., de Lonlay P., Foulquier F., Kornak U., Lefeber D.J., Morava E., Pérez B., Seta N., Thiel C., Van Schaftingen E., Matthijs G., Jaeken J.* // Eur. J. Med. Genet. 2018. V. 61. P. 643–663. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.012
16. *Wong S.Y.-W., Gadomski T., van Scherpenzeel M., Honzik T., Hansikova H., Holmefjord K.S.B., Mork M., Bowling F., Sykut-Cegielska J., Koch D., Hertecant J., Preston G., Jaeken J., Peeters N., Perez S., Nguyen D.D., Crivelly K., Emmerzaal T., Gibson K.M., Raymond K., Abu Bakar N., Foulquier F., Poschet G., Ackermann A.M., He M., Lefeber D.J., Thiel C., Kozicz T., Morava E.* // Genet. Med. 2017. V. 19. P. 1226–1235. https://doi.org/10.1038/gim.2017.41
17. *Dörre K., Olczak M., Wada Y., Sosicka P., Grüneberg M., Reunert J., Kurlemann G., Fiedler B., Biskup S., Hörtnagel K., Rust S., Marquardt T.* // J. Inherit. Metab. Dis. 2015. V. 38. P. 931–940. https://doi.org/10.1007/s10545-015-9828-6
18. *Wild M.K., Lühn K., Marquardt T., Vestweber D.* // Cells Tissues Organs. 2002. V. 172. P. 161–173. https://doi.org/10.1159/000066968
19. *Ng B.G., Freeze H.H.* // Trends Genet. 2018. V. 34. P. 466–476. https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.03.002
20. *Ivanov D.O., Novikova V.P., Pokhlebkina A.A.* // Pediatrician (St. Petersburg). 2018. V. 9. P. 5–15. https://doi.org/10.17816/PED935-15
21. *Gonzalez P.S., O'Prey J., Cardaci S., Barthet V.J.A., Sakamaki J., Beaumatin F., Roseweir A., Gay D.M., Mackay G., Malviya G., Kania E., Ritchie S., Bau-*

dot A.D., Zunino B., Mrowinska A., Nixon C., Ennis D., Hoyle A., Millan D., McNeish I.A., Sansom O.J., Edwards J., Ryan K.M. // Nature. 2018. V. 563. P. 719–723.
https://doi.org/10.1038/s41586-018-0729-3

22. *Wood F.C., Cahill G.F.* // J. Clin. Invest. 1963. V. 42. P. 1300–1312.
https://doi.org/10.1172/JCI104814
23. *Sgambat K., Banks M., Moudgil A.* // Pediatr. Nephrol. 2013. V. 28. P. 2131–2135.
https://doi.org/10.1007/s00467-013-2539-z
24. *Hauber H.-P., Schulz M., Pforte A., Mack D., Zabel P., Schumacher U.* // Int. J. Med. Sci. 2008. V. 5. P. 371–376.
https://doi.org/10.7150/ijms.5.371
25. *Baenziger J.U., Fiete D.* // Cell. 1980. V. 22. P. 611–620.
https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90371-2
26. *Rensen P.C.N., van Leeuwen S.H., Sliedregt L.A.J.M., van Berkel T.J.C., Biessen E.A.L.* // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 5798–5808.
https://doi.org/10.1021/jm049481d
27. *Hangeland J.J., Levis J.T., Lee Y.C., Tso P.O.P.* // Bioconjug. Chem. 1995. V. 6. P. 695–701.
https://doi.org/10.1021/bc00036a006
28. *Juliano R.L., Ming X., Carver K., Laing B.* // Nucleic Acid Ther. 2014. V. 24. P. 101–113.
https://doi.org/10.1089/nat.2013.0463
29. *Prakash T.P., Graham M.J., Yu J., Carty R., Low A., Chappell A., Schmidt K., Zhao C., Aghajan M., Murray H.F., Riney S., Booten S.L., Murray S.F., Gaus H., Crosby J., Lima W.F., Guo S., Monia B.P., Swayze E.E., Seth P.P.* // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. 8796–8807.
https://doi.org/10.1093/nar/gku531
30. *Yu R.Z., Graham M.J., Post N., Riney S., Zanardi T., Hall S., Burkey J., Shemesh C.S., Prakash T.P., Seth P.P., Swayze E.E., Geary R.S., Wang Y., Henry S.* // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2016. V. 5. P. e317.
https://doi.org/10.1038/mtna.2016.26
31. *Li Z., Kruijt J.K., van der Sluis R.J., Berkel T.J.C. Van, Hoekstra M.* // Physiol. Genomics. 2013. V. 45. P. 268–275.
https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00151.2012
32. *Springer A.D., Dowdy S.F.* // Nucleic Acid Ther. 2018. V. 28. P. 109–118.
https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736
33. *Benizri S., Gissot A., Martin A., Vialet B., Grinstaff M.W., Barthélémy P.* // Bioconjug. Chem. 2019. V. 30. P. 366–383.
https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00761
34. *Girelli D., Busti F., Marchi G., Martinelli N., Olivieri O.* // Intern. Emerg. Med. 2018. V. 13. P. 313–318.
https://doi.org/10.1007/s11739-018-1810-5
35. *Bennett C.F., Swayze E.E.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2010. V. 50. P. 259–293.
https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654
36. *Allerson C.R., Sioufi N., Jarres R., Prakash T.P., Naik N., Berdeja A., Wanders L., Griffey R.H., Swayze E.E., Bhat B.* // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 901–904.
https://doi.org/10.1021/jm049167j
37. *Nair J.K., Attarwala H., Sehgal A., Wang Q., Aluri K., Zhang X., Gao M., Liu J., Indrakanti R., Schofield S., Kretschmer P., Brown C.R., Gupta S., Willoughby J.L.S., Boshar J.A., Jadhav V., Charisse K., Zimmermann T., Fitzgerald K., Manoharan M., Rajeev K.G., Akinc A., Hutabarat R., Maier M.A.* // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 10969–10977.
https://doi.org/10.1093/nar/gkx818
38. *Wada F., Yamamoto T., Ueda T., Sawamura M., Wada S., Harada-Shiba M., Obika S.* // Nucleic Acid Ther. 2018. V. 28. P. 50–57.
https://doi.org/10.1089/nat.2017.0698
39. *Yamamoto T., Wada F., Harada-Shiba M.* // J. Atheroscler. Thromb. 2016. V. 23. P. 1011–1025.
https://doi.org/10.5551/jat.RV16001
40. *Brown J.M., Dahlman J.E., Neuman K.K., Prata C.A.H., Krampert M.C., Hadwiger P.M., Vornlocher H.-P.* // Nucleic Acid Ther. 2019. V. 29. P. 231–244.
https://doi.org/10.1089/nat.2019.0782
41. *Weng Y., Xiao H., Zhang J., Liang X.-J., Huang Y.* // Biotechnol. Adv. 2019. V. 37. P. 801–825.
https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.012
42. *Hu B., Zhong L., Weng Y., Peng L., Huang Y., Zhao Y., Liang X.-J.* // Signal Transduct. Target. Ther. 2020. V. 5. P. 101.
https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x
43. *Craig K., Abrams M., Amiji M.* // Expert Opin. Drug Deliv. 2018. V. 15. P. 629–640.
https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1473375
44. *Al Shaer D., Al Musaimi O., Albericio F., de la Torre B.G.* // Pharmaceuticals. 2020. V. 13. P. 40.
https://doi.org/10.3390/ph13030040
45. *de Paula Brandão P.R., Titze-de-Almeida S.S., Titze-de-Almeida R.* // Mol. Diagn. Ther. 2020. V. 24. P. 61–68.
https://doi.org/10.1007/s40291-019-00438-6
46. *Janas M.M., Harbison C.E., Perry V.K., Carito B., Sutherland J.E., Vaishnaw A.K., Keirstead N.D., Warner G.* // Toxicol. Pathol. 2018. V. 46. P. 735–745.
https://doi.org/10.1177/0192623318792537
47. *Shen X., Corey D.R.* // Nucleic Acids Res. 2018. V. 46. P. 1584–1600.
https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239
48. *Zimmermann T.S., Karsten V., Chan A., Chiesa J., Boyce M., Bettencourt B.R., Hutabarat R., Nochur S., Vaishnaw A., Gollob J.* // Mol. Ther. 2017. V. 25. P. 71–78.
https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.10.019
49. *Cedillo I., Dana C., Engle E., Chen L., McPherson A., Rodriguez A.* // Molecules. 2017. V. 22. P. 1356.
https://doi.org/10.3390/molecules22081356
50. *Setten R.L., Rossi J.J., Han S.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. V. 18. P. 421–446.
https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4
51. *Soriano V.* // AIDS Rev. 2018. V. 20. P. 125–127.
52. *Kim Y., Jo M., Schmidt J., Luo X., Prakash T.P., Zhou T., Klein S., Xiao X., Post N., Yin Z., MacLeod A.R.* // Mol. Ther. 2019. V. 27. P. 1547–1557.
https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.06.009
53. *Zuckerman J.E., Davis M.E.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2015. V. 14. P. 843–856.
https://doi.org/10.1038/nrd4685
54. *Yang B., Ming X., Cao C., Laing B., Yuan A., Porter M.A., Hull-Ryde E.A., Maddry J., Suto M., Janzen W.P., Juliano R.L.* // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43.

P. 1987–1996.
https://doi.org/10.1093/nar/gkv060
55. *To K.K.W., Fong W., Tong C.W.S., Wu M., Yan W., Cho W.C.S.* // Expert Opin. Drug Discov. 2020. V. 15. P. 63–83.
https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1690449
56. *Cai L., Gu Z., Zhong J., Wen D., Chen G., He L., Wu J., Gu Z.* // Drug Discov. Today. 2018. V. 23. P. 1126–1138.
https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.02.009
57. *Witzigmann D., Quagliata L., Schenk S.H., Quintavalle C., Terracciano L.M., Huwyler J.* // Hepatol. Res. 2016. V. 46. P. 686–696.
https://doi.org/10.1111/hepr.12599
58. *Shi B., Abrams M., Sepp-Lorenzino L.* // J. Histochem. Cytochem. 2013. V. 61. P. 901–909.
https://doi.org/10.1369/0022155413503662
59. *Bunker A., Magarkar A., Viitala T.* // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1858. P. 2334–2352.
https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.025
60. *Lee Y., Thompson D.H.* // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2017. V. 9. P. e1450.
https://doi.org/10.1002/wnan.1450
61. *El-Hammadi M.M., Arias J.L.* // Expert Opin. Ther. Pat. 2019. V. 29. P. 891–907.
https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1679767
62. *Basha S.A., Salkho N., Dalibalta S., Husseini G.A.* // Mini Rev. Med. Chem. 2019. V. 19. P. 961–969.
https://doi.org/10.2174/1389557519666190408155251
63. *Olusanya T., Haj Ahmad R., Ibegbu D., Smith J., Elkordy A.* // Molecules. 2018. V. 23. P. 907.
https://doi.org/10.3390/molecules23040907
64. *Scheideler M., Vidakovic I., Prassl R.* // Chem. Phys. Lipids. 2020. V. 226. P. 104837.
https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104837
65. *Salatin S., Jelvehgari M., Maleki-Dizaj S., Adibkia K.* // Ther. Deliv. 2015. V. 6. P. 1017–1029.
https://doi.org/10.4155/tde.15.28
66. *Karimi M., Bahrami S., Ravari S.B., Zangabad P.S., Mirshekari H., Bozorgomid M., Shahreza S., Sori M., Hamblin M.R.* // Expert Opin. Drug Deliv. 2016. V. 13. P. 1609–1623.
https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1193149
67. *Neek M., Kim T.I., Wang S.-W.* // Nanomedicine. 2019. V. 15. P. 164–174.
https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.09.004
68. *Liu K., Jiang X., Hunziker P.* // Nanoscale. 2016. V. 8. P. 16091–16156.
https://doi.org/10.1039/c6nr04489a
69. *Deirram N., Zhang C., Kermaniyan S.S., Johnston A.P.R., Such G.K.* // Macromol. Rapid Commun. 2019. V. 40. P. e1800917.
https://doi.org/10.1002/marc.201800917
70. *Zhao K., Li D., Shi C., Ma X., Rong G., Kang H., Wang X., Sun B.* // Curr. Drug Deliv. 2016. V. 13. P. 494–499.
https://doi.org/10.2174/1567201813041605210046O9
71. *Ulbrich K., Holá K., Šubr V., Bakandritsos A., Tuček J., Zbořil R.* // Chem. Rev. 2016. V. 116. P. 5338–5431.
https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00589
72. *Jaimes-Aguirre L., Gibbens-Bandala B.V., Morales-Avila E., Ocampo-García B.E., Seyedeh-Fatemeh M., Amirhosein A.* // Curr. Pharm. Des. 2016. V. 22. P. 2886–903.
https://doi.org/10.2174/1381612822666160217125028
73. *Kuznetsova N.R., Svirshchevskaya E.V., Sitnikov N.S., Abodo L., Sutorius H., Zapke J., Velder J., Thomopoulou P., Oschkinat H., Prokop A., Schmalz H.-G., Fedorov A.Yu., Vodovozov E.L.* // Биоорг. химия. 2013. V. 39. P. 609–618. [*Kuznetsova N.R., Svirshchevskaya E.V., Sitnikov N.S., Abodo L., Sutorius H., Zapke J., Velder J., Thomopoulou P., Oschkinat H., Prokop A., Schmalz H.-G., Fedorov A.Yu., Vodovozov E.L.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. V. 39. P. 543–552.]
https://doi.org/10.1134/S1068162013050105
74. *Guo Q., Shen X., Li Y., Xu S.* // Curr. Med. Sci. 2017. V. 37. P. 635–641.
https://doi.org/10.1007/s11596-017-1783-z
75. *Pardo J., Peng Z., Leblanc R.* // Molecules. 2018. V. 23. P. 378.
https://doi.org/10.3390/molecules23020378
76. *Martincic M., Tobias G.* // Expert Opin. Drug Deliv. 2015. V. 12. P. 563–581.
https://doi.org/10.1517/17425247.2015.971751
77. *Rode A., Sharma S., Mishra D.K.* // Curr. Drug Deliv. 2018. V. 15. P. 620–629.
https://doi.org/10.2174/1567201815666171221124711
78. *Chauhan A.* // Molecules. 2018. V. 23. P. e938.
https://doi.org/10.3390/molecules23040938
79. *Ray S., Li Z., Hsu C.-H., Hwang L.-P., Lin Y.-C., Chou P.-T., Lin Y.-Y.* // Theranostics. 2018. V. 8. P. 6322–6349.
https://doi.org/10.7150/thno.27828
80. *Huang D., Wu D.* // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2018. V. 90. P. 713–727.
https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.03.002
81. *Sharma A.K., Gothwal A., Kesharwani P., Alsaab H., Iyer A.K., Gupta U.* // Drug Discov. Today. 2017. V. 22. P. 314–326.
https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.013
82. *Wang H., Huang Q., Chang H., Xiao J., Cheng Y.* // Biomater. Sci. 2016. V. 4. P. 375–390.
https://doi.org/10.1039/C5BM00532A
83. *Hsu H.-J., Bugno J., Lee S., Hong S.* // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2017. V. 9. P. e1409.
https://doi.org/10.1002/wnan.1409
84. *Cabuzu D., Cirja A., Puiu R., Grumezescu A.* // Curr. Top. Med. Chem. 2015. V. 15. P. 1605–1613.
https://doi.org/10.2174/1568026615666150414144750
85. *Daraee H., Eatemadi A., Abbasi E., Fekri Aval S., Kouhi M., Akbarzadeh A.* // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2016. V. 44. P. 410–422.
https://doi.org/10.3109/21691401.2014.955107
86. *Kong F.-Y., Zhang J.-W., Li R.-F., Wang Z.-X., Wang W.-J., Wang W.* // Molecules. 2017. V. 22. P. E1445.
https://doi.org/10.3390/molecules22091445
87. *Connor D.M., Broome A.-M.* // Adv. Cancer Res. 2018. V. 139. P. 163–184.
https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.05.001
88. *Gholipourmalekabadi M., Mobaraki M., Ghaffari M., Zarebkohan A., Omrani V.F., Urbanska A.M., Seifalian A.* // Curr. Pharm. Des. 2017. V. 23. P. 2918–2929.
https://doi.org/10.2174/1381612823666170419105413
89. *Alemzadeh E., Dehshahri A., Izadpanah K., Ahmadi F.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2018. V. 167. P. 20–27.
https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.026

90. *Shahgolzari M., Pazhouhandeh M., Milani M., Khosroushahi A.Y., Fiering S.* // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2020. P. e1629. https://doi.org/10.1002/wnan.1629
91. *Sadauskas E., Wallin H., Stoltenberg M., Vogel U., Doering P., Larsen A., Danscher G.* // Part. Fibre Toxicol. 2007. V. 4. P. 10. https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-10
92. *Nel A.E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M. V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M.* // Nat. Mater. 2009. V. 8. P. 543–557. https://doi.org/10.1038/nmat2442
93. *Longmire M., Choyke P.L., Kobayashi H.* // Nanomedicine. 2008. V. 3. P. 703–717. https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703
94. *Golombek S.K., May J.-N., Theek B., Appold L., Drude N., Kiessling F., Lammers T.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2018. V. 130. P. 17–38. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007
95. *Musumeci F., Radi M., Brullo C., Schenone S.* // J. Med. Chem. 2012. V. 55. P. 10797–10822. https://doi.org/10.1021/jm301085w
96. *Cheung A., Bax H.J., Josephs D.H., Ilieva K.M., Pellizzari G., Opzoomer J., Bloomfield J., Fittall M., Grigoriadis A., Figini M., Canevari S., Spicer J.F., Tutt A.N., Karagiannis S.N.* // Oncotarget. 2016. V. 7. P. 52553–52574. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9651
97. *Raz A., Nakahara S.* // Anticancer Agents Med. Chem. 2008. V. 8. P. 22–36. https://doi.org/10.2174/187152008783330833
98. *Du J., Lane L.A., Nie S.* // J. Control. Release. 2015. V. 219. P. 205–214. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.050
99. *Zhou L., Wang H., Li Y.* // Theranostics. 2018. V. 8. P. 1059–1074. https://doi.org/10.7150/thno.22679
100. *Tang Q., Yu B., Gao L., Cong H., Song N., Lu C.* // Curr. Med. Chem. 2018. V. 25. P. 1837–1866. https://doi.org/10.2174/0929867325666180111095913
101. *Park J.H., Cho Y.W., Son Y.J., Kim K., Chung H., Jeong S.Y., Choi K., Park C.R., Park R.-W., Kim I.-S., Kwon I.C.* // Colloid Polym. Sci. 2006. V. 284. P. 763–770. https://doi.org/10.1007/s00396-005-1438-7
102. *Ai S., Zhen S., Liu Z., Sun F., He X., Chu F., Guan W., Wang J.* // RSC Adv. 2018. V. 8. P. 30012–30020. https://doi.org/10.1039/C8RA05071F
103. *Khatun Z., Nurunnabi M., Reeck G.R., Cho K.J., Lee Y.* // J. Control. Release. 2013. V. 170. P. 74–82. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.04.024
104. *Son Y.* // J. Control. Release. 2003. V. 91. P. 135–145. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00231-1
105. *Park J. H., Kwon S., Lee M., Chung H., Kim J.-H., Kim Y.-S., Park R.-W., Kim I.-S., Seo S.B., Kwon I.C., Jeong S.Y.* // Biomaterials. 2006. V. 27. P. 119–126. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.028
106. *Lee E., Lee J., Lee I.-H., Yu M., Kim H., Chae S.Y., Jon S.* // J. Med. Chem. 2008. V. 51. P. 6442–6449. https://doi.org/10.1021/jm800767c
107. *Fattahi A., Asgarshamsi M., Hasanzadeh F., Varshosaz J., Rostami M., Mirian M., Sadeghi-aliabadi H.* // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2015. V. 26. P. 119. https://doi.org/10.1007/s10856-015-5407-5
108. *Gong X.-Y., Yin Y.-H., Huang Z.-J., Lu B., Xu P.-H., Zheng H., Xiong F.-L., Xu H.-X., Xiong X., Gu X.-B.* // Int. J. Pharm. 2012. V. 436. P. 240–247. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.043
109. *Huang S., Huang G.* // Drug Deliv. 2019. V. 26. P. 252–261. https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1580322
110. *Tran T.H., Bae B., Lee Y., Na K., Huh K.M.* // Carbohydr. Polym. 2013. V. 92. P. 1615–1624. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.075
111. *Wang X., Lang S., Tian Y., Zhang J., Yan X., Fang Z., Weng J., Lu N., Wu X., Li T., Cao H., Li Z., Huang X.* // ACS Cent. Sci. 2020. V. 6. P. 382–389. https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00956
112. *Han J., Park W., Park S., Na K.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016. V. 8. P. 7739–7747. https://doi.org/10.1021/acsami.6b01664
113. *Svenson S., Wolfgang M., Hwang J., Ryan J., Eliasof S.* // J. Control. Release. 2011. V. 153. P. 49–55. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.03.007
114. *Shahriari M., Taghdisi S.M., Abnous K., Ramezani M., Alibolandi M.* // Int. J. Pharm. 2019. V. 572. P. 118835. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118835
115. *Lee J.-Y., Lee H.S., Kang N.-W., Lee S.Y., Kim D.H., Kim S., Yoon I.-S., Cho H.-J., Kim D.-D.* // Carbohydr. Polym. 2020. V. 230. P. 115568. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115568
116. *Gotov O., Battogtokh G., Ko Y.T.* // Mol. Pharm. 2018. V. 15. P. 4668–4676. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00640
117. *Cadete A., Olivera A., Besev M., Dhal P.K., Gonçalves L., Almeida A.J., Bastiat G., Benoit J.-P., de la Fuente M., Garcia-Fuentes M., Alonso M.J., Torres D.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 11565. https://doi.org/10.1038/s41598-019-47995-8
118. *Liu J., Liang N., Li S., Han Y., Yan P., Kawashima Y., Cui F., Sun S.* // J. Biomater. Appl. 2020. V. 34. P. 1458–1469. https://doi.org/10.1177/0885328220905256
119. *Li H., Zhang P., Luo J., Hu D., Huang Y., Zhang Z.-R., Fu Y., Gong T.* // ACS Nano. 2019. V. 13. P. 9386–9396. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04166
120. *Zhou H., Yu W., Guo X., Liu X., Li N., Zhang Y., Ma X.* // Biomacromolecules. 2010. V. 11. P. 3480–3486. https://doi.org/10.1021/bm100989x
121. *Kim J.-H., Kim Y.-S., Park K., Lee S., Nam H.Y., Min K.H., Jo H.G., Park J.H., Choi K., Jeong S.Y., Park R.-W., Kim I.-S., Kim K., Kwon I.C.* // J. Control. Release. 2008. V. 127. P. 41–49. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.014
122. *Hwang H.-Y., Kim I.-S., Kwon I.C., Kim Y.-H.* // J. Control. Release. 2008. V. 128. P. 23–31. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.003
123. *Deng L., Wang G., Ren J., Zhang B., Yan J., Li W., Khashab N.M.* // RSC Adv. 2012. V. 2. P. 12909–12914. https://doi.org/10.1039/c2ra21888g
124. *You J., Hu F.-Q., Du Y.-Z., Yuan H.* // Biomacromolecules. 2007. V. 8. P. 2450–2456. https://doi.org/10.1021/bm070365c
125. *Hu F.-Q., Ren G.-F., Yuan H., Du Y.-Z., Zeng S.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2006. V. 50. P. 97–103. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.009

126. *Hu F.-Q., Wu X., Du Y.-Z., You J., Yuan H.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008. V. 69. P. 117–125. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.09.018
127. *You J., Li X., de Cui F., Du Y.-Z., Yuan H., Hu F.Q.* // Nanotechnology. 2008. V. 19. P. 045102. https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/04/045102
128. *Qin Y., Chen J., Bi Y., Xu X., Zhou H., Gao J., Hu Y., Zhao Y., Chai Z.* // Acta Biomater. 2015. V. 17. P. 201–209. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.026
129. *Tan Y., Liu C.-G.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2009. V. 69. P. 178–182. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.11.026
130. *Cao J., Huang S., Chen Y., Li S., Li X., Deng D., Qian Z., Tang L., Gu Y.* // Biomaterials. 2013. V. 34. P. 6272–6283. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.008
131. *Gao C., Liu T., Dang Y., Yu Z., Wang W., Guo J., Zhang X., He G., Zheng H., Yin Y., Kong X.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 111. P. 964–970. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.012
132. *Zhang P., Wu J., Xiao F., Zhao D., Luan Y.* // Med. Res. Rev. 2018. V. 38. P. 1485–1510. https://doi.org/10.1002/med.21485
133. *Tao Y., Han J., Dou H.* // J. Mater. Chem. 2012. V. 22. P. 8930–8937. https://doi.org/10.1039/c2jm30290j
134. *Liang D.-S., Su H.-T., Liu Y.-J., Wang A.-T., Qi X.-R.* // Biomaterials. 2015. V. 71. P. 11–23. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.035
135. *Zhao Z., He M., Yin L., Bao J., Shi L., Wang B., Tang C., Yin C.* // Biomacromolecules. 2009. V. 10. P. 565–572. https://doi.org/10.1021/bm801225m
136. *Gref R., Minamitake Y., Peracchia M., Trubetskoy V., Torchilin V., Langer R.* // Science. 1994. V. 263. P. 1600–1603. https://doi.org/10.1126/science.8128245
137. *Vernaez O., Neubert K.J., Kopitzky R., Kabasci S.* // Polymers (Basel). 2019. V. 11. P. 1939. https://doi.org/10.3390/polym11121939
138. *Ibrahim A.G.* // Am. J. Polym. Sci. Technol. 2019. V. 5. P. 55–62. https://doi.org/10.11648/j.ajpst.20190502.13
139. *Bhattacharya A., Rawlins J.W., Ray P., eds.* Polymer grafting and crosslinking // Hoboken, NJ, USA. John Wiley & Sons, Inc. 2008. https://doi.org/10.1002/9780470414811
140. *Choi K.Y., Yoon H.Y., Kim J.-H., Bae S.M., Park R.-W., Kang Y.M., Kim I.-S., Kwon I.C., Choi K., Jeong S.Y., Kim K., Park J.H.* // ACS Nano. 2011. V. 5. P. 8591–8599. https://doi.org/10.1021/nn202070n
141. *Han H.S., Lee J., Kim H.R., Chae S.Y., Kim M., Saravanakumar G., Yoon H.Y., You D.G., Ko H., Kim K., Kwon I.C., Park J.C., Park J.H.* // J. Control. Release. 2013. V. 168. P. 105–114. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.02.022
142. *Werle M., Bernkop-Schnürch A.* // J. Pharm. Pharmacol. 2008. V. 60. P. 273–281. https://doi.org/10.1211/jpp.60.3.3001
143. *Werle M., Hoffer M.* // J. Control. Release. 2006. V. 111. P. 41–46. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.11.011
144. *Kamra M., Moitra P., Ponnalagu D., Karande A.A., Bhattacharya S.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. V. 11. P. 37442–37460. https://doi.org/10.1021/acsami.9b09485
145. *Cao Y., Tan Y.F., Wong Y.S., Liew M.W.J., Venkatraman S.* // Mar. Drugs. 2019. V. 17. P. 381. https://doi.org/10.3390/md17060381
146. *Wang B., He C., Tang C., Yin C.* // Biomaterials. 2011. V. 32. P. 4630–4638. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.003
147. *Serrano-Sevilla I., Artiga Á., Mitchell S.G., De Matteis L., de la Fuente J.M.* // Molecules. 2019. V. 24. P. 2570. https://doi.org/10.3390/molecules24142570
148. *Mao S., Sun W., Kissel T.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2010. V. 62. P. 12–27. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.08.004
149. *Chen C.-K., Huang P.-K., Law W.-C., Chu C.-H., Chen N.-T., Lo L.-W.* // Int. J. Nanomedicine. 2020. V. 15. P. 2131–2150. https://doi.org/10.2147/IJN.S222419
150. *Wang Y., Ye M., Xie R., Gong S.* // Bioconjug. Chem. 2019. V. 30. P. 325–337. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00749
151. *Dosio F., Arpicco S., Stella B., Fattal E.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2016. V. 97. P. 204–236. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.011
152. *Jacob S., Nair A.B.* // Drug Dev. Res. 2018. V. 79. P. 201–217. https://doi.org/10.1002/ddr.21452
153. *Zhao F., Yin H., Li J.* // Biomaterials. 2014. V. 35. P. 1050–1062. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.044
154. *Novikov B.N., Grimsley J.K., Kern R.J., Wild J.R., Wales M.E.* // J. Control. Release. 2010. V. 146. P. 318–325. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.06.003
155. *Díaz-Moscoso A., Le Gourriérec L., Gómez-García M., Benito J., Balbuena P., Ortega-Caballero F., Guilloteau N., Di Giorgio C., Vierling P., Defaye J., Mellet C.O., Fernández J.M.G.* // Chemistry. J. 2009. V. 15. P. 12871–12888. https://doi.org/10.1002/chem.200901149
156. *Zuckerman J.E., Gritli I., Tolcher A., Heidel J.D., Lim D., Morgan R., Chmielowski B., Ribas A., Davis M.E., Yen Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 11449–11454. https://doi.org/10.1073/pnas.1411393111
157. *Huang G., Huang H.* // J. Control. Release. 2018. V. 278. P. 122–126. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.015
158. *Bachar G., Cohen K., Hod R., Feinmesser R., Mizrachi A., Shpitzer T., Katz O., Peer D.* // Biomaterials. 2011. V. 32. P. 4840–4848. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.040
159. *Mattheolabakis G., Milane L., Singh A., Amiji M.M.* // J. Drug Target. 2015. V. 23. P. 605–618. https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1052072
160. *Spadea A., Rios de la Rosa J.M., Tirella A., Ashford M.B., Williams K.J., Stratford I.J., Tirelli N., Mehibel M.* // Mol. Pharm. 2019. V. 16. P. 2481–2493. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00083

161. *Yang C., Li C., Zhang P., Wu W., Jiang X.* // Theranostics. 2017. V. 7. P. 1719–1734. https://doi.org/10.7150/thno.18340
162. *Miyazaki M., Yuba E., Hayashi H., Harada A., Kono K.* // Bioconjug. Chem. 2018. V. 29. P. 44–55. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00551
163. *Jiang D., Liang J., Noble P.W.* // Physiol. Rev. 2011. V. 91. P. 221–264. https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2009
164. *Casu B., Lindahl U.* // In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Elsevier, 2001. P. 159–206. https://doi.org/10.1016/S0065-2318(01)57017-1
165. *Garg H.G., Linhardt R.J., Hales C.A., eds.* Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Elsevier, 2005. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-044859-6.X5000-X
166. *Xu W., Qian J., Zhang Y., Suo A., Cui N., Wang J., Yao Y., Wang H.* // Acta Biomater. 2016. V. 33. P. 131–141. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.027
167. *Fu H.-G., Chen Y., Yu Q., Liu Y.* // ACS Med. Chem. Lett. 2020. V. 11. P. 1191–1195. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.0c00040
168. *Cai Z., Zhang H., Wei Y., Cong F.* // Biomacromolecules. 2017. V. 18. P. 1677–1696. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00424
169. *Xu W., Qian J., Hou G., Wang Y., Wang J., Sun T., Ji L., Suo A., Yao Y.* // Acta Biomater. 2019. V. 83. P. 400–413. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.026
170. *Ernsting M.J., Tang W.-L., MacCallum N., Li S.-D.* // Bioconjug. Chem. 2011. V. 22. P. 2474–2486. https://doi.org/10.1021/bc200284b
171. *Dai L., Si C.* // Curr. Med. Chem. 2019. V. 26. P. 2410–2429. https://doi.org/10.2174/0929867324666170711131353
172. *Huang G., Huang H.* // Nanomedicine. 2018. V. 13. P. 3149–3158. https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0331
173. *Varshosaz J.* // Expert Opin. Drug Deliv. 2012. V. 9. P. 509–523. https://doi.org/10.1517/17425247.2012.673580
174. *Severino P., da Silva C.F., Andrade L.N., de Lima Oliveira D., Campos J., Souto E.B.* // Curr. Pharm. Des. 2019. V. 25. P. 1312–1334. https://doi.org/10.2174/1381612825666190425163424
175. *The Danish Enoxaparin Study Group* // Arch. Intern. Med. 1991. V. 151. P. 1621–1624. https://doi.org/10.1001/archinte.151.8.1621
176. *Kucera S.U., DiNunzio J.C., Kaneko N., McGinity J.W.* // Drug Dev. Ind. Pharm. 2012. V. 38. P. 341–350. https://doi.org/10.3109/03639045.2011.604328
177. *Leiman D.A., Riff B.P., Morgan S., Metz D.C., Falk G.W., French B., Umscheid C.A., Lewis J.D.* // Dis. Esophagus. 2017. V. 30. P. 1–8. https://doi.org/10.1111/dote.12535
178. *Lavín de Juan L., García Recio V., Jiménez López P., Girbés Juan T., Cordoba-Diaz M., Cordoba-Diaz D.* // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2017. V. 42. P. 126–133. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.05.018
179. *Ensign L.M., Cone R., Hanes J.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2012. V. 64. P. 557–570. https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009
180. *Li H., Dong W., Zhou J., Xu X., Li F.* // Int. J. Pharm. 2013. V. 449. P. 37–43. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.008
181. *Cousin J., Cloninger M.* // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 1566. https://doi.org/10.3390/ijms17091566
182. *Ingrassia L., Nshimyumukiza P., Dewelle J., Lefranc F., Wlodarczak L., Thomas S., Dielie G., Chiron C., Zedde C., Tisnès P., van Soest R., Braekman J.C., Darro F., Kiss R.* // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 1800–1807. https://doi.org/10.1021/jm050971v
183. *Daniotti J.L., Lardone R.D., Vilcaes A.A.* // Front. Oncol. 2016. V. 5. P. 300. https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00300
184. *Wu M., Li H., Liu R., Gao X., Zhang M., Liu P., Fu Z., Yang J., Zhang-Negrerie D., Gao Q.* // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 110. P. 32–42. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.016
185. *Chen F., Huang G., Huang H.* // Future Med. Chem. 2020. V. 12. P. 161–171. https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0114
186. *Singh S., Aggarwal A., Thompson S., Tomé J.P.C., Zhu X., Samaroo D., Vinodu M., Gao R., Drain C.M.* // Bioconjug. Chem. 2010. V. 21. P. 2136–2146. https://doi.org/10.1021/bc100356z
187. *Pereira P.M.R., Rizvi W., Bhupathiraju N.V.S.D.K., Berisha N., Fernandes R., Tomé J.P.C., Drain C.M.* // Bioconjug. Chem. 2018. V. 29. P. 306–315. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00636
188. *Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Krylova L.V., Volovetsky A.B., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Meshkov I.N., Gorbunova Y.G., Romanenko Y.V., Koifman O.I., Balalaeva I.V., Fedorov A.Yu.* // J. Med. Chem. 2019. V. 62. P. 11182–11193. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01294
189. *Böcker S., Laaf D., Elling L.* // Biomolecules. 2015. V. 5. P. 1671–1696. https://doi.org/10.3390/biom5031671
190. *Yuan S.S., Li M.L., Chen J.S., Zhou L., Zhou W.* // ChemMedChem. 2018. V. 13. P. 764–778. https://doi.org/10.1002/cmdc.201700762
191. *Parker N., Turk M.J., Westrick E., Lewis J.D., Low P.S., Leamon C.P.* // Anal. Biochem. 2005. V. 338. P. 284–293. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.026
192. *Low P.S., Kularatne S.A.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2009. V. 13. P. 256–262. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.022
193. *Wee P., Wang Z.* // Cancers (Basel). 2017. V. 9. P. 52. https://doi.org/10.3390/cancers9050052
194. *Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N.* // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 1995. V. 19. P. 183–232. https://doi.org/10.1016/1040-8428(94)00144-I
195. *Jin F., Wang F.* // Glycoconj. J. 2020. V. 37. P. 277–291. https://doi.org/10.1007/s10719-020-09912-4
196. *Scarà S., Bottoni P., Scatena R.* In: *Scatena R.*, ed. Advances in cancer biomarkers. advances in experimental medicine and biology // Dordrecht. Springer. 2015. P. 247–260. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_15
197. *Trinchera M., Aronica A., Dall'Olio F.* // Biology (Basel). 2017. V. 6. P. 16. https://doi.org/10.3390/biology6010016

198. *Awad S., Alkashash A.M., Amin M., Baker S.J., Rose J.B.* // Front. Oncol. 2020. V. 10. P. 620. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00620
199. *Ferreira I., Carrascal M., Mineiro A., Bugalho A., Borralho P., Silva Z., Dall'olio F., Videira P.* // Int. J. Oncol. 2019. V. 55. P. 1033–1048. https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4886
200. *Hashida N., Ohguro N., Yamazaki N., Arakawa Y., Oiki E., Mashimo H., Kurokawa N., Tano Y.* // Exp. Eye Res. 2008. V. 86. P. 138–149. https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.10.004
201. *Arakawa Y., Hashida N., Ohguro N., Yamazaki N., Onda M., Matsumoto S., Ohishi M., Yamabe K., Tano Y., Kurokawa N.* // Biomed. Res. 2007. V. 28. P. 331–334. https://doi.org/10.2220/biomedres.28.331
202. *Moiseeva E.V., Kuznetsova N.R., Svirshchevskaya E.V., Bovin N.V., Sitnikov N.S., Shavyrin A.S., Beletskaya I.P., Combes S., Fedorov A.Y., Vodovozova E.L.* // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2011. V. 5. P. 276. https://doi.org/10.1134/S1990750811030073
203. *Kuznetsova N.R., Stepanova E.V., Peretolchina N.M., Khochenkov D.A., Boldyrev I.A., Bovin N.V., Vodovozova E.L.* // J. Drug Target. 2014. V. 22. P. 242–250. https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.862805
204. *Alekseeva A., Kapkaeva M., Shcheglovitova O., Boldyrev I., Pazynina G., Bovin N., Vodovozova E.* // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. P. 1099–1110. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.01.016
205. *Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G.* // Eur. J. Cancer. 2000. V. 36. P. 942–949. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00029-0
206. *Кузнецова Н.Р., Гаенко Г.П., Хайдуков С.В., Бовин Н.В., Водовозова Е.Л.* // Биоорг. химия. 2009. V. 35. P. 542–549. [*Kuznetsova N.R., Gaenko G.P., Haidukov S.V., Bovin N.V., Vodovozova E.L.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2009. V. 35. P. 490–496.] https://doi.org/10.1134/S1068162009040116
207. *Kuznetsova N.R., Sevrin C., Lespineux D., Bovin N.V., Vodovozova E.L., Mészáros T., Szebeni J., Grandfils C.* // J. Control. Release. 2012. V. 160. P. 394–400. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.010
208. *Kishimoto S., Fujitani N., Ohnishi T., Aoki H., Suzuki R., Fukushima S.* // Anticancer Res. 2017. V. 37. P. 6055–6061. https://doi.org/10.21873/anticanres.12053
209. *Mizushina Y., Hada T., Yoshida H.* // Oncol. Rep. 2012. V. 28. P. 821–828. https://doi.org/10.3892/or.2012.1893
210. *Tsuruta W., Tsurushima H., Yamamoto T., Suzuki K., Yamazaki N., Matsumura A.* // Biomaterials. 2009. V. 30. P. 118–125. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.009
211. *Stahn R., Grittner C., Zeisig R., Karsten U., Felix S.B., Wenzel K.* // Cell. Mol. Life Sci. 2001. V. 58. P. 141–147. https://doi.org/10.1007/PL00000774
212. *Yamada Y., Kobayashi H., Iwasa M., Sumi S., Ushikoshi H., Aoyama T., Nishigaki K., Takemura G., Fujiwara T., Fujiwara H., Kiso M., Minatoguchi S.* // Am. J. Physiol. Circ. Physiol. 2013. V. 304. P. H1124–H1133. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00707.2012
213. *Ansboro S., Greiser U., Barry F., Murphy M.* // Eur. Cells Mater. 2012. V. 23. P. 310–319. https://doi.org/10.22203/eCM.v023a24
214. *Hudak J.E., Bertozzi C.R.* // Chem. Biol. 2014. V. 21. P. 16–37. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.09.010
215. *Sarkar D., Vemula P.K., Zhao W., Gupta A., Karnik R., Karp J.M.* // Biomaterials. 2010. V. 31. P. 5266–5274. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.006
216. *Heimburg-Molinaro J., Lum M., Vijay G., Jain M., Almogren A., Rittenhouse-Olson K.* // Vaccine. 2011. V. 29. P. 8802–8826. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.009
217. *Feng D., Shaikh A.S., Wang F.* // ACS Chem. Biol. 2016. V. 11. P. 850–863. https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00084
218. *Guo J., Jiang W., Li Q., Jaiswal M., Guo Z.* // Carbohydr. Res. 2020. V. 492. P. 107999. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107999
219. *Mettu R., Chen C.-Y., Wu C.-Y.* // J. Biomed. Sci. 2020. V. 27. P. 9. https://doi.org/10.1186/s12929-019-0591-0
220. *Saboural P., Chaubet F., Rouzet F., Al-Shoukr F., Azzouna R., Bouchemal N., Picton L., Louedec L., Maire M., Rolland L., Potier G., Guludec D.L., Letourneur D., Chauvierre C.* // Mar. Drugs. 2014. V. 12. P. 4851–4867. https://doi.org/10.3390/md12094851
221. *Barbosa A.I., Coutinho A.J., Costa Lima S.A., Reis S.* // Mar. Drugs. 2019. V. 17. P. 654. https://doi.org/10.3390/md17120654
222. *Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozevich G.E., Berman A.E., Bilan M.I., Usov A.I., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A., Sanderson C.J., Kelly M., Rabinovich G.A., Iacobelli S., Nifantiev N.E.* // Glycobiology. 2007. V. 17. P. 541–552. https://doi.org/10.1093/glycob/cwm014
223. *Shamay Y., Elkabets M., Li H., Shah J., Brook S., Wang F., Adler K., Baut E., Scaltriti M., Jena P.V., Gardner E.E., Poirier J.T., Rudin C.M., Baselga J., Haimovitz-Friedman A., Heller D.A.* // Sci. Transl. Med. 2016. V. 8. P. 345ra87. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf7374
224. *Forero Ramirez L.M., Gobin E., Aid-Launais R., Journe C., Moraes F.C., Picton L., Le Cerf D., Letourneur D., Chauvierre C., Chaubet F.* // Carbohydr. Polym. 2020. V. 245. P. 116457. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116457
225. *Juenet M., Aid-Launais R., Li B., Berger A., Aerts J., Ollivier V., Nicoletti A., Letourneur D., Chauvierre C.* // Biomaterials. 2018. V. 156. P. 204–216. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.047
226. *Fitton H.J., Stringer D.S., Park A.Y., Karpiniec S.N.* // Mar. Drugs. 2019. V. 17. P. 571. https://doi.org/10.3390/md17100571
227. *Zheng K.H., Kaiser Y., Poel E., Verberne H., Aerts J., Rouzet F., Stroes E., Letourneur D., Chauvierre C.* // Atherosclerosis. 2019. V. 287. P. e143. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.425
228. *Hsu H., Hwang P.* // Clin. Transl. Med. 2019. V. 8. P. e15. https://doi.org/10.1186/s40169-019-0234-9
229. *Khatuntseva E.A., Ustuzhanina N.E., Zatonskii G.V., Shashkov A.S., Usov A.I., Nifant'ev N.E.* // J. Carbohydr. Chem. 2000. V. 19. P. 1151–1173. https://doi.org/10.1080/07328300008544140

230. *Krylov V.B., Kaskova Z.M., Vinnitskiy D.Z., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A., Chizhov A.O., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2011. V. 346. P. 540–550. https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.005
231. *Ustyuzhanina N., Krylov V., Grachev A., Gerbst A., Nifantiev N.* // Synthesis (Stuttg). 2006. V. 2006. P. 4017–4031. https://doi.org/10.1055/s-2006-950333
232. *Vinnitskiy D.Z., Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S., Nifantiev N.E.* // Org. Biomol. Chem. 2016. V. 14. P. 598–611. https://doi.org/10.1039/C5OB02040A
233. *Batzke K., Büchel G., Hansen W., Schramm A.* // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 718. https://doi.org/10.3390/ijms19030718
234. *Duan S., Paulson J.C.* // Annu. Rev. Immunol. 2020. V. 38. P. 365–395. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102419-035900
235. *Daly J., Carlsten M., O'Dwyer M.* // Front. Immunol. 2019. V. 10. P. 1047. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01047
236. *Wang J., Sun J., Liu L.N., Flies D.B., Nie X., Toki M., Zhang J., Song C., Zarr M., Zhou X., Han X., Archer K.A., O'Neill T., Herbst R.S., Boto A.N., Sanmamed M.F., Langermann S., Rimm D.L., Chen L.* // Nat. Med. 2019. V. 25. P. 656–666. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0374-x
237. *Perdicchio M., Ilarregui J.M., Verstege M.I., Cornelissen L.A.M., Schetters S.T.T., Engels S., Ambrosini M., Kalay H., Veninga H., den Haan J.M.M., van Berkel L.A., Samsom J.N., Crocke P.R., Sparwasser T., Berod L., Garcia-Vallejo J.J., van Kooyk Y., Unger W.W.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 3329–3334. https://doi.org/10.1073/pnas.1507706113
238. *Edgar L.J., Kawasaki N., Nycholat C.M., Paulson J.C.* // Cell Chem. Biol. 2019. V. 26. P. 131–136.e4. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.006
239. *Spence S., Greene M.K., Fay F., Hams E., Saunders S.P., Hamid U., Fitzgerald M., Beck J., Bains B.K., Smyth P., Themistou E., Small D.M., Schmid D., O'Kane C.M., Fitzgerald D.C., Abdelghany S.M., Johnston J.A., Fallon P.G., Burrows J.F., McAuley D.F., Kissenpfennig A., Scott C.J.* // Sci. Transl. Med. 2015. V. 7. P. 303ra140. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab3459
240. *Sun Y., Hong S., Xie R., Huang R., Lei R., Cheng B., Sun D., Du Y., Nycholat C.M., Paulson J.C., Chen X.* // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140. P. 3592–3602. https://doi.org/10.1021/jacs.7b10990
241. *Dam T.K., Gerken T.A., Brewer C.F.* // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 3822–3827. https://doi.org/10.1021/bi9002919
242. *Angata T., Nycholat C.M., Macauley M.S.* // Trends Pharmacol. Sci. 2015. V. 36. P. 645–660. https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.06.008
243. *Büll C., Heise T., Adema G.J., Boltje T.J.* // Trends Biochem. Sci. 2016. V. 41. P. 519–531. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.03.007
244. *Peng W., Paulson J.C.* // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 12450–12458. https://doi.org/10.1021/jacs.7b03208
245. *Macauley M.S., Crocker P.R., Paulson J.C.* // Nat. Rev. Immunol. 2014. V. 14. P. 653–666. https://doi.org/10.1038/nri3737
246. *Peng W., de Vries R.P., Grant O.C., Thompson A.J., McBride R., Tsogtbaatar B., Lee P.S., Razi N., Wilson I.A., Woods R.J., Paulson J.C.* // Cell Host Microbe. 2017. V. 21. P. 23–34. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.11.004
247. *Schweizer A., Wöhner M., Prescher H., Brossmer R., Nitschke L.* // Eur. J. Immunol. 2012. V. 42. P. 2792–2802. https://doi.org/10.1002/eji.201242574
248. *Fesnak A.D., June C.H., Levine B.L.* // Nat. Rev. Cancer. 2016. V. 16. P. 566–581. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.97
249. *June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U., Ghassemi S., Milone M.C.* // Science. 2018. V. 359. P. 1361–1365. https://doi.org/10.1126/science.aar6711
250. *Mehta R.S., Rezvani K.* // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 283. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00283
251. *Tang X., Yang L., Li Z., Nalin A.P., Dai H., Xu T., Yin J., You F., Zhu M., Shen W., Chen G., Zhu X., Wu D., Yu J.* // Am. J. Cancer Res. 2018. V. 8. P. 1083–1089.
252. *Matosevic S.* // J. Immunol. Res. 2018. V. 2018. P. 4054815. https://doi.org/10.1155/2018/4054815
253. *Banchereau J., Steinman R.M.* // Nature. 1998. V. 392. P. 245–252. https://doi.org/10.1038/32588
254. *Clausen B.E., Stoitzner P.* // Front. Immunol. 2015. V. 6. P. 534. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00534
255. *Prausnitz M.R., Langer R.* // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. P. 1261–1268. https://doi.org/10.1038/nbt.1504
256. *Zaric M., Lyubomska O., Poux C., Hanna M.L., McCrudden M.T., Malissen B., Ingram R.J., Power U.F., Scott C.J., Donnelly R.F., Kissenpfennig A.* // J. Invest. Dermatol. 2015. V. 135. P. 425–434. https://doi.org/10.1038/jid.2014.415
257. *Wamhoff E.-C., Schulze J., Bellmann L., Rentzsch M., Bachem G., Fuchsberger F.F., Rademacher J., Hermann M., Del Frari B., van Dalen R., Hartmann D., van Sorge N.M., Seitz O., Stoitzner P., Rademacher C.* // ACS Cent. Sci. 2019. V. 5. P. 808–820. https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00093
258. *Schulze J., Rentzsch M., Kim D., Bellmann L., Stoitzner P., Rademacher C.* // Biochemistry. 2019. V. 58. P. 2576–2580. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00402
259. *Quiocho F.A.* // Biochem. Soc. Trans. 1993. V. 21. P. 442–448. https://doi.org/10.1042/bst0210442
260. *Schoen A., Freire E.* // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 5019–5024. https://doi.org/10.1021/bi00438a017
261. *Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.-Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D.* // J. Med. Chem. 2002. V. 45. P. 2615–2623. https://doi.org/10.1021/jm020017n
262. *McClellan K., Perry C.M.* // Drugs. 2001. V. 61. P. 263–283. https://doi.org/10.2165/00003495-200161020-00011
263. *von Itzstein M., Wu W.-Y., Kok G.B., Pegg M.S., Dyason J.C., Jin B., Van Phan T., Smythe M.L., White H.F.,*

Oliver S.W., Colman P.M., Varghese J.N., Ryan D.M., Woods J.M., Bethell R.C., Hotham V.J., Cameron J.M., Penn C.R. // Nature. 1993. V. 363. P. 418–423. https://doi.org/10.1038/363418a0

264. *Cox T., Lachmann R., Hollak C., Aerts J., van Weely S., Hrebícek M., Platt F., Butters T., Dwek R., Moyses C., Gow I., Elstein D., Zimran A.* // Lancet. 2000. V. 355. P. 1481–1485. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02161-9
265. *Chen X., Zheng Y., Shen Y.* // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. P. 109–116. https://doi.org/10.2174/092986706789803035
266. *Hevey R., Ling C.-C.* // Future Med. Chem. 2012. V. 4. P. 545–584. https://doi.org/10.4155/fmc.11.193
267. *Hevey R.* // Pharmaceuticals. 2019. V. 12. P. 55. https://doi.org/10.3390/ph12020055
268. *Oberbillig T., Mersch C., Wagner S., Hoffmann-Röder A.* // Chem. Commun. 2012. V. 48. P. 1487–1489. https://doi.org/10.1039/C1CC15139H
269. *Bull C., Boltje T.J., Wassink M., de Graaf A.M.A., van Delft F.L., den Brok M.H., Adema G.J.* // Mol. Cancer Ther. 2013. V. 12. P. 1935–1946. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0279
270. *Magnani J.L., Ernst B.* // Discov. Med. 2009. V. 8. P. 247–252.
271. *Gao J., Qiao S., Whitesides G.M.* // J. Med. Chem. 1995. V. 38. P. 2292–2301. https://doi.org/10.1021/jm00013a005
272. *Prescher H., Schweizer A., Kuhfeldt E., Nitschke L., Brossmer R.* // ACS Chem. Biol. 2014. V. 9. P. 1444–1450. https://doi.org/10.1021/cb400952v
273. *Prescher H., Schweizer A., Kuhfeldt E., Nitschke L., Brossmer R.* // ChemBioChem. 2017. V. 18. P. 1216–1225. https://doi.org/10.1002/cbic.201600707
274. *Wagner S., Hauck D., Hoffmann M., Sommer R., Joachim I., Müller R., Imberty A., Varrot A., Titz A.* // Angew. Chemie Int. Ed. Engl. 2017. V. 56. P. 16559–16564. https://doi.org/10.1002/anie.201709368
275. *Ordanini S., Varga N., Porkolab V., Thépaut M., Belvisi L., Bertaglia A., Palmioli A., Berzi A., Trabattoni D., Clerici M., Fieschi F., Bernardi A.* // Chem. Commun. 2015. V. 51. P. 3816–3819. https://doi.org/10.1039/C4CC09709B
276. *Berzi A., Ordanini S., Joosten B., Trabattoni D., Cambi A., Bernardi A., Clerici M.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 35373. https://doi.org/10.1038/srep35373
277. *Berry G.T.* In: Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Eds. GeneReviews® // Seattle (WA). 1993
278. *Yamamoto T., Harada-Shiba M., Nakatani M., Wada S., Yasuhara H., Narukawa K., Sasaki K., Shibata M.-A., Torigoe H., Yamaoka T., Imanishi T., Obika S.* // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2012. V. 1. P. e22. https://doi.org/10.1038/mtna.2012.16
279. *Keppler D., Lesch R., Reutter W., Decker K.* // Exp. Mol. Pathol. 1968. V. 9. P. 279–290. https://doi.org/10.1016/0014-4800(68)90042-7
280. *Pearce A.K., O'Reilly R.K.* // Bioconjug. Chem. 2019. V. 30. P. 2300–2311. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00456
281. *Komarova B.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Chem. Rec. 2016. V. 16. P. 488–506. https://doi.org/10.1002/tcr.201500245
282. *Krylov V.B., Argunov D.A., Vinnitskiy D.Z., Verkhnyatskaya S.A., Gerbst A.G., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S., Huebner J., Holst O., Siebert H.-C., Nifantiev N.E.* // Chemistry. 2014. V. 20. P. 16516–16522. https://doi.org/10.1002/chem.201405083
283. *Токатлы А.И., Винницкий Д.З., Устюжанина Н.Е., Нифантьев Н.Э.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 57–75. [*Tokatly A.I., Vinnitskiy D.Z., Ustuzhanina N.E., Nifantiev N.E.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 52–68.] https://doi.org/10.31857/S0132342321010255

Target Delivery Using Carbohydrate Systems: Expectations and Reality

E. S. Shchegravina*, A. A. Sachkova*, S. D. Usova*, A. V. Nyuchev*, Iu. A. Gracheva*, and A. Yu. Fedorov*, #

#*E-mail: afedorovNN@yandex.ru*

**Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

At the end of the twentieth century, the world entered the era of high-tech and personalized medicine, characterized by the development of targeted drugs. Selective delivery of drugs is recognized as one of the most effective methods for increasing the effectiveness and safety of therapy. This review is devoted to the study of the possibilities of using carbohydrates for the target delivery of drugs, in particular, in the treatment of oncological diseases. The works in which the possibilities of using mono- and oligosaccharides as vector ligands for interaction with tumor- and tissue-specific receptors have been analyzed, examples of conjugation of carbohydrates with chemotherapeutic agents were discussed, photodynamic therapy agents, substrates for *in vitro* and *in vivo* imaging are described. Separate sections of this review are focused on the possibility of using polysaccharides as nanocontainers for the selective delivery of active substances, including nucleic acids, as well as the use of carbohydrates in tumor immunotherapy. The problems and prospects of the biomedical application of carbohydrates and their mimetics as vectors for targeted delivery are considered.

