

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
Химический факультет
Кафедра органической химии
Лаборатория координационных металлоорганических соединений

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и
перинатологии имени академика В. И. Кулакова
Лаборатория регенеративной медицины

Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины Российского
университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы

Московская школа на Юго-Западе № 1543

Разработка полимерного трансфицирующего агента на основе N-метил-изосерина

Бушманов Тимофей
Научные руководители:
Е.Д. Шапуткин
А.А. Багдасарян

Москва 2025

Оглавление

Оглавление	2
Введение	3
Цели данной работы	4
Задачи работы	4
Обзор литературы	5
Методы доставки siRNA, shRNA и плазмид	5
Клетки-мишени	5
Трансфекция макрофагов: методы и эффективность	6
Поляризация макрофагов: от M1 к M2 и обратно	6
Использование трансфицированных макрофагов в медицине	6
Проблемы и перспективы	7
Методика	Error! Bookmark not defined.
Асептическая работа в лаборатории	8
Материалы:	8
Методика	Error! Bookmark not defined.
Трансфекция и цитометрия	9
Протокол для siRNA	9
Протокол для плазмиды 1	10
Протокол для плазмиды 2	Error! Bookmark not defined.
Протокол для плазмиды 3	10
Цитометрия	11
Первый способ синтеза N-метил-изосерина	11
Первая стадия - эпоксидирование метилакрилата	11
Вторая стадия - раскрытие эпоксидной группы.	13
Третья стадия (вариант А) - гидролиз сложного эфира	14
Третья стадия (вариант Б) – гидрирование аминоксигруппы	15
Второй способ синтеза N-метил-изосерина	15
Первая стадия – синтез 2-бром-3-гидроксипропановой кислоты	15
Вторая стадия – получение метилглицидата	17
Третья стадия – синтез N-метил-изосерина	18
Синтез О-бензил-L-тирозина	19
Обсуждение результатов	21
Химия	21
Биология	Error! Bookmark not defined.
Выводы	27
Список литературы	27

Введение

Трансфекция, представляющая собой процесс введения нуклеиновых кислот, таких как ДНК, РНК или их аналоги, в клетки-мишени, является краеугольным камнем современной биомедицинской науки и генной терапии [1]. Этот метод позволяет ученым менять геном клетки для изучения биологических процессов, разработки новых лекарственных препаратов и дальнейшего лечения заболеваний. Таким образом трансфицирующие агенты могут служить инструментом для изучения влияния определенных генов на клеточные функции, а также для создания клеточных моделей заболеваний.

В медицине трансфекция открывает широкие перспективы, особенно в области генной терапии. Например, при лечении наследственных заболеваний, таких как муковисцидоз или спинальная мышечная атрофия, трансфекция может быть использована для доставки функциональной копии дефектного гена в клетки пациента, помогая тем самым исправить генетический дефект [2]. Кроме того, трансфекция играет важную роль в разработке новых методов лечения рака. Она может быть использована для доставки генов, кодирующих терапевтические белки, непосредственно в опухолевые клетки, или для повышения иммуногенности опухоли с целью стимуляции противоопухолевого иммунного ответа [3]. Важность трансфекции в этих областях обусловлена ее потенциалом для разработки персонализированных методов лечения, нацеленных непосредственно на причину заболевания на генетическом уровне.

Одним из наиболее перспективных направлений в области трансфекции является использование малых интерферирующих РНК (siRNA) и коротких шпилечных РНК (shRNA) для регуляции экспрессии генов [4]. siRNA представляют собой короткие двухцепочечные молекулы РНК, которые, взаимодействуя с комплексом RISC (RNA-induced silencing complex), приводят к деградации комплементарной мРНК, тем самым подавляя экспрессию соответствующего гена [5]. shRNA, в свою очередь, представляют собой одноцепочечные молекулы РНК, которые, попадая в клетку, процессируются в siRNA и запускают аналогичный механизм подавления экспрессии генов [5].

Многочисленные исследования продемонстрировали эффективность использования siRNA и shRNA для подавления экспрессии генов, участвующих в развитии различных заболеваний, включая рак, вирусные инфекции и нейродегенеративные заболевания [6]. Например, было показано, что введение siRNA, нацеленных на гены, необходимые для роста и выживания раковых клеток, может приводить к замедлению роста опухоли и увеличению выживаемости [7]. Аналогичным образом, использование shRNA для подавления экспрессии вирусных генов может препятствовать репликации вируса и снижать вирусную нагрузку [8].

