

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи



Дорошенко Ирина Андреевна

**ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗАМЕЩЕННЫЕ КАРБОЦИАНИНЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ
СИНТЕТИЧЕСКОГО ДИЗАЙНА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК**

02.00.16 – Медицинская химия

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2021

Работа выполнена на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова

Научный руководитель – *Подругина Татьяна Александровна* – кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты – *Аверин Алексей Дмитриевич* – доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Химический факультет, Кафедра органической химии, ведущий научный сотрудник

Грин Михаил Александрович – доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО "МИРЭА–Российский технологический университет", заведующий кафедрой химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии

Козлов Алексей Вячеславович – кандидат химических наук, ИПХФ РАН, Отдел кинетики химических и биологических процессов, младший научный сотрудник лаборатории химической физики ферментов

Защита диссертации состоится «24» декабря 2021 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.06 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, дом 1, строение 3, МГУ, Химический факультет, ауд. 337.

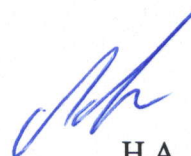
E-mail: *natalylozinskaya@mail.ru* (учёный секретарь)

doroshenkoiran@gmail.com (соискатель)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/408175887/>

Автореферат разослан «__» ноября 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Н.А. Лозинская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Современный уровень исследования процессов, происходящих в живых системах, требует эффективного мониторинга изменений в режиме реального времени. Такой подход к решению задач разного уровня сложности предполагает в качестве наиболее эффективного метода визуализации. С этой точки зрения удобным является использование молекул, способных к флуоресценции. Структура таких молекул должна определять свойства флуорофора, позволяющие регистрировать состояние системы и локализацию объекта визуализации в ходе эксперимента. Методы визуализации можно разделить на две группы, в зависимости от способа связывания флуорофора с целевым объектом: визуализация, подразумевающая предварительное ковалентное связывание флуорофора с наблюдаемой молекулой, и визуализация, при которой флуорофор нековалентно взаимодействует с целевыми молекулами. С этой точки зрения перспективными флуорофорами для визуализации являются карбоцианины. Карбоцианиновые красители представляют собой важный класс π -полиеновых сопряженных структур, сочетающих в своей структуре ароматические гетероциклические фрагменты и полиеновый фрагмент с делокализованным положительным зарядом. Уникальные фотофизические свойства карбоцианинов в различных средах и широком диапазоне длин волн поглощения и флуоресценции привели к их использованию в самых разнообразных областях аналитической химии, биологии и медицины для количественного мониторинга процессов в тканях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Еще одним фактором, определяющим эффективность использования карбоцианинов – их структурные особенности, позволяющие проводить разнообразные модификации структурных фрагментов, тем самым изменяя их фотофизические свойства. Несмотря на большую востребованность карбоцианиновых красителей, до настоящего времени единственным допущенным в клиническую практику карбоцианином является кардиогрин (ICG), что, несомненно, делает актуальным поиск перспективных карбоцианиновых красителей и создание основ структурного дизайна этого класса соединений для синтеза флуорофоров с заданными фотофизическими свойствами.

Цель работы.

Цель работы заключалась в синтетическом дизайне карбоцианиновых красителей за счет введения гидрофобных и гидрофильных заместителей, в том числе содержащих функциональные группы, в различные структурные фрагменты молекулы и изучении спектрально-кинетических и фотофизических свойств, способности проникновения через клеточную мембрану и цитотоксичности синтезированных карбоцианинов, а также ковалентных и нековалентных конъюгатов на их основе.

Достижение данной цели предполагало необходимость решения следующих задач:

- Разработка методологии синтеза карбоцианинов с учетом направления их структурной модификации: природы гетероцикла, длины полиметиновой цепи и природы заместителей в различных структурных фрагментах;
- Синтез на основе выбранной методологии нескольких серий новых три-, пента- и гептаметиновых карбоцианинов и их конформационно закрепленных производных на основе гетероциклов разной природы: хинолинов, индолинов, бензоиндолинов и бензотиазолов, содержащих гидрофобные и гидрофильные заместители при кватернизированных атомах азота;
- Исследование влияния проведенной направленной модификации структуры на фотофизические и спектрально-кинетические свойства карбоцианинов;
- Изучение эффективности нековалентного взаимодействия целевых красителей с транспортными белками и низкомолекулярными аналитами для определения их потенциала в качестве инструмента для визуализации;
- Создание ковалентных конъюгатов на основе синтезированных карбоцианинов с пептидами и антибиотиками для дальнейшего использования при изучении процессов их взаимодействия с клетками, а также в диагностике и терапии.

Научная новизна.

Впервые синтезирована серия симметричных и несимметричных карбоцианинов либо принадлежащих разным гетероциклическим системам, либо имеющих общее гетероциклическое ядро, но разные заместители

при кватернизированном атоме азота, либо имеющих различную длину полиметиновой цепи, в том числе конформационно закрепленных. Осуществлена модификация конформационно закрепленных трикарбоцианинов по мезо-положению полиметинового фрагмента с участием О- и N нуклеофилов, синтезированы конъюгаты на их основе с нефункциональными пептидами и показана возможность создания конъюгатов с проникающими пептидами. Впервые синтезированы симметричные и несимметричные трикарбоцианины, содержащие алкинильный фрагмент, как основа для создания конъюгатов с модифицированными антибиотиками с использованием клик-реакций.

Исследованы фотофизические свойства целевых карбоцианинов. Впервые с помощью полужесткого докинга определены сайты связывания синтезированных карбоцианинов с транспортными белками – сывороточными альбуминами и альфа-фетопротеином.

Впервые было показано, что эффективное нековалентное связывание с малыми молекулами хорошо обеспечивают карбоцианины бензоиндоленинового ряда, содержащие как гидрофильные группы COOH и SO_3^- , так и гидрофобный алкильный фрагмент, что делает возможным их использование в аналитических целях в качестве инструмента визуализации.

Установлено, что пентаметиновый карбоцианин с додецилкарбоксылными заместителями при кватернизированных атомах азота гетероциклов может быть успешно использован в качестве селективного флуоресцентного сенсора.

Найден путь создания перспективной основы для конъюгирования трикарбоцианинов с пептидными векторами. Установлено, что необходимой структурной базой для создания целевых конъюгатов с проникающими пептидами являются трикарбоцианины, модифицированные ω -аминокислотами по мезо-положению конформационно закрепленной полиметиновой цепи и содержащие не менее двух сульфонатных групп в заместителях при кватернизированных атомах азота индоленинового скаффолда.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработан подход к созданию широкого спектра структурных модификаций карбоцианинов с целью направленного синтеза флуорофоров как для ковалентного связывания с биомолекулами, так и для нековалентного взаимодействия с низкомолекулярными аналитами и транспортными белками. Выявлена зависимость способности целевых карбоцианинов к проникновению в клетки от природы заместителей в различных структурных фрагментах молекулы. Найден оптимальные комбинации липофильных и гидрофильных заместителей в карбоцианинах, определяющие цитотоксичность последних и селективность к проникновению в опухоли.

Впервые на основании определения спектрально-кинетических характеристик установлена возможность образования двух типов комплексов целевых карбоцианинов с транспортными белками и вычислены их константы связывания.

Впервые синтезированы серии индотрикарбоцианинов, конформационно закрепленных и со свободной полиметиновой цепью, содержащих фосфонатные заместители при кватернизированных атомах азота гетероцикла и установлено, что замена гидрофильных сульфонатных групп на фосфонатные не приводит к существенному изменению спектрально-кинетических характеристик. Установлено, что возможность поэтапного гидролиза фосфонатных групп влияет на возможность накопления в клетках: эффективность накопления уменьшается при переходе от диэтилфосфонатных производных к моноэфирам и затем к свободной фосфоновой кислоте.

На основании метода импульсного фотолиза было определено значение квантового выхода триплетного состояния Φ_T ($\Phi_T < 10^{-5}$) и показано, что все целевые карбоцианины не могут сенсibilизировать фотохимические процессы, то есть могут быть использованы как эффективные флуорофоры для визуализации.

Разработан подход к созданию конъюгатов на основе конформационно закрепленных индотрикарбоцианов с пептидами, обладающими антипролиферативной активностью.

Положения, выносимые на защиту.

- Выявленная зависимость методологии сборки карбоцианинов от направления их структурной модификации позволяет синтезировать три-, пента- и гептаметиновые флуорофоры и их конформационно закрепленные производные на основе гетероциклов разной природы: хинолинов, индоленинов,

бензоиндоленинов и бензотиазолов, содержащих гидрофобные и гидрофильные заместители при кватернизированных атомах азота.

- Оптимальной последовательностью для синтеза несимметричных карбоцианинов является проведение на первой стадии процесса конденсации с метиленовой компонентой, содержащей алкилсульфонатную группу при кватернизированном атоме азота, метиленовая компонента с гидрофобным заместителем вводится на второй стадии процесса.

- Разработанная методология синтеза ковалентных конъюгатов с пептидами на базе индоленина и бензиндоленина за счет нуклеофильного замещения атома хлора по мезо-положению полиметиновой цепи конформационно закрепленных карбоцианинов является основой для создания конъюгатов карбоцианинов с проникающими пептидами.

- Конъюгаты с нефункциональными пептидами, содержащие не менее двух алкилсульфонатных групп в заместителях при атоме азота гетероцикла не способны проникать через клеточную мембрану, что позволяет использовать их в качестве маркеров при исследовании механизмов действия проникающих пептидов.

- Анализ фотофизических и спектрально-кинетических характеристик карбоцианинов, проведенный на нескольких сериях карбоцианинов, в которых варьировались природа гетероцикла, величина полиметиновой цепи и природа заместителей в разных структурных фрагментах свидетельствует о том, что данные параметры существенно зависят от природы гетероциклического скаффолда и от длины полиметиновой цепи, и практически не зависят от характера заместителя при кватернизированном атоме азота, что и определяет направления модификации их структуры.

- Нековалентное связывание целевых карбоцианинов с транспортными белками происходит за счет неспецифических взаимодействий и приводит к образованию двух типов комплексов – со свободным флуорофором и с его агрегатом, причем взаимодействие со свободным карбоцианином является преобладающим. Величины констант связывания и времени жизни двух типов комплексов в большей степени зависят от природы заместителей в мезо-положении полиметиновой цепи, чем от природы заместителей при атоме азота гетероцикла.

- Нековалентное взаимодействие целевых красителей с низкомолекулярными аналитами эффективно осуществляется за счет процессов агрегации в мицеллярных растворах и может служить основой для создания инструментов визуализации малых молекул.

Личный вклад автора состоит в проведении анализа мировой литературы по основным направлениям работы, постановке синтетического эксперимента, решении актуальных задач оптимизации процессов модификации целевых соединений, включающих планирование, проведение синтеза и очистки карбоцианинов. Автор принимала непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, обработке и интерпретации полученных результатов, представлении ключевых результатов работы на конференциях, в подготовке материалов к публикации в научных журналах и в формулировании выводов. Также автор принимала участие в определении основных физико-химических параметров, в изучении сайтов связывания выбранных мишеней с помощью соответствующего ПО, в исследовании констант связывания с транспортными белками и анализе проведенных физико-химических экспериментов, в изучении взаимодействия карбоцианинов, содержащих карбоксильную группу, с низкомолекулярными аналитами, в проведении экспериментов по взаимодействию целевых конъюгатов с клетками и в исследовании биологической активности флуорофоров.

Апробация работы и публикации.

Основное содержание работы изложено в 19 публикациях в виде 7 статей в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых виртуальными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ, а также 12 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях.

Основные материалы работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на следующих конференциях: Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016», «Ломоносов – 2017», «Ломоносов-2020», «Ломоносов-2021» (Москва, Россия, 2016, 2017, 2020, 2021 гг.), Кластер конференций по органической химии «Оргхим-2016» (Санкт-Петербург, Россия, 2016), XX Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (Нижний Новгород, Россия, 2017), 3-я Российская

конференция по медицинской химии (Казань, Россия, 2017), V Всероссийская конференция с международным участием по органической химии (Владикавказ, Россия, 2018), 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry «MedChem Russia 2019» (Екатеринбург, Россия, 2019).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда - проект №14-13-00698, Гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ № НШ-5130.2014.3, № НШ-10268.2016.3, государственного задания № 121021000105-7 и гранта РФФИ № 20-03-00334.

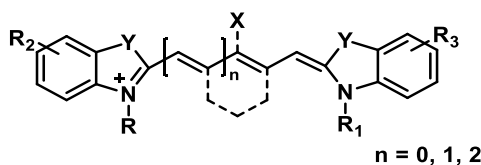
Структура и объем работы.