Keywords: carbohydrates, target delivery, carbohydrate vectors, nanoparticles, glycomimetics

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 106–110

УДК 547.455.643:547.292

СЕЛЕКТИВНОЕ АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ ГИДРОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ В МЕТИЛ-*D*-ГЕКСОПИРАНОЗИДАХ СМЕСЬЮ УКСУСНОГО АНГИДРИДА И УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

© 2021 г. Ю. Е. Цветков*, Д. В. Яшунский*, Н. Э. Нифантьев*, #

**Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 47*

Поступила в редакцию 27.07.2020 г.
После доработки 15.08.2020 г.
Принята к публикации 16.08.2020 г.

6-*O*-Ацетилированные производные *D*-гексопиранозидов являются ценными промежуточными продуктами в синтетической химии углеводов. Мы разработали новый простой метод избирательного ацетилирования первичной гидроксильной группы в метил-*D*-гексопиранозидах, заключающийся во взаимодействии со смесью уксусного ангидрида и уксусной кислоты при 50°C, в результате чего образуются соответствующие 6-ацетаты с выходами 40–50%.

Ключевые слова: избирательное 6-O-ацетилирование, метил-D-гексопиранозид, уксусная кислота, ацетангидрид

DOI: 10.31857/S0132342321010267

ВВЕДЕНИЕ

Производные моно- и олигосахаридов, содержащие ацетильную группу при O6 и свободные гидроксильные группы в положениях 2, 3 и 4, широко используются в химии углеводов как исходные соединения для дальнейших манипуляций с защитными группами [1–6] или как гликозил-акцепторы в реакциях гликозилирования [7–10]. 6-*O*-Ацетилированные производные моносахаридов, вторичные гидроксильные группы которых несут отличные от ацетатов защитные группы, находят применение в олигосахаридном синтезе, причем 6-*O*-ацетильные группы могут контролировать стереохимический результат реакций гликозилирования [11, 12].

Наиболее эффективным методом избирательного введения 6-*O*-ацетильной группы является энзиматическое ацетилирование в присутствии липаз из различных источников; в качестве донора ацетильной группы обычно используется винилацетат [7–10, 13, 14]. Выходы 6-*O*-ацетилированных производных в этих реакциях могут достигать 90%. Однако коммерческие ферментные препараты достаточно дороги, поэтому химические методы избирательного ацетилирования первичной гидроксильной группы в незащищенных гексопиранозидах также являлись предметом ряда исследований. Были предложены новые реагенты (например, *N*-ацетилимидазол в присутствии гидроксида тетраметиламмония [15]) и катализаторы селективного 6-*O*-ацетилирования (в частности, производные 4-диметиламинопиридина [16], соли лантанидов [17] и скандия [18]). В ряде случаев (см., например, работу Bianco et al. [17]), эффективность и селективность химических методов не уступала таковым для ферментативных реакций. Избирательное 6-*O*-ацетилирование с использованием ацетилхлорида в присутствии пространственно затрудненных аминов также продемонстрировало достаточно высокую эффективность [19].

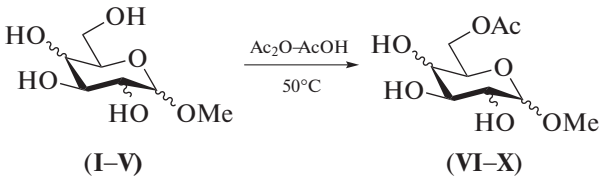
Недавно мы показали, что уксусная кислота и уксусный ангидрид способны в отсутствие катализаторов избирательно ацетилировать первичную гидроксильную группу в метил-2,3-ди-*O*-бензоил-α-*D*-глюкопиранозиде, результатом чего является образование соответствующего 6-*O*-ацетильного производного с высоким выходом [20]. В настоящей статье мы описываем использование аналогичной реакции для моноацетилирования незащищенных метил-*D*-гексопиранозидов (**I**–**V**) с получением соответствующих 6-ацетатов (**VI**–**X**).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свободные метил-*D*-гексопиранозиды практически нерастворимы в уксусном ангидриде, поэтому исходные соединения (**I**–**V**) сначала растворяли в уксусной кислоте, затем прибавляли уксусный ангидрид (объемное соотношение Ac_2O–AcOH 1 : 2) и полученные растворы нагревали при 50 °C, кон-

Автор для связи: (тел., факс: +7 (499) 135-87-84; эл. почта: nen@ioc.ac.ru).

тролируя протекание реакции методом ТСХ (схема 1). Реакцию останавливали, когда содержание исходного метилгликозида в реакционной смеси примерно равнялось содержанию продуктов ди- и триацетилирования.



(I–V) **(VI–X)**

Схема 1. 6-*O*-Ацетилирование гексопиранозильных тетраолов (**I**–**V**).

Моноацетилированные производные выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в системе хлороформ–метанол (4 : 1) с выходом 50–60% (табл. 1). По данным ЯМР, главными компонентами полученных хроматографически однородных продуктов являлись 6-ацетаты (**VI**–**X**), идентифицированные по характерному слабопольному положению сигналов протонов при C6 в спектрах ^{1}H-ЯМР. Минорными компонентами являлись моноацетилированные производные, несущие ацетильную группу на вторичных гидроксильных группах. Об этом свидетельствовало присутствие в спектрах ^{1}H-ЯМР минорных сигналов протонов H1, а также сигналов в слабом поле ($\delta > 4.7$ м.д.), отвечающих кольцевым протонам в положениях, несущих ацетильную группу. Количество вторичных ацетатов во фракции моноацетилированных производных варьировалось от 7 до 30% в зависимости от структуры исходного метилгликозида.

Наиболее высокая региоселективность 6-*O*-ацетилирования наблюдалась в случае α-метилглюкозида (**I**), наименьшая – в случае α-метилгалактозида (**III**). β-Метилглюкозид (**II**), β-метилгалактозид (**IV**) и α-метилманнозид (**V**) занимали промежуточное положение (табл. 1). Поиск условий хроматографической очистки 6-*O*-ацетилированных производных (**VI**–**X**) от примесей вторичных ацетатов не привел к успеху. Соединения (**VII**–**IX**) были выделены в чистом виде кристаллизацией (табл. 1).

Таким образом, смесь уксусного ангидрида и уксусной кислоты избирательно ацетилирует первичную гидроксильную группу в незащищенных гексопиранозидах, в результате чего образуются соответствующие 6-*O*-ацетилированные производные с выходами 50–60%. Предлагаемый метод не уступает в ряде случаев известным методам избирательного ацетилирования первичных гидроксильных групп в производных углеводов [15, 16, 18]. Умеренные выходы целевых продуктов компенсируются простотой реакции и отсутствием необходимости использования малодоступных или дорогостоящих катализаторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

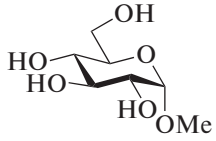
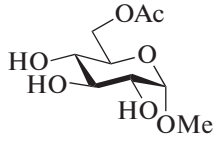
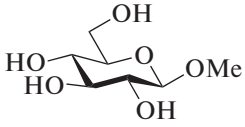
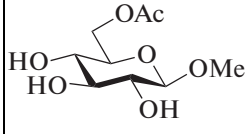
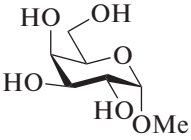
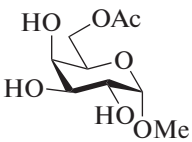
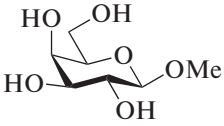
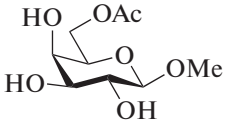
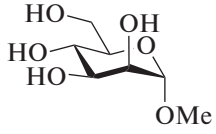
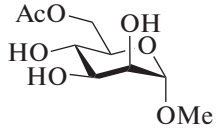
Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках с силикагелем Kieselgel 60 F_{254} (Merck, Германия), вещества обнаруживали опрыскиванием раствором орцинола (180 мг орцинола в смеси 85 мл воды, 10 мл ортофосфорной кислоты и 5 мл этанола) с последующим нагреванием при ~150°C. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Silica gel 60 (40–63 мкм; Merck, Германия). Оптическое вращение измеряли на цифровом поляриметре P-2000 (JASCO, Япония) при комнатной температуре. Температуры плавления определяли на столике Кофлера. Спектры ЯМР регистрировали при 25°C на спектрометре AMX-400 (Bruker, Швейцария) в D_2O. Отнесение сигналов проводили с использованием методик двумерной корреляционной спектроскопии COSY и HSQC. Обозначения 2-Ac, 3-Ac и 4-Ac в описании спектров ^{1}H-ЯМР соответствуют метил-*D*-гексопиранозидам, несущим ацетильную группу в положении 2, 3 или 4 соответственно.

Общая методика 6-*O*-ацетилирования. К раствору метил-*D*-гексопиранозида в AcOH (1–3 мл/100 мг) прибавили по каплям Ac_2O (0.5 объема AcOH) при 50°C. Смесь перемешивали при этой температуре, контролируя протекание реакции ТСХ в системе $CHCl_3$–MeOH (4 : 1). Когда визуально содержание исходного гексопиранозида (R_f 0.10–0.15) и суммы продуктов ди- (R_f 0.55–0.65) и триацетилирования (R_f 0.80–0.85) становилось равным (7–10 ч), смесь охлаждали, упаривали, затем остаточные AcOH и Ac_2O удаляли соупариванием со смесью EtOH–толуол. Из остатка колоночной хроматографией ($CHCl_3$–MeOH 95 : 5 → 9 : 1) выделяли хроматографически однородную фракцию продуктов моноацетилирования (R_f 0.40–0.45, $CHCl_3$–MeOH (4 : 1)).

Метил-6-*O*-ацетил-α-*D*-глюкопиранозид (VI). После колоночной хроматографии получено соединение (**VI**) в виде бесцветного сиропа с общим выходом 58%, содержащее ~7% ацетатов по вторичным гидроксилам. ^{1}H-ЯМР (400 МГц, D_2O, δ, м.д., *J*, Гц): 5.13 (т, 0.03H, *J* 9.5, H3 3-Ac), 4.97 (д, 0.025H, $J_{1,2}$ 3.7, H1 2-Ac), 4.86 (д, 0.05H, $J_{1,2}$ 4.0, H1 2-Ac и 3-Ac), 4.81 (д, 1H, $J_{1,2}$ 3.8, H1), 4.41 (дд, 1H, $J_{6a,5}$ 2.4, $J_{6a,6b}$ 12.5, H6a), 4.30 (дд, 1H, $J_{6b,5}$ 5.3, H6b), 3.85 (ддд, 1H, H5), 3.68 (т, 1H, *J* 9.4, H3), 3.58 (дд, $J_{2,3}$ 9.8, H2), 3.46 (т, 1H, *J* 9.5, H4), 3.42 (с, 3H, CH_3O), 2.14 (с, 3H, CH_3CO). ^{13}C-ЯМР (100 МГц, D_2O, δ, м.д.): 175.0 (CO), 100.3 (C1), 73.9 (C3), 72.1 (C2), 70.5 (C4), 70.2 (C5), 64.3 (C6), 56.1 (CH_3O), 21.1 (CH_3CO). Данные спектров ЯМР соединения (**VI**) хорошо согласуются с данными, приведенными в работе Jansson et al. [21].

Метил-6-*O*-ацетил-β-*D*-глюкопиранозид (VII). После колоночной хроматографии получена фрак-

Таблица 1. Ацетилирование метил-*D*-гексопиранозидов смесью Ac_2O–AcOH

Исходные метил-*D*-гексопиранозиды (**I**–**V**)	Время реакции, ч	6-Ацетаты (**VI**–**X**)	Суммарный выход фракции моноацетатов, %	Содержание моноацетатов по вторичным OH-группам*, %	Выход кристаллического 6-ацетата, %
 (**I**)	10	 (**VI**)	58	7	–**
 (**II**)	10	 (**VII**)	62	12	38
 (**III**)	7	 (**VIII**)	51	30	28
 (**IV**)	9	 (**IX**)	57	14	38
 (**V**)	10	 (**X**)	61	14	–**

* По данным интегрирования характеристичных сигналов в спектрах ^{1}H-ЯМР.
** Сиропообразный продукт.

ция моноацетатов (выход 62%), содержащая 6-ацетатат (**VII**) и ацетаты по вторичным гидроксилам (~12%). ^{1}H-ЯМР (400 МГц, D_2O, δ, м.д., *J*, Гц): 4.98 (т, 0.06H, *J* 9.1, H3 3-Ac), 4.80 (т, 0.04H, *J* 9.4, H4 4-Ac), 4.69 (т, 0.04H, *J* 9.2, H2 2-Ac), 4.58 (д, 0.04H, $J_{1,2}$ 8.1, H1 2-Ac), 4.49 (д, 0.06H, $J_{1,2}$ 8.1, H1 3-Ac), 4.43 (дд, 1H, $J_{6a,5}$ 2.2, $J_{6a,6b}$ 12.2, H6a), 4.40 (д, 1H, $J_{1,2}$ 7.9, H1), 4.30 (дд, 1H, $J_{6b,5}$ 5.1, H6b), 3.69–3.64 (м, 1H, H5), 3.56 (с, 3H, CH_3O), 3.53–3.44 (м, 2H, H3, H4), 3.27 (т, 1 H, *J* 8.8, H2), 2.14 (с, 3H, CH_3CO). ^{13}C-ЯМР (100 МГц, D_2O, δ, м.д.): 175.0 (CO), 104.3 (C1), 76.5 (C3), 74.2 (C5), 74.0 (C2), 70.4 (C4), 64.1 (C6), 58.2 (CH_3O), 21.1 (CH_3CO). Данные спектров ЯМР соединения (**VII**) хорошо согласуются с данными, приведенными в работе Jansson et al. [21]. Кристаллизацией из смеси EtOH–Et_2O выделено соединение (**VII**) (38%) в виде бесцветных кристаллов, т. пл. 129–131°C, $[\alpha]_D$ −26° (с 1, EtOH). Литературные данные [22]: т. пл. 128–129°C, $[\alpha]_D$ −34° (вода).

Метил-6-*O*-ацетил-α-*D*-галактопиранозид (VIII). После колоночной хроматографии получена фракция моноацетатов (выход 51%), содержащая 6-ацетат (**VIII**) и ацетаты по вторичным гидроксилам (~30%). ^{1}H-ЯМР (400 МГц, D_2O, δ, м.д., *J*, Гц): 5.34 (д, 0.14H, $J_{3,4}$ 3.3, H4 4-Ac), 5.04–5.00 (м, 0.60H, H1 2-Ac, H2 2-Ac, H3 3-Ac), 4.91 (д, 0.34H, $J_{1,2}$ 4.1, H1 3-Ac, H1 4-Ac), 4.85 (д, 1H, $J_{1,2}$ 2.9, H1), 4.32 (дд, 1H, $J_{6a,5}$ 4.1, $J_{6a,6b}$ 11.6, H6a), 4.25 (дд, 1H, $J_{6b,5}$ 8.1, H6b), 4.13 (м, 1H, H5), 4.01 (уш. с, 1H, H4), 3.83 (м, 2H, H2, H3), 3.41 (с, 3H, CH_3O), 2.13 (с, 3H, CH_3CO). ^{13}C-ЯМР (100 МГц, D_2O, δ, м.д.): 174.9 (CO), 100.3 (C1), 70.1 (C3), 70.0 (C4),

69.1 (C5), 68.9 (C2), 65.0 (C6), 55.9 (CH_3O), 21.1 (CH_3CO). Данные спектров ЯМР соединения (**VIII**) хорошо согласуются с данными, приведенными в работе Jansson et al. [21]. Кристаллизацией из смеси EtOH–Et_2O получено соединение (**VIII**) (выход 28%) в виде бесцветных кристаллов, т. пл. 157–159°C, $[\alpha]_D$ +147° (c 1, EtOH). Литературные данные [23]: т. пл. 154–156°C, $[\alpha]_D$ +160° (EtOH).

Метил-6-*O*-ацетил-β-*D*-галактопиранозид (IX). После колоночной хроматографии получена фракция моноацетатов (выход 57%), содержащая 6-ацетат (**IX**) и ацетаты по вторичным гидроксилам (~14%). ^{1}H-ЯМР (400 МГц, D_2O, δ, м.д., *J*, Гц): 5.30 (д, 0.05H, $J_{3,4}$ 3.5, H4 4-Ac), 4.92 (дд, 0.04H, $J_{1,2}$ 8.1, $J_{2,3}$ 10.1, H2 2-Ac), 4.87 (дд, 0.07H, $J_{2,3}$ 10.1, $J_{3,4}$ 3.4, H3 3-Ac), 4.52 (д, 0.04H, $J_{1,2}$ 8.1, H1 2-Ac), 4.44 (д, 0.07H, $J_{1,2}$ 8.1, H1 3-Ac), 4.41 (д, 0.05H, $J_{1,2}$ 7.9, H1 4-Ac), 4.33 (д, 1H, $J_{1,2}$ 7.9, H1), 4.29 (д, 2H, $J_{6,5}$ 6.2, 2 H6), 3.96 (д, 1H, $J_{3,4}$ 3.5, H4), 3.92 (т, 1H, $J_{5,6}$ 6.2, H5), 3.66 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 3.5, $J_{2,3}$ 10.0, H3), 3.57 (с, 3H, CH_3O), 3.51 (дд, 1H, $J_{2,3}$ 10.0, $J_{1,2}$ 7.9, H2), 2.13 (с, 3H, CH_3CO). ^{13}C-ЯМР (100 МГц, D_2O, δ, м.д.): 174.9 (CO), 104.7 (C1), 73.5 (C3), 73.5 (C5), 71.4 (C2), 69.5 (C4), 64.7 (C6), 58.1 (CH_3O), 21.1 (CH_3CO). Данные спектров ЯМР соединения (**IX**) хорошо согласуются с данными, приведенными в работе Jansson et al. [21]. Кристаллизацией из смеси EtOH–Et_2O получено соединение (**IX**) (выход 38%) в виде бесцветных кристаллов, т. пл. 146–148°C, $[\alpha]_D$ –11° (c 1, EtOH). Литературные данные [24]: т. пл. 142–145°C, $[\alpha]_D$ –14° (EtOH).

Метил-6-*O*-ацетил-β-*D*-маннопиранозид (X). После колоночной хроматографии получено соединение (**X**) в виде бесцветного сиропа с общим выходом 61%, содержащее ~14% ацетатов по вторичным гидроксилам. ^{1}H-ЯМР (400 МГц, D_2O, δ, м.д., *J*, Гц): 5.03 (дд, 0.05H, $J_{1,2}$ 1.6, $J_{2,3}$ 3.5, H2 2-Ac), 4.96 (т, 0.04H, *J* 9.5, H4 4-Ac), 4.93 (дд, 0.07H, $J_{2,3}$ 3.4, $J_{3,4}$ 9.8, H3 3-Ac), 4.69 (уш. с, 1H, H1), 4.37 (дд, 1H, $J_{6a,5}$ 2.2, $J_{6a,6b}$ 12.2, H6a), 4.22 (дд, 1H, $J_{6b,5}$ 5.6, H6b), 3.88 (дд, 1H, $J_{1,2}$ 1.8, $J_{2,3}$ 3.1, H2), 3.70 (м, 1H, H5), 3.67 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 9.4, H3), 3.64 (т, 1H, *J* 9.7, H4), 3.34 (с, 3H, CH_3O), 2.08 (с, 3H, CH_3CO). Данные спектра ^{1}H-ЯМР соединения (**X**) хорошо согласуются с данными, приведенными в работе Lassfolk et al. [25]. ^{13}C-ЯМР (100 МГц, D_2O, δ, м.д.): 175.2 (CO), 102.0 (C1), 71.4 (C3), 71.1 (C5), 70.8 (C2), 67.6 (C4), 64.6 (C6), 55.8 (CH_3O), 21.2 (CH_3CO).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-43-02023).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rana S.S., Matta K.L.* // Carbohydr. Res. 1983. V. 113. P. C18–C21. https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88254-8
2. *La Ferla B., Prosperi D., Lay L., Russo G., Panza L.* // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 1333–1342. https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00164-7
3. *Kaji E., Komori T., Yokoyama M., Kato T., Nishino T., Shirahata T.* // Tetrahedron. 2010. V. 66. P. 4089–4100. https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.04.007
4. *Muramatsu W., Kawabata T.* // Tetrahedron Lett. 2007. V. 48. P. 5031–5033. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.05.098
5. *Gening M.L., Titov D.V., Grachev A.A., Gerbst A.G., Yudina O.N., Chizhov A.O., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Eur. J. Org. Chem. 2010. V. 13. P. 2465–2475. https://doi.org/10.1002/ejoc.200901275
6. *Kochetkov N.K., Nifant'ev N.E., Backinowsky L.V.* // Tetrahedron. 1987. V. 43. P. 3109–3121. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86852-6
7. *Lawandi J., Rocheleau S., Moitessier N.* // Tetrahedron. 2011. V. 67. P. 8411–8420. https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.07.026
8. *Legentil L., Cabezas Y., Tasseau O., Tellier C., Daligault F., Ferrières V.* // J. Org. Chem. 2017. V. 82. P. 7114–7122. https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b00565
9. *Rencurosi A., Poletti L., Russo G., Lay L.* // Eur. J. Org. Chem. 2003. P. 1672–1680. https://doi.org/10.1002/ejoc.200200425
10. *Zhang X., Kamiya T., Otsubo N., Ishida H., Kiso M.* // J. Carbohydr. Chem. 1999. V. 18. P. 225–239. https://doi.org/10.1080/07328309908543992
11. *Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Carbohydr. Res. 2014. V. 384. P. 70–86. https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.11.016
12. *Komarova B.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E.* // Chem. Rec. 2016. V. 16. P. 488–506. https://doi.org/10.1002/tcr.201500245
13. *Yasukochi T., Fukase K., Kusumoto S.* // Tetrahedron Lett. 1999, V. 40. P. 6591–6593. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)01280-0
14. *La Ferla B., Lay L., Russo G., Panza L.* // Tetrahedron Asymmetry. 2000. V. 11. P. 3647–3651. https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)00342-6
15. *Lu Y., Wei P., Pei Y., Xu H., Xin X., Pei Z.* // Green Chem. 2014. V. 16. P. 4510–4514. https://doi.org/10.1039/c4gc00770k

16. *Kurahashi T., Mizutani T., Yoshida J.-i.* // Tetrahedron. 2002. V. 58. P. 8669–8677. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)01098-0
17. *Bianco A., Brufani M., Melchioni C., Romagnoli P.* // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. P. 651–652.
18. *McClure M.S., Berry M.B., Caine D., Crawford C., Crump B.C., Glover B.N., Kedia S.B., Millar A., Mitchell M.B., Nichols C.J., Patterson D.E., Powers J.* // Eur. J. Org. Chem. 2012. P. 3561–3565. https://doi.org/10.1002/ejoc.201200261
19. *Ishihara K., Kurihara H., Yamamoto H.* // J. Org. Chem. 1993. V. 58. P. 3791–3793. https://doi.org/10.1021/jo00067a005
20. *Цветков Ю.Е., Генинг М.Л., Нифантьев Н.Э.* // Изв. АН. Сер. хим. 2020. С. 2228–2230. [*Tsvetkov Y.E., Gening M.L., Nifantiev N.E.* // Russ. Chem. Bull. 2020. V. 69. P. 2228–2230.]
21. *Jansson P.-E., Kenne L., Schweda E.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1987. P. 377–383. https://doi.org/10.1039/P19870000377
22. *Bouveng H.O.* // Acta Chem. Scand. 1961. V. 15. P. 87–95. https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.15-0087
23. *Borén H.B., Garegg P.G., Kenne L., Pilotti Å., Svensson S., Swahn C.-G.* // Acta Chem. Scand. 1973. V. 27. P. 2740–2748.
24. *Garegg P.G., Swahn C.-G.* // Acta Chem. Scand. 1972. V. 26. P. 3895–3901. https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.26-3895
25. *Lassfolk R., Rahkila J., Johansson M.P., Ekholm F.S., Wärnå J., Leino R.* // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 1646–1654. https://doi.org/10.1021/jacs.8b11563

Selective Acetylation of the Primary Hydroxyl Group in Methyl *D*-Hexopyranosides with a Mixture of Acetic Anhydride and Acetic Acid

Y. E. Tsvetkov*, D. V. Yashunsky*, and N. E. Nifantiev*, #

#Fax: +7 (499) 135-97-84; e-mail: nen@ioc.ac.ru

**N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 47, Moscow, 119991 Russia*

6-*O*-Acetylated derivatives of *D*-hexopyranosides are valuable intermediates in synthetic carbohydrate chemistry. We have developed a new simple procedure for selective acetylation of the primary hydroxyl group in methyl *D*-hexopyranosides consisting in treatment with a mixture of acetic anhydride and acetic acid at 50°C. As a result, corresponding 6-acetates were formed in 40–50% yield.

Keywords: acetic acid, *acetic anhydride*, *methyl D-hexopyranosides*, *selective 6-O-acetylation*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 111–127

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 547.56:615.012.1

ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ РЕСВЕРАТРОЛА – СИНТЕЗ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ. ЧАСТЬ 1. АНАЛОГИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ЗАМЕНОЙ АРИЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ НА ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ

© 2021 г. А. В. Семенов*, #, Е. В. Семенова*, О. И. Балакирева*

**Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Россия, 430005 Саранск, ул. Большевистская, 68*

Поступила в редакцию 02.06.2020 г.
После доработки 16.06.2020 г.
Принята к публикации 24.06.2020 г.

Ресвератрол – полифенольный фитоалексин, производное стильбена, исследованию физиологических эффектов которого посвящено большое количество работ, в результате которых для него было показано антиоксидантное, противоопухолевое, нейропротекторное, противовоспалительное, антибактериальное и противовирусное действие. В последние десятилетия большое внимание уделялось созданию производных ресвератрола для улучшения его фармакологической активности и фармакокинетики. Первая часть обзора посвящена синтетическим аналогам ресвератрола, полученным путем замены одного или двух фенильных фрагментов стильбенового остова на биоизостерные гетероциклические структуры. Основное внимание уделено методам синтеза аналогов ресвератрола и проявляемой ими биологической активности.

Ключевые слова: ресвератрол, гетероциклические аналоги, антиоксиданты, противоопухолевая активность, нейропротекторы, противовоспалительная активность

DOI: 10.31857/S0132342321010218

ВВЕДЕНИЕ

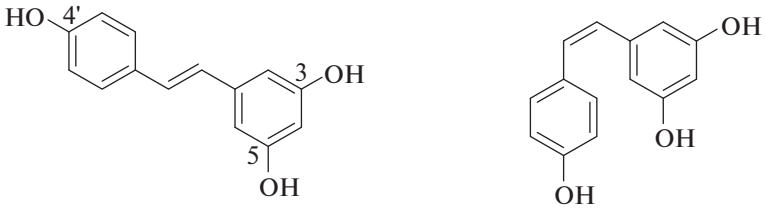
Ресвератрол (3,5,4'-тригидрокистильбен) относится к фитоалексинам полифенольной природы – группе широко распространенных соединений растительного происхождения. Благодаря наличию в структуре двойной связи C=C он может существовать в виде *цис*- и *транс*-конфигураций (рис. 1), которые при определенных условиях достаточно легко переходят друг в друга.

В природных условиях преобладает более устойчивый *транс*-ресвератрол, впервые обнаруженный и выделенный в чистом виде японским исследователем M. Takaoka еще в 1940 г. из одного из видов черемицы (*Veratrum grandiflorum*) [1]. В дальнейшем этот фитоалексин был идентифицирован во многих природных объектах: коре сосны, орехах (арахис, фисташки), какао-бобах, ягодах (малина, слива, виноград) и др. В настоящее время основными природными источниками ресвератрола являются экстракты кожицы и семян винограда, а также экстракт корней горца японского.

Интерес к ресвератролу резко возрос в 1992 г., когда была выдвинута гипотеза для объяснения кардиопротекторных эффектов красного вина и так называемого “французского парадокса” – относительно низкой частоты сердечно-сосудистых

Сокращения: AChE – ацетилхолинэстераза; AMPK – 5'АМФ-активируемая протеинкиназа; Aβ – бета-амилоид; CD – кластер дифференцировки; Cdk – циклинзависимая протеинкиназа; COX – циклооксигеназа; DIBAL-H – диизобутилалюминий-гидрид; IL – интерлейкин; iNOS – индуцируемая NO-синтаза; LPS – липополисахариды; LSD – лизинспецифическая гистондеметилаза; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; MOM – метоксиметил; MW – микроволновое излучение; Myc – протоонкогенный белок Myc; NF – ядерный фактор транскрипции; PGC – коактиватор рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом; PGE – простагландин; PMB – *пара*-метоксибензил; PPAR – рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; ROS (Reactive oxygen species) – активные формы кислорода; SIRT – сиртуин; SPLET (Sequential proton-loss electron transfer) – отрыв протона с последующим переносом электрона; TBAB – тетрабутиламмонийбромид; TERT – теломеразная обратная транскриптаза; TLR – Toll-подобный рецептор; TNF – фактор некроза опухоли; UCP – разобщающий митохондриальный белок; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; MAO – моноаминоксидаза.

Автор для связи: (тел.: +7 (987) 691-05-38; эл. почта: salexan@mail.ru).



транс-ресвератрол *цис*-ресвератрол

Рис. 1. Структуры изомеров ресвератрола.

заболеваний в тех регионах Франции, где совместно с высококалорийной диетой с большим содержанием насыщенных жиров употребляется значительное количество красного вина [2]. Последующие многочисленные исследования, обобщенные в ряде обзоров, показали наличие у ресвератрола не только кардиопротекторных [3], но и противоопухолевых [4], нейропротекторных [5] и противовоспалительных свойств [6], а также способность замедлять процессы старения и увеличивать продолжительность жизни, что было показано для ряда организмов (дрожжи, черви, мухи и рыбы) [7, 8]. Многие из этих эффектов опосредованы выраженными антиоксидантными свойствами соединения [9].

Однако мультитаргетность действия ресвератрола на практике ассоциирована с относительно невысокой клинической эффективностью. Недостаточная терапевтическая эффективность препарата у человека многими авторами объясняется низкой биодоступностью, связанной с очень быстрой пресистемной элиминацией в кишечнике и печени [10, 11]. В связи с этим проводится активный поиск синтетических аналогов ресвератрола в направлении повышения фармакологической активности или селективности действия, а также оптимизации фармакокинетики. Представленные в литературе модификации структуры нативного соединения, в том числе с учетом концепции биоизостерных замен, можно разделить на три ключевых направления: 1) варьирование типа, числа и количества заместителей в стильбеновом остове ресвератрола; 2) замена арильных фрагментов на гетероциклические структуры; 3) модификация линкера, соединяющего бензольные кольца.

Первая часть обзора посвящена второму варианту трансформации нативной структуры. Каждая серия аналогов будет рассмотрена с точки зрения подходов к синтезу и их биологической активности.

ЗАМЕНА АРИЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ В РЕСВЕРАТРОЛЕ НА БИОИЗОСТЕРНЫЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ

Общая стратегия синтеза аналогов этого типа обычно базируется на формировании непредельного линкера, соединяющего циклические фрагменты независимо от их природы. Для этого используются как различные модификации реакции Виттига, так и процессы кросс-сочетания в присутствии металлокомплексных катализаторов.

Аналоги с антиоксидантной активностью

Антиоксидантные свойства ресвератрола во многих случаях рассматриваются в качестве базовой основы проявляемых им физиологических эффектов. Поэтому множество работ посвящены созданию аналогов ресвератрола с улучшенной способностью подавлять негативные эффекты, вызываемые ROS. С другой стороны, показанная в ряде исследований прооксидантная активность соединения также представляет несомненный интерес. В случае гетероциклических аналогов модулирование данных видов активностей в основном построено на создании гибридных молекул за счет объединения в одной структуре нескольких фармакофоров. В последнее время такой подход в медицинской химии привлекает большое внимание. Примером может служить синтез производных ресвератрола с включением в структуру фрагмента витамина Е [12]. Ключевой стадией получения структур (**1**) и (**2**) стала реакция Виттига–Хорнера между предварительно синтезированным альдегидом с хромановым остовом и соответствующей серии диэтилфосфонатов (схема 1).

Кинетические исследования позволили установить, что антиоксидантное действие синтезированных молекул согласуется с механизмом отрыва протона с последующим переносом электрона Sequential proton-loss electron transfer (SPLET), и при этом фиксируется существенный рост антирадикальной активности по сравнению с родительскими структурами.

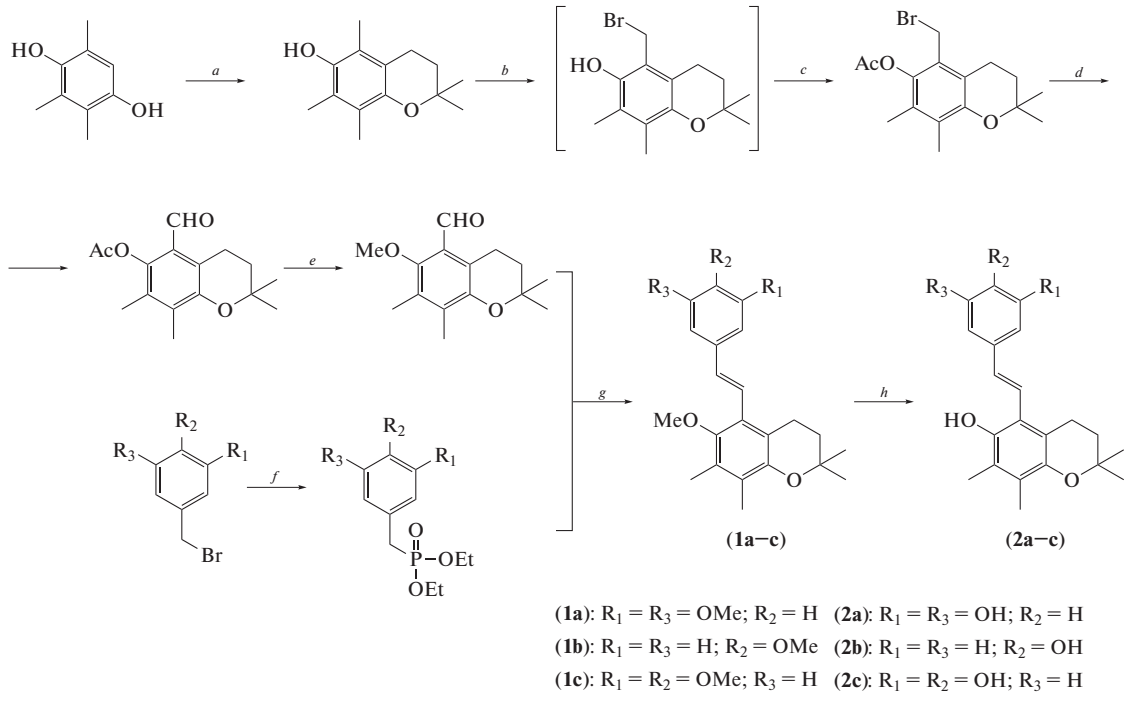
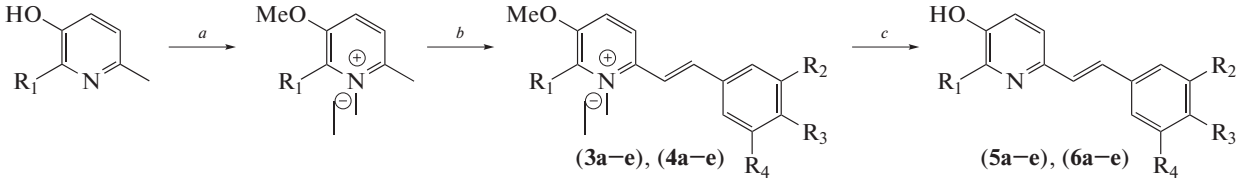


Схема 1. Синтез соединений (**1**) и (**2**). Реагенты и условия реакций: *a* – 2-метилбут-3-ен-2-ол, TFA; *b* – Br_2; *c* – Ac_2O, AcOH, H_2SO_4; *d* – *N*-метилморфолин-*N*-оксид; *e* – 1. NH_4OAc, 2. MeI, K_2CO_3; *f* – $(EtO)_3P$; *g* – NaH; *h* – NaH, EtSH.

В своих исследованиях [13, 14] мы также обратились к созданию гибридных антиоксидантов, включив в остов ресвератрола 3-гидроксипиридиновый фрагмент – структурную основу таких препаратов, как эмоксипин и мексидол. Синтез аналогов проведен по схеме 2 и включает получение четвертичных пиридиниевых солей с последующей их конденсацией в условиях реакции Кнёвенагеля с коммерчески доступными альдегидами.



(**3a**): $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
(**3b**): $R_1 = R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OMe$
(**3c**): $R_1 = R_4 = H$, $R_2 = R_3 = OMe$
(**3d**): $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = R_4 = OMe$
(**3e**): $R_1 = H$, $R_2 = R_3 = R_4 = OMe$
(**4a**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_3 = R_4 = H$
(**4b**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OMe$
(**4c**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_3 = OMe$, $R_4 = H$
(**4d**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_4 = OMe$, $R_3 = H$
(**4e**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_3 = R_4 = OMe$

(**5a**): $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
(**5b**): $R_1 = R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OH$
(**5c**): $R_1 = R_4 = H$, $R_2 = R_3 = OH$
(**5d**): $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = R_4 = OH$
(**5e**): $R_1 = H$, $R_2 = R_3 = R_4 = OH$
(**6a**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_3 = R_4 = H$
(**6b**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OH$
(**6c**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_3 = OH$, $R_4 = H$
(**6d**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_4 = OH$, $R_3 = H$
(**6e**): $R_1 = Et$, $R_2 = R_3 = R_4 = OH$

Схема 2. Синтез соединений (**3**–**6**). Реагенты и условия реакций: *a* – 1. CH_3ONa, CH_3OH, MW. 2. CH_3I, MW или 1. CH_2N_2, Et_2O. 2. CH_3I, $CHCl_3$, MW; *b* – ArCHO, BuOH, пиперидин; *c* – Py · HCl.

Большинство полученных производных показало высокую антирадикальную (в тесте ДФПГ) и антиоксидантную (на модели железо-аскорбат индуцированного окисления липидных мембран митохондрий) активность, превышающую параметры прототипа, при низкой токсичности. Наилучшими характеристиками обладали производные (**5b**, **c**) и (**6b**, **c**).

Еще одним примером может служить синтез гибридов ресвератрола и известного хелатирующего агента – деферипрона [15]. Синтетическая схема 3 базируется на реакции Виттига, в рамках которой илиды на основе койевой кислоты вводились во взаимодействие с доступными замещенными бензальдегидами.

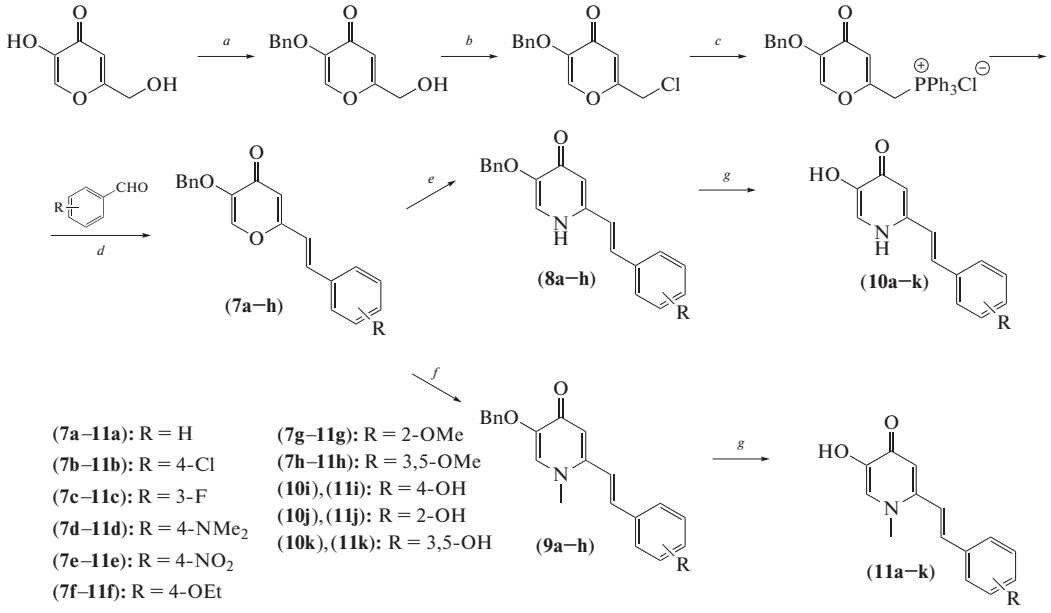


Схема 3. Синтез соединений (**7**–**11**). Реагенты и условия реакций: *a* – BnCl, MeOH, кипячение, 16 ч; *b* – $SOCl_2$, 2 ч; *c* – PPh_3, $CHCl_3$, 24 ч; *d* – NaOH; *e* – $NH_3 \cdot H_2O$; *f* – $MeNH_2$; *g* – 6 н HCl или BBr_3.

Оценка *in vitro* показала, что большинство полученных соединений одновременно проявляют высокую антиоксидантную и металлхелатирующую активность. Наиболее перспективными оказались производные (**10i**) и (**11f**).

На основе реакции кросс-сочетания (схема 4) были получены новые аналоги ресвератрола, содержащие пяти- и шестичленные нитроксиды и изоиндолиновые нитроксиды [16].

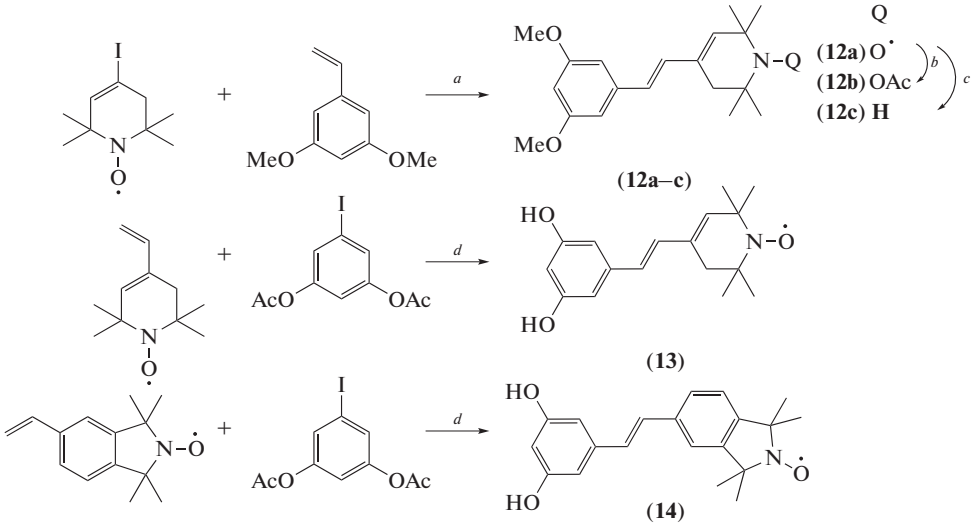


Схема 4. Синтез соединений (**12**–**14**). Реагенты и условия реакций: *a* – K_2CO_3, $Pd(OAc)_2$, Bu_4NBr, DMF; *b* – 1. аскорбиновая кислота, N_2, диоксан, H_2O; 2. Et_3N, AcCl; *c* – Fe, AcOH; *d* – 1. KOAc, $Pd(OAc)_2$, Bu_4NBr, DMF, 2. MeONa, MeOH.