Следовательно, существует необходимость в разработке векторов для трансфекции, которые обладают высокой эффективностью, низкой токсичностью и биосовместимостью, а также доступной стоимостью. Создание таких реагентов откроет новые возможности для разработки эффективных и безопасных методов генной терапии и позволит приблизиться к лечению широкого спектра заболеваний.

Цели данной работы

1. Синтез производных аминокислот, прекурсоров для получения трансфицирующих агентов
2. Изучение эффективности полимерных реагентов для трансфекции, разработанных ранее в лаборатории КМОС

Задачи работы

1. Синтез O-Вп-тирозина
2. Синтез N-метил-изосерина или его производных
3. Осуществление трансфекции макрофагов при помощи синтетических полимерных трансфицирующих агентов
4. Оценка эффективности доставки siRNA с помощью проточной цитометрии и системы флуоресцентной визуализации клеток

Обзор литературы

Методы доставки siRNA, shRNA и плазмид.

Несмотря на большой потенциал siRNA и shRNA, их применение в клинической практике ограничено рядом факторов. Одним из основных препятствий является сложность доставки этих молекул в клетки-мишени. siRNA и shRNA представляют собой крупные отрицательно заряженные молекулы, которые плохо проникают через клеточные мембраны. Кроме того, они подвержены быстрой деградации в биологических жидкостях и могут вызывать неспецифические иммунные ответы [8].

Для решения этих проблем были разработаны различные системы доставки siRNA и shRNA, включая вирусные и невирусные векторы. Вирусные векторы, такие как аденовирусы и лентивирусы, обладают высокой эффективностью трансфекции, но могут вызывать нежелательные иммунные реакции и обладают потенциалом для интеграции в геном клетки-хозяина, что может привести к мутациям [9]. Невирусные векторы, такие как липосомы, полимеры и наночастицы, обладают меньшей токсичностью и иммуногенностью, но обычно менее эффективны в трансфекции [10].

Среди невирусных векторов полимеры занимают особое место благодаря относительной простоте синтеза, возможности модификации и низкой токсичности [11]. Различные полимеры, такие как полиэтиленимин (PEI), поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA) и хитозан, были исследованы в качестве векторов для доставки siRNA и shRNA [12]. PEI является одним из наиболее широко используемых полимеров для трансфекции благодаря своей высокой плотности заряда и способности эффективно конденсировать нуклеиновые кислоты. Однако PEI также обладает высокой токсичностью, что ограничивает его применение *in vivo*. PLGA является биоразлагаемым и биосовместимым полимером, который часто используется для создания наночастиц для доставки лекарств и нуклеиновых кислот. Хитозан является природным, биосовместимым полисахаридом, обладающим низкой токсичностью [13], но его эффективность трансфекции обычно ниже, чем у PEI.

Коммерческие трансфекционные реагенты, такие как Lipofectamine [14] и TransIT [15], широко используются в научных исследованиях благодаря удобству и относительной эффективности. Однако эти реагенты часто обладают высокой цитотоксичностью и могут вызывать неспецифические эффекты, что ограничивает их применение *in vivo* и в клинической практике. Кроме того, коммерческие реагенты могут быть дорогими, что делает их недоступными для некоторых исследовательских групп.

Клетки-мишени

Макрофаги, являясь ключевыми клетками врожденного иммунитета, играют важную роль в поддержании гомеостаза тканей, фагоцитозе патогенов и регуляции воспалительных процессов. Их пластичность, проявляющаяся в поляризации в различные фенотипы (M1 и M2), делает их привлекательной мишенью для терапевтического воздействия. Трансфекция макрофагов, позволяющая направленно изменять их функцию, открывает новые перспективы для лечения широкого спектра заболеваний, от онкологических до воспалительных.