Материал диссертации изложен на 230 страницах машинописного текста и состоит из 7 разделов: включает введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы, список цитируемой литературы и приложение. Диссертационная работа содержит 67 рисунков, 40 таблиц и 102 схемы. Список литературы включает 149 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Расширение спектра задач, решаемых с использованием визуализации свидетельствует о том, что проблема поиска наиболее эффективных флуорофоров не становится менее актуальной. С этой точки зрения модификация универсального скаффолда карбоцианинов позволяет направленно создавать системы для эффективной визуализации сложных процессов. Задача настоящего исследования состояла в направленном синтезе симметричных и несимметричных три-, пента- и гептаметиновых карбоцианинов со свободной полиметиновой цепью, конформационно закрепленных трикарбоцианинов, включающих в свою структуру заместители различной природы, исследование их спектрально-кинетических характеристик и зависимости их свойств от структурных модификаций.

Схема 1



1. Синтез карбоцианинов

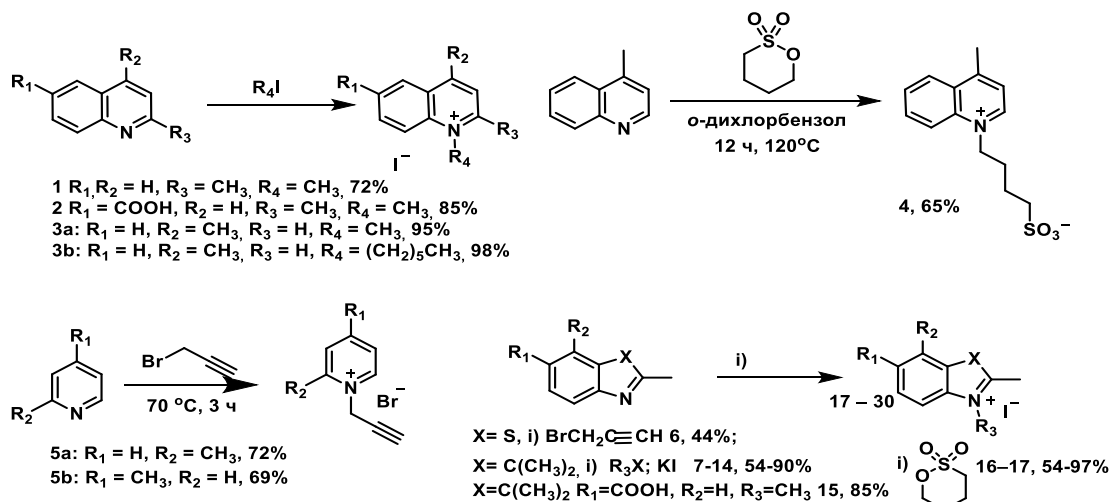
С точки зрения вариантов структурных модификаций карбоцианины представляют собой крайне перспективные модели, поскольку имеют несколько потенциальных центров модификации: гетероциклическое ядро, кватернизированный атом азота гетероцикла и для конформационно закрепленных трикарбоцианинов – мезо-положение полиметиновой цепи. Варьирование размера сопряженной системы флуорофора за счет длины полиметинового фрагмента карбонильных компонент, природы гетероцикла и гетероатома в мезо-положении позволяет менять область поглощения и флуоресценции в широких пределах.

1.1 Синтез гетероциклических солей.

Соли на основе азотсодержащих гетероциклов являются базовыми исходными соединениями в синтезе карбоцианинов, используемыми как в качестве метиленовой компоненты, так и для создания соответствующей карбонильной компоненты в синтезе несимметричных карбоцианинов.

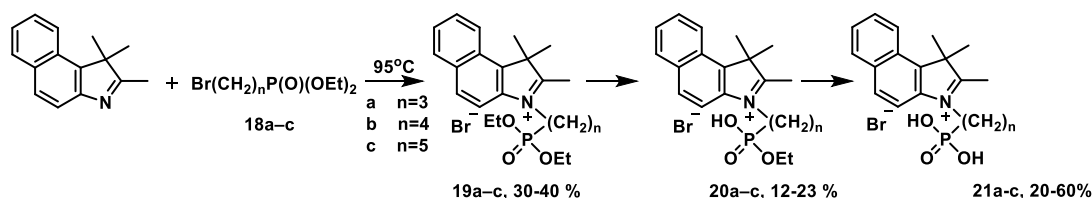
Для решения поставленных в данном исследовании задач был синтезирован ряд солей на основе гетероциклов разной природы, содержащих у атома азота алкильные группы, функциональные гидрофильные группы (алкилсульфонатные, алкилкарбоксилатные и алкилфосфонатные) и группы, содержащие алкинильный фрагмент. Соединения на основе метилхинолинов **1-4**, метилпиридинов **5a-b**, бензотиазола **6**, 2,3,3-триметил-3H-индола и 1,1,2-триметил-1H-бензо[e]индола **7-17** получали с использованием соответствующих алкилгалогенидов и сульфтона. Для большинства солей методики были модифицированы с целью увеличения выхода (Схема 2).

Схема 2



Фосфонатзамещенные соли **19a-c** получены алкилированием бензоиндоленина соответствующими ω -бромалкилфосфонатами **18a-c** (Схема 3).

Схема 3



Наиболее проблемным этапом синтеза четвертичных солей **19-21** являются процессы выделения и очистки. В процессе выделения происходит частичный гидролиз эфирных групп **20a-c**, что снижает выход целевых соединений. Полный гидролиз проводится нагреванием соответствующих эфиров в концентрированной бромоводородной кислоте (соли **21a-c**).

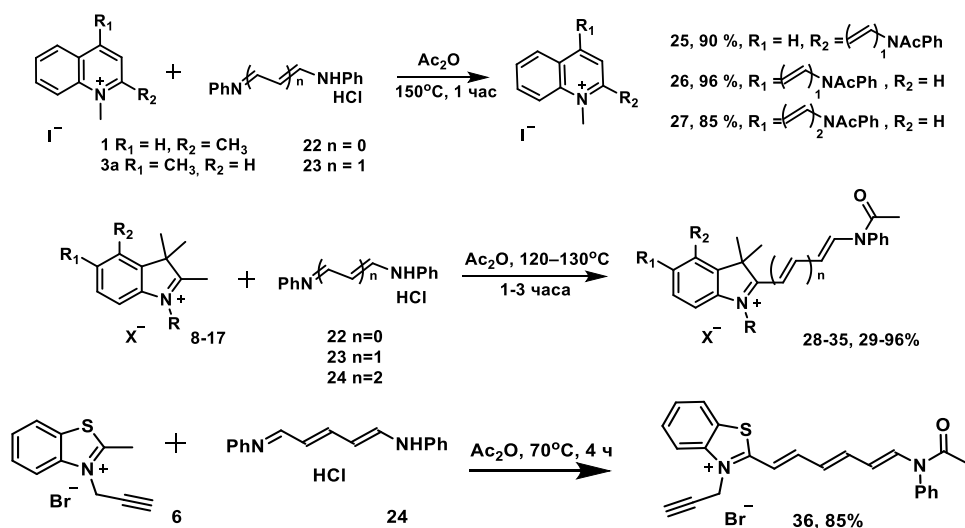
1.2 Синтез несимметричных карбоцианинов

Синтез несимметричных карбоцианинов предполагает проведение последовательно двух конденсаций дикарбонильной компоненты с двумя различными солями.

Монокарбонильные компоненты синтезировали на основе индолениновых, бензиндолениновых, тиазольных и метилхинолиновых гетероциклических солей.

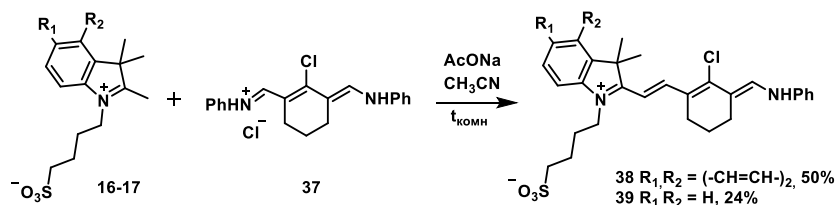
Сопряженные анилы **25-36** были синтезированы на основе солей **1, 3a, 6, 7-14, 16** и **17** (Схема 4).

Схема 4



Ряд монозамещенных анилов **38-39** необходимых для создания несимметричных конформационно закрепленных трикарбоцианинов был синтезирован исходя из дианила **37** (Схема 5).

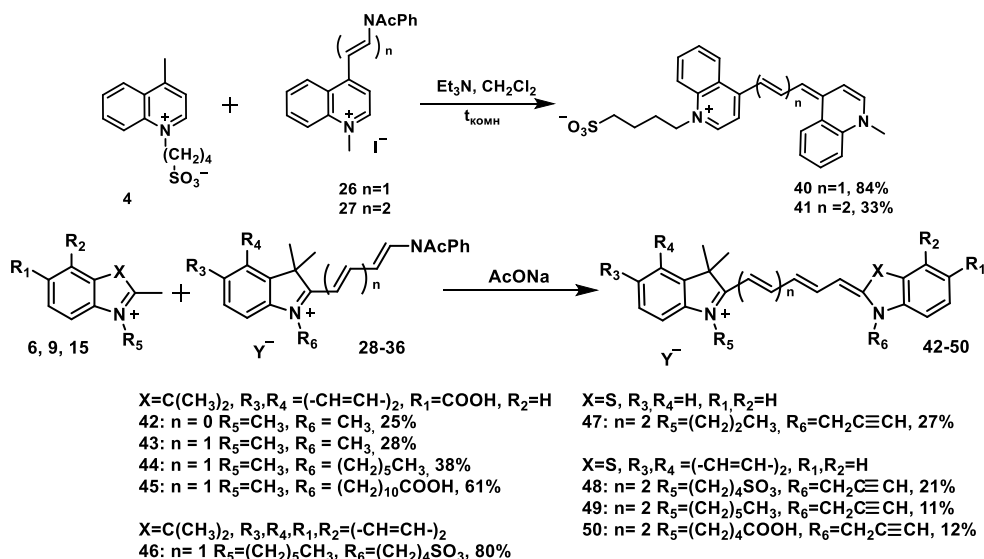
Схема 5



Было установлено, что наиболее устойчивыми являются конформационно закрепленные моноанилы на основе индоленина и бензоиндоленина с алкилсульфонатными группами.

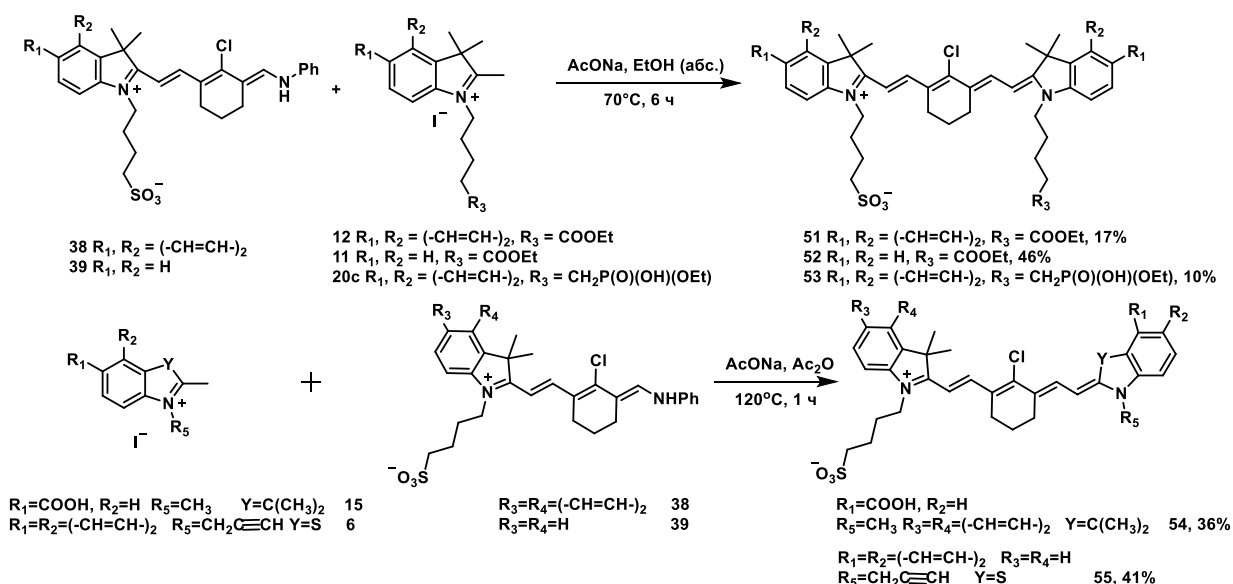
Синтезированные карбонильные компоненты **26-36** были введены в реакцию конденсации с целью получения несимметричных карбоцианинов, дикарбоцианинов и трикарбоцианинов на основе солей пиридинов, хинолинов, индоленинов и бензоиндоленинов (Схема 6).

