

МОДУЛЬНЫЕ ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ КАТИОННЫХ И НЕЙТРАЛЬНЫХ АМФИФИЛОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

Г.А. Серебренникова, профессор, М.А. Маслов, доцент,

Н.Г. Морозова, доцент

кафедры Химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского

МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: mamaslov@mail.ru

В обзоре представлены результаты собственных исследований, полученных авторами в ходе цикла работ по синтезу и изучению биологической активности катионных и нейтральных амфифилов, предназначенных для разработки систем доставки нуклеиновых кислот в эукариотические клетки.

Synthesis and biological activities of both cationic and neutral amphiphiles for the development of systems for nucleic acids delivery into eukaryotic cells have been discussed.

Ключевые слова: катионные липиды, неогликолипиды, катионные липосомы, липофекция, генная терапия.

Key words: cationic lipids, neoglycolipids, cationic liposomes, lipofection, gene therapy.

Генная терапия представляет собой фундаментальный подход к лечению наследственных или приобретенных заболеваний путем воздействия на клетку или ткани терапевтическими нуклеиновыми кислотами (олигонуклеотиды, РНК и ДНК). Для генной терапии главными условиями коррекции заболевания являются эффективная доставка нуклеиновых кислот (НК) в клетки-мишени и обеспечение их длительного функционирования [1]. Терапевтическая НК должна преодолеть внеклеточные и внутриклеточные барьеры, прежде чем она достигнет своей цели, поэтому система доставки призвана защитить ее от разрушительного воздействия ферментов, способствовать проникновению внутрь клетки, а в некоторых случаях и дальнейшей экспрессии в ядре. Кроме того, система доставки должна быть нетоксичной, неиммуногенной и биосовместимой.

Генетическая модификация соматических клеток может проводиться методами *in vivo* либо *ex vivo*. Исторически в генной терапии существует три различных подхода. Первый заключается в использовании незащищенной ДНК, прямая инъекция которой в клетку приводит к высокому уровню экспрессии. Простота этого подхода обуславливает его использование в ряде экспериментальных протоколов [2]. Однако применение незащищенных НК ограничивается легко доступными для непосредственной инъекции тканями (кожа или мускулы) и совершенно не подходит для системной доставки из-за наличия внеклеточных нуклеаз. Второй подход включает использование генетически измененных вирусов. Вирусные системы доставки – это биологические системы, происходящие из нативных вирусов, способных переносить собственный генетический материал в клетки хозяина. Некоторые вирусы, включая ретровирусы, аденовирусы, простой вирус герпеса и аденоассоциированный вирус, были лишены своей токсичности с сохранением высокой способности транспортировать гены [1]. Вирусные векторы очень эффективны с точки зрения доставки и экспрессии. Однако использование вирусов ограничивается их иммуногенностью, онкогенностью, ограниченным размером переносимой НК и высокой стоимостью. Поэтому с 1990-х годов разраба-

тываются невирусные системы доставки на основе катионных амфифилов и полимеров, которые являются альтернативой вирусам. Среди прочих стал широко изучаться метод липофекции, использующий катионные липиды или липосомы как средство доставки НК [1–4]. Катионные амфифилы имеют ряд преимуществ по сравнению с вирусными векторами, так как они не инфекционны и не иммуногенны, обладают возможностью переноса протяженных НК. Катионные липосомы легко получать, они стабильны при хранении и экономически доступны. Все эти свойства катионных липосом делают их перспективными кандидатами для транспорта генов.

В большинстве случаев катионные липосомы конструируют из катионного амфифила и липида-помощника (липид-хелпера). Однако участие липида-хелпера не является необходимым. Комплексы между НК и катионными липосомами образуются за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженными группами катионного амфифила и отрицательно заряженными фосфатными группами НК. В результате такой спонтанной самоассоциации образуются наноразмерные частицы, называемые липоплексами, в которых НК располагается между липидными бислоями, выполняющими защитные функции. Структура и размер липоплексов зависят от типа используемого катионного липида и НК, а также от способа приготовления катионных липосом и количественного соотношения НК/липосомы.

Препятствием для широкого применения систем доставки на основе катионных липосом является низкая эффективность переноса НК, что объясняется существованием внутренних и внешних лимитирующих барьеров (или факторов) (рис. 1) [5]. Под внеклеточными факторами подразумевают нестабильность липоплексов в биологических жидкостях (взаимодействие с альбумином, липопротеинами низкой плотности, макроглобулинами и другими молекулами, что приводит к агрегации и быстрому клиренсу липоплексов), а также низкую степень взаимодействия с целевыми клетками-мишенями. Многочисленные исследования показывают, что липоплексы накапливаются преимущественно в легких, печени и селезенке.

Эта аккумуляция приводит к их агрегированию и потере терапевтической активности. Следовательно, коллоидная стабильность липоплексов в физиологических условиях является важным фактором, который необходимо учитывать при конструировании систем доставки нуклеиновых кислот [6]. Кроме того, положительно заряженные частицы могут взаимодействовать с опсонинами – белками плазмы крови, что приводит к их быстрому выведению ретикуло-эндотелиальной системой [7]. Взаимодействие липоплексов с компонентами сывотки крови может быть минимизировано за счет использования липофильных производных полиэтиленгликоля (ПЭГ) при конструировании липосомальных систем доставки. Полиэтиленгликоль создает стерический барьер вокруг липоплекса и предотвращает взаимодействие с компонентами крови, а также захват липоплексов клетками ретикуло-эндотелиальной системы [8].

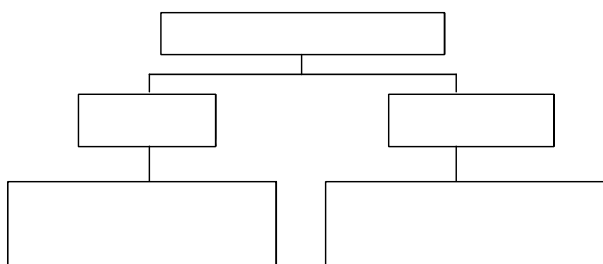


Рис. 1. Биологические барьеры, возникающие на пути липоплексов.

Чтобы избежать проблем неспецифического взаимодействия липоплексов *in vivo*, необходимо снабдить системы доставки нуклеиновых кислот нацеливающими лигандами, которые обеспечивают избирательное взаимодействие с клетками-мишенями и приводят к рецептор-опосредованному эндоцитозу. Нацеливающие лиганды могут быть как низкомолекулярными соединениями (например, фолиевая кислота, галактоза, липопротеины низкой плотности, небольшие пептиды), так и пептидами и протеинами (например, трансферрин и антитела) [9].

В ходе трансфекции клеток липоплексами приходится также преодолевать внутренние барьеры, главными из которых являются эндосомальная и ядерная мембраны. При формировании липоплекса использование избытка катионного амфифила (количественное соотношение липид/НК определяется как среднее соотношение зарядов липоплекса (+/-)) придает поверхности липоплекса положительный заряд, что способствует неспецифическому взаимодействию комплекса с отрицательно заряженной мембраной клетки. Электронная и флуоресцентная микроскопии показали, что липоплексы находятся во внутриклеточных везикулах в цитозоле, что говорит об их проникновении в клетку посредством эндоцитоза [10]. Кроме того, часть комплексов может остаться не востребованной на поверхности клетки. Преобладающим способом проникновения в клетку путем доставки, по-видимому, является неспецифический адсорбционный эндоцитоз, так как отрицательно заряженные гликопротеины, протеогликаны,

глицерофосфаты, присутствующие на клеточной мембране, способны взаимодействовать с положительно заряженными липоплексами [11].

После проникновения липоплекса внутрь клетки посредством эндоцитоза, высвобождение НК из эндосомы является основным препятствием на пути к осуществлению своего «терапевтического» воздействия. Относительно слабая трансфицирующая активность невирусных векторов частично является следствием того, что липоплексы не способны (в большинстве случаев) успешно высвободиться в цитозоль до деградации НК в лизосомах. Предполагают, что в случае систем доставки на основе катионных амфифилов происходит локальная дестабилизация мембраны, в которой катионные амфифилы, входящие в состав липоплексов, индуцируют перемещение анионных липидов из эндосомальной мембраны. А образование нейтральных пар ионов между анионными липидами эндосомальной мембраны и катионными амфифилами вызывает последующее разрушение липоплекса и высвобождение НК из комплекса в цитоплазму [12]. Кроме того, специальные липиды-хелперы (например, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE)), входящие в состав липоплексов, облегчают слияние с эндосомальной мембраной и помогают ее дестабилизировать.

Для поликатионных липидов, содержащих несколько аминогрупп, механизмом высвобождения из эндосом служит механизм «протонной губки» [13]. Особое внимание стоит уделить за кислению pH внутри эндосом: изначально значение pH такое же, как и в цитозоле (pH 7.2–7.4), но затем оно постепенно понижается до 5.0 за счет АТФ-зависимых протонных насосов, расположенных в эндосомальной мембране. Модулируя тип линкеров в структуре катионного амфифила, можно обеспечить своевременное высвобождение НК. Были получены катионные липиды, в состав которых входят кислотолabile винильные, ацетальные группировки, что обеспечивает полный гидролиз липида в кислой среде и своевременное высвобождение НК. С целью увеличения эндосомального высвобождения к липоплексам в качестве модификаторов можно использовать присоединяют pH-чувствительные эндосомолитические и амфипатические пептиды [14, 15].