Трансфекция макрофагов: методы и эффективность

Существуют различные методы трансфекции макрофагов, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. Липофекция, использующая липидные носители для доставки генетического материала, является одним из наиболее распространенных методов. Однако, эффективность липофекции может варьироваться в зависимости от типа макрофагов и используемого липидного реагента [16]. Электропорация, метод, основанный на использовании электрических импульсов для создания пор в клеточной мембране, также применяется для трансфекции макрофагов. Этот метод позволяет доставлять различные типы генетического материала, включая ДНК, РНК и белки [17]. Вирусные векторы, такие как аденовирусы и лентивирусы, демонстрируют высокую эффективность трансфекции, но могут вызывать иммунный ответ и имеют ограничения по размеру переносимого генетического материала [18]. Важно отметить, что выбор метода трансфекции должен основываться на конкретных целях исследования и учитывать потенциальные побочные эффекты.

Поляризация макрофагов: от M1 к M2 и обратно

Макрофаги могут поляризоваться в два основных фенотипа: M1 (классически активированные) и M2 (альтернативно активированные). M1 макрофаги характеризуются провоспалительной активностью, секрецией цитокинов (TNF- α , IL-12), продукцией активных форм кислорода и азота, и участвуют в уничтожении патогенов и опухолевых клеток. M2 макрофаги, напротив, обладают противовоспалительными свойствами, секретируют цитокины (IL-10, TGF- β), способствуют регенерации тканей и ангиогенезу [19]. Изменение поляризации макрофагов является ключевым механизмом в развитии и прогрессировании многих заболеваний. Например, в опухолевом микроокружении преобладают M2 макрофаги, которые способствуют росту опухоли, метастазированию и подавляют противоопухолевый иммунитет [20]. Трансфекция макрофагов позволяет направленно изменять их поляризацию, переключая их из M2 в M1 фенотип для усиления противоопухолевого иммунного ответа или из M1 в M2 фенотип для снижения воспаления и стимуляции регенерации тканей.

Использование трансфицированных макрофагов в медицине

Трансфекция макрофагов открывает новые возможности для терапии различных заболеваний. В онкологии, трансфицированные макрофаги могут быть использованы для доставки противоопухолевых препаратов непосредственно в опухоль, а также для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа [21]. Например, макрофаги, трансфицированные геном интерлейкина-12 (IL-12), демонстрируют усиленную противоопухолевую активность [22]. В терапии воспалительных заболеваний, трансфицированные макрофаги могут быть использованы для доставки противовоспалительных препаратов или для стимуляции регенерации тканей [23]. Например, макрофаги, трансфицированные геном IL-10, обладают выраженным противовоспалительным эффектом и могут быть использованы для лечения аутоиммунных заболеваний и хронических воспалительных процессов [24].

Проблемы и перспективы

Несмотря на многообещающие результаты, использование трансфицированных макрофагов в медицине сталкивается с рядом проблем. Одной из основных проблем является обеспечение эффективной и специфичной трансфекции макрофагов *in vivo*. Необходимо разработать новые методы трансфекции, которые позволят доставлять генетический материал только в макрофаги, не затрагивая другие клетки. Другой проблемой является контроль поляризации макрофагов *in vivo*. Необходимо разработать стратегии, которые позволят поддерживать желаемый фенотип макрофагов в течение длительного времени. Также необходимо учитывать потенциальные побочные эффекты трансфекции макрофагов, такие как иммунный ответ и развитие воспаления.

В заключение, трансфекция макрофагов является перспективным направлением в современной медицине. Разработка новых методов трансфекции и контроля поляризации макрофагов позволит создать эффективные и безопасные методы лечения широкого спектра заболеваний.

Экспериментальные протоколы

Асептическая работа в лаборатории

Материалы:

1. Стерильный ламинарный бокс
2. Полная питательной среды будет использоваться RPMI-1640 с добавлением 10% бычьей/телячьей фетальной сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамина и смеси антибиотика 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина.
3. Культура клеток макрофагов мыши RAW 264.7 будет содержаться в 5% CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C и относительной влажности 45%
4. Дозатор серологических пипеток (Pipet Controller)
5. Серологические пипетки разных объемов
6. Лабораторные механические дозаторы
7. Наконечники для дозаторов разных объемов
8. Перчатки
9. Трипановый синий (trypan blue)
10. Парафин
11. Кассеты/слайды для клеточного счетчика Bio-Rad TC20
12. Клеточный счетчик Bio-Rad TC20
13. Центрифуга
14. Пробирки
15. Средний культуральный флакон объемом 75см² с вентилирующей крышкой
16. Скребок