Схема 6



На основе полученных конформационно закрепленных монокарбонильных компонент **38** и **39** были синтезированы несимметричные красители **51-55** (Схема 7).

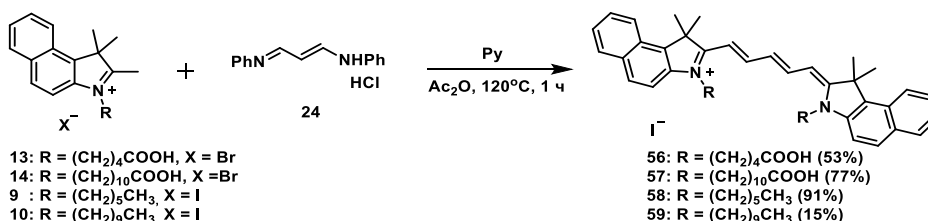
Схема 7



1.3 Синтез симметричных карбоцианиновых красителей

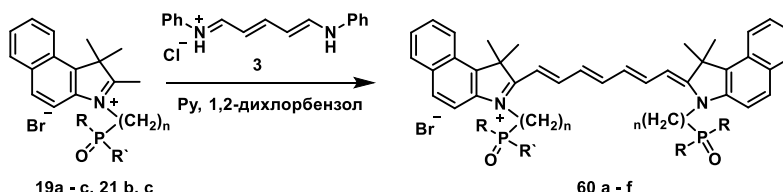
Симметричные пентаметиновые карбоцианины **56-59** были синтезированы для последующего изучения их комплексообразования с аналитами из соответствующих бензоиндолениниевых солей **13, 14, 9, 10** (Схема 8).

Схема 8



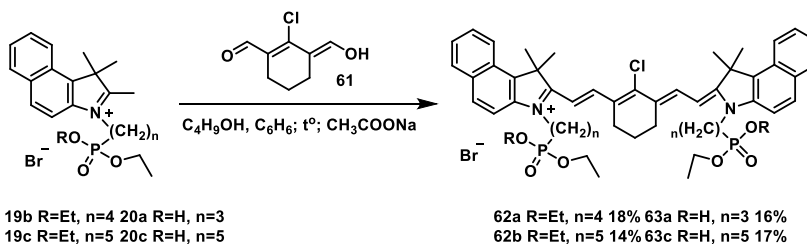
Синтез серии фосфонатных аналогов ICG **60a-f** был осуществлен на основе солей **19a-c** и **21b,c** с приемлемыми выходами (30—50%) (Схема 9).

Схема 9



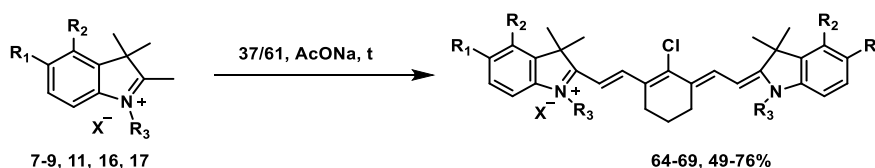
В рамках данного исследования было показано, что конформационно закрепленные карбоцианины с фосфонатными группами образуются с лучшими выходами при использовании в качестве карбонильной компоненты диальдегида **60** (Схема 10).

Схема 10



Серия симметричных трикарбоцианинов **64, 65, 68, 69** и неописанных ранее **66, 67** была синтезирована путем одностадийной конденсации солей **7-9, 11, 16, 17**, выступающих в качестве метиленовых компонент, с дианилом **37** или диальдегидом **61**, в качестве карбонильных компонент (Схема 11).

Схема 11



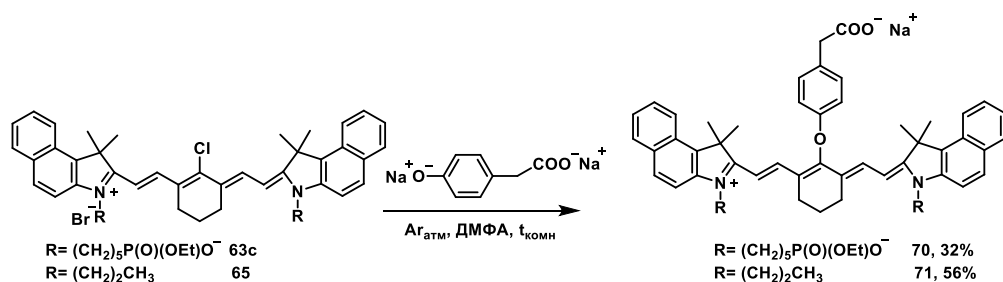
1.4 Синтез конформационно закрепленных трикарбоцианиновых красителей, модифицированных по мезо-положению

Модификация конформационно закрепленных трикарбоцианинов по мезо-положению полиметиновой цепи актуальна в случае необходимости дальнейшей функционализации красителя с целью создания ковалентных конъюгатов за счет образования пептидной связи, либо осуществления клик-реакции.

1.4.1 Введение О-нуклеофила по мезо-положению

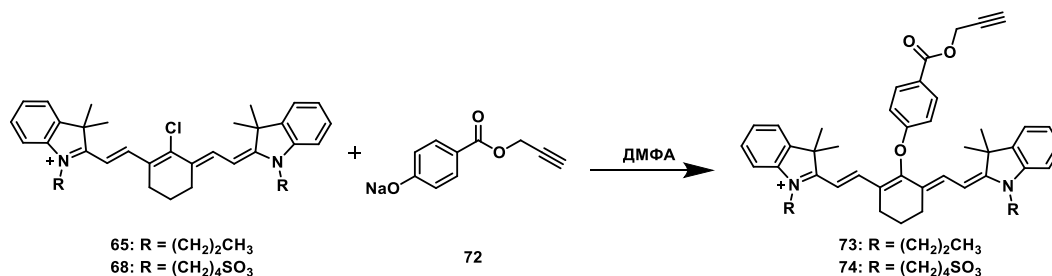
В настоящем исследовании синтезированные конформационно закрепленные флуорофоры **63c, 65, 68** были модифицированы по мезо-положению производными *l*-гидроксифенилуксусной, пара-гидроксibenзойной кислот. Синтез неописанных ранее соединений **70** и **71** был осуществлён с выходом 32% и 56%, соответственно (Схема 12).

Схема 12



Пропаргильный эфир *n*-гидроксibenзойной кислоты **72** был использован в виде фенолята для дальнейшей модификации красителей **65**, **68** по мезо-положению. В результате проведенных реакций были получены красители **73**, **74** (Схема 13).

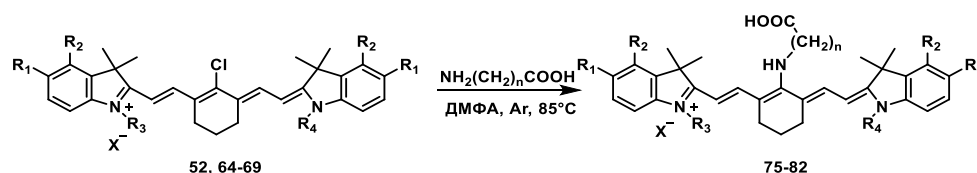
Схема 13



1.4.2 Введение N-нуклеофила по мезо-положению

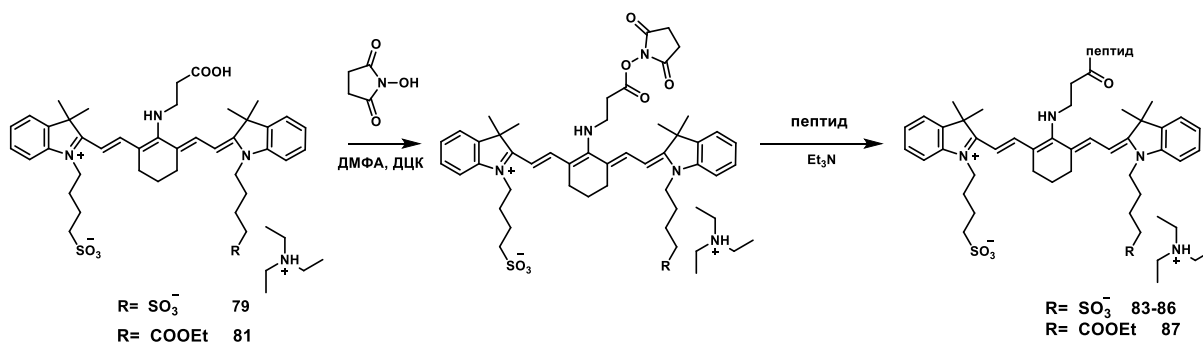
В рамках данного исследования с целью выявления зависимости эффективности проникновения флуорофора в клетку от строения молекулы карбоцианина была синтезирована серия трикарбоцианинов, модифицированных ω -аминокислотами: **75-82** (Схема 14). Введение N-нуклеофила в мезо-положение трикарбоцианина приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения в электронных спектрах поглощения, в связи с чем контроль прохождения реакции осуществляли по исчезновению максимума поглощения в области 780-825 нм и появлению максимума поглощения в области 625-660 нм.

Схема 14



На основе соединений **79** и **81** была получена серия неописанных ранее конъюгатов **83-87** с разными нефункциональными пептидами для отработки методологии синтеза конъюгатов с пептидами (Схема 15).

Схема 15

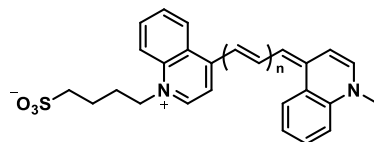


2. Спектрально-кинетические свойства карбоцианинов

Все структурные типы карбоцианинов, синтезированные в данном исследовании, были охарактеризованы основными спектрально-кинетическими параметрами.

Природа периферийного гетероцикла достаточно существенно влияет на область поглощения и флуоресценции карбоцианинов. Карбоцианины **40** и **41** на основе 4-метилхинолина, представленные на схеме 16 имеют максимумы поглощения при 705 и 814 нм, соответственно.

Схема 16



40 $n=1$ $\lambda_{\text{abs}} = 705$ нм, $\lambda_{\text{fl}} = 734$ нм, стоксов сдвиг 560 см^{-1} ; **41** $n=2$ $\lambda_{\text{abs}} = 814$ нм, $\lambda_{\text{fl}} = 839$ нм, стоксов сдвиг 366 см^{-1}

Максимумы поглощения карбоцианинов на основе бензоиндоленина и индоленина расположены в более коротковолновой области спектра, по сравнению с хинолиновыми аналогами (Схема 17, Таблица 1).

Схема 17

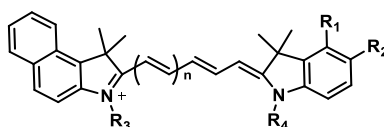


Таблица 1. Максимум поглощения и флуоресценции карбоцианинов **42-45, 57, 58** в этаноле.

№	R ₁ , R ₂	R ₃	R ₄	n	λ_{abs} , нм	λ_{fl} , нм	Стоксов сдвиг, см^{-1}
42	R ₃ =H, R ₄ =COOH	CH ₃	CH ₃	0	585	601	455
43	R ₃ =H, R ₄ =COOH	CH ₃	CH ₃	1	660	690	659
44	R ₃ =H, R ₄ =COOH	(CH ₂) ₅ CH ₃	CH ₃	1	663	695	694
45	R ₃ =H, R ₄ =COOH	(CH ₂) ₁₀ COOH	CH ₃	1	663	688	548
57	(-CH=CH-) ₂	(CH ₂) ₁₀ COOH	(CH ₂) ₁₀ COOH	1	684	730	921
58	(-CH=CH-) ₂	(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₅ CH ₃	1	680	720	817

Несмотря на то, что хромофорная система в карбоцианинах **60a,b,d-f** полностью идентична структуре **ICG**, мы наблюдаем небольшой гипсохромный сдвиг максимума поглощения на 10 нм при том же значении максимума флуоресценции, что, в свою очередь, приводит к увеличению Стоксова сдвига в полтора раза (Схема 18, Таблица 2), а коэффициента экстинкции в два (1.2×10^5 для **ICG** и 2.7×10^5 для фосфонатных аналогов). Возможно, это связано с разной способностью данных соединений к агрегации в растворе.

