

На правах рукописи



ПУЧКОВ ПАВЕЛ АНАТОЛЬЕВИЧ

**СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ДИМЕРНЫХ ПОЛИКАТИОННЫХ АМФИФИЛОВ
ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ**

02.00.10 – Биоорганическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет».

Научный руководитель доктор химических наук, доцент, Маслов Михаил Александрович, профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», директор Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет»

Официальные оппоненты:

Водовозова Елена Львовна, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, заведующий лабораторией химии липидов

Грачев Михаил Константинович, доктор химических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский педагогический государственный университет», заведующий кафедрой органической химии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «28» декабря 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.131.06 на базе ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» по адресу: 119571, г. Москва, пр. Вернадского, д. 86, ауд. М-116.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» по адресу: 119454, Москва, проспект Вернадского, д. 78 и интернет-сайтах ВАК РФ <http://vak.minobrnauki.gov.ru> и ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» <https://www.mirea.ru>.

Автореферат разослан «____» _____ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук



Ларкина Екатерина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время для лечения наследственных и ряда других заболеваний, для которых определены генетические причины их возникновения, разрабатываются методы генной терапии, основанные на доставке в клетки организма коротких (антисмысловые или антигенные олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК, микроРНК) и протяженных (ДНК, мРНК) терапевтических нуклеиновых кислот (НК^{*}). Поскольку транспорт в эукариотические клетки незащищенных НК является затруднительным, то для их доставки используют вирусы, которые обладают высокой эффективностью, но при этом имеют ряд серьезных недостатков, прежде всего связанных с индукцией воспалительных и иммунных реакций в организме. В качестве альтернативы разрабатываются невирусные средства доставки, основанные на использовании полимерных носителей, мицелл, а также липосом, сформированных на основе синтетических катионных амфифилов. Недостатком данных носителей является низкая эффективность, которая обусловлена наличием внеклеточных и внутриклеточных биологических барьеров, препятствующих проникновению транспортной системы с заключенной в нее НК в эукариотическую клетку и проявлению НК терапевтического действия.

Катионные липосомы (КЛ) – это невирусные средства доставки, которые широко используются для транспорта НК. Обязательным компонентом липосом является катионный амфирил (КА), связывающий и компактизирующий молекулы НК с образованием нуклеолипидных комплексов (липоплексы). Структура КА представляет собой комбинацию гидрофобного и катионного доменов, разнесенных в пространстве при помощи спейсерных групп. Направленная модификация химической структуры КА является одним из способов повышения эффективности доставки НК, поскольку именно в структуре закладывается способность молекулы к образованию липидных агрегатов, формированию определенной липидной фазы, а также к «отклику» на различные внутриклеточные факторы.

Ранее было показано, что поликатионные амфирилы на основе природных полиаминов обеспечивают более эффективный транспорт НК в клетки, по сравнению с монокатионными аналогами, за счет формирования системы распределенных зарядов в полиаминной матрице и способности облегчать высвобождение НК из эндосом. Введение в молекулу классического КА (мономерный амфирил «голова-хвост») дополнительного гидрофобного домена позволило создать класс димерных амфирилов (гемини-амфирилов), которые доставляли НК в

* Список сокращений, использованных в автореферате: НК – нуклеиновая кислота, КА – катионный амфирил, ДПКА – димерный поликатионный амфирил, КЛ – катионные липосомы, пДНК – плазмидная ДНК, siРНК – малая интерферирующая РНК, ТЭТА – триэтилентетрамин, DCM – дихлорметан, ТВАВ – тетрабутиламмоний бромид, 9-BBN – 9-борабициклононан, DMTMM – 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолиний хлорид, EEDQ – 2-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин, DIEA – диизопропилэтиламин, NMM – N-метилморфолин, DOPE – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин, ИП – индекс полидисперсности, EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок, FBS – телячья сыворотка крови.

эукариотические клетки в присутствии сыворотки крови эффективнее мономерных аналогов. Введение в структуру КА стимул-чувствительных групп различной природы (кислото-, термо-, фотолabile, редокс-чувствительные), способных разрушаться под действием внутриклеточных факторов, может увеличить количество высвобождающейся из липоплекса НК, тем самым, усилив ее биологический / терапевтический эффект.

Данная работа посвящена дизайну и синтезу новых димерных поликатионных амфифилов (ДПКА) за счет направленной модификации отдельных структурных элементов амфифильной молекулы, созданию на их основе катионных липосом, изучению их физико-химических характеристик и биологической (трансфицирующей) активности.

Работа является частью научных исследований, проводимых на кафедре химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова МИРЭА – Российского технологического университета в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (проект № 0706-2020-0019), гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-7946.2016.11, а также грантов РНФ 18-73-00270 и РФФИ 18-29-08009мк и 13-04-40181-К.

Целью работы является синтез новых димерных поликатионных амфифилов для генной терапии, исследование физико-химических характеристик и биологических свойств катионных липосом на их основе.

В рамках указанной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Получить ряд новых ДПКА, в которых варьируется структура катионного домена и спейсерных групп.
2. Разработать подходы к синтезу стимул-чувствительных ДПКА с дисульфидными группами, расположенными в разных частях молекулы.
3. Получить на основе синтезированных ДПКА катионные липосомы и изучить их физико-химические характеристики и биологические свойства.

Научная новизна

В результате работы получены семь новых ДПКА, в которых варьируется строение катионного домена и спейсерных групп. Разработан новый подход к введению дисульфидных групп в молекулу ДПКА, и проведена оптимизация синтеза дисульфидных ДПКА на основе холестерина и спермина. Используя синтезированные амфифилы, были получены новые катионные липосомы и их комплексы с пДНК и siРНК, для которых определены физико-химические характеристики: размер, ζ -потенциал и полнота связывания с НК. Для дисульфидных амфифилов впервые показана различная чувствительность липоплексов к действию восстанавливающих агентов, которая зависит от положения дисульфидной связи в молекуле ДПКА.

Биологические исследования *in vitro* позволили оценить влияние структуры ДПКА на эффективность доставки НК и выявить наиболее перспективные катионные липосомы для дальнейших биологических исследований. Наиболее важные модификации, усиливающие трансфицирующую активность ДПКА, связаны с использованием в качестве катионного домена полиамина спермина и его природной способностью упаковывать молекулы НК, а также с увеличением длины спейсеров димерных поликатионных амфифилов с 6 до 8 атомов. Катионные липосомы на основе ДПКА с дисульфидной группой в структуре спейсера показали высокую эффективность доставки siРНК, приводящую к подавлению биосинтеза белка на 90%.

Практическая значимость

В ходе работы нами был оптимизирован синтез ДПКА, что позволяет разработать лабораторную и в дальнейшем промышленную технологию их получения. На основе ДПКА получены новые катионные липосомы, которые могут быть использованы для эффективной доставки коротких и протяженных НК в различные типы эукариотических клеток, что расширяет имеющийся арсенал трансфицирующих агентов. Для внесения новых или восстановления утраченных клетками функций в ходе доставки пДНК наиболее перспективными являются липосомы на основе ДПКА с этоксиэтоксиэтильным спейсером. Катионные липосомы на основе ДПКА с дисульфидной группой обеспечивают эффективный транспорт siРНК, специфически подавляющих экспрессию генов-мишеней. Данные композиции могут быть использованы в качестве альтернативы зарубежному коммерческому препарату Липофектамин 2000, а также разработанным ранее в нашей лаборатории липосомам на основе ДПКА **2Х3**. Запатентован способ получения стимул-чувствительных катионных липосом на основе дисульфидного ДПКА (Патент РФ № 2610271, 2017 г.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтез новых димерных поликатионных амфифилов, содержащих различные структурные компоненты, для получения катионных липосом для генной терапии.
2. Исследование физико-химических характеристик, цитотоксичности и трансфицирующей активности катионных липосом, сформированных на основе синтезированных амфифилов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, включая 5 статей в научных журналах, входящих в Перечень ВАК и в международные базы цитирования Scopus и Web of Science, 11 тезисов докладов, получен 1 патент РФ.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены на V молодежной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии – 2013» (Москва, 2013), XV Международной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии – 2014» (Звенигород, 2014), Втором междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии (Новый Свет, 2015), XXVIII зимней

молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016), Кластере конференций по органической химии «OrgХим-2016», (Санкт-Петербург (пос. Репино), 2016), IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), Третьем междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике 2017 (Севастополь, 2017), International workshop «Targeting RNA world » (Saint-Petersburg, 2018), Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019).

Личный вклад автора. Диссертантом выполнен весь объем синтетической части работы, получены катионные липосомы, проведены физико-химические исследования, проанализированы данные биологических испытаний. Автор участвовал в формулировке задач и выводов работы, а также в подготовке научных публикаций по теме диссертации.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 92 страницах печатного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (119 ссылок). Работа проиллюстрирована 18 рисунками и содержит 7 схем и 3 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Структура димерных поликатионных амфифилов (ДПКА) оказывает ключевое влияние на эффективность доставки НК в эукариотические клетки. Основными структурными элементами данных соединений являются гидрофобный и катионный домены, а также спейсерные группы, которые связывают эти домены посредством линкеров различной природы (рис. 1). Ранее в нашей лаборатории были получены ДПКА на основе спермина (**2X3** и **2D3**, рис. 1), показавшие высокую эффективность при трансфекции эукариотических клеток [Maslov M.A. et al., *J. Control. Release*, 160, 2012, p. 182; Markov O.O. et al., *J. Control. Release*, 160, 2012, p. 200].