Дальнейшая судьба доставляемой терапевтической НК будет зависеть от ее типа, например, в случае малых интерферирующих НК доставка в цитозоль является завершающей стадией доставки при трансфекции, поскольку именно в цитозоле данный тип НК оказывает свое терапевтическое воздействие. Если в качестве объекта доставки используется антисмысловой олигонуклеотид или плазмидная ДНК, то для завершения процесса трансфекции необходимы полная диссоциация комплекса НК/катионные липиды, транспорт комплекса в ядро клетки и, в случае олигонуклеотида, его связывание с мишенью.

Мобильность таких больших молекул как ДНК в цитоплазме крайне низкая, что делает их мишенями для цитоплазматических нуклеаз [16].

Период полураспада незащищенной ДНК в цитоплазме клеток составляет около 50–90 мин. Таким образом, плазмидная ДНК должна быть защищена и при этом сохранять способность к проникновению в ядро. Пептиды со специфической последовательностью «сигнальная ядерная локализация» способствуют внутриклеточному транспорту больших молекул через ядерные поры [17, 18].

Существование и детальное выяснение лимитирующего действия внеклеточных и внутриклеточных барьеров стимулировало разработку липидных систем доставки, которые эволюционировали от простых липидных молекул к высокоорганизованным модульным липидным транспортным системам. Все компоненты таких систем должны проходить строгую оценку и отбор с точки зрения эффективности доставки НК, а сами системы должны быть нацелены на специфические органы и ткани.

Модульные системы доставки нуклеиновых кислот

Модульная липидная система доставки НК представляет собой самособирающийся транспортный контейнер, построенный из различных липофильных модулей и запрограммированный на выполнение определенных функций: защиту НК, «нацеленность» на специфические клетки-мишени, эффективное высвобождение НК из эндосом, транспорт в ядро с целью эффективного преодоления различных биологических барьеров, упомянутых ранее [19]. Таким образом, чтобы такая модульная система работала как эффективный переносчик, к ней предъявляют следующие требования:

1. Система доставки должна включать следующие липофильные модули:

- связывающий и защищающий модуль – катионный липид – для электростатического связывания НК и защиты от действия нуклеаз;
- адресный модуль – липоконъюгат с адресным лигандом – для направленного транспорта НК в клетки-мишени;
- стабилизирующий модуль – липофильное производное полиэтиленгликоля – для снижения степени взаимодействия с молекулами-дезактиваторами (альбумином, липопротеидами низкой плотности, макроглобулинами, гепарином) и увеличения времени циркуляции НК в организме;
- модуль с последовательностью ядерной локализации для активного перемещения НК в ядро (в случае ДНК).

2. Основные модули должны быть способны к саморазборке внутри клетки для эффективного высвобождения НК.

3. Система доставки должна обладать низкой цитотоксичностью.

Так как концепция модульных липидных систем доставки предполагает быстрое «переключение» системы на различные типы клеток-мишеней и даже на различные субклеточные компартменты, то необходимо, чтобы все компоненты системы могли быстро и легко заменяться.

Первым модулем системы доставки, который определяет ее эффективность, является катионный

липид, который ответственен за образование электростатического комплекса с молекулой НК и отвечает за ее компактизацию, упаковку и защиту от разрушительного действия эндонуклеаз. На сегодняшний день известен большой набор катионных амфифилов [20–22], но исследования в этом направлении постоянно продолжаются с целью создания малотоксичных и эффективных агентов доставки генетического материала на основе положительно заряженных супрамолекулярных ансамблей.

Для поиска новых агентов трансфекции, обладающих повышенной эффективностью доставки НК, проводятся различные модификации структуры катионных амфифилов, которые отличаются компоновкой структурных единиц, природой катионной головки и гидрофобного остатка, наличием и длиной спейсера, а также типом связующей группы (линкера). Несмотря на определенные успехи, пока еще не достигнут уровень трансфекции, необходимый для практического использования, что связано как с недостатком данных по взаимосвязи структура–активность, так и с необходимостью детального выяснения биологических барьеров, которые необходимо преодолеть липоплексу. Для увеличения эндосомального высвобождения НК необходимо создавать pH-чувствительные катионные амфифилы, которые могли бы эффективно дестабилизировать эндосомальную мембрану, а также использовать средства, предотвращающие деструктивный гидролиз липоплексов в эндосомах [23].

Вторым модулем, который может существенно улучшить эффективность транспорта НК, являются липоконъюгаты с адресным лигандом к специфическим рецепторам клеток-мишеней. Захват липоплексов клетками происходит по механизму эндоцитоза, поэтому наличие в системе доставки НК адресных групп позволяет увеличить поглощение клетками-мишенями. Так как ковалентное связывание молекулы НК с адресным лигандом имеет ряд существенных недостатков (изменение активности НК и др.), то были получены липофильные адресные модули катионной и нейтральной природы, которые могут участвовать в построении катионных липосом, либо встраиваться в уже сформированный комплекс НК/катионные липосомы [24, 25]. В настоящее время сосуществуют два конкурирующих подхода к конструированию направленных систем доставки НК. В первом подходе используется единый липофильный переносчик, который одновременно выполняет функции компактизации и нацеливания НК на определенные клетки или ядро. В другом подходе эти функции выполняют два различных ковалентно не связанных друг с другом липофильных модуля, из которых формируются системы доставки НК.

Третьим модульным компонентом, способным защищать липоплексы от инактивации в биологических жидкостях, являются липофильные производные ПЭГ. Существуют три основных подхода к созданию транспортных систем, содержащих ПЭГ. В первом методе липофильное производное

ПЭГ вводится в состав катионных липосом до образования комплексов с НК. Второй подход основан на включении липофильного производного ПЭГ в уже сформированный липоплекс. В третьем подходе ПЭГ, снабженный реакционноспособной группой, взаимодействует с функциональными группами, расположенными на внешней поверхности липосом.

Было показано, что только ПЭГ с молекулярным весом от 2000 Да способны адекватно осуществлять стерическую стабилизацию липоплексов [26]. Однако, несмотря на свои защитные функции, молекулы ПЭГ могут негативно влиять на эффективность доставки НК, затрудняя высвобождение НК из эндосом [27, 28]. Поэтому при конструировании ПЭГ-содержащих систем доставки необходимо обеспечивать баланс между эффективной стерической стабилизацией и эффективностью трансфекции.

В случае ДНК возникает необходимость в использовании еще одного модуля, который имел бы в своей структуре пептидную последовательность «сигнала ядерной локализации». На сегодняшний день литературные данные показывают, что подходы, использующие «сигнал ядерной локализации», могут улучшить доставку ДНК в ядро и, как следствие, увеличить количество синтезируемого белка [18].

Катионные амфифилы – основные компоненты модульной системы доставки нуклеиновых кислот

С начала 1990-х годов в нашей научной группе проводятся систематические фундаментальные исследования по молекулярному конструированию поверхностных амфифилов на основе природных и модифицированных липидов, предназначенных для формирования мембранных наночастиц с заданными транспортными свойствами.

Эти исследования связаны с оптимизацией известных, поиском и разработкой новых подходов к синтезу различных типов модифицированных липидов с целью дальнейшего исследования их поведения в биологических системах при выяснении механизмов самосборки природных макромолекулярных агрегатов и транспорта с их помощью лекарственных веществ. С точки зрения биосовместимости при создании катионных амфифилов мы опирались на катионные аналоги метаболизируемых липидов – производных глицерина, стероидов, включающих катионную головку, представленную азотистыми основаниями алифатического и гетероциклического типа или полиаминами.

Структура катионного амфифила рассматривается как комбинация нескольких единиц (доменов), соединенных между собой химической связью определенного типа. Причем каждый домен вносит свой вклад в активность молекулы катионного амфифила, что и определяет ее поведение в организме. Путем направленных единичных модификаций гидрофобных и гидрофильных доменов, а также изменением длины и природы спейсерных групп, разделяющих структурные домены катионных амфифилов, нами были созданы модификационные ряды соединений, отличающихся параметрами одной из структурных единиц: катионной головки, гидрофобного домена, разделяющего их спейсера и линкерной группы (рис. 2). Совокупность таких рядов по различным структурно-функциональным признакам привела к появлению химико-структурной «библиотеки» катионных липидов, с помощью которой становится возможным в дальнейшем оценить вклад каждой структурной составляющей в трансфицирующую активность катионных липидов и выявить наиболее оптимальный вариант компоновки структурных единиц в липидной молекуле.

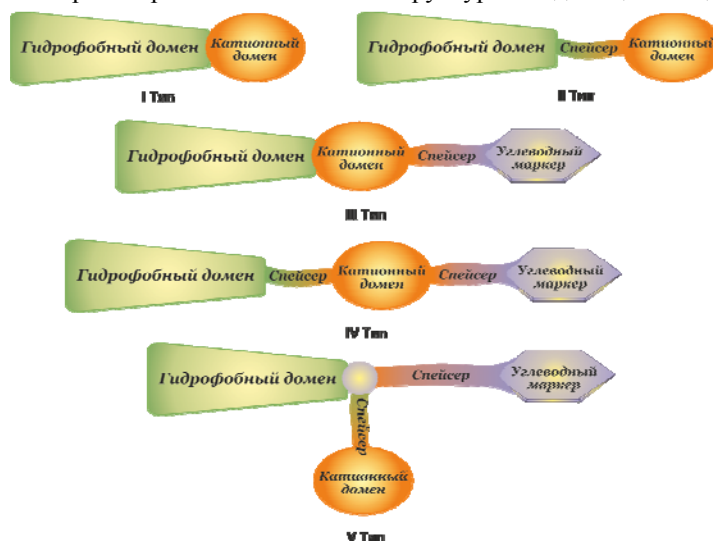


Рис. 2. Варианты компоновки структурных элементов катионных амфифилов, разработанных в ходе собственных синтетических исследований.