Схема 18

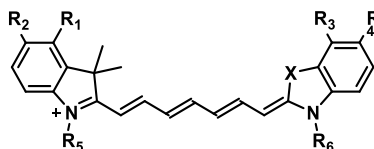


Таблица 2. Фотофизические свойства карбоцианинов **ICG, 60a-f, 47-50** в метаноле.

№	R ₁ , R ₂	R ₃ , R ₄	X	R ₅	R ₆	λ_{abs} , нм	λ_{fl} , нм	Стоксов сдвиг, см^{-1}
ICG	(-CH=CH-) ₂	(-CH=CH-) ₂	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	794	808	218
60a-b	(-CH=CH-) ₂	(-CH=CH-) ₂	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) _n P(O)(OEt) ₂	(CH ₂) _n P(O)(OEt) ₂	785	805	317
60d-e	(-CH=CH-) ₂	(-CH=CH-) ₂	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) _n P(O)(OH) ₂	(CH ₂) _n P(O)(OH) ₂	785	805	317
60f	(-CH=CH-) ₂	(-CH=CH-) ₂	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₅ P(O)(OEt)(OH)	(CH ₂) ₅ P(O)(OEt)(OH)	785	805	317
47	H	H	S	(CH ₂) ₂ CH ₃	CH ₂ C≡CH	750	788	519
48	(-CH=CH-) ₂	H	S	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	CH ₂ C≡CH	775	807	469
49	(-CH=CH-) ₂	H	S	(CH ₂) ₅ CH ₃	CH ₂ C≡CH	775	807	468
50	(-CH=CH-) ₂	H	S	(CH ₂) ₄ COOH	CH ₂ C≡CH	780	807	429

Коэффициенты экстинкции для всех флуорофоров **47-50, 60** достаточно высокие и имеют одинаковый порядок - 10^5 . Для симметричных и несимметричных конформационно закрепленных карбоцианинов происходит увеличение фотостабильности, а также квантового выхода и времени жизни флуоресценции. Фотофизические параметры симметричных и несимметричных конформационно закрепленных красителей **69, 62a,b, 53-55** (Схема 19) представлены в таблице 3.

Схема 19

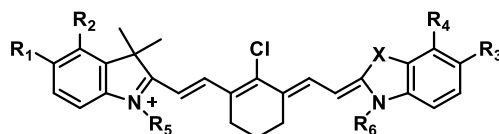


Таблица 3. Максимум поглощения и флуоресценции карбоцианинов **69**, **62a,b**, **53-55** в метаноле.

№	R ₁ , R ₂	R ₃ , R ₄	X	R ₅	R ₆	λ _{abs} , нм	λ _f , нм	Стоксов сдвиг, см ⁻¹
69*	(-CH=CH-)₂	(-CH=CH-)₂	C(CH₃)₂	(CH₂)₄SO₃⁻	(CH₂)₄SO₃⁻	818	850	460
62a,b	(-CH=CH-)₂	(-CH=CH-)₂	C(CH₃)₂	(CH₂) _n P(O)(OEt)₂	(CH₂) _n P(O)(OEt)₂	819	835	233
53	(-CH=CH-)₂	(-CH=CH-)₂	C(CH₃)₂	(CH₂)₄SO₃⁻	(CH₂)₅P(O)(OH)(OEt)	818	835	233
54**	(-CH=CH-)₂	R₃=H, R₄=COOH	C(CH₃)₂	(CH₂)₄SO₃⁻	CH₃	790	830	610
55**	H	H	S	(CH₂)₄SO₃⁻	CH₂C≡CH	790	812	343

*В роли модельного соединения для сравнения в данном случае выступал коммерчески доступный **IR-820**

**значения для этих соединений измерены в этаноле

Для фосфонатзамещенных производных **62a,b** значение максимума флуоресценции смещено в более коротковолновую область, по сравнению с сульфатным аналогом **69** и, как следствие, значение Стоксова сдвига меньше, чем у остальных закрепленных трикарбоцианинов. При введении гетероатомов в полиметиновую цепь (соединения **70**, **71**, **75**, **79**, **80**, **82**, **88**) наблюдается гипсохромное смещение максимума поглощения незначительное для О-нуклеофилов и существенное для N-нуклеофилов (схема 20, таблица 4).

Схема 20

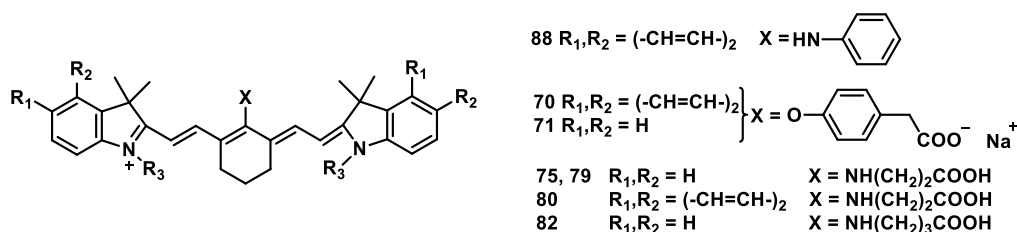


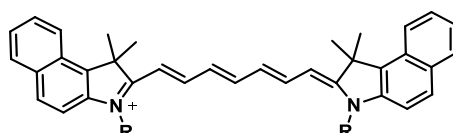
Таблица 4. Максимумы спектров поглощения (λ_{abs}) и флуоресценции (λ_f) и Стоксов сдвиг красителей **70**, **71**, **75**, **79**, **80**, **82** и **88**.

№ соединения	R ₃	λ _{abs} , нм	λ _f , нм	Стоксов сдвиг, см ⁻¹
70	(CH₂)₅P(O)(OEt)(O⁻)Na⁺	808	818	151
71	(CH₂)₂CH₃	767	783	266
75	(CH₂)₂CH₃	658	760	2039
79	(CH₂)₄SO₃⁻	629	743	2439
80	(CH₂)₄SO₃⁻	624	741	2530
82	(CH₂)₄SO₃⁻	638	760	2516
88	(CH₂)₄P(O)(OEt)₂	782	815	518

Величина гипсохромного сдвига при введении алифатической аминогруппы (соединения **75**, **79**, **80**, **82**) значительно больше (на 160 - 194 нм) по сравнению с ароматической аминогруппой (соединение **88** – на 37 нм), что приводит к увеличению Стоксова сдвига для соединений, модифицированных ω-аминокислотами более, чем в 5 раз.

Для ряда трикарбоцианинов разных структурных типов в рамках данного исследования было определено время жизни флуоресценции¹ (схема 21, таблица 5).

Схема 21



Замена сульфатной группы на фосфонатную привела к существенному увеличению времени жизни флуоресценции, что можно объяснить менее выраженными процессами агрегации для фосфонатных аналогов.

¹ Работа выполнялась совместно с д.х.н., проф. В.А. Кузьминым.

Таблица 5. Максимум поглощения и время жизни флуоресценции карбоцианинов **ICG**, **60b** и **60d** в этаноле и водном растворе PBS.

№	R	Растворитель	$\lambda_{\text{п}}$, нм	τ_{f} (I), нс(A, %)
ICG	$(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-$	EtOH	808	0.19 ± 20 (100)
60b	$(\text{CH}_2)_4\text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2$	EtOH	810	0.59 ± 20 (100)
		PBS	800	0.20 ± 30 (100)
60d	$(\text{CH}_2)_4\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$	EtOH	810	0.59 ± 20 (100)
		PBS	800	0.24 ± 30 (100)

На примере соединений **47-50**, **55** было показано (схема 22, таблица 6), что наибольшее время жизни флуоресценции наблюдается для красителя **47** – практически в два раза больше, чем для его бензоаналогов **48**, **49**, **50**, что свидетельствует об уменьшении времени жизни флуоресценции при введении дополнительного конденсированного ароматического кольца в гетероцикл. К такому же снижению времени жизни флуоресценции приводит одновременная замена в соединении **47** гидрофобного алкильного заместителя на гидрофильный алкилсульфонатный и создание конформационно закрепленного полиметинового фрагмента.

Схема 22

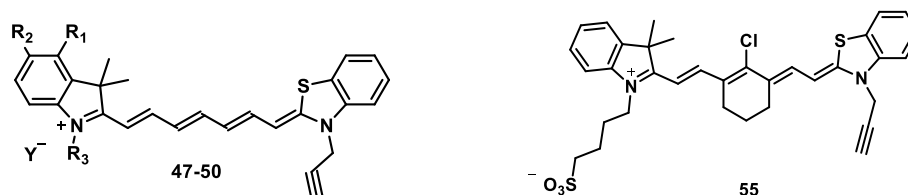


Таблица 6. Время жизни трикарбоцианинов **47-50** и **55** в метаноле.

№	R ₁ , R ₂	R ₃	Y	$\lambda_{\text{п}}$, нм	τ_{f} (I), нс(A, %)
47	H	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	I	788	1.11 (100)
48	$(-\text{CH}=\text{CH}-)_2$	$(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-$	-	807	0.59 (100)
49	$(-\text{CH}=\text{CH}-)_2$	$(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	I	807	0.64 (100)
50	$(-\text{CH}=\text{CH}-)_2$	$(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	Br	807	0.57 (100)
55	H	$(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3^-$	-	812	0.66 (100)

Для всех синтезированных в данной работе соединений мы наблюдаем более высокие значения времени жизни флуоресценции по сравнению с модельным флуорофором **ICG** и низкий квантовый выход триплетного состояния ($\phi_{\text{T}} < 10^{-5}$), что говорит о возможности их практического использования в качестве перспективных флуорофоров для детектирования биомакромолекул и визуализации клеточных структур.²

3. Анализ взаимодействия синтезированных красителей с биомакромолекулами

3.1 Молекулярный докинг красителей с ЧСА и АФП и анализ их взаимодействий

Эффективная оценка характера взаимодействия карбоцианинов с транспортными белками возможна с помощью молекулярного докинга. Молекулярный докинг выполнен на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета МГУ.³

В рамках данного исследования был проведен молекулярный докинг синтезированных в работе трикарбоцианинов и их структурных модификаций с базовыми белками: человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), бычьим сывороточным альбумином (БСА) и альфа-фетопротеином (АФП). АФП - белок, родственник альбумину, что определяет те же закономерности его связывания с карбоцианинами. В опухолевых клетках, в отличие от здоровых, происходит резкое повышение экспрессии рецепторов АФП. Результаты молекулярного докинга свидетельствуют о том, что для карбоцианинов существует несколько способов связывания с молекулами ЧСА, БСА и АФП.

Нами было установлено, что трикарбоцианины связываются с транспортными белками в широком, умеренно полярном кармане между субдоменами IА и IIIА для БСА, ЧСА и АФП, либо между субдоменами IА и IIВ для БСА и ЧСА.

² Работа выполнялась совместно с д.х.н., проф. В.А. Кузьминым.

³ Работа выполнялась совместно с с.н.с. Е.В. Радченко и М.Г. Местергази.

На моделях **60b**, **75**, **79** показано, что в гидрофильном сайте белка локализованы комплексы с более коротким временем жизни, которое является средним между величинами в этаноле и воде.

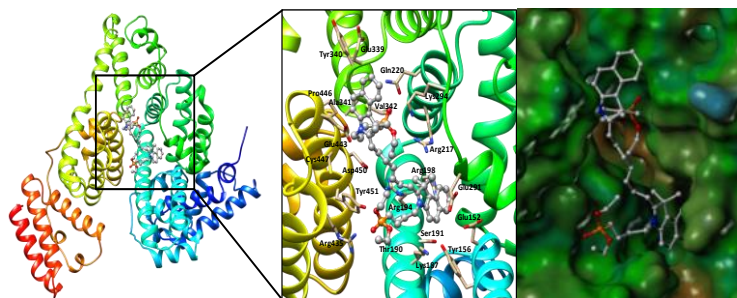


Рисунок 1. Оптимальный сайт связывания ICG-P(O)(EtO)₂ (**60b**) в структуре БСА.

Установлено, что основной вклад в связывание красителя в данном кармане вносят стерические и гидрофобные взаимодействия. Данный вывод удалось подтвердить и в результате анализа формы карманов связывания и распределения локальной гидрофобности на поверхности. Но этот факт не исключает гидрофильных взаимодействий.

На рисунке 2 видно, что гидрофильные группы красителя **79** (карбоксильная группа остатка β-аланина и сульфонатная группа заместителя при атоме азота терминальной группы) принимают участие в образовании водородных связей с аминокислотными остатками белка.