С целью рационального отбора структурных элементов ДПКА, увеличивающих эффективность доставки НК, в данной работе была проведена модификация структуры амфифилов по катионному домену и спейсерным группам. Катионными доменами служили полиамины триэтилететрамин (ТЭТА) и спермин, изменялась длина и гидрофильность спейсеров, а также в качестве дополнительного линкера была использована дисульфидная группа, чувствительная к действию восстановителей.

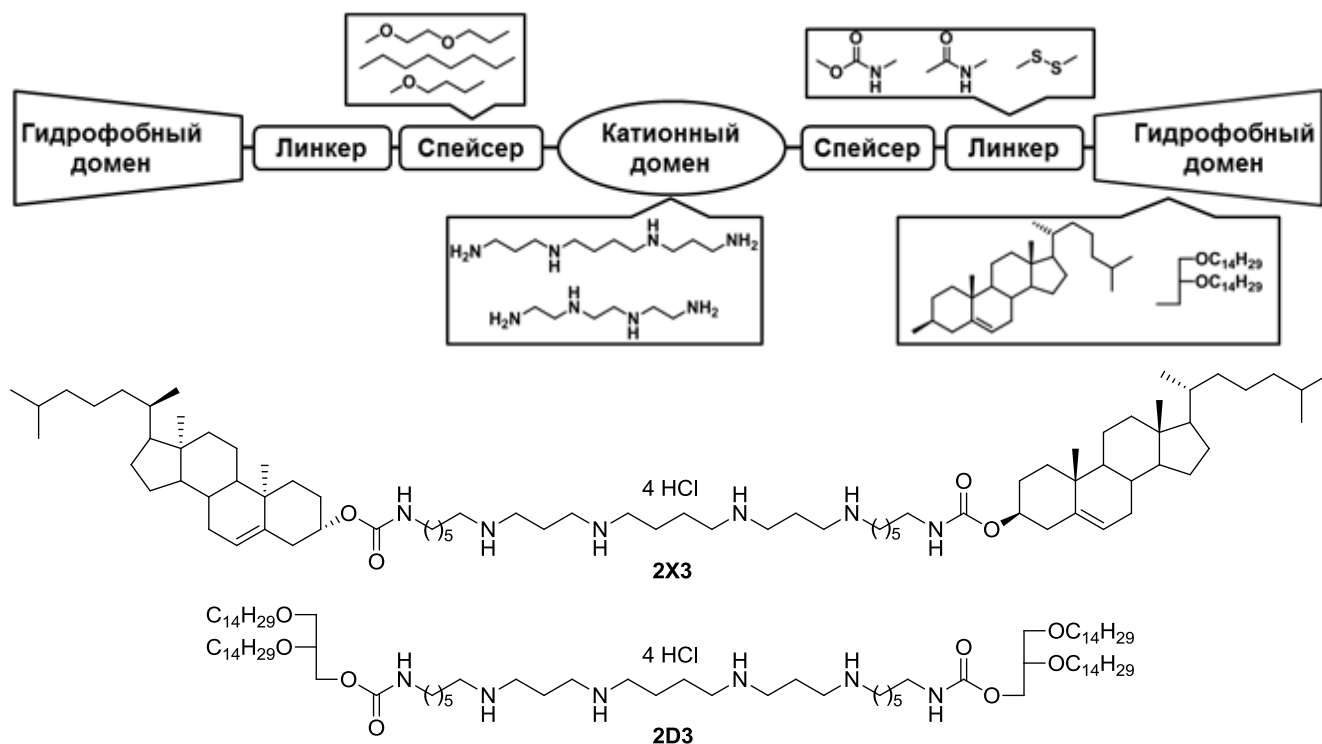


Рисунок 1. Структура димерных поликатионных амфифилов.

Стратегия синтеза заключалась в предварительном получении избирательно защищенных полиаминов, а также бром- и аминопроизводных холестерина или диалкилглицерина (гидрофобный домен) с различными спейсерными и линкерными группами. После этого обе компоненты вводились во взаимодействие друг с другом с получением защищенных димерных производных, а удаление защитных групп приводило к целевым ДПКА (рис. 2).

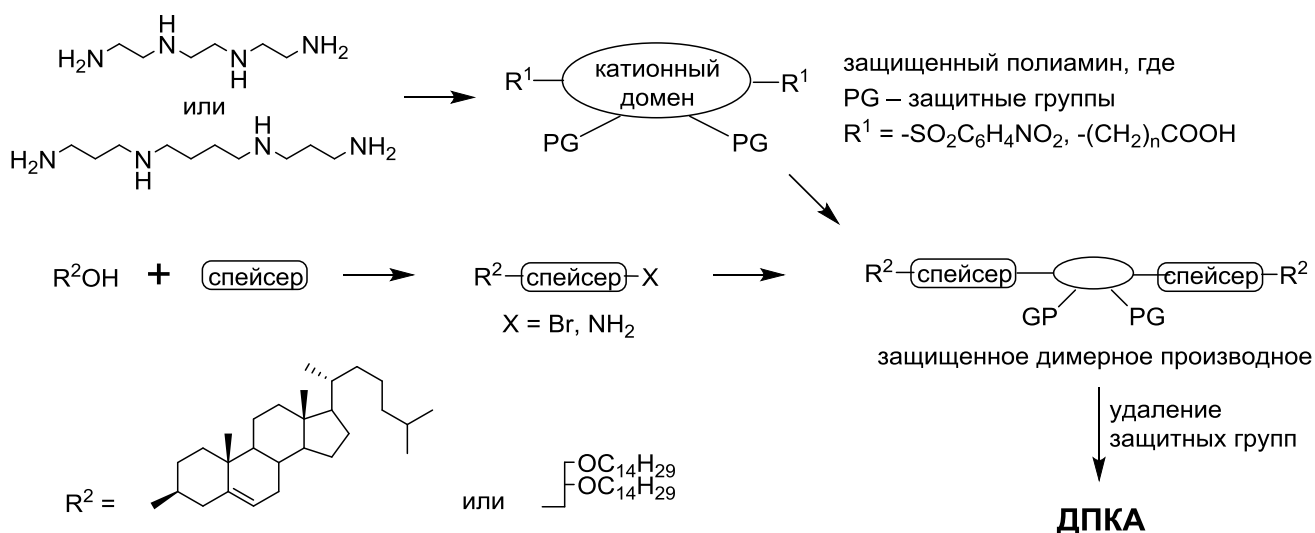
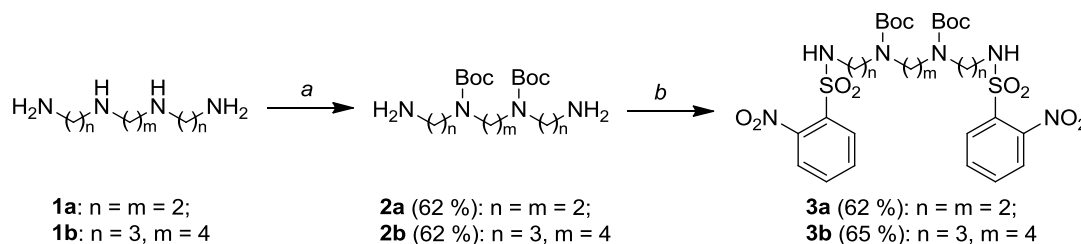


Рисунок 2. Стратегия синтеза димерных поликатионных амфифилов.

Региоселективно защищенные производные полиаминов **3a,b** получали согласно ранее использованному в нашей лаборатории подходу [Петухов И.А. и др., *Изв. АН Сер. Хим.*, 2010,

с. 254], позволяющему исключить вероятность полиалкилирования и проводить реакции в мягких условиях. Он заключается в избирательном блокировании терминальных аминогрупп спермина (**1a**) или триэтилентетрамина (**1b**) трифторацетильной защитой, что позволяет провести ортогональное блокирование оставшихся вторичных аминогрупп *трет*-бутилпиروкарбонатом. После удаления трифторацетильных защит производные **2a,b** вводятся во взаимодействие с 2-нитробензолсульфонилхлоридом, давая соответствующие сульфонамиды **3a,b** (схема 1).