Пересев клеток

1. Подготавливаем рабочее место: надеваем перчатки, обрабатываем спиртом и прожигаем ламинарный бокс под ультрафиолетом 15 минут, размещаем там необходимые для нас материалы (изложены выше в пункте «Материалы») и опрыскиваем их спиртом перед внесением, а затем обжигаем горящим ватным шариком (который хранится в спиртовке)
2. Достаем из термостата средний культуральный флакон с клеточной культурой Raw 264.7
3. Кладем на поверхность ламинарного бокса и обрабатываем горлышко флакона пламенем спиртового ватного шарика
4. открываем горлышко культурального флакона и сливаем всю питательную среду

5. Добавляем к клеткам 7-10 мл полной питательной среды RPMI-1640 при помощи серологической пипетки
6. Снимаем скребком (так как клетки не отделяются трипсином, ввиду сильной адгезии) клетки с поверхности флакона, переносим суспензию среды с клетками в фалькон на 15 мл и откручиваем на центрифуге 5 минут 300g
7. Затем открываем фалькон и сливаем всю питательную среду, клетки остаются в осадке
8. Клетки ресуспендируем в 1 мл свежей полной питательной среды RPMI-1640
9. Отбираем 10 мкл трипанового синего и капаем на парафин, затем отбираем 10 мкм получившейся суспензии клеток и смешиваем с трипановым синим. Затем отбираем 10 мкм этой смеси и заливаем в кассету для клеточного счетчика Bio-Rad TC20
10. Вставляем кассету в клеточный счетчик Bio-Rad TC20 и подсчитываем количество клеток

Трансфекция и цитометрия

Для оценки эффективности реагентов, как полученных ранее в лаборатории, так и синтезированных в ходе данной работы будет проведена трансфекция мышинных макрофагов линии RAW 264.7 плазмидой флуоресцентно-меченной нуклеиновой кислотой (antiEGFP-siRNA-FAM), siRNA-FAM — это молекула siRNA, к которой ковалентно присоединен краситель FAM. Трансфекция будет производиться в среде OptiMEM для того, чтобы полимеры лучше связывались с нуклеиновыми кислотами. Эффективность трансфекции будет оцениваться через сутки на проточном цитофлуориметре NovoCyte Advanteon, Agilent и флуоресцентном микроскопе и системе визуализации ZOE).

Протокол для siRNA

1. Клетки линии макрофагальной линии RAW выращивали в 48 луночном планшете на среде RPMI+FBS 10%, 0,3 мг/мл L-глутамина и смеси антибиотика 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина до конfluence ~90% (получалась и «полная посадка»).
2. Концентрации: siRNA-FAM 10 мкМ, полимеры в ДМСО ~50-60 мкг/мкл (в зависимости от MW).
3. Трансфекция. В отдельных пробирках смешивали 15 мкл раствора siRNA (5 мкл/лунку планшета), полимер (от 1 до 15 мкл для достижения желаемого зарядового соотношения) и добавочный ДМСО (до финальной концентрации 80% в премиксе). После смешивания всех компонентов – перемешивали каждую смесь вортексированием, ждали 15 минут. Далее к каждому премиксу добавляли 800 мкл среды OptiMEM, снова смешивали на вортексе. Заменяли ростовую среду в каждой лунке на 300мкл полученной трансфицирующей смеси. Спустя 4 часа заменяли среду на RPMI+FBS 10% +0,3 мг/мл L-глутамина и смеси антибиотика 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Контрольная

трансфекция коммерческим препаратом: готовили 2 раствора - 12 мкл реагента Transfectin в 50 мкл среды OptiMEM, и 15 мкл раствора siRNA в 50 мкл среды OptiMEM – смешивали их, ждали 15 минут, разбавляли 800 мкл среды OptiMEM, далее аналогично остальным.

4. Через 24 часа после трансфекции анализировали клетки: 1) на флуоресцентном микроскопе и системе визуализации ZOE; 2) на проточном цитофлуориметре MACS Quant 10.