Основной метод получения катионных амфифилов с различными азотистыми основаниями состоит в кватернизации аминов. Так, прямое алкилирование гетероциклических и алифатических аминов диалкил-

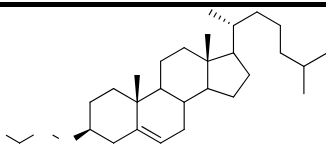
бромглицеринами приводит к образованию амфифилов 1–14, в структуре которых катионная головка непосредственно связана с гидрофобным доменом (катионные амфифилы I типа, рис. 2) [29, 30].

	R	X	Y		
1	$n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$		Br^-	8	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$
2	$n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$		I^-	9	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$
3	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$		Cl^-	10	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$
4	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$		Br^-	11	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$
5	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$		TsO^-	12	$\text{C}_{18}\text{H}_{35}$
6	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$		Br^-	13	$n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$
7	$n\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$		Br^-	14	$n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$

OR
OR
X Y

Для выявления взаимосвязи структура–активность были получены катионные амфифилы, в которых катионная головка связана с гидрофобным доменом через спейсерные группы различной длины (катионные амфифилы II типа, рис. 2). Для синтеза амфифилов II типа был разработан подход, основанный на первоначальном введении галогенсодержащей спейсерной группы в гидрофобный домен и последующей кватернизации алифатических или гетероциклических оснований. С помощью такого подхода были получены амфифилы с различной длиной

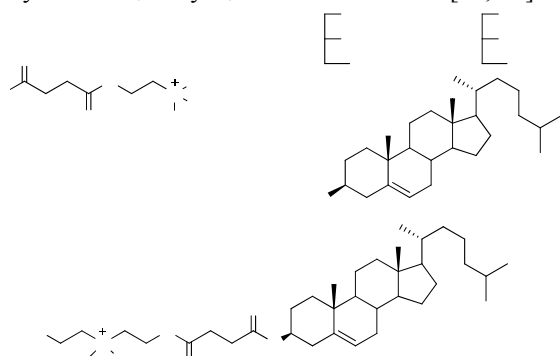
спейсерной группы на основе холестерина (15–26), тетрадеканола (27–29) и диглицерида (30–32) [31–33]. Также этот универсальный подход позволяет получать амфифилы с линкерами сложноэфирного и уретанового типов. Известно, что важное влияние на трансфицирующую активность катионного амфифила оказывает тип линкера, который определяет стабильность и токсичность катионного амфифила в биологических средах, что предполагает обеспечение удачного баланса при создании новых катионных липидов [20].



	Z	n	X	Y		Z	n	X	Y
15	C(O)	4		Br ⁻	21	C(O)	4		Br ⁻
16	C(O)	4		Br ⁻	22	C(O)NH	2		Br ⁻
17	C(O)	4		-	23	C(O)NH	2		Br ⁻
18	C(O)	4		Br ⁻	24	C(O)NH	6		Br ⁻
19	C(O)	4		Br ⁻	25	C(O)NH	6		Br ⁻
20	C(O)	4		Br ⁻	26	C(O)NH	6		Br ⁻

	R	X	Y		R	X	Y
27	C ₁₄ H ₂₉ O		Br ⁻	30			Br ⁻
28			Br ⁻	31			Br ⁻
29			Br ⁻	32			Br ⁻

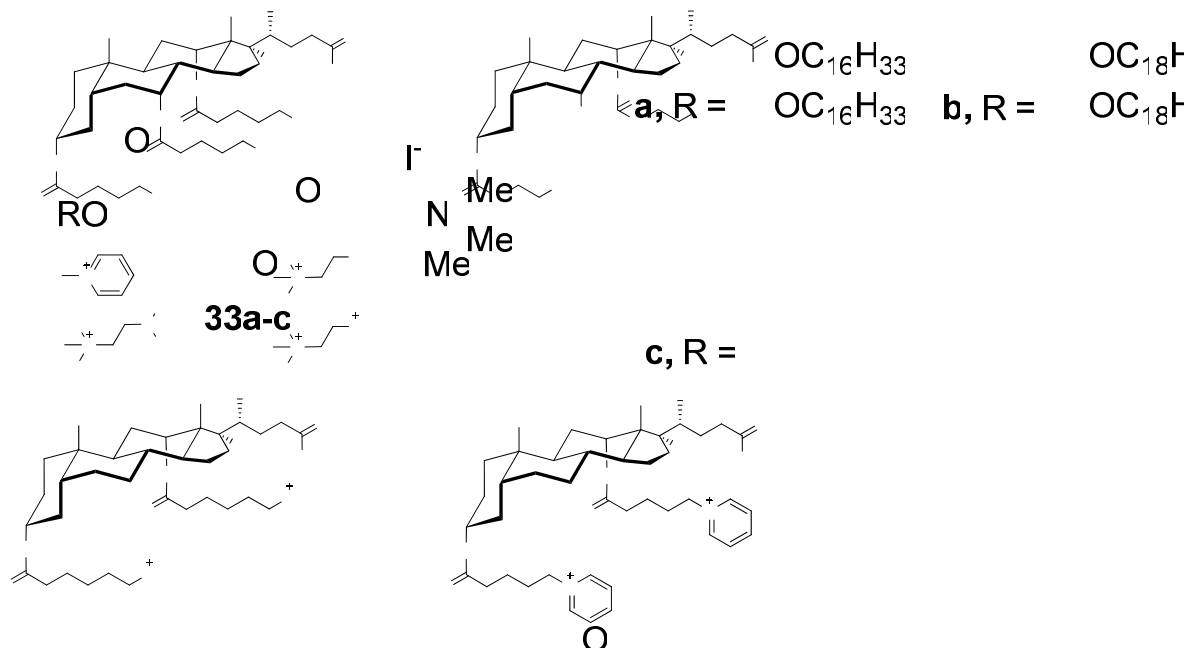
К амфифилам II типа также относятся катионные производные диглицерида **33a,b** и холестерина **33c, 34**, содержащие азотистые основания алифатического ряда, присоединенные к холестерину с помощью сукцинильного остатка [28, 34].



В развитие наших исследований по синтезу катионных амфифилов II типа были получены новые представители этого класса на основе желчных кислот (**35–40**). Использование в качестве гидрофобного домена таких полифункциональных соединений, как холевая и дезоксихолевая кислоты, позволяет получать катионные

амфифилы, содержащие несколько положительно заряженных групп. Это может оказать влияние на эффективность трансфекции, поскольку устойчивость липоплекса зависит от плотности положительного заряда на поверхности липосом [35]. Например, катионные амфифилы на основе холевой кислоты используются для трансфекции эукариотических клеток, при этом присутствие аминокислот на стероидном остоле способствует проникновению нуклеиновых кислот в клетку [36, 37]. Также благодаря специальной амфифильности производные холевой кислоты могут образовывать каналы, проводящая способность которых зависит от гидрофильно-липофильного баланса молекулы [38].

Дизайн заряженных амфифилов на основе холевой кислоты предусматривает введение катионных заместителей по функциональным группам молекулы. В ходе исследований по синтезу стероидных катионных амфифилов нами были получены новые представители класса катионных амфифилов на основе холевой (**35a–d, 36c, 36f**) и дезоксихолевой (**36a,b, d,e, 37a,b, 38**) кислот, в которых положительно заряженные группировки прикреплены к гидрофобному стероидному остову через линкеры различной природы [39, 40].

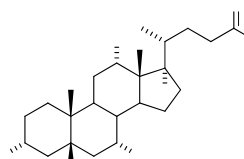
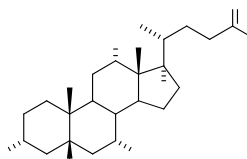


Был предложен подход к синтезу моно- (**39a,b**) и диаминоаналогов (**40a,b**) холевой кислоты, ключевой стадией которого является восстановление оксиминопроизводных холестероидов хлоридом

дом титана(III) в присутствии цианоборгидрида натрия [41]. В качестве исходных соединений использовали метилхолат и тетрадецилхолат, что исключало нежелательное участие карбоксильной

группы в последующих превращениях, а варьирование длины алкильной цепи позволяло изме-

нять гидрофобность и амфифильные свойства производных холевой кислоты.

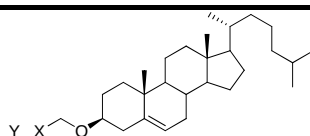


Эндосомальная мембрана является одним из главных биологических барьеров, препятствующих эффективной доставке генетического материала. Для увеличения эндосомального высвобождения было предложено использовать липиды с кислотолабильными связями, что способствует дестабилизации липоплекса и облегчает высвобождение ДНК из эндосомального компартмента в цитоплазму [42].