Схема 1



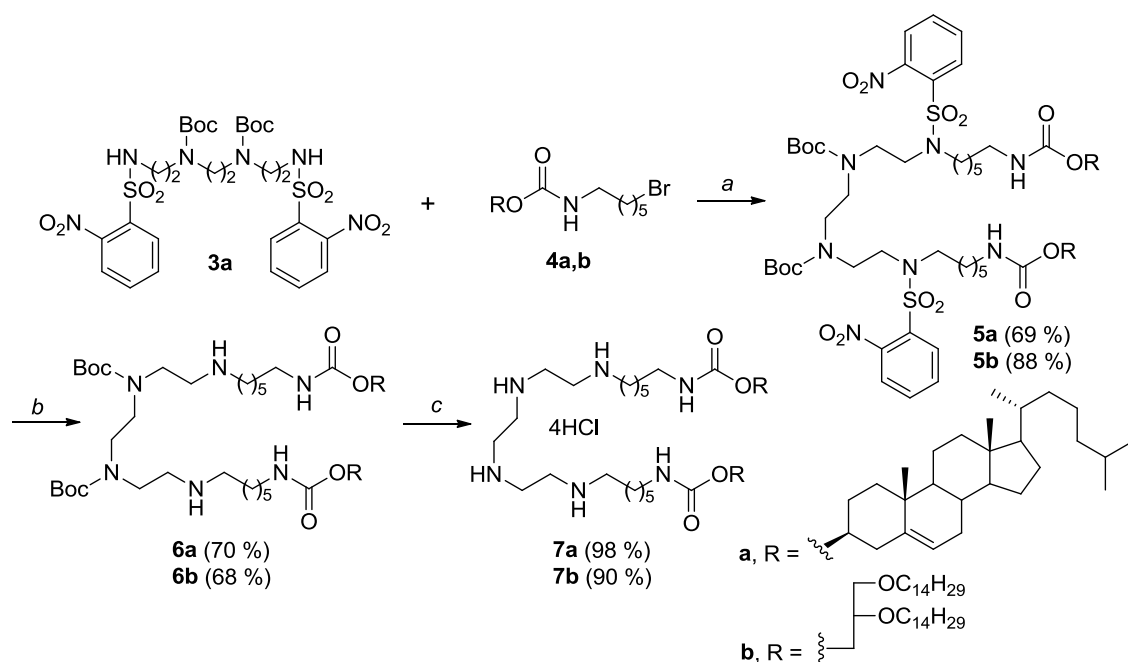
Реагенты и условия: а) CF_3COOEt , MeOH, 70 °C, 5 ч, затем Boc_2O , Et_3N , 24 °C, 96 ч, затем NaOH, MeOH, 24 °C, 48 ч; б) $2\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{Cl}$, Et_3N , DCM, 24 °C, 1 ч.

1. Синтез новых димерных поликатионных амфифилов

1.1. Синтез димерных поликатионных амфифилов на основе триэтилентетрамина

Известно, что природные полиамины, такие как спермин, играют важную роль в упаковке ДНК, и многие системы доставки на основе спермина эффективно трансфицируют эукариотические клетки. С другой стороны, литературные данные указывают, что липофильные производные синтетических полиаминов могут обладать большей эффективностью доставки НК по сравнению с природными аналогами. В качестве катионного домена ДПКА нами был опробован синтетический аналог спермина – триэтилентетрамин (ТЭТА), который содержит сходное количество аминогрупп, но иное число метиленовых звеньев между ними. Кроме того, в отличие от спермина, ТЭТА обладает небольшой коммерческой стоимостью.

На основе ТЭТА были получены ДПКА **7a,b**, гидрофобные домены которых представлены остатками холестерина или 1,2-ди-*O*-тетрадецилглицерина. Конденсация региоселективно защищенного производного ТЭТА **3a** с бромпроизводными **4a,b** [Петухов И.А. и др., *Изв. АН Сер. Хим.*, 2010, с. 254] в условиях реакции Фукуямы давала соединения **5a,b** с выходом 69 и 88 %, соответственно. Последующее удаление 2-нитробензолсульфонильной защиты 10-кратным избытком тиофенола приводило к образованию соединений **6a,b** с выходом 68-70%. Количественное удаление *трет*-бутоксикарбонильных защитных групп действием 3 М HCl в диоксане давало после перекристаллизации из этанола целевые ДПКА **7a,b** на основе синтетического полиамина – ТЭТА (схема 2).

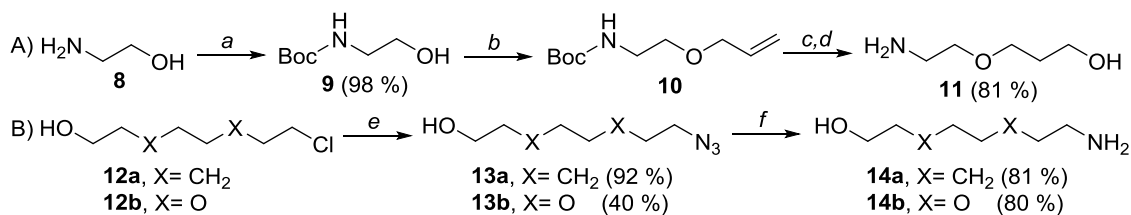


Реагенты и условия: а) Cs₂CO₃, DMF, 80 °C, 5 ч; б) PhSH, K₂CO₃, DMF, 24 °C, 1.5 ч; в) 3 М HCl/dioxane, DCM, 24 °C, 1.5 ч.

1.2. Синтез димерных поликатионных амфифилов на основе спермина со спейсерными группами различного типа и длины

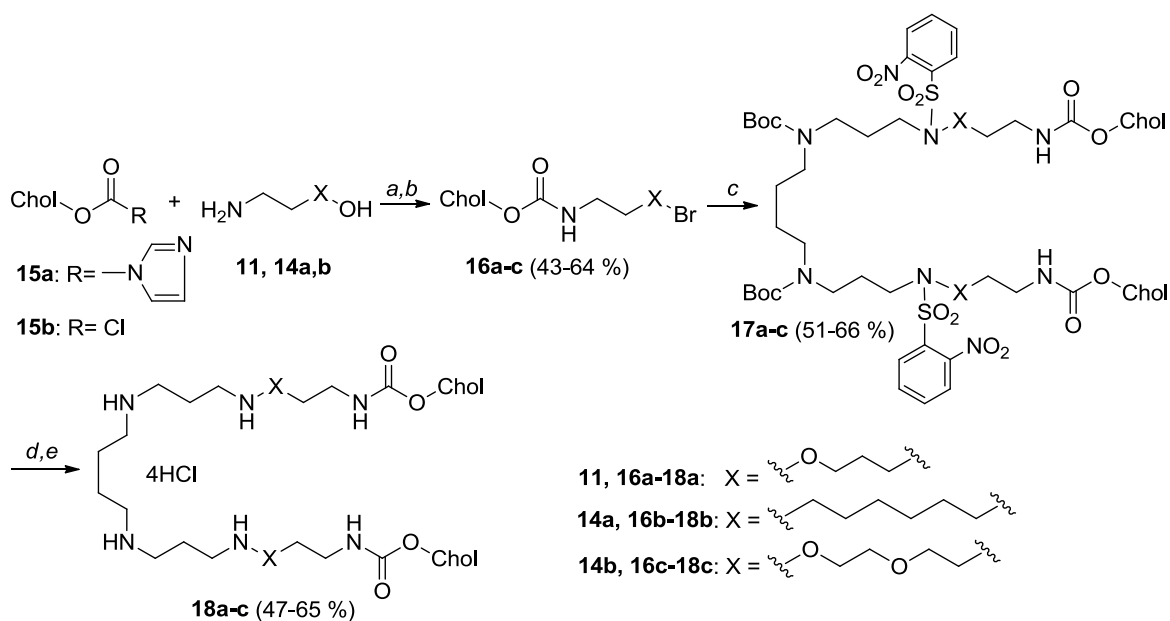
В структуре ДПКА спейсерная группа обеспечивает пространственное разнесение гидрофобного и катионного доменов, а также влияет на способность амфифила формировать катионные липосомы и связывать НК. С целью подбора оптимального типа и длины спейсерной группы нами были получены ДПКА **18a-c** с этоксипропильным, этоксиэтоксиэтильным и октаметиленовым спейсерами. В структуре амфифила **18a** этоксипропильный спейсер имеет подобную длину, что и спейсер в соединении **2X3** (рис. 1), но большую гидрофильность. Этоксиэтоксиэтильный и октаметиленовый спейсеры обладают большей длиной за счет двух дополнительных атомов кислорода или углерода, но разной гидрофильностью.

Исходя из стратегии синтеза, спейсерные группы вводили в молекулу холестерина, используя доступные коммерческие предшественники. Этоксипропильный спейсер (схема 3) получали из 2-аминоэтанола (**8**), аминогруппу которого блокировали *трет*-бутоксипирокарбонатом, затем вводили аллильную группу в условиях межфазного катализа действием 3-бром-1-пропена. Полученный алкен **10** гидроборировали с помощью региоселективного агента 9-борабициклононана (9-BBN), а последующее окислительное расщепление борпроизводного перекисью водорода давало целевой спирт с высоким выходом. Удаление *трет*-бутоксикарбонильной защиты действием 3 М HCl в диоксане приводило к соединению **11** с выходом 81 % на две стадии. Восьмиатомные спейсеры **14a,b** получали, исходя из коммерческих хлорспиртов **12a,b**, которые превращали в азиды **13a,b** и восстанавливали в присутствии 5% Pd/C, получая аминоспирты **14a,b** с хорошим выходом.