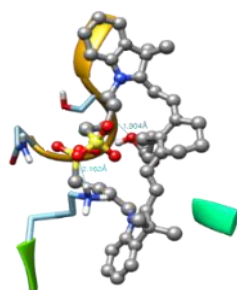


Рисунок 2. Водородные связи гидрофильных групп в структуре красителя **85** с гидрофильными аминокислотами (Ser 480 и Lys351).

3.2 Изучение связывания конъюгата цианинового красителя с пентапептидом с ЧСА

Анализ взаимодействия конъюгатов трикарбоцианинов с пептидами с биомакромолекулами транспортных белков проведен на примере конъюгата **86** карбоцианина **79** с модельным нефункциональным пентапептидом. В данной работе методами молекулярного докинга мы исследовали взаимодействие конъюгата **86** с ЧСА.

Как видно из рисунка 3, конъюгат связывается с альбумином в типичных для цианиновых красителей сайтах: в карманах между субдоменами IIА и IIВ и между IIА и IIIА.

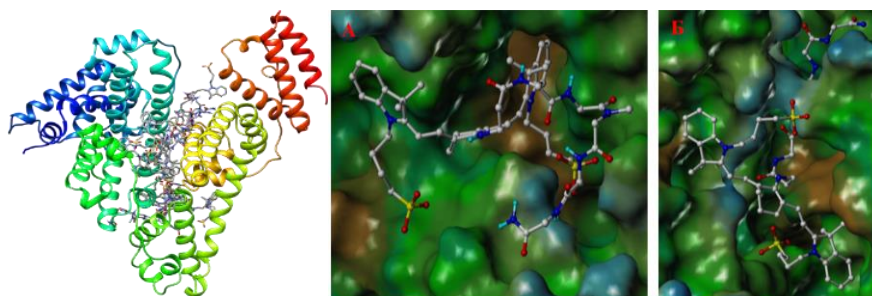


Рисунок 3. Расположение оптимальных и близких к ним по значению оценочной функции связанных конформаций конъюгата **86** в структуре ЧСА. Вид поверхностей двух карманов связывания (А (слева) – карман между субдоменами IIА и IIВ, Б (справа) – карман между субдоменами IIА и IIIА).

В кармане между субдоменами IIА и IIВ гидрофильные пентапептидная цепочка и сульфогруппы образуют множественные водородные связи с окружающими их гидрофильными аминокислотами.

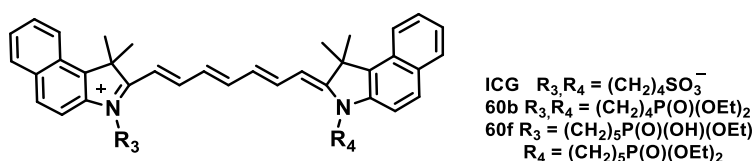
Таким образом, анализ связывания карбоцианинов и конъюгатов на их основе с транспортными белками (БСА, ЧСА, АФП) свидетельствует о неспецифическом характере связывания. Основную роль в связывании с белком как самих красителей, так и конъюгатов на их основе играют гидрофобные и стерические взаимодействия.

3.3 Спектрально-кинетические свойства комплексов цианиновых красителей с биомакромолекулами

Для серии трикарбоцианинов разных структурных типов было проведено экспериментальное определение констант связывания с БСА и ЧСА. Физико-химические исследования были выполнены в ИБХФ РАН им. Н.М. Эмануэля.⁴

Максимумы поглощения для соединений **60b** и **60f** в растворе фосфатного буфера находятся при 785 и 780 нм, соответственно (Схема 23).

Схема 23



При увеличении концентрации БСА происходит сдвиг равновесия в сторону образования комплекса. Константы связывания K_b были рассчитаны из кривых связывания. Изучение кривых затухания флуоресценции позволяет сделать вывод, что происходит образование двух типов комплексов с разными временами жизни флуоресценции – более коротким τ_2 , и более длинным τ_1 (Таблица 7).

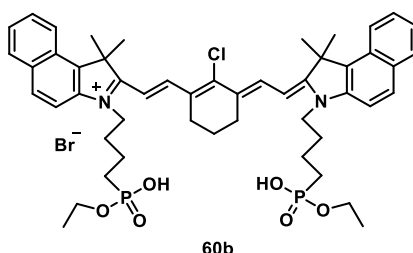
По этой же методике была измерена константа комплексообразования модельного кардиограина **ICG** с ЧСА, она оказалась равной $(1.0 \pm 0.3) \times 10^5 M^{-1}$, и с БСА – $(1.2 \pm 0.2) \times 10^5 M^{-1}$ (Таблица 7).

Таблица 7. Константы связывания K_b , время (τ_1 и τ_2) жизни флуоресценции комплексов красителей **ICG**, **60b**, **f** с БСА и растворов красителей (τ) в H_2O и EtOH.

Соединение	$K_b \times 10^{-5}, M^{-1}$	τ_1 , нс	τ_2 , нс	$\tau(H_2O)$, нс	$\tau(EtOH)$, нс
ICG	1.2 ± 0.2	0.81 (62%)	0.37 (38%)	0.25	0.54
60b	2.2 ± 0.8	0.74 (79%)	0.21 (21%)	0.26	0.59
60f	0.9 ± 0.1	0.74 (78%)	0.21 (22%)	0.26	0.59

Близкие значения констант комплексообразования соединения **ICG** для ЧСА и БСА указывают на схожий характер взаимодействия в сайте связывания белков с красителем и на правомерность использования БСА в работах по моделям комплексообразования наряду с ЧСА. Это согласуется с данными молекулярного докинга.

Схема 24



В водных растворах карбоцианин **60b** образует нековалентный комплекс с ЧСА. Величина константы комплексообразования составляет $1.3 \times 10^5 M^{-1}$. Кинетика затухания флуоресценции комплекса соединения **60b** с ЧСА также свидетельствует об образовании двух типов комплексов. Введение цикла в полиметиновую цепь увеличивает квантовый выход флуоресценции примерно в 1.5 раза.

Трикарбоцианины, модифицированные по мезо-положению ω -аминокислотами, имеют значения констант связывания на порядок ниже, чем для описанных выше моделей (таблица 8).

⁴ Работа выполнялась совместно с д.х.н., проф. В.А. Кузьминым.

Схема 25

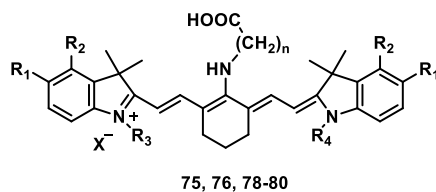


Таблица 8. Значения констант связывания красителей 75, 76, 78-80 с ЧСА.

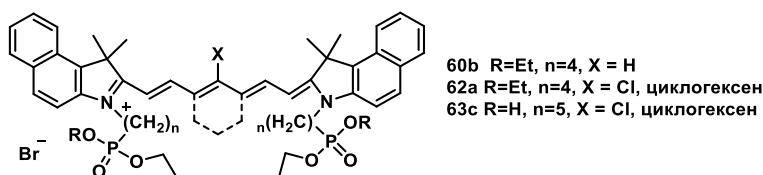
Трикарбоцианины	K_b, M^{-1}
75	$3,67 \times 10^4$
76	$2,67 \times 10^4$
78	$1,78 \times 10^4$
79	$1,07 \times 10^4$
80	$1,48 \times 10^4$

Таким образом, установлено, что независимо от структурного типа карбоцианина происходит образование комплексов двух типов – с изолированными молекулами и с агрегатами карбоцианинов. Комплексообразование со свободными красителями является преобладающим.

4. Исследование накопления трикарбоцианинов в опухолевых клетках и оценка цитотоксичности

На ряде синтезированных карбоцианинов **60b**, **62a** и **63c** (схема 26) было проведено исследование зависимости накопления в опухолевых клетках от концентрации и времени инкубации. Исследования проводили на клеточных линиях НТС116.

Схема 26



Интенсивность флуоресценции лизатов клеток НТС116 измеряли после накопления красителей **60b**, **62a** и **63c**. Установлено, что соединения **60b**, **62a** и **63c** накапливаются в клетках, но с различной интенсивностью. Наиболее эффективное накопление достигается в течение 1 часа инкубации и сохраняется таковым на протяжении до 24 часов у соединений **60b**, **62a**.

Темновая токсичность **60b**, **62a** и **63c** для клеток НТС116 и МСF7 невысока, что позволяет использовать относительно высокие концентрации этих трикарбоцианинов для накопления в клетках.

Для выявления зависимости структура-активность для карбоцианинов **42**, **44-46**, **54**, **57**, **71**, **75-77**, **79-82**, **83-86** были проведены испытания на цитотоксичность (Схема 27). Были построены кривые выживаемости и определены значения IC_{50} (Таблица 9).

Схема 27

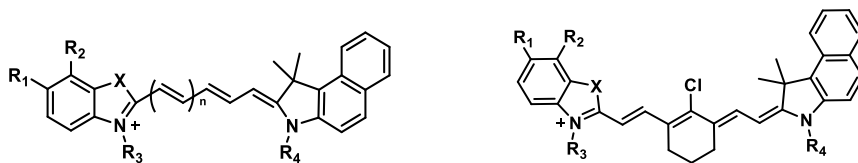


Таблица 9. Цитотоксичность соединений 42, 44-46, 54, 57 на клеточной линии НТС116.

№	R ₁ , R ₂	X	R ₃	R ₄	n	IC ₅₀ , мкМ
42	R ₁ =COOH, R ₂ =H	C(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	0	>50
44	R ₁ =COOH, R ₂ =H	C(CH ₃) ₂	CH ₃	(CH ₂) ₅ CH ₃	1	8
45	R ₁ =COOH, R ₂ =H	C(CH ₃) ₂	CH ₃	(CH ₂) ₁₀ COOH	1	7
46	(-CH=CH-)₂	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	1	5
54	R ₁ =COOH, R ₂ =H	C(CH ₃) ₂	CH ₃	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	2	>50
57	(-CH=CH-)₂	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₁₀ COOH	(CH ₂) ₁₀ COOH	1	1

Из данных таблицы 9 следует, что включение структуры флуорофора гидрофильных алкилсульфонатных групп приводит к потере цитотоксичности, а увеличение липофильности заместителей за счет удлинения углеводородных линкеров приводит к резкому возрастанию цитотоксичности. Те же тенденции можно заметить в результате сравнительного анализа цитотоксичности флуорофоров **71**, **75-77**, **79-82** на клетках НСТ116 и неопухолевых фибробластов (линия ПФЧ). Соединения **75-77**, которые не содержат сульфонатных групп, вызывали гибель клеток обеих клеточных линий (таблица 10).

Схема 28

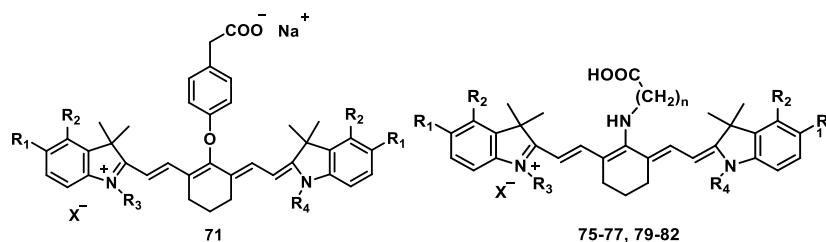


Таблица 10. Показатели цитотоксичности соединений **71**, **75-77**, **79-82**.

№	R ₁ , R ₂	R ₃	R ₄	X	n	IC ₅₀ , мкМ НСТ116	IC ₅₀ , мкМ ПФЧ
71	H	(CH ₂) ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	I	-	0,03	-
75	H	(CH ₂) ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	I	2	2,7	3,4
76	(-CH=CH-)₂	(CH ₂) ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	I	2	5,5	2,5
77	H	(CH ₂) ₄ COOEt	(CH ₂) ₄ COOEt	I	2	2,3	4,6
79	H	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	-	2	>50	>50
80	(-CH=CH-)₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	-	2	>50	48,5
81	H	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ COOEt	-	2	>50	>50
82	H	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	-	3	>50	>50

В результате исследований цитотоксичности целевых конъюгатов **83-86** на клетках НСТ116 и неопухолевых фибробластов (линия ПФЧ) в микромолярных концентрациях установлено, что введение адамантильного заместителя у С-конца пептидного фрагмента приводит к появлению цитотоксичности: незначительной у конъюгата **85** и выраженной у соединения **83** (таблица 11).