Следуя этой концепции, нами осуществлен синтез положительно заряженных липидов **41–44**, в которых гидрофобный домен связан с остатком гетероциклического основания кислотолабильными линкерами *O,O*- и *N,O*-ацетального типа [43–45]. Ацетали подобного типа легко гидролизуются разбавленными кислотами [46]. Схема получения катионных липидов основана на использовании метилтиометилвых (ROCH₂SCH₃)

эфиров. При обработке бромом или *N*-бромсукцинимидом метилтиометилвые эфиры легко превращаются в α -галогенэфиры, которые способны в мягких условиях взаимодействовать как с *N*-, так и *O*-нуклеофилами, следовательно, на их основе могут быть получены липиды как с *N,O*- (**41a–i**, **42a**, **43a–c**), так и *O,O*-ацетальным (**41j**, **42b**, **44a–c**) типом связывания.

При получении катионных амфифилов с *O,O*-ацетальной связью на основе диглицерида, на первом этапе вводили остаток 2-бромэтанола [45]. Для этого на метилтиометилвый эфир 1,2-диглицерил-*rac*-глицерина действовали бромом, а затем 2-бромэтанолом в присутствии 4-пиктидина. Синтез катионных липидов **44a–c** осуществляли, как термизацией соответствующих гетероциклических оснований бромпроизводным диглицерида.



41a-j

	X	Y		X	Y
41a		Br ⁻	41f		Br ⁻
41b		Br ⁻	41g		CF ₃ COO ⁻
41c		—	41h		Br ⁻
41d		Br ⁻	41i		Br ⁻

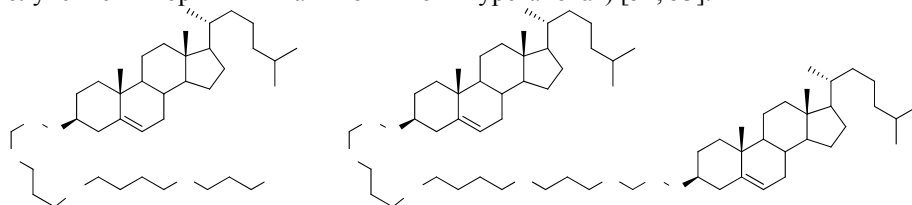
	X	Y		X	Y		X	Y
42a		Br ⁻	43a		Br ⁻	44a		Br ⁻
42b		Br ⁻	43b		Br ⁻	44b		Br ⁻
			43c		Br ⁻	44c		I ⁻

Следующий цикл наших работ был посвящен синтезу катионных амфифилов II типа на основе природного биогенного полиамина – спермина. Природные полиамины – спермин и спермидин, играют важную роль в жизнедеятельности клеток, они способны упаковывать ДНК в тороидальные и стержневые структуры. Структурно-функциональные исследования показали, что липофильные

производные полиаминов конденсируют ДНК более эффективно, чем природные полиамины, [47, 48] и могут быть использованы в качестве невирусных систем доставки генетического материала. Среди липофильных полиаминов производные спермина наиболее эффективно связывают и упаковывают ДНК [49, 50]. В литературе при получении поликатионных амфифилов, гидрофоб-

ная часть которых связана с полиамином посредством спейсеров различной длины, превалирует подход, основанный на первоначальном присоединении спейсерной группы к полиаминной матрице, после чего полученный фрагмент связывают с активированной гидрофобной составляющей [51].

Нами предложен иной подход к синтезу несимметричных (45a–c) и симметричных (46a–c) поликатионных амфифилов, в основу которого положено получение вторичных аминов по



Катионные липиды 46a–c относятся к классу гемини-сурфактантов – соединений симметричной структуры, в которых два гидрофобных домена связаны спейсерами. Гемини-сурфактанты обладают очень высокой поверхностной активностью, что делает их интересными в биологических и биомедицинских исследованиях *in vitro* [54].

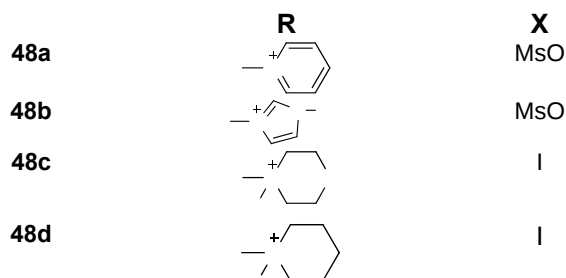
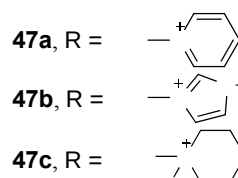
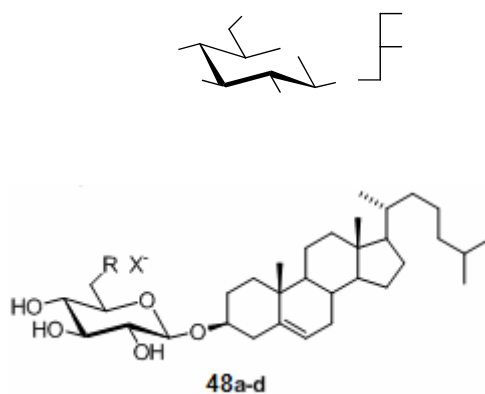
Углеводсодержащие катионные липиды для доставки нуклеиновых кислот

Известно, что присутствие углеводного остатка в структуре амфифила повышает коллоидную стабильность липоплексов [55, 56] и способствует снижению их цитотоксичности [57]. Липоплексы, содержащие амфифилы с углеводными остатками, способны к переходу из ламеллярной фазы в мицеллярную при уменьшении pH среды. Это, в свою очередь, приводит к более легкому высвобождению ДНК из липоплекса, что увеличивает эффективность доставки генетического материала [58, 59]. Углеводная составляющая может выступать либо в качестве спейсера между гидрофильным и гидрофобным доменами, либо она может служить удобной матрицей для конструирования поликатионных амфифилов. Также в структуру катионных амфифилов включают остатки углеводов, которые играют роль адресных маркеров для доставки нуклеиновых кислот в

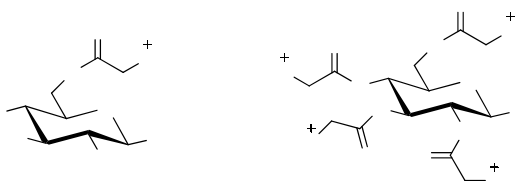
реакции Фукуямы – алкилирование 2-нитробензолсульфонамидов, полученных из первичных аминов, алкилгалогенидами с последующим удалением 2-нитробензолсульфонильной группы и образованием вторичных аминов. Для изучения влияния структуры амфифила на цитотоксичность и способность переносить НК варьировались длина спейсерной группы, разделяющей спермин и холестерин, и тип связи (сложноэфирная и уретановая) [52, 53].

гепатоциты [60–62], макрофаги [63, 64] и ядро клеток HeLa [65]. Известно, что на поверхности гепатоцитов экспонированы гликопротеиновые рецепторы, с помощью которых клетки селективно узнают, связывают и поглощают молекулярные ансамбли, содержащие галактозу. Это свойство может быть использовано для направленной доставки НК с помощью липосом, включающих синтетические галактолипиды.

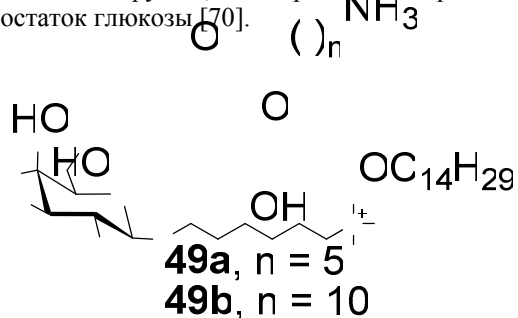
Продолжая исследования по поиску новых катионных амфифилов, нами был предпринят синтез катионных производных 1,2-ди-*O*-октадецилглицерина (47a–c) и холестерина (48a–d), содержащих в качестве спейсерной группы углеводное звено (катионные амфифилы II типа, рис. 2) [66, 67]. Стратегия синтеза состояла в предварительном построении глюкозидной матрицы, последующим формированием катионной головки путем кватернизации различных гетероциклических оснований 6-*O*-сульфонатами глюкозидов, дилицерина или холестерина. Создание катионных Гликолипидов 48a–d потребовало регистративных процедур ввиду наличия мезильной группы по С-6 положению углеводного остатка в незащищенную молекулу гликозилдиглицерида или холестерилглюкозида [66, 67].



К этому же типу катионных амфифилов также относятся гликозиды **49a,b** и **50a,b**, отличающиеся количеством катионных «головок» и длиной спейсера [68]. При проведении регио-селективного ацилирования молекулы β -D-тетрадецилгликозида Вос-защищенными аминокислотами в условиях реакции Мицунобу были получены гликолипиды **49a,b**. В синтезе поликатионных амфифилов **50a,b**, углеводное звено послужило в качестве матрицы для размещения нескольких катионных головок; данные амфифилы были получены исчерпывающим ацилированием β -D-тетрадецилгликозида Вос-аминокислотами с использованием различных конденсирующих агентов.