Реагенты и условия: а) Boc_2O , NaOH, THF, 24 °C, 5 ч; б) 3-бром-1-пропен, ТВАВ, NaOH, 24 °C, 19 ч; в) 9-BBN, THF, 9 °C, 4 ч, затем 30 % водн. H_2O_2 , NaOH, 5 °C, 1 ч; г) 3 М HCl/dioxane, DCM, 20 °C, 1.5 ч; е) NaN_3 , DMF, 70 °C, 27–74 ч; ф) H_2 , 5 % Pd/C, MeOH, 24 °C, 2–10 ч.

Введение спейсерных групп в структуру гидрофобного домена проводили взаимодействием аминспиртов **11**, **14a,b** и активированных производных холестерина **15a,b** (схема 4). В случае соединения **14a** использование имидазолида **15a** не привело к образованию целевого продукта, а его замена на холестерилхлорформиат **15b** позволила получить гидроксипроизводное с выходом 71 %. Бромирование полученных гидроксипроизводных действием тетрабромметана в присутствии трифенилфосфина дало соединения **16a-c** с высокими выходами. Конденсация холестериновых компонент **16a-c** с региоселективно защищенным производным спермина **3b** приводила к соединениям **17a-c** с выходами 51–66 %. Дальнейшее десульфонилирование и удаление *трет*-бутоксикарбонильных групп проводили в условиях, аналогичных описанному выше, получая целевые ДПКА **18a-c** с этоксипропильным, этоксиэтоксиэтильным и октаметиленовым спейсерами с выходами 47–65 % по двум стадиям.



Реагенты и условия: а) Et_3N , DCM, для **15a** 40 °C, 58–70 ч, для **15b** 24 °C, 20–24 ч; б) CBr_4 , Ph_3P , MeOH, 24 °C, 3–50 ч; в) **3b**, Cs_2CO_3 , DMF, 80 °C, 32–37 ч; г) PhSH , K_2CO_3 , DMF, 24 °C, 5–35 ч; е) 3 М HCl/dioxane, DCM, 24 °C, 3–5 ч.

1.3. Синтез димерных поликатионных амфифилов на основе спермина с дисульфидными группами

Наличие и положение дисульфидной группы, чувствительной к восстановлению, в молекуле ДПКА, может приводить к увеличению эффективности доставки НК за счет ее лучшего высвобождения из липоплексов. Нами разработан синтез ДПКА, в которых дисульфидная группа находится в структуре спейсера (модификация 1) или является линкером, связывающим гидрофобный домен и спейсер (модификация 2, рис. 3).

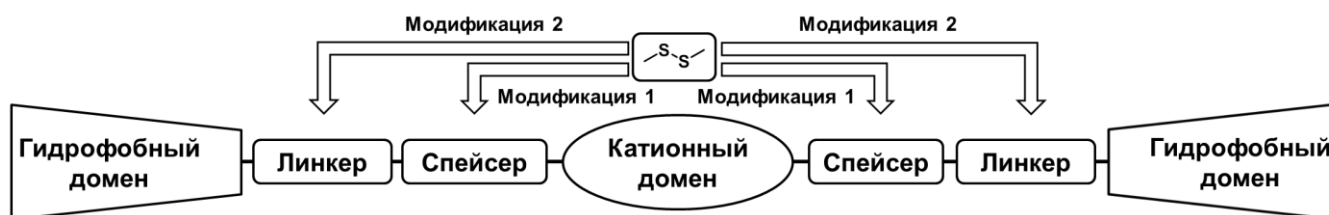
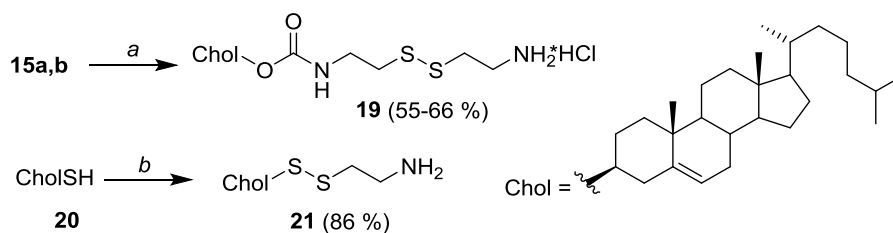


Рисунок 3. Введение дисульфидной группы.

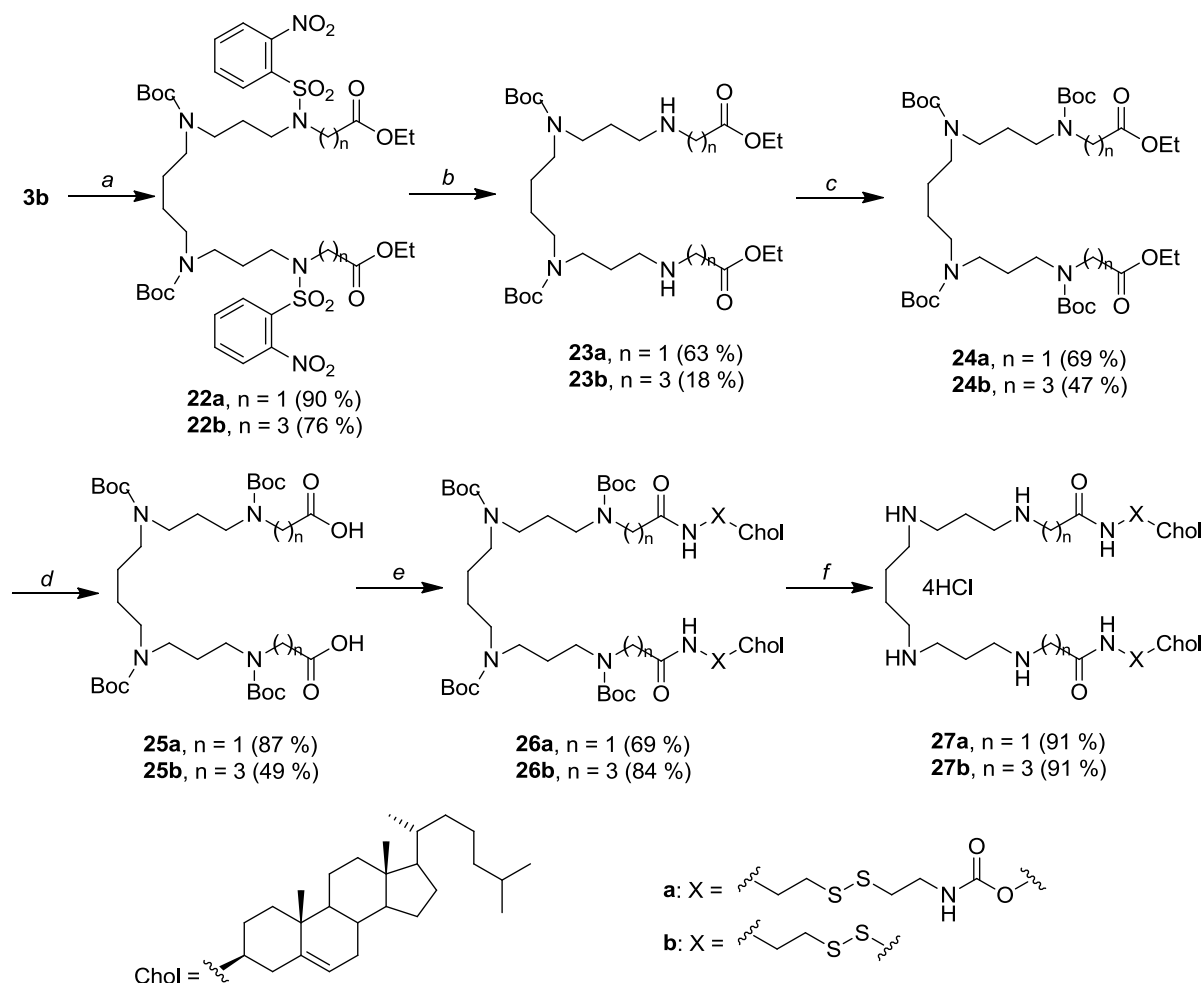
Самым простым способом введения спейсера с дисульфидной группой является взаимодействие активированных производных холестерина **15a,b** с цистамином (схема 5). Использование холестерилхлорформиата **15b**, а не имидазолида **15a**, способствовало увеличению выхода соединения **19** с 55 до 66 %. Реакцией тиол-дисульфидного обмена между тиохолестерином **20** и цистамином с высоким выходом было получено соединение **21** с дисульфидной группой в качестве линкера.

Схема 5



Реагенты и условия: а) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, Et_3N , DCM, для **15a** 40 °C, 45 ч, для **15b** 24 °C, 2 ч; б) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, Et_3N , DMF, 24 °C, 48 ч.

Для синтеза ДПКА **27a,b** с дисульфидными группами первоначально получали дикарбоксипроизводное спермина **25a,b** (схема 6), для чего региоселективно защищенный спермин **3b** алкилировали этиловым эфиром бромуксусной или 4-бромбутановой кислот в условиях реакции Фукуямы. После удаления 2-нитробензолсульфонильных защит соединения **23a,b** обрабатывали *трет*-бутилпирокарбонатом, получая полностью защищенные производные спермина **24a,b**, а последующий гидролиз этиловых эфиров давал соединения **25a,b** со свободными карбоксильными группами. Следует отметить, что соединение **25b** было получено с меньшим выходом, что связано с его более сложным выделением и очисткой.