Протокол для плазмиды pEGFP-C1

1. Клетки линии макрофагальной линии RAW выращивали в 48 луночном планшете на среде RPMI, FBS 10% +0,3 мг/мл L-глутамина и смеси антибиотика 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина до конфлюентности ~ 90%(в краевые лунки помещена вода).
2. Концентрации: pEGFP-C1 100 нг/мкл, полимеры в ДМСО ~50-60 мкг/мкл (в зависимости от MW).
3. Трансфекция. В отдельных пробирках смешивали 15 мкл раствора плазмиды (5 мкл/точку), полимер (от 1 до 5 мкл для достижения желаемого зарядового соотношения) и добавочный ДМСО (до конц 80% в премиксе). После смешивания всех компонентов – вортексили, ждали 15 минут. Далее к каждому премиксу добавляли 800 мкл среды OptiMEM, снова вортексили. Заменяли ростовую среду в каждой лунке на 300мкл полученной трансфицирующей смеси. Спустя 4 часа заменяли среду на RPMI+ FBS 10% +0,3 мг/мл L-глутамина и смеси антибиотика 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Контрольная трансфекция коммерческим препаратом: готовили 2 раствора - 6 мкл реагента Transfectin в 50 мкл среды OptiMEM, и 15 мкл раствора плазмиды в 50 мкл среды OptiMEM – смешивали их, ждали 15 минут, разбавляли 800 мкл среды OptiMEM, далее аналогично остальным.
4. Спустя 72 часа после трансфекции анализировали клетки: 1) на флуоресцентном микроскопе и системе визуализации ZOE; 2) на проточном цитофлуориметре MACS Quant 10.

Протокол для плазмиды pc DNA 3.0 IFN-g EGFP

1. Клетки линии макрофагальной линии RAW выращивали в 48 луночном планшете на среде RPMI+FBS 10% +0,3 мг/мл L-глутамина и смеси антибиотика 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина до конфлюентности ~ 90%(в краевые лунки помещена вода).
2. Концентрации: pIFN-I 643 нг/мкл, полимеры в ДМСО ~40-60 мкг/мкл (в зависимости от MW).
3. Трансфекция. В отдельных пробирках смешивали 1 мкл раствора плазмиды, полимер (от 6 до 18 мкл для достижения желаемого зарядового соотношения) и добавочный ДМСО (0 - 24 мкл). После смешивания всех компонентов – вортексили, ждали 15 минут. Далее к каждому премиксу добавляли 1200 мкл среды OptiMEM, снова вортексили. Заменяли ростовую среду в каждой лунке на 400мкл полученной трансфицирующей смеси. Спустя 4 часа заменяли среду на RPMI+FBS 10% +0,3 мг/мл L-глутамина и смеси антибиотика 50 ед/мл

пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Контрольная трансфекция коммерческим препаратом: готовили 2 раствора - 6 мкл реагента Transfectin BioRad в 50 мкл среды OptiMEM, и 1 мкл раствора плазмиды в 50 мкл среды OptiMEM – смешивали их, ждали 15 минут, разбавляли 1200 мкл среды OptiMEM, далее аналогично остальным.

4. Спустя 72 часа после трансфекции анализировали клетки: 1) на флуоресцентном микроскопе и системе визуализации ZOE; 2) на проточном цитофлуориметре MACS Quant 10.

Цитометрия

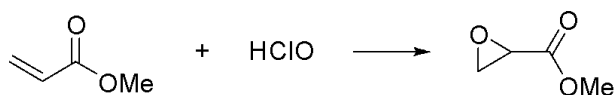
1. Анализ клеток начинался с фотографирования лунок планшета через 1 - 3 дня после трансфекции. Фотографировали на флуоресцентном микроскопе и системе визуализации ZOE по одной лунке каждой концентрации или с определённым полимером (в зависимости от эксперимента). Делали по две фотографии: ч/б и в зелёном спектре, чтобы подсветить трансфицированные клетки. Затем мы попарно объединяли фото.
2. Необходимо промыть клетки от среды. Сначала сливали среду, потом лунки прокапывали единичным раствором PBS, затем сливали раствор из лунок (2-3 повторения)
3. Далее шла подготовка клеток для цитометрии по алгоритму:
 - a. В лунки с клетками раскапали по 300 мкл единичного ПБСа.
 - b. Отделили клетки от дна лунки специальным скребком (после каждой серии одинаковых лунок нужно промыть скребком в растворе ПБС).
 - c. Далее перенести по 200 мкл из каждой лунки в 96 луночный планшет.
4. Сама цитометрия проводится на проточном цитометре MACS Quant 10.

