



УДК 54.057:661.185.42:547.832.1

# СИНТЕЗ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ ПЭГИЛИРОВАННЫХ ИНДОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

© 2025 г. В. Е. Шершов\*, В. Е. Кузнецова\*,<sup>#</sup>, Г. Ф. Штылев\*, И. Ю. Шишкин\*,  
Р. А. Мифтахов\*, В. И. Бутвиловская\*, И. В. Гречишникова\*,  
А. А. Стомахин\*, О. А. Заседателева\*, А. В. Чудинов\*

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

Поступила в редакцию 07.12.2024 г.

После доработки 12.12.2024 г.

Принята к публикации 13.12.2024 г.

Осуществлен синтез с подбором условий выделения и очистки флуоресцентно-меченого полиэтиленгликоля с реакционноспособной карбоксильной группой для маркирования биомолекул. ПЭГилированные нуклеотиды, входящие в состав лекарственных препаратов, позволяют осуществлять адресную доставку к органу-мишени, продлевать период полураспада, снижать иммуногенность и повышать стабильность.

**Ключевые слова:** ПЭГ, СуЗ, аминок-ПЭГ-карбоксы, индоцианиновый краситель, ПЭГилированный цианиновый краситель

**DOI:** 10.31857/S0132342325040053, **EDN:** LMYUYG

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка систем доставки лекарственных средств – одна из приоритетных задач развития фармацевтических технологий [1]. Перспективное направление при этом – процесс модификации молекул различными полимерными соединениями для создания фармацевтических препаратов пролонгированного действия [2, 3]. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) – один из инертных гидрофильных биосовместимых полимеров с уникальным набором физико-химических и биологических свойств [4].

ПЭГилированные молекулы имеют пониженный почечный клиренс, дополнительную защиту от действия протеолитических ферментов, низкие иммуногенность и антигенность, что позволяет сохранить активность *in vivo* нативного препарата в организме человека в течение более продолжительного времени [5]. Стоит отметить, что низкомолекулярные ПЭГ в организме расщепляются алко-

гольдегидрогеназой до токсичных метаболитов, поэтому в промышленности (пищевой, фармацевтической, косметологической) применяют ПЭГ с молекулярной массой >1 кДа [6].

Для визуализации процесса *in vivo* в динамике необходимо наличие флуорофора в структуре действующего вещества [7]. Для этих целей наилучшим образом подходят цианиновые красители, имеющие широкий диапазон спектров поглощения и флуоресценции в области 550–770 нм (в зависимости от структуры), характеризующиеся высоким значением квантового выхода флуоресценции и коэффициента молярной экстинкции, обладающие высокой растворимостью в воде, термо- и светостойкостью. Введение разнообразных функциональных заместителей в структуру красителя легко позволяет влиять на суммарный электрический заряд молекулы [8, 9].

Сокращения: BNPC – бис(4-нитрофенил)карбонат; DCC – дициклогексилкарбодиимид; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DSC – *N,N'*-дисукуцинимидилкарбонат; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; HBTU – *O*-бензотриазолил-*N,N,N',N'*-тетраметилурия гексафторфосфат; NHS – *N*-гидроксисукцинимид; pNP – *p*-нитрофенол; ПЭГ – полиэтиленгликоль.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: (499) 135-98-00; эл. почта: kuzneimb@gmail.com).

Целью данной работы был синтез с подбором условий выделения и очистки флуоресцентно-меченого полиэтиленгликоля с реакционноспособной карбоксильной группой для последующей модификации одноцепочечных молекул ДНК.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе представлены различные способы введения биологически активных соединений в состав ПЭГ [10]. Традиционный способ – модификация ПЭГ по концевым гидроксильным группам [11, 12], приводящая к получению гетерофункциональных производных, один из которых – ПЭГ с концевыми amino- и карбоксильными группами [13].