Реагенты и условия: а) $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{COOEt}$, Cs_2CO_3 , DMF, 65°C , 30 ч; б) PhSH , K_2CO_3 , DMF, 24°C , 1 ч; в) Boc_2O , Et_3N , DCM, 24°C , 48 ч; д) NaOH , MeOH, 24°C , 96 ч; е) **19** для **25a** или **21** для **25b**, EEDQ, DIEA, DCM, 50°C , 48 ч; ф) 3 М HCl /dioxane, DCM, 24°C , 24 ч.

Ключевой стадией синтеза являлась конденсация дикарбоксипроизводных **25a,b** с дисульфидными производными холестерина **19** или **21** в присутствии различных конденсирующих агентов (табл. 1). Использование ТВТУ (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний тетрафторборат) привело к очень низкому выходу соединения **26a** (табл. 1, п. 1). Другим опробованным агентом был DMTMM (4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолиний хлорид), реакции с которым протекают в мягких условиях. DMTMM был нами испытан в нескольких растворителях (или смесях растворителей), максимальный достигнутый выход соединения **26a** составил 30 % (табл.1, пп. 2-4). При замене DMTMM на EEDQ (2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин) соединение **26a** образовывалось с наибольшим выходом (табл. 1, п. 5). Аналогично было получено соединение **26b** с выходом 84%. Удаление Вос-защитных групп давало целевые ДПКА **27a,b** в виде гидрохлоридов с высокими выходами.

Таблица 1. Оптимизация условий реакции конденсации

№ п/п	Реагенты	Растворитель	Выход соединения 26a, %
1	TBTU, DIEA	DMF	9
2	DMTMM, DIEA	DMF	- *
3	DMTMM, DIEA	Et ₂ O	22
4	DMTMM, NMM	MeOH:THF=5:1	30
5	EEDQ, DIEA	CH ₂ Cl ₂	69

* - целевое соединение выделено не было

Таким образом, нами получено семь новых ДПКА, в которых варьируется строение катионного домена, а также тип и длина спейсерных групп. Кроме того, осуществлено введение дисульфидных связей в молекулу амфифилов для придания им способности разрушаться под действием восстановителей. Оптимизация синтеза амфифила **27a** позволила увеличить общий выход с 4 до 21%. Структура всех целевых и промежуточных соединений подтверждена данными спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии.

2. Физико-химические характеристики и биологическая активность катионных липосом на основе димерных поликатионных амфифилов

Димерные поликатионные амфифилы **7a,b**, **18a-c**, **27a,b** были использованы для приготовления катионных липосом. Для этого получали тонкую липидную пленку, состоящую из смеси ДПКА и липида-хелпера DOPE (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин) (соотношение 1:1 мольн.), которую затем гидратировали в деионизированной воде Milli-Q и обрабатывали ультразвуком 15 мин при 60-65 °С. Для полученных липосом были исследованы физико-химические характеристики, оценена цитотоксичность, а также способность доставлять НК в эукариотические клетки *in vitro*. Комплексы катионных липосом с НК (липоплексы) формировали смешением липидных дисперсий и растворов НК при различных соотношениях N/P (отношение числа аминогрупп ДПКА к числу фосфатных групп НК).

2.1 Физико-химические характеристики катионных липосом и их комплексов с НК

Гидродинамический размер и ζ-потенциал катионных липосом и их комплексов с плазмидной ДНК (пДНК) или малой интерферирующей РНК (siРНК) определяли с помощью метода динамического светорассеяния. Оптимальным для систем доставки считается размер частиц в диапазоне 10-200 нм. Большинство амфифилов образовывали компактные частицы диаметром 40-62 нм (табл. 2). При этом липосомы **18a**/DOPE содержали дополнительную минорную фракцию с размером 193.7 нм, а наиболее крупные частицы образовывались в случае дисульфидного ДПКА **27b** (440 нм). При формировании большинства липоплексов размер

частиц увеличивался незначительно, за исключением липосом **18a/DOPE** и **27b/DOPE**, комплексы которых характеризовались наибольшими размерами и индексами полидисперсности. Все катионные липосомы и их комплексы с НК обладали положительным ζ -потенциалом, что важно для предотвращения их агрегации в более крупные частицы.

Таблица 2. Физико-химические характеристики катионных липосом и их комплексов

	Липосомы			Комплексы с пДНК ¹			Комплексы с siРНК ¹		
	Размер, нм	ИП ²	ζ -потенциал, мВ	Размер, нм	ИП ²	ζ -потенциал, мВ	Размер, нм	ИП ²	ζ -потенциал, мВ
2X3/DOPE	51.0	0.307	66.5	99.0	0.238	46.9	170.3	0.359	26.9
2D3/DOPE	61.8	0.241	59.9	н.о. ³	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
7a/DOPE	58.9	0.220	64.8	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
7b/DOPE	58.7	0.228	61.5	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
18a/DOPE	60.5 193.7	0.290	59.8	152.8	0.352	48.4	1665.3	0.369	26.0
18b/DOPE	58.1	0.217	60.9	102.4	0.147	47.1	226.8	0.079	43.4
18c/DOPE	39.7	0.232	57.8	66.6	0.282	41.9	158.7	0.261	32.0
27a/DOPE	51.1	0.240	57.6	82.5	0.253	18.7	190.8	0.141	20.8
27b/DOPE	440.0	0.254	47.1	252.8	0.369	42.8	358.9	0.386	37.8

¹ Комплексы были приготовлены при соотношении N/P 6:1

² ИП – индекс полидисперсности

³ н.о. – не определяли

2.2 Цитотоксичность катионных липосом*

Токсичность липосом на основе амфифилов **7a,b**, **27a,b** в отношении клеток НЕК293 (эмбриональные клетки почек человека) определяли с помощью МТТ-теста. Клетки инкубировали с катионными липосомами в диапазоне концентраций от 1 до 40 мкМ в течение 24 ч в присутствии 10% FBS. В случае липосом на основе холестеринсодержащих амфифилов **7a**, **27a** значение IC₅₀ не было достигнуто в исследованном диапазоне концентраций, в то же время липосомы **27b/DOPE**, содержащие дисульфидную группу в составе линкера, показали значение IC₅₀ около 30 мкМ. Для липосом, содержащих амфифил **7b** на основе 1,2-дитетрадецилглицерина, значение IC₅₀ составило 16 мкМ. Цитотоксичность липосом **18b/DOPE** и **18c/DOPE** определяли с помощью клеточного анализатора xCelligence system[®], значение IC₅₀ достигнуто не было. Таким образом, катионные липосомы, содержащие ДПКА с гидрофобным доменом на основе холестерина были менее токсичны, чем липосомы с ДПКА на основе диалкилглицерина.

* Эксперименты выполнены доц. Е.В. Шмендель в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН под руководством д.б.н., проф. М.А. Зенковой

2.3 Трансфицирующая активность катионных липосом*

В качестве объектов для доставки была выбрана протяженная пДНК рEGFP-C2 (4700 п.о.), кодирующая усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), а также малая интерферирующая РНК (siРНК, 21 п.о.), направленная к мРНК EGFP. Все эксперименты осуществляли при различных соотношениях N/P (отношение числа аминокислотных групп КА к числу фосфатных групп НК) и в присутствии 10% FBS для приближения к условиям *in vivo*. Результаты сравнивали с коммерческим препаратом Липофектамин 2000 (Lf 2000), а также липосомами на основе полученных ранее в нашей лаборатории амфифилов **2X3** и **2D3** (рис. 1), показавшими ранее высокую эффективность доставки НК. Эффективность доставки рEGFP-C2 (2 мкг/мл) в клетки НЕК293 определяли по уровню экспрессии EGFP, оценивая с помощью проточной цитометрии количество трансфицированных клеток в популяции, и среднюю интенсивность флуоресценции клеточной популяции. Способность катионных липосом доставлять siРНК в клетки и обеспечивать подавление экспрессии гена-мишени по механизму РНК-интерференции изучали на трансгенных клетках сирийского хомячка ВНК IR-780, стабильно экспрессирующих EGFP. Контролем служили необработанные клетки, уровень флуоресценции которых принимали за 100 %. Эффективность доставки siРНК (50 нМ) катионными липосомами оценивали по подавлению экспрессии EGFP в клетках ВНК IR-780.

2.3.1 Доставка нуклеиновых кислот катионными липосомами на основе ТЭТА

Эффективность доставки пДНК для катионных липосом на основе **7a** также, как и амфифилов **2X3** и **2D3**, увеличивалась с ростом соотношения N/P. Количество трансфицированных клеток для холестеринсодержащих липосом **7a**/DOPE было в 4-5 раз выше, чем для **7b**/DOPE с диалкилглицерином, и при N/P 10/1 достигало 56%, что сопоставимо с результатами для коммерческого препарата Lf 2000 (рис. 4A). Однако значения средней интенсивности флуоресценции клеточной популяции для липосом с ДПКА **7a,b** на основе ТЭТА, были меньше значений липосом на основе сперминсодержащих амфифилов **2X3** и **2D3**, а также Lf 2000 (рис. 4B).