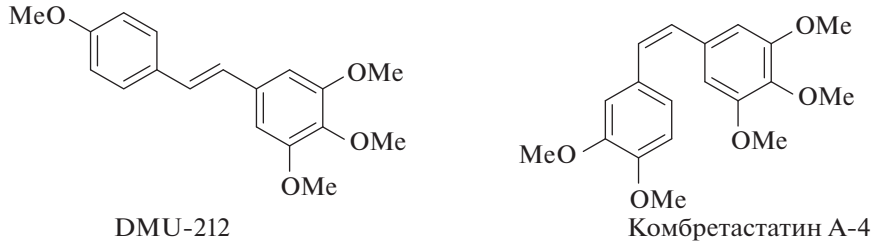


Рис. 2. Структуры DMU-212 и комбретастатина А-4.

К сожалению, их способность к перехвату свободных радикалов не превзошла наблюдаемую для прототипа.

Аналоги с противоопухолевой активностью

Согласно имеющимся в литературе сведениям противоопухолевые эффекты ресвератрола могут реализовываться различными механизмами, одним из которых является антимитотическое действе путем воздействия на различные фазы клеточного цикла. В частности, у ресвератрола выявлена способность ингибировать функции микротрубочек. При этом установлено, что более эффективным воздействием на тубулин обладают его метоксилированные производные, например, (*E*)-3,4,5,4' -тетраметоксистильбен (DMU-212) [17], имеющий структурное сходство с известным природным антимитотическим агентом комбретастатином А-4 (рис. 2).

Учитывая вероятную ключевую роль триметоксистирильного фрагмента в проявляемой активности, был синтезирован ряд аналогов DMU-212, в которых 4-метоксифенильный фрагмент был заменен на индольный, бензофурановый, бензотиазольный или бензотиофеновый остатки [18]. В основу синтеза была положена реакция Виттига между соответствующими гетероциклическими альдегидами и трифенилфосфониевыми солями (схема 5).

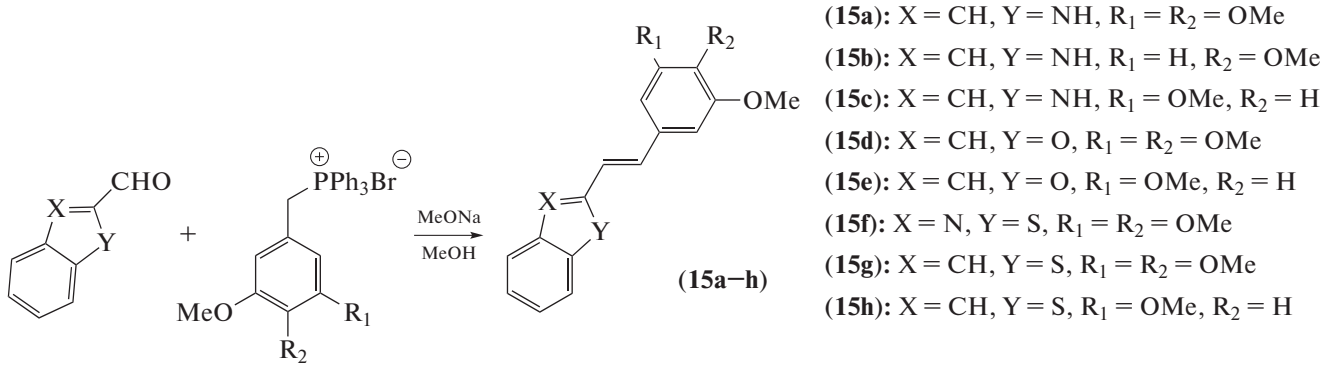
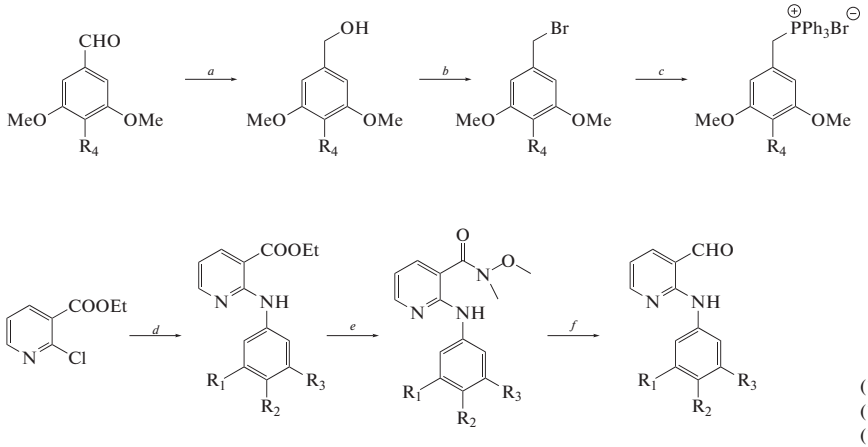


Схема 5. Синтез соединений (**15**).

Было установлено, что именно аналоги, содержащие *транс*-3,4,5-триметоксистирильный фрагмент (соединения (**15a**), (**15d**), (**15f**) и (**15g**) соответственно), продемонстрировали мощный ингибирующий эффект (со значениями $GI_{50} < 1$ мкМ) в 85% из 60 исследованных линий раковых клеток человека. При этом 3,4- и 3,5-диметоксизамещенные производные показали значительно меньшее ингибирование роста. Проведенное молекулярное моделирование выявило, что четыре наиболее активные соединения (**15a**), (**15d**), (**15f**) и (**15g**) эффективно взаимодействуют с колхициновым сайтом связывания тубулина.

Также была предпринята попытка создания гибридной молекулы (схема 6) на основе ресвератрола и известного ингибитора полимеризации тубулина – 2-анилинопиридин сульфонамида (E7010) [19].



	E/Z, %
(16a): $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_4 = OMe$	90/10
(16b): $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = F$, $R_4 = OMe$	94/6
(16c): $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = Cl$, $R_4 = OMe$	90/10
(16d): $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = OH$, $R_4 = OMe$	94/6
(16e): $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = R_4 = OMe$	93/7
(16f): $R_1 = H$, $R_2 = R_3 = R_4 = OMe$	94/6
(16g): $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = OMe$	95/5
(16h): $R_1 = R_2 = R_3 = F$, $R_4 = OMe$	95/5
(16i): $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$	90/10
(16j): $R_1 = R_3 = R_4 = H$, $R_2 = F$	92/8
(16k): $R_1 = R_3 = R_4 = H$, $R_2 = Cl$	92/8
(16l): $R_1 = R_3 = R_4 = H$, $R_2 = OMe$	90/10
(16m): $R_1 = R_4 = H$, $R_2 = R_3 = OMe$	94/6

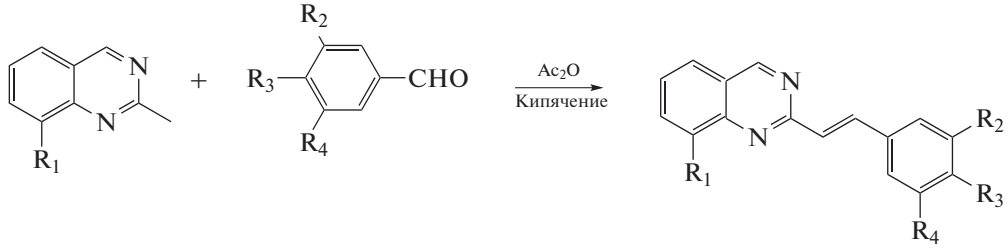
Схема 6. Синтез соединений (**16**). Реагенты и условия реакций: *a* – $NaBH_4$, MeOH; *b* – PBr_3, CH_2Cl_2; *c* – PPh_3, толуол; *d* – $ArNH_2$, этиленгликоль; *e* – *N*,*O*-диметилгидроксиламин, $AlMe_3$, CH_2Cl_2; *f* – DIBAL-H, CH_2Cl_2; *g* – NaH, THF.

Антипролиферативную активность соединений исследовали на четырех раковых клеточных линиях человека (A549, HepG2, HeLa и Du145). Были получены значения GI_{50} в диапазоне 2.1–20 мкМ. В отношении клеточной линии HepG2 рака шейки матки человека производные (**16a**) и (**16k**) показали в 13 раз более низкие значения GI_{50} по сравнению с ресвератролом и в 1.1–2 раза более низкие значения GI_{50} по отношению к E7010. Установлено, что соединения (**16a**) и (**16k**) в рассматриваемой клеточной линии активно взаимодействовали с колхициновым сайтом связывания, ингибировали сборку тубулина, деполимеризовали микротрубочки и останавливали клеточный цикл в фазе G_2/M. Также они продемонстрировали высокую эффективность и селективность на панели линий раковых клеток человека NCI 60.

Антимитотическая активность оценивалась и для стирилхиназолиновых аналогов [20], синтезированных в условиях реакции Кнёвенагеля по схеме 7 [21].

Подавляющее большинство полученных производных показало ингибирующую активность по отношению к трем раковым клеточным линиям HeLa, HL-60 и A549 более выраженную, чем у ресвератрола. При этом наиболее мощным цитотоксическим эффектом обладало триацетильное производное (**17g**), проявляющее в концентрациях 2–10 мкМ цитостатический, а в концентрации 10 мкМ – цитоцидный эффект в отношении клеток рака шейки матки человека HeLa. Было установлено, что соединение (**17g**) ингибирует пролиферацию клеток HeLa за счет остановки клеточного цикла в фазе G_2/M, связанной с активизацией экспрессии циклина B1, за счет усиления фосфорилирования циклинзависимой протеинкиназы 1 (Cdk1) и белка Cdc25C, а также путем повышения уровня белка $p21^{CIP1/WAF1}$ по p53-зависимому механизму. Последующие исследования показали, что в случае клеточной линии лейкемии HL-60 соединение (**17g**) стимулирует апоптоз Fas-опосредованным каспазо-8-зависимым путем через генерацию ROS и, в меньшей степени, путем активации высвобождения цитохрома *c* и каспазы-9 [22].

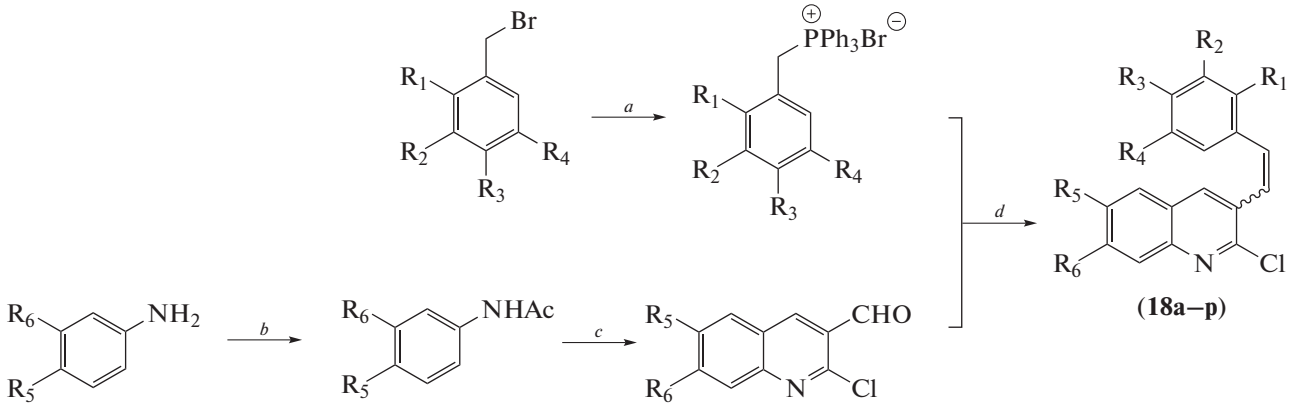
Серия гибридных молекул, содержащих хинолиновый фрагмент, была получена по синтетической схеме 8, в основу которой положена реакция Виттига [23].



(17a–k)

(17a): $R_1 = R_2 = R_3 = OH$, $R_4 = H$
(17b): $R_1 = R_4 = H$, $R_2 = R_3 = OH$
(17c): $R_1 = OMe$, $R_2 = R_3 = OH$, $R_4 = H$
(17d): $R_1 = R_3 = OMe$, $R_2 = OH$, $R_4 = H$
(17e): $R_1 = R_4 = H$, $R_2 = R_3 = OAc$
(17f): $R_1 = OMe$, $R_2 = R_3 = OAc$, $R_4 = H$
(17g): $R_1 = R_2 = R_3 = OAc$, $R_4 = H$
(17h): $R_1 = OMe$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OH$
(17i): $R_1 = R_3 = OH$, $R_2 = R_4 = H$
(17j): $R_1 = OMe$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OAc$
(17k): $R_1 = OMe$, $R_2 = R_4 = Br$, $R_3 = OAc$

Схема 7. Синтез соединений (**17**).



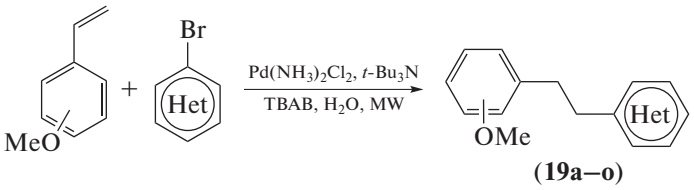
(18a–p)

(18a): $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$, $R_3 = CF_3$
(18b): $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$, $R_3 = F$
(18c): $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$, $R_3 = CF_3$, $R_6 = Cl$
(18d): $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$, $R_3 = F$, $R_6 = Cl$
(18e): $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = H$, $R_3 = CF_3$, $R_5 = OMe$
(18f): $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = H$, $R_3 = F$, $R_5 = OMe$
(18g): $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$, $R_2 = CF_3$
(18h): $R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = H$, $R_2 = CF_3$, $R_5 = OMe$
(18i): $R_1 = R_3 = R_6 = H$, $R_2 = R_4 = CF_3$, $R_5 = OMe$
(18j): $R_1 = R_3 = R_5 = R_6 = H$, $R_2 = R_4 = CF_3$
(18k): $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = R_4 = CF_3$, $R_6 = Cl$
(18l): $R_1 = R_3 = CF_3$, $R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
(18m): $R_1 = R_3 = CF_3$, $R_2 = R_4 = R_6 = H$, $R_5 = OMe$
(18n): $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = R_4 = CF_3$, $R_5 + R_6 = –OCH_2O–$
(18o): $R_1 = R_3 = R_4 = H$, $R_2 = CF_3$, $R_5 + R_6 = –OCH_2O–$
(18p): $R_1 = CF_3$, $R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = H$, $R_5 = OMe$

Схема 8. Синтез соединений (**18**). Реагенты и условия реакций: *a* – PPh_3, PhMe, кипячение; *b* – HCl, Ac_2O; *c* – $POCl_3$: DMF 3 : 1; *d* – NaOH, DMSO.

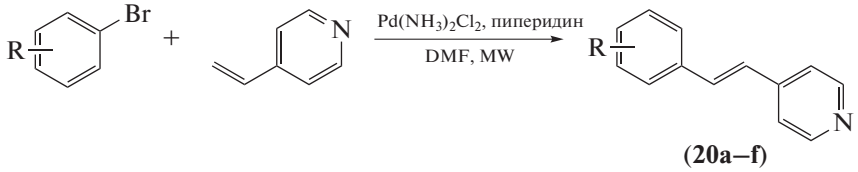
Исследования активности, проведенные на четырех клеточных линиях (HeLa, MDA-MB231, MCF7 и MDA-MB468), показали, что три производные (**18g**), (**18h**), (**18p**) в виде *Z*-изомеров не только обладали достаточно мощным антипролиферативным эффектом (IC_{50} < 4 мМ), но и показывали приблизительно двукратную селективность в отношении раковых клеток по сравнению с нормальными клетками. Три других соединения (**18a**), (**18i**), (**18j**) в виде *Z*-изомеров показали сравнительно хорошую активность со значениями IC_{50} в диапазоне 4–10 мМ. Соединение (**18b**) в виде *E*-изомера проявило высокую активность только в отношении MDA-MB468 (IC_{50} = 0.12 мМ), вызывая значительное повреждение ДНК и останавливая клеточный цикл в S-фазе. Производное (**18g**) в виде *Z*-изомера оказалось эффективным против всех исследованных раковых клеточных линий, вызывая остановку клеточного цикла путем ингибирования полимеризации микротрубочек и, в конечном итоге, приводя к развитию апоптоза. Эффект опосредован взаимодействием соединения с тубулином в сайте связывания, характерным для подофиллотоксина.

Наряду с прямым цитостатическим действием оценивалась противоопухолевая активность ресвератрола, связанная с подавлением опухолевого ангиогенеза [24], в частности, путем влияния на фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), сверхэкспрессия производства которого встречается в различных типах опухолевых клеток, способствует их пролиферации и миграции при увеличении проницаемости сосудов. Также сообщалось [25] о влиянии ресвератрола на экспрессию генов, участвующих в активации теломеразы – фермента, экспрессия которого ограничена или отсутствует в нормальных соматических клетках человека, но активирована у 90% злокачественных. С целью повышения эффективности противоопухолевой терапии предпринимаются попытки совмещения высокой цитотоксической активности со способностью подавлять опухолевый ангиогенез и экспрессию генов, связанных с активацией теломеразы. Так, по реакции Хека был синтезирован ряд пиридиновых и пиримидиновых аналогов ресвератрола (схема 9) [26].



(**19a–o**)

(19a): 2-OMe, Het = 2-Py
(19b): 3-OMe, Het = 2-Py
(19c): 4-OMe, Het = 2-Py
(19d): 2-OMe, Het = 3-Py
(19e): 3-OMe, Het = 3-Py
(19f): 4-OMe, Het = 3-Py
(19g): 2-OMe, Het = 4-Py
(19h): 3-OMe, Het = 4-Py
(19i): 4-OMe, Het = 4-Py
(19j): 2-OMe, Het = 2-пиримидинил
(19k): 3-OMe, Het = 2-пиримидинил
(19l): 4-OMe, Het = 2-пиримидинил
(19m): 2-OMe, Het = 5-пиримидинил
(19n): 3-OMe, Het = 5-пиримидинил
(19o): 4-OMe, Het = 5-пиримидинил



(**20a–f**)

(20a): R = 2-OH
(20b): R = 3-OH
(20c): R = 4-OH
(20d): R = 2-NH_2
(20e): R = 3-NH_2
(20f): R = 4-NH_2

Схема 9. Синтез соединений (**19**) и (**20**).

Соединения (**19c**), (**19e**), (**19g**), (**19h**) и (**19i**) демонстрировали более низкие значения IC_{50}, чем ресвератрол, в отношении опухолевой клеточной линии HT-29 и имели более высокие значения IC_{50} при исследовании на неопухолевой клеточной линии HEK-293. Наиболее активными ока-

зались метоксизамещенные соединения (**19g–i**), содержащие 4-пиридиновое кольцо.

Кроме того, соединение (**19g**) проявило способность снижать образование белка VEGF и экспрессию гена hTERT в концентрациях ниже значения IC_{50} по отношению к неопухолевым клеткам HEK-293. Для производного (**19h**) помимо высокой цитотоксичности к HT-29 и снижения продукции VEGF также показано уменьшение экспрессии гена c-Myc. В то же время гидроксизамещенные аналоги (**20a–c**) не проявили выраженной активности, что также показано в работе [27], где альтернативным путем было получено соединение (**20c**), которое проявило посредственную цитотоксичность на уровне ресвератрола по отношению к клеточным линиям рака поджелудочной железы AsPC-1, Capan-2 и BxPC-3.

Еще одной перспективной мишенью для создания противоопухолевых средств является лизин-специфическая гистондеметилаза (LSD1) – фермент, играющий важную роль в росте и дифференцировке клеток, избыточная экспрессия которого наблюдается при многих типах злокачественных новообразований и связывается с началом и прогрессированием роста опухоли. Было показано, что ресвератрол проявляет сильное ингибирующее влияние на активность LSD1, более выраженное, чем у известного ингибитора – *транс*-2-фенилциклопропиламина [28]. На основе структуры ресвератрола были предприняты попытки создания новых обратимых ингибиторов LSD1 [29, 30], синтез которых на основе реакции Виттига–Хорнера представлен на схеме 10.

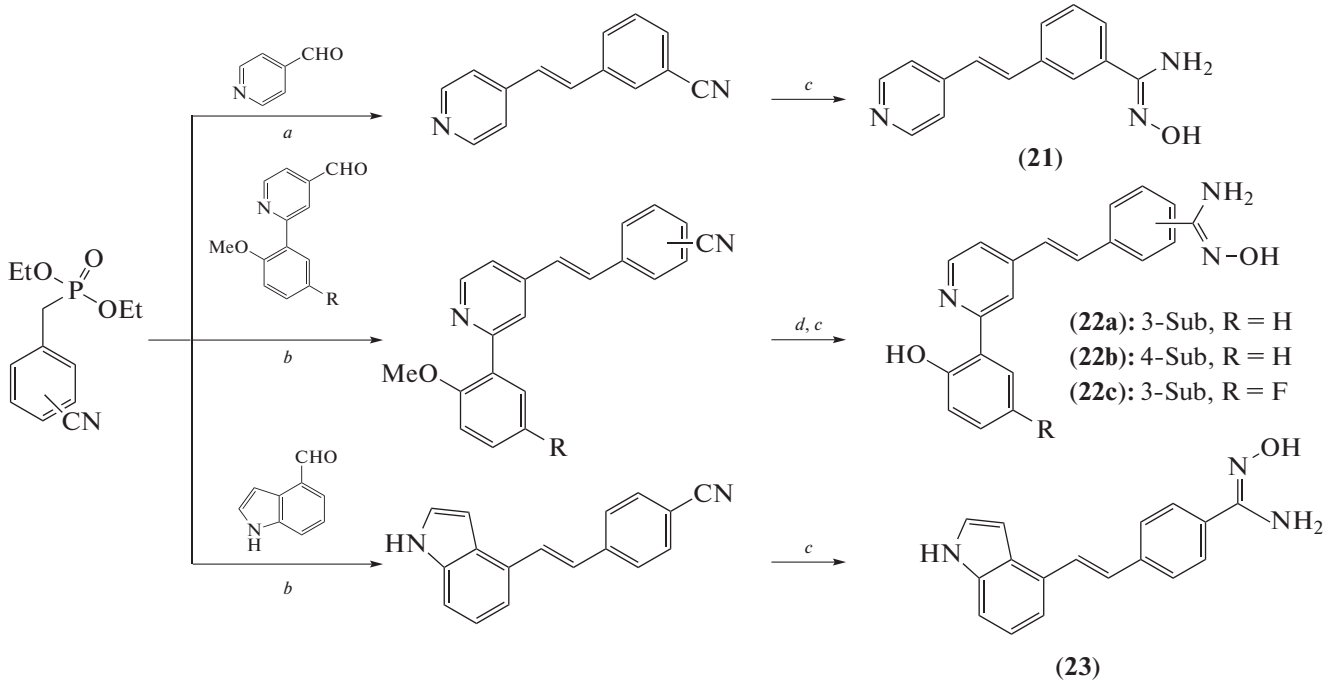


Схема 10. Синтез соединений (**21**–**23**). Реагенты и условия реакций:
a – *t*-BuOH, *t*-BuOK; *b* – *t*-BuOK, DMF; *c* – $NH_2OH \cdot HCl$, Et_3N, CH_3OH, кипячение, 3–8 ч; *d* – BBr_3, CH_2Cl_2.

В результате испытаний было выявлено несколько соединений, ингибирующих LSD1, со значениями IC_{50} в субмикромолярном диапазоне. Соединение (**22c**) оказалось наиболее сильным обратимым ингибитором LSD1 (IC_{50} = 283 нМ), способным усиливать экспрессию суррогатного клеточного биомаркера CD86 в клеточной линии лейкемии человека THP-1. Соединение (**22c**) показало хорошее ингибирование роста клеток THP-1 и MOLM-13 согласно значениям IC_{50}, которые составляли 5.76 и 8.34 мкМ соответственно. Кроме того, соединение (**22c**) дозозависимо подавляло деление клеток THP-1.

Стильбеновая структура ресвератрола с высокой вероятностью предполагает у него наличие эстроген-модулирующих эффектов, которые изучались на различных клеточных линиях рака молочной железы (MCF-7, T47D, LY2 и S30). Было установлено, что в присутствии эстрадиола ресвератрол действует как антиэстроген и таким образом должен оказывать положительное влияние при химиотерапии рака молочной железы [31].

Были предложены новые структуры (схема 11), сочетающие в себе защищенный пиридоксиновый фрагмент и остов ресвератрола [32–34].

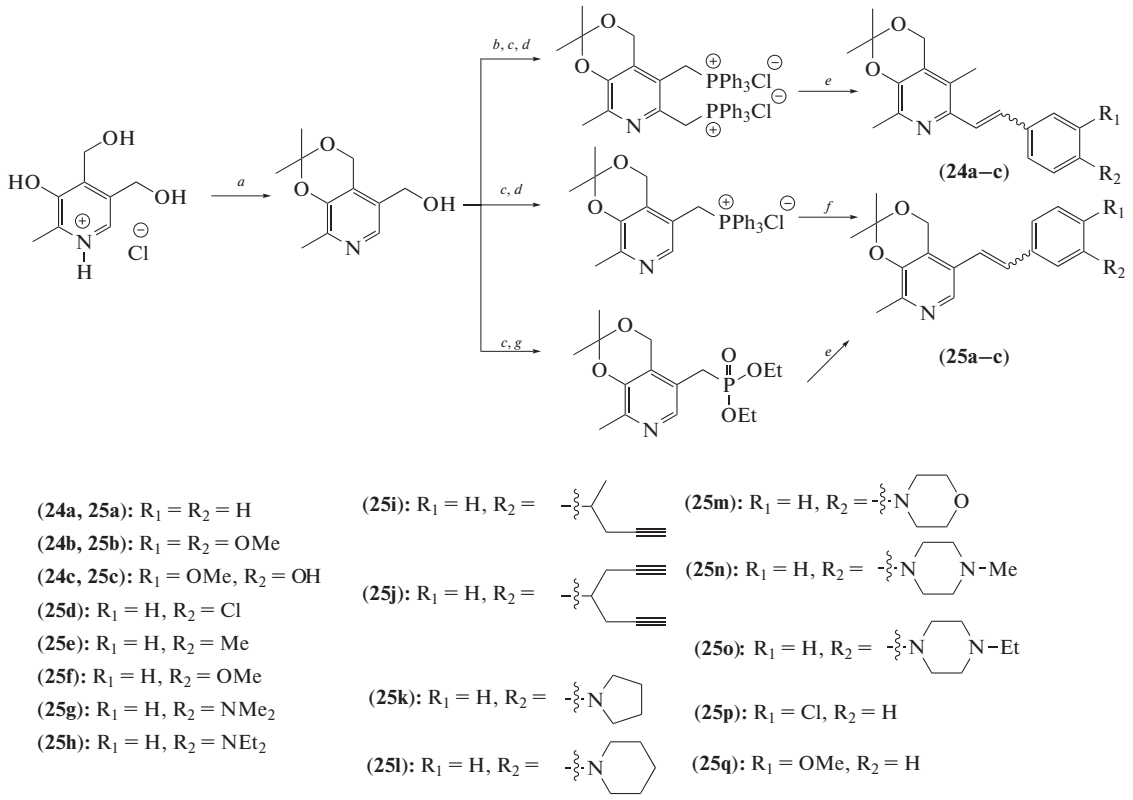


Схема 11. Синтез соединений (**24**) и (**25**). Реагенты и условия реакций: *a* – $(CH_3)_2CO$, H^+; *b* – H_2O, HCHO, NaOH, 70°C; *c* – $SOCl_2$, CH_2Cl_2 или $PhCH_3$, кипячение; *d* – PPh_3, CH_3CN, кипячение; *e* – ArCHO, NaH, CH_2Cl_2 или THF; *f* – ArCHO, Et_3N, CH_2Cl_2, кипячение; *g* – $P(OEt)_3$, кипячение.

Синтезированные соединения были исследованы на наличие противоопухолевой активности и цитотоксические эффекты *in vitro*. Установлено, что аналоги (*E*-**25b**) и (*E*-**25c**) не обладали цитотоксичностью как по отношению к опухолевым (MCF-7, SNB-19 и HCT-15), так и нормальным (HEK-293) клеточным линиям, в то время как соединение (*E*-**25a**) оказывало более существенное влияние на клетки HEK-293, чем на опухолевые клетки. Наиболее перспективными оказались соединения (*E*-**24b**) и (*E*-**24c**), продемонстрировавшие высокую селективную эффективность в отношении эстроген-зависимой клеточной линии MCF-7 рака молочной железы (IC_{50} в диапазоне 1.9–7.9 мкМ). Соединение (*E*-**24b**) также показало четкую селективность в отношении эстроген-зависимых клеток рака молочной железы MCF-7 по сравнению с эстроген-негативными клетками рака молочной железы MDA-MB-231 (индекс селективности 10), что свидетельствует о существенной роли рецепторов эстрогена в качестве потенциальной мишени.

Аналоги с нейропротекторной активностью

Во множестве исследований было показано нейропротекторное действе ресвератрола как путем предотвращения гибели нейронов от воздействия АФК благодаря прямому антиоксидантному эффекту и активации сиртуина SIRT1, так и другими путями, например, через подавление роста амилоидных бляшек (за счет преобразования растворимых олигомеров и фибриллярных β-амилоидов в нетоксичную форму), снижения активации микроглии (путем подавления провоспалительных медиаторов или подавлением поляризации M1 и активации поляризации M2), митохондриального биогенеза (за счет стимуляции экспрессии PGC-1α и активации AMPK), профилактики апоптотической гибели клеток в гиппокампе (путем увеличение митохондриальной экспрессии UCP2 через активацию PPAR-γ).

Дизайн гетероциклических аналогов ресвератрола с нейропротекторной активностью обычно основывается на попытках создания многоцелевых лигандов, что продиктовано сложным патогенезом нейродегенеративных заболеваний.

В работе [34] вышеописанные производные (**25**) изучались в качестве ингибиторов моноаминоксидазы B – потенциальных средств для лечения болезни Паркинсона. Большинство из них проявили сильную ингибирующую активность на MAO-B с высокой селективностью. В частности, соединения (**25i**) и (**25n**) наиболее эффективно

ингибировали hMAO-B со значениями IC_{50} в диапазоне 0.01–0.02 мкМ. Дальнейшее исследования показали, что (**25n**) является обратимым, а (**25i**) необратимым ингибитором МАО-В. Причины различий и особенности взаимодействия соединений с МАО-В были оценены методом молекулярного докинга. Кроме того, (**25i**) и (**25n**) показали хорошую антиоксидантную активность, нейропротекторный эффект в тесте H_2O_2-индуцированного повреждения клеток PC-12 и способность преодолевать гематоэнцефалический барьер, что свидетельствует о потенциальной ценности данных соединений для лечения болезни Паркинсона.

Еще одна серия многофункциональных агентов, представляющих собой пиридоксин-ресвератрольные гибриды и полученные на их базе основания Манниха (схема 12), была синтезирована в работе Yang et al. [35].

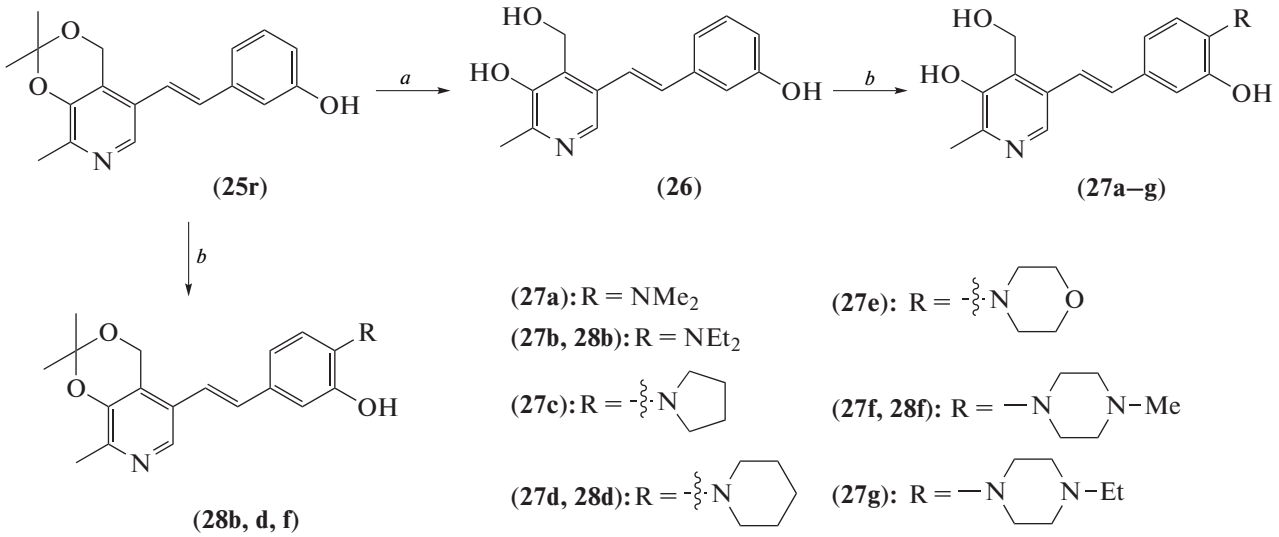


Схема 12. Синтез соединений (**26**–**28**).
Реагенты и условия реакций: *a* – 10% HCl, THF, 70°C, 3 ч; *b* – амин, параформ, EtOH, кипячение.

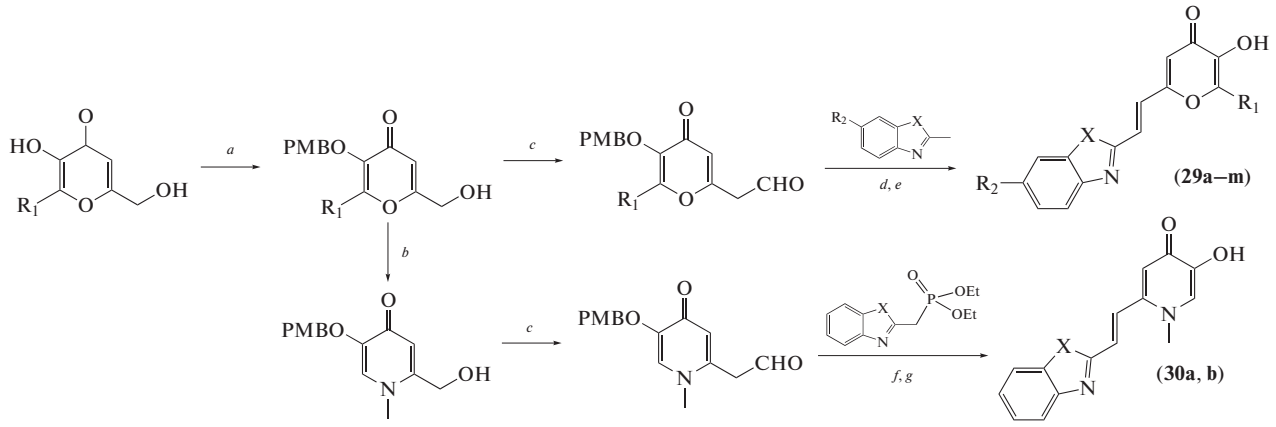
Результаты испытаний показали, что большинство из этих соединений могут избирательно ингибировать ацетилхолинэстеразу (АХЭ) и МАО-В. Среди них соединения (**27d**) и (**28b**) продемонстрировали наибольший потенциал ингибирования по отношению к АХЭ (IC_{50} = 2.11 и 1.56 мкМ соответственно), а соединение (**27e**) наиболее активно ингибировало МАО-В (IC_{50} = 2.68 мкМ). Кинетический анализ показал, что соединение (**27d**) является ингибитором смешанного типа, связываясь одновременно с каталитическим и периферическим анионным сайтом АХЭ. Кроме того, все исследованные соединения показали хорошие антиоксидантные и металлхелатообразующие свойства, что важно при создании многофункциональных агентов для лечения болезни Альцгеймера.

Так, в попытке создания эффективных средств для терапии болезни Альцгеймера для рассмотренных выше соединений (**10i**) и (**11f**), проявляющих одновременно выраженную антиоксидантную и металлхелатирующую активность, было оценено ингибирующее влияние на агрегацию Аβ. Было показано, что рассматриваемые соединения могут эффективно взаимодействовать с *C*-концом Аβ1–42, ингибировать собственную или индуцированную металлом (железо, медь) агрегацию β-листов и образование фибрилл, показывая потенциал против агрегации Аβ1–42 больший, чем у ресвератрола.

В продолжение этой фармакофорно-комбинированной стратегии в исследовании Jiang et al. [36] была синтезирована серия производных 2-замещенных бензотиазолов (схема 13), в которых фрагмент деферипрона или мальтола были соединены с тиогавином Т – флуоресценным индикатором, широко используемым *in vitro* для оценки агрегации Аβ.

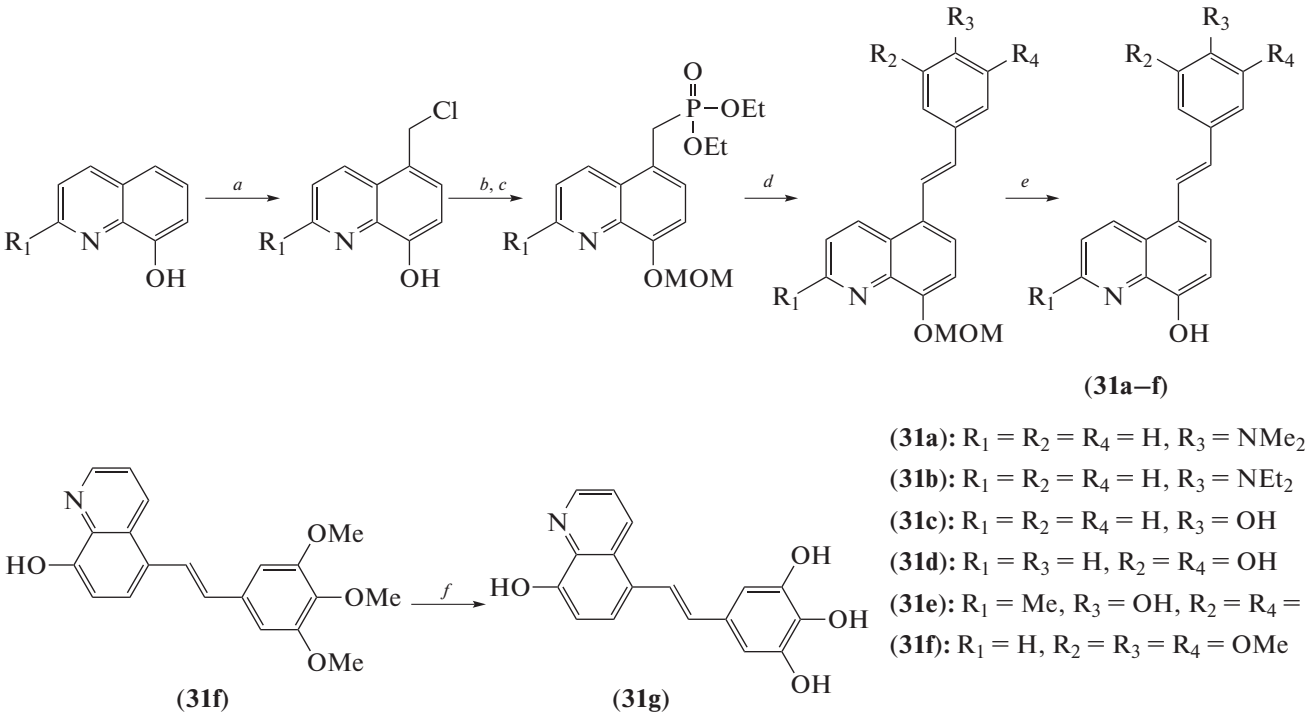
Максимальную эффективность показали молекулы (**29c**) и (**29i**), проявляющие превосходную ингибирующую активность в отношении агрегации Аβ1–42, высокую радикалпоглощающую активность, выраженные хелатирующие свойства по отношению к биометаллам, а также дезагрегационную активность в отношении ранее образованных Аβ1–42 фибрилл.

В исследовании [37] были синтезированы соединения, нацеленные на терапию болезни Альцгеймера путем объединения фармакофоров ресвератрола и фрагмента известного хелатора металла – клиохинола (схема 14).



(**29a**): X = S, R_1 = R_2 = H
(**29b**): X = S, R_1 = Me, R_2 = H
(**29c**): X = O, R_1 = R_2 = H
(**29d**): X = O, R_1 = Me, R_2 = H
(**29e**): X = NMe, R_1 = R_2 = H
(**29f**): X = NMe, R_1 = Me, R_2 = H
(**29g**): X = S, R_1 = H, R_2 = OMe
(**29h**): X = S, R_1 = H, R_2 = Br
(**29i**): X = S, R_1 = H, R_2 = OH
(**29j**): X = O, R_1 = H, R_2 = OMe
(**29k**): X = O, R_1 = H, R_2 = OH
(**29l**): X = NMe, R_1 = H, R_2 = OMe
(**29m**): X = NMe, R_1 = H, R_2 = OH
(**30a**): X = S
(**30b**): X = O

Схема 13. Синтез соединений (**29**) и (**30**).
Реагенты и условия реакций: *a* – PMB-Cl, K_2CO_3, DMF, 80°C; *b* – CH_3NH_2, H_2O, кипячение; *c* – MnO_2, $CHCl_3$, кипячение; *d* – AcOH, Ac_2O, MW; *e* – K_2CO_3, MeOH; *f* – NaH, THF; *g* – CF_3COOH, CH_2Cl_2.



(**31a–f**)

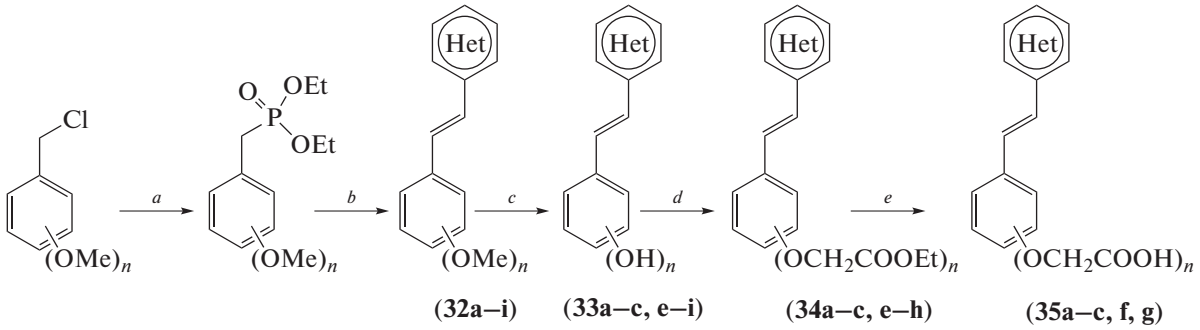
(**31a**): R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = NMe_2
(**31b**): R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = NEt_2
(**31c**): R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH
(**31d**): R_1 = R_3 = H, R_2 = R_4 = OH
(**31e**): R_1 = Me, R_3 = OH, R_2 = R_4 = H
(**31f**): R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = OMe

Схема 14. Синтез соединений (**31**). Реагенты и условия реакций: *a* – 37% HCl, 37% HCHO; *b* – $P(OEt)_3$, кипячение; *c* – MOMCl, $(i\text{-}Pr)_2NEt$, CH_2Cl_2; *d* – ArCHO, CH_3ONa, DMF, 0–80°C; *e* – 6 M HCl, CH_3OH, кипячение; *f* – BBr_3, CH_2Cl_2.

Гибриды показали значительную способность ингибировать автоиндуцированную агрегацию β-амилоида (Aβ) и агрегацию Aβ, индуцированную медью(II), потенциальное антиоксидантное действие и хелатирующую способность. Среди этих соединений (**31c**) имело наиболее высокий потенциал ингибирования автоиндуцированной (IC_{50} = 8.50 мкМ) и индуцированной медью(II) агрегации Aβ, оно также способствовало разборке хорошо структурированных фибрилл Aβ, образованных путем самоиндукции агрегации и индуцированных медью(II) агрегаций Aβ. Кроме того, соединение (**31c**) было способно контролировать продукцию гидроксильных радикалов за счет блокирования окислительно-восстановительного цикла меди путем комплексообразования, что подтверждается экспериментами с использованием системы Cu(I)/Cu(II) с аскорбатом в качестве восстановителя. Важно отметить, что для соединения (**31c**) летальная доза у белых мышей была выше 2 г/кг, а также была продемонстрирована способность преодолевать гематоэнцефалический барьер.

В качестве другой важной мишени при терапии нейродегенеративных заболеваний рассматриваются резидентные макрофаги ЦНС – так называемая микроглия. Ее гиперактивация (при воздействии различных факторов) инициирует чрезмерную продукцию воспалительных медиаторов (оксид азота, цитокины, TNF-α), что оказывает повреждающее действе на нейроны и способствует патогенезу болезни Альцгеймера, Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний.

Основываясь на данных о способности ресвератрола подавлять активацию макрофагов и контролировать экспрессию iNOS, в ряде работ были синтезированы его гетероциклические аналоги (схема 15), и было изучено их ингибирующее влияние в экспериментальной модели активации микроглии липополисахаридами (LPS) [38, 39].



(32a–i) **(33a–c, e–i)** **(34a–c, e–h)** **(35a–c, f, g)**

(32a–35a): 3,5-Sub; Het = 4-Py
(32b–35b): 3,5-Sub; Het = 3-Py
(32c–35c): 3,5-Sub; Het = 2-Py
(32d): 3,5-Sub; Het = 2-фурил
(32e–34e): 3,5-Sub; Het = 4-хинолинил
(32f–35f): 4-Sub; Het = 4-Py
(32g–35g): 4-Sub; Het = 3-Py
(32h–34h): 4-Sub; Het = 2-Py
(32i), **(33i):** 3,5-Sub; Het = 2-(4-бромфурил)

Схема 15. Синтез соединений (**32**–**35**). Реагенты и условия реакций: *a* – $P(OEt)_3$, кипячение, 3 ч; *b* – PyCHO, NaOEt, DMF; *c* – BBr_3, CH_2Cl_2, –10°C, 2 ч; *d* – $ClCH_2COOEt$, KOH, DMF; *e* – 1. NaOH, 2. HCl.

Было обнаружено, что соединения (**32e**), (**33e**) и (**33i**) значительно ингибировали продукцию NO и TNF-α микроглией, блокируя фосфорилирование и деградацию IκBα, но не проявляли способности взаимодействовать напрямую с NO в растворе нитропруссида натрия, а производное (**33i**), кроме того, эффективно блокировало образование ROS.

Сходные эффекты проявляло и ранее описанное производное (**17g**), для которого наряду со снижением экспрессии iNOS, TNF-α и уровня мРНК, была обнаружена способность снижать секрецию интерлейкина-6 (IL-6), экспрессию белка Toll-подобного рецептора 4 (TLR4), а также ингибировать сигнальные пути, ассоциированные с митоген-активируемой протеинкиназой (MAPK) и ядерным фактором транскрипции κB

(NF-κB) [40]. Таким образом, мощные ингибирующие эффекты соединений на активацию микроглии представляют интерес для лечения нейродегенеративных заболеваний, сопровождаемых активацией микроглии.

Аналоги с противовоспалительной активностью

Было установлено, что ресвератрол способен проявлять противовоспалительный эффект не только путем подавления активации макрофагов и контроля экспрессии iNOS, но и за счет способности снижать экспрессию и активность ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [41]. К сожалению, как и у большинства нестероидных противовоспалительных средств, у ресвератрола из-за недостаточной селективности ингибирования ЦОГ были показаны побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта, например, значимое негативное влияние на заживление индуцированной индометацином язвы желудка у мышей [42].

В попытке создания более эффективных и безопасных противовосполительных средств в работе Chen et al. [43] были синтезированы и исследованы ранее описанные производные (**33**–**35**), некоторые из которых были превращены в основания Манниха (**36**–**38**) (схема 16).