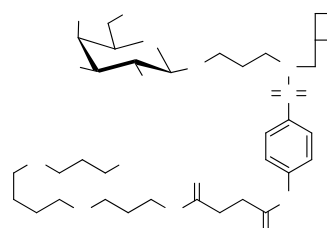
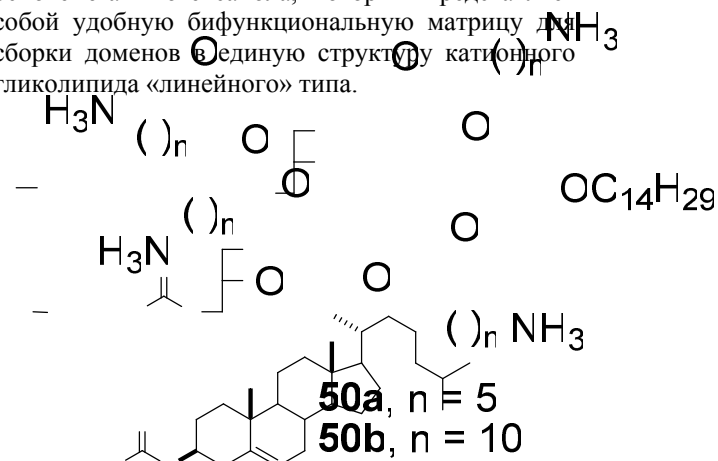
В литературе известны удачные примеры по конструированию новых липидных транспортных средств на основе несимметричных болаамфифилов, которые способны к самосборке в монослойную мембрану благодаря определенному структурному каркасу молекулы [69]. Такие соединения содержат две гидрофильные «головки», связанные одной или более гидрофобными спейсерными группами, причем одна из «головок» может быть заряженной, а другая нейтральной. Нами был осуществлен синтез pH-чувствительного биodeградируемого липида гликозилдиглицеридной природы **51**, содержащего в своем составе остатки 11-аминоундекановой кислоты, приносящие протонирующиеся в физиологических условиях аминокислоты, и нейтральный гидрофильный остаток глюкозы [70].



К катионным амфифилам V типа (рис. 2) относится гликолипид **54**, в котором поликатионная головка в виде остатка спермина посредством промежуточных линкеров вынесена в периферическую область липидной молекулы. Стратегия синтеза целевого поликатионного гликолипида **54** состояла в предварительном построении базисной структуры неогликолипида, в которую далее через систему линкеров вводился поликатионный фрагмент [75].



С целью создания амфифилов, в которых углеводные остатки выступают в качестве адресного маркера, нами осуществлен синтез монокатионных галактолипидов **52a–d** (катионные амфифилы III типа, рис. 2) и **53a,b** (катионные амфифилы IV типа) [71–73]. В качестве гидрофобного домена, необходимого для встраивания в липидный бислой, были использованы остатки холестерина, 1,2-ди-O-тетрадецил-*rac*-глицерина и тетрадецилового спирта. Ранее для синтеза подобных соединений был предложен подход, основанный на гликозилировании 2-бромэтанола трихлорацетимидатным производным глюкозы с последующей кватернизацией различных третичных аминов полученным 2-бромэтилгликозидом [74]. Хотя этот метод привлекателен ввиду малого числа стадий, его главный недостаток – отсутствие универсальности в силу ограниченности выбора исходных реагентов. Более универсальная схема синтеза, позволяющая изменять длину спейсера между положительно заряженной группой и углеводным остатком, описана совсем недавно [62], однако общий выход конечных соединений по этому пути составил 3%. В нашей группе был разработан иной подход, в основу которого легло направленное получение вторичных аминов по реакции Фукуямы. Для связывания гидрофобного, гидрофильного и адресного доменов использовали спейсеры на основе 6-аминогексанола, который представляет собой удобную бифункциональную матрицу для сборки доменов в единую структуру катионного гликолипида «линейного» типа.

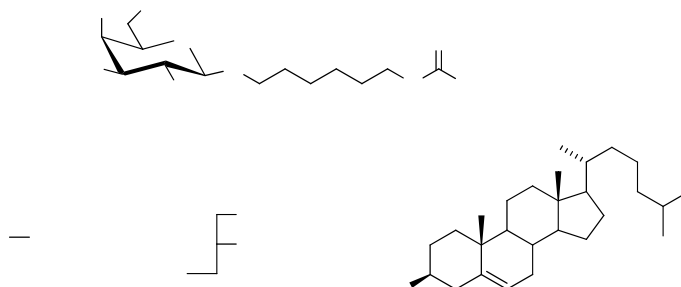


Таким образом, нами разработаны способы получения липидных модулей для систем доставки НК. Положительно заряженные амфифилы, относящиеся к типам I и II, выполняют только функцию связывания и конденсации молекулы НК. В амфифилах III, IV и V наряду с катионной группировкой также присутствует адресный маркер, ковалентно связанный с липидным доменом.

Параллельно нами также разрабатывается альтернативный подход, в котором двухкомпонентная липидная система доставки НК состоит из не связанных ковалентно модулей: катионного амфифила типа I или II, который отвечает за функцию связывания НК, и нейтрального неогликолипида, предназначенного для адресной доставки НК к клеткам-мишеням.

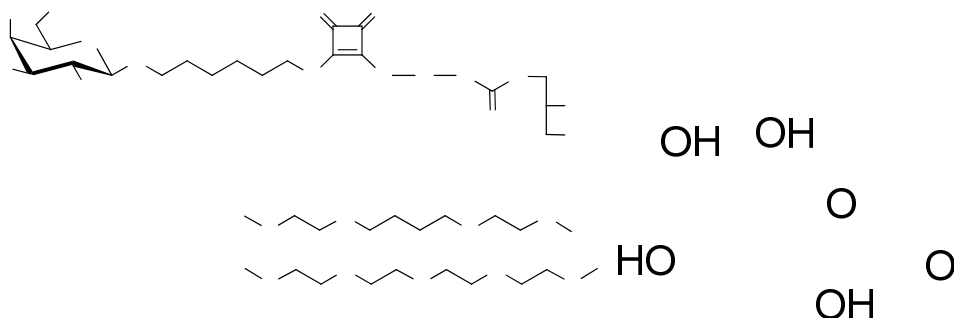
Синтез неогликолипидов как компонентов модульных систем доставки нуклеиновых кислот

Для создания двухкомпонентных систем доставки НК нами был осуществлен синтез ряда неогалактолипидов 55a–с, отличающихся природой гидрофобного домена, представленного, как и для вышеприведенных соединений, одной или двумя тетрадецильными цепочками (остаток тетрадеканола или дитетрадецилглицерина) или холестерином (с жестким стероидным остовом) [76]. Структурные домены в неогликолипидах 55a–с соединены с помощью гликозидной и уретановой связи.



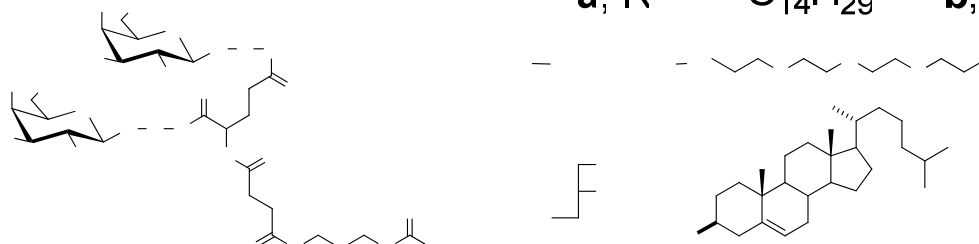
Другая синтетическая стратегия сборки галактозосодержащих липидов из унифицированных доменов была основана на использовании 3,4-диэтоксиклобут-3-ен-1,2-диона, который впервые был применен в синтезе неогликопептидов. Являясь хемоселективным реагентом, взаимодействующим с первичными аминогруппами, 3,4-

диэтоксиклобут-3-ен-1,2-дион применяется в синтезе углеводных [77] и пептидных [78] конъюгатов. С использованием данного реагента получены липидные конъюгаты 56a–f с галактозным адресным маркером, предназначенные для создания невирусных систем нацеленной доставки нуклеиновых кислот в гепатоциты [79].



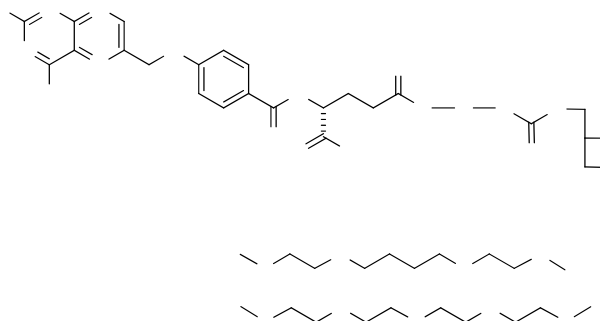
Аффинность связывания лигандов в составе липидного переносчика с узнающими их рецепторами на поверхности клеток-мишеней является наиболее важным критерием при разработке направленных систем доставки НК. Известно, что сродство транспортной системы к рецепторам возрастает с увеличением количества остатков галактозы в липидной молекуле [80, 81]. С учетом этого нами осуществлен синтез бивалентных нейтральных галактозосодержащих липидов 57 [82]. В

структуру неогалактолипидов 57 входят два остатка галактозы, размещенных на многофункциональной матрице, представленной остатком *L*-глутаминовой кислоты. В качестве липидного домена выступают холестерин и диглицерид. Прикрепление нацеливающих лигандов к *L*-глутаминовой кислоте осуществляли при помощи спейсеров на основе 6-аминогексанола и триэтиленгликоля.