Доставка siРНК с помощью катионных липосом **7a**/DOPE и **7b**/DOPE также была не эффективна, в то время как композиции на основе амфифилов **2X3** и **2D3** ингибировали экспрессию белка до 15-20% от уровня в контроле (рис. 4C). Таким образом, изменение структуры катионного домена ДПКА (замена спермина на ТЭТА) приводит к снижению трансфицирующей активности липосом.

* Эксперименты по трансфекции выполнены доц. Е.В. Шмендель в лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН под руководством д.б.н., проф. М.А. Зенковой

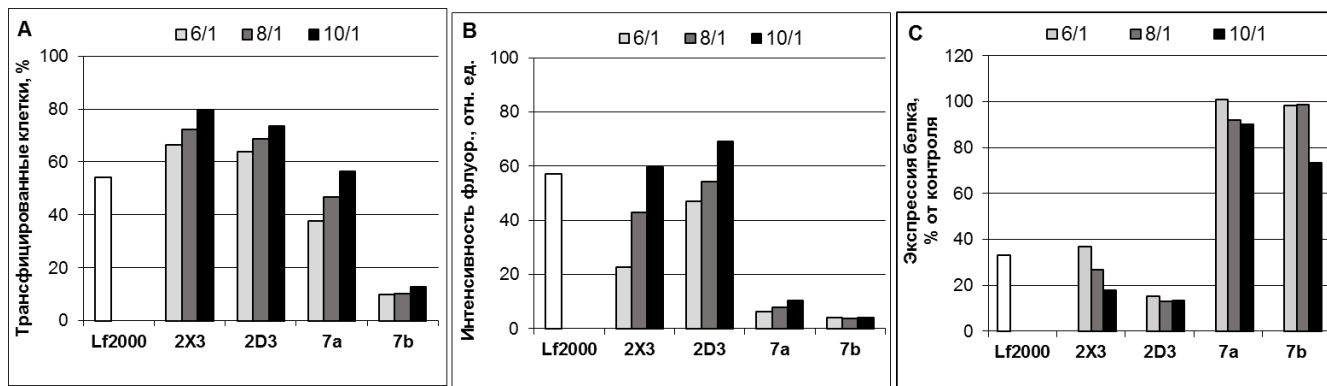


Рисунок 4. Доставка пДНК рEGFP-C2 (А, В) и siРНК (С) в клетки НЕК 293 и ВНР IR-780, соответственно. Трансфекцию клеток комплексами катионных липосом с НК осуществляли при различных соотношениях N/P в присутствии 10% FBS. Стандартное отклонение не превышает 7–9%.

2.2.2 Доставка нуклеиновых кислот катионными липосомами на основе амфифилов с различными спейсерными группами

При доставке пДНК рEGFP-C2 липосомы на основе ДПКА **18a-c** (также как и **2X3**) показали увеличение количества трансфицированных клеток в 1.5 раза по сравнению с Lf 2000 (рис 5А). Однако, в случае **18a,b** интенсивность флуоресценции была ниже значений Lf 2000 и контрольных липосом **2X3, 2D3** (рис. 5В). Максимальный уровень экспрессии EGFP наблюдали для липосом с ДПКА **18c** с гидрофильным этоксиэтоксиэтильным спейсером при N/P 6/1.

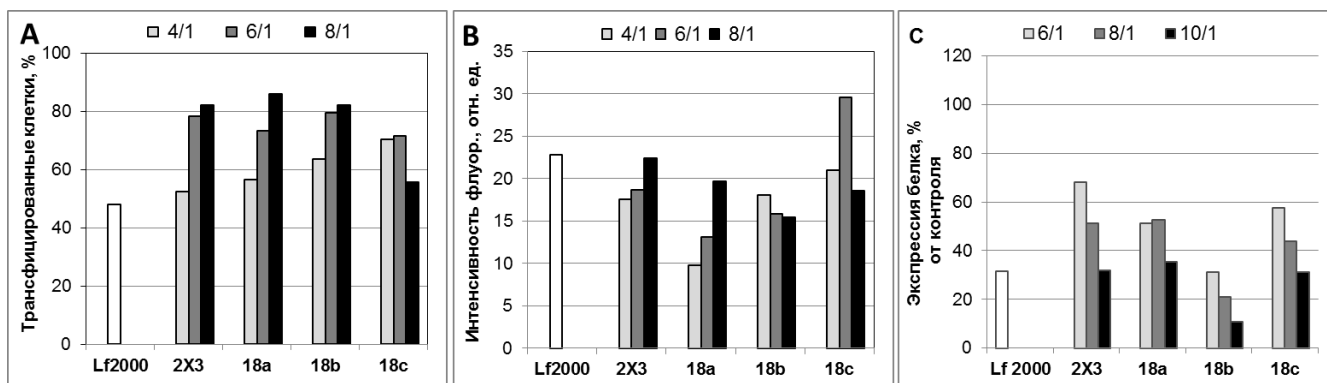


Рисунок 5. Доставка пДНК рEGFP-C2 (А, В) и siРНК (С) в клетки НЕК 293 и ВНР IR-780, соответственно. Трансфекцию клеток комплексами катионных липосом с НК осуществляли при различных соотношениях N/P в присутствии 10% FBS. Стандартное отклонение не превышает 7–9%.

Катионные липосомы на основе ДПКА способствовали эффективной доставке siРНК, что выразалось в значительном подавлении экспрессии зеленого флуоресцентного белка в клетках ВНК IR-780 (рис. 5С). При соотношении N/P 10/1 трансфицирующая активность катионных липосом, содержащих амфифилы **18a,c** с гидрофильными спейсерами, была сравнима с активностью липосом **2X3/DOPE** и Lf 2000. Максимальное подавление биосинтеза белка

(до 10% от уровня в контроле) достигалось при использовании липосом **18b**/DOPE с гидрофобным октаметиленовым спейсером.

Таким образом, увеличение длины спейсерной группы с 6 (**2X3**, **18a**) до 8 (**18b**,**c**) атомов повышало эффективность доставки НК. Введение в структуру амфифила гидрофильного спейсера не изменило трансфицирующую активность липосом **18a**/DOPE по сравнению с **2X3**, а в случае липосом с ДПКА **18c** улучшило доставку пДНК.

2.3.3 Доставка нуклеиновых кислот катионными липосомами, сформированными амфифилами с дисульфидной группой

Дисульфидные связи подвергаются внутриклеточному расщеплению, например, в ходе тиол-дисульфидного обмена с глутатионом. Липосомы на основе амфифилов с дисульфидной группой должны быть стабильными во внеклеточном пространстве и расщепляться после интернализации в клетки. В случае доставки пДНК pEGFP-C2 липосомы **27b**/DOPE с дисульфидным линкером, связывающим гидрофобный домен и спейсер, были эффективнее липосом **27a**/DOPE с дисульфидной группой в структуре спейсера и сравнимы с липосомами **2X3**/DOPE как по количеству трансфицированных клеток, так и по интенсивности флуоресценции (рис. 6 А, В). Однако, в экспериментах по доставке siРНК липосомы с амфифилом **27a** оказались самыми эффективными композициями: подавление синтеза белка составило 10-12% от уровня в контроле при всех использованных соотношениях N/P (рис. 6 С).

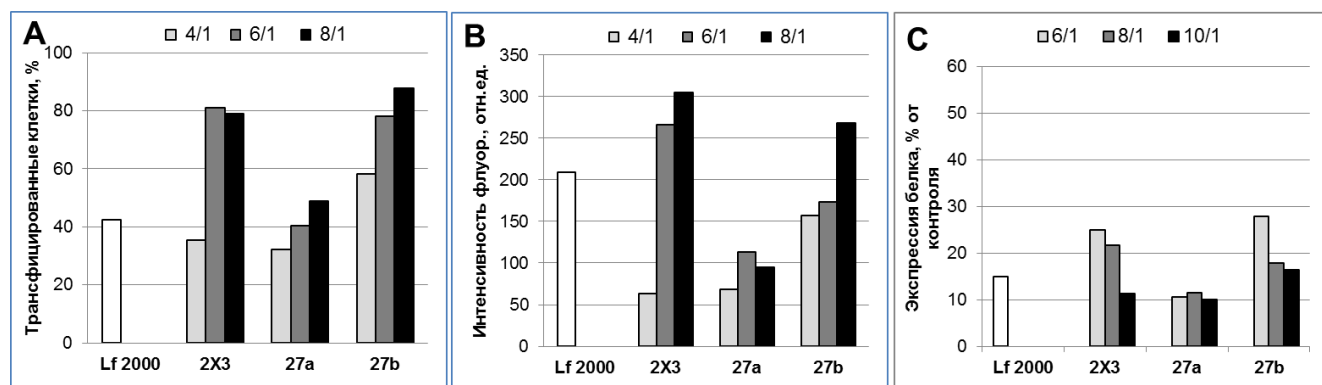


Рисунок 6. Доставка пДНК pEGFP-C2 (А, В) и siРНК (С) в клетки HEK 293 и BHR IR-780, соответственно. Трансфекцию клеток комплексами катионных липосом с НК осуществляли при различных соотношениях N/P в присутствии 10% FBS. Стандартное отклонение не превышает 7–9%.