Первый способ синтеза N-метил-изосерина

N-метил-изосерин можно синтезировать из метилакрилата за 6 стадий. Этот вариант выглядел довольно простым, и в части стадий синтеза используются относительно дешёвые и легкодоступные реагенты, например обыкновенная хлорка.

Первая стадия - эпоксидирование метилакрилата

Этот синтез мы пробовали делать с тремя реагентами: NaClO, Ca(ClO)₂, метахлорнадбензойная кислота. Реакции были поставлены по методу Стивенсона и др. [25]. Первые реакции были тестовыми, и ставились в соотношении 1:10 к методике. Наилучший результат по скорости и выходу реакции был при использовании NaClO в качестве окислителя. И было принято решение использовать эту реакцию в дальнейшем.



<i>Reactants</i>			<i>Products</i>	
Formula	C₄H₆O₂	ClHO	Formula	C₄H₆O₃
MW	86,09	52,46	MW	102,09
Limiting?	Yes	No	Equivalents	
Equivalents			%Completion	
Sample Mass	5,85g	3,56g	Expected Mass	6,94g
%Weight			Expected Moles	67,95 mmol
Molarity			Measured Mass	
Density			Purity	
Volume		300,00 mL	Product Mass	
Reactant Moles	67,95mmol	67,95mmol	Product Moles	
Reactant Mass	5,85g	3,56g	%Yield	

Рис. 1. Синтез метилглицидата.

В колбу объемом 0,5л с круглым дном, оснащенную магнитной мешалкой и термометром, налили водный раствор гипохлорита натрия (300мл) и охладили до 0°C на ледяной бане. Одной порцией добавили метилакрилат (5,85 г.), и колбу неплотно закрыли пробкой. Двухфазную смесь энергично перемешивали при температуре 0°C. Через 30 мин ледяную баню сняли, а раствор перемешивали еще в течение 1,5 ч. За это время внутренняя температура постепенно повышается до 30-37°C, и двухфазная желтая смесь становится мутной и бесцветной. Затем реакционную смесь охладили до 20-25°C на ледяной бане, перенесли в делительную воронку и экстрагировали дихлорметаном (4 × 150 мл). Органические экстракты высушили сульфатом магния и отфильтровали его. Так как метилглицидат это весьма летучее соединение, для выделения конечного продукта была собрана специальная установка, с помощью которой вручную регулировалась температура кипения реакционной смеси. Установка состоит из магнитной мешалки, водяной бани, колбы с реакционной смесью (250мл), прямого холодильника, ртутного термометра и плоскодонной колбы (приёмника). Раствор переливают в колбу и очищают фракционной вакуумной дистилляцией с получением рацемического метилглицидата в виде бесцветной жидкости. ЯМР спектр полученного соединения представлен на рис. 2.