Схема 29

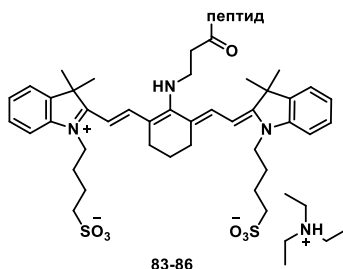


Таблица 11. Показатели цитотоксичности соединений **83-86**.

№	пептид	IC ₅₀ , мкМ НСТ116	IC ₅₀ , мкМ ПФЧ
83	GlyGlyGlyOAd	21,2	>50
84	GlyGlyGlyOH	>50	>50
85	GlySarGlyGlyGlyOAd	46	>50
86	GlyGlySarGlyGlyNH ₂	>50	>50

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что при варьировании алкильных и алкилсульфонатных заместителей в карбоцианинах можно достичь желаемых показателей цитотоксичности, при этом введение прочих функциональных групп в структуру молекулы не всегда влияет на этот показатель.

Исследования проводились на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета МГУ.⁵

⁵ Исследования были проведены совместно с с.н.с., д.м.н. А.А. Штилем.

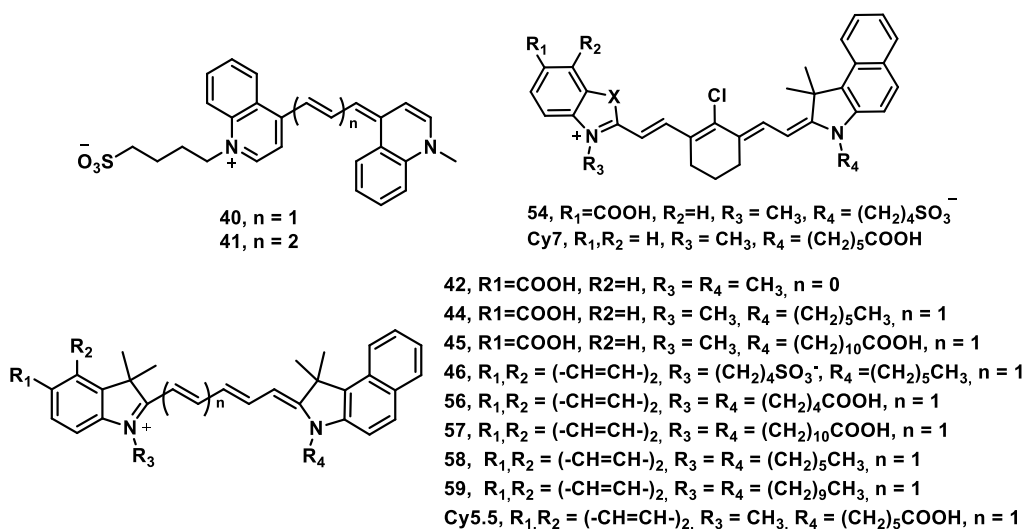
5. Визуализация низкомолекулярных аналитов

На серии триметиновых и пентаметиновых карбоцианинов **40-42**, **44-46**, **54**, **56-59**, содержащих в различных структурных фрагментах алкильные, алкилсульфонатную и карбоксильную группы, были изучены возможности их нековалентного взаимодействия с низкомолекулярными аналитами (Схема 30).

Эксперимент был проведен на кафедре аналитической химии Химического факультета МГУ.⁶

Была исследована возможность визуального определения аминокликозидов с использованием стратегии амплификации флуоресценции карбоцианинов в растворах ПАВ (додецилсульфат натрия (ДДС), либо цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ)) в предмицеллярной концентрации. В качестве модельных аналитов были выбраны следующие антибиотики: цефтриаксон, цефтазидим, амикацин, неомицин, гентамицин, стрептомицин, гуанидин, пefлоксацин, цефазолин, цефотаксим, цитрат, бензилпенициллин. В исследованиях участвовали для сравнения помимо новых карбоцианинов **40-42**, **44-46**, **54**, **56-59** два коммерчески доступных красителя Cy5.5 и Cy7 (схема 30).

Схема 30



В ходе данного исследования удалось установить механизм возникновения сигнала при опосредованном взаимодействии красителей **40-42**, **44-46**, **54**, **56-59** с модельными аналитами в мицеллярном растворе ПАВ (ДДС и ЦТАБ). Выбор ПАВ определялся тем, что ДДС образовывал агрегаты с катионными аналитами, а ЦТАБ – с наночастицами красителя в водном растворе. Механизм приведен на рисунке 4.

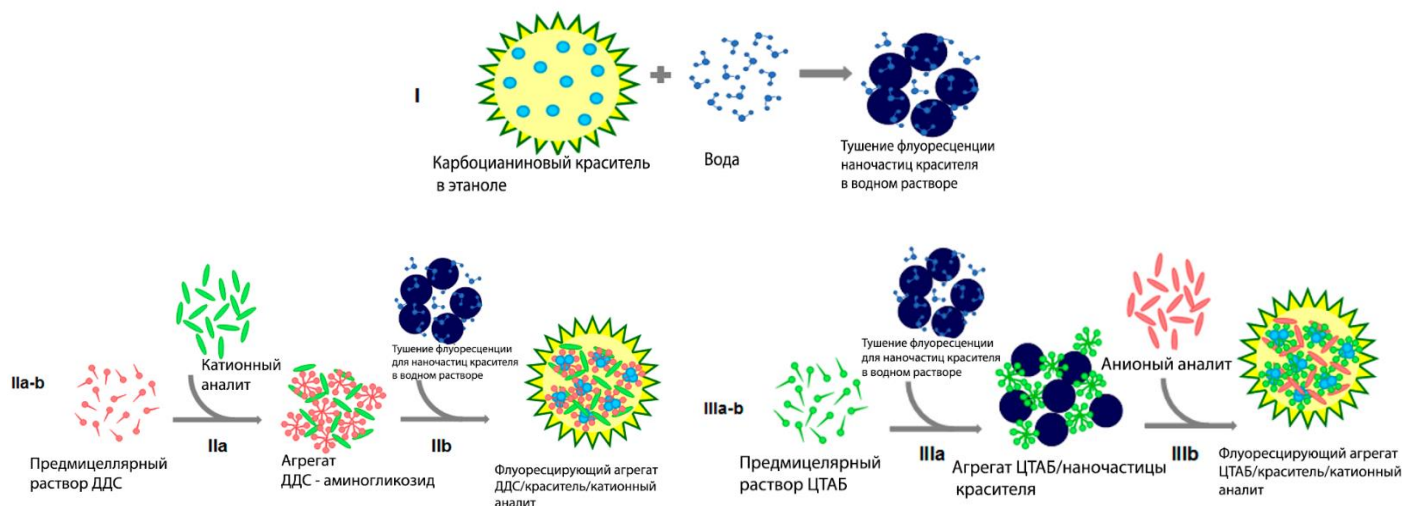


Рисунок 4. Схема механизма образования агрегата ПАВ/Краситель/Аналит.

⁶ Исследования были проведены совместно с д.х.н. М.К. Беклемишевым.

На рисунке 5 – общий вид спектров на примере карбоцианина **57** в растворах ПАВ.

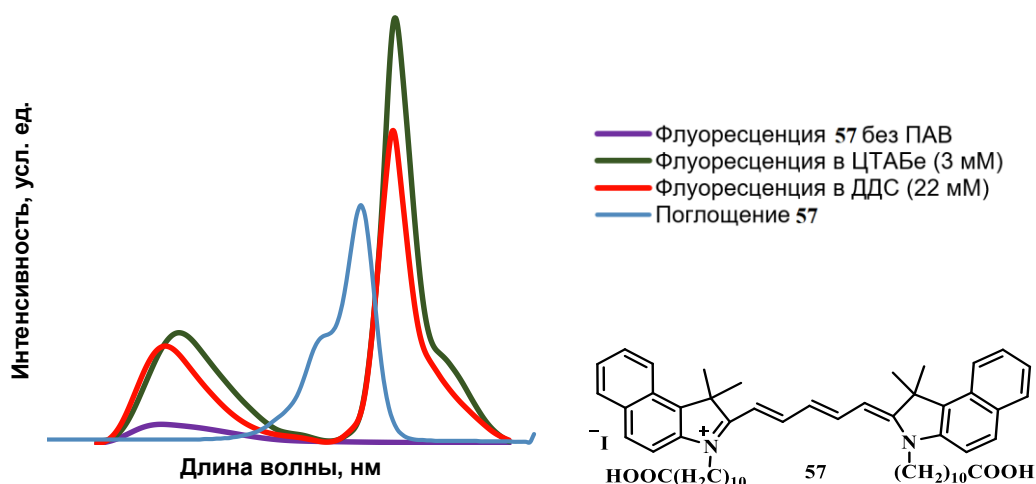


Рисунок 5. Общий вид спектров поглощения и флуоресценции на примере красителя **57**.

Проведенный скрининг позволил оценить эффективность каждого карбоцианина в качестве аналитического агента. Нормировали значения по сигналам красителя **57**.

Количественной характеристикой карбоцианина являлась величина гидрофобности ($\log P$). Расчет проводили помощью ресурса chemaxon.com. Из диаграммы зависимости рассчитанных параметров «эффективности» карбоцианинов от их гидрофобности (Рисунок 6) следует, что гидрофобность является важным условием использования красителя в качестве флуориметрического реагента. Это относится как к катионным, так и к анионным ПАВ.

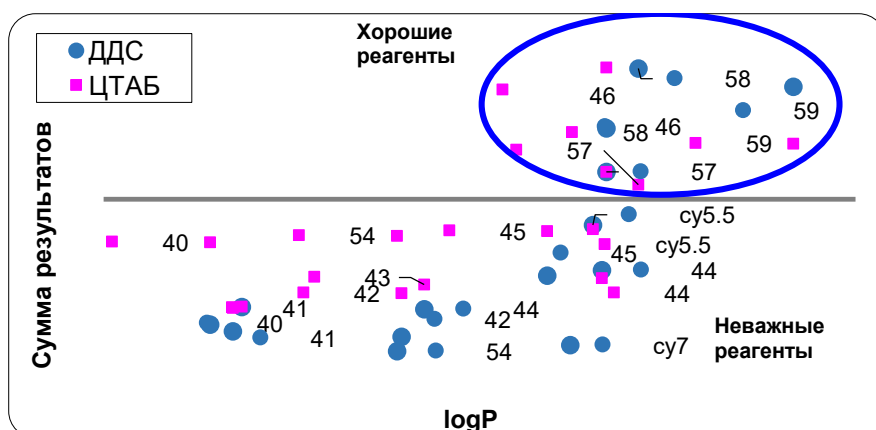


Рисунок 6. Корреляция «эффективности» красителя как флуориметрического реагента с гидрофобностью ($\log P$).

В результате проведенного скрининга было установлено, что пентаметиновые карбоцианины на основе бензоиндоленина **46**, **57-59** могут быть успешно использованы во флуориметрических методах, основанных на агрегации.

Еще одним направлением изучения нековалентных взаимодействий аналитов с карбоцианинами было исследование возможности создания селективного флуоресцентного сенсора. Было установлено, что взаимодействие карбоцианина **57** с дипирином в присутствии бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ) приводит к обесцвечиванию красителя, сопровождающемуся резкими изменениями спектров флуоресценции. В присутствии не анионных поверхностно-активных веществ (н-додецилсульфат натрия) никаких изменений не происходило.

В результате проведенных исследований была предложена структура комплекса карбоцианина 57, дипирона и ЦТАБ (рисунок 7).

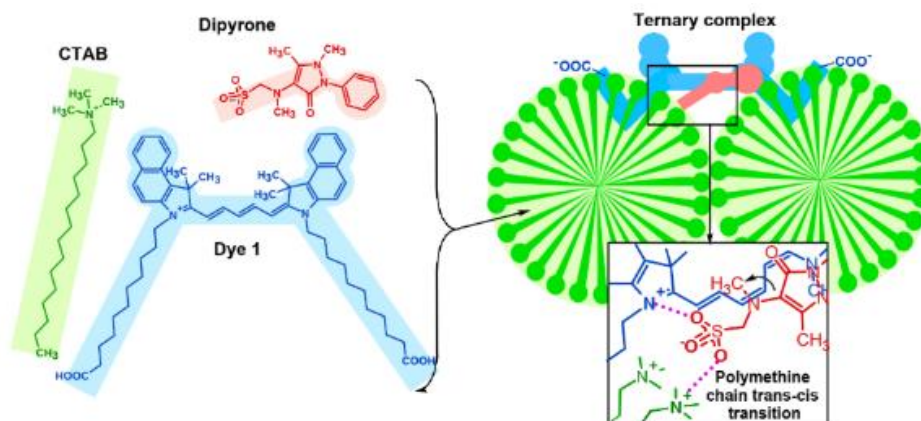


Рисунок 7. Предлагаемая структура ансамбля краситель 57 – дипирон – ЦТАБ.