Для визуализации ПЭГ выбран дисульфированный по 5,5'-положениям индоленинового фрагмента индокарбоцианиновый краситель (аналог Су3) [8]. Данный краситель обладает максимумами поглощения и флуоресценции в области 550–570 нм, квантовым выходом флуоресценции ~20%, коэффициентом молярной экстинкции ~150 000, а также высокой термо- и светостойкостью.

Проведение реакции конъюгации ПЭГ и индокарбоцианинового красителя в одну стадию без выделения промежуточного активированного эфира красителя в водно-органическом растворителе привело к образованию целевого продукта в следовых количествах, вне зависимости от используемых активирующих агентов (DSC, BNPC,

NHS/EDC, NHS/DCC, pNP/DCC, HBTU). Поэтому предварительно получали активированное производное индокарбоцианинового красителя (рис. 1) с помощью бис-*p*-нитрофенилкарбоната в DMF с выходом 85%. Активированный эфир выделяли обращено-фазовой хроматографией на колонке с сорбентом C18-RP в градиенте 10–50% ацетонитрила в воде.

Далее при помощи активированного эфира красителя (II) проводили флуоресцентное маркирование полиэтиленгликоля (III). Реакцию конъюгации осуществляли при использовании 10-кратного избытка ПЭГ по отношению к красителю в инертных апротонных растворителях (DMF, DMSO, триметилфосфат, гексаметапол) в присутствии DIPEA и в водно-органической среде (карбонат-бикарбонатный буферный раствор – DMF), при этом получали разный состав продуктов реакции. Степень протекания реакции контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на алюминиевых пластинках, покрытых сорбентом RP-18 F254, в системе ацетонитрил : вода (2 : 3) (рис. 2).

В водно-органической среде равновесие смещено в сторону реакции гидролиза активированного эфира до исходной кислоты (вне зависимости от температуры проведения реакции), при этом флуоресцентно-меченый ПЭГ (IV) образуется с выходом, не превышающим 2–3%. Проведение реакции в гексаметаполе привело к образованию

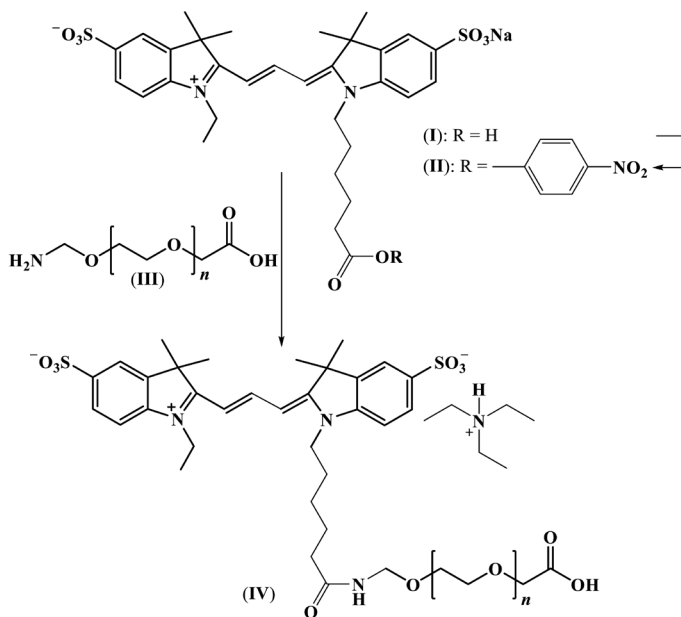
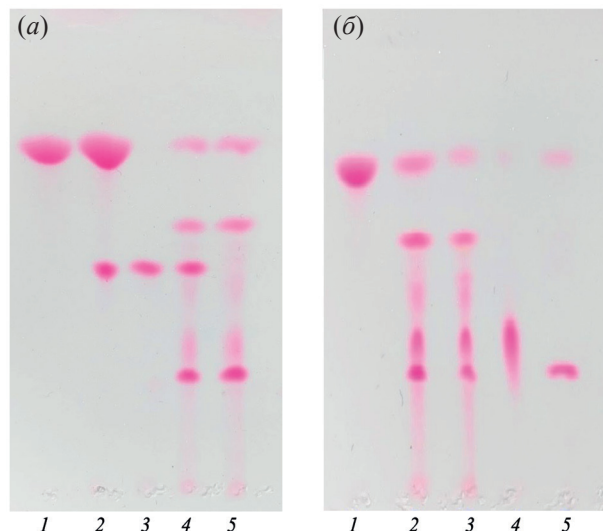