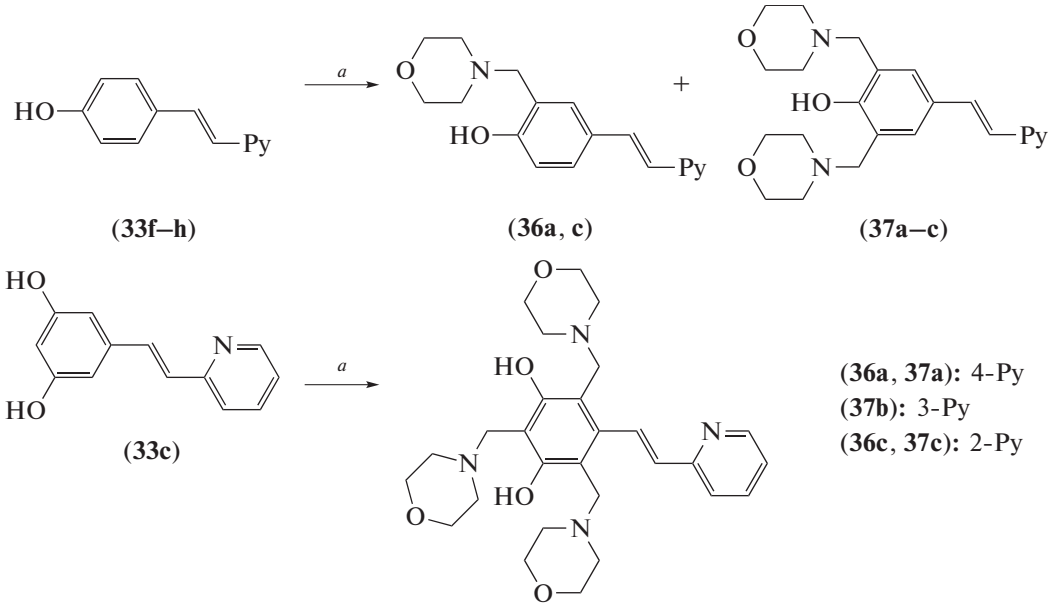


Схема 16. Синтез соединений (**36**–**38**).
Реагенты и условия реакций: *a* – HCHO, морфолин, EtOH, кипячение, 2 ч.

В испытаниях, проведенных на модели индуцированного ксилолом отека у мышей, наиболее активным соединением оказался ресвератрол, подавляющий индуцированный отек на 38.9%. Сравнимые результаты (37.0%) продемонстрировало соединение (**35c**). Другие производные (**35f**), (**37b**), (**38**) показали уменьшение отека в диапазоне от 30 до 35%.

Ранее описанная серия производных стирилхиназолина (**17a**–**k**) также исследовалась на наличие способности ингибировать ЦОГ-2 и снижать продукцию PGE2. Большая часть стирилхиназолинов (**17a**–**k**), за исключением 3,4-диацетилированных стирилхиназолинов (**17d**–**f**), показала сравнимую или лучшую ингибирующую активность, чем ресвератрол, при более низкой цитотоксичности, изученной на клеточной линии RAW264.7. При этом было установлено, что заместители в бензольном кольце стирилхиназолинов оказывали более сильное влияние на ингибирующую активность, чем заместители в хиназолиновом цикле.

В работе Kim et al. [44] реакцией Виттига–Хорнера между пиронилфосфонатом и различными ароматическими карбоксальдегидами (схема 17) были получены пиронилвинильные аналоги ресвератрола (**39**).

Оценка их способности ингибировать продукцию NO и PGE2 была исследована на LPS-активированных клетках макрофагов клеточной линии RAW264.7. Наилучшую ингибирующую активность показало производное (**39b**) с меньшей по сравнению с ресвератролом цитотоксичностью.

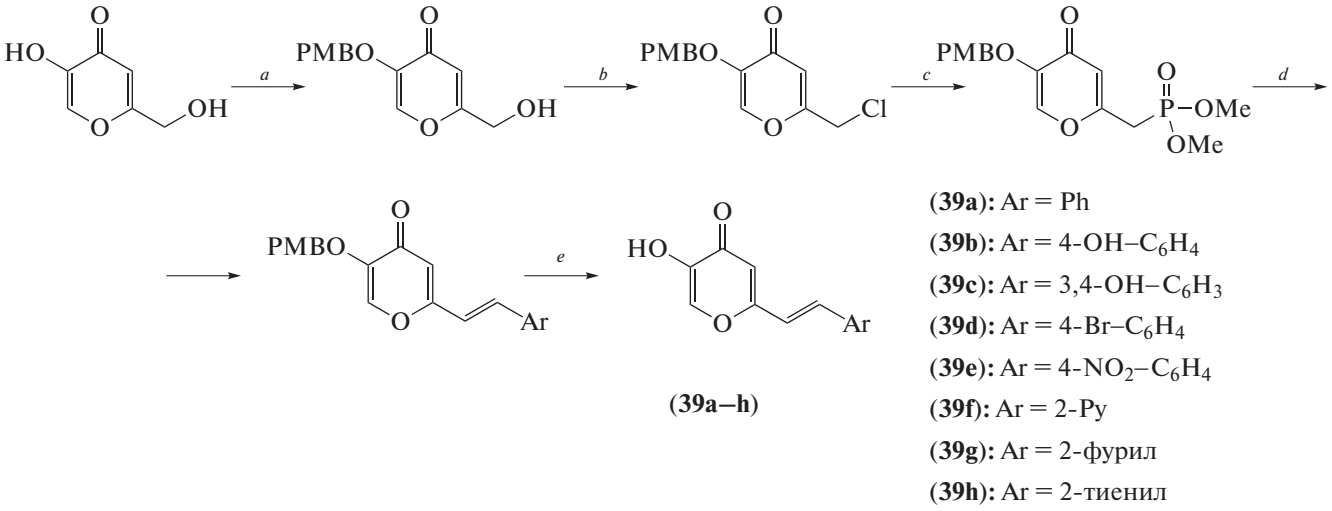


Схема 17. Синтез соединений (**39**). Реагенты и условия реакций: *a* – PMB-Cl, K_2CO_3, DMF, 80°C; *b* – $SOCl_2$, 2 ч; *c* – $P(OMe)_3$; *d* – ArCHO, NaH, THF; *e* – BBr_3, CH_2Cl_2.

Аналоги с иными физиологическими эффектами

Ранее было обнаружено, что ресвератрол обладает ингибирующим действием против вируса гриппа *in vitro* [45]. В исследовании Li et al. [46] с использованием оценки активности нейраминидазы была протестирована противогриппозная активность 50 производных ресвератрола. Среди веществ, проявлявших ингибирующее действие на активность нейраминидазы вируса гриппа (штамм A/PR/8/34 (H1N1)), оказался и описанный ранее аналог (**33b**) со значением IC_{50} = 186.1 мМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования по созданию аналогов ресвератрола в рамках обсуждаемой стратегии в значительной степени сосредоточены на получении гибридных структур, основным преимуществом которых выступает мультитаргетное воздействие, что особенно важно при лечении таких сложных с точки зрения механизмов патогенеза патологий, как онкологические и нейродегенеративные заболевания. При этом за основу берется сохранение и потенцирование известной для прототипа антирадикальной активности и ряд других ранее установленных мишень-ориентированных эффектов. Во многих случаях такой подход оказался весьма эффективным и обеспечил не только аддитивные эффекты отдельных фармакофорных фрагментов, но и их потенцирующее действие. Большинство исследований проводилось на культурах клеток, что сопряжено с рядом известных ограничений, ввиду чего для подтверждения фармакологических эффектов и установления истинных механизмов действия новых соединений необходимы испытания в рамках целостного организма.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Takaoka M.* // J. Faculty Sci. Hokkaido Imper. Univ. 1940. V. 3. P. 1–16.
2. *Perdue L.* // The French Paradox and beyond / Sonoma, California: Renaissance, 1993.
3. *Bonnefont-Rousselot D.* // Nutrients. 2016. V. 8. P. 250–273. https://doi.org/10.3390/nu8050250
4. *Khan O.S., Bhat A.A., Krishnankutty R., Mohammad R.M., Uddin S.* // Nutr. Cancer. 2016. V. 68. P. 365–373. https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1152386
5. *Singh N., Agrawal M., Doré S.* // ACS Chem. Neurosci. 2013. V. 4. P. 1151–1162. https://doi.org/10.1021/cn400094w
6. *Poulsen M.M., Fjeldborg K., Ornstrup M.J., Kjær T.N., Nøhr M.K., Pedersen S.B.* // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1852. P. 1124–1136. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.024
7. *Markus M.A., Morris B.J.* // Clin. Interv. Aging. 2008. V. 3. P. 331–339.

8. *Westphal C.H., Dipp M.A., Guarente L.* // Trends Biochem. Sci. 2007. V. 32. P. 555–560. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.09.008
9. *Gülçin I.* // Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2010. V. 11. P. 210–218. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002
10. *Sun X., Peng B., Yan W.* // J. Chem. Thermodyn. 2008. V. 40. P. 735–738. https://doi.org/10.1016/j.jct.2007.10.006
11. *Delmas D., Aires V., Limagne E., Dutartre P., Mazué F., Ghiringhelli F., Latruffe N.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2011. V. 1215. P. 48–59. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05871.x
12. *Yang J., Liu G.-Y., Lu D.-L., Dai F., Qian Y.-P., Jin X.-L., Zhou B.* // Chem. Eur. J. 2010. V. 16. P. 12808–12813. https://doi.org/10.1002/chem.201002020
13. *Semenov A.V., Balakireva O.I., Tarasova I.V. Burtasov A.A., Semenova E.V., Petrov P.S., Minaeva O.V., Pyataev N.A.* // Med. Chem. Res. 2018. V. 27. P. 1298–1308. https://doi.org/10.1007/s00044-018-2150-8
14. *Semenov A.V., Balakireva O.I., Tarasova I.V., Semenova E.V., Zulfugarov P.K.* // Med. Chem. Res. 2020. V. 29. P. 1590–1599. https://doi.org/10.1007/s00044-020-02585-6
15. *Xu P., Zhang M., Sheng R., Ma Y.* // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 127. P. 174–186. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.045
16. *Kálai T., Borza E., Antus C., Radnai B., Gulyás-Fekete G., Fehér A., Sümegi B., Hideg K.* // Bioorg. Med. Chem. 2011. V. 19. P. 7311–7317. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.066
17. *Sale S, Verschoyle R.D., Boocock D., Jones D.J.L., Wilsher N., Ruparelia K.C., Potter G.A., Farmer P.B., Steward W.P., Gescher A.J.* // Br. J. Cancer. 2004. V. 90. P. 736–744. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601568
18. *Penthala N.R., Thakkar S., Crooks P.A.* // Bioorg. Med. Chem. Let. 2015. V. 25. P. 2763–2767. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.05.019
19. *Kamal A., Ashraf Md., Basha S.T., Hussaini S.M.A., Singh S., Vishnuvardhan M.V.P.S., Kiran B., Sridhar B.* // Org. Biomol. Chem. 2016. V. 14. P. 1382–1394. https://doi.org/10.1039/C5OB02022K
20. *Kim J.-Y., Choi H.-E., Lee H.-H., Shin J.-S., Shin D.-H., Choi J.-H., Lee Y. S., Lee K.-T.* // Oncol. Reports. 2015. V. 33. P. 2639–2647. https://doi.org/10.3892/or.2015.3871
21. *Park J.H., Min H.-Y., Kim S.S., Lee J.Y., Lee S.K., Lee Y.S.* // Arch. Pharm. 2004. V. 337. P. 20–24. https://doi.org/10.1002/ardp.200300791
22. *Park E.Y., Kim J.-I., Leem D.-G., Shin J.-S., Kim K.-T., Choi S.Y., Lee M.-H., Choi J.-H., Lee Y.S., Lee K.-T.* // Oncol. Reports. 2016. V. 36. P. 3577–3587. https://doi.org/10.3892/or.2016.5168
23. *Srivastava V., Lee H.* // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 7629–7640. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.11.007
24. *Trapp V., Parmakhtiar B., Papazian V., Willmott L., Fruehauf J.P.* // Angiogenesis. 2010. V. 13. P. 305–315. https://doi.org/10.1007/s10456-010-9187-8
25. *Lanzilli G., Fuggetta M.P., Tricarico M., Cottarelli A., Serafino A., Falchetti R., Ravagnan G., Turriziani M., Adamo R., Franzese O., Bonmassar E.* // Int. J. Oncol. 2006. V. 28. P. 641–648. https://doi.org/10.3892/ijo.28.3.641
26. *Martí-Centelles R., Murga J., Falomir E., Carda M., Alberto Marco J.* // Med. Chem. Commun. 2015. V. 6. P. 1809–1815. https://doi.org/10.1039/c5md00197h
27. *De Filippis B., De Lellis L., Florio R., Ammazzalorso A., Amoia P., Fantacuzzi M., Giampietro L., Maccallini C., Amoroso R., Veschi S., Cama A.* // Med. Chem. Res. 2019. V. 28, P. 984–991. https://doi.org/10.1007/s00044-019-02351-3
28. *Abdulla A., Zhao X., Yang F.* // J. Biochem. Pharmacol. Res. 2013. V. 1. P. 56–63.
29. *Duan Y.-C., Guan Y.-Y., Zhai X.-Y., Ding L.-N., Qin W.-P., Shen D.-D., Liu X.-Q., Sun X.-D., Zheng Y.-C., Liu H.-M.* // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 126. P. 246–258. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.035
30. *Duan Y., Qin W., Suo F., Zhai X., Guan Y., Wang X., Zheng Y., Liu H.* // Bioorg. Med. Chem. 2018. V. 26. P. 6000–6014. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.037
31. *Bhat K.P.L., Lantvit D., Christov K., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M.* // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 7456–7463.
32. *Pugachev M.V., Nguyen T.T.N., Bulatov T.M., Pavelyev R.S., Iksanova A.G., Bondar O.V., Balakin K.V., Shtyrlin Yu.G.* // Journal of Chemistry. 2017. V. 2017. P. 1–7. https://doi.org/10.1155/2017/8281518
33. *Pugachev M.V., Pavelyev R.S., Nguyen T.N.T., Iksanova A.G., Lodochnikova O.A., Shtyrlin Yu.G.* // Russian Chem. Bull., Int. Ed. 2016. V. 65. P. 532–536. https://doi.org/10.1007/s11172-016-1333-z
34. *Li W., Yang X., Song Q., Cao Z., Shi Y., Deng Y., Zhang L.* // Bioorganic Chem. 2020. V. 97. P. 103707. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103707
35. *Yang X., Qiang X., Li Y., Luo L., Xu R., Zheng Y., Cao Z., Tan Z., Deng Y.* // Bioorganic Chem. 2017. V. 71. P. 305–314. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.02.016
36. *Jiang L., Zhang M., Tang L., Weng Q., Shen Y., Hu Y., Sheng R.* // RSC Adv. 2016. V. 6. P. 17318–17327. https://doi.org/10.1039/C5RA25788C
37. *Mao F., Yan J., Li J., Jia X., Miao H., Sun Y., Huang L., Li X.* // Org. Biomol. Chem. 2014. V. 12. P. 5936–5944. https://doi.org/10.1039/c4ob00998c
38. *Meng X.-L., Yang J.-Y., Chen G.-L., Wang L.-H., Zhang L.-J., Wang S., Li J., Wu C.-F.* // Chem.-Biol. Interact. 2008. V. 174. P. 51–59. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.015
39. *Meng X.L., Yang J.Y., Chen G.L., Zhang L.J., Wang L.H., Li J., Wang J.M., Wu C.F.* // Int. Immunopharmacol. 2008. V. 8. P. 1074–1082. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.03.011
40. *Hou Y., Zhang Y., Mi Y., Wang J., Zhang H., Xu J., Yang Y., Liu J., Ding L., Yang J., Chen G., Wu C.* // Mol. Nutr.

Food Res. 2019. V. 63. P. 1801380.
https://doi.org/10.1002/mnfr.201801380

41. *Szewczuk L.M., Forti L., Stivala L.A., Penning T.M.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 22727–22737.
https://doi.org/10.1074/jbc.M314302200
42. *Guha P., Dey A., Chatterjee A., Chattopadhyay S., Bandyopadhyay S.K.* // Br. J. Pharmacol. 2010. V. 159. P. 726–734.
https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00572.x
43. *Chen G., Shan W., Wu Y., Ren L., Dong J., Ji Z.* // Chem. Pharm. Bull. 2005. V. 53. P. 1587–1590.
https://doi.org/10.1248/cpb.53.1587
44. *Kim M.H., Shin J.-S., Lee K.-T., Lee Y.S.* // Bull. Korean Chem. Soc. 2011. V. 32. P. 299–302.
https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.1.299
45. *Palamara A.T., Nencioni L., Aquilano K., De Chiara G., Hernandez L., Cozzolino F., Ciriolo M.R., Garaci E.* // J. Infect. Dis. 2005. V. 191. P. 1719–1729.
https://doi.org/10.1086/429694
46. *Li C., Fang J.-S., Lian W.-W., Pang X.-C., Liu A.-L., Du G.-H.* // Chem. Biol. Drug Des. 2015. V. 85. P. 427–438.
https://doi.org/10.1111/cbdd.12425

Heterocyclic Resveratrol Analogues – Synthesis and Physiological Activity. Part 1. Analogues Obtained by Replacement of Aryl Moieties with Heterocyclic Fragments

A. V. Semenov*, #, E. V. Semenova*, and O. I. Balakireva*

#Phone: +7 (987) 691-05-38; e-mail: salexan@mail.ru

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

Resveratrol is a polyphenolic stilbenoid, the physiological effects of which have been studied in a large number of studies. Antioxidant, antitumor, neuroprotective, anti-inflammatory, antibacterial and antiviral effects of this natural substance were shown. In the last decade, much attention has been paid to the development of resveratrol derivatives to improve its pharmacological activity and pharmacokinetics. The first part of the review is devoted to the synthetic analogues of resveratrol, obtained by replacement one or two phenyl moieties of the stilbene backbone with bioisosteric heterocyclic fragments. The main attention was paid to methods for the synthesis of resveratrol analogues and the their biological activity.

Keywords: resveratrol, heterocyclic analogues, antioxidants, antitumor activity, neuroprotective agents, anti-inflammatory activity

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 128–134

УДК 577.112:577.336

ПРЕВРАЩЕНИЯ ХРОМОФОРА ПРИ СОЗРЕВАНИИ ХРОМОБЕЛКА ИЗ *Actinia equina*

© 2021 г. А. А. Пахомов*, **, #, А. А. Пастухова*, Г. В. Тишкин*, В. И. Мартынов*

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

***Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 28*

Поступила в редакцию 17.06.2020 г.
После доработки 28.06.2020 г.
Принята к публикации 30.06.2020 г.

В настоящее время считается, что синтез хромофора красных флуоресцентных белков проходит через промежуточную "синюю" форму с максимумом поглощения в районе 400 нм, непосредственно превращающуюся в "красную" через образование двойной связи в боковой цепи хромофоробразующего остатка Tyr. Показано, что в хромобелке из *Actinia equina* (aeCP), как и в большинстве красных флуоресцентных белков, синтез хромофора проходит путем дегидратации и двух стадий окисления. Однако на промежуточной стадии наблюдается появление дополнительной "зеленой" формы с максимумом поглощения в районе 530 нм.

Ключевые слова: флуоресцентные белки, красные флуоресцентные белки, RFP, aeCP, хромофор, синтез хромофора, посттрансляционные модификации

DOI: 10.31857/S0132342321010164

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные белки семейства GFP (зеленого флуоресцентного белка из *Aequorea victoria*) нашли широкое применение в молекулярной и клеточной биологии [1–3]. Среди них особенно привлекательны – красные флуоресцентные белки (RFP), т.к. они позволяют работать в диапазоне с минимальной клеточной автофлуоресценцией [4, 5]. С увеличением длины волны прозрачность тканей животных возрастает за счет уменьшения рассеивания, а в диапазоне длин волн >650 нм проницаемость тканей для света дополнительно возрастает за счет минимизации вклада поглощения гемоглобина. Это позволяет использовать RFP для визуализации процессов в рамках целого организма [6, 7].

В настоящее время общепринята модель, согласно которой хромофор RFP синтезируется из промежуточной "синей" формы [8–10], которая образуется в результате посттрансляционных модификаций (циклизации, окисления и дегидратации) трех аминокислотных остатков внутри белка и поглощает в области 400 нм. Также известно, что в RFP, хромофор которых синтезируется из аминокислотной последовательности -Asp-Tyr-Gly-, на промежуточной стадии образуется "зеленая" форма (максимум поглощения ~500 нм), превращающаяся в "красную" по пути окислительного декарбоксилирования первого хромофоробразующего остатка Asp [11–15]. В настоящей работе на примере хромобелка из *Actinia equina* (aeCP) показано, что на промежуточной стадии синтеза хромофора RFP может образовываться форма, поглощающая в области, характерной для зеленых и желтых флуоресцентных белков, даже в случае, если хромофор синтезируется не из аминокислотной последовательности -Asp-Tyr-Gly-.

Хромобелок aeCP имеет максимум поглощения при 593 нм и в исходном виде не флуоресцирует. Однако ранее на его основе, путем внесения нескольких точечных замен в аминокислотное окружение хромофора, были получены красные флуоресцентные белки AQ14 и AQ143 с максимумами эмиссии в районе 660 нм [16]. Ключевыми заменами, приводящими к повышению квантового выхода в белках AQ14 и AQ143 по сравнению с aeCP, стали C143S и S158A, отвечающие за *цис-транс*-изомерию хромофора [17, 18]. Введением аналогичных замен в окружение хромофо-

Сокращения: aeCP – хромобелок из *Actinia equina*; cgCP – хромобелок из *Condylactis gigantea*; DsRed – RFP из *Discosoma* sp.; GFP – зеленый флуоресцентный белок из *Aequorea victoria*; hcCP – хромобелок из *Heteractis crispa*; HcRed – красный флуоресцентный вариант hcCP; RFP – красный флуоресцентный белок; tagBFP – мономерный синий флуоресцентный белок, полученный на основе tagRFP; tagRFP – мономерный вариант RFP из *Entacmaea quadricolor*.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-51-11; факс: +7 (495) 336-61-66; эл. почта: alpah@mail.ru).

ра были получены флуоресцентные варианты и других хромобелков [18, 19]. Высокий квантовый выход флуоресценции определяется в основном планарностью и конформационной неподвижностью хромофора внутри белка, при этом химическая структура хромофора в разных мутантных вариантах остается одной и той же [20]. Таким образом, отнесение белка к RFP или к хромобелку с точки зрения структуры хромофора носит скорее номенклатурный характер, т.к. известные на сегодня природные красные флуоресцентные белки и хромобелки имеют такую же химическую структуру хромофора, как RFP, клонированный из *Discosoma* sp. (DsRed) [21, 22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении кинетики созревания ряда хромобелков, поглощающих в дальнем красном диапазоне (aeCP, hcCP (хромобелок из *Heteractis crispa*) и cgCP (хромобелок из *Condylactis gigantea*)), нами было обнаружено, что на промежуточной стадии образуется "синяя" форма с максимумом поглощения в районе 400 нм (рис. 1), что согласуется с данными, опубликованными ранее [23]. Аналогичное поведение было обнаружено также у хромобелка из *Anemonia sulcata* (asCP) [24] и других красных флуоресцентных белков, в частности, в мономерном варианте RFP из *Entacmaea quadricolor* – tagRFP [25]. Однако в случае aeCP не наблюдалось прямого перехода из "синей" формы в конечное "красное" состояние, а появлялась еще и промежуточная форма с максимумом поглощения при 536 нм (рис. 1*в*). Такое поглощение характерно для желтых и зеленых флуоресцентных белков, особенно если принимать во внимание значительный батохромный сдвиг максимума поглощения созревшего aeCP по сравнению с другими RFP типа DsRed. По прошествии 5 ч от начала эксперимента наблюдается переход из "зеленой" формы 536 нм в конечное "красное" состояние с изобестической точкой при 549 нм (рис. 1*в*). Это свидетельствует о непосредственном превращении "зеленой" формы в "красную" при созревании aeCP без промежуточных долгоживущих интермедиатов. Чтобы получить кинетическую кривую для промежуточной "зеленой" формы, из общего спектра поглощения вычитали спектр полностью созревшего белка, нормированный на значение поглощения при 593 нм (рис. 1*в*, форма G). После такого преобразования становится четко видно, что "синяя" форма образуется раньше "зеленой", которая затем превращается в "красную".

Ранее методами рентгеноструктурного анализа было показано, что "синяя" форма хромофора образуется в результате посттрансляционных модификаций трех аминокислотных остатков внутри белка с образованием ацилиминного заместителя возле первого хромофоробразующего остатка (рис. 2, структура B). С помощью мутагенеза аминокислотных остатков в окружении хромофора красного флуоресцентного белка tagRFP удалось получить белок tagBFP, в котором синтез хромофора останавливался на стадии "синей" формы [25, 26]. В этом ключе образование "зеленой" формы хромофора в aeCP можно было бы объяснить таутомеризацией BFP-хромофора с образованием двойной связи в боковой цепи второго хромофоробразующего остатка Tyr (рис. 2, структура G). Такая структура – энергетически более выгодна, т.к. приводит к сопряжению двух ароматических колец, и образуется в большинстве зеленых флуоресцентных белков. В tagBFP такая таутомеризация, вероятно, не происходит, поскольку фенольная группа хромофоробразующего остатка Tyr ориентирована под большим углом к плоскости имидазолонового цикла, из-за чего сопряжение ароматических колец является проблематичным [27].

Превращение из "зеленого" состояния в конечное "красное" возможно за счет окисления структуры G (рис. 2) с образованием двойной связи в боковой цепи первого хромофоробразующего остатка. Мы проанализировали структуру конечного состояния хромофора при помощи масс-спектрометрии выделенного из белка короткого пептида, содержащего хромофор. Для этого белок денатурировали и подвергали протеолитическому расщеплению пепсином. Далее из протеолитического гидролизата при помощи ВЭЖХ выделяли короткий пептид, содержащий хромофор. Масса выделенного хромопептида составила 1037.4 Да (m/z 1038.4). Это на 22 Да меньше расчетной массы немодифицированного пептида A^{59}PCCMYGSKT (1059.4 Да), что соответствует одной стадии дегидратации (–18 Да) и двум стадиям окисления (–4 Да) при синтезе хромофора и наблюдается в большинстве красных белков. Таким образом, в конечном состоянии aeCP имеет хромофор, типичный для RFP (рис. 2, соединение R).

Отметим, что ранее были получены мутантные варианты DsRed [28], asCP [24] и cgCP [29], синтез хромофора которых частично не доходит до "красной" формы, а останавливается на стадии "зеленого" хромофора с максимумом поглощения в районе 500 нм. В зрелом DsRed дикого типа значительная часть белка также содержит "зеленый" хромофор [28]. В отличие от aeCP, "зеленая" форма в этих белках является конечной и не способна превращаться в "красную" [23].

Чтобы попытаться понять причины отличий в кинетике созревания aeCP и других белков, мы проанализировали аминокислотное окружение хромофора aeCP в сравнении с гомологами. Пространственная структура aeCP и cgCP к настоящему времени не установлена, так же как и для hcCP,

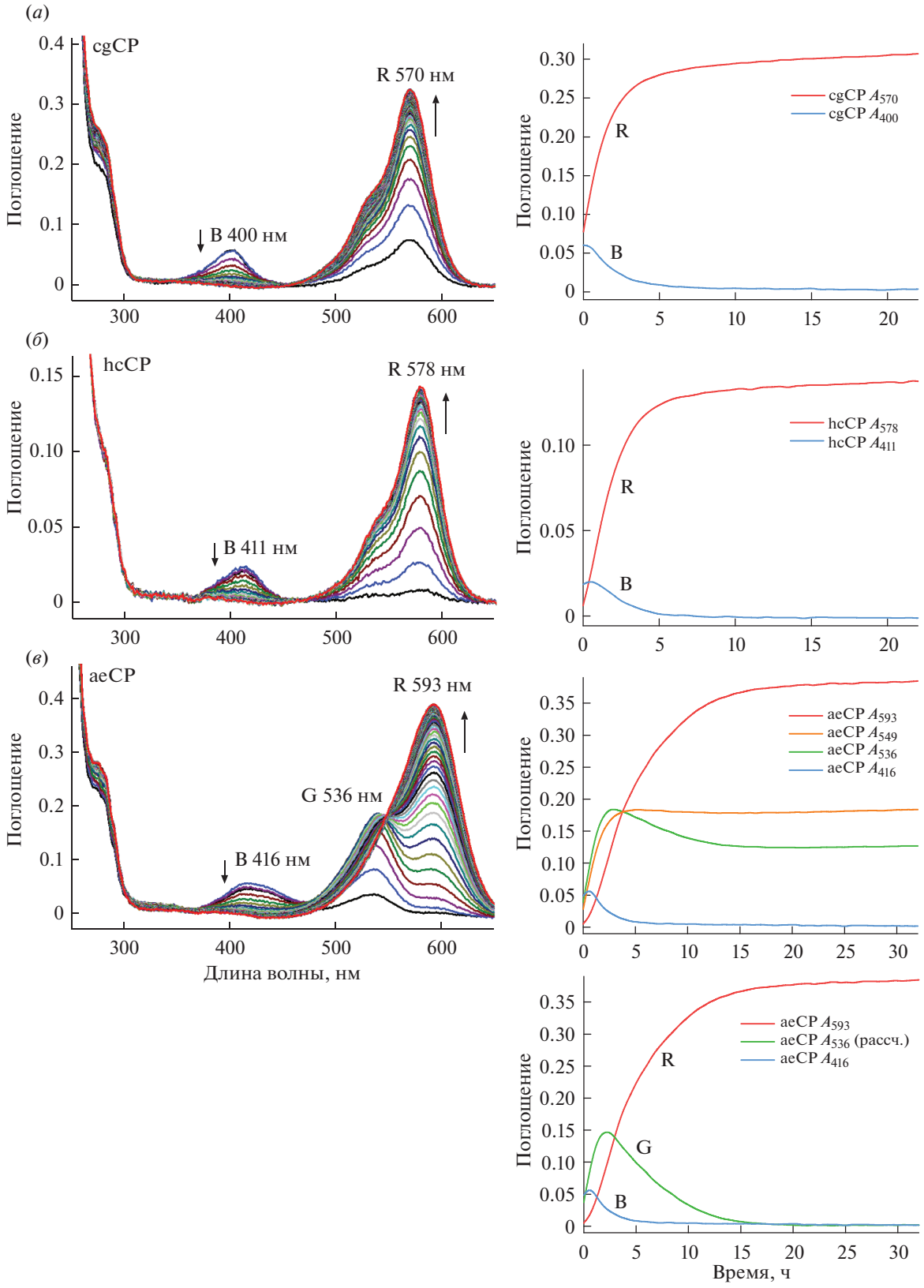


Рис. 1. Изменение спектров поглощения хромобелков cgCP (*а*), hcCP (*б*) и aeCP (*в*) в процессе созревания белка. Спектры снимали с интервалом 30 мин при комнатной температуре. Кинетические кривые созревания при разных длинах волн показаны справа. Поглощение при 549 нм для aeCP соответствует изобестической точке спектрального перехода из формы G в форму R. Кинетические кривые созревания aeCP с учетом вычитания "красной" компоненты для промежуточной формы G приведены внизу справа.

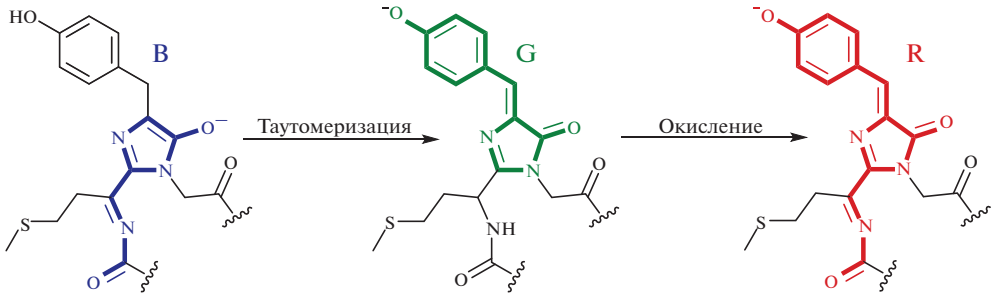


Рис. 2. Предполагаемая последовательность реакций при синтезе хромофора aeCP.

однако установлена структура мутантного варианта hcCP – HcRed, флуоресцирующего в красной области спектра. Ранее было показано, что гомологичное моделирование можно использовать для оценки аминокислотного окружения флуоресцентных белков и объяснения их свойств [30, 31]. В настоящей работе при помощи гомологичного моделирования была построена модель пространственной структуры aeCP с использованием хромобелка из *Cnidopus japonicus* (cjBlue, степень гомологии 65%) [32] в качестве белка-шаблона. Модель cgCP и hcCP строилась на основе HcRed [33]. Согласно полученным данным, хромофор aeCP вовлечен в стекинг-взаимодействие с остатком His197 (H197) (рис. 3*а*), что, вероятно, вносит значительный вклад в батохромный сдвиг. Анализ ближайшего аминокислотного окружения хромофора aeCP не обнаружил принципиальных отличий в сравнении с другими GFP-подобными белками. В целом ближайшее окружение хромофора aeCP очень похоже на таковое у других гомологов, включая каталитические остатки Glu215 (E215) и Arg92 (R92) (рис. 3*а*). Анализ более отдаленных участков показал, что в aeCP могут присутствовать полости, отсутствующие в других белках (рис. 3*б*). Это может сказываться как на общей подвижности боковых цепей внутри β-бочонка, так и на прохождении молекул растворителя либо кислорода снаружи белка к хромофору. Недавно было показано, что на протекание реакции зелено-красной конверсии в RFP из *Zoanthus* sp. (zoan2RFP) может оказывать влияние даже подвижность аминокислотных остатков, боковые цепи которых ориентированы в растворитель, а не внутрь β-бочонка [14]. При этом вклад таких остатков может быть существенно большим, чем остатков, участвующих во взаимодействиях между субъединицами мономера в тетрамерном комплексе белка. Таким образом, анализ модели aeCP не выявил принципиальных отличий в структуре белка относительно других гомологов, и необходимо проведение дополнительных исследований для более точного определения причин, по которым при синтезе хромофора aeCP промежуточная "зеленая" форма является, с одной стороны, довольно долгоживущей, а с другой стороны, способна полностью превращаться в "красное" состояние.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере хромобелка aeCP показано, что механизм синтеза хромофора "красных" белков семейства GFP может протекать через последовательные промежуточные "синее" и "зеленое" состояния. Наиболее вероятным механизмом выступает образование сначала "синего" хромофора типа tagBFP, который таутомеризуется в "зеленый" хромофор GFP-типа. "Красный" хромофор DsRed-типа образуется, вероятно, в результате последующего окисления GFP-хромофора. Потенциально такой сине-зелено-красный переход можно использовать для разработки флуоресцентных таймеров на основе aeCP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение и очистка белков. Клетки *Escherichia coli* штамма JM-109 трансформировали плазмидой pQE-30, несущей ген целевого белка, и выращивали в среде LB, содержавшей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для получения полностью созревшего белка клеточную культуру выращивали при постоянном перемешивании (250 об./мин) и температуре 37°C в течение ночи, затем температуру понижали до 22°C и продолжали перемешивание клеточной суспензии в течение суток для максимального созревания белка. Для получения белка в незрелом состоянии клетки выращивали при 37°C в течение ~12 ч и сразу же выделяли из них белок. Клеточную биомассу осаждали центрифугированием (3000 *g*, 15 мин при 4°C), затем осадок ресуспендировали в промывочном буфере (50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH 8.0) и охлаждали во льду. После этого клетки лизировали при помощи ультразвукового дезинтегратора Sonopuls HD-3100 (Bandelin, Германия), полученный клеточный лизат центрифугировали при 12000 *g* в течение 10 мин при 4 °C. Поскольку целевые белки на своем *N*-конце содержали гексагистидиновую последовательность, их выделе-

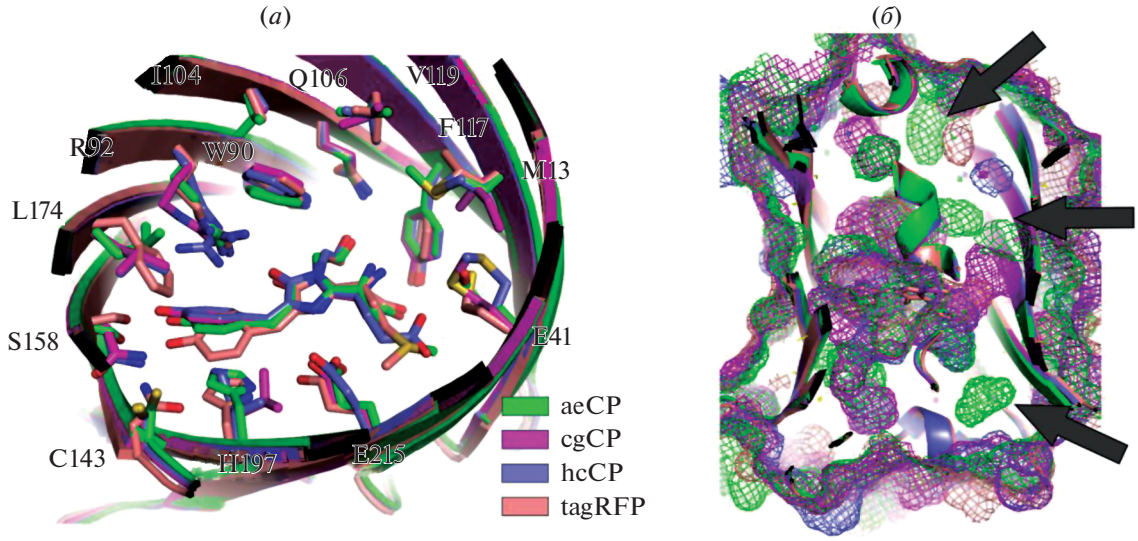


Рис. 3. Рассчитанная пространственная структура хромобелка aeCP в сравнении с гомологами. (*а*) – Аминокислотное окружение хромофора в белках aeCP, cgCP, hcCP и tagRFP (PDB ID: 3M22), подписаны аминокислотные остатки aeCP; (*б*) – полости внутри β-бочонка для этих же белков. Стрелки указывают на полости в aeCP, не обнаруженные в других гомологах.

ние осуществляли методом металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Quiagen, США). Клеточный лизат наносили на хроматографическую колонку, предварительно уравновешенную промывочным буфером, промывку проводили 4-кратным объемом того же буфера, после чего осуществляли элюирование белков буфером, содержавшим 50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол, pH 8.0.

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Cary 50 Bio (Varian, США). Для наблюдения за кинетикой созревания белков образцы сразу после выделения на Ni-NTA-агарозе переносили в кювету и снимали спектры поглощения через каждые 30 мин при комнатной температуре (22°C).

Выделение хромофорсодержащих пептидов. Раствор белка титровали до pH 2.8 при помощи уксусной кислоты для денатурации, после чего к раствору добавляли пепсин (Sigma, США) в соотношении 1 : 30 и оставляли на ночь. Полученный гидролизат белка наносили на ВЭЖХ-колонку с обращенной фазой (Ultrasphere ODS, BD Biosciences, США), уравновешенную 10 мМ натрий-фосфатным буфером. Пептиды элюировали с помощью линейного градиента ацетонитрила в том же буфере. Детекцию пептидных фракций проводили одновременно при 220 и 380 нм. Основную фракцию, поглощающую при 380 нм, анализировали при помощи масс-спектроскопии.

MALDI-TOF-масс-спектрометрический анализ хромопептидов проводили на масс-спектрометре Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия) в режиме рефлектрона. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту.

Гомологичное моделирование. Парное выравнивание последовательностей и последующее гомологичное моделирование осуществляли при помощи программы MODELLER v9.24 [34]. При моделировании хромофор был введен как жесткое тело в режиме, учитывающем гетероатомные остатки (с параметром env.io.hetatm = True). Для моделирования пространственной структуры aeCP в качестве шаблона использовали ближайший гомолог с известной пространственной структурой – cjBlue (PDB ID: 2IB5) [32]. Структуры cgCP и hcCP были получены с использованием белка HcRed (PDB ID: 1YZW) [33] в качестве шаблона. Анализ и сравнение структур белков проводили с использованием программы PyMOL [35].

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-04-00745 и 18-29-09166) и частично Российского научного фонда (проект № 19-73-20194).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность К.А. Лукьянову, ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН (ИБХ РАН), за предоставление плазмиды, несущей ген хромобелка aeCP.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163. https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009
2. *Martynov V.I., Pakhomov, A.A., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2018. V. 1862. P. 2924–2939. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.013
3. *Pakhomov A.A., Martynov V.I., Orsa A.N., Bondarenko A.A., Chertkova R.V., Lukyanov K.A., Petrenko A.G., Deyev I.E.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. V. 493. P. 1518–1521. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.170
4. *Miyawaki A., Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2012. V. 22. P. 679–688. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.09.002
5. *Fabritius A., Ng D., Kist A.M., Erdogan M., Portugues R., Griesbeck O.* // Cell Chem. Biol. 2018. V. 25. P. 1554e8–1561e8. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.08.008
6. *Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V, Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zaraisky A.G., Lukyanov S., Chudakov D.M.* // Nat. Methods. 2007. V. 4. P. 741–746. https://doi.org/10.1038/nmeth1083
7. *Luker K.E., Pata P., Shemiakina I.I., Pereverzeva A., Stacer A.C., Shcherbo D.S., Pletnev V.Z., Skolnaja M., Lukyanov K.A., Luker G.D., Pata I., Chudakov D.M.* // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 10332. https://doi.org/10.1038/srep10332
8. *Shcherbakova D.M., Subach O.M., Verkhusha V.V.* // Angew Chem. Int. Ed. Engl. 2012. https://doi.org/10.1002/anie.201200408
9. *Subach F.V., Verkhusha V.V.* // Chem. Rev. 2012. V. 112. P. 4308–4327. https://doi.org/10.1021/cr2001965
10. *Плетнева Н.В., Горячева Е.А., Артемьев И.В., Архипова С.Ф., Плетнев В.З.* // Биоорг. химия. 2019. Т. 45 С. 339–347. [*Pletneva N.V., Goryacheva E.A., Artemyev I.V., Arkhipova S.F., Pletnev V.Z.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 187–194.] https://doi.org/10.1134/S106816201903004X
11. *Pakhomov A.A., Martynov V.I.* // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 11528–11535. https://doi.org/10.1021/bi700721x
12. *Pletneva N., Pletnev V., Tikhonova T., Pakhomov A.A., Popov V., Martynov V.I., Wlodawer A., Dauter Z.* // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2007. V. 63. P. 1082–1093. https://doi.org/10.1107/S0907444907042461
13. *Pletneva N., Pletnev S., Tikhonova T., Popov V., Martynov V., Pletnev V.* // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2006. V. 62. P. 527–532. https://doi.org/10.1107/S0907444906007852
14. *Kim S.E., Hwang K.Y., Nam K.H.* // Protein Sci. 2019. V. 28. P. 375–381. https://doi.org/10.1002/pro.3540
15. *Pakhomov A.A., Frolova A.Y., Tabakmakher V.M., Chugunov A.O., Efremov R.G., Martynov V.I.* // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2020. V. 206. P. 111853. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111853
16. *Shkrob M.A, Yanushevich Y.G., Chudakov D.M., Gurskaya N.G., Labas Y.A, Poponov S.Y., Mudrik N.N., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Biochem. J. 2005. V. 392. P. 649–654. https://doi.org/10.1042/BJ20051314
17. *Bulina M.E., Chudakov D.M., Mudrik N.N., Lukyanov K.A.* // BMC Biochem. 2002. V. 3. P. 1–8. https://doi.org/10.1186/1471-2091-3-7
18. *Chudakov D.M., Feofanov A.V., Mudrik N.N., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 7215–7219. https://doi.org/10.1074/jbc.M211988200
19. *Gurskaya N.G., Fradkov A.F., Terskikh A., Matz M.V., Labas Y.A., Martynov V.I., Yanushevich Y.G., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A.* // FEBS Lett. 2001. V. 507. P. 16–20. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02930-1
20. *Andresen M., Wahl M.C., Stiel A.C., Grater F., Schafer L.V., Trowitzsch S., Weber G., Eggeling C., Grubmuller H., Hell S.W., Jakobs S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 13070–13074. https://doi.org/10.1073/pnas.0502772102
21. *Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldridge K.K., Tsien R.Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 11990–11995. https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11990
22. *Yarbrough D., Wachter R.M., Kallio K., Matz M.V., Remington S.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 462–467. https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.462
23. *Verkhusha V.V., Chudakov D.M., Gurskaya N.G., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Chem. Biol. 2004. V. 11. P. 845–854. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.04.007
24. *Пахомов А.А., Третьякова Ю.А., Мартынов В.И.* // Биоорг. химия. 2010. Т. 36. С. 117–121. [*Pakhomov A.A., Tretyakova Y.A., Martynov V.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 109–113.] https://doi.org/10.1134/S1068162010010127
25. *Subach O.M., Malashkevich V.N., Zencheck W.D., Morozova K.S., Piatkevich K.D., Almo S.C., Verkhusha V.V.* // Chem. Biol. 2010. V. 17. P. 333–341. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.005
26. *Subach O.M., Gundorov I.S., Yoshimura M., Subach F.V., Zhang J., Grüenwald D., Souslova E.A., Chudakov D.M., Verkhusha V.V.* // Chem. Biol. 2008. V. 15. P. 1116–1124. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.08.006
27. *Pletnev S., Subach F.V., Dauter Z., Wlodawer A., Verkhusha V.V.* // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. P. 2243–2253. https://doi.org/10.1021/ja908418r
28. *Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 11984–11989. https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11984

29. *Pakhomov A.A., Pletneva N.V., Balashova T.A., Martynov V.I.* // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 7256–7264. https://doi.org/10.1021/bi060207q

30. *Пахомов А.А., Мартынов В.И.* // Биоорг. химия. 2011. Т. 37. С. 429–432. [*Pakhomov A.A., Martynov V.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 383–386.] https://doi.org/10.1134/S1068162011030137

31. *Pakhomov A.A., Martynov V.I.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 407. P. 230–235. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.004

32. *Chan M.C.Y., Karasawa S., Mizuno H., Bosanac I., Ho D., Privé G.G., Miyawaki A., Ikura M.* // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 37813–37819. https://doi.org/10.1074/jbc.M606921200

33. *Wilmann P.G., Petersen J., Pettikiriarachchi A., Buckle A.M., Smith S.C., Olsen S., Perugini M.A., Devenish R.J., Prescott M., Rossjohn J.* // J. Mol. Biol. 2005. V. 349. P. 223–237. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.02

34. *Webb B., Sali A.* // Curr. Protoc. Bioinformatics. 2016. V. 54. P. 5.6.1–5.6.37. https://doi.org/10.1002/cpbi.3

35. *Rigsby R.E., Parker A.B.* // Biochem. Mol. Biol. Educ. 2016. V. 44. P. 433–437. https://doi.org/10.1002/bmb.20966

Transformations of the Chromophore in the Course of Maturation of a Chromoprotein from *Actinia equina*

A. A. Pakhomov*, **, #, A. A. Pastukhova*, G. V. Tishkin*, and V. I. Martynov*

#Phone: +7 (495) 336-51-11; e-mail: alpah@mail.ru

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

***Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, ul. Vavilova 28, Moscow, 119334 Russia*

Currently, it is generally accepted that chromophore synthesis of red fluorescent proteins passes through an intermediate "blue" form with a maximum absorption at 400 nm, which directly turns into "red" with the formation of a double bond in the side chain of the chromophore-forming Tyr residue. We show that the synthesis of the chromophore of a chromoprotein from *Actinia equina* (aeCP) proceeds via dehydration and two stages of oxidation, like in other red fluorescent proteins. However, the appearance of an additional "green" form with a maximum absorption near 530 nm at the intermediate stage is observed.

Keywords: fluorerscent proteins, red fluorerscent proteins, RFP, chromophore, chromophore synthesis, post-translational modifications

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 135–143

УДК 577.112:577.336

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОТОКОНВЕРТИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ИЗ *Montastraea cavernosa*

© 2021 г. А. Ю. Фролова*, **, А. А. Пахомов*, **, #, В. И. Мартынов*

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

***ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 28*

Поступила в редакцию 08.06.2020 г.
После доработки 19.06.2020 г.
Принята к публикации 20.06.2020 г.

Среди широкого разнообразия известных на сегодняшний день флуоресцентных зондов особое место занимают фотоконвертируемые флуоресцентные белки (ФКФБ), способные к необратимому изменению положения максимума эмиссии флуоресценции под действием света. Были изучены основные физико-химические свойства ФКФБ, выделенного из *Montastraea cavernosa* (mcavGR). Показано, что mcavGR обладает высокой яркостью и контрастностью фотопревращения, сравнимой с лучшими гомологичными ФКФБ, такими как Kaede, dendFP, Dendra2, EosFP и др., и в то же время обладает значительной фотостабильностью.