Таким образом, было показано, что дикарбоцианин 57 на основе бензоиндоленина может быть эффективно использован в аналитических целях в качестве инструмента визуализации при нековалентном связывании аналитов с красителем.

6. Синтез ковалентных конъюгатов на основе карбоцианинов 48, 49 и 73 с антибиотиками

Поскольку карбоцианины способны накапливаться в митохондриях, то конъюгаты противораковых препаратов с карбоцианинами представляют собой перспективные объекты. В клик-реакции с антибиотиками, модифицированными N_3 -группой вводили целевые трикарбоцианины 48, 49, 73, модифицированные алкинильным фрагментом. На их основе были получены конъюгаты 89, 90, 91 с модифицированными N_3 -группой эремоницином и даунорубицином (Рисунок 8). Сравнение цитотоксичности полученных конъюгатов показало, что конъюгирование лекарства с липофильным красителем 48 не влияет на его цитотоксичность, в то время как сочетание с гидрофильным карбоцианином 49, содержащим сульфатную группу приводит к потере цитотоксичности к ряду клеточных линий.

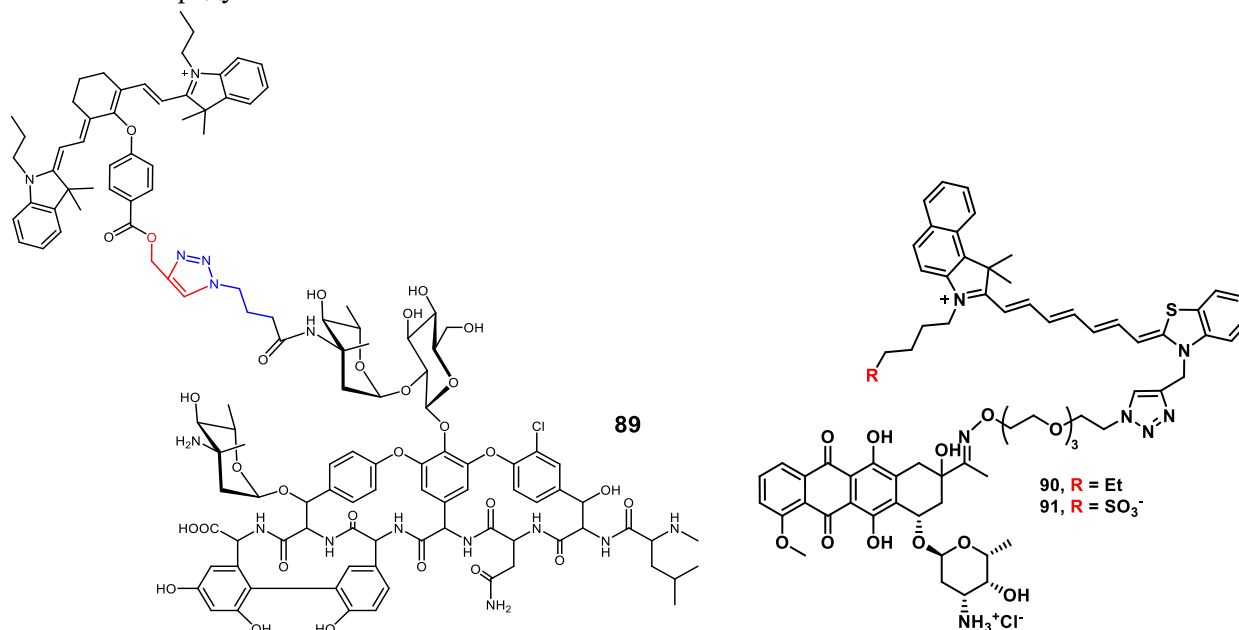


Рисунок 8. Структура конъюгатов 89-91.⁷

⁷ Эксперименты по синтезу и очистке конъюгатов 89-91 были проведены в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе аспирантом Химического факультета МГУ Верютиным Д.А. под руководством старшего преподавателя кафедры медицинской химии Химического факультета МГУ Шувалова М.В. и н.с. НИИНА им. Г.Ф.Гаузе Алферовой В.А.

7. Исследование взаимодействия флуорофоров, модифицированных ω -аминокислотами, и конъюгатов на их основе с клетками

Одной из задач, решаемых в рамках данного исследования, было изучение зависимости эффективности проникновения карбоцианина в клетку от его строения с целью выбора оптимального флуорофора для визуализации процессов взаимодействия проникающих пептидов с клетками.

Данные исследования были выполнены на серии трикарбоцианинов **75-82** (таблица 12), модифицированных ω -аминокислотами и их конъюгатов с нефункциональными пептидами.

Схема 31

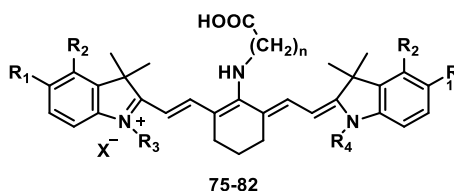


Таблица 12. Трикарбоцианины **75-82**, модифицированные аминокислотами.

№	R ₁ , R ₂	R ₃	R ₄	X	n
75	H	(CH ₂) ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	I	2
76	(-CH=CH-) ₂	(CH ₂) ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	I	2
77	H	(CH ₂) ₄ COOEt	(CH ₂) ₄ COOEt	I	2
78	(-CH=CH-) ₂	(CH ₂) ₄ COOEt	(CH ₂) ₄ COOEt	I	2
79	H	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	-	2
80	(-CH=CH-) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	-	2
81	H	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ COOEt	-	2
82	H	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	-	3

На базе соединений **75-82** была исследована зависимость интенсивности флуоресценции красителей на клетках линии НСТ116 (Таблица 13). Самые низкие значения интенсивности флуоресценции клеток наблюдались в случае флуорофора **79**, содержащего две отрицательно заряженные сульфатные группы. Самые высокие значения получены для флуорофоров **75-78**, содержащих гидрофобные алкильные и карбоэтоксикальные группы у атомов азота.

Исследования флуоресценции и цитометрические исследования были проведены совместно с Российским научным центром Рентгенорадиологии.⁸

Таблица 13. Измерение интенсивности флуоресценции соединений **75-82** на клеточной линии НСТ116 при $\lambda_{fl} = 730-760$ нм.

	Интенсивность флуоресценции субстрата до отмывки	Интенсивность флуоресценции отмытого субстрата	Интенсивность флуоресценции среды
75	1288686	426359	1602159
76	3003480	310031	403831
77	566758	453379	1095088
78	2127938	448620	84214
79	1462141	5411	1462837
80	468910	270424	546280
81	1626891	78301	1912682
82	3381105	195296	3031696

Образцы до и после отмывки исследовались с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Observer Z1 (увеличение 25х). Приведенные результаты свидетельствуют о том, что карбоцианины **75-78** и **80**, проникают внутрь онкоклеток. Хромофор **81**, содержащий одну сульфатную группу проникает частично, а красители **79** и **82**, содержащие две сульфатные группы в клетки практически не проникают (Рисунок 9).

⁸ Исследования были проведены совместно с к.м.н. Т.М. Кулинич.

	75	76	77	78
Fl субстрата до отмывки				
Fl отмывого субстрата				
	79	80	81	82
Fl субстрата до отмывки				
Fl отмывого субстрата				

Рисунок 9. Клетки после взаимодействия с субстратом в флуоресцентном микроскопе при $\lambda_{fl} = 630$ нм.

Был проведен сравнительный анализ кинетики взаимодействия флуорофоров **75-82** с клетками НСТ116 на проточном цитометре. Соединения **79** и **81** не проникают в сами клетки, однако окклюдированы на их поверхности (на 78%), при этом практически не взаимодействуя с лимфоцитами (менее 10%), что говорит о селективности данных соединений к клеткам НСТ116. Соединения **80** и **82** теряют избирательность к опухолевым клеткам.

У соединений **75-78** наблюдается ярко выраженная логарифмическая зависимость на кинетических графиках, то есть данные красители проникают в клетки. У флуорофоров **80, 81** и **82** наблюдается слабо выраженная логарифмическая зависимость, что свидетельствует о том, что эти трикарбоцианины накапливаются в клетках незначительно.

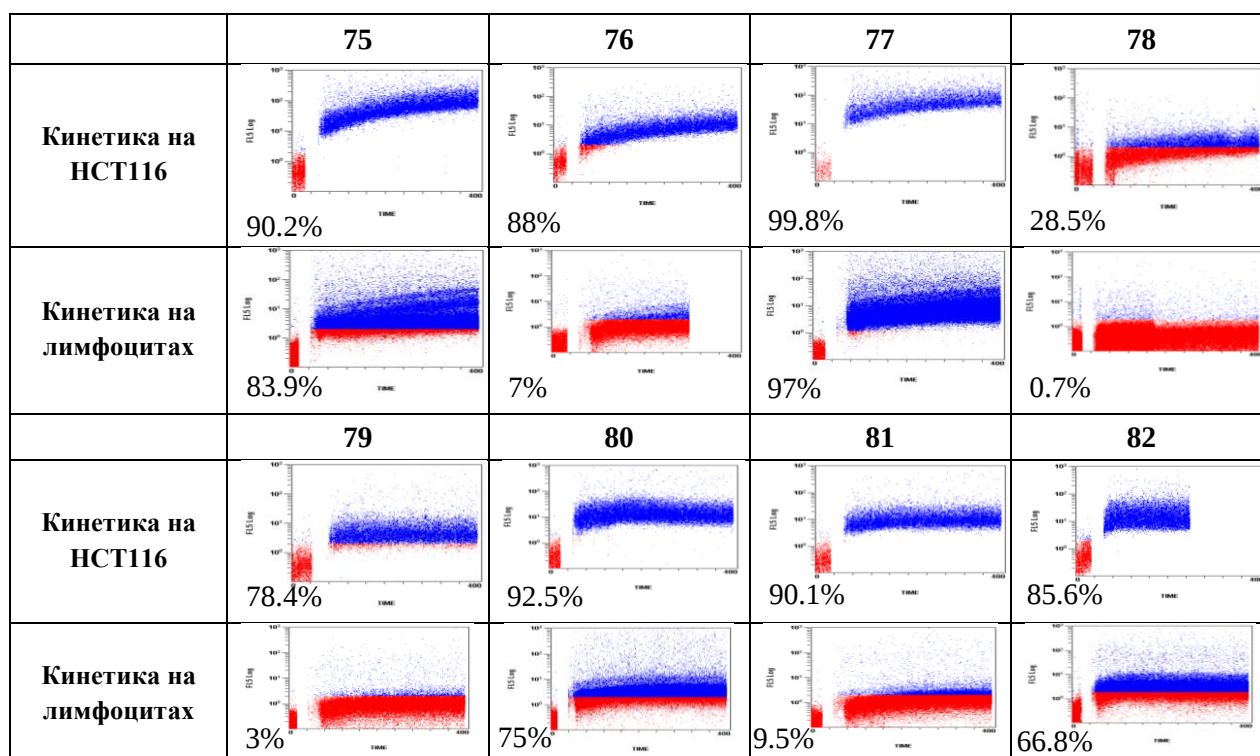
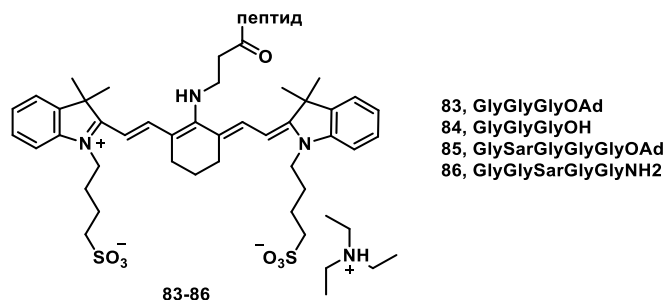


Рисунок 10. Исследование кинетики взаимодействия клеток с флуорофорами **75-82** на проточном цитометре при $\lambda_{fl} = 755$ нм

Обобщая результаты проведенных исследований можно сделать вывод, что соединение **79** полностью удовлетворяет поставленной задаче – выбор флуорофора, который самостоятельно не проникает в клетки как

раковые, так и лимфоцитов. Это соединение было выбрано, как основа для дальнейшего создания конъюгатов с нефункциональными пептидами **83-86** (Схема 32).