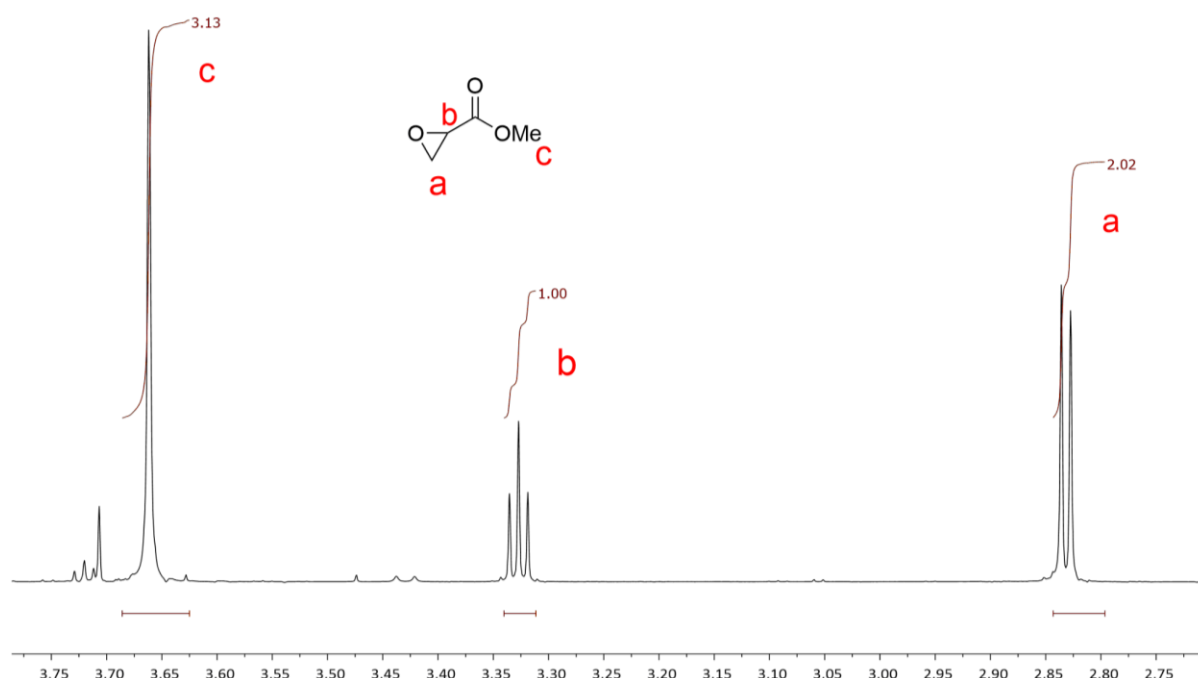


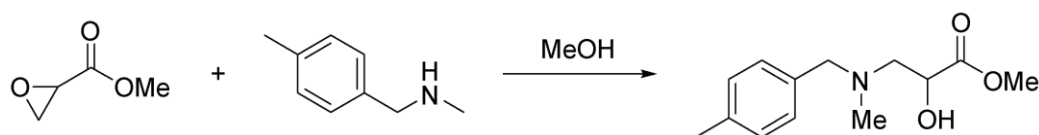
Рис. 2. ЯМР спектр метилглицидата

Масса конечного продукта, составила 1,7 г. Получается, что в этой реакции выход составляет 24,6%. Так как реакция прошла успешно, мы решили её повторить уже на большем объёме.

Вторая стадия - раскрытие эпоксидной группы.

Эту и следующую реакции ставили по методике из патента [26], с той разницей, что в нашем случае был использован N-Tol-метиламин вместо N-Bn-метиламина.

Раствор метилглицидата (7,00г) и N-Tol-метиламина (9,27г) в MeOH (25,4мл) перемешивали при 70°C в течение 16 часов. Смесь сконцентрировали в вакууме.



Reactants				Products	
Formula	C₄H₆O₃	C₉H₁₃N	CH₄O	Formula	C₁₃H₁₉NO₃
MW	102,09	135,21	32,04	MW	237,30
Limiting?	Yes	No	No	Equivalents	
Equivalents			10,02	%Completion	
Sample Mass	7,00g	9,27g		Expected Mass	16,27 g
%Weight				Expected Moles	68,57 mmol
Molarity				Measured Mass	
Density			866,50 mg/mL	Purity	
Volume			25,40 mL	Product Mass	
Reactant Moles	68,57 mmol	68,57 mmol	686,88 mmol	Product Moles	
Reactant Mass	7,00g	9,27g	22,01 g	%Yield	

Рис. 3. Раскрытие эпоксидного цикла

Выход реакции составил ~100% и было получено 16,25 г вещества.