Рис. 1. Схема синтеза флуоресцентно-меченого полиэтиленгликоля (IV).

только побочного продукта с количественным выходом (рис. 2а). Флуоресцентно-меченый ПЭГ (IV) с выходом 23% получен в DMF в присутствии DIPEA при нагревании в течение 12 ч при 50°C (рис. 2б). Сопоставимые выходы получены при использовании DMSO и триметилфосфата в ка-

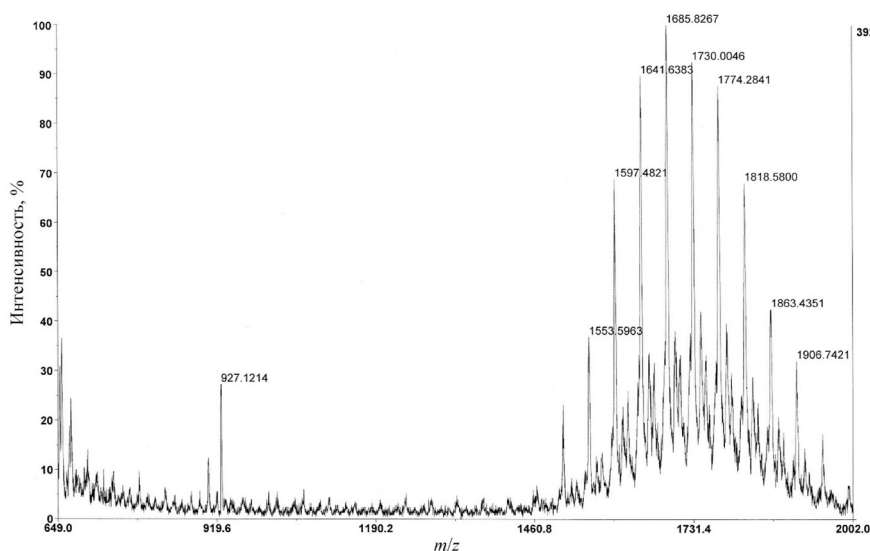


**Рис. 2.** Результаты ТСХ продуктов реакции флуоресцентного маркирования полиэтиленгликоля (C18-RP пластинки, 40% ацетонитрил – 60%  $\text{H}_2\text{O}$ ): (а) – растворитель гексаметапол: 1 – исходный Су3, 2 – смешанная проба исходного Су3 и реакционной массы в гексаметаполе, 3 – реакционная масса в гексаметаполе, 4 – смешанная проба реакционная масса в DMF плюс реакционная масса в гексаметаполе, 5 – реакционная масса в DMF; (б) – растворитель DMF и DMSO: 1 – исходный Су3, 2 – реакционная масса в DMF, 3 – реакционная масса в DMSO, 4 – флуоресцентно-меченый ПЭГ, 5 – Су3 rNP.

честве растворителя. Реакция конденсации при комнатной температуре протекает с медленной скоростью. Проведение реакции в присутствии каталитических количеств DMAP сместило равновесие в сторону гидролиза активированного эфира (II). При нагревании до 50°C скорость реакции образования целевого продукта увеличилась по сравнению с проведением реакции при комнатной температуре. Следует отметить, что при комнатной температуре преимущественно образовывался побочный продукт и гидролизировался активированный эфир.