Схема 32



	А	Б		В
Клетки до отмывания			Кинетика на НСТ116	
Клетки после отмывания			Кинетика на лимфоцитах	

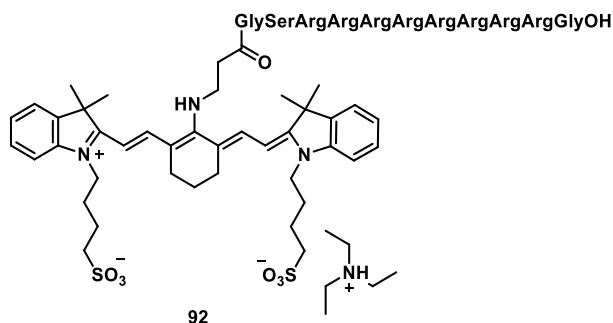
Рисунок 11. Фотографии флуоресцирующих клеток линии НСТ116 после взаимодействия с конъюгатом **86** при $\lambda_{\text{д}}$ = 730-760 нм (А). Фотографии после взаимодействия конъюгата **86** с клетками НСТ116 во флуоресцентном микроскопе при $\lambda_{\text{д}}$ = 630 нм (Б). Исследование кинетики на проточном цитометре (В).

Результаты исследования кинетики взаимодействия на проточном цитометре в сравнении с лимфоцитами свидетельствуют о том, что соединение **86** также проявляет селективность к опухолевым клеткам, по сравнению с лимфоцитами. Графики не имеют логарифмического роста, то есть конъюгат **86** окрашивает мембрану, но внутрь клетки не проникает (Рисунок 11).

Таким образом, было установлено, что конъюгат **86** так же, как и исходный флуорофор **79**, практически не проникает в клетки и селективен по отношению к опухолевым клеткам.

Используя разработанный подход к синтезу конъюгатов трикарбоцианинов, модифицированных ω -аминокислотами, с нефункциональными пептидами, в реакцию с трикарбоцианином **79** был введен проникающий пептид GlySerArgArgArgArgArgArgArgArgGlyOH. В результате было выделено соединение **92** (схема 33).

Схема 33



Установлено, что необходимой структурной базой для создания целевых карбоцианинов с проникающими пептидами является наличие индолининового скаффолда, содержащего не менее двух алкилсульфонатных групп в заместителях при кватернизированных атомах азота и модифицированного β -аланином по мезо-положению конформационно закрепленной полиметиновой цепи.

ВЫВОДЫ

1. Впервые синтезированы несколько серий три-, пента- и гептаметиновых карбоцианинов и их конформационно закрепленные производных на основе гетероциклов разной природы: хинолинов, индоленинов, бензоиндоленинов и бензотиазолов, содержащих гидрофобные и гидрофильные заместители при кватернизированных атомах азота.
2. Установлено, что оптимальной последовательностью для синтеза несимметричных карбоцианинов является проведение на первой стадии процесса конденсации с метиленовой компонентой, содержащей алкилсульфонатную группу при кватернизированном атоме азота, метиленовая компонента с гидрофобным заместителем вводится на второй стадии процесса.
3. Установлено, что трикарбоцианины модифицированные ω -аминокислотами по мезо-положению конформационно закрепленной полиметиновой цепи и содержащие две алкилсульфонатные группы при кватернизированных атомах азота индоленинового скаффолда представляют собой оптимальную структурную основу для создания целевых конъюгатов проникающих пептидов с флуорофорами.
4. Показано, что замена сульфонатной группы на фосфонатную в заместителях при атомах азота гетероцикла приводит к существенному увеличению времени жизни флуоресценции карбоцианинов, что можно объяснить менее выраженными процессами агрегации для фосфонатных аналогов.
5. Установлено, что при нековалентном связывании синтезированных трикарбоцианинов с биомакромолекулами транспортных белков крови независимо от структурного типа карбоцианина происходит образование комплексов двух типов – с изолированными молекулами и с агрегатами карбоцианинов. Комплексообразование со свободными красителями является преобладающим. Методом полужесткого молекулярного докинга установлены возможные сайты связывания трикарбоцианинов с транспортными белками – ЧСА, БСА и АФП.
6. Показано, что введение циклического фрагмента и акцепторного заместителя в полиметиновую цепь не приводит к изменению величины константы связывания карбоцианинов с транспортными белками, однако, модификация мезо-положения алифатической аминогруппой в качестве сильного мезомерного донора приводит к уменьшению константы связывания в 10 раз.
7. Установлено, что для всех синтезированных в данной работе соединений наблюдаются более высокие значения времени жизни флуоресценции по сравнению с модельным флуорофором ICG и низкий квантовый выход триплетного состояния, что говорит о возможности их практического использования для детектирования биомакромолекул и визуализации клеточных структур.
8. Впервые было показано, что карбоцианины бензоиндоленинового ряда, содержащие как гидрофильные группы COOH и SO_3^- , так и гидрофобный алкильный фрагмент могут быть использованы в аналитических целях в качестве инструмента визуализации за счет эффективного нековалентного связывания с малыми молекулами. Пентаметиновый карбоцианин с додецилкарбоксильными заместителями при кватернизированных атомах азота гетероциклов может быть успешно использован в качестве селективного флуоресцентного сенсора.
9. Показано, что увеличение липофильности заместителей за счет удлинения углеводородных линкеров при атомах азота гетероциклов приводит к резкому возрастанию цитотоксичности, а введение алкилсульфонатных групп снижает цитотоксичность карбоцианинов. Показана возможность направленного

синтеза соединений с заданными свойствами: варьирование алкильных и алкилсульфонатных заместителей в различных структурных фрагментах карбоцианинов приводит к достижению необходимых показателей цитотоксичности.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях

Публикации в журналах Scopus, Web of Science, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ:

1. Zakharenkova S.A., Katkova E.A., **Doroshenko I.A.**, Kriveleva A.S., Lebedeva A.N., Vidinchuk T.A., Shik A.V., Abramchuk S.S., Podrugina T.A., Beklemishev M.K. Aggregation-based fluorescence amplification strategy: “turn-on” sensing of aminoglycosides using near-IR carbocyanine dyes and pre-micellar surfactants//Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, Vol. 247, P. 119109. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119109>. IF = 4.098, **Q1**.
2. Zakharenkova S.A., Kriveleva A.S., Katkova E.A., **Doroshenko I.A.**, Polovkov N.Y., Podrugina T.A., Beklemishev M.K. Non-covalent binding and selective fluorescent sensing of dipyrone with a carbocyanine dye and cetyltrimethylammonium bromide//Methods and Applications in Fluorescence, 2021, Vol. 9, No. 1, P. 015001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/abc13c>. IF = 3.009, **Q2**.
3. **Doroshenko I.A.**, Aminulla K.G., Azev V.N., Kulinich T.M., Vasilichin V.A., Shtil A.A., Podrugina T.A. Synthesis of modified conformationally fixed tricarbocyanine dyes for conjugation with therapeutic agents//Mendeleev Communications, 2021, Vol. 31, No. 5, P. 615-617. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2021.09.008>. IF = 1.786, **Q3**.
4. Kuzmin V.A., Nekipelova T.D., Podrugina T.A., Golovina G.V., Kostyukov A.A., Temnov V.V., **Doroshenko I.A.**, Radchenko E.V., Palyulin V.A., Zefirov N.S. Complex formation of albumin with tricarbocyanine dyes containing phosphonate groups//Photochemical & Photobiological Sciences, 2016, Vol. 15, No. 11, P. 1377-1384. <https://doi.org/10.1039/C6PP00246C>. IF = 2.344, **Q3**.
5. Podrugina T.A., Pavlova A.S., **Doroshenko I.A.**, Kuz'min V.A., Kostyukov A.A., Shtil' A.A. Synthesis and photophysical properties of conformationally fixed tricarbocyanines with phosphonate groups//Russian Chemical Bulletin, 2018, Vol. 67, No. 5, P. 806-814. <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2141-4>. IF = 1.014, **Q4**.
6. Kuzmin V.A., Podrugina T.A., Nekipelova T.D., **Doroshenko I.A.**, Proskurnina M.V., Golovina G.V., Radchenko E.V., Kostyukov A.A., Temnov V.V., Matveeva E.D., Palyulin V.A., Zefirov N.S. New phosphonate-substituted tricarbocyanines and their interaction with bovine serum albumin//Doklady Chemistry, 2016, Vol. 470, No. 1, P. 264-267. <https://doi.org/10.1134/S001250081609007X>. IF = 0.609, **Q4**.
7. Podrugina T.A., Temnov V.V., **Doroshenko I.A.**, Kuzmin V.A., Nekipelova T.D., Proskurnina M.V., Zefirov N.S. Synthesis of advanced fluorescent probes — water-soluble symmetrical tricarbocyanines with phosphonate groups//Russian Chemical Bulletin, 2016, Vol. 65, No. 11, P. 2722-2728. <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1642-2>. IF = 0.529, **Q4**.

Другие публикации:

1. Аминулла К.Г., **Дорошенко И.А.** Синтез и исследование свойств трикарбоцианинов, модифицированных пептидами, как потенциальных хромофоров для визуализации клеточных процессов // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2021 [Электронный ресурс] / отв.ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.И. Зимакова. — Москва: Москва, 2021.
2. Аминулла К.Г., **Дорошенко И.А.** Синтез конъюгатов конформационно закрепленных трикарбоцианиновых красителей с пептидами // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2020 [Электронный ресурс] / отв.ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. — Москва: Москва, 2020.
3. Местергази М.Г., Костюков А.А., Шмыкова А.М., Кривелева А.С., **Дорошенко И.А.**, Подругина Т.А. и др. Сравнительный молекулярный дизайн, синтез и исследование физико-химических свойств моно- и бисхромофорных карбоцианиновых красителей // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2020 [Электронный ресурс] / отв.ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. — Москва: Москва, 2020.

4. **Doroshenko I.A.**, Mestergazi M.G., Podrugina T.A. et al. Conformationally fixed tricarbocyanines modified with β -alanine, as the basis for the vector delivery of biogenic molecules // 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChem Russia 2019, Ekaterinburg, Russia, June 10-14, 2019. — Ekaterinburg, Russia, 2019. — P. 44–44.
5. **Дорошенко И.А.**, Т. А. Подругина, А. С. Павлова и др. N-модифицированные аналоги конформационно закрепленных трикарбоцианинов // Сборник тезисов V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии. — г. Владикавказ, республика Северная Осетия - Алания, 2018. — С. 318–318.
6. **Doroshenko I.A.**, Podrugina T.A., Pavlova A.S., Zefirov N.S. Synthesis of conformationally fixed tricarbocyanines // 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry, Kazan, Russia, September 28 – October 03, 2017. — Kazan, Russia, 2017. — P. 183–183.
7. Краснобров В.Д., **Дорошенко И.А.**, Павлова А.С. и др. Синтез несимметричных конформационно закрепленных индотрикарбоцианинов // XX Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием): тезисы докладов (Нижний Новгород, 18–20 апреля 2017 г.). Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2017. - 561 с. ISBN 978-5-91326-377-3. — Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского Нижний Новгород, 2017. — С. 122–123.
8. **Дорошенко И.А.** Синтез конформационно закрепленных трикарбоцианинов с фосфонатными группами // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2017 [Электронный ресурс] / отв.ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. — Москва: Москва, 2017.
9. Podrugina T.A., Kuzmin V.A., Nekipelova T.D., **Doroshenko I.A.** et al. New water-soluble tricarbonylcyanines to a phosphonate groups and their interaction with serum albumin // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Екатеринбург, том 4, тезисы. — Vol. 4. — Екатеринбург, 2016. — P. 601.
10. **Дорошенко И.А.**, Деревянко И.А., Подругина Т.А., Зефилов Н.С. Новые водорастворимые аналоги индоцианинового зеленого (ICG) с алкилфосфоновыми заместителями // Кластер конференций Оргхим-2016. — Репино, Санкт-Петербург, Россия, 2016. — С. 97–98.
11. Подругина Т.А., Темнов В.В., **Дорошенко И.А.** и др. Индотрикарбоцианины с фосфонатными заместителями // Кластер конференций Оргхим-2016. — Репино, Санкт-Петербург, Россия, 2016. — С. 643–644.
12. **Дорошенко И.А.** Новые водорастворимые фосфонатзамещенные трикарбоцианины. Синтез и свойства // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2016 [Электронный ресурс] / отв.ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. — Москва: Москва, 2016.