Положение дисульфидной связи в амфифилах **27a,b** может влиять на доставку НК, поэтому нами была изучена способность липосом высвобождать нуклеиновые кислоты из липоплексов под действием дестабилизирующих агентов: глутатиона (GSH), 1,4-дителиотреитола (ДТТ) и гепарина. Клетки HEK 293 трансфицировали липоплексами, которые предварительно инкубировали в течение 10 мин с GSH, ДТТ, гепарином или их комбинациями. Уменьшение

трансфицирующей активности указывало на дестабилизацию липоплекса и высвобождение нуклеиновой кислоты до ее интернализации в клетки.

Обработка липоплексов GSH (10 мМ) приводила к снижению доставки пДНК только в случае дисульфидного амфифила **27a** и не влияла на трансфекцию, опосредованную липоплексами с амфифилом **2X3**, нечувствительными к восстановлению, и амфифилом **27b** (рис. 7, столбцы 2). В случае липосом **27b**/DOPE наблюдали небольшое снижение интенсивности флуоресценции. Добавление к GSH гепарина (100 мкг/мл) вызывало снижение эффективности трансфекции для всех изученных липоплексов, при этом порядок добавления гепарина к липоплексам (до или после GSH) не влияет на доставку НК (рис. 7, столбцы 3 и 4).

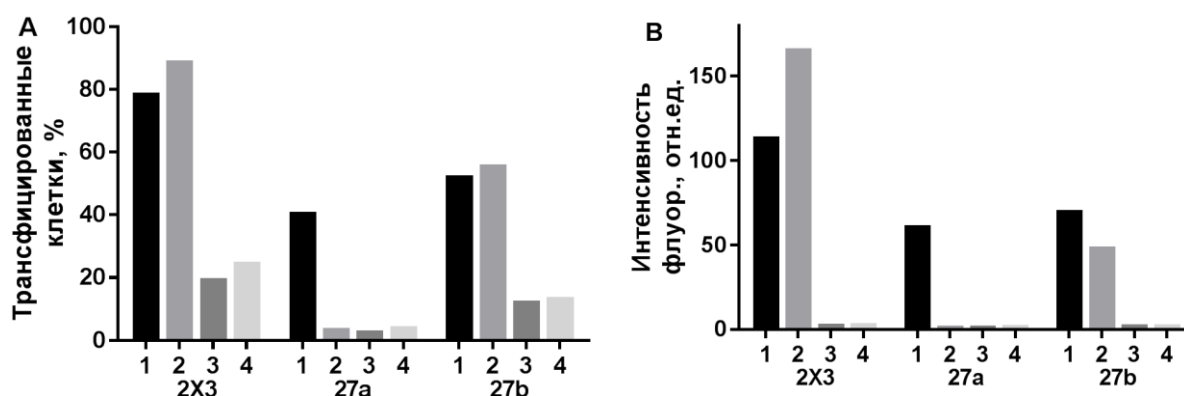


Рисунок 7. Процент трансфицированных клеток (А) и относительная интенсивность флуоресценции клеток (В) после доставки пДНК в клетки НЕК 293 липоплексами: (1) - без предварительной обработки; (2) - обработанными 10 мМ GSH; (3) - обработанными 10 мМ GSH, затем гепарином (100 мкг/мл); (4) - обработанными гепарином (100 мкг/мл), затем 10 мМ GSH. Липоплексы готовили при соотношении N/P 6/1. Эксперименты проводили в присутствии 10% FBS, каждый в трех экземплярах. Стандартное отклонение не превышало 7 – 9 %.

Обработка липоплексов с амфифилом **27a** ДТТ значительно снижала эффективность доставки уже при его минимальной концентрации 0.5 мМ, по-видимому, из-за расщепления дисульфидных связей и дестабилизации липоплекса (рис. 8). Напротив, эффективность доставки липоплексов **27b** снижалась только при концентрации ДТТ 10 мМ. Нечувствительные к восстановлению липоплексы на основе **2X3** сохраняли свою активность в присутствии ДТТ во всем диапазоне исследованных концентраций. И только добавление гепарина к липосомам **2X3**/DOPE способствовало снижению доставки НК до минимальных значений.

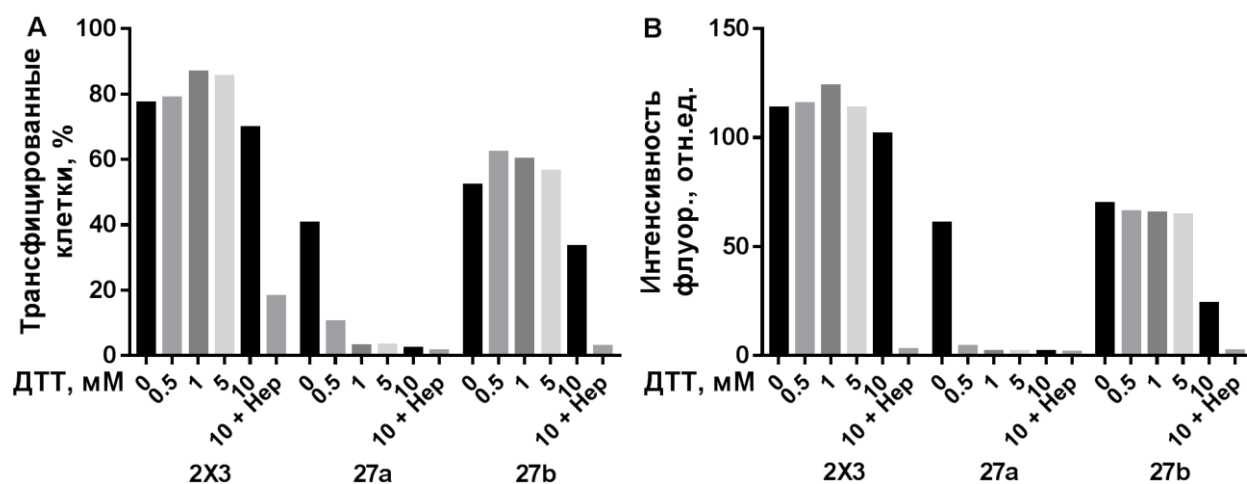


Рисунок 8. Процент трансфицированных клеток (А) и интенсивность флуоресценции (В) после доставки пДНК рEGFP-C2 в клетки НЕК 293, опосредованной липосомами, предварительно обработанными ДТТ (0-10 мМ) и гепарином (100 мкг/мл). Липоплексы готовили при соотношении N/P 6/1. Стандартное отклонение не превышало 7 – 9 %.

Анализ электрофоретической подвижности липоплексов, инкубированных в присутствии GSH, ДТТ и/или гепарина (рис. 9), показал, что добавление GSH (10 мМ) не вызывает высвобождения пДНК из липоплексов для всех исследуемых композиций (рис. 9 А). Поскольку гепарин является полианионом, его добавление к липоплексам способствовало их дестабилизации, при этом минимальная концентрация гепарина, необходимая для высвобождения НК из липоплексов с ДПКА **27a**, **27b** и **2X3**, составляла 25, 50 и 100 мкг/мл, соответственно. Липоплексы с амфифилом **27a** были наиболее чувствительны к обработке гепарином: окрашивание геля наблюдалось при концентрациях от 10 мкг/мл. Таким образом, низкая эффективность доставки пДНК липосомами **27a/DOPE** (рис. 6 А, В) может быть связана с низкой стабильностью липоплексов в присутствии вне- и внутриклеточных полианионов. Хотя на электрофореграммах не наблюдается высвобождение пДНК под действием GSH, при трансфекции клеток липоплексами, обработанными GSH, эффективность доставки пДНК снижалась. Это может быть связано с взаимодействием между GSH и ДНК или электростатическими взаимодействиями между гидрофильным доменом амфифила и молекулой ДНК, что препятствует их разделению на агарозном геле (данные не приведены).

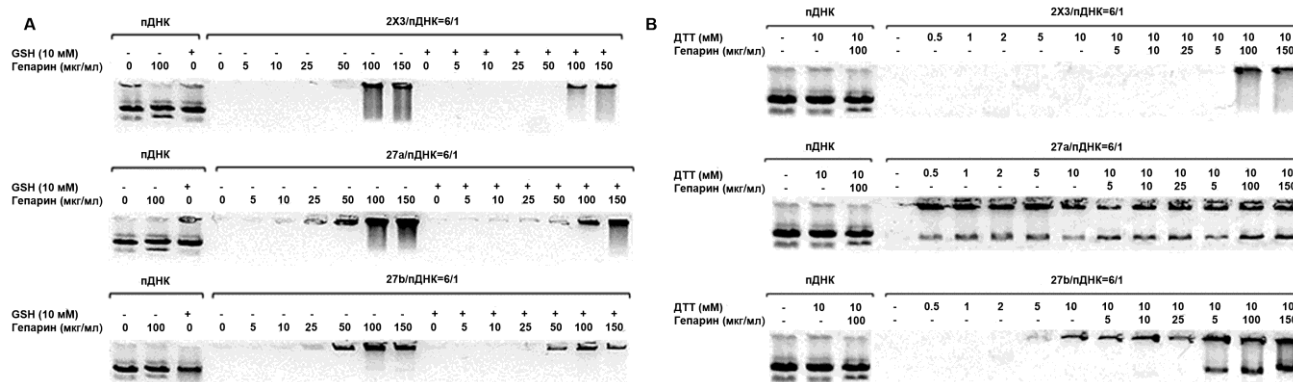


Рисунок 9. Гель-электрофорез липоплексов в присутствии GSH (10 мМ), ДТТ (0 – 10 мМ) и/или гепарина (0 – 150 мг/мл). Свободная пДНК и липоплексы, необработанные агентами, использовали в качестве контроля.