Хроматографическая очистка – удобный и относительно быстрый способ выделения чистых продуктов из реакционной массы. При помощи обращенно-фазовой хроматографии на колонке с сорбентом C18-RP (25 × 40 мкм) в градиенте 10–50% ацетонитрила в воде целевой продукт отделяли от избытка индокарбоцианинового красителя (I) и большей части побочных продуктов, а последующая очистка ионнообменной хроматографией на сорбенте DEAE-целлюлоза DE52 позволяет удалить оставшиеся побочные продукты. Заключительный этап очистки – колоночная хроматография на силикагеле, с помощью которой удается полностью удалить избыток ПЭГ. Структуру флуоресцентно-меченого ПЭГ подтвердили данными MALDI-масс-спектрометрического анализа (рис. 3).

Следует отметить, что представленный подход получения и очистки флуоресцентно-меченого



**Рис. 3.** MALDI-масс-спектр флуоресцентно-меченого полиэтиленгликоля (IV).

ПЭГ можно применять к любому индоцианиновому красителю и ПЭГ с концевыми amino- и карбоксильной группами.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы и оборудование.** В работе применяли реагенты и растворители марок о.с.ч., х.ч. или ч.д.а. (Aldrich, США; Alfa Aesar, Германия; Fluka, США; Химмед, Россия), с концевыми amino- и карбоксильной группами (Macklin, Китай).

1 М триэтиламмоний-ацетатный буферный раствор (ТЕАА) получали следующим образом: к смеси деионизированной воды (700 мл) и триэтиламина (139 мл, 1 моль) при охлаждении на льду и интенсивном перемешивании добавляли по каплям под слой жидкости уксусную кислоту (57 мл, 1 моль) до достижения pH 7.0, после чего объем раствора доводили до 1 л.

1 М триэтиламмоний-гидрокарбонатный буферный раствор (ТЕНС) – в смесь деионизированной воды (700 мл) и триэтиламина (139 мл, 1 моль) при охлаждении на льду, интенсивном перемешивании и контроле pH пропускали газообразный  $\text{CO}_2$  до значения pH 7.5, после чего объем раствора доводили до 1 л.

Индокарбоцианиновый краситель и его активированный эфир синтезировали согласно публикации [8].

Воду для приготовления растворов получали на установке Milli-Q (EMD Millipore, США). Для хроматографической очистки олигонуклеотидов использовали колонку BDS Hypersil C18-RP (Thermo Scientific, США).

**Синтез флуоресцентно-меченого полиэтиленгликоля (на примере ПЭГ 1 кДа).** Смесь *пара*-нитрофенилового эфира индокарбоцианинового красителя (8.5 мг, 10.5 мкмоль) и  $\text{NH}_2\text{-PEG1000-COOH}$  (108.5 мг, 110 мкмоль) растворяли в DMF (500 мкл) в присутствии DIPEA (25 мкл) и перемешивали 12 ч при 50°C. Реакционную массу разбавляли водой и продукт реакции (**IV**) выделяли обращенно-фазовой хроматографией на колонке C18-RP (25 × 40 мкм) в градиенте 10–50% ацетонитрила в воде. Растворитель удаляли, остаток растворяли в смеси ацетонитрил–вода 3 : 7, наносили на колонку, заполненную DEAE-целлюлозой (DE-52, Whatman), и элюировали в линейном градиенте концентраций 0.025–0.1 М ТЕНС (триэтиламмоний гидрокарбонатный буферный раствор, pH 8.5) в 30%-ном ацетонитриле со скоростью 58 мл/ч. Растворители удаляли, оста-

ток растворяли в дихлорметане и очищали колоночной хроматографией на силикагеле в системе дихлорметан : метанол, 10 : 1. Получили 4 мг продукта (**IV**) (23%). Найдено:  $m/z$  1685.82  $[\text{M}]^+$ . Вычислено:  $M = 1611$ .