Синтез липофильных производных фолиевой кислоты

Как известно, быстро развивающиеся или недифференцированные опухоли, в отличие от нормальных тканей, отличаются повышенным содержанием фолатных рецепторов на клеточной поверхности. Фолиевая кислота (витамин B₉, **58**) – это витамин, который в организме человека восстанавливается до тетрагидрофолиевой кислоты, являющейся коферментом, участвующим в разных метаболических процессах. Фолиевая кислота необходима раковым клеткам для пролиферации. Для селективной доставки лекарственных веществ и НК перспективным является создание транспортных систем, снабженных адресным лигандом на основе фолиевой кислоты. Нами синтезированы фолатсодержащие амфифилы **59a-f**

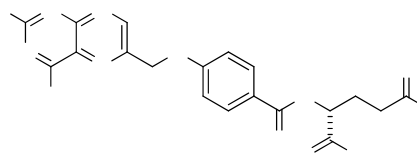


Трансфицирующая активность катионных липидов

Исследование трансфекции эукариотических клеток короткими и протяженными нуклеиновыми кислотами при помощи синтезированных катионных амфифилов проводили в научных лабораториях Института биомедицинской химии РАМН и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

При трансфекции клеток НГУК (невриномы Гассерова узла крысы) плазмидной ДНК, кодирующей щелочную фосфатазу, с помощью липосом, содержащих амфифилы **3** и **42b**, было обнаружено, что активность соединения **42b** была в 2 раза больше, чем активность соединения **3** [84]. Данный факт может объясняться влиянием спейсерной группы или наличием ацетального линкера в молекуле **42b**. Для амфифилов данного строения увеличение расстояния между гидрофобной и гидрофильной частями молекулы обычно приводит к уменьшению эффективности трансфекции [85], а присутствие группы, гидролизующейся в кислых условиях, увеличивает эффективность [86]. Катионные амфифилы **3** и **42b** отличаются между собой расстоянием между гидрофобной и гидрофильной частями молекулы, а также типом присоединения этих частей друг к другу. Поэтому более высокая активность липида **42b** может объясняться наличием в структуре ацетальной группы, которая на стадии высвобождения плазмидной ДНК из эндосомального компартмента разрушается, тем самым увеличивая количество попадающей в цитозоль, а затем в ядро ДНК, а,

липидной природы в качестве одного из компонентов системы доставки НК в опухолевые клетки [83].

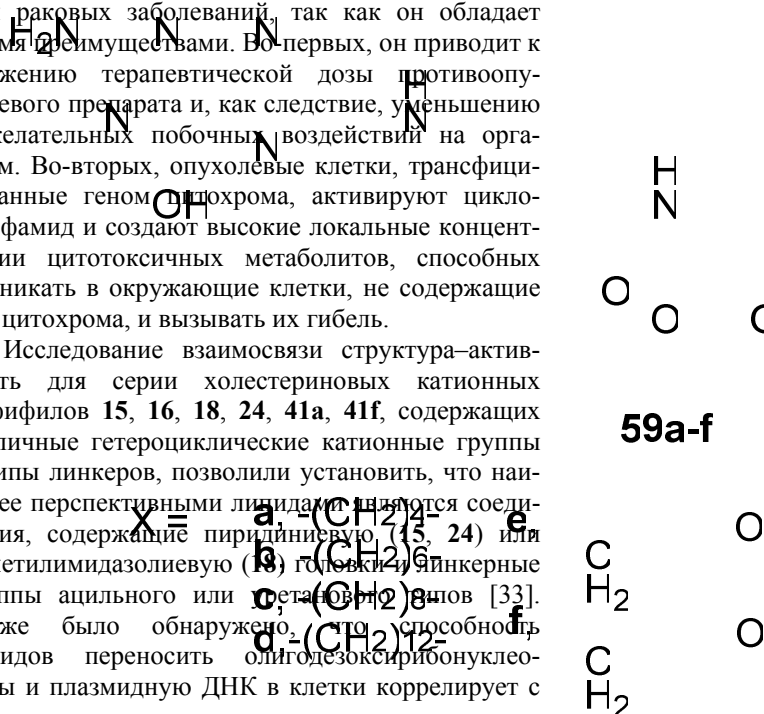


Остаток фолиевой кислоты служит для нацеливания на опухолевые клетки, а диглицеридная составляющая обеспечивает встраивание в катионные липосомы. Спейсеры различной длины и природы обеспечивают подвижность вышеназванных структурных составляющих в пространстве.

следовательно, и количество синтезируемого белка (щелочной фосфатазы).

Катионные амфифилы **6** и **42b** были использованы для трансфекции клеток эпителия почки человека 293 геном цитохрома человека *CYP 2B6* [87]. Введение генетической конструкции, экспрессирующей цитохром, делает клетки опухоли чувствительными к химиотерапевтическому агенту – циклофосфамиду и приводит к их гибели. Данный подход может использоваться для терапии раковых заболеваний, так как он обладает двумя преимуществами. Во-первых, он приводит к снижению терапевтической дозы противоопухолевого препарата и, как следствие, уменьшению нежелательных побочных воздействий на организм. Во-вторых, опухолевые клетки, трансфицированные геном цитохрома, активируют циклофосфамид и создают высокие локальные концентрации цитотоксичных метаболитов, способных проникать в окружающие клетки, не содержащие ген цитохрома, и вызывать их гибель.

Исследование взаимосвязи структура–активность для серии холестеринных катионных амфифилов **15**, **16**, **18**, **24**, **41a**, **41f**, содержащих различные гетероциклические катионные группы и типы линкеров, позволили установить, что наиболее перспективными липидами являются соединения, содержащие пиримидиновую (**15**, **24**) или *N*-метилимидазолиевую (**18**) головки и линкерные группы ацильного или эфирного типов [33]. Также было обнаружено, что способность липидов переносить олигонуклеотиды и плазмидную ДНК в клетки коррелирует с



их способностью образовывать липоплексы размером, не превышающим 100 нм.

Результаты биологических исследований для углеводсодержащих амфифилов **48a–d** показали, что данные соединения эффективно переносят олигодезоксирибонуклеотиды только в составе катионных липосом, содержащих DOPE [67]. Эффективность доставки флуоресцентно меченого олигонуклеотида липосомами **48d**-DOPE сравнима с эффективностью коммерческого агента Lipofectamine® 2000. В случае доставки коротких интерферирующих РНК наибольшей активностью обладали липосомы с гликолипидом **48c**, причем эффект ингибирования наблюдался как в отсутствие сыворотки крови в ростовой среде, так и в ее присутствии.

Исследование трансфицирующей активности холестеринсодержащих поликатионных амфифилов **45a–c** и **46a–c** позволило выявить взаимосвязь структура–активность для данного класса соединений. Были получены липосомальные композиции, состоящие из поликатионных амфифилов и нейтрального липида DOPE в соотношении 1:1 (мольн.). Лучшая эффективность среди амфифилов **45a–c** была обнаружена для соединения **45b** с уретановым линкером. Результаты, полученные для липосом с гемини-сурфактантами **46a–c**, показали, что максимальной трансфицирующей активностью обладают амфифилы **46a** и **46c** со сложноэфирной и уретановой связью и длиной спейсера в 4 и 6 метиленовых звеньев, соответственно. При проведении трансфекции в присутствии сыворотки крови резко снижались транспортные свойства липида со сложноэфирным линкером **46a**, в то время как активность соединения **46c** не изменялась. Таким образом, для эффективной трансфекции в структуре катионного амфифила желательно иметь линкер уретанового типа, а поликатионный амфифил **46c** является наиболее активным транс-

фектантом, способным доставлять различные типы НК как в отсутствие сыворотки крови в ростовой среде, так и в ее присутствии.

Закключение

В настоящее время стало очевидным, что синтез универсальной амфифильной молекулы, которая обладала бы всеми необходимыми функциями для успешного осуществления трансфекции, является трудоемкой и практически непосильной задачей. Для достижения высокой эффективности трансфекции необходимо создавать модульные липидные транспортные системы, которые представляют собой многокомпонентные супрамолекулярные комплексы, запрограммированные на выполнение определенных задач. Необходимый для осуществления процесса трансфекции алгоритм должен «закладываться» в химические структуры компонентов системы, что позволит таким системам не только задействовать механизмы молекулярного клеточного узнавания, но и тонко реагировать на различные внутриклеточные стимулы.

Синтез липидов с различной компоновкой структурных доменов позволяет расширить библиотеку потенциальных невирусных систем доставки НК, а также выявить взаимосвязь структура–активность и выбрать наиболее оптимальный вариант компоновки структурных единиц в липидной молекуле. Таким образом, фундаментальные исследования в области катионных и нейтральных липидов, проводимые в нашей научной группе, открывают новые перспективы их применения в передовой области медицины – генной терапии.