ДТТ является сильным восстанавливающим агентом, который позволяет наглядно оценить чувствительность дисульфидной группы к восстановлению. ДТТ не индуцировал высвобождение пДНК из липоплексов с амфифилом **2X3**, нечувствительным к действию восстановителя (рис. 9 В). пДНК эффективно высвобождалась из липоплексов как с амфифилом **27a**, содержащим дисульфидную связь в спейсерной группе, так и **27b** с дисульфидной группой в качестве линкера. При этом ДПКА **27a** был более чувствителен к действию ДТТ, чем амфифил **27b**, что согласуется с экспериментами по трансфекции клеток (рис. 8). Минимальная концентрация ДТТ, необходимая для высвобождения пДНК, составляла 0.5 мМ в случае **27a** и 10 мМ в случае **27b**. Интересно, что одновременное добавление ДТТ и гепарина к липоплексам, содержащим амфифил **27b**, обеспечивало более интенсивное высвобождение пДНК в дозозависимой концентрации (рис. 9 В).

Таким образом, эффективность доставки НК липоплексами с дисульфидными ДПКА зависит от положения дисульфидной группы в молекуле. Липосомы на основе **27b** с дисульфидной группой в качестве линкера оказались более эффективны при доставке пДНК *in vitro*, в то время как эффективность доставки siРНК была выше в случае липосом на основе **27a**, имеющем дисульфидную группу в структуре спейсера. При этом более чувствительными к действию дестабилизирующих агентов были липосомы на основе ДПКА **27a**.

ВЫВОДЫ

1. Синтезирован ряд новых ДПКА, в которых варьируется строение катионного домена и спейсерных групп. Разработаны новые подходы и проведена оптимизация синтеза ДПКА с дисульфидными группами, чувствительными к действию восстановителей.
2. На основе полученных соединений сформированы новые катионные липосомы, способные трансфицировать эукариотические клетки *in vitro*. Показано, что большинство полученных липосом и их комплексов с НК обладают компактными размерами.

3. Изучено влияние структуры ДПКА на трансфицирующую активность: при замене триэтилентетрамина (**7a,b**) на спермин происходит увеличение эффективности доставки НК; влияние структуры спейсера групп ДПКА на трансфицирующие свойства липосом зависит от типа переносимой НК. Установлено, что использование в качестве гидрофобного домена холестерина снижает цитотоксичность катионных липосом.
4. Показано, что расположение дисульфидной группы в молекуле ДПКА оказывает влияние на трансфицирующую активность катионных липосом и на их чувствительность к действию восстанавливающих агентов, которая была выше у липосом на основе амфифила **27a** с дисульфидной группой в структуре спейсера. Однако, в случае доставки пДНК *in vitro* более эффективными являются липосомы на основе ДПКА **27b** с дисульфидной группой в качестве линкера, в то время как эффективность доставки siРНК была выше для липосом на основе амфифила **27a**.
5. Выявлены наиболее эффективные средства доставки пДНК (липосомы с амфифилом **18c** с гидрофильным спейсером) и siРНК (липосомы с амфифилом **27a** с дисульфидной группой, чувствительной к восстановлению), трансфицирующая активность которых превосходила таковую для коммерческого препарата Липофектамин 2000 и для известных катионных липосом на основе ДПКА **2X3**. Указанные катионные липосомы перспективны для дальнейших биологических исследований *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. P.A. Puchkov, E.V. Shmendel, A.S. Luneva, N.G. Morozova, M.A. Zenkova, M.A. Maslov / Design, synthesis and transfection efficiency of a novel redox-sensitive polycationic amphiphile // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, V. 26, P. 5911–5915.
2. P.A. Puchkov, I.A. Kartashova, E.V. Shmendel, A.S. Luneva, N.G. Morozova, M.A. Zenkova, M.A. Maslov / Spacer structure and hydrophobicity influences transfection activity of novel polycationic gemini amphiphiles // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, V. 27, P. 3290–3294.
3. П.А. Пучков, К.А. Перевощикова, И.А. Карташова, А.С. Лунева, Т.О. Кабилова, Н.Г. Морозова, М.А. Зенкова, М.А. Маслов / Поликатионные амфифилы на основе триэтилентетрамина и их трансфицирующая активность // *Биоорг. химия*, 2017, Т. 43, С. 543–552.
4. P.A. Puchkov, E.V. Shmendel, V.D. Andreeva, N.G. Morozova, M.A. Zenkova, M.A. Maslov / A novel disulfide-containing polycationic amphiphile: 1,28-di[(cholest-5-en-3 β -yl)disulfanyl]-4,25-dioxo-3,8,12,17,21,26-hexaazaoctacosane tetrahydrochloride // *Molbank*, 2018, V. 2018, M981.
5. P.A. Puchkov, E.V. Shmendel, A.S. Luneva, M.A. Zenkova, M.A. Maslov / Position of disulfide bond determines the properties of novel stimuli-responsive cationic lipids // *ChemistrySelect*, 2020, V. 5, P. 4509–4514.

Патенты РФ:

1. П.А. Пучков, Е.В. Шмендель, Н.Г. Морозова, М.А. Маслов, М.А. Зенкова / Дисульфидный поликатионный амфифил, композиция на его основе с нейтральным фосфолипидом и способ её получения // Патент России № 2610271, 08.02.2017, Бюл. № 4.

Публикации в сборниках тезисов научных конференций:

1. П.А. Пучков, Н.Г. Морозова, М.А. Маслов / Синтез димерных амфифилов, содержащих в своей структуре стимул-чувствительные группы // Тезисы докладов V молодежной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии-2013», Москва, 2013, С. 76.
2. P.A. Puchkov, I.A. Kartashova, N.G. Morozova, M.A. Maslov / Dimeric polycationic amphiphiles as promising gene carriers // Abstracts of XV International scientific conference «High-Tech in Chemical Engineering – 2014», Zvenigorod, 2014, P. 168.
3. П.А. Пучков, Н.Г. Морозова, М.А. Маслов / Синтез дисульфидного поликатионного амфифила для генной терапии // Тезисы докладов Второго междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической и биологической химии, Новый Свет, 2015, С. 131.
4. П.А. Пучков, И.А. Карташова, А.С. Лунева, Е.В. Шмендель, К.А. Перевощикова, Н.Г. Морозова, М.А. Зенкова, М.А. Маслов / Синтез и изучение свойств новых поликатионных амфифилов для генной терапии // Тезисы докладов XXVIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2016, Москва, С. 93.
5. П.А. Пучков, А.С. Лунева, Е.В. Шмендель, Н.Г. Морозова, М.А. Зенкова, М.А. Маслов / Синтез и биологическая активность нового поликатионного амфифила с дисульфидным линкером // Тезисы докладов Кластера конференций по органической химии «ОргХим-2016», Санкт-Петербург (пос. Репино), 2016, С. 185-186.
6. П.А. Пучков, Е.В. Шмендель, А.С. Лунева, Н.Г. Морозова, М.А. Зенкова, М.А. Маслов / Синтез и трансфицирующая активность нового поликатионного амфифила с дисульфидным линкером // Тезисы докладов IX Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2017, С. 527–529.
7. П.А. Пучков, И.А. Карташова, А.С. Лунева, Е.В. Шмендель, Н.Г. Морозова, М.А. Зенкова, М.А. Маслов / Влияние спейсерных групп на эффективность доставки нуклеиновых кислот поликатионными амфифилами // Тезисы докладов Третьего междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике, Севастополь, 2017, С. 58.
8. А.С. Лунева, П.А. Пучков, Н.Г. Морозова, М.А. Маслов / Создание терапевтических конструкций на основе катионных липосом и нуклеиновых кислот // Тезисы докладов Третьего междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике, Севастополь, 2017, С. 101.
9. К.Е. Маркачева, П.А. Пучков, Н.Г. Морозова, М.А. Маслов / Разработка метода синтеза поликатионного гемини-амфифила с дисульфидной группой для генной терапии // Тезисы докладов Третьего междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике, Севастополь, 2017, С. 104.
10. P.A. Puchkov, E.V. Shmendel, A.S. Luneva, N.G. Morozova, M.A. Zenkova, M.A. Maslov / Novel polycationic amphiphiles for improved nucleic acid delivery // Abstracts of International workshop «Targeting RNA world», Saint-Petersburg, 2018, P. 43.
11. П.А. Пучков, Е.В. Шмендель, А.С. Лунева, М.А. Зенкова, М.А. Маслов / Дисульфидные поликатионные амфифилы для доставки нуклеиновых кислот: связь структура – активность // Тезисы докладов Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего», Новосибирск, 2019, с.52.