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен синтез с подбором условий выделения и очистки флуоресцентно-меченого полиэтиленгликоля с реакционноспособной карбоксильной группой для последующей модификации одноцепочечных молекул ДНК. Наличие эффективного и практически осуществимого способа получения реакционноспособных ПЭГилированных индоцианиновых красителей с возможностью контроля качества полупродуктов на каждой стадии синтеза позволит расширить скрининг терапевтических препаратов с заданными характеристиками.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00549.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условиях ухода за ними были соблюдены.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – БЕК, ВЕШ; экспериментальные работы – ВЕШ, ГФШ, ИЮШ, РАМ, ИВГ; написание статьи – ВЕШ, БЕК, АВЧ; анализ данных – ВИБ, ААС; администрирование проекта – БЕК, АВЧ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

### ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Porfiryeva N.N., Moustafine R.I., Khutoryanskiy V.V. // Polym. Sci. Ser. C. 2020. V. 62. P. 62–74. <https://doi.org/10.1134/S1811238220010094>

2. Maier K.E., Rusconi C.P., Levy M. // *Cell Chem. Biol.* 2019. V. 26. P. 615–616.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.03.004>
3. Moreno A., Pitoc G.A., Ganson N.J., Layzer J.M., Hershfild M.S., Tarantal A.F., Sullenger B.A. // *Cell Chem. Biol.* 2019. V. 26. P. 634–644.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.02.009>
4. Zalipsky S. // *Bioconjug. Chem.* 1995. V. 6. P. 150–165.  
<https://doi.org/10.1021/bc00034a003>
5. Veronese F.M., Caliceti P., Schiavon O. // *J. Bioact. Compat. Polym.* 1997. V. 12. P. 196–207.  
<https://doi.org/10.1177/088391159701200302>
6. Geckil H., Xu F., Zhang X., Moon S., Demirci U. // *Nanomedicine.* 2010. V. 5. P. 469–484.  
<https://doi.org/10.2217/nnm.10.21>
7. Thapaliya E.R., Usama S.M., Patel N.L., Feng Y., Kalen J.D., Croix B.S., Schnermann M.J. // *Bioconjug. Chem.* 2022. V. 33. P. 718–725.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00015>
8. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. e73.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky251>
9. Shershov V.E., Lapa S.A., Levashova A.I., Shishkin I.Yu., Shtylev G.F., Shekalova E.Yu., Vasiliskov V.A., Zasedatelev A.S., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. P. 649–656.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162023050242>
10. Puchkov I.A., Bairamashvili D.I., Shvets V.I. // *Fine Chem. Technol.* 2014. V. 9. P. 3–31.  
<https://doi.org/10.1134/S2410269414010063>
11. Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002. V. 54. P. 459–476.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00026-3)
12. Li J., Kao W.J. // *Biomacromolecules.* 2003. V. 4. P. 1055–1067.  
<https://doi.org/10.1021/bm025727b>
13. Song F., Chen L., Lin R., Salter R. // *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 2020. V. 63. P. 15–24.  
<https://doi.org/10.1002/jlcr.3747>

## Synthesis of Reactive Pegylated Indocyanine Dyes

V. E. Shershov\*, V. E. Kuznetsova\*<sup>#</sup>, G. F. Shtylev\*, I. Yu. Shishkin\*, R. A. Miftahov\*,  
V. I. Butvilovskaya\*, I. V. Grechishnikova\*, A. A. Stomahin\*,  
O. A. Zasedateleva\*, and A. V. Chudinov\*

<sup>#</sup> Phone: +7 (495) 135-98-00; e-mail: [kuzneimb@gmail.com](mailto:kuzneimb@gmail.com)

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

Synthesis was carried out with the selection of conditions for the isolation and purification of fluorescently labeled polyethylene glycol with a reactive carboxyl group for labeling biomolecules. Pegylated nucleotides, which are part of drugs, allow targeted delivery to the target organ, prolong the half-life, reduce immunogenicity and increase stability.

**Keywords:** PEG, Cy3, amino Peg carboxy, indocyanine dye, pegylated cyanine dye