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку (проекты № 10-03-00995a и 09-03-00874a).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gene and cell therapy: Therapeutic mechanisms and strategies / Ed. N.S. Templeton. – Boca Raton: CRC Press, 2009. 1101 p.
2. Non-viral vectors for gene therapy. Part 1 / Eds. L. Huang, M.-C. Hung, E. Wagner. – Amsterdam: Elsevier, 2005. 392 p.
3. Karmali P.P., Chaudhuri A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises // Med. Res. Rev. 2007. V. 27. P. 696–722.
4. Tseng Y.-C., Mozumdar S., Huang L. Lipid-based systemic delivery of siRNA // Adv. Drug Deliv. Rev. 2009. V. 61. P. 721–731.
5. Zuhorn I.S., Engberts J.B.F.N., Hoekstra D. Gene delivery by cationic lipid vectors: Overcoming cellular barriers // Eur. Biophys. J. 2007. V. 36. P. 349–362.
6. Tang M.X., Szoka F.C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes // Gene Ther. 1997. V. 4. P. 823–832.
7. Ogris M., Brunner S., Schuller S., Kircheis R., Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: Reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery // Gene Ther. 1999. V. 6. P. 595–605.
8. Romberg B., Hennink W.E., Storm G. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles // Pharm. Res. 2008. V. 25. P. 55–71.
9. Molas M., Gómez-Valadés A.G., Vidal-Alabró A., Miguel-Turu M., Bermudez J., Bartrons R., Perales J.C. Receptor-mediated gene transfer vectors: Progress towards genetic pharmaceuticals // Curr. Gene Ther. 2003. V. 3. P. 468–485.
10. Merdan T., Kunath K., Fischer D., Kopecek J., Kissel T. Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments // Pharm Res. 2002. V. 19. P. 140–146.

11. Mounkes L.C., Zhong W., Cipres-Palacin G., Heath T.D., Debs R.J. Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery *in vitro* and *in vivo* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 26164–26170.
12. Xu Y., Szoka Jr.F.C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection // Biochem. 1996. V. 35. P. 5616–5623.
13. Boussif O., Lezoualch F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7297–7301.
14. Martin I., Pecheur E., Ruyschaert J.M., Hoekstra D. Membrane fusion induced by a short fusogenic peptide is assessed by its insertion and orientation into target bilayers // Biochem. 1999. V. 38. P. 9337–9347.
15. van Rosenberg S.M.W., Sliedregt-Bol K.M., Meeuwenoord N.J., van Berkel T.J.C., van Boom J.H., van Marel G.A., Biessen E.A.L. Targeted lysosome disruptive elements for improvement of parenchymal liver cell-specific gene delivery // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 45803–45810.
16. Lukacs G.L., Haggie P., Seksek O., Lechardeur D., Freedman N., Verkman A.S. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 1625–1629.
17. Gorlich D., Mattaj I.W. Nucleocytoplasmic transport // Science. 1996. V. 271. P. 1513–1518.
18. Bremner K.H., Seymour L.W., Logan A., Read M.L. Factors influencing the ability of nuclear localization sequence peptides to enhance nonviral gene delivery // Bioconjugate Chem. 2004. V. 15. P. 152–161.
19. De Laporte L., Cruz Rea J., Shea L.D. Design of modular non-viral gene therapy vectors // Biomaterials. 2006. V. 27. P. 947–954.
20. Martin B., Sainlos M., Aissaoui A., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.-P., Lehn J.-M., Lehn P. The design of cationic lipids for gene delivery // Curr. Pharm. Design. 2005. V. 11. P. 375–394.
21. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Катионные амфифилы липидной и нелипидной природы в генной терапии // Изв. АН. Сер. хим. 2000. № 3. С. 385–400.
22. Mintzer M.A., Simanek E.E. Nonviral vectors for gene delivery // Chem. Rev. 2009. V. 109. P. 259–302.
23. Guo X., Szoka F.C. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery // Acc. Chem. Res. 2003. V. 36. P. 335–341.
24. Carriere M., Escribe V., Jollet A., Scherman D., Azoulay M., Monneret C. New synthetic glycolipids for targeted gene transfer: synthesis, formulation in lipoplexes and specific interaction with lectin // Drug Delivery. 2004. V. 11. P. 351–363.
25. Hattori Y., Maitani Y. Enhanced *in vitro* DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer // J. Contr. Release. 2004. V. 97. P. 173–183.
26. Martin-Herranz A., Ahmad A., Evans H.M., Ewert K., Schulze U., Safinya C.R. Surface functionalized cationic lipid-DNA complexes for gene delivery: PEGylated lamellar complexes exhibit distinct DNA-DNA interaction regimes // Biophys. J. 2004. V. 86. P. 1160–1168.
27. Masson C., Garinot M., Mignet N., Wetzter B., Mailhe P., Scherman D., Bessodes M. pH-Sensitive PEG lipids containing orthoester linkers: New potential tools for nonviral gene delivery // J. Contr. Release. 2004. V. 99. P. 423–434.
28. Song L.Y., Ahkong Q.F., Rong Q., Wang Z., Ansell S., Hope M.J., Mui B. Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1558. P. 1–13.
29. Константинова И.Д., Ушакова И.П., Серебренникова Г.А. Синтез положительно заряженных липидов с простой эфирной связью // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 844–848.
30. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез алкильных глицеролипидов с различными катионными группами, присоединенными непосредственно к глицериновому скелету // Изв. АН. Сер. хим. 1999. № 7. С. 1381–1384.
31. Константинова Т.В., Клыков В.Н., Серебренникова Г.А. Синтез холестеринсодержащих катионных амфифилов с гетероциклическими основаниями // Биоорганическая химия. 2001. Т. 27. № 6. С. 453–456.
32. Соколова Т.В., Клесарева Ю.С., Серебренникова Г.А. Синтез катионных производных холестерина с азотистыми основаниями алифатического ряда // Журн. орг. химии. 2004. Т. 40. С. 365–367.
33. Medvedeva D.A., Maslov M.A., Serikov R.N., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Sheglov D.V., Latyshev A.V., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Novel cholesterol-based cationic lipids for gene delivery // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 6558–6568.
34. Константинова Т.В., Клыков В.Н., Маслов М.А., Серебренникова Г.А. Синтез катионных производных холестерина с сукцинильной спейсерной группой // Журн. орг. химии. 2002. Т. 38. № 8. С. 1240–1242.
35. Yoshimura T., Hasegawa S., Hirashima N., Nakanishi M., Ohwada T. Anchoring and bola cationic amphiphiles for nucleotide delivery. Effects of orientation and extension of hydrophobic regions // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001. V. 11. P. 2897–2901.
36. Walker S., Sofia M.J., Kakarla R., Kogan N.A., Wierichs L., Longley C.B., Bruker K., Axelrod H.R., Midha S., Babu S., Kahne D. Cationic facial amphiphiles: a promising class of transfection agents // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 1585–1590.
37. Vandenburg Y.R., Smith B.D., Pérez-Payán M.N., Davis A.P. Non-leaky vesicle fusion and enhanced cell transfection using a cationic facial amphiphile // J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122. P. 3252–3253.
38. Bandyopadhyay P., Bandyopadhyay P., Regen S.L. Ion conductors derived from biogenic amines, bile

acids, and amino acids // *Bioconjugate Chem.* 2002. V. 13. P. 1314–1318.

39. Соколова Т.В., Маслов М.А., Серебренникова Г.А. Получение катионных амфифилов на основе дезоксихолевой кислоты // *Биоорганическая химия.* 2004. Т. 30. № 5. С. 531–536.

40. Соколик В.Н., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез поликатионных амфифилов на основе холевой кислоты // *Вестник МИТХТ.* 2010. Т. 5. № 6. С. 58–62.

41. Maslov M.A., Morozova N.G., Solomatina T.V., Sergeeva O.A., Cheshkov D.A., Serebrennikova G.A. Synthesis of cholic acid amino analogues using $\text{NaBH}_3\text{CN-TiCl}_3$ // *Mendeleev Commun.* 2011. V. 21. P. 137–139.

42. Aissaoui A., Martin B., Kan E., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.-P., Lehn J.-M., Lehn P. Novel cationic lipids incorporating an acid-sensitive acylhydrazone linker: Synthesis and transfection properties // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. P. 5210–5223.

43. Константинова И.Д., Завгородний С.Г., Мирошников А.И., Ушакова И.П., Серебренникова Г.А. 1-Алкилтиоалкилирование гидроксильной группы дисамещенных глицеринов как удобный метод синтеза модифицированных липидов алкильного типа // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 66–69.

44. Sokolik V.N., Sokolova T.V., Maslov M.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A. Synthesis of cationic cholesterol-containing amphiphiles with an acid-labile linker // *Mendeleev Commun.* 2007. V. 17. P. 281–283.

45. Маслов М.А., Морозова Н.Г., Сенан И.М., Серебренникова Г.А. Синтез катионных липидных агентов трансфекции с *O,O*- или *N,O*-ацетальными связями // *Биоорганическая химия.* 2009. Т. 35. № 5. С. 696–700.

46. Shaw J.T., Woerpel K.A. Stereoselective insertion of formamides into the C–Si bond of siliranes // *J. Org. Chem.* 1997. V. 62. P. 442–443.

47. Ouameur A.A., Tajmir-Riahi H.-A. Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 42041–42054.

48. Remy J.S., Sirlin C., Vierling P., Behr J.-P. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules // *Bioconjugate Chem.* 1994. V. 5. P. 647–654.

49. Geall A.J., Taylor R.J., Earll M.E., Eaton M.A.W., Blagbrough I.S. Synthesis of cholesteryl polyamine carbamates: pK(a) studies and condensation of calf thymus DNA // *Bioconjugate Chem.* 2000. V. 11. P. 314–326.