Ключевые слова: хромофор, фотоконверсия, флуоресцентный белок, mcavGR, mcavRFP, dendFP, Dendra2

DOI: 10.31857/S013234232101005X

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные метки – одни из основных инструментов для визуализации процессов в живых системах [1, 2]. Генетически кодируемые зонды на основе флуоресцентных белков (ФБ) обладают рядом уникальных свойств и перекрывают практически весь видимый диапазон от синего до красного цвета [3–7]. Несмотря на определенный "провал" в желтой области (максимумы эмиссии ~545 нм) и невысокую яркость белков с эмиссией в красном диапазоне (>620 нм), ФБ используются для решения самого широкого спектра задач *in vitro* и *in vivo* [8–12]. Отдельный класс представляют собой зонды на основе фотоконвертируемых флуоресцентных белков (ФКФБ), способных к изменению цвета за счет батохромного смещения максимумов возбуждения и эмиссии флуоресценции в ответ на облучение УФ-светом [13, 14]. В основном эти зонды представлены белками семейства Kaede и способны к фотопревращению из зеленого флуоресцентного состояния в красное [15, 16]. Такая фотоконверсия происходит за счет расширения π-системы хромофора белка в результате реакций фотоэлиминирования [17, 18] (рис. 1). Эти свойства в сочетании с возможностью генетического кодирования позволяют применять ФКФБ для прицельного мечения и наблюдения за перемещением объектов внутри клетки [19–21], а также в рамках целого организма [22, 23]. ФКФБ были использованы также при разработке новых методов суперразрешающей флуоресцентной микроскопии, которые позволяют преодолеть дифракционный барьер и получать снимки с разрешением до нескольких десятков нанометров [24–27]. В то же время ФКФБ имеют ряд характеристик, ограничивающих их применение. В частности, фотоконверсия, как правило, происходит в результате облучения УФ-светом, токсичного для клеток или модельного организма. Тетрамерная природа большинства флуоресцентных белков дикого типа вносит дополнительные ограничения для их использования из-за склонности к агрегации. При помощи направленного мутагенеза были получены мономерные варианты ряда ФКФБ [19, 21, 28–30], однако после мономеризации часто ухудшается эффективность их созревания и фотофизические характеристики, такие как квантовый выход флуоресценции, фотостабильность, степень фотоконверсии. На сегодняшний день поиск и получение ФКФБ с улучшенными свойствами по-прежнему остаются актуальными.

Сокращения: ФБ – флуоресцентный белок; ФКФБ – фотоконвертируемый флуоресцентный белок; dendFP – ФКФБ из *Dendronephthya* sp.; Dendra2 – мономерный мутантный вариант dendFP; Kaede – ФКФБ из *Trachyphyllia geoffroyi*; mcavGR, mcavRFP – ФКФБ из *Montastraea cavernosa*.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-51-11; факс: +7 (495) 336-61-66; эл. почта: alpah@mail.ru).

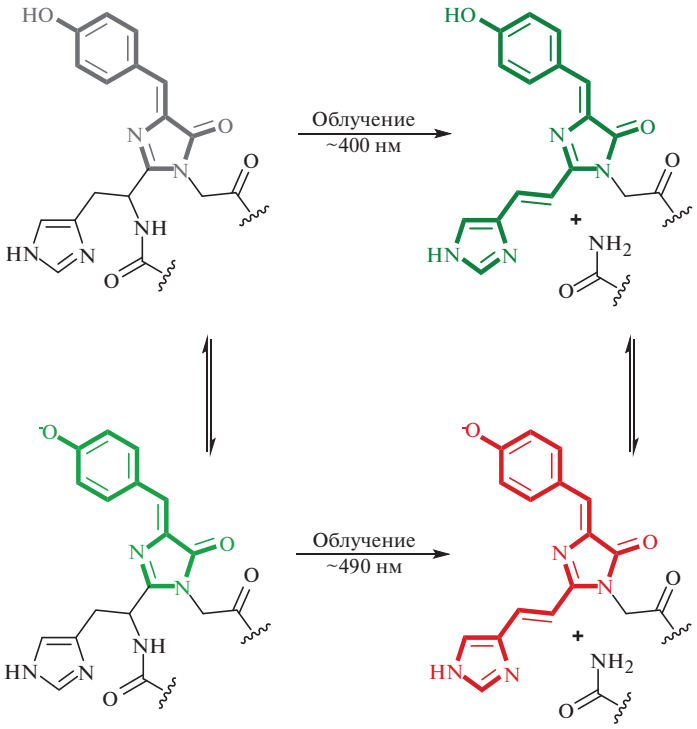


Рис. 1. Фотопревращения хромофора белков семейства Kaede.

Ранее сообщалось, что флуоресцентный белок, выделенный из кораллового полипа *Montastraea cavernosa* (mcavGR), способен к смещению максимумов возбуждения/эмиссии флуоресценции из зеленой области в красную [31], однако полная информация о его физико-химических свойствах с тех пор не появлялась. В настоящей работе мы попытались восполнить этот пробел и подвергли всестороннему изучению физико-химические свойства белка mcavGR в сравнении с другими ФКФБ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно проведенному нами филогенетическому анализу, mcavGR принадлежит к той же группе ФБ, что и ФКФБ Kaede [15], EosFP [32], dendFP [33], а также ФБ Dronpa [34], AzamiGreen [35], kikG [36] и cFP484 [37]. Ближайшими гомологами, помимо других ФБ из *Montastraea cavernosa* [38, 39], являются Kaede и EosFP (степень гомологии 77 и 79% соответственно), а также неприродный белок-предшественник LEA (least evolved ancestor, степень гомологии 88%) [40, 41]. В работе Labas et al. [31] mcavGR, как и другой гомологичный белок rfloRFP, был описан впервые как красный флуоресцентный белок (mcavRFP) из-за наблюдаемой окраски в конечном состоянии после фотопревращения, хотя в отсутствие света белок синтезируется в зеленой форме. Мы не стали переименовывать белок в mcavFP, т.к. под mcavFP иногда подразумевается другой гомолог, также выделенный из *Montastraea cavernosa* [42, 43].

Как и у других Kaede-подобных белков, хромофор mcavGR образован из аминокислотной последовательности -His-Tyr-Gly- [31]. Способность к фотоконверсии под действием УФ-света, вероятно, обусловлена реакцией фотоэлиминирования, сопровождающейся расширением π-системы исходного хромофора за счет имидазолэтиленильной группы (рис. 1). В настоящей работе фотоконверсионные свойства mcavGR сравнивали с широко используемым ФКФБ Dendra2, выступающими мономерным, ярким и, в отличие от других гомологов, способным также к ограниченной фотоконверсии под действием цианового (488 нм) света, а также с природным предшественником Dendra2 – dendFP. Для сравнения с другими ФКФБ использовали литературные данные (табл. 1).

Прежде всего мы провели анализ олигомерного состояния mcavGR с помощью гель-фильтрации. С использованием EGFP, dendFP и DsRed в качестве белков сравнения было показано, что mcavGR – тетрамер, как и большинство других природных представителей белков семейства Kaede.

В исходном состоянии mcavGR – типичный зеленый флуоресцентный белок с максимумами возбуждения/эмиссии флуоресценции при 506/517 нм соответственно, которые под действием света

Таблица 1. Физико-химические свойства mcavGR в сравнении с другими фотоконвертируемыми флуоресцентными белками

Флуоресцентный белок	Олигомерное состояние	До фотоконверсии					После фотоконверсии					Ссылки
		λ возб./эм., нм	ε*, M^{-1} $см^{-1}$	QY	яркость/1000	pK_a	λ возб./эм., нм	ε*, M^{-1} $см^{-1}$	QY	яркость/1000	pK_a	
mcavGR	Тетрамер	506/517	106000	0.79	83.74	6.7	572/581	87200	0.70	61.04	6.8	Данная работа
Kaede	Тетрамер	508/518	98800	0.80	79.04	5.6	572/580	60400	0.33	19.93	5.7	[15, 16]
dendFP	Димер**	492/508	82600	0.76	62.78	6.5	557/575	73000	0.64	46.72	6.2	[44, 45]
Dendra2	Мономер	490/507	45000	0.50	22.50	6.6	553/573	35000	0.55	19.25	6.9	[19]
KikGR	Тетрамер	507/517	28200	0.70	19.74	7.8	583/593	32600	0.65	21.19	5.5	[36]
KikGRX	Тетрамер	507/517	20300	0.70	14.21	8.0	583/593	28600	0.65	18.20	5.7	[46]
mKikGR	Мономер	505/515	49000	0.69	33.81	6.6	580/591	28000	0.63	17.64	5.2	[28]
mClavGR2	Мономер	488/504	19000	0.77	14.63	8.0	566/583	32000	0.53	16.96	7.3	[21]
mMaple	Мономер	489/505	15000	0.74	11.10	8.2	566/583	30000	0.56	16.80	7.3	[30]
EosFP	Тетрамер	506/516	72000	0.70	50.40	5.8	571/581	41000	0.55	22.55	6.8	[32]
mEosFP	Мономер	505/516	67200	0.64	43.01	5.3	569/581	37000	0.62	22.94	6.5	[29, 32]
mEos4b	Мономер	505/516	78200	0.84	65.69	5.5	570/580	55500	0.71	39.40	5.8	[43, 47]
LEA	Тетрамер	504/513	86800	0.81	70.31	6.3	571/580	ND	ND	ND	ND	[40]

* Молярный коэффициент экстинкции при длине волны основного пика поглощения.
** Олигомерное состояние dendFP зависит от концентрации. В концентрированных растворах существует в виде тетрамера.
ND – не определено.

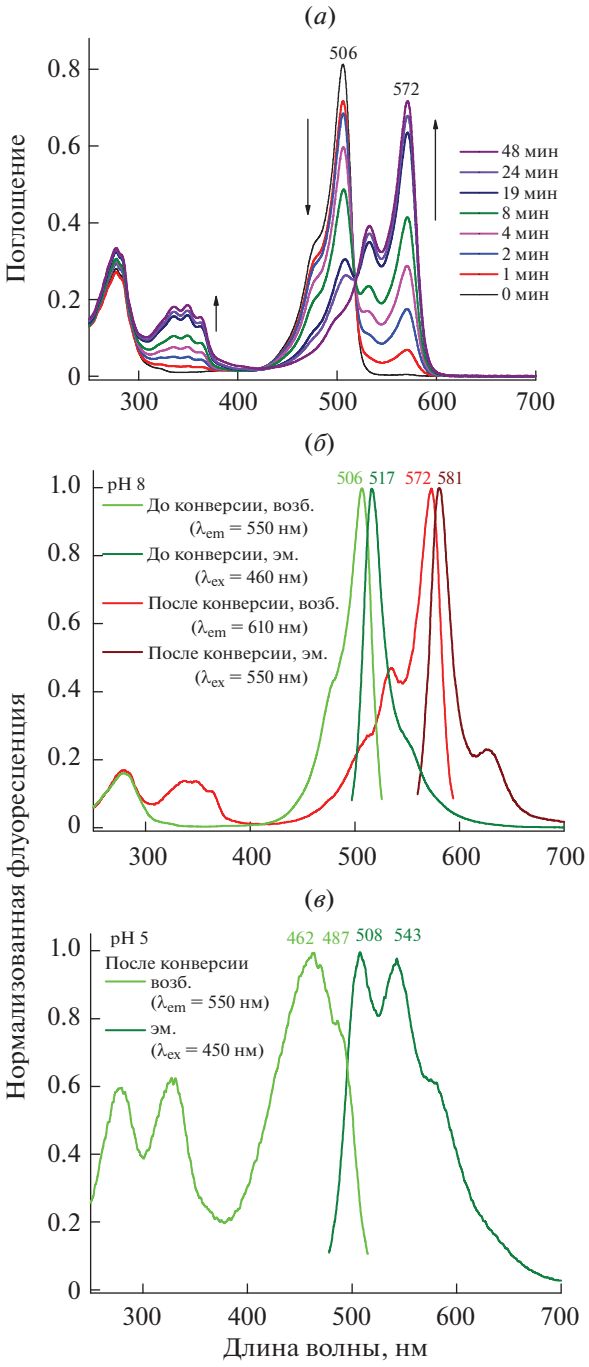


Рис. 2. Фотофизические свойства mcavGR. (*а*) – Спектры поглощения в ходе фотоконверсии при облучении УФ-светом (365 нм); (*б*) – спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции до (зеленый цвет) и после (красный цвет) фотоконверсии при pH 8; (*в*) – спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции фотоконвертированного белка при pH 5. Положение максимумов в нанометрах показано числами над соответствующими пиками.

смещаются на ~65 нм в красную область спектра (рис. 2*а*, 2*б*). При понижении pH наблюдается уменьшение поглощения при 506 нм с одновременным ростом при 385 нм зеленой формы белка до фотопревращения (рис. 3*а*). Ранее было показано, что такое поведение связано с кислотно-основным равновесием фенольной группы хромофора [44, 48]. pK_a этого перехода оказалось равным 6.66 ± 0.03, что является сопоставимым со значениями pK_a для других гомологов. Отметим, что фотоконверсия белка запускается светом, возбуждающим протонированную форму хромофора, поэтому низкие значения pK_a кислотно-основного равновесия хромофора затрудняют конверсию при физиологических pH ~ 7.5 за счет смещения равновесия в сторону анионного хромофора. С другой стороны, при высоких значениях pK_a яркость белка падает при нейтральных значениях pH за счет снижения концентрации анионного хромофора. В этом ключе mcavGR имеет “средние” значения pK_a относительно других Kaede-подобных белков (табл. 1). Фотоконвертированный белок при закислении среды, аналогично другим Kaede-подобным белкам, переходит из красной формы в зеленую со сдвигом максимумов поглощения от 572 к 460–490 нм и эмиссии флуоресценции от 581 к 510–540 нм с pK_a = 6.78 ± 0.02 (рис. 2*в*, 3*б*).

Одним из ключевых параметров ФБ, характеризующих их применимость в флуоресцентной микроскопии, выступает яркость, определяемая как произведение квантового выхода и молярного коэффициента экстинкции. Согласно полученным данным, mcavGR имеет коэффициенты экстинкции в максимумах поглощения анионных форм хромофора 106000 и 87200 M^{-1} $см^{-1}$ и квантовые выходы 0.79 и 0.70 для исходной и фотоконвертированной форм соответственно. С учетом данных, описанных в литературе (табл. 1), mcavGR – один из самых ярких ФКФБ, имеющих значительные перспективы для дальнейшего применения.

Кинетические параметры фотопревращения ФБ зависят в значительной степени от используемого оборудования и его настройки в конкретном эксперименте, поэтому оценку фотоконверсионных свойств mcavGR проводили в сравнении с другими реперными белками в тех же условиях. Как было отмечено выше, в качестве реперных белков использовали ФКФБ Dendra2 и его природный предшественник dendFP. Анализ кинетики фотопревращения белков под действием синего света (405 нм) в условиях микроскопии показал, что mcavGR конвертируется несколько медленнее dendFP, но быстрее его мономерного варианта Dendra2 (табл. 2, рис. 4*а*–4*в*). В то же время из рис. 4*а*–4*в* видно, что mcavGR демонстрирует более высокий контраст в ходе фотопревращения. Анализ фотостабильности белков при длительном облучении УФ-светом (365 нм) в одинаковых

условиях показал, что mcavGR дольше других сохраняет флуоресцентные свойства (рис. 4*г*, табл. 2).

Таким образом, нами были исследованы основные физико-химические свойства белка mcavGR. Показано, что в растворе он – тетрамер. Изучена кинетика превращения белка mcavGR из зеленого состояния в красное под действием света, а также его фотостабильность. Проанализированы основные фотофизические характеристики, такие как положение максимумов поглощения и флуоресценции, коэффициенты экстинкции, квантовые выходы флуоресценции, яркость. Показано, что в сравнении с другими белками Kaede-семейства mcavGR обладает высокой яркостью в исходном и фотоконвертированном состояниях, а также является фотостабильным. Эти свойства подтверждают, что mcavGR имеет значительный потенциал для дальнейшего применения в качестве фотоконвертируемого генетически кодируемого флуоресцентного зонда, особенно в случае получения его мономерного варианта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Филогенетический анализ проводили с использованием последовательностей белков, взятых из базы данных FPbase [43]. Выравнивание последовательностей осуществляли при помощи утилиты MAFFT v.7.467 [49]. Для построения филогенетического дерева использовали програму Seaview4 [50] совместно с программой PhyML 3.0 [51].

Наработка и выделение белков. Клетки *Escherichia coli* штамма JM-109 трансформировали плазмидой pQE-30, несущей ген целевого флуоресцентного белка (mcavGR, dendFP, Dendra2, EGFP, DsRed), и выращивали в среде LB, содержавшей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Клеточную культуру выращивали при постоянном перемешивании (250 об./мин) и температуре 37°C в течение ночи, затем температуру снижали до 22°C и продолжали перемешивание клеточной суспензии в течение суток для максимального созревания белка. Осаждение клеточной биомассы осуществляли центрифугированием (3000 *g*) в течение 15 мин при 4°C, осадок затем ресуспендировали в промывочном буфере (50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH 8.0) и охлаждали во льду. Далее клетки лизировали при помощи френч-пресса (Ashcroft, США) при давлении 2000 psi. Получившийся клеточный лизат центрифугировали при 75000 *g* в течение 20 мин при 4°C. Целевые белки на своем *N*-конце содержали гексагистидиновую последовательность, поэтому их выделение осуществляли методом металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Qiagen,

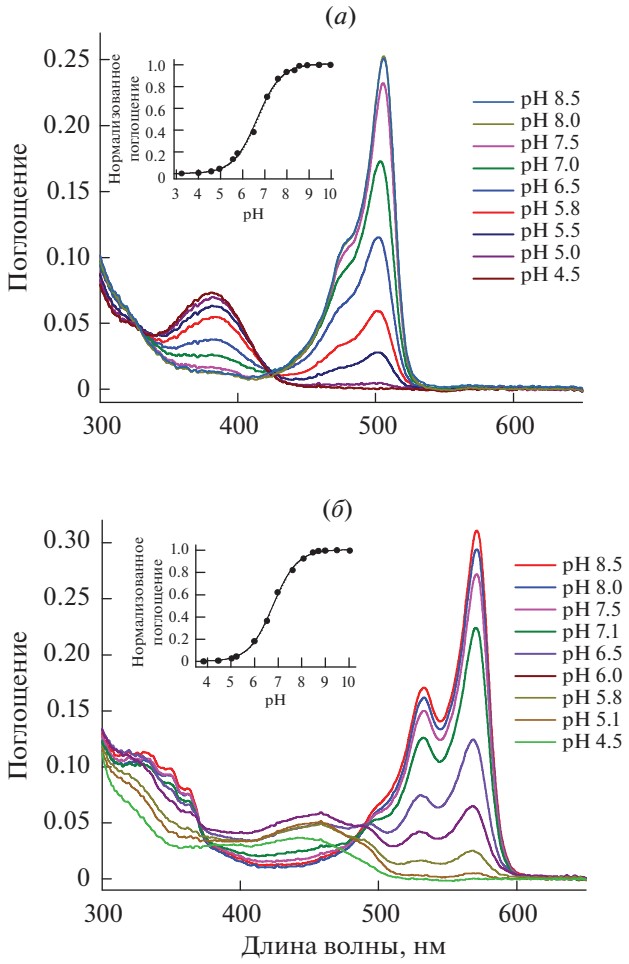


Рис. 3. Зависимость спектров поглощения mcavGR от pH до (*а*) и после (*б*) фотоконверсии. Кривые титрования, рассчитанные по максимуму поглощения анионной формы (506 нм (*а*) и 572 нм (*б*)), приведены на вставках.

Таблица 2. Фотоконверсионные свойства mcavFP в сравнении с белками dendFP и Dendra2

Флуоресцентный белок	k (G → R, 405 нм, микро)*, мин$^{-1}$	k (G → R, 365 нм)**, ч$^{-1}$	k (обесцвеч., 365 нм)**, ч$^{-1}$
mcavGR	1.11 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.008 ± 0.001
dendFP	2.22 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.076 ± 0.013
Dendra2	0.51 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.018 ± 0.007

* Константа зелено-красного превращения в условиях микроскопии.
** Константы зелено-красного превращения и последующей фотодеградации при облучении лампой (365 нм) в пробирке.

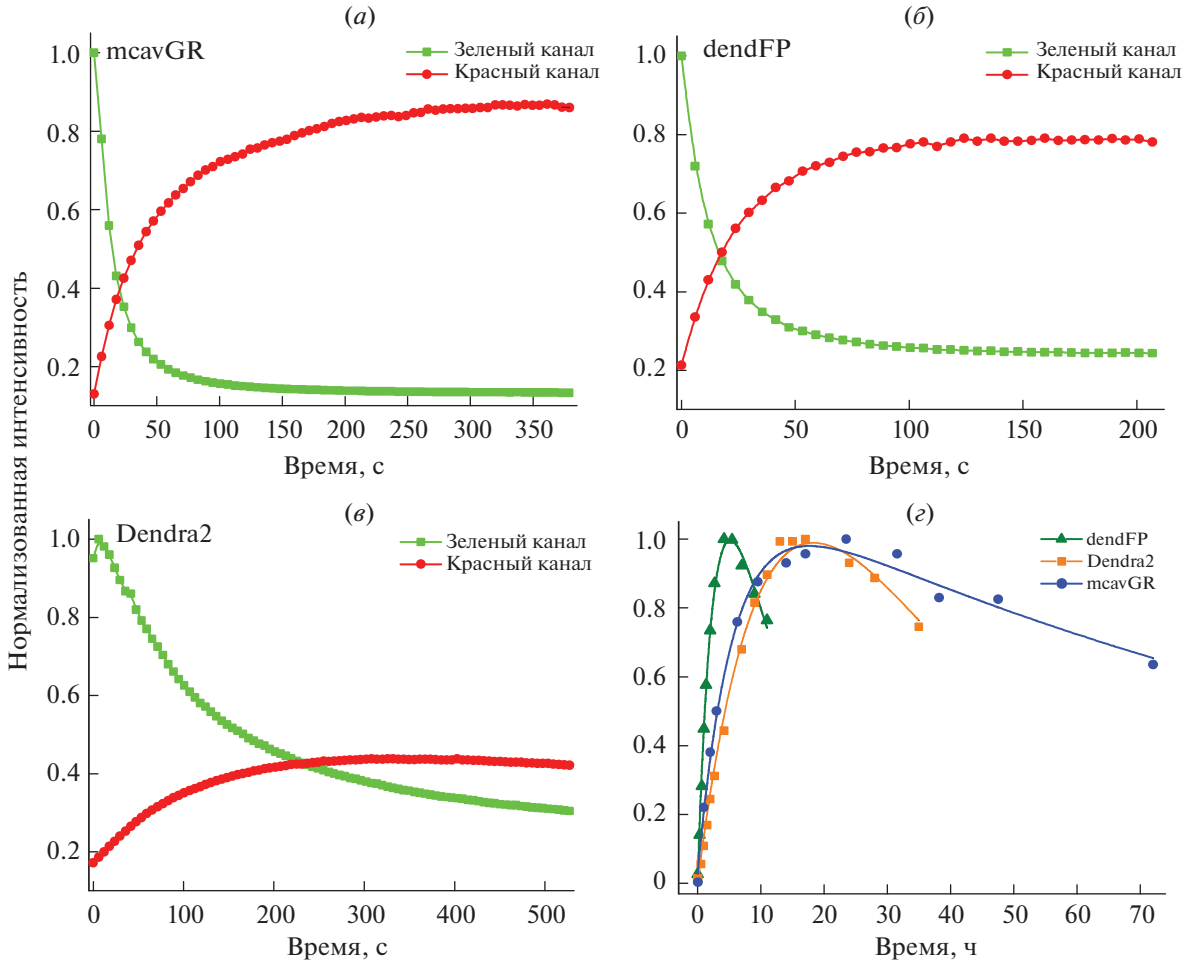


Рис. 4. Кинетика фотопревращений mcavGR в сравнении с белками dendFP и Dendra2. Представлены кривые зелено-красной фотоконверсии mcavGR (*а*), dendFP (*б*) и Dendra2 (*в*) под действием синего (405 нм) света в условиях широкопольной флуоресцентной микроскопии; (*г*) – динамика изменения поглощения при 570 нм в ходе зелено-красной конверсии и фотодеградации белков под действием УФ-света (365 нм).

США). После нанесения клеточного лизата на хроматографическую колонку, предварительно уравновешенную промывочным буфером, проводили промывку 4-кратным объемом того же буфера. Элюирование белков осуществляли буфером, содержавшим 50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол, pH 8.0.

Гель-фильтрационный анализ проводили с использованием хроматографа ACTA FPLC (GE Healthcare, Швеция) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Колонку Superdex 200 (300 × 10 мм; GE Healthcare, Швеция) уравновешивали буфером, содержавшим 20 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl (pH 8.0), и наносили образцы белков с концентрацией ~1.5 мг/мл. Детекцию белковых фракций осуществляли при 280 нм. В качестве белков сравнения для определения олигомерного состояния mcavGR использовали мономерный EGFP [52] и тетрамерный DsRed [53], в качестве димера – dendFP [45].

Фотофизическая характеризация. Спектры поглощения исследуемых белков регистрировали на спектрофотометре Cary 50 Bio (Varian, США) при комнатной температуре. Флуоресцентные свойства белков изучали в тех же условиях при помощи спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, США). Определение квантовых выходов и молярных коэффициентов экстинкции белка mcavGR до и после фотоконверсии проводили в соответствии с методикой, использованной в работе Pletneva et al. [45]. В качестве стандартов для определения квантового выхода до и после фотоконверсии использовали EGFP и DsRed соответственно. Для определения коэффициента экстинкции mcavGR до фотопревращения концентрацию полностью созревшего белка рассчитывали методом Ward [54] по поглощению белка после денатурации в щелочной среде и с учетом коэффициента экстинкции GFP-хромофора 44000 M^{-1} $см^{-1}$. Коэффициент экстинкции красной формы белка определяли с учетом

остаточного количества неконвертированного белка согласно Pletneva et al. [45]. Яркость белка определяли как произведение значений квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента экстинкции.

Фотометрическое титрование. Для получения кривых титрования белок с помощью гель-фильтрации на колонке NAP-10 (GE Healthcare, США) переводили в буферный раствор, содержавший 12.5 мМ CH_3COONa, 12.5 мМ CAPS, 12.5 мМ NaH_2PO_4, 12.5 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7.5. Титрование осуществляли добавлением аликвот растворов 0.5 М HCl либо 0.5 М NaOH к 100 мкл белка. После каждого добавления раствора кислоты или щелочи образцы белка ресуспендировали, измеряли pH при помощи pH-метра Orion Star A211 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием микро-pH-электрода Orion 8220BNWP (Thermo Fisher Scientific, США) и снимали спектр поглощения белка. Для определения константы кислотно-основного равновесия хромофора mcavGR строили зависимость поглощения анионной формы хромофора от изменения pH с учетом разбавления анализируемых образцов и проводили аппроксимацию согласно уравнению Henderson–Hasselbalch [55].

Изучение скорости реакции зелено-красной фотоконверсии выполняли на белках, иммобилизованных на гранулах Ni-NTA-агарозы, в промывочном буфере при комнатной температуре. Исследование проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе DMI6000 (Leica, Германия). Образец гранул с отдельным белком облучали фиолетовым светом (405 ± 20 нм). Использовали объектив с 63-кратным увеличением и набор светофильтров для регистрации зеленого и красного флуоресцентных сигналов (GFP и CY3 соответственно). Константы скорости зелено-красной фотоконверсии определяли при помощи программного обеспечения биохимического симулирования кинетики COPASI [56] с использованием схемы необратимых реакций первого порядка $G \rightarrow R \rightarrow C$, где G – исходная зеленая форма, R – красная форма, C – продукт фотообесцвечивания красной формы. Параметры реакций были определены по анализу кинетики для красной формы белка при помощи методов дифференциальной эволюции (Differential Evolution).

Исследование динамики фотоконверсии и фотообесцвечивания проводили с использованием УФ-трансиллюминатора CL-215 (Ultra-Violet Products, США) при температуре 4°C для минимизации фотообесцвечивания. Эксперименты по изучению фотодеградации осуществляли при комнатной температуре. Образцы белков с одинаковыми концентрациями (~0.2 мг/мл) облучали светом с длиной волны 365 нм в течение заданного времени, после чего снимали спектры поглощения белков. Кинетические параметры реакций определяли с использованием программы COPASI, как описано выше.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-04-00745 и 18-29-09166) и частично Российского научного фонда (проект № 19-73-20194).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность К.А. Лукьянову, ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН (ИБХ РАН), за предоставление плазмиды, несущей ген флуоресцентного белка mcavGR.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Physiol. Rev. Am. Physiological Soc. 2010. V. 90. P. 1103–1163. https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009
2. *Martynov V.I., Pakhomov A.A., Popova N.V., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // Acta Naturae. 2016. V. 8. P. 33–46.
3. *Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K., Nagai T.* // Nat. Methods. 2009. V. 6. P. 351–353. https://doi.org/10.1038/nmeth.1317
4. *Shinoda H., Ma Y., Nakashima R., Sakurai K., Matsuda T., Nagai T.* // Cell Chem. Biol. 2018. V. P. 330e7–338e7. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.12.005
5. *Pakhomov A.A., Martynov V.I.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 407. P. 230–235. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.004
6. *Pakhomov A.A., Frolova A.Y., Tabakmakher V.M., Chugunov A.O., Efremov R.G., Martynov V.I.* // J. Photochem. Photobiol. B. 2020. V. 206. P. 111853. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111853
7. *Fabritius A., Ng D., Kist A.M., Erdogan M., Portugues R., Griesbeck O.* // Cell Chem. Biol. 2018. V. 25. P. 1554e8–1561e8. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.08.008
8. *Kostyuk A.I., Demidovich A.D., Kotova D.A., Belousov V.V., Bilan D.S.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 4200. https://doi.org/10.3390/ijms20174200

9. *Martynov V.I., Pakhomov A.A., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2018. V. 1862. P. 2924–2939. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.013
10. *Bukhari H., Müller T.* // Trends Cell Biol. 2019. V. 29. P. 912–928. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.08.004
11. *Можаев А.А., Серова О.В., Орса А.Н., Бойко А.А., Горященко А.С., Деев И.Е., Петренко А.Г.* // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 213–217. [*Mozhaev A.A., Serova O.V., Orsa A.N., Boyko A.A., Goryashchenko A.S., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 179–182.] https://doi.org/10.1134/S1068162019020080
12. *Злобовская О.А., Ширманова М.В., Ковалева Т.Ф., Саркисян К.С., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А.* // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 17–26. [*Zlobovskaya O.A., Shirmanova M.V., Kovaleva T.F., Sarkisyan K.S., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 645–652.] https://doi.org/10.1134/S1068162018060109
13. *Adam V.* // Histochem. Cell Biol. 2014. V. 142. P. 19–41. https://doi.org/10.1007/s00418-014-1190-5
14. *Nemet I., Ropelewski P., Imanishi Y.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2015. V. 14. P. 1787–1806. https://doi.org/10.1039/C5PP00174A
15. *Ando R., Hama H., Yamamoto-Hino M., Mizuno H., Miyawaki A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 12651–12656. https://doi.org/10.1073/pnas.202320599
16. *Fron E., Sliwa M., Adam V., Michiels J., Rocha S., Dedecker P., Hofkens J., Mizuno H.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2014. V. 13. P. 867–874. https://doi.org/10.1039/c3pp50335f
17. *Mizuno H., Mal T.K., Tong K.I., Ando R., Furuta T., Ikura M., Miyawaki A.* // Mol. Cell. 2003. V. 12. P. 1051–1058. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00393-9
18. *Li X., Chung L.W., Mizuno H., Miyawaki A., Morokuma K.* // J. Phys. Chem. B. 2010. V. 114. P. 16666–16675. https://doi.org/10.1021/jp1101779
19. *Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 2024–2032. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.291
20. *Baker S.M., Buckheit R.W., Falk M.M.* // BMC Cell Biol. 2010. V. 11. P. 15. https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-15
21. *Hoi H., Shaner N.C., Davidson M.W., Cairo C.W., Wang J., Campbell R.E.* // J. Mol. Biol. 2010. V. 401. P. 776–791. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.056
22. *Moeyaert B., Holt G., Madangopal R., Perez-Alvarez A., Fearey B.C., Trojanowski N.F., Ledderose J., Zolnik T.A., Das A., Patel D., Brown T.A., Sachdev R.N.S., Eickholt B.J., Larkum M.E., Turrigiano G.G., Dana H., Gee C.E., Oertner T.G., Hope B.T., Schreiter E.R.* // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 4440. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06935-2
23. *Osugi T., Sasakura Y., Satake H.* // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 1892. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58884-w
24. *Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F.* // Science. 2006. V. 313. P. 1642–1645. https://doi.org/10.1126/science.1127344
25. *McKinney S.A., Murphy C.S., Hazelwood K.L., Davidson M.W., Looger L.L.* // Nat. Methods. 2009. V. 6. P. 131–133. https://doi.org/10.1038/nmeth.1296
26. *Nienhaus K., Ulrich Nienhaus G.* // Chem. Soc. Rev. 2014. V. 43. P. 1088–1106. https://doi.org/10.1039/C3CS60171D
27. *Robert A., Hookway C., Gelfand V.I.* // BioEssays. 2016. V. 38. P. 232–243. https://doi.org/10.1002/bies.201500142
28. *Habuchi S., Tsutsui H., Kochaniak A.B., Miyawaki A., van Oijen A.M.* // PLoS One. 2008. V. 3. P. 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003944
29. *Adam V., Moeyaert B., David C.C., Mizuno H., Lelimousin M., Dedecker P., Ando R., Miyawaki A., Michiels J., Engelborghs Y., Hofkens J.* // Chem. Biol. 2011. V. 18. P. 1241–1251.
30. *McEvoy A.L., Hoi H., Bates M., Platonova E., Cranfill P.J., Baird M.A., Davidson M.W., Ewers H., Liphardt J., Campbell R.E.* // PLoS One. 2012. V. 7. P. e51314. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051314
31. *Labas Y.A., Gurskaya N.G., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A., Matz M.V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 4256–4261. https://doi.org/10.1073/pnas.062552299
32. *Wiedenmann J., Ivanchenko S., Oswald F., Schmitt F., Rocker C., Salih A., Spindler K.-D., Nienhaus G.U.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 15905–159910. https://doi.org/10.1073/pnas.0403668101
33. *Пахомов А.А., Мартынова Н.Ю., Гурская Н.Г., Балашова Т.А., Мартынов В.И.* // Биохимия. 2004. Т. 69. С. 1108–1117. [*Pakhomov A.A.* // Biochemistry (Moscow). 2004. V. 69. P. 901–908.] https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000040223.09641.29
34. *Ando R., Mizuno H., Miyawaki A.* // Science. 2004. V. 306. P. 1370–1373. https://doi.org/10.1126/science.1102506
35. *Karasawa S., Araki T., Yamamoto-Hino M., Miyawaki A.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 34167–34171. https://doi.org/10.1074/jbc.M304063200
36. *Tsutsui H., Karasawa S., Shimizu H., Nukina N., Miyawaki A.* // EMBO Rep. 2005. V. 6. P. 233–238. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400361
37. *Ai H.W.* // Biochem. J. 2006. V. 400. P. 531–540.
38. *Kelmanson I.V., Matz M.V.* // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. P. 1125–1133. https://doi.org/10.1093/molbev/msg130
39. *Field S.F., Bulina M.Y., Kelmanson I.V, Bielawski J.P., Matz M.V.* // J. Mol. Evol. 2006. V. 62. P. 332–339. https://doi.org/10.1007/s00239-005-0129-9
40. *Kim H., Grunkemeyer T.J., Modi C., Chen L., Fromme R., Matz M.V., Wachter R.M.* // Biochemistry. 2013. V. 52. P. 8048–8059. https://doi.org/10.1021/bi401000e

41. *Kim H., Zou T., Modi C., Dörner K., Grunkemeyer T.J., Chen L., Fromme R., Matz M.V., Ozkan S.B., Wachter R.M.* // Structure. 2015. V. 23. P. 34–43. https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.011
42. *Mazel C.H., Lesser M.P., Gorbunov M.Y., Barry T.M., Farrell J.H., Wyman K.D., Falkowski P.G.* // Limnol. Oceanogr. 2003. V. 48. P. 402–411. https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.1_part_2.0402
43. *Lambert T.J.* // Nat. Methods. 2019. V. 16. P. 277–278. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8
44. *Пахомов А.А., Черткова Р.В., Мартынов В.И.* // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. С. 669–674. [*Pakhomov A.A., Chertkova R. V., Martynov V.I.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 602–606.] https://doi.org/10.1134/S1068162015060114
45. *Pletneva N.V., Pletnev S., Pakhomov A.A., Chertkova R.V., Martynov V.I., Muslinkina L., Dauter Z., Pletnev V.Z.* // Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol. 2016. V. 72. P. 922–932. https://doi.org/10.1107/S205979831601038X
46. *Tsutsui H., Shimizu H., Mizuno H., Nukina N., Furuta T., Miyawaki A.* // Chem. Biol. 2009. V. 16. P. 1140–1147. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.10.010
47. *Paez-Segala M.G., Sun M.G., Shtengel G., Viswanathan S., Baird M.A., Macklin J.J., Patel R., Allen J.R., Howe E.S., Piszczek G., Hess H.F., Davidson M.W., Wang Y., Looger L.L.* // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 215–218. https://doi.org/10.1038/nmeth.3225
48. *Pakhomov A.A., Martynov V.I., Orsa A.N., Bondarenko A.A., Chertkova R.V., Lukyanov K.A., Petrenko A.G., Deyev I.E.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. V. 493. P. 1518–1521. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.170
49. *Katoh K., Toh H.* // Bioinformatics. 2007. V. 23. P. 372–374. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl592
50. *Gouy M., Guindon S., Gascuel O.* // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 221–224. https://doi.org/10.1093/molbev/msp259
51. *Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O.* // Syst. Biol. 2010. V. 59. P. 307–321. https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010
52. *Orm M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J.* // Science. 1996. V. 273. P. 1392–1395. https://doi.org/10.1126/science.273.5280.139
53. *Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 11984–11989. https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11984
54. *Ward W.W.* // Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols. 2nd ed. / Eds. Chalfie M., Kain S.R. John Wiley & Sons, Inc., 2005. P. 39–65. https://doi.org/10.1002/0471739499.ch3
55. *Sniegowski J.A., Phail M.E., Wachter R.M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 332. P. 657–663. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.166
56. *Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U.* // Bioinformatics. 2006. V. 22. P. 3067–3074. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485

Physicochemical Properties of Photoconvertible Fluorescent Protein from *Montastraea cavernosa*

A. Yu. Frolova*, **, A. A. Pakhomov*, **, #, and V. I. Martynov*

#Phone: +7 (495) 336-51-11; e-mail: alpah@mail.ru

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

***Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, ul. Vavilova 28, Moscow, 119334 Russia*

Among the wide variety of currently known fluorescent probes, photoconvertible fluorescent proteins (PCFP) that capable to irreversibly change their position of the maximum of fluorescence emission under specific light irradiation, are of special interest. We studied the main physicochemical properties of PCFP isolated from *Montastraea cavernosa* (mcavGR). It was shown that mcavGR has high brightness and contrast of photoconversion, comparable with the best homologous PCFPs, such as Kaede, dendFP, Dendra2, EosFP, etc., and at the same time has significant photostability.

Keywords: chromophore, photoconversion, fluorerscent protein, mcavGR, mcavRFP, dendFP, Dendra2

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 144–152

УДК 577.112.6:615.015.11

ВЛИЯНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ПЕПТИДА HLDF-6 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ ЛИНИЙ Balb/c И C57Bl/6

© 2021 г. Г. И. Ковалев*, #, Е. В. Васильева*, Р. М. Салимов*, Ю. А. Золотарев, А. К. Дадаян**, А. П. Богачук***, В. М. Липкин*****

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

***ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 123182 Москва, пл. акад. Курчатова, 2*

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

Поступила в редакцию 06.05.2020 г.
После доработки 21.05.2020 г.
Принята к публикации 23.05.2020 г.

Проведен сравнительный анализ психотропной активности пептида HDLF-6 в кислотной (TGENHR) и амидной (HLDF-6-амид, TGENHR-NH_2) формах с использованием метода оценки поведения мышей аутбредных линий Balb/c (обладающей исходным дефицитом ориентировочно-исследовательской активности) и C57Bl/6 (линия сравнения) в тесте "закрытый крестообразный лабиринт" (ЗКЛ) при внутрибрюшинном (в дозе 100 мкг/кг в сутки, пятикратно) и интраназальном (в ежедневных дозах 30, 100 и 300 мкг/кг в сутки) введении в течение 5 суток. Введение амидной защиты по *С*-концу пептида HDLF-6 приводило к развитию селективного ноотропного эффекта у HLDF-6-амида (но не у HLDF-6) у мышей линии Balb/c как при интраназальном, так и при внутрибрюшинном применении пептида. Напротив, у мышей C57Bl/6 этот эффект не воспроизводился. При этом двигательная активность и уровень тревожности не изменялись у мышей этих генетических линий при использовании обеих форм пептида. На основании результатов поведенческих экспериментов в ЗКЛ сделан вывод о наличии у пептида HLDF-6-амида избирательного фармакологического эффекта, проявляющегося в повышении исследовательской активности только у животных с исходным когнитивным дефицитом, что является характерным для ноотропных препаратов. С помощью радиорецепторного анализа впервые установлено, что у пептида HLDF-6 и его производных обнаруживается общая мишень для высокоаффинного специфического связывания на мембранных препаратах головного мозга крыс. Таким образом, представляется перспективной дальнейшая разработка на основе пептида HLDF-6-амида оригинального ноотропного препарата для интраназального применения.

Ключевые слова: пептид HLDF-6, ноотропная активность, эффективность исследовательского поведения, закрытый крестообразный лабиринт, радиорецепторный анализ

DOI: 10.31857/S0132342321010115

ВВЕДЕНИЕ

Ранее из клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека был выделен новый фактор дифференцировки лейкоцитов (HLDF), который является гликозилированным белком, содержащим 54 а.о. В составе фактора HLDF был идентифицирован шестичленный фрагмент HLDF-6 ($_{41}$TGENHR$_{46}$), полностью воспроизводящий дифференцирующую активность полноразмерного белка [1, 2]. Были определены уровни белкового фактора HLDF в отделах мозга и показано положительное влияние гексапептида HLDF-6 на биосинтез *de novo* ДНК и белка в гомогенизатах мозга [3]. В условиях бета-амилоидной токсичности пептид HLDF-6 проявляет антиапоптотическую активность на первичных культурах нейронов мозжечка и гиппокампа. Показано, что нейропротекторный пептид HLDF-6 в дозах 1–50 мкг/кг предотвращает нейродегенерацию в гиппокампе, а также потерю долговременной памяти и снижение ориентировочно-исследовательской активности у крыс на экспериментальной модели болезни Альцгеймера [4]. Установлено, что пептид HLDF-6 обладает антиишемическим эффектом на модели хронической церебральной

Сокращения: HLDF – фактор дифференцировки лейкоцитов; HLDF-6 – пептидный фрагмент $_{41}$TGENHR$_{46}$ фактора HLDF; HLDF-6-амид – амидная форма пептида HLDF-6; ЗКЛ – закрытый крестообразный лабиринт.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 601-20-51; факс: +7 (495) 601-20-51; эл. почта: kovalev@academpharm.ru).

ишемии, обеспечивая как защиту нейронов, так и восстановление когнитивных способностей животных в поведенческих тестах [5]. Ранее было показано, что замещение в пептиде HLDF-6 *C*-концевой карбоксильной группы на амидную повышает протеолитическую стабильность модифицированного пептида HLDF-6-амида в плазме крови крыс [6]. Также на токсических моделях болезни Альцгеймера было показано, что пептид HLDF-6-амид обладает более высокой ноотропной и нейропротекторной активностью по сравнению с пептидом HLDF-6, не содержащим амидной защиты [7]. Установлено, что фармакологические эффекты пептида HLDF-6-амида реализуются с участием NMDA-глутаматергической системы гиппокампа [8].

Известно, что ноотропная активность препаратов наиболее специфично проявляется в условиях создания когнитивного дефицита [9]. Один из оптимальных способов его моделирования – применение неинвазивных методов оценки дефицита исследовательского поведения в ранее незнакомой обстановке, в частности метода "закрытый крестообразный лабиринт" (ЗКЛ) [10]. Другая существенная особенность препаратов с ноотропной активностью – их способность проявлять специфическую фармакологическую активность после неоднократного системного введения [11, 12]. Для моделирования сниженной эффективности исследовательского поведения в ЗКЛ были использованы мыши инбредной линии Balb/c, обладающие исходным дефицитом исследовательской активности; в качестве линии сравнения использовали мышей линии C57Bl/6 [10].

Целью данного исследования стал сравнительный анализ ноотропной активности пептида HDLF-6 в кислотной (TGENHR) и амидной (пептид HLDF-6-амид, TGENHR-NH_2) формах с применением неинвазивного поведенческого теста "закрытый крестообразный лабиринт" для оценки способности к пространственной ориентации без предварительного обучения, уровня тревожности и двигательной активности, а также поиск предполагаемых мест специфического связывания этого гексапептида.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное изучение влияния пептидов HLDF-6 и HLDF-6-амида на поведение мышей линий Balb/c и C57Bl/6 в тесте ЗКЛ. Ранее установлено, что специфическое действие ноотропных препаратов проявляется преимущественно в условиях когнитивного дефицита и сниженной восстановительной способности мозга [9, 13]. Предполагаемое воздействие на когнитивное поведение изучали в неинвазивном тесте ЗКЛ на мышах. Данный тест основан на использовании врожденных индивидуальных способностей животных по пространственной ориентации в новой обстановке без предшествующего обучения, что принципиально отличает его от методов условного рефлекса пассивного избегания и условного рефлекса активного избегания, в основе которых лежит предварительное обучение. Тест способен выявлять воздействие психотропных препаратов на когнитивную активность, тревожность, вызванную новизной обстановки, а также на двигательную активность. Для сравнительного анализа ноотропной активности пептидов HLDF-6 и HLDF-6-амида были использованы инбредные мыши линий Balb/c и C57Bl/6, различающиеся как по эффективности исследовательского поведения в лабиринте, так и по уровню тревожности и двигательной активности [10]. Инбредные мыши Balb/c служили моделью для оценки состояния когнитивного дефицита и повышенной тревожности, а мыши линии C57Bl/6 – в качестве линии сравнения.

Внутрибрюшинное введение пептидов. Пептиды HLDF-6 и HLDF-6-амид вводили внутрибрюшинно в ежедневной дозе 100 мкг/кг в течение 5 суток. Последнее введение осуществляли за 30 мин до поведенческой сессии. Избирательный фармакологический эффект, связанный с ноотропной активностью пептидов, оценивали по двум параметрам эффективности ориентировочно-исследовательского поведения – "длина первого цикла патрулирования", отражающей количество заходов, затрачиваемых на первый полный обход всех четырех боковых отсеков лабиринта, и "число циклов патрулирования" – количеству полных обходов тупиков за сессию [14].

Результаты компьютерной обработки исследовательской активности животных представлены на рис. 1*а*, 1*б*. Из них следует, что плацебо-группа линии Balb/c (белые столбцы) уступает плацебо-группе линии C57Bl/6 (сплошные серые столбцы) по ряду поведенческих актов: мыши линии C57Bl/6 превосходят животных Balb/c по параметру "длина первого цикла патрулирования" (F_PtrN) на 14% ($p < 0.05$), а по параметру "число циклов патрулирования" (PtrN) – на 11% ($p < 0.05$).

У мышей опытной группы C57Bl/6 после субхронического внутрибрюшинного введения пептида HLDF-6-амид в ежедневной дозе 100 мкг/кг в течение 5 суток оба показателя эффективности исследовательского поведения не отличаются от значений в контроле, тогда как у мышей линии Balb/c наблюдается повышение эффективности исследовательского поведения до значений, характерных для соответствующих групп линии C57Bl/6 (рис. 1*а*).