50. Byk G., Dubertret C., Escriou V., Frederic M., Jaslin G., Rangara R., Pitard B., Crouzet J., Wils P., Schwartz B., Scherman D. Synthesis, activity and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 229–235.

51. Geall A.J., Blagbrough I.S. Homologation of polyamines in the rapid synthesis of lipospermine conjugates and related lipoplexes // *Tetrahedron.* 2000. V. 56. P. 2449–2460.

52. Petukhov I.A., Maslov M.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A. Convenient synthesis of polycationic amphiphiles by the Fukuyama reaction // *Mendeleev Commun.* 2009. V. 19. P. 250–252.

53. Петухов И.А., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез холестерин-содержащих поликатионных липидов // *Изв. АН. Сер. хим.* 2010. № 1. С. 254–261.

54. Kirby A.J., Camilleri P., Engberts J.B.F.N., Feiters M.C., Nolte R.J.M., Soderman O., Bergsma M., Bell P.C., Fielden M.L., Rodriguez C.L.G., Guedat P., Kremer A., McGregor C., Perrin C., Ronsin G., van Eijk M.C.P. Gemini surfactants: New synthetic vectors for gene transfection // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003. V. 42. P. 1448–1457.

55. Jacopin C., Hofland H., Scherman D., Herscovici J. Synthesis and transfecting properties of a glycosylated polycationic DNA vector // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001. V. 11. P. 419–422.

56. Perouzel E., Jorgensen M.R., Keller M., Miller A.D. Synthesis and formulation of neoglycolipids for the functionalization of liposomes and lipoplexes // *Bioconjugate Chem.* 2003. V. 14. P. 884–898.

57. Horiuchi S., Aoyama Y. Systematic lactose-functionalization of amphiphilic octaamine macrocycle as a gene carrier. Optimization of the charge, size, toxicity and receptor factors for hepatocyte targeting // *J. Contr. Release.* 2006. V. 116. P. 107–114.

58. Wasungu L., Stuart M.C.A., Scarzello M., Engberts J.B.F.N., Hoekstra D. Lipoplexes formed from sugar-based gemini surfactants undergo a lamellar-to-micellar phase transition at acidic pH. Evidence for a non-inverted membrane-destabilizing hexagonal phase of lipoplexes // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1758. P. 1677–1684.

59. Wasungu L., Scarzello M., van Dam G., Molema G., Wagenaar A., Engberts J.B.F.N., Hoekstra D. Transfection mediated by pH-sensitive sugar-based gemini surfactants: Potential for *in vivo* gene therapy applications // *J. Mol. Med.* 2006. V. 84. P. 774–784.

60. Murao A., Nishikawa M., Managit C., Wong J., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M. Targeting efficiency of galactosylated liposomes to hepatocytes *in vivo*: Effect of lipid composition // *Pharm. Res.* 2002. V. 19. P. 1808–1814.

61. Fabio K., Gaucheron J., Di Giorgio C., Vierling P. Novel galactosylated polyamine bolaamphiphiles for gene delivery // *Bioconjugate Chem.* 2003. V. 14. P. 358–367.

62. Mukthavaram R., Marepally S., Venkata M.Y., Vegi G.N., Sistla R., Chaudhuri A. Cationic glycolipids with cyclic and open galactose head groups for the selective targeting of genes to mouse liver // *Biomaterials.* 2009. V. 30. P. 2369–2384.

63. Duffels A., Green L.G., Ley S.V., Miller A.D. Synthesis of high-mannose type neoglycolipids: Active targeting of liposomes to macrophages in gene therapy // *Chem. Eur. J.* 2000. V. 6. P. 1416–1430.

64. Higuchi Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M. The potential role of fucosylated cationic liposome/NFκB decoy complexes in the treatment of cytokine-related liver disease // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 532–539.

65. Masuda T., Akita H., Nishio T., Niikura K., Kogure K., Ijio K., Harashima H. Development of lipid particles

- targeted via sugar-lipid conjugates as novel nuclear gene delivery system // *Biomaterials*. 2008. V. 29. P. 709–723.
66. Альшоейби З.Я., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез катионных глюкозил-диглицеридов // *Биоорганическая химия*. 2000. Т. 26. С. 703–706.
67. Maslov M.A., Morozova N.G., Chizhik E.I., Rapoport D.A., Zenkova M.A., Serebrennikova G.A. Synthesis and delivery activity of new cationic cholesteryl glucosides // *Carbohydrate Res.* 2010. V. 345. P. 2438–2449.
68. Маслов М.А., Аль-Шоейби З.Я., Андрияшина Т.Ю., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Положительно заряженные ацилаты углеводов как потенциальные медиаторы трансфекции // *Биоорганическая химия*. 2007. Т. 33. № 5. С. 538–543.
69. Guilbot J., Benvegnu T., Legros N., Plusquellec D., Dedieu J.-C., Gulik A. Efficient synthesis of unsymmetrical bolaamphiphiles for spontaneous formation of vesicles and disks with a transmembrane organization // *Langmuir*. 2001. V. 17. P. 613–618.
70. Аль-Шоейби З.Я., Андрияшина Т.Ю., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез глюкозил-диглицерида для pH-чувствительных липосом // *Биоорганическая химия*. 2003. Т. 29. № 5. С. 323–325.
71. Морозова Н.Г., Маслов М.А., Мягченков В.В., Серебренникова Г.А. Модельный синтез катионного неогликолипида // *Вестник МИТХТ*. 2006. Т. 1. № 4. С. 55–58.
72. Морозова Н.Г., Маслов М.А., Петухова О.А., Андреева С.В., Гришаева А.О., Серебренникова Г.А. Синтез липидных медиаторов для направленной доставки олиго- и полинуклеотидов в гепатоциты // *Изв. АН. Сер. хим.* 2010. № 1. С. 245–253.
73. Морозова Н.Г., Маслов М.А., Мягченков В.В., Серебренникова Г.А. Синтез положительно заряженных галактозосодержащих сурфактантов // *Биоорганическая химия*. 2010. Т. 36. С. 714–720.
74. Quagliotto P., Viscardi G., Barolo C., D'Angelo D., Barni E., Compari C., Duce E., Fiscaro E. Synthesis and properties of new glucocationic surfactants: Model structures for marking cationic surfactants with carbohydrates // *J. Org. Chem.* 2005. V. 70. P. 9857–9866.
75. Maslov M.A., Medvedeva D.A., Rapoport D.A., Serikov R.N., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Synthesis and transfection activity of novel galactosylated polycationic lipid // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21. № 10. P. 2937–2940.
76. Иванова Е.А., Морозова Н.Г., Маслов М.А., Серебренникова Г.А. Синтез галактозо-содержащих амфифилов // *Вестник МИТХТ*. 2010. Т. 5. № 5. С. 65–70.
77. Bergh A., Magnusson B.-G., Ohlsson J., Wellmar U., Nilsson U.J. Didecyl squarate – a practical amino-reactive cross-linking reagent for neoglycoconjugate synthesis // *Glycoconjugate J.* 2001. V. 18. P. 615–621.
78. Sejwal P., Han Y., Shah A., Luk Y.-Y. Water-driven chemoselective reaction of squarate derivatives with amino acids and peptides // *Org. Lett.* 2007. V. 9. P. 4897–4900.
79. Шмендель Е.В., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез неогликолипидов для применения в невирусных системах доставки генетического материала // *Изв. АН. Сер. хим.* 2010. № 12. С. 2225–2239.
80. Lee Y.C. In: *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications* / Ed. Y.C. Lee, R.T. Lee. – London: Academic Press, 1994. P. 3.
81. Mahon E., Aastrup T., Barboiu M. Multivalent recognition of lectins by glyconanoparticle systems // *Chem. Commun.* 2010. V. 46. P. 5491–5493.
82. Иванова Е.А., Морозова Н.Г., Маслов М.А., Серебренникова Г.А. Оптимизация дизайна галактозосодержащего адресного вектора для трансфекции эукариотических клеток // *Сб. тезисов докл. XIII Междунар. науч.-техн. конф. «Наукоемкие химические технологии – 2010»*. – Иваново–Суздаль, 2010. С. 209.
83. Шмендель Е.В., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез амфифильных производных фолиевой кислоты // *Сб. тезисов докл. III молодежной науч.-техн. конф. «Наукоемкие химические технологии – 2009»*. – Москва, 2009. С. 55.
84. Жданов Р.И., Подобед О.В., Куценко Н.Г., Бунеева О.А., Цветкова Т.А., Гурьев С.О., Серебренникова Г.А., Константинова И.Д., Маслов М.А. Новые катионные липосомы для трансфекции эукариотических клеток // *Доклады АН*. 1998. Т. 362. № 4. С. 557–560.
85. Leventis R., Silvius J. R. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles // *Biochim. Biophys. Acta*. 1990. V. 1023. P. 124–132.
86. Tan F., Hughes J. A. Introduction of a disulfide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 242. P. 141–145.
87. Коломейчук С.Н., Абакумова О.Ю., Маслов М.А., Калашникова Е.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А., Швеи В.И., Соколов Н.Н. Трансфекция эукариотических клеток геном цитохрома *CYP450 2B6*: появление чувствительности к циклофосфамиду // *Вопросы мед. химии*. 2002. Т. 48. № 5. С. 469–476.