После введения по аналогичному протоколу пептида HLDF-6 (рис. 1*б*) значимых изменений эффективности исследовательского поведения не отмечено ни у мышей Balb/c, ни у мышей C57Bl/6. Таким образом, субхроническое внутрибрюшин-

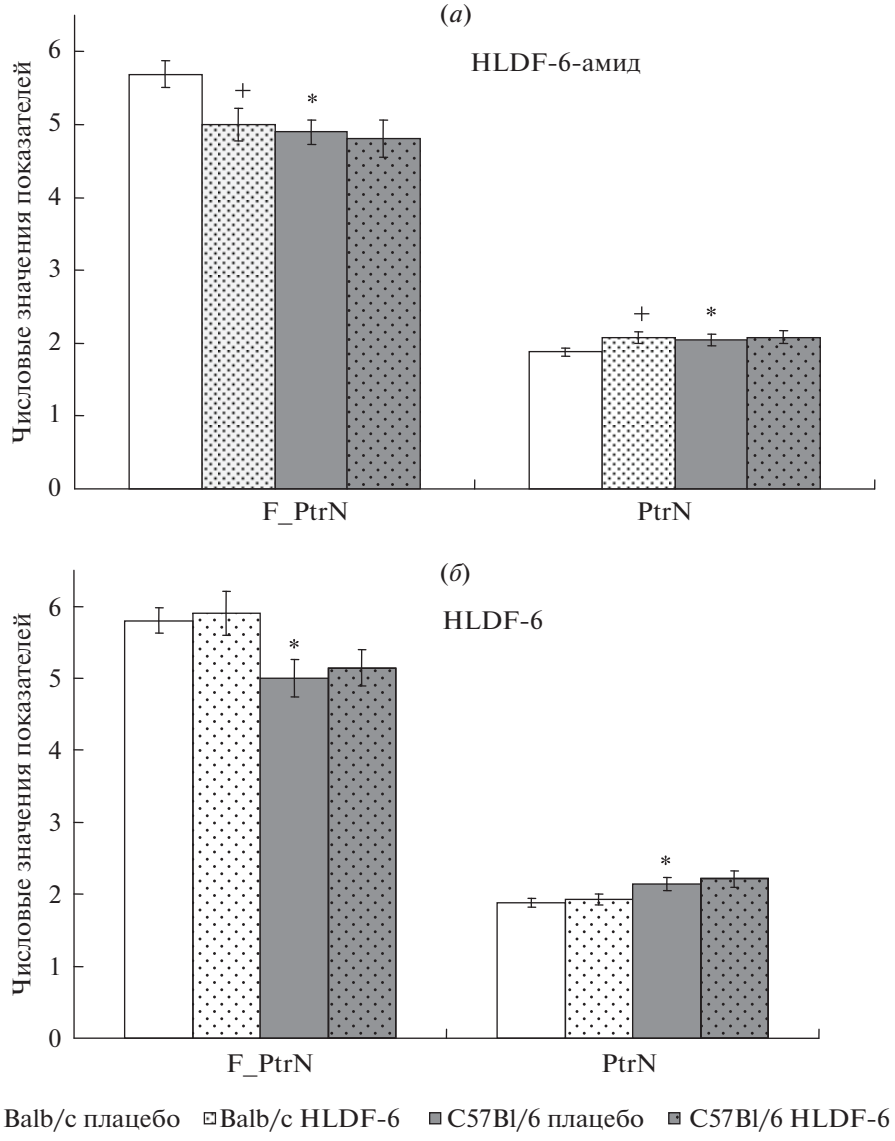


Рис. 1. Влияние субхронического внутрибрюшинного введения пептидов HLDF-6-амида (*а*) и HLDF-6 (*б*) в дозе 100 мкг/кг в сутки на эффективность исследовательской активности мышей линий Balb/c и C57Bl/6 в тесте "закрытый крестообразный лабиринт". Обозначения: * – статистически значимые отличия от мышей Balb/c по *t*-критерию Стьюдента; + – статистически значимые отличия от контроля по *U*-критерию Манна–Уитни; F_PtrN – длина первого цикла патрулирования; PtrN – число циклов патрулирования; F_ChTm – латентное время до 1-го захода в боковой отсек; F_GITm – время пребывания в первом боковом отсеке; T_ChTm – общее время пребывания животного в центральном отсеке лабиринта; T_GlTm – общее время, проведенное в боковых отсеках.

ное введение пептида HLDF-6 в дозе 100 мкг/кг в сутки оказывается неэффективным в отношении показателей исследовательского поведения, соответствующих ноотропной активности, присущей амидной форме пептида (рис. 1*а*).

На рис. 2 представлены результаты сравнительного анализа влияния пептидов на двигательную активность и уровень тревожности у двух линий мышей. Из них следует, что по исходному показателю тревожности – "латентное время до 1-го захода в боковой отсек" (F_ChTm) – мыши плацебо-группы линии Balb/c (белые столбцы) вдвое превосходят мышей плацебо-группы линии C57Bl/6 (сплошные серые столбцы). Субхроническое введение как пептида HLDF-6, так и HLDF-6-амида к существенным сдвигам в этих элементах поведения не приводит, т.е. анксиолитическая активность обоих пептидов не развивается. Этот результат согласуется с данными, полученными ранее в тесте "открытое поле", по которым анксиолитический эффект пептида HLDF-6-амида развивался не ранее трех недель внутрибрюшинного введения [8]. Можно предположить, что ноотроп-

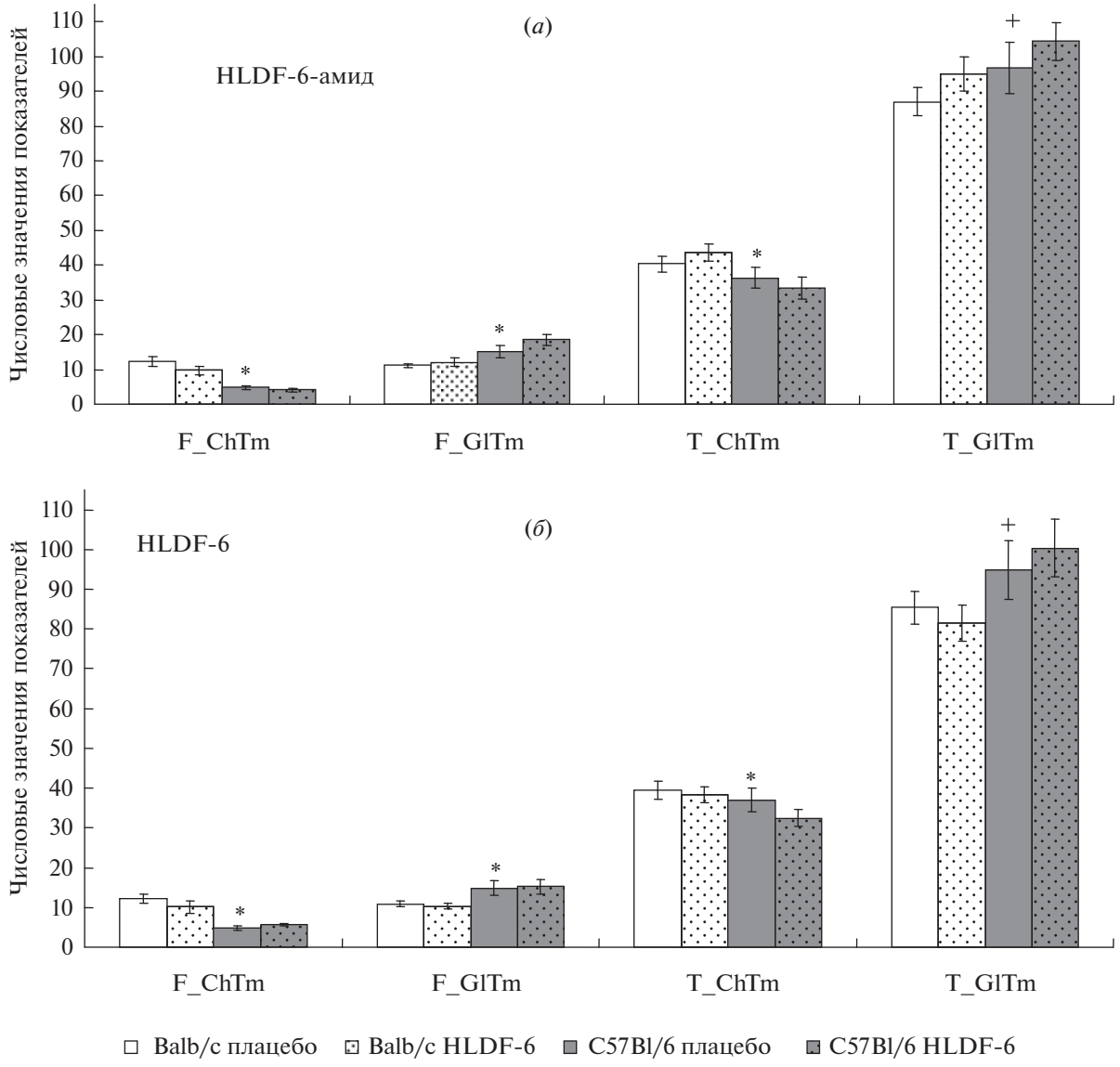


Рис. 2. Влияние субхронического внутрибрюшинного введения пептидов HLDF-6-амида (*а*) и HLDF-6 (*б*) в дозе 100 мкг/кг в сутки на уровень тревожности и двигательную активность мышей линий Balb/c и C57Bl/6 в тесте "закрытый крестообразный лабиринт". Обозначения: *, + – статистически значимые отличия от мышей BALB/c по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна–Уитни соответственно; F_PtrN – длина первого цикла патрулирования; PtrN – число циклов патрулирования; F_ChTm – латентное время до 1-го захода в боковой отсек; F_GITm – время пребывания в первом боковом отсеке; T_ChTm – общее время пребывания животного в центральном отсеке лабиринта; T_GlTm – общее время, проведенное в боковых отсеках.

ный эффект пептида HLDF-6-амид проявляется значительно быстрее анксиолитического.

Кроме того, приведенные на рис. 2 данные свидетельствуют о том, что при 5-кратном введении обеих форм пептида HLDF-6 в дозе 100 мкг/кг в сутки изменений двигательной активности у мышей обеих линий не наблюдается.

Сравнительный анализ влияния пептидов HLDF-6-амида и HLDF-6 на ряд показателей поведения мышей инбредных линий Balb/c и C57Bl/6, исходно различающихся по эффективности исследовательского поведения и уровню тревожности, свидетельствует о том, что пептид HLDF-6-амид избирательно улучшает когнитивное поведение мышей линии Balb/c с исходным дефицитом исследовательской активности, не изменяя поведения мышей линии сравнения C57Bl/6. Селективность относительно когнитивного дефицита присуща и традиционным ноотропам – пирацетаму [11], фенотропилу [15], пантогаму [12], используемым в более высоких дозах (50–200 мг/кг), а также пептидным препаратам семаксу и ноопепту в дозах 0.6 и 1.0 мг/кг соответственно [16, 17].

Таблица 1. Влияние субхронического интраназального введения пептида HLDF-6-амида на исследовательское поведение мышей в тесте "закрытый крестообразный лабиринт"

Линия мышей	Группы (мкг/кг в сутки)	Длина первого цикла патрулирования, число заходов (F_PtrN)	Число циклов патрулирования (PtrN)
Balb/c	Плацебо (физ. раствор)	6.18 ± 1.32	1.72 ± 0.66
	HLDF-6-амид (30)	6.33 ± 2.61	1.60 ± 0.69
	HLDF-6-амид (100)	5.83 ± 1.95	1.91 ± 0.67
	HLDF-6-амид (300)	5.24 ± 1.12*	2.00 ± 0.53*
C57Bl/6	Плацебо (физ. раствор)	5.45 ± 1.30#	1.98 ± 0.49
	HLDF-6-амид (30)	5.84 ± 0.8	2.14 ± 0.55
	HLDF-6-амид (100)	5.58 ± 1.24	2.00 ± 0.58
	HLDF-6-амид (300)	5.77 ± 2.01	2.01 ± 0.48

***** Статистически значимые отличия от внутрилинейного контроля по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).
# Статистически значимые межлинейные отличия в контроле по *t*-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$).
Данные представлены в виде $m \pm$ S.E.M.

Таблица 2. Влияние субхронического интраназального введения пептида HLDF-6 на исследовательское поведение мышей в тесте "закрытый крестообразный лабиринт"

Линия мышей	Группы (мкг/кг в сутки)	Длина первого цикла патрулирования (F_PtrN)	Число циклов патрулирования (PtrN)
Balb/c	Плацебо (физ. раствор)	6.18 ± 2.32	1.72 ± 0.66
	HLDF-6 (30)	5.97 ± 2.10	1.67 ± 0.64
	HLDF-6 (100)	6.08 ± 1.67	1.62 ± 0.65
	HLDF-6 (300)	5.34 ± 1.33*	1.81 ± 0.47
C57Bl/6	Плацебо (физ. раствор)	5.45 ± 1.30#	1.98 ± 0.49
	HLDF-6 (30)	5.91 ± 1.31	2.15 ± 0.38
	HLDF-6 (100)	6.08 ± 1.98	2.00 ± 0.71
	HLDF-6 (300)	5.64 ± 1.12	2.08 ± 0.51

* Статистически значимые отличия от внутрилинейного контроля по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0.05$).
# Статистически значимые межлинейные отличия в контроле по *t*-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$).
Данные представлены в виде $m \pm$ S.E.M.

Не содержащий амидной защиты пептид HLDF-6 при субхроническом внутрибрюшинном введении в дозе 100 мкг/кг в сутки оказался неактивным и не улучшал когнитивный компонент поведения в условиях данного эксперимента.

Интраназальное введение пептидов. Вторая часть исследования выполнена с применением интраназального введения пептидов как адекватного пути введения препаратов пептидной природы, позволяющего исключить пресистемный метаболизм в желудочно-кишечном тракте и печени, вследствие чего ускоряется достижение терапевтического эффекта. Пептиды HLDF-6-амид и HLDF-6 в дозах 30, 100 и 300 мкг/кг в сутки или физиологический раствор вводили мышам линий Balb/c и C57Bl/6 в течение 5 суток.

Результаты компьютерной обработки исследовательской поведенческой активности мышей обеих линий представлены в табл. 1 и 2. Показано, что мыши линии Balb/c плацебо-группы уступают мышам линии C57Bl/6 из соответствующей группы в эффективности исследовательского поведения в незнакомой обстановке – длина первого цикла патрулирования (F_PtrN) у мышей линии Balb/c была на 13% больше, чем у C57Bl/6 ($p < 0.05$).

Субхроническое 5-кратное введение пептида HLDF-6-амида в ежедневной дозе 30 мкг/кг не оказывало положительного эффекта. При введении в дозе 100 мкг/кг в сутки проявлялась выраженная тенденция к улучшению ($p = 0.058$), тогда как в дозе 300 мкг/кг в сутки улучшение наступало сразу по двум параметрам исследовательского поведения: длина первого цикла (F_PtrN) сокращалась на 15%, а общее число полных циклов (PtrN) увеличивалось на 16%. Напротив, у мышей линии сравнения C57Bl/6 аналогичное введение пептида HLDF-6-амида не оказывало достоверного влияния на эффективность исследовательского поведения ни в одной из доз (табл. 1).

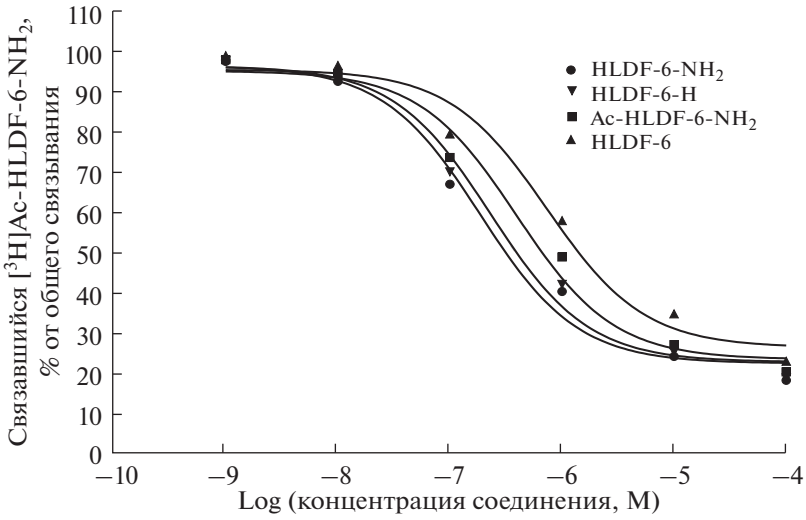


Рис. 3. Кривые конкуренции пептида HLDF-6 и его производных HLDF-6-NH_2, HLDF-6-H и Ac-HLDF-6-NH_2 за места специфического связывания [^{3}H]Ac-HLDF-6-NH_2 с мембранами головного мозга крыс Вистар.

Как и в случае с HLDF-6-амидом, изменений в исследовательском поведении у мышей линии сравнения C57Bl/6 в результате 5-кратного интраназального введения пептида HLDF-6 не отмечено. У мышей линии Balb/c, обнаруживающей когнитивный дефицит, после интраназального введения пептида HLDF-6 в дозе 300 мкг/кг в сутки эффективность исследовательского поведения улучшалась лишь по одному параметру – снижалась длина первого цикла патрулирования (F_PtrN) (табл. 2).

Ранее на примере пептидов семакса и ноопепта нами было показано, что выраженное ноотропное действие пептидных препаратов при интраназальном введении мышам Balb/c может означать, что при экстранейрональном пути поступления пептиды через обонятельный эпителий попадают в большей степени в области мозга, связанные с процессами памяти и обучения, тогда как при внутрибрюшинном введении – преимущественно в структуры мозга, ответственные за эмоциональный статус (передний мозг и лимбические области), вследствие чего преобладает анксиолитический эффект [17]. Следовательно, дальнейшая разработка ноотропного фармакологического препарата с интраназальным способом введения на основе пептида HLDF-6-амид представляется перспективной.

Радиорецепторный анализ связывания меченного тритием пептида [^{3}H]Ac-HLDF-6-NH_2 с мембранными препаратами головного мозга крыс. В проведенных ранее экспериментах исследователям не удавалось обнаружить специфического связывания пептида HLDF-6 на поверхности клеток, хотя было установлено, что даже однократные замены аминокислотных остатков в его структуре приводят к потере дифференцирующей активности [2]. В нашей работе с использованием меченного тритием пептида [^{3}H]Ac-HLDF-6-NH_2 было впервые продемонстрировано, что на мембранных препаратах, приготовленных из головного мозга самцов крыс Вистар, имеются места высокоаффинного специфического связывания пептида HLDF-6 и его производных (рис. 3). Показано, что величина IC_{50} для исходного пептида HLDF-6 составляет 1813 ± 0.19 нМ, тогда как у его содержащих защитные группировки производных HLDF-6-амид, HLDF-6-AA (ацетил-амидная форма пептида HLDF-6) и HLDF-6-H (TGEXHR-NH_2, где X = Hse) эта величина составляет 531 ± 0.15, 754 ± 0.18 и 574 ± 0.14 нМ соответственно. Таким образом, у пептида HLDF-6 и его производных обнаружена общая мишень специфического связывания на мембранах головного мозга крыс. Введение амидной и ацетильной защиты в пептид не только не лишило этих производных сродства к местам специфического связывания на мембранах мозга, но и привело к увеличению сродства к местам связывания [^{3}H]Ac-TGENHR-NH_2 в 3.4 и 2.4 раза соответственно. Можно предположить, что в дальнейших экспериментах специфические фармакологические эффекты, установленные для незащищенной формы пептида HLDF-6, будут подтверждены и для других исследованных форм пептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные животные. Для *in vivo* исследований использовали самцов мышей инбредных линий Balb/c (n = 160) и C57Bl/6 (n = 108), полученных из питомника лабораторных живот-

ных ФИБХ РАН “Пущино”, массой 23–25 г. Для радиолигандного анализа *in vitro* применяли мембранные препараты мозга самцов аутбредных крыс Вистар (питомник “Столбовая”, $n = 8$, масса 200–220 г), приготовленные по стандартной методике, описанной ниже.

Содержание животных соответствовало Правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96) и Правилам надлежащей лабораторной практики (утв. приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. № 199н). Мышей содержали по 8 особей в клетке, крыс – по 4 особи, всех в условиях свободного доступа к воде и корму при температуре 21°C и постоянном световом дне 14 ч (включение света в 8 ч утра). Факторы внешней среды (температура, влажность, освещенность, состав подстила) соответствовали требованиям по содержанию лабораторных животных.

Изучение влияния пептидов HLDF-6-амида и HLDF-6 на поведение мышей линий Balb/c и C57Bl/6 в тесте ЗКЛ. Пептиды HLDF-6-амид и HLDF-6 в дозах 30, 100 и 300 мкг/кг (опытные группы) или физиологический раствор (плацебо-группы) вводили внутрибрюшинно (100 мкг/кг, по весу животного) или интраназально (30, 100 и 300 мкг/кг, в объеме 10 мкл) ежедневно в течение 5 суток. Количество животных в каждой группе – от 10 до 15. Для оценки исследовательского поведения животных использовали закрытый крестообразный лабиринт, который состоял из четырех прозрачных пластмассовых закрытых пустых отсеков, соединявшихся с таким же центральным отсеком с помощью входных отверстий [18]. Тупиковые отсеки размером 14 × 14 × 14 см были пронумерованы по часовой стрелке от 1 до 4. Пол лабиринта очищали влажным ватным тампоном перед каждым опытом. Мышь помещали в центральный отсек, после чего лабиринт накрывали прозрачной крышкой. Животное могло свободно перемещаться по его отделениям, а экспериментатор синхронно фиксировал номера посещаемых отделений, используя компьютерную программу, регистрирующую последовательность и продолжительность переходов. Критерием захода в отсек лабиринта считалось наличие всех четырех лап животного внутри этого помещения. Эксперимент продолжался до тех пор, пока животное не совершит 12 переходов из одного бокового отсека в другой (т.е. пока оно не совершит 13 визитов в боковые отсеки).

Последующий компьютерный анализ данных позволил выделить следующие показатели:

1) “длина первого цикла патрулирования” (F_PtrN) и “число циклов патрулирования” (PtrN), совершенных за время эксперимента. Показатель “длина первого цикла патрулирования” исчисляется числом заходов животного в боковые отсеки лабиринта до момента, когда животное побывает во всех четырех боковых отсеках лабиринта хотя бы один раз. Чем меньше число заходов в боковые отсеки при первом цикле патрулирования и чем больше выполнено циклов патрулирования, тем более упорядоченно и эффективно происходит исследование лабиринта. Эти показатели могут быть использованы для оценки ноотропного действия вещества;

2) “общее время пребывания животного в центральном отсеке лабиринта” (T_ChTm) и “общее время, проведенное в боковых отсеках” (T_GlTm) в секундах, не считая 1-го захода в боковой отсек. Эти показатели отражают уровень двигательной активности животного, а также характеризуют интенсивность обследования ими новой среды и могут быть использованы для оценки стимулирующего/тимолептического или, наоборот, седативного эффекта вещества;

3) “латентное время до 1-го захода в боковой отсек” (F_ChTm) и “время пребывания в нем” (F_GlTm). Эти показатели отражают баланс между любопытством и настороженностью животного при первом контакте с новой обстановкой. Если их величины значимо превышают, соответственно, показатели п. 2, то это может рассматриваться как признак настороженности и тревоги.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0.

Радиорецепторный анализ связывания меченного тритием пептида [^{3}H]Ac-HLDF-6-NH_2 с мембранами головного мозга крыс Вистар *in vitro*. После декапитации выделяли головной мозг, ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили в низкотемпературной морозильной камере при –80°C для последующих экспериментов в условиях *in vitro*. В день эксперимента ткань мозга измельчали в гомогенизаторе Поттера “тефлон–стекло” в 25 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ EDTA, pH 7.1). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 48000 *g*. Полученный осадок гомогенизировали в буфере и инкубировали 10 мин при 37°C, затем центрифугировали 10 мин при 48000 *g*. Осадок ресуспендировали в 5 объемах буфера и замораживали в криопробирках при –80°C.

В день анализа ткань размораживали, разбавляли в 100 объемах буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1), центрифугировали 3 раза по 10 мин при 48000 *g*. Осадок ресуспендировали в необходимом количестве буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1).

В экспериментах по радиолигандному связыванию использовали меченый тритием пептид [^{3}H]Ac-HLDF-6-NH_2 с удельной активностью 22 Кюри/ммоль. Инкубационная смесь (конечный

объем 0.5 мл) содержала 50 мкл [^{3}H]Ac-HLDF-6-NH_2, 200 или 250 мкл буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1) и 200 мкл белковой суспензии мембран, для неспецифического связывания добавляли 50 мкл немеченого пептида (HLDF-6-AA). Реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 30 мин. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолоконные фильтры GF/C (Whatman, Великобритания), предварительно выдержанные в течение 2 ч в 0.3%-ном полиэтиленимине при 4°C. Каждую пробирку промывали 2 раза холодным буфером (50 мМ Tris-HCl, pH 7.1), затем фильтры промывали 2 раза тем же объемом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы, содержавшие по 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г PPO, 0.2 г POPOP на 1 л толуола). Определение радиоактивности проб осуществляли на сцинтилляционном счетчике Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer, США) с эффективностью счета 42–46%. Результаты измерений по радиорецепторному связыванию проводили с помощью программы GraphPad Prism 4.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при частичной поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 14N08.11.0002) и программ Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине” за 2012–2014 гг.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации [19], а также рекомендациям, изложенным в “Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств” [20], и в соответствии с международными требованиями по правилам GLP FDA и GLP OECD на лабораторных животных (экспериментальных биомоделях) SPF-статуса (свободные от патогенной флоры). Мышей SPF-статуса получали из Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, имеющего международную аккредитацию AAALAC. Система управления качеством производства лабораторных животных в Питомнике сертифицирована на соответствие международным требованиям ИСО 9001:2008. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M.* // FEBS Letters. 1994. V. 356. P. 327–329. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01306-3
2. *Костанян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницина С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М.* // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С. 505–511. [*Kostanyan I.A., Astapova M.V., Navolotskaya E.V., Lepikhova T.N., Dranitsyna S.M., Telegin G.B., Rodionov I.L., Baidakova L.K., Zolotarev Yu.A., Molotkovskaya I.M., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2000. V. 26. P. 505–511.] https://doi.org/10.1007/BF02758614
3. *Sewell R.D., Gruden M.A., Pache D.M., Storogeva Z.I., Kostanyan I.A., Proshin A.T., Yurasov V.V., Sherstnev V.V.* // J. Psychopharmacol. 2005. V. 19. P. 602–608. https://doi.org/10.1177/0269881105056645
4. *Костанян И.А., Жохов С.С., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Сурина Е.А., Бабиченко И.И., Шерстнев В.В., Липкин В.М.* // Биоорг. химия. 2006. Т. 32. С. 399–407. [*Kostanyan I.A., Zhokhov S.S., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Surina E.A., Babichenko I.I., Sherstnev V.V., Lipkin V.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2006. V. 32. P. 360–367.] https://doi.org/10.1134/S1068162006040066
5. *Костанян И.А., Сторожева З.И., Семенова Н.А., Липкин В.М.* // Доклады Академии наук. 2009. Т. 428. С. 565–569. [*Kostanyan I.A., Storozheva Z.I., Semenova N.A., Lipkin V.M.* // Doklady Biol. Sci. 2009. V. 428. P. 418–422.] https://doi.org/10.1134/S0012496609050081
6. *Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Кост Н.В., Воеводина М.Э., Соколов О.Ю., Козик В.С., Шрам С.И., Азев В.Н., Бочаров Э.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф.* // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. С. 644–656. [*Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Kozik V.S., Shram S.I., Bocharov E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 578–589.] https://doi.org/10.1134/S1068162015060205
7. *Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A., Lipkin V.M.* // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30. P. 78–92. https://doi.org/10.1177/0269881115616393
8. *Zolotarev Yu.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M., Myasoedov N.F.* // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30. P. 922–935. https://doi.org/10.1177/0269881116660705
9. *Ковалев Г.И., Фирстова Ю.Ю.* // Клиническая фармакология и терапия. 2010. Т. 19. С. 72–73.
10. *Ковалев Г.И., Васильева Е.В., Салимов Р.М.* // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2019. Т. 69. С. 123–130. https://doi.org/10.1134/S0044467719010064
11. *Ковалев Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г.* // Экспер. и клин. фармакол. 2014. Т. 77. С. 49–55.

12. *Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Ковалев Г.И., Незнамов Г.Г.* // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2015. № 1. С. 44–51.
13. *Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалев Г.И.* // Эксперим. и клин. фармакол. 2012. Т. 75 С. 32–37.
14. *Salimov R.M.* // Alcohol. 1999. V. 17. P. 157–162.
15. *Фирстова Ю.Ю., Абаимов Д.А., Капица И.Г., Воронина Т.А., Ковалев Г.И.* // Нейрохимия. 2011. Т. 28. С. 130–141.
16. *Ковалев Г.И., Фирстова Ю.Ю., Салимов Р.М., Кондрахин Е.А.* // Психиатрия. 2010. Т. 3. С. 23–27.
17. *Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалев Г.И.* // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016. № 2. С. 31–36.
18. *Салимов Р.М.* // Журнал высшей нервной деятельности. 1988. Т. 38. С. 569–571.
19. Национальный стандарт Российской Федерации, ГОСТ Р 53434 – (2009).
20. *Миронов А.Н. Бунятян Н.Д., Васильев А.Н.* // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. 944 с.

Influence of Sub-Chronic Peptide HLDF-6 Administration on the Exproratory Behavior of Inbred Mice Balb/c and C57Bl/6 Strains

G. I. Kovalev*,#, E. V. Vasileva*, R. M. Salimov*, Yu. A. Zolotarev, A. K. Dadayan**, A. P. Bogachouk***, and V. M. Lipkin*****

#Phone: +7 (495) 601-20-51; fax: +7 (495) 601-20-51; e-mail: kovalev@academpharm.ru

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

***Institute of Molecular Genetics, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia*

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

A comparative analysis of the psychotropic activity of the HDLF-6 peptide in acidic (TGENHR) and amide forms (HLDF-6-amide, TGENHR-NH_2) was carried out using the method for assessing the behavior on 2 inbred mice strains Balb/c (with initial deficiency of exploratory efficacy) and C57Bl/6 (as reference) in the "closed cross-maze"-test (CCM) using sub-chronic intraperitoneal (100 μg/kg, daily) and intranasal administration at daily doses 30, 100 and 300 μg/kg. It was shown that the introduction of amide protection at the *C*-terminus of the HDLF-6 peptide reveals the selective nootropic effect of HLDF-6-amide (but not HLDF-6) in Balb/c population after both intranasal and intraperitoneal routs of the peptides administrations. On the contrary, in the group of C57Bl/6 mice this effect was not reproduced. The locomotor activity and the anxiety level did not change in these strains after injections of both forms of the peptide. Based on the results of behavioral experiments in CCM-test, it was concluded that the HLDF-6-amide peptide has a selective pharmacological effect, which manifests itself in an increase in exploratory activity only in animals with initial cognitive deficit, which is characteristic of nootropic drugs. Using radioreceptor analysis, it was for the first time established that the peptide HLDF-6 and its derivatives showed a common target of specific high affinity binding on the rat cerebral membranes. Thus, it seems promising to further develop, based on the HLDF-6-amide peptide, an original nootropic drug for intranasal use.

Keywords: HLDF-6 peptide, nootropic activity, the effectiveness of exploratory behavior, closed cross maze, radioreceptor analysis

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 153–161

УДК 577.152.1:543.067

ГАЛЛОЦИАНИН КАК ФЛУОРОГЕН ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ NADPH-ЗАВИСИМОЙ ПРОДУКЦИИ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА КЛЕТКАМИ КРОВИ

© 2021 г. О. М. Панасенко*, #, В. Е. Реут, И. В. Бородина*, Д. С. Матюшкина*, В. А. Иванов*, Д. В. Григорьева**, И. В. Горудко**, А. В. Соколов*, ***, С. Н. Черенкевич****

**ФГБУ "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины" ФМБА России, Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а*

***Белорусский государственный университет, Беларусь, 220030 Минск, просп. Независимости, 4*

****Институт экспериментальной медицины, Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12*

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.
После доработки 18.04.2020 г.
Принята к публикации 21.04.2020 г.

Методами спектрофотометрии, масс-спектрометрии и спектрофлуориметрии исследовано взаимодействие красителя оксазинового ряда галлоцианина с активными формами кислорода $\left(^{\bullet}O_2^-,\ H_2O_2\right)$ и галогенов (HOCl). Показано, что галлоцианин реагирует с HOCl и $^{\bullet}O_2^-$ (но не с H_2O_2) с образованием флуоресцирующих продуктов. С использованием ингибиторного анализа установлено, что как в системе ксантин/ксантиноксидаза, так и в присутствии активированных нейтрофилов крови человека основной вклад в превращение галлоцианина во флуорофор вносит его реакция с $^{\bullet}O_2^-$. Полученные результаты позволяют заключить, что галлоцианин может выполнять роль флуорогенного хемосенсора и использоваться для оценки активации нейтрофилов, NADPH-зависимой продукции супероксидного анион-радикала нейтрофилами и другими клетками крови, а также для тестирования антиоксидантных препаратов, разрабатываемых с целью коррекции заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом.

Ключевые слова: галлоцианин, активные формы кислорода, активные формы галогенов, окислительный стресс, супероксидный анион-радикал, хлорноватистая кислота, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342321010176

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы представляют собой самый многочисленный подвид гранулоцитарных лейкоцитов (до ~70%) крови человека, играющий ключевую роль в реализации клеточного звена врожденного иммунитета во многом благодаря продукции активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ). Эти соединения не только играют роль медиаторов важных внутриклеточных и межклеточных редокс-чувствительных сигнальных путей, таких как ионная проницаемость, апоптоз, нетоз и рецепторные взаимодействия, но и, будучи высокореакционными, уничтожают патогены (бактерии, вирусы, грибы и др.), выполняя антимикробную функцию [1]. За продукцию АФК и АФГ в нейтрофилах отвечают главным образом ферменты: NADPH-оксидаза (КФ 1.6.3.1), супероксиддисмутаза (SOD, КФ 1.15.1.1) и миелопероксидаза (MPO, КФ 1.11.2.2). Активация нейтрофилов в ответ на провоспалительный стимул сопровождается сборкой NADPH-оксидазного комплекса, который катализирует реакцию восстановления молекулярного кислорода (O_2) до супероксидного анион-радикала $\left(^{\bullet}O_2^-\right)$ [2]:

$$NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + 2^{\bullet}O_2^- + H^+. \qquad (1)$$

В результате дисмутации $^{\bullet}O_2^-$ (спонтанной или катализируемой SOD) образуется пероксид водорода (H_2O_2):

$$2^{\bullet}O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2, \qquad (2)$$

являющийся субстратом фермента азурофильных гранул нейтрофилов – MPO [1, 3]. MPO в организ-

Сокращения: 4-АВАН – гидразид 4-аминобензойной кислоты; CP – церулоплазмин; fMLP – *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин; MPO – миелопероксидаза; PMA – форбол-12-миристат-13-ацетат; SOD – супероксиддисмутаза; АФГ – активные формы галогенов; АФК – активные формы кислорода; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 246-44-90; эл. почта: o-panas@mail.ru).

ме человека катализирует главным образом окисление хлорида до хлорноватистой кислоты (HOCl):

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O.$$

АФК и особенно АФГ (включая HOCl), образующиеся при активации нейтрофилов и обладающие повышенной реакционной способностью, реагируют со многими биологически важными молекулами (нуклеиновыми кислотами, белками, липидами, антиоксидантами и др.), повреждают клетки и ткани организма, вызывая окислительный/галогенирующий стресс, провоцирующий развитие воспалительных заболеваний: сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, онкологических и др. [3–5]. Становится понятно, насколько важно контролировать и оценивать активность ферментов, ответственных за образование АФК и АФГ. Очевидно, что регистрация продукции клетками АФК/АФГ дает возможность разработки новых методов и подходов, направленных на профилактику, диагностику и мониторинг эффективности терапии заболеваний, ассоциированных с окислительным/галогенирующим стрессом. Среди методов, используемых для обнаружения АФК и АФГ (масс-спектрометрия в сочетании с различными вариантами хроматографии, иммуноферментный анализ, хемилюминесценция, спиновые ловушки и др.), флуоресцентный анализ отличается высокой чувствительностью и доступностью [6–8].

В последнее время предложено большое количество низкомолекулярных флуорогенных зондов, позволяющих в том числе в режиме реального времени регистрировать продукцию различных АФК и АФГ как внутри, так и вне клетки: 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат, дигидродамин 123, 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин (Amplex Red), аминофенилфлуоресцеин (2-[6-(4'-амино)фенокси-3*H*-ксантен-3-он-9-ил]бензойная кислота) и др. [6–11]. Однако указанные зонды не всегда являются достаточно чувствительными и специфичными при анализе тех или иных АФК/АФГ, зачастую их синтез весьма трудоемок, что значительно увеличивает стоимость, либо они попросту неудобны в анализе (плохая растворимость в воде, недостаточная стабильность и т.п.). Например, упомянутые 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат, дигидродамин 123 и аминофенилфлуоресцеин одинаково хорошо окисляются свободными радикалами, пероксинитритом и HOCl [6, 9]. Amplex Red, предназначенный для определения H_2O_2 в присутствии пероксидаз, легко окисляется под действием АФГ. Более того, такие восстановители, как NADH и глутатион, могут заметно искажать результат анализа [10, 11].

Ранее нами был предложен кинетический спектрофотометрический метод для измерения галогенирующей активности MPO, основанный на обесцвечивании под действием АФГ красителя оксазинового ряда – целестинового синего B [12]. Позднее мы показали, что этот краситель с успехом может быть использован для выявления HOCl, продуцируемой активированными нейтрофилами, методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии [13].

В настоящей работе мы сосредоточили свое внимание на другом красителе оксазинового ряда – галлоцианине (4-гидрокси-7-диметиламино-1-карбоксифеноксазон-3 хлорид). Он – структурный аналог целестинового синего B, но отличается большей фотостабильностью, относительно хорошей растворимостью в фосфатно-солевом буфере и легко синтезируется с выходом, близким к количественному. Благодаря в том числе этим свойствам, галлоцианин уже более полувека используется при гистологическом анализе для окраски ядер [14] и количественного определения нуклеиновых кислот [15]. Нами было исследовано взаимодействие галлоцианина с основными АФК ($^{\bullet}O_2^-$, H_2O_2) и АФГ (HOCl) с целью использования красителя для выявления продукции этих соединений активированными нейтрофилами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие галлоцианина с $^{\bullet}O_2^-$. Известно, что диоксид калия (KO_2) в водной среде гидролизуется с образованием короткоживущего супероксидного анион-радикала:

$$KO_2 + H_2O \rightarrow H^+ + KOH + {}^{\bullet}O_2^-, \qquad (3)$$

который быстро дисмутирует до пероксида водорода по реакции (2). Суммарное уравнение реакции выглядит так:

$$2KO_2 + 2H_2O \rightarrow 2KOH + H_2O_2 + O_2. \qquad (4)$$

Для исследования взаимодействия галлоцианина с $^{\bullet}O_2^-$ к раствору галлоцианина добавляли навеску сухого KO_2, перемешивали и регистрировали спектры поглощения в видимой области (400–750 нм). Результаты измерения приведены на рис. 1. Видно, что раствор галлоцианина имеет максимум поглощения при 623 нм. По мере увеличения концентрации добавленного KO_2 наблюдается снижение высоты этого пика, одновременно появляется пик поглощения с максимумом при 510 нм, увеличивается его интенсивность, при этом окраска раствора меняется с синей на бледно-фиолетовую. В совокупности это свидетельствует о расходовании галлоцианина и образовании как минимум одного продукта. В контрольных экспериментах мы показали, что добавление к галлоцианину (20 мкМ) раствора H_2O_2 (10–1000 мкМ), образующегося по реакции (4), не приводит к изменению

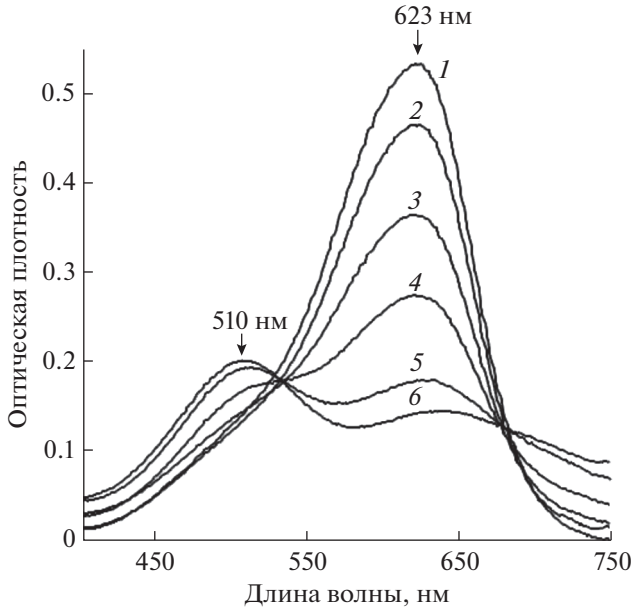


Рис. 1. Спектры поглощения галлоцианина до и после добавления к нему KO_2. Среда измерения – ФСБ-2, pH 7.4 (см. "Эксперим. часть"). Концентрация галлоцианина – 20 мкМ. Концентрация KO_2 (мМ): *1* – 0; *2* – 0.22; *3* – 0.76; *4* – 0.98; *5* – 1.31; *6* – 1.64.

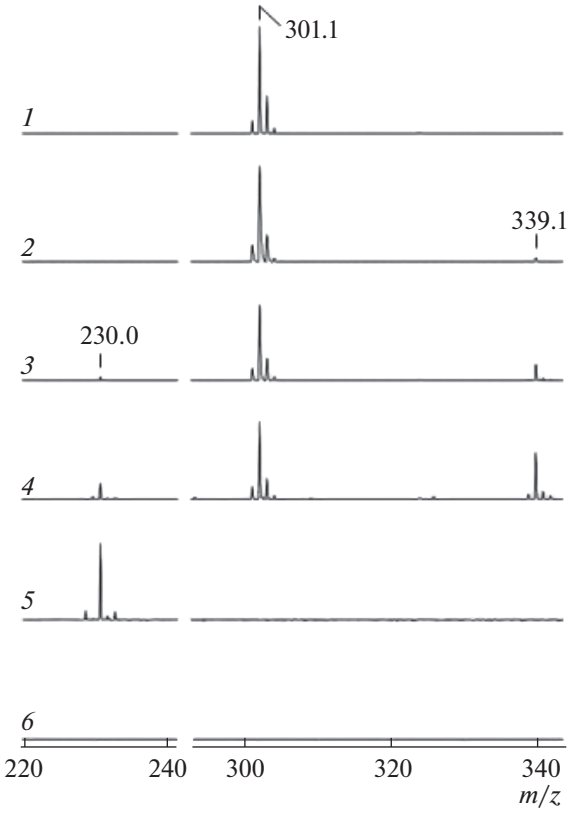


Рис. 2. Масс-спектры галлоцианина до и после добавления к нему KO_2. Среда измерения – ФСБ-2, pH 7.4 (см. "Эксперим. часть"). Концентрация галлоцианина – 80 мкМ. Концентрация KO_2 (мМ): *1* – 0; *2* – 1.14; *3* – 2.84; *4* – 5.69; *5* – 11.38; *6* – масс-спектр матрицы (2,5-дигидроксибензойной кислоты) в отсутствие галлоцианина.

спектра поглощения галлоцианина (данные не приведены). Это значит, что галлоцианин не вступает в реакцию с H_2O_2. В таком случае можно заключить, что изменение спектра поглощения галлоцианина при добавлении к нему KO_2 обусловлено его реакцией с $^{\bullet}O_2^-$, образующимся в качестве интермедиата при гидролизе KO_2 по реакции (3).

Этот факт подтверждают изображенные на рис. 2 масс-спектры галлоцианина, зарегистрированные до и после добавления к нему KO_2 в различных концентрациях. Масс-спектр галлоцианина (спектр *1* на рис. 2) представляет собой моноизотопное распределение, максимально интенсивный пик (*m/z* 301.1) соответствует массе катиона $[C_{15}H_{13}N_2O_5]^+$, состоящего из основных изотопов (^{12}C, ^{1}H, ^{14}N, ^{16}O). По мере роста концентрации KO_2 сначала появляется (спектр *2* на рис. 2), увеличивается (спектры *3* и *4*), а затем исчезает (спектр *5*) сигнал с *m/z* 339.1. Параллельно, начиная с концентрации KO_2 2.84 мМ, появляется и увеличивается сигнал с *m/z* 230.0. При концентрации KO_2 11.38 мМ (спектр *5* на рис. 2) пик от исходного галлоцианина (*m/z* 301.1) исчезает полностью и остается только сигнал с *m/z* 230.0. Такой результат можно объяснить, если предположить, что в реакции галлоцианина с KO_2 сначала образуется продукт с *m/z* 339.1, который в конце концов превращается в соединение с *m/z* 230.0. Как минимум один из продуктов является флуорофором, что подтверждают результаты, приведенные на рис. 3, из которого видно, что добавление к раствору галлоцианина KO_2 приводит к возникновению флуоресценции, которая усиливается по мере увеличения концентрации KO_2 (максимумы в спектре возбуждения в области 260–370 нм, испускания – 480–500 нм, рис. 3).

Помимо KO_2 для продукции $^{\bullet}O_2^-$ нами был использован фермент ксантиноксидаза, который в присутствии ксантина катализирует восстановление O_2 до $^{\bullet}O_2^-$ [16]. Результаты эксперимента приведены на рис. 4. Видно, что в присутствии ксантиноксидазы и ее субстрата ксантина наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции при 490 нм (возбуждение при 360 нм) (кривая *1* на рис. 4), тогда как в отсутствие ксантина ферментативная реакция не идет, и прирост интенсивности флуоресценции отсутствует (кривая *2* на рис. 4). Этот результат свидетельствует о взаимодействии синтезирующегося в ферментативной реакции $^{\bullet}O_2^-$ с галлоцианином с образованием флуорофора. Из данных, представленных на рис. 5,

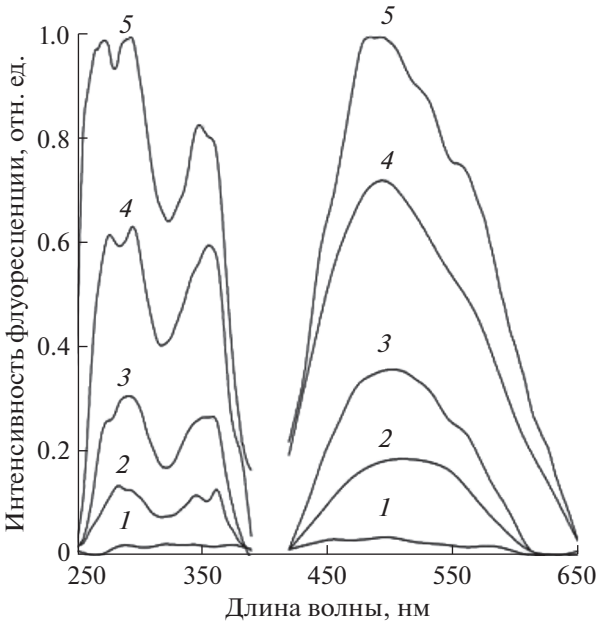


Рис. 3. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции галлоцианина до и после добавления к нему KO_2. Среда измерения – ФСБ-1, pH 7.4 (см. "Эксперим. часть"). Концентрация галлоцианина – 5 мкМ. Концентрация KO_2 (мМ): *1* – 0; *2* – 0.7; *3* – 1.6; *4* – 2.7; *5* – 4.1. Возбуждение – при 360 нм, испускание – при 490 нм.

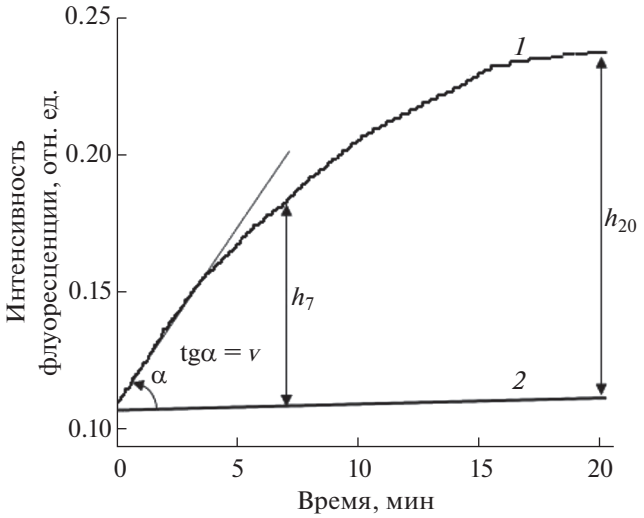


Рис. 4. Кинетика изменения интенсивности флуоресценции галлоцианина в системе ксантин/ксантиноксидаза (кривая *1*). Концентрация галлоцианина – 5 мкМ, ксантина – 1 мМ, ксантиноксидазы – 0.52 мкМ. Среда измерения – ФСБ-1, pH 7.4 (см. "Эксперим. часть"). Кривая *2* – контрольная кривая, полученная в отсутствие ксантина. Возбуждение – при 360 нм, испускание – при 490 нм. На рисунке обозначены определяемые параметры: интенсивность флуоресценции по сравнению с фоновым уровнем через 7 (h_7) или 20 (h_{20}) мин после запуска реакции и скорость химического превращения галлоцианина (v).

видно, что интенсивность флуоресценции (h_{20}) и химическая реакция галлоцианина (v) в системе ксантин/ксантиноксидаза практически полностью подавляются в присутствии SOD. Этот факт свидетельствует о решающем вкладе $^{\bullet}O_2^-$ в химические превращения красителя.

Взаимодействие галлоцианина с HOCl. На рис. 6 приведены спектры поглощения галлоцианина до и после добавления к нему HOCl в различных концентрациях. Видно, что раствор галлоцианина имеет максимум поглощения при 623 нм (спектр *1* на рис. 6*а*). Рассчитанный из этого спектра молярный коэффициент экстинкции составил $\varepsilon_{623} = 28000$ M^{-1} $см^{-1}$, что хорошо согласуется с данными литературы [17, 18]. Добавление HOCl к красителю приводило к уменьшению оптической плотности раствора при длине волны 623 нм и появлению менее интенсивной полосы поглощения с максимумом при 475 нм (рис. 6*а*), что свидетельствует об образовании продукта реакции. Из вставки на рис. 6*а* видно, что падение концентрации галлоцианина происходит пропорционально концентрации добавленной HOCl так, что коэффициент стехиометрии HOCl : галлоцианин равен ~1.5. Однако, как видно из рис. 6*б*, дальнейшее увеличение концентрации HOCl приводит к снижению оптической плотности раствора при 475 нм и появлению полосы поглощения при 416 нм. В ходе реакции сине-фиолетовая окраска исходного раствора галлоцианина сначала меняется на оранжевую, а при дальнейшем увеличении концентрации HOCl раствор обесцвечивается. Такой результат говорит о том, что HOCl реагирует с галлоцианином с образованием как минимум двух продуктов, первый из которых, имеющий полосу поглощения при 475 нм, является промежуточным и при более высоких концентрациях HOCl претерпевает превращение в продукт, поглощающий при 416 нм.

Такой вывод подтверждают и приведенные на рис. 7 масс-спектры галлоцианина, зарегистрированные до и после добавления к нему HOCl в различных концентрациях. Видно, что по мере увеличения концентрации HOCl интенсивность сигнала, соответствующего массе катиона исходного галлоцианина $[C_{15}H_{13}N_2O_5]^+$ (m/z 301.1), постепенно снижается. Параллельно появляются сигналы с m/z 328.3 и 452.0, по всей вероятности, соответствующие двум продуктам реакции HOCl с галлоцианином. Как минимум один из этих продуктов является флуорофором. Об этом свидетельствуют представленные на рис. 8 спектры возбуждения и испускания флуоресценции раствора галлоцианина после добавления к нему HOCl в различных концентрациях. Видно, что по мере возрастания концентрации добавленной к галлоцианину HOCl наблюдается увеличение интенсивно-

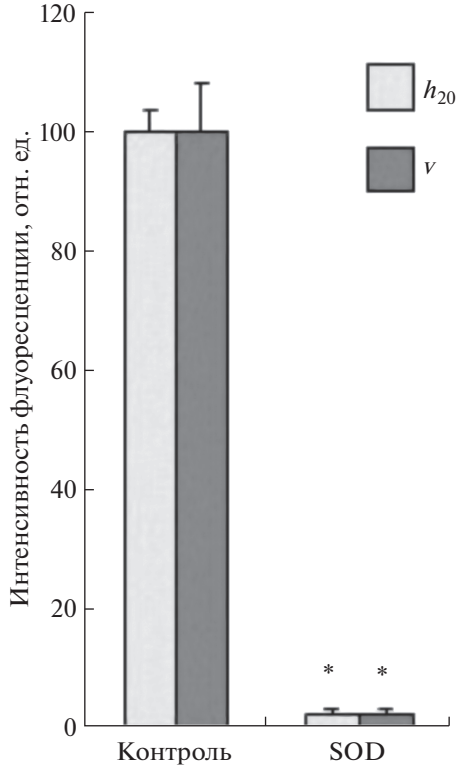


Рис. 5. Влияние SOD (1.6 мкМ) на интенсивность (h_{20}) и скорость нарастания флуоресценции (v) в системе галлоцианин + ксантин/ксантиноксидаза. Концентрация галлоцианина – 5 мкМ, ксантина – 1 мМ, ксантиноксидазы – 0.52 мкМ. Среда измерения – ФСБ-1, pH 7.4 (см. "Эксперим. часть"). Возбуждение – при 360 нм, испускание – при 490 нм.

сти флуоресценции раствора красителя (максимумы в спектре возбуждения – 269, 292 и 360 нм, испускания – 490 нм, рис. 8), что обусловлено образованием продукта реакции.

Таким образом, оба исследованных нами реагента ($^{\bullet}O_2^-$ и HOCl) в бесклеточной среде реагируют с галлоцианином с образованием флуоресцирующих продуктов. Далее мы попытались выяснить, можно ли использовать галлоцианин в качестве флуорогенного хемосенсора для регистрации продукции АФК и/или АФГ нейтрофилами крови человека.

Продукция $^{\bullet}O_2^-$ нейтрофилами. Известно, что среди всех клеток крови нейтрофилы являются основными носителями MPO и NADPH-оксидазы. Стимуляция нейтрофилов приводит, с одной стороны, к сборке и активации NADPH-оксидазного ферментного комплекса, что сопровождается усиленной продукцией $^{\bullet}O_2^-$ [2], а с другой – к дегрануляции клеток, секреции MPO из азурофильных гранул во внеклеточное пространство и, как следствие – к синтезу HOCl [1, 4]. Оба события, как демонстрируют представленные выше результаты, должны способствовать трансформации галлоцианина в его флуорогенную форму. Для того чтобы выяснить, какая из ферментных систем нейтрофилов в большей степени ответственна за превращение галлоцианина во флуорофор, мы активировали нейтрофилы добавлением *N*-формилметил-лейцил-фенилаланина (fMLP) или форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA) в присутствии галлоцианина и различных веществ, способных как

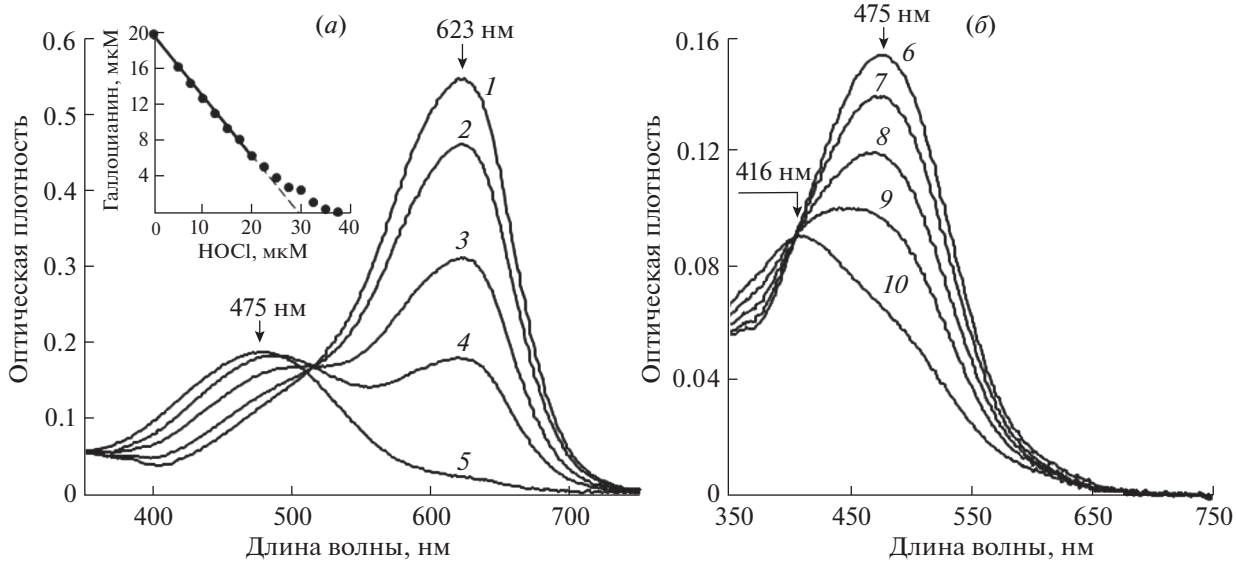


Рис. 6. Спектры поглощения галлоцианина до и после добавления к нему HOCl. Среда измерения – ФСБ-2, pH 7.4 (см. "Эксперим. часть"). Концентрация галлоцианина – 20 мкМ. Концентрация HOCl (мкМ) (*а*): *1* – 0; *2* – 7.5; *3* – 15.0; *4* – 22.5; *5* – 40.0; (*б*): *6* – 45.0; *7* – 52.5; *8* – 60.0; *9* – 67.5; *10* – 75.0. На вставке приведена концентрационная зависимость убыли галлоцианина в растворе при добавлении к нему HOCl, рассчитанная по убыли оптической плотности при 623 нм.

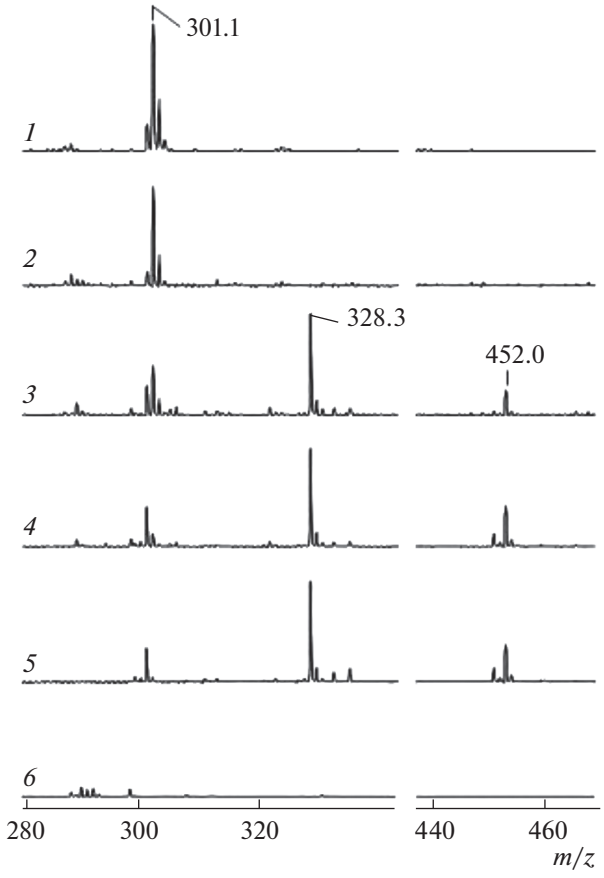


Рис. 7. Масс-спектры галлоцианина до и после добавления к нему HOCl. Среда измерения – ФСБ-2, pH 7.4 (см. "Эксперим. часть"). Концентрация галлоцианина – 80 мкМ. Концентрация HOCl (мМ): *1* – 0; *2* – 0.4; *3* – 4.0; *4* – 8.0; *5* – 16.0; *6* – масс-спектр матрицы (2,5-дигидроксибензойной кислоты) в отсутствие галлоцианина.

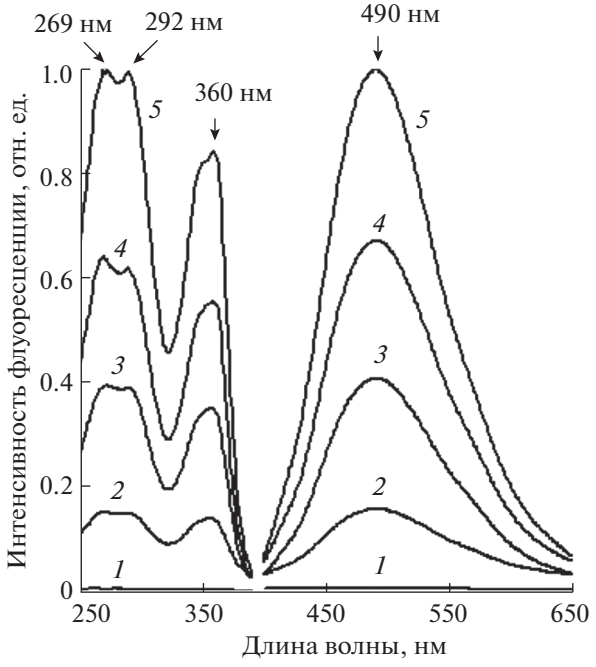


Рис. 8. Спектры возбуждения и испускания флуоресценции галлоцианина до и после добавления к нему HOCl. Среда измерения – ФСБ-1, pH 7.4 (см. "Эксперим. часть"). Концентрация галлоцианина – 5 мкМ. Концентрация HOCl (мкМ): *1* – 0; *2* – 2.5; *3* – 5.0; *4* – 7.5; *5* – 10.0. Возбуждение – при 360 нм, испускание – при 490 нм.

перехватывать и/или элиминировать АФК/АФГ, так и ингибировать их продукцию, регистрируя при этом изменение интенсивности флуоресценции. Результаты экспериментов приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что гидразид 4-аминобензойной кислоты (4-АВАН; специфический ингибитор каталитической активности MPO, а значит, и продукции HOCl [19]), таурин (перехватчик HOCl) и маннитол (перехватчик гидроксильного радикала) не оказывали достоверного влияния на параметры окисления галлоцианина в присутствии активированных нейтрофилов. В то же время при добавлении к нейтрофилам SOD или церулоплазмина (CP) значения амплитуды интенсивности флуоресценции (h_7) и скорости реакции (v) были значительно ниже контроля (активация нейтрофилов fMLP или PMA без ингибиторов или перехватчиков АФК/АФГ) или не определялись вовсе в результате отсутствия прироста флуоресценции спустя 20 мин после активации нейтрофилов. Как известно, SOD элими-

Таблица 1. Влияние ингибиторов продукции АФК/АФГ и их перехватчиков на параметры, характеризующие химическое превращение галлоцианина в суспензии нейтрофилов, активированных fMLP или PMA

Агонист	Параметр	SOD, 1.6 мкМ	CP, 1.1 мкМ	4-АВАН, 100 мкМ	Таурин, 3.2 мМ	Маннитол, 10 мМ
fMLP, 0.5 мкМ	v, % от контроля	7 ± 5*	5 ± 4*	102 ± 29	98 ± 27	113 ± 20
	h_7, % от контроля	14 ± 4*	19 ± 18*	129 ± 30	92 ± 15	107 ± 35
PMA, 50 нМ	v, % от контроля	0**	2 ± 3*	93 ± 19	105 ± 20	125 ± 20
	h_7, % от контроля	0**	6 ± 9*	127 ± 23	104 ± 19	110 ± 15

* $p < 0.05$.
** Полное отсутствие прироста флуоресценции спустя 20 мин после активации нейтрофилов.

нирует $^{\bullet}O_2^-$, катализируя его дисмутацию по реакции (2) до H_2O_2, который, как нам удалось установить, не реагирует с галлоцианином (см. выше). Обнаруженный эффект CP, по всей видимости, обусловлен SOD-активностью этого белка [20]. Полученные результаты позволяют предположить, что основной вклад в окисление галлоцианина в суспензии нейтрофилов происходит за счет его реакции с $^{\bullet}O_2^-$.

Следует отметить, что в крови человека подавляющее количество MPO сосредоточено в нейтрофилах и лишь незначительная ее часть – в моноцитах [1, 4]. Что касается NADPH-оксидазы, то различные ее изоформы присутствуют не только в нейтрофилах, но и практически во всех остальных типах клеток крови [2]: моноцитах [21], лимфоцитах [22], тромбоцитах [23], эритроцитах [24].

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что галлоцианин может выполнять роль флуорогенного хемосенсора и использоваться для оценки NADPH-зависимой продукции супероксидного анион-радикала, по всей вероятности, не только нейтрофилами, но и другими клетками крови, а также для тестирования антиокислительных свойств препаратов, разрабатываемых с целью коррекции заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: цитрат натрия, *N*-формил-метил-лейцил-фенилаланин (fMLP), форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA), гипохлорит натрия (NaOCl), галлоцианин, диоксид калия (KO_2), ксантиноксидазу, ксантин, гидразид 4-аминобензойной кислоты (4-ABAH), супероксиддисмутазу (SOD), таурин, маннитол, 2,5-дигидроксибензойную кислоту фирмы Sigma (США); декстран T70 фирмы Roth (Германия); гистопак фирмы Nycomed (Норвегия). Остальные реактивы были производства "Реахим" (Россия) и "Белмедпрепараты" (Беларусь). Церулоплазмин (CP) выделяли из крови здоровых доноров с помощью ионообменной и аффинной хроматографии [20].

Концентрацию гипохлорит-аниона (OCl^-) определяли по его поглощению при 290 нм и pH 12, используя коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon_{290} = 350\ M^{-1}\ см^{-1}$ [25]. Принимая во внимание тот факт, что pK_a HOCl составляет ~7.5 [25] и при физиологических значениях pH примерно половина кислоты находится в молекулярной форме, а остальная часть – в виде аниона, под HOCl мы подразумевали смесь $HOCl/OCl^-$, присутствующую в исследуемой среде.

В качестве буферного раствора использовали фосфатно-солевой буфер, содержавший 10 мМ Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, pH 7.4 (ФСБ-1) либо 10 мМ Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 7.4 (ФСБ-2).

Спектры поглощения регистрировали на двухлучевых спектрофотометрах PB 2201 (Solar, Беларусь) и Cary-50 (Varian, США).

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре CM 2203 (Solar, Беларусь).

Выделение нейтрофилов осуществляли путем центрифугирования в градиенте плотности гистопака из крови здоровых доноров, как описано ранее [26]. Полученный осадок нейтрофилов отмывали в ФСБ-1, содержавшем 2 мг/мл *D*-глюкозы, при 4°C и сразу использовали в эксперименте.

Продукцию АФК и АФГ нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом с использованием галлоцианина. К нейтрофилам (10^6 кл./мл) в ФСБ-1, содержавшем 1 мМ $CaCl_2$ и 0.5 мМ $MgCl_2$, добавляли галлоцианин (5 мкМ), fMLP (0.5 мкМ) или PMA (50 нМ), ингибиторы продукции АФК/АФГ или их перехватчики (SOD, 4-ABAH, CP, таурин, маннитол). Регистрацию осуществляли при 37°C и постоянном перемешивании образца. Продукцию $^{\bullet}O_2^-$ в системе ксантин/ксантиноксидаза регистрировали в ФСБ-1 при 25°C, концентрация ксантина – 1 мМ, ксантиноксидазы – 0.52 мкМ, галлоцианина – 5 мкМ. Для регистрации флуоресценции эмпирически были подобраны значения длин волн возбуждения и испускания 360 и 490 нм соответственно. Для характеристики химического превращения красителя были выбраны следующие параметры (рис. 4): тангенс угла наклона начального линейного участка кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции (v), характеризующий скорость реакции, и интенсивность флуоресценции образца по сравнению с фоновым уровнем через 7 (h_7) или 20 (h_{20}) мин после запуска активации нейтрофилов, отражающую количество накопившегося флуоресцирующего продукта реакции.

Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Время задержки анализатора – 200 нс. Напряжение на электроде ускорителя составляло 25.01 кВ, накапливающем электроде – 21.71 кВ, фокусирующей линзе – 10.01 кВ. Параметры масс-спектрометра были оптимизированы для диапазона m/z 50–1000. Сигнал накапливался как усредненный по 200 одиночным лазерным импульсам с постоянной мощностью лазерного излучения на уровне порогового значения для увеличения разрешения. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту.

Статистическую и графическую обработку данных выполняли с использованием пакета программ OriginPro 2016. Данные представлены как

среднее ± стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически достоверными при значении $p < 0.05$, рассчитанном по критерию Стьюдента. Типичные кинетические кривые представляют собой инвариант 3–5 независимых экспериментов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-515-00006) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б20Р-215).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Klebanoff S.J.* // J. Leukoc. Biol. 2005. V. 77. P. 598–625. https://doi.org/10.1189/jlb.1204697
2. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К.* // Усп. совр. биол. 2006. Т. 126. С. 97–112.
3. *Sies H.* // Klin. Wochenschr. 1991. V. 69. P. 965–968. https://doi.org/10.1007/BF01645140
4. *Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В.* // Усп. биол. химии. 2013. Т. 53. С. 195–244. [*Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V.* // Biochemistry (Moscow). 2013. V. 78. P. 1466–1489.] https://doi.org/10.1134/S0006297913130075
5. *Панасенко О.М., Сергиенко В.И.* // Вестник Российской АМН. 2010. № 1. С. 27–39.
6. *Huang J., Milton A., Arnold R.D., Huang H., Smith F., Panizzi J.R., Panizzi P.* // J. Leukoc. Biol. 2016. V. 99. P. 541–548. https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0615-256R
7. *Tarpey M.M., Fridovich I.* // Circ. Res. 2001. V. 89. P. 224–236. https://doi.org/10.1161/hh1501.094365
8. *Kettle A.J., Albrett A.M., Chapman A.L., Dickerhof N., Forbes L.V., Khalilova I., Turner R.* // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 781–793. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.004
9. *Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H.J., Nagano T.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 278. P. 3170–3175. https://doi.org/10.1074/jbc.M209264200
10. *Votyakova T.V., Reynolds I.J.* // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 431. P. 138–144. https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.025
11. *Grivennikova V.G., Kareyeva A.V., Vinogradov A.D.* // Redox Biol. 2018. V. 17. P. 192–199. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.014
12. *Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenko O.M.* // Free Radic. Res. 2015. V. 49. P. 777–789. https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1017478
13. *Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудинина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б.* // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2016. Т. 1. № 3 (109). Часть 2. С. 86–91.
14. *Загородний В.В.* // Архив патологии. 1982. Т. 44. С. 67–68.
15. *Brown A., Scholtz C.L.* // Stain Technol. 1979. V. 54. P. 89–92. https://doi.org/10.3109/10520297909112640
16. *Borges F., Fernandes E., Roleira F.* // Curr. Med. Chem. 2002. V. 9. P. 195–217. https://doi.org/10.2174/0929867023371229
17. *Balavoine G.G., Geletii Y.V.* // Nitric Oxide. 1999. V. 3. P. 40–54. https://doi.org/10.1006/niox.1999.0206
18. *Kettisen K., Bulow L., Sakai H.* // Bioconjug. Chem. 2015. V. 26. P. 746–754. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00076
19. *Malle E., Furtmüller P.G., Sattler W., Obinger C.* // Br. J. Pharmacol. 2007. V. 152. P. 838–854. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707358
20. *Sokolov A.V., Kostevich V.A., Varfolomeeva E.Y., Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Kozlov S.O., Kudryavtsev I.V., Mikhalchik E.V., Filatov M.V., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M., Arnhold J., Vasilyev V.B.* // Biochem. Cell Biol. 2018. V. 96. P. 457–467. https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0277
21. *Okura Y., Yamada M., Kuribayashi F., Kobayashi I., Ariga T.* // J. Clin. Immunol. 2015. V. 35. P. 158–167. https://doi.org/10.1007/s10875-015-0138-4
22. *Bánfi B., Molnár G., Maturana A., Steger K., Hegedûs B., Demaurex N., Krause K.H.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 37594–37601. https://doi.org/10.1074/jbc.M103034200
23. *Fuentes E., Gibbins J.M., Holbrook L.M., Palomo I.* // Trends Cardiovasc. Med. 2018. V. 28. P. 429–434. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.03.001
24. *George A., Pushkaran S., Konstantinidis D.G., Koochaki S., Malik P., Mohandas N., Zheng Yi., Joiner C.H., Kalfa T.A.* // Blood. 2013. V. 121. P. 2099–2107. https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441188
25. *Morris J.C.* // J. Phys. Chem. 1966. V. 70. P. 3798–3805.
26. *Timoshenko A.V., Kayser K., Gabius H.J.* // Lectin Methods and Protocols / Eds. Rhodes J.M., Milton J.D. Humana Press, 1998. P. 441–451. https://doi.org/10.1385/0-89603-396-1:441

Gallocyanine as a Fluorogen for Identification of NADPH-Dependent Production of Superoxide by Blood Cells

O. M. Panasenko*, #, V. E. Reut, I. V. Borodina*, D. S. Matyushkina*, V. A. Ivanov*, D. V. Grigorieva**, I. V. Gorudko**, A. V. Sokolov*, ***, and S. N. Cherenkevich****

#Phone: +7 (499) 246-44-90; e-mail: o-panas@mail.ru

**Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia*

***Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus*

****Institute of Experimental Medicine, ul. Academica Pavlova 12, Saint Petersburg, 197376 Russia*

In this work spectrophotometry, mass spectrometry and fluorescence spectroscopy methods were used to investigate interaction of the oxazine dye gallocyanine with reactive oxygen $\left(^{\bullet}O_2^-,\ H_2O_2\right)$ and halogen (HOCl) species. It was shown that gallocyanine reacts with HOCl and $^{\bullet}O_2^-$ but not with H_2O_2 to form fluorescent products. Using inhibitory analysis it was found that both in xanthine/xanthine oxidase and in activated human blood neutrophil systems, reaction with $^{\bullet}O_2^-$ is responsible for gallocyanine conversation to fluorescent form. Results obtained in this study suggest that gallocyanine can act as a fluorogenic chemosensor for assessing neutrophil activation, NADPH-dependent production of superoxide anion radicals by these and other blood cells, as well as for testing antioxidant drugs, designed to intervene in disease associated with oxidative stress.

Keywords: gallocyanine, reactive oxygen species, reactive halogen species, oxidative stress, superoxide anion radical, hypochlorous acid, fluorescence

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 162–172

УДК 577.13:615.334

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ МОНАСНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ГРИБА *Aspergillus cavernicola*

© 2021 г. Г. К. Рысцов*, **, Т. В. Антипова*, К. В. Зайцев*, М. Ю. Земскова*, **, #**

**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФГБУН "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований" РАН, Россия, 142290 Московская обл., Пущино, пр. Науки, 5*

***Московский государственный областной университет, Россия, 141014 Московская обл., Мытищи, ул. Веры Волошиной, 24*

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

Поступила в редакцию 30.06.2020 г.
После доработки 11.07.2020 г.
Принята к публикации 13.07.2020 г.

Обнаружено, что монасникотиновая кислота (МНК), выделенная из гриба *Aspergillus cavernicola* ВКМ F-906, снижает пролиферацию и миграцию клеток рака простаты человека LnCaP и ингибирует сигнальные пути AKT–mTORC1 и FAK–Src. Однако МНК также повышает уровень HSP60 и фосфорилирование c-Jun – факторов, стимулирующих жизнедеятельность раковых клеток. МНК-индуцированные клеточные ответы появляются только через 48 ч, что подразумевает участие либо продуктов метаболизма МНК, либо таутомеров, возникающих при протонировании МНК в результате роста клеточных культур и утилизации соединения клетками человека. Эти результаты позволяют предположить, что МНК является перспективным соединением для получения различных производных, которые будут ингибировать онкогенные сигнальные пути без стимуляции факторов, обеспечивающих выживание опухолевых клеток.

Ключевые слова: монасникотиновая кислота, Aspergillus cavernicola, клетки рака предстательной железы, противоопухолевая активность, сигнальный путь AKT–mTORC1, xCELLigence

DOI: 10.31857/S0132342321010206

Азафилоновые соединения, продуцируемые грибами рода *Monascus*, традиционно используются для получения пищевых добавок и натуральных красителей, которые оказывают положительное воздействие на здоровье человека [1]. По спектрам поглощения эти соединения традиционно классифицируются как красные, оранжевые и желтые пигменты. В настоящее время у *Monascus* было идентифицировано около сотни различных азафилоновых пигментов [2]. Несколько подобных пигментов были обнаружены у грибов *Penicillium*, *Talaromyces* и др. [3]. Эти соединения обладают антиоксидантными, гиполипидемическими, противовоспалительными, антимикробными и противоопухолевыми свойствами [2, 4]. Исследование монапурпиридина А показало, что это соединение вызывает апоптоз клеток рака молочной железы MCF-7 [5].

Штамм *Aspergillus cavernicola* VKM F-906 продуцирует большое количество красных пигментов, подобных монаскорубрамину [6]. Недавно из этого штамма нами был выделен новый метаболит [7]. Структура соединения была определена с помощью масс-спектрометрии, 1D и 2D ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа; соединение было описано как 4-[(1*E*)-2-ацетил-5-метил-4-оксогепт-1-ен-1-ил]-6-[(1*Z*)-проп-1-ен-1-ил]пиридин-3-карбоновая кислота (рис. 1). Из-за сходства его молекулярной структуры с монасникотинатами [8] и монапурпиридином А [5], ранее обнаруженными у грибов рода *Monascus*, соединение было названо монасникотиновой кислотой (МНК). МНК представляет особый интерес для изучения ее биологической активности как

Сокращения: AKT – серин/треонинспецифичная протеинкиназа B; c-Jun – протоонкоген, фактор транскрипции; FAK – киназа фокальной адгезии; FBS – фетальная бычья сыворотка; HSP60 – белок теплового шока 60; LnCaP – клетки рака простаты человека; mTORC1 – сигнальный комплекс mTOR, мишень рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin); RTCA – биосенсорная технология xCELLigence; Src – протоонкоген, тирозин-протеинкиназа Src; КИ – клеточный индекс; МНК – монасникотиновая кислота.

Автор для связи (тел.: +7 (929) 913-27-56; факс: +7 (495) 956-33-70; эл. почта: mzemskova@ibpm.pushchino.ru).

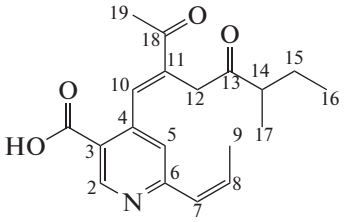


Рис. 1. Молекулярная структура монасникотиновой кислоты (МНК).

нового соединения из этого класса природных продуктов.

В статье мы приводим данные об исследовании противоопухолевой активности и некоторых аспектов молекулярного механизма действия МНК на клетки рака предстательной железы человека. С помощью современной технологии xCELLigence, позволяющей проводить анализ клеток в реальном времени, мы определяли влияние МНК на пролиферацию и миграцию клеток рака простаты LnCaP. Для идентификации клеточных мишеней, на которые действует МНК, был применен анализ фосфорилирования ключевых киназ, контролирующих гомеостаз опухолевых клеток. Используя преимущества этих подходов, нам удалось раскрыть потенциальный механизм ингибирования пролиферации и миграции опухолевых клеток при воздействии МНК вследствие снижения активностей сигнальных путей AKT–mTORC1 и FAK–Src.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биосенсорная технология xCELLigence (RTCA) разработана для непрерывного мониторинга адгезионных свойств клеток *in vitro* в режиме реального времени. В данной технологии используются специально разработанные планшеты (E- и CIM-планшеты), дно лунок планшетов покрыто золотыми электродами, к которым прикрепляются клетки-мишени. Вследствие размножения клеток происходят изменения электрического сопротивления, которые преобразуются в значения клеточного индекса (КИ). Показатели КИ увеличиваются, когда клетки прикрепляются к электродам и размножаются. Следовательно, любое воздействие, которое вызывает изменения в количестве клеток (их пролиферация или гибель) или в их движении (миграция или инвазия), может быть исследовано посредством измерений КИ с применением E- и CIM-планшетов соответственно. Используя преимущества технологии xCELLigence, мы определяли способность МНК ингибировать размножение клеток рака предстательной железы человека LnCaP, выявляли, когда это происходит и какова природа клеточного ответа. Клетки высевали в лунки E-планшета и через 24 ч, когда клетки прикреплялись к электродам и начинали размножаться, добавляли либо контрольное соединение (DMSO), либо МНК в различных концентрациях и измеряли значения КИ в течение 86 ч. Как видно на рис. 2*а*, существенных изменений в адгезии и росте клеток не наблюдалось в течение первых часов обработки (т.е. КИ клеток, обработанных МНК, был идентичен КИ контрольных клеток в течение 24 ч после добавления соединения). Затем, однако, наблюдалось статистически значимое снижение значений КИ, которое проявлялось примерно через 48 ч после добавления МНК к клеткам и зависело от количества вносимого вещества и времени инкубации (рис. 2*а* и 2*б*). Полумаксимальная ингибирующая концентрация МНК (IC_{50}) для клеток LnCaP через 48 ч обработки была определена как 34.71 мкг/мл (105 мкМ).

Поскольку МНК-индуцированный ответ не был очевиден сразу, мы изучили пролиферацию клеток в условиях более длительной обработки соединением. Клетки LnCaP предварительно обрабатывали МНК в течение 96 ч при дозе IC_{50} и затем анализировали с помощью технологии xCELLigence в течение последующих 86 ч. Как показано на рис. 2*в*, у предварительно обработанных клеток наблюдался замедленный рост по сравнению с клетками без предварительной обработки (рис. 2*а*), хотя в обоих экспериментах в лунки E-планшетов добавляли равное количество клеток и инкубировали в течение первых 24 ч в среде, не содержавшей МНК. Эти данные свидетельствуют о том, что индуцированное МНК ингибирование пролиферации клеток сохраняется даже в отсутствие препарата. Добавление МНК к предварительно обработанным клеткам вызвало снижение их КИ по сравнению с КИ как контрольных клеток, так и клеток без предварительной обработки соединением (рис. 2*б* и 2*г*). Это статистически значимое уменьшение наблюдалось уже через 24 ч после внесения препарата, с последующим понижением значений КИ с увеличением времени инкубации и концентрации соединения (рис. 2*в* и 2*г*). После 48 ч воздействия МНК для предварительно обработанных клеток значение IC_{50} составило 19 мкг/мл (57 мкМ), что примерно в 2 раза меньше, чем IC_{50} для клеток LnCaP без предварительной инкубации с соединением.

Анализ кривых КИ показывает, что МНК не вызывает гибель клеток, поскольку не наблюдалось значительного уменьшения значений КИ, вызванного падением сопротивления вследствие открепления гибнущих клеток от электродов-датчиков. Этот вывод был также подтвержден микроскопическими наблюдениями (рис. 3). В клетках, обработанных МНК, наблюдалось снижение количества прикрепленных клеток, однако изменений размера, формы, уменьшения клеточной адгезии и плавающих мертвых клеток не обнаруже-

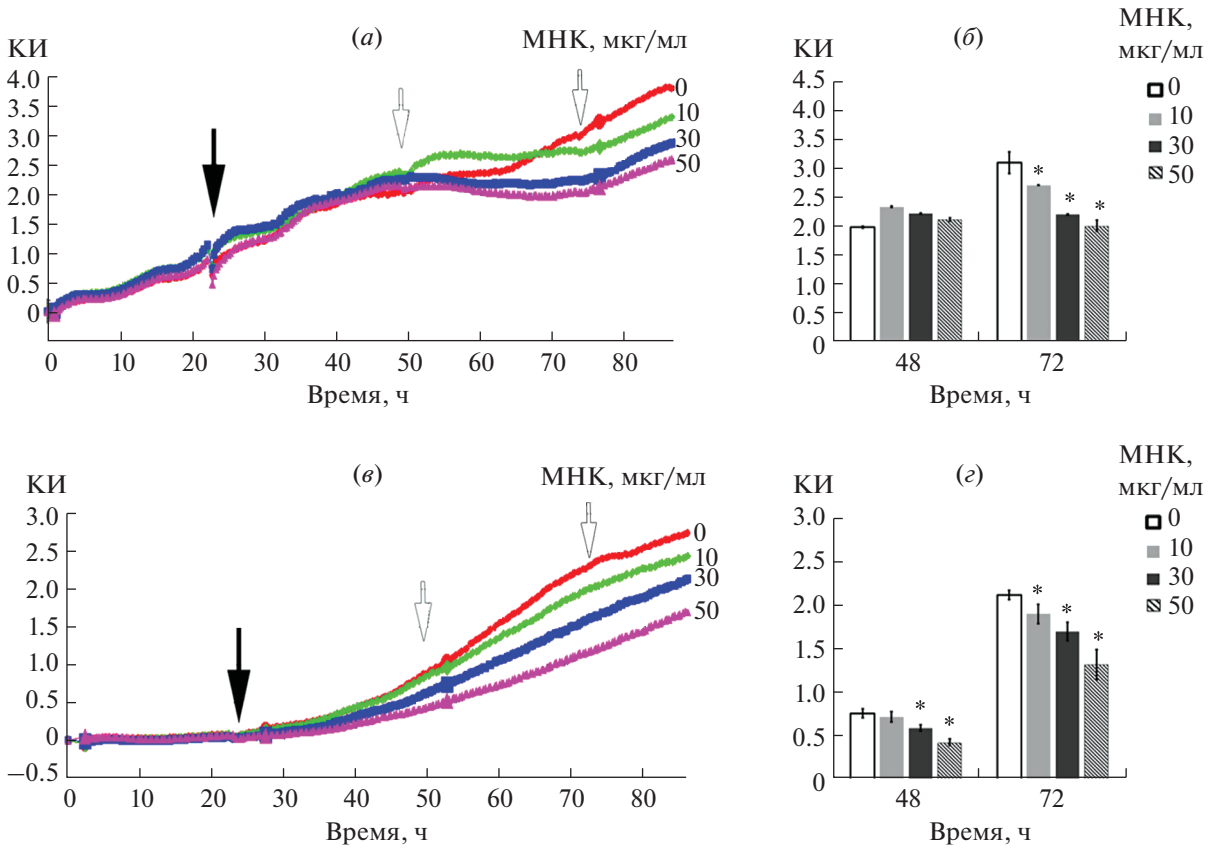


Рис. 2. Цитостатическое действие МНК на клетки рака простаты человека LnCaP в зависимости от концентрации МНК и времени культивирования. Эксперимент проведен с использованием технологии xCELLigence: (*а*) – инкубация с МНК, добавленной к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ) (опыт 1); (*б*) – гистограмма значений КИ в опыте 1; (*в*) – инкубация с МНК, внесенной к клеткам, предварительно обработанным МНК в течение 96 ч (опыт 2); (*г*) – гистограмма значений КИ в опыте 2. Черными стрелками на графиках КИ отмечено время добавления МНК, белые стрелки указывают на различия в кривых КИ в опытах 1 и 2. Временные точки на гистограммах (*б*) и (*г*) показаны в соответствии с временным периодом, указанным для кривых КИ (*а*) и (*в*). * Статистически значимые различия значений КИ ($p < 0.05$) клеток, обработанных МНК, по сравнению с контрольными клетками, обработанными DMSO (контроль – 0). Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов.

но (рис. 3*б*). Следовательно, МНК ингибирует пролиферацию клеток рака предстательной железы линии LnCaP и, таким образом, обладает цитостатическими свойствами без ярко выраженного цитотоксического эффекта.

Одной из характеристик опухолевых клеток является их способность к миграции, приводящая в условиях организма к образованию метастаз в удаленных от опухоли органах. Мы оценили влияние МНК на миграцию клеток LnCaP в направлении градиента ростовых факторов, используя CIM-планшеты и технологию xCELLigence, которая позволяет измерять количество клеток, мигрирующих через мембрану. Как показано на рис. 4*а*, МНК не подавляла миграцию клеток в направлении градиента сыворотки в течение 20 ч после добавления соединения в различных концентрациях. Такое отсутствие активности МНК согласуется с результатами, представленными на рис. 2*а*, когда индуцированное МНК ингибирование пролиферации клеток также не наблюдалось в течение первых 24 ч воздействия препарата. Для того чтобы определить, приведет ли увеличение времени обработки к снижению миграции, клетки LnCaP инкубировали в присутствии МНК (35 мкг/мл) в течение 96 ч и затем помещали в CIM-планшеты для дальнейшего анализа миграции в присутствии различных концентраций соединения. Как показано на рис. 4*б*, в течение 3–20 ч МНК индуцировала значительное ингибирование миграции клеток LnCaP по сравнению с контролем. Было установлено, что через 15 ч обработки IC_{50} МНК составляет 7.8 мкг/мл (23.8 мкМ).

В совокупности наши данные указывают на то, что МНК обладает умеренной ингибирующей активностью в отношении пролиферации и миграции клеток LnCaP, и для проявления этой активности требуется относительно длительное время. Это наблюдение предполагает, что биологическая активность данного соединения проявляется ли-

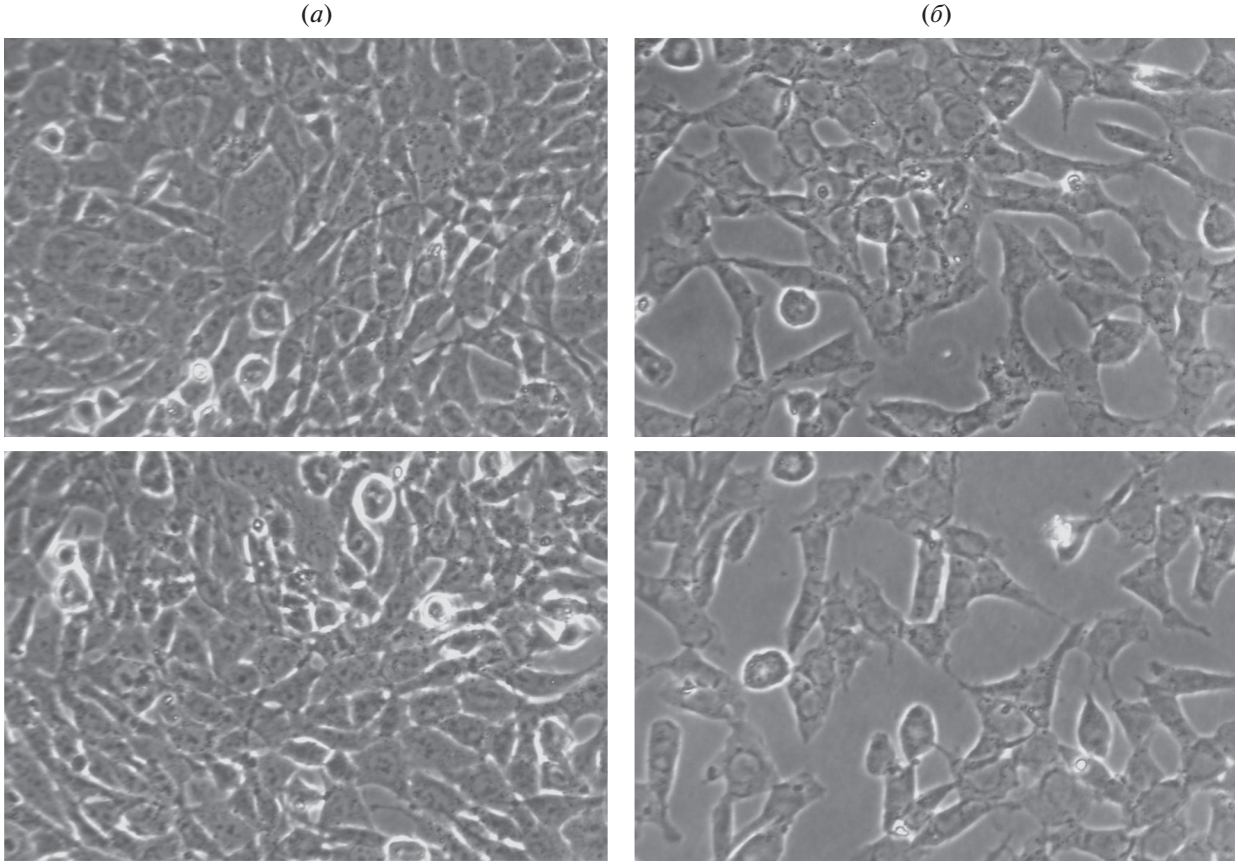


Рис. 3. Микрофотографии двух случайно выбранных полей клеток LnCaP, инкубированных либо с DMSO, либо с МНК (35 мкг/л) в течение 96 ч: (*а*) – контроль (DMSO); (*б*) – МНК. Увеличение 40×.

бо в том случае, когда критические концентрации достигаются после накопления МНК опухолевыми клетками, либо соединение сначала должно метаболизироваться клетками, и только продукты метаболизма МНК обладают ингибирующим эффектом. Существует еще одно возможное объяснение замедленного клеточного ответа на введение соединения. МНК содержит карбонильные группы и подвижные протоны у C12, C14 и C19 [7], что приводит к кето-енольной таутомерии (рис. 5). При подкислении атом азота пиридинового кольца протонируется, и в результате таутомерии происходит перераспределение заряда и увеличение сопряжения в молекуле. Именно это изменение и может оказывать влияние на биологическую функцию соединения. Из-за физиологического подкисления культуральной среды вследствие роста и метаболизма клеток нельзя исключать возможность того, что с увеличением времени культивирования енольная форма МНК начинает преобладать, и, по-видимому, этот таутомер обладает более сильными ингибирующими способностями, чем кето-форма МНК. Это допущение поддерживается экспериментальными данными, указывающими на большую биологическую активность енолятов относительно кетоформ в различных физиологических реакциях [9]. Такое наблюдение дает основание для развития нового подхода в рациональной разработке лекарств в медицинской химии.

Анализ жизнедеятельности клеток в реальном времени показал, что, в отличие от монапурпиридина А [6], МНК не вызывает гибель клеток. Однако обе молекулы имеют близкую структуру и отличаются наличием сложноэфирной этиловой группы в монапурпиридине А, а также длиной и структурой алкильного фрагмента. Существует вероятность того, что введение различных заместителей в карбоксильную группу МНК может усилить противоопухолевые свойства этого соединения. Известно, что использование соединений, в которых варьируют заместители в карбоксильной группе (свободная COOH и ее комплексы, сложные эфиры), позволяет изменять полярность молекулы лекарственного соединения, улучшает проявление фармакологической активности и замедляет процесс биодекарбоксилирования [10]. Для производных пиридина показана разнообразная биологическая активность, в том числе антибактериальная и противогрибковая [11].

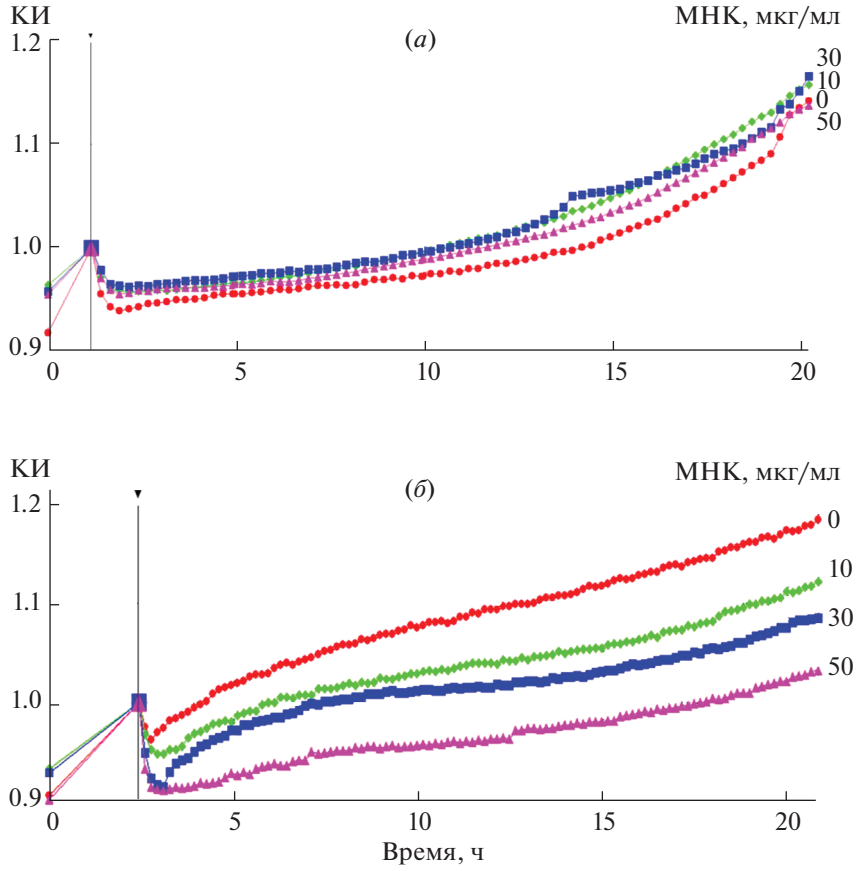
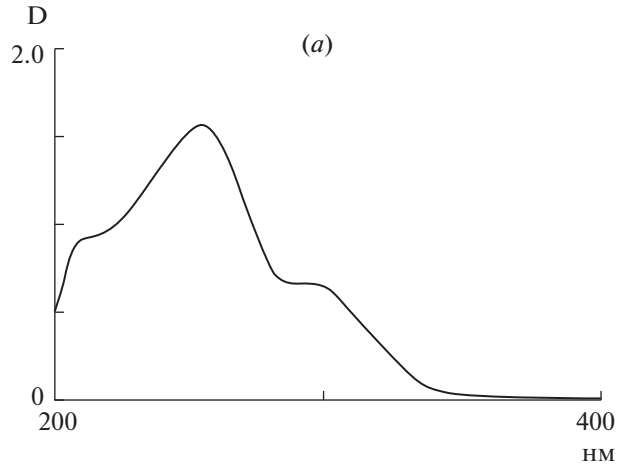
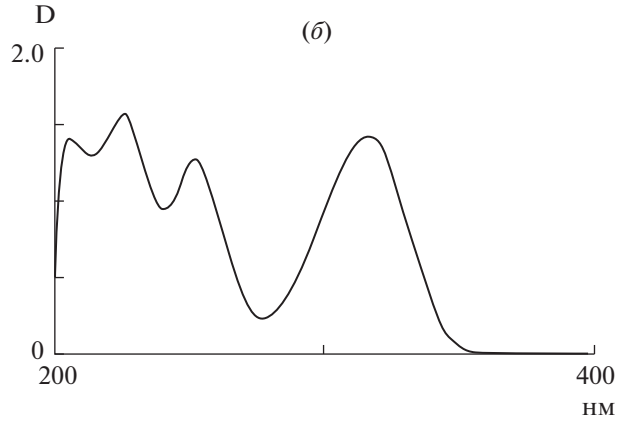


Рис. 4. Влияние МНК на миграцию клеток LnCaP при различных концентрациях МНК относительно клеток, обработанных DMSO (контроль – 0). Данные получены с использованием технологии xCELLigence. Представлены профили миграции клеток LnCaP через мембрану по направлению к градиенту сыворотки в условиях, когда DMSO или соединение добавляли непосредственно перед началом измерения КИ (*а*) и при добавлении либо DMSO (контроль), либо МНК к клеткам, предварительно обработанным в течение 96 ч DMSO или МНК в дозе 35 мкг/мл соответственно (*б*).

Чтобы определить клеточные мишени для МНК в период времени, когда наблюдалось ингибирование пролиферации и миграции клеток, клетки LnCaP обрабатывали МНК в течение 96 ч при IC_{50}, а затем клеточные лизаты анализировали для определения фосфорилирования клеточных киназ и уровней белков, регулирующих гомеостаз опухолевых клеток. Как видно на рис. 6, значительное снижение фосфорилирования Ser473 (S473) и Thr308 (T308) было обнаружено для всех трех изоформ AKT-киназы в клетках, обработанных МНК, по сравнению с контролем. Как известно, каскадное фосфорилирование этих аминокислотных остатков необходимо для активации AKT [12]. Ингибирование активности AKT имело функциональные последствия для фосфорилирования хорошо известных субстратов этой киназы, таких как GSK3α/β (S21/S9) [13], PRAS40 (T246) [14] и WNK1 (T60) [15], и для фосфорилирования непрямых мишеней AKT, таких как киназы mTOR (S2448) и p70S6 (T421/S424). Следовательно, МНК может нарушать активацию сигнального пути AKT–mTOR, который является одним из основных регуляторов пролиферации и миграции клеток [12]. Данные фосфопротеомного анализа также указывают на МНК-индуцированное ингибирование фосфорилирования тирозинкиназы Src, продукта онкогена *c-src*, и фокальной адгезионной киназы FAK (рис. 6). Оба белка демонстрировали снижение уровней фосфорилирования тирозина Y397 для FAK и Y419 для Src. Как было показано, фосфорилирование остатков тирозина Y397 для FAK и Y419 для Src необходимо для взаимодействия киназ FAK–Src и активации комплекса для индукции различных клеточных ответов, включая клеточную адгезию и миграцию [16–20]. Следовательно, МНК может ингибировать миграцию клеток, влияя на активность комплекса FAK–Src.

Однако в клетках, обработанных МНК, наблюдалось увеличение уровня белка теплового шока HSP60 (в 1.75 раза) и активация протоонкогена c-Jun (в 2.5 раза) (рис. 6). Известно, что оба этих фактора увеличивают рост и миграцию клеток и предотвращают их гибель [21, 22]. Фосфорилирова-





(в)

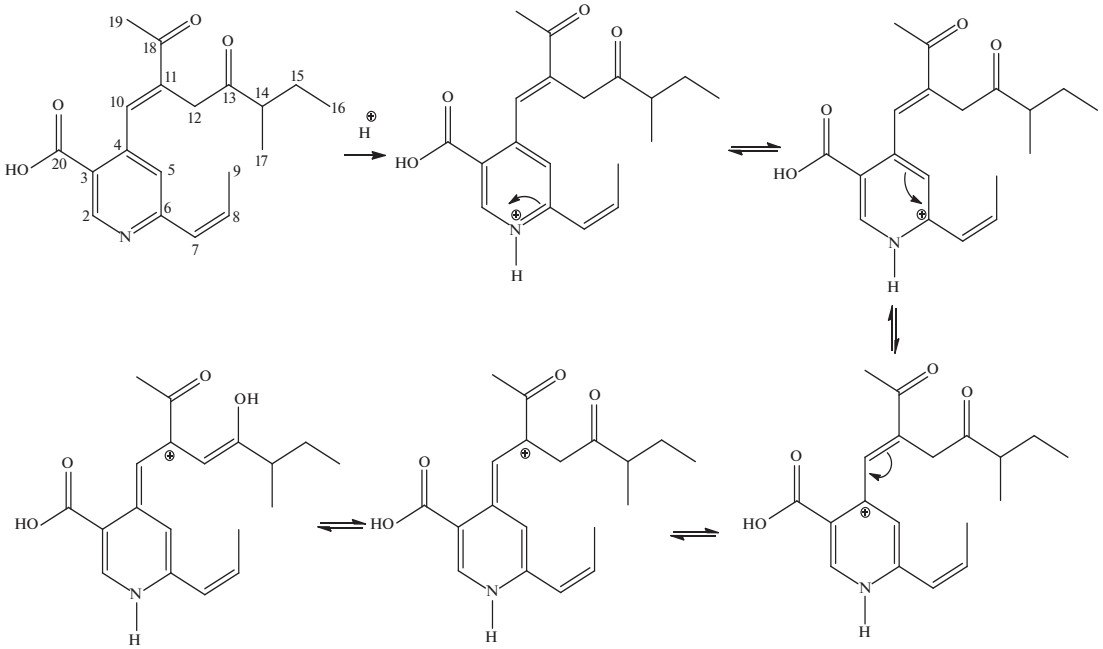


Рис. 5. УФ- (MeOH) спектры МНК при нормальном (*а*) и кислом значениях pH (*б*) имеют полосы поглощения с $\lambda_{макс.}$ 254, 298 (пл.) нм, а при 0.05 н. HCl в MeOH наблюдается батохромный сдвиг с $\lambda_{макс.}$ 212, 250, 306, 433 нм, и раствор метанола становится желтым, что указывает на возможную кето-енольную таутомерию молекулы МНК при кислых значениях pH (*в*).

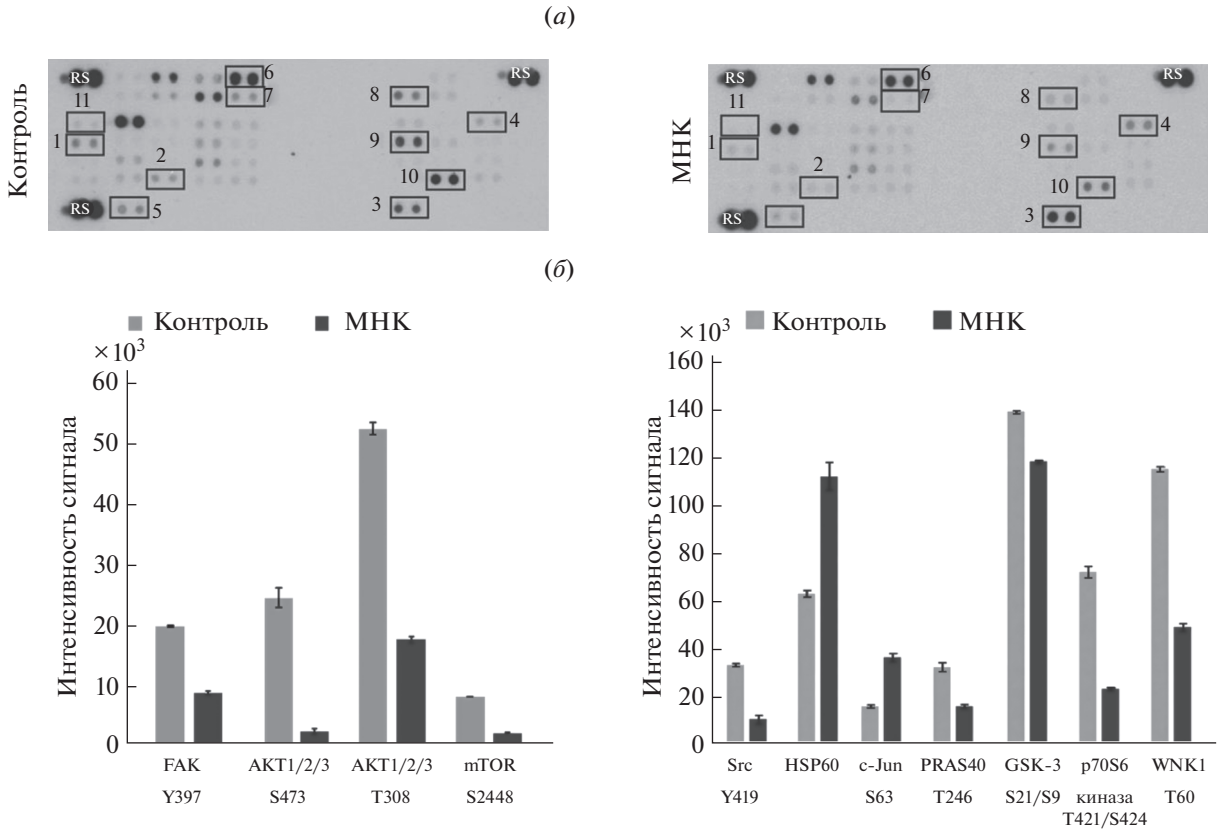


Рис. 6. МНК модулирует уровни фосфорилирования клеточных киназ и уровень шаперона HSP60 в клетках LnCaP. (*а*) – Репрезентативное изображение мембран фосфопротеомного анализа, где антитела, иммобилизованные на мембране и специфичные к фосфорилированным аминокислотным остаткам определенных белков, представлены в двух экземплярах. Интенсивность каждого сигнала соответствует уровню фосфорилирования или уровню общего белка (в случае HSP60). 1 – Src Y419, 2 – FAK Y397, 3 – HSP60, 4 – c-Jun S63, 5 – PRAS40 T246, 6 – GSK-3 S21/S9, 7 – AKT1/2/3 S473, 8 – AKT1/2/3 T308, 9 – p70S6 киназа T421/S424, 10 – WNK1 T60, 11 – mTOR S2448, RS – контрольные точки; (*б*) – денситометрический анализ интенсивности сигналов, представленных на мембранах и полученных из лизатов клеток, обработанных либо DMSO, либо МНК. Гистограммы показывают среднюю плотность пикселей, которые отражают уровень интенсивности сигналов. Планки погрешностей представляют ± s.d.

ние Ser63 c-Jun (S63) необходимо для стабильности белка и его транскрипционной активности [21, 23]. Известно, что c-Jun играет важную роль в стимуляции пролиферации клеток; этот факт позволяет предположить, что относительно слабая активность МНК в ингибировании роста клеток может быть опосредована активацией c-Jun. Шаперон HSP60 организует широкую программу выживания клеток посредством увеличения количества антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xl, уменьшения количества проапоптотических Bax-содержащих комплексов [24], стабилизации митохондриальных белков [25] и ограничения функционирования p53 [26]. Таким образом, индуцированное МНК повышение уровня HSP60 может действовать как защитный механизм против цитотоксического действия соединения.

Чтобы подтвердить результаты фосфопротеомного анализа клеточных мишеней, мы оценили уровни экспрессии AKT1 и HSP60 в клеточных лизатах LnCaP, обработанных МНК в течение 96 ч, посредством иммуноблоттинга. В клетках, инкубированных в присутствии МНК, наблюдалось снижение уровней как фосфорилированной формы киназы (фосфо-AKT1), так и общего белка AKT1 в 3.4 и в 1.5 раза соответственно, тогда как уровень HSP60 повышался примерно в 2 раза в клетках, обработанных МНК, по сравнению с контролем (рис. 7). Эти данные подтверждают результаты фосфопротеомного анализа. Известно, что mTOR активирует трансляцию белка посредством фосфорилирования критических компонентов клеточного трансляционного аппарата [27]. Таким образом, различия в уровнях общего белка AKT1 между обработанными МНК клетками и контролем (рис. 7*а*–7*в*) могут быть объяснены МНК-индуцированным ингибированием пути AKT1–mTORC1, приводящим к снижению скорости синтеза киназы. Однако следует отметить, что при снижении общего уровня киназы в клетках не наблюдалось то-

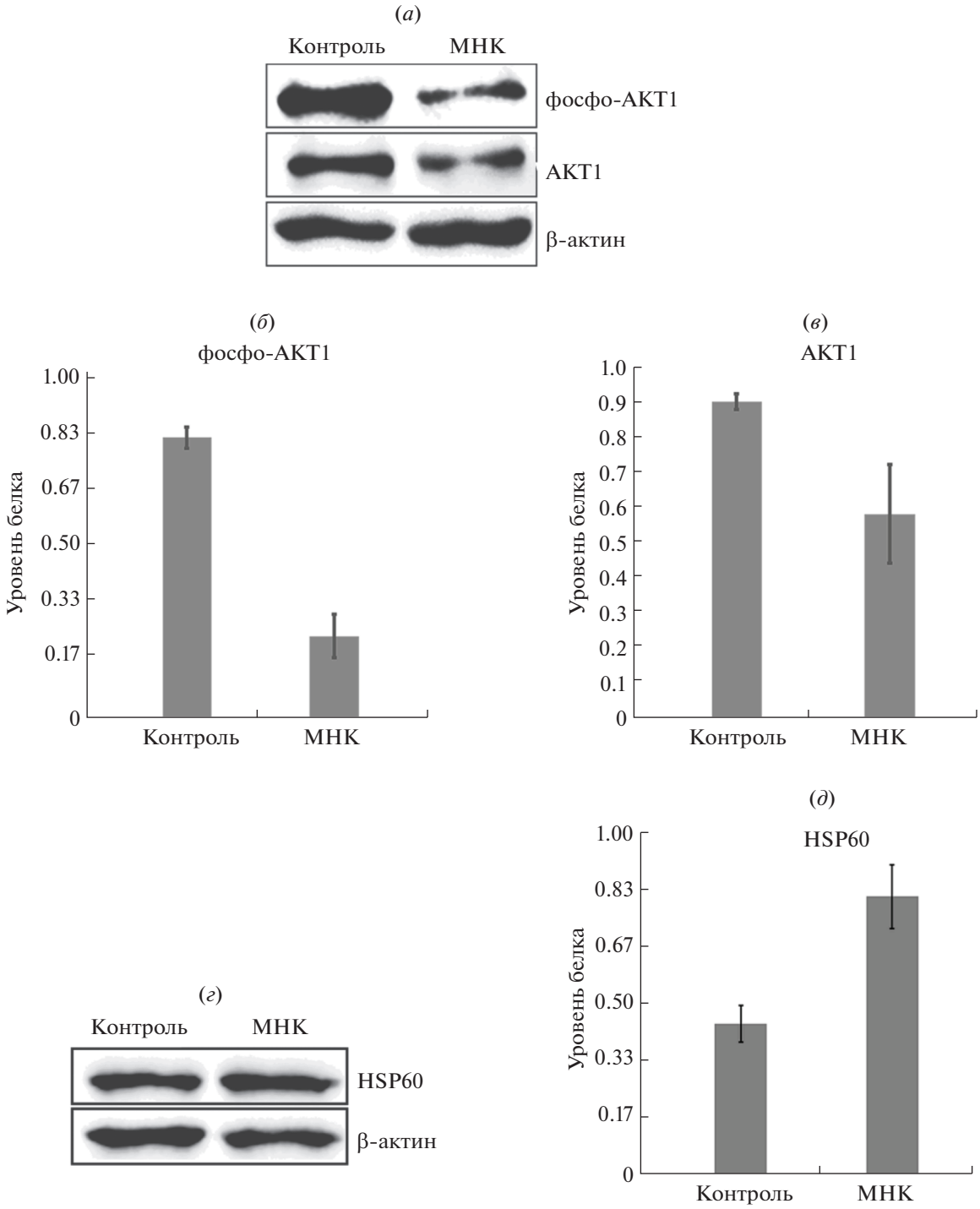


Рис. 7. Иммуноблот-анализ, документирующий изменения экспрессии белков в клетках LnCaP, обработанных МНК в концентрации IC_{50} (35 мкг/мл) в течение 96 ч. Методом иммуноблоттинга были определены количества фосфо-AKT1 (S473), общего AKT1 (*а*) и уровня общего белка HSP60 (*г*). В качестве контроля равного количества белков в каждой пробе использовали идентификацию β-актина. (*б*), (*в*), (*д*) – Денситометрический анализ сигналов иммуноблоттинга фосфо-AKT1 (S473), общего AKT1 и HSP60, нормализованных к уровню β-актина. Гистограммы представляют кратные изменения уровней экспрессии фосфо-AKT1 (S473), общего AKT1 и HSP60 в клетках, обработанных МНК, относительно контрольных клеток, обработанных DMSO. Планки погрешностей представляют ± s.d.

тального ингибирования трансляции, о чем свидетельствует выявленное двукратное повышение уровня HSP60 (рис. 7*г*, 7*д*) в МНК-обработанных клетках по сравнению с контрольными клетками. Следовательно, МНК обладает избирательным действием относительно AKT1 и не подавляет тотальный синтез белков.

Таким образом, в настоящем исследовании охарактеризована биологическая активность нового соединения – монасникотиновой кислоты (МНК), выделенной из гриба *A. cavernicola*. Кроме того, мы выяснили механизм, по которому МНК может контролировать рост и миграцию клеток рака предстательной железы человека посредством регуляции сигнальных путей AKT–mTOR, Src–FAK, c-Jun и HSP60. Эти данные закладывают основу для дальнейшего конструирования и синтеза производных МНК с оптимальными противоопухолевыми свойствами, которые будут сохранять способность ингибировать онкогенный путь AKT–mTOR без активации сигналов выживания опухолевых клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Условия выращивания штамма гриба и выделение МНК. Штамм гриба *A. cavernicola* ВКМ F-906 был получен из фонда Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН. Штамм выращивали в среде следующего состава (г/л дистиллированной воды): маннит – 50.0; янтарная кислота – 5.4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.3; KH_2PO_4 – 1.0; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.0044, pH доводили 25%-ным раствором NH_4OH до значения 5.4. Засев сред осуществляли водной споровой суспензией (1–2 × 10^6 конидий/мл) 14-суточных культур, выращенных на поверхности скошенного мальц-агара. Штамм культивировали при (24 ± 1)°C в колбах объемом 750 мл в 150 мл жидкой среды в течение 11 сут. Выделение МНК проводили, как описано ранее [7]. Для изучения биологической активности МНК на клеточных культурах человека кристаллизованный метаболит растворяли в стерильном DMSO (Sigma, Германия) в концентрациях 10–50 мг/мл.

Клетки. Клетки рака предстательной железы человека LnCaP культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 50 мкг/мл стрептомицина и пенициллина и 0.3 г/л глутамина (ПанЭко, Россия). Клетки инкубировали при 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO_2. Микроскопические наблюдения клеток проводили на микроскопе MICROMED E-LUME (Микромед, Россия).

Антитела. Моноклональные антитела мыши (анти-AKT1 (Santa Cruz Biotechnology, США) и анти-β-актин, конъюгированные с пероксидазой (Sigma, Германия)) и антитела кролика (анти-фосфо-AKT1 (S473) (D9E) (Cell Signaling Technology, США) и анти-HSP60 (Cloud Clone Corp., США)) использовали в качестве первичных антител для иммуноблоттинга. Конъюгированные с пероксидазой антитела против иммуноглобулинов мыши (H&L, goat) и кролика (H&L, goat) (Rockland, США) использовали в качестве вторичных антител для визуализации белка методом вестерн-блоттинга.

Анализ клеточной пролиферации. Все эксперименты проводили с использованием инструмента xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США). Сначала 100 мкл ростовой среды RPMI 1640 добавляли в лунки E-планшетов 16 (ACEA Biosciences, США) и помещали в прибор xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США) для измерения фонового сопротивления среды. Затем клетки LnCaP (10000 клеток/лунку) высевали в E-планшеты. Планшеты помещали в прибор xCELLigence для непрерывной регистрации сопротивления на электродах. Через 24 ч к клеткам добавляли 100 мкл ростовой среды RPMI, содержавшей либо DMSO (контроль), либо МНК в указанных концентрациях. Электрическое сопротивление регистрировали каждые 15 мин в течение 86 ч. Поскольку известно первоначальное количество клеток, внесенных в лунки E-планшетов, любое изменение их числа, возникающее во время инкубации, вызывает перемену электрического сопротивления. Относительное число клеток, прикрепленных к золотым электродам на дне лунок, представлено в виде КИ. Данные КИ также использовали для определения значений IC_{50} МНК.

В экспериментах по воздействию МНК в течение длительного времени клетки LnCaP (2 × × 10^5 клеток/лунку в 6-луночных планшетах) инкубировали с МНК (35 мкг/мл) или с DMSO (контроль) в течение 48 ч. Затем клетки высевали в свежую питательную среду с добавлением тех же концентрацией МНК или DMSO и инкубировали в течение следующих 48 ч. После общего времени обработки 96 ч клетки анализировали с помощью технологии xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США), как описано выше.

Мониторинг миграции клеток. Скорость миграции клеток контролировали в режиме реального времени с использованием технологии xCELLigence (CIM-планшеты, ACEA Biosciences, США). Клетки LnCaP (30000 клеток) помещали в бессывороточную среду, содержавшую DMSO или МНК в указанных концентрациях, и высевали в каждую лунку верхней части камеры CIM-планшета. Среду RPMI, содержавшую 5% FBS, вносили в каждую лунку нижней камеры. Сыворотку использовали в качестве хемоаттрактанта, который стимулирует миграцию клеток через пористую мембрану. Полное сопротивление каждой лунки

автоматически контролировалось каждые 10 мин в течение 24 ч и выражалось в виде значений КИ, отражающих количество клеток, которые мигрировали из верхней части камеры через мембрану в нижнюю часть камеры в среду, содержащую хемоаттрактант.

Определение клеточных мишеней действия МНК. Для идентификации клеточных сигнальных путей, на которые действует МНК, мы использовали набор ARY003 Proteome Profiler™ (R&D Systems, США), позволяющий одновременно определять относительный уровень фосфорилирования 46 киназ и белков, контролирующих жизнедеятельность клеток человека. Клетки LnCaP (2×10^5) обрабатывали МНК (35 мкг/мл) или DMSO (контроль) в течение 48 ч. Затем клетки высевали в свежую питательную среду с такими же концентрациями веществ. После 96 ч обработки клетки трижды промывали охлажденным фосфатным буфером, лизировали с использованием прилагаемого в наборе буфера для лизиса и определяли концентрацию белка с использованием стандартного метода анализа поглощения (BCA, Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные лизаты, полученные из обработанных МНК или контрольных клеток и содержавшие 300 мкг белка в 1 мл, наносили на мембраны с иммобилизованными антителами, специфичными к определенным клеточным белкам, и инкубировали в соответствии с инструкцией производителя. Интенсивность сигналов, соответствующих количеству связанных с антителами фосфорилированных белков, определяли после обработки мембран хемилюминесцентным реагентом и авторадиографии при помощи системы Fusion Fx (Vilber Lourmat, Франция). Программное обеспечение Studio Image Lite, версия 5.2 (LI-COR Biosciences, США) использовали для количественной оценки интенсивности сигналов.

Иммуноблот-анализ. Клетки LnCaP инкубировали в течение 96 ч в условиях, описанных выше для анализа клеточных мишеней. После обработки клетки промывали холодным фосфатным буфером и лизировали в присутствии 200 мкл буфера для лизиса (20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 100 мМ NaCl, 5 мМ EDTA) с добавлением ингибиторов протеаз (cocktail V, Calbiochem, Германия) и фосфатаз (10 мМ бета-глицерофосфат, 10 мМ ортованадат натрия, 10 мМ пирофосфат натрия и 5 мМ фторид натрия). Концентрацию белка измеряли с использованием набора BCA (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные белки (30 мкг) разделяли посредством 10%-ного SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad Laboratories, США). Затем мембраны инкубировали с реагентом, блокирующим неспецифическое связывание (5% обезжиренного молока в буфере TBST), и инкубировали с первичными антителами (разведение 1 : 1000 в растворе 5%-ного BSA в буфере TBST) в течение 16 ч. По окончании обработки мембраны промывали буфером TBST и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (разведение 1 : 5000 в растворе 5%-ного обезжиренного молока в буфере TBST). Иммунореактивность определяли с использованием хемилюминесцентного субстрата (Thermo Fisher Scientific, США), сигналы специфических белков визуализировали с помощью станции Fusion Fx (Vilber Lourmat, Франция). Относительные уровни экспрессии белка определяли денситометрией сигналов с использованием программного обеспечения Studio Image Lite (версия 5.2).

Статистическая обработка результатов. Эксперименты по анализу пролиферации и миграции клеток проводили в трех повторностях с использованием двух независимых выделений МНК. Статистическую значимость различий между двумя группами оценивали с использованием двустороннего критерия Стьюдента; все данные представлены как среднее ± s.d. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hyde K.D., Xu J., Rapior S., Jeewon R., Lumyong S., Niego A.G.T., Abeywickrama P.D., Aluthmuhandiram J.V.S., Brahamanage R.S., Brooks S., Chaiyasen A., Chethana K.W.T., Chomnunti P., Chepkirui C., Chuankid B., de Silva N.I., Doilom M., Faulds C., Gentekaki E., Gopalan V., Kakumyan P., Harishchandra D., Hemachandran H., Hongsanan S., Karunarathna A., Karunarathna S.C., Khan S., Kumla J., Jayawardena R.S., Liu J.-K, Liu N., Luangharn T., Macabeo A.P.G., Marasinghe D.S., Meeks D., Mortimer P.E., Mueller P., Nadir S., Nataraja K.N., Nontachaiyapoom S., O'Brien M., Penkhrue W., Phukhamsakda C., Ramanan U.S., Rathnayaka A.R., Sadaba R.B., Sandargo B., Samarakoon B.C., Tennakoon D.S., Siva R., Sriprom W., Suryanarayanan T.S., Sujarit K., Suwannarach N., Suwunwong T., Thongbai B., Thongklang N., Wei D., Wijesinghe S.N., Winiski J., Yan J., Yasanthika E., Stadler M.* // Fungal Diversity. 2019. V. 97. P. 1–136. https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9
2. *Chen W., Chen R., Liu Q., He Y., He K., Ding X., Kang L., Guo X., Xie N., Zhou Y., Lu Y., Cox R.J., Molnár I., Li M., Shaoa Y., Chen F.* // Chem. Sci. 2017. V. 8. P. 4917–4925. https://doi.org/10.1039/c7sc00475c
3. *Lebeau J., Venkatachalam M., Fouillaud M., Petit T., Vinale F., Dufossé L., Caro Y.* // J. Fungi. (Basel). 2017.

V. 28. P. E34.
https://doi.org/10.3390/jof3030034
4. *Patakova P.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 40. P. 169–181.
https://doi.org/10.1007/s10295-012-1216-8
5. *Hsu L.C., Hsu Y.W., Liang Y.H., Liaw C.C., Kuo Y.H., Pan T.M.* // Molecules. 2012. V. 17. P. 664–673.
https://doi.org/10.3390/molecules17010664
6. *Samson R.A., Varga J., Meijer M., Frisvad J.C.* // Studies in Mycology. 2011. V. 69. P. 81–97.
https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.06
7. *Antipova T.V., Zaitsev K.V., Zherebker A.Ya., Tafeenko V.A., Baskunov B.P., Zhelifonova V.P., Ivanushkina N.E., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Kozlovsky A.G.* // Mendeleev Commun. 2018. V. 28. P. 55–57.
https://doi.org/10.1016/j.mencom.2018.01.018
8. *Wu M.D., Cheng M.J., Yech Y.J., Chen Y.L., Chen K.P., Chen I.S., Yang P.H., Yuan G.F.* // Molecules. 2011. V. 16. P. 4719–4727.
https://doi.org/10.3390/molecules16064719
9. *Negi A., Gill B.S.* // PharmaTutor. 2013. V. 1. P. 45–53.
10. *Soldatenkov A., Koladina N.M., Shendrik I.V.* // Fundamentals of Organic Chemistry of Medicinal Substances. M: Chemistry, 2001. 192 p.
11. *Zaki R.M., Kamal El-Dean, Radwan S.M., Ammar M.A.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 85–96.
https://doi.org/10.1134/S1068162020010148
12. *Manning B.D., Toker A.* // Cell. 2017. V. 169. P. 381–405.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001
13. *Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A.* // Nature. 1995. V. 378. P. 785–789.
https://doi.org/10.1038/378785a0
14. *Kankanamalage S.G., Karra A.S., Cobb M.H.* // Cell Commun. Signal. 2018. V. 16. P. 72.
https://doi.org/10.1186/s12964-018-0287-1
15. *Gibbons J.J., Abraham R.T., Yu.K.* // Semin. Oncol. 2009. V. 36. P. 3–17.
https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2009.10.011
16. *Calalb M.B., Polte T.R., Hanks S.K.* // Mol. Cell Biol. 1995. V. 15. P. 954–963.
https://doi.org/10.1128/MCB.15.2.954
17. *Martin G.S.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001. V. 2. P. 467–475.
https://doi.org/10.1038/35073094
18. *Cox B.D., Natarajan M., Stettner M.R., Gladson C.L.* // J. Cell Biochem. 2006. V. 99. P. 35–52.
https://doi.org/10.1002/jcb.20956
19. *Summy J.M., Gallick G.E.* // Cancer Metastasis Rev. 2003. V. 22. P. 337–358.
20. *Bolós V., Gasent J.M., López-Tarruella S., Grande E.* // Onco Targets Ther. 2010. V. 3. P. 83–97.
https://doi.org/10.2147/OTT.S6909
21. *Shaulian E., Karin M.* // Oncogene. 2001. V. 20. P. 2390–2400.
https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204383
22. *Cappello F., Conway de Macario E., Marasà L., Zummo G., Macario A.J.L.* // Cancer Biol. Therapy. 2008. V. 7. P. 801–809.
https://doi.org/10.4161/cbt.7.6.6281
23. *Dunn C., Wiltshire C., MacLaren A., Gillespie D.A.* // Cell Signal. 2002. V. 14. P. 585–593.
https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00275-3
24. *Shan Y.X., Liu T.J., Su H.F., Samsamshariat A., Mestril R., Wang P.H.* // J. Mol. Cell. Cardiol. 2003. V. 35. P. 1135–1143.
25. *Kim W., Ryu J., Kim J.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 131.
https://doi.org/10.3390/ijms20010131
26. *Ghosh J.C., Dohi T., Kang B.H., Altieri D.C.* // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 5188–5194.
https://doi.org/10.1074/jbc.M705904200
27. *Holz M.K., Ballif B.A., Gygi S.P., Blenis J.* // Cell. 2005. V. 123. P. 569–580.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024

Antitumor Activity of Monasnicotinic Acid, Isolated from Fungus *Aspergillus cavernicola*

G. K. Rystsov*, **, T. V. Antipova*, K. V. Zaitsev*, and M. Yu. Zemskova*, **, #**

#Phone: +7 (929) 913-27-56; e-mail: mzemskova@ibpm.pushchino.ru

**Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

***Moscow State Regional University, ul. Very Voloshinoi, Mytishchi, Moscow region, 141014 Russia*

****Moscow State University, Leninskye Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia*

It was found that monasnicotinic acid (MNA) isolated from fungus *Aspergillus cavernicola* VKM F-906 reduces the proliferation and migration of prostate cancer cells LnCaP and inhibits the AKT–mTORC1 and FAK–Src signaling pathways. However, MNA also increases the level of HSP60 and phosphorylation of c-Jun, the factors stimulating the vital activity of cancer cells. MNA-induced cellular responses appear only after 48 h, which implies the participation of either the products of MNA metabolism or tautomers arising during protonation of MNA because of the cell growth and utilization of the compound by human cells. These results suggest MNA be a promising compound for the production of various derivatives with enhanced inhibitory properties and without stimulation of pro-survival signaling pathways of tumor cells.

Keywords: monasnicotinic acid, *Aspergillus cavernicola*, *prostate cancer cells*, *antitumor activity*, *AKT–mTORC1 signaling pathway*, *xCELLigence*

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2021, том 47, № 1, с. 173–176

ПИСЬМО РЕДАКТОРУ

УДК 547.782

СТИРОЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИНДОЛА И ПИРАНОНА КАК ФЛУОРОГЕННЫЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ БЕЛКА FAST

© 2021 г. А. И. Соколов*, И. Н. Мяснянко*, Н. С. Балеева*,#, М. С. Баранов*, **

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

***Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1*

Поступила в редакцию 07.07.2020 г.
После доработки 10.07.2020 г.
Принята к публикации 13.07.2020 г.

Синтезированы стирольные производные индола и пиранона. Исследована возможность их использования в качестве флуорогенов для белка FAST. Установлено, что производные индола не проявляют заметных флуорогенных свойств, в то время как производные пиранона демонстрируют высокую флуорогенность – их связывание с белком приводит к усилению флуоресценции и смещению максимумов эмиссии в длинноволновую область.

Ключевые слова: флуорогены, флуороген-активирующие белки, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342321010231

Генетически-кодируемые метки давно и активно используются во флуоресцентной микроскопии. В последнее время помимо традиционных флуоресцентных белков в подобной роли все чаще используются так называемые флуороген-активирующие белки [1–3]. Взаимодействие этих белков с флуорогенами – низкомолекулярными соединениями, которые в свободном виде не имеют выраженной флуоресценции – приводит к образованию флуоресцентного комплекса [4]. В отличие от флуоресцентных белков, такие белки можно использовать в отсутствие кислорода, и им не требуется дополнительного времени для созревания. Довольно часто заметные флуорогенные свойства проявляют соединения, имеющие в своей структуре подвижный заместитель, фиксация которого приводит к росту квантового выхода флуоресценции. Например, некоторые производные хромофора GFP и родственные им роданины, содержащие подвижный бензилиденовый фрагмент, были успешно применены в качестве флуорогенов для белка FAST [5–8]. Также в роли флуорогенов довольно часто выступают красители, содержащие подвижные стирольные заместители [9–11].

В настоящей работе в качестве потенциальных флуорогенных красителей для белка FAST мы предложили стирольные производные индола и пиранона. Такие соединения были получены с помощью конденсации ароматических альдегидов с исходными метил-3*H*-индолия перхлоратом (**I**) и метил-2*H*-пираноном (**VI**) в присутствии основания (схема 1).

Изучение оптических свойств показало, что полученные соединения характеризуются схожими свойствами. Производные индола (**II**) и (**III**), как и производные пиранона (**VII**) и (**VIII**), имеют максимумы абсорбции в области ~350 и ~500 нм для нейтральных и анионных форм соответственно (табл. 1). Также они характеризуются слабой флуоресценцией в области 500–600 нм в фосфатном буфере (с квантовым выходом <1%).

Было установлено, что добавление белка FAST в растворы производных пиранона (**VII**) и (**VIII**) приводит к усилению флуоресценции в 20–30 раз, а также батохромному сдвигу максимумов эмиссии на 50 нм (рис. 1). Напротив, производные индола (**II**) и (**III**) никак не реагировали на присутствие этого белка (рис. 1).

Таким образом, можно заключить, что стирольные производные пиранона могут быть использованы в качестве основы для создания флуорогенных красителей для белка FAST, в то время как индольные производные в подобной роли не перспективны.

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок; FAST – Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag.

#Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).

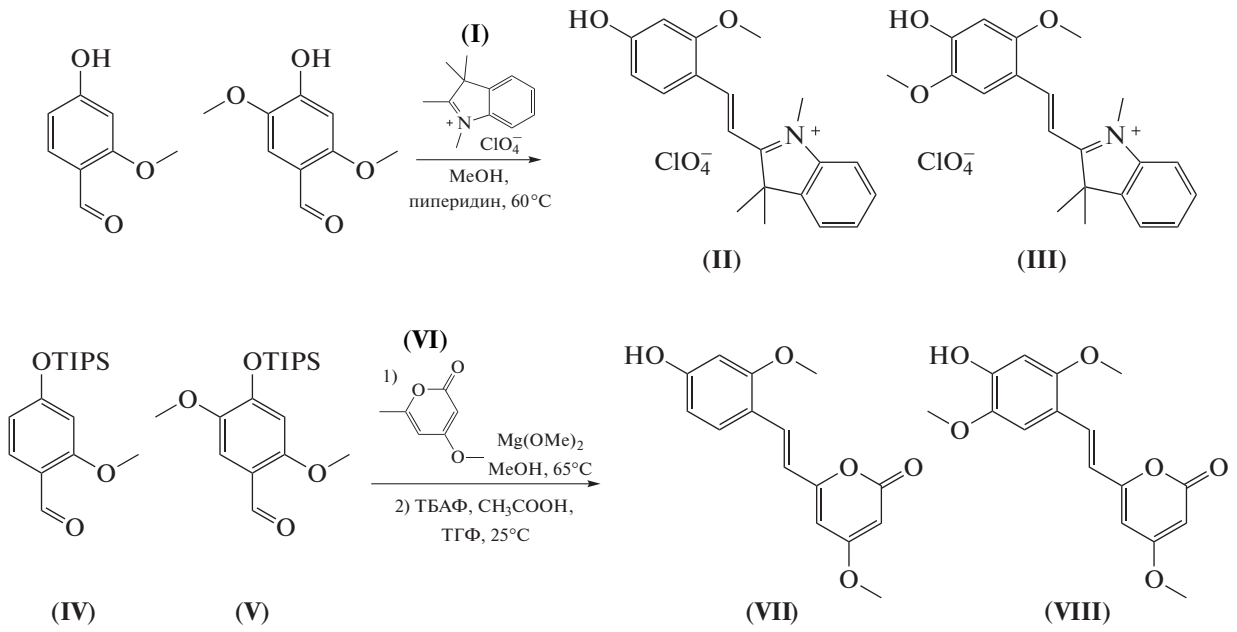


Схема 1. Схема синтеза производных **(II)**, **(III)**, **(VII)** и **(VIII)**.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР (δ, м.д.; *J*, Гц) зарегистрированы на приборе Bruker Avance III (700 МГц, США) при 303 K в DMSO-d_6 (внутренний стандарт – Me_4Si). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio (США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Температуры плавления определены на приборе SMP 30 (Великобритания) и не исправлены. Масс-спектры высокого разрешения записаны на приборе Bruker micrOTOF II, ионизация электрораспылением.

Препарат выделенного белка FAST получен согласно методике, описанной ранее [7].

Перхлораты *E*-2-(4-гидроксистирил)-1,3,3-триметил-3*H*-индолия. Соответствующий ароматический альдегид (1 ммоль), перхлорат 1,2,3,3-тетраметил-3*H*-индолия (1.05 ммоль, 271 мг) и пиперидин (0.05 ммоль) растворяли в метаноле (10 мл) и перемешивали при 60°C в течение 4 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, выпавший осадок отфильтровывали, промывали метанолом (3 × 3 мл) и диэтиловым эфиром (3 × 5 мл). Полученный продукт сушили под вакуумом.

Перхлорат *E*-2-(4-гидрокси-2-метоксистирил)-1,3,3-триметил-3*H*-индолия (II). Оранжевый порошок (346 мг, 85%); т. пл. ~ 200°C с разложением; ^{1}H-ЯМР: 11.05 (с, 1H), 8.41 (д, J_2 16.2, 1H), 8.11 (д, J_2 8.6, 1H), 7.78–7.84 (м, 2H), 7.65–7.50 (м, 2H), 7.48 (д, J_2 16.0, 1H), 6.56–6.62 (м, 2H), 4.01 (с, 3H), 3.97 (с, 3H), 1.73 (с, 6H); ^{13}C-ЯМР: 181.1, 165.8, 162.4, 148.2, 142.7, 141.9, 133.1, 128.8, 128.4, 122.6, 114.8, 114.3, 109.7, 108.5, 99.3, 56.2, 51.2, 33.6, 26.3; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 308.1651; рассчитано для $C_{20}H_{22}NO_2^+$, $[M]^+$ 308.1645.

Таблица 1. Оптические свойства соединений **(II)**, **(III)**, **(VII)** и **(VIII)** в свободном виде и в составе комплекса с белком FAST

Соединение	Абсорбция в свободном виде, нм			Комплекс с белком FAST (фосфатный буфер, pH 7)	
	ацетонитрил		фосфатный буфер, pH 7		
	нейтр.	анион.		абсорбция, нм	эмиссия, нм
(II)	350	520	529	530	550
(III)	360	505	549	550	575
(VII)	368	477	372	480	550
(VIII)	385	502	383	500	595

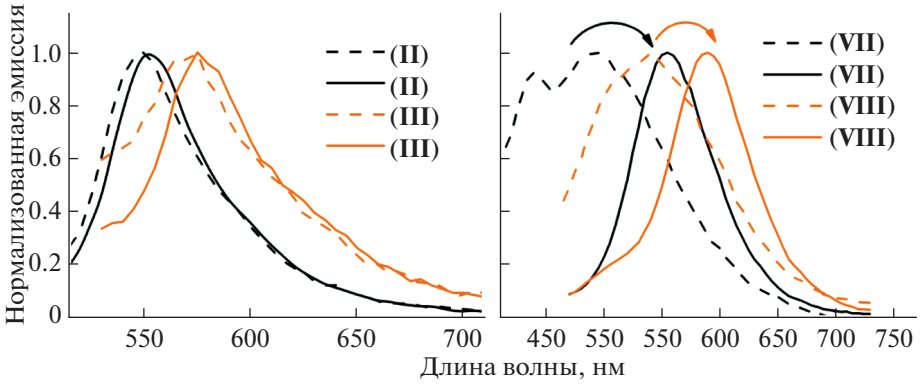


Рис. 1. Нормализованные спектры испускания соединений (**II**), (**III**), (**VII**) и (**VIII**) в свободном виде (пунктир) и в составе комплекса с белком (сплошная) в фосфатном буфере.

Перхлорат *E*-2-(4-гидрокси-2,5-диметоксистирил)-1,3,3-триметил-3*H*-индолия (III). Красный порошок (275 мг, 63%); т. пл. около 200°C с разложением; ^{1}H-ЯМР: 10.91 (ущ.с., 1H), 8.44 (д, J_2 16.0, 1H), 7.81 (д, J_2 7.4, 1H), 7.79 (д, J_2 7.8, 1H), 7.67 (с, 1H), 7.59 (т, J_2 7.7, 1H), 7.54 (т, J_2 7.3, 1H), 7.43 (д, J_2 16.0, 1H), 6.65 (с, 1H), 4.02 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 3.88 (с, 3H), 1.73 (с, 6H); ^{13}C-ЯМР: 180.8, 157.7, 156.3, 147.8, 143.0, 142.7, 141.9, 128.8, 128.2, 122.6, 114.2, 113.9, 112.8, 108.1, 100.2, 56.7, 56.6, 51.1, 33.5, 26.5; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 338.1761; рассчитано для $C_{21}H_{24}NO_3^+$, $[M]^+$ 338.1751.

4-((Триизопропилсилил)окси)бензальдегиды. Соответствующий 4-гидроксибензальдегид (3 ммоль), триизопропилсилил хлорид (3.3 ммоль, 0.7 мл), диизопропилэтиламин (3.6 ммоль, 0.63 мл) и имидазол (0.3 ммоль, 20 мг) растворяли в ТГФ (25 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (20 мл). Органический слой промывали насыщенным раствором хлорида натрия (50 мл), высушивали над безводным Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Полученный продукт дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент – гексан–этилацетат, 9 : 1).

2-Метокси-4-((триизопропилсилил)окси)бензальдегиды (IV). Бесцветное масло (924 мг, 99%); ^{1}H-ЯМР: 10.18 (с, 1H), 7.64 (д, J_2 8.2, 1H), 6.52–6.57 (м, 2H), 3.87 (с, 3H), 1.35–1.00 (м, 21H); ^{13}C-ЯМР: 187.1, 163.3, 162.7, 129.8, 118.7, 112.1, 103.4, 55.8, 17.6, 12.0; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 309.1876; рассчитано для $C_{17}H_{29}O_3Si^+$, $[M + H]^+$ 309.1880.

2,5-Диметокси-4-((триизопропилсилил)окси)-бензальдегиды (V). Бесцветное масло (994 мг, 98%); ^{1}H-ЯМР: 10.19 (с, 1H), 7.22 (с, 1H), 6.60 (с, 1H), 3.83 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 1.35–1.00 (м, 21H); ^{13}C-ЯМР: 186.8, 157.6, 152.3, 144.9, 117.7, 109.5, 104.8, 56.2, 55.6, 17.6, 12.4; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 339.1980; рассчитано для $C_{18}H_{31}O_4Si^+$, $[M + H]^+$ 339.1986.

(*E*)-6-(4-Гидроксистирил)-4-метокси-2*H*-пиран-2-оны. Магний (9 ммоль, 216 мг) растворяли в безводном метаноле (7 мл). К полученному раствору по каплям прибавляли раствор соответствующего бензальдегида (3 ммоль) и 4-метокси-6-метил-2*H*-пиран-2-она (504 мг, 3,6 ммоль) в метаноле (5 мл). Реакционную смесь кипятили в течение 5 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и упаривали на роторном испарителе. Остаток растворяли в тетрагидрофуране (25 мг) и добавляли фторид тетрабутиламмония (940 мг, 3.6 ммоль) и уксусную кислоту (1 капля). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в хлороформе (10 мл), промывали насыщенным раствором хлорида натрия (30 мл), высушивали над безводным Na_2SO_4 и упаривали. Полученный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (элюент – хлороформ–метанол, 50 : 1).

(*E*)-6-(4-Гидрокси-2-метоксистирил)-4-метокси-2*H*-пиран-2-он (VII). Желтый порошок (30 мг, 4%); т. пл. 210–213°C; ^{1}H-ЯМР: 9.96 (с, 1H), 7.42–7.50 (м, 2H), 6.76 (д, J_2 16.2, 1H), 6.45 (д, J_2 2.3, 1H), 6.42 (дд, J_2 8.5, 2.3, 1H), 6.18 (д, J_2 2.3, 1H), 5.56 (д, J_2 2.3, 1H), 3.82 (с, 3H), 3.82 (с, 3H); ^{13}C-ЯМР: 171.1, 162.8, 160.5, 159.3, 158.9, 129.2, 128.6, 115.9, 114.7, 108.1, 99.7, 99.1, 87.8, 56.3, 55.4; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 275.0913; рассчитано для $C_{15}H_{15}O_5^+$, $[M + H]^+$ 275.0914.

(*E*)-6-(4-Гидрокси-2,5-диметоксистирил)-4-метокси-2*H*-пиран-2-он (VIII). Оранжевый порошок (37 мг, 4%); т. пл. 226–229°C; ^{1}H-ЯМР: 9.61 (уш.с., 1H), 7.51 (д, J_2 16.1, 1H), 7.21 (с, 1H), 6.81 (д, J_2 16.2, 1H), 6.54 (с, 1H), 6.15 (с, 1H), 5.56 (с, 1H), 3.82 (с, 3H), 3.78 (с, 6H); ^{13}C-ЯМР: 171.0, 162.7, 159.4,

153.0, 149.9, 142.0, 129.0, 115.9, 113.8, 111.1, 100.5, 99.5, 87.7, 56.4, 56.2, 55.8; HRMS (ESI) *m/z*: найдено M 305.1017; рассчитано для $C_{16}H_{17}O_6^+$, $[M + H]^+$ 305.1020.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 18-73-10105.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Schmidt B.A., Creeger Y., Fisher G.W., Zakel K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A., Woolford C.A., Yan Q., Vasilev K.V., Berget P.B., Bruchez M.P., Jarvik J.W., Waggoner A.* // Nat. Biotechnol. 2008. V. 26. P. 235–240. https://doi.org/10.1038/nbt1368
2. *Bruchez M.P.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2015. V. 27. P. 18–23. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.014
3. *Xu S., Hu H.Y.* // Acta Pharm. Sin. B. 2018. V. 8. P. 339–348. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.02.001
4. *Jullien L., Gautier A.* // Methods Appl. Fluoresc. 2015. V. 3. P. 042007. https://doi.org/10.1088/2050-6120/3/4/042007
5. *Plamont M.A., Billon-Denis R., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vriz S., Saux T., Jullien L., Gautier A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2016. V. 113. P. 497–502. https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113
6. *Li C., Plamont M. A., Sladitschek H. L., Rodrigues V., Aujard I., Neveu P., Saux T., Jullien L., Gautier A.* // Chem. Sci. 2017. V. 8. P. 5598–5605. https://doi.org/10.1039/C7SC01364G
7. *Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Gorbachev D.A., Malyshevskaya K.K., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S.* // Chem. Eur. J. 2019. V. 25. P. 9592–9596. https://doi.org/10.1002/chem.201901151
8. *Li C., Mourton A., Plamont M.A., Rodrigues V., Aujard I., Volovitch M., Le Saux T., Perez F., Vriz S., Jullien L., Joliot L., Gautier A.* // Bioconjugate Chem. 2018. V. 29. P. 1823–1828. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00180
9. *Shank N.I., Zanotti K.J., Lanni F.,Berget P.B., Armitage B.A.* // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 12960–2969. https://doi.org/10.1021/ja9016864
10. *Tan X., Constantin T.P., Sloane K.L., Waggoner A.S., Bruchez M.P., Armitage B.A.* // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 9001–9009. https://doi.org/10.1021/jacs.7b04211
11. *Senutovitch N., Stanfield R.L., Bhattacharyya S., Rule G.S., Wilson I.A., Armitage B.A., Waggoner A.S., Berget P.B.* // Biochem. 2012. V. 51. P. 2471–2485. https://doi.org/10.1021/bi201422g

Styrene Derivatives of Indole and Pyranone as Fluorogenic Substrates for FAST Protein

A. I. Sokolov*, I. N. Myasnyanko*, N. S. Baleeva*,#, and M. S. Baranov*, **

#Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

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

***Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia*

We report novel styrene derivatives of indole and pyranone. The possibility of their use as fluorogens for FAST protein were investigated. Derivatives of indole do not exhibit noticeable fluorogenic properties, while derivatives of pyranone exhibit superior fluorogenic potential – binding to a protein leads to increase fluorescence intensity and a emission red shift.

Keywords: fluorogens, fluorogen-activating proteins, fluorescence