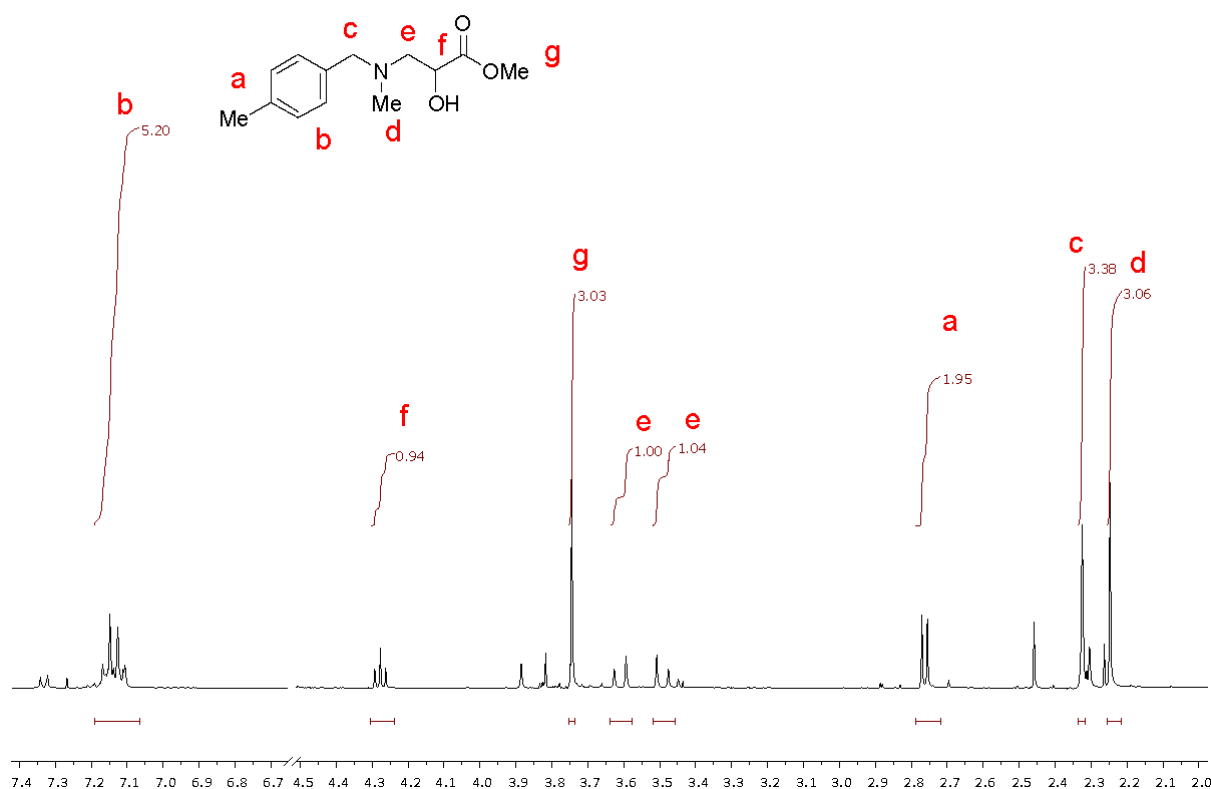
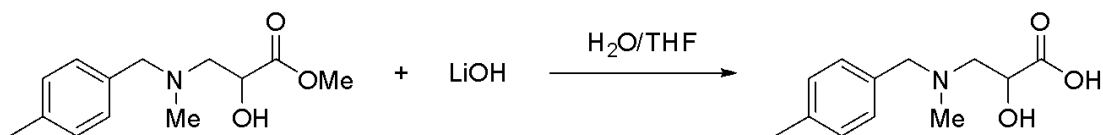


Рис. 4. Спектр ЯМР ¹H продукта присоединения N-метил-N-толиламина к метилглицидату

Третья стадия (вариант А) - гидролиз сложного эфира

Мы решили поставить синтез на половину всего полученного на предыдущей стадии вещества, то есть 8,00 г, добавили к нему 0,8г LiOH, растворенного в 100мл воды, и оставили колбу с реактивами перемешиваться в течение недели.



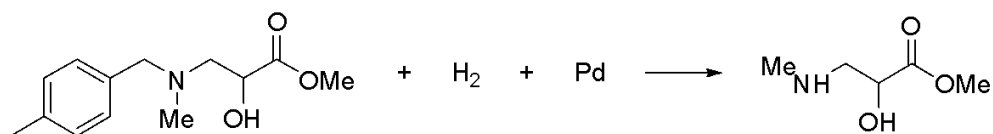
Reactants			Products	
Formula	C₁₃H₁₉NO₃	HLiO	Formula	C₁₂H₁₇NO₃
MW	237,30	23,95	MW	223,27
Limiting?	Yes	No	Equivalents	
Equivalents			%Completion	
Sample Mass	8,00g	807,32mg	Expected Mass	7,53g
%Weight			Expected Moles	33,71 mmol
Molarity			Measured Mass	
Density			Purity	
Volume			Product Mass	
Reactant Moles	33,71 mmol	33,71 mmol	Product Moles	
Reactant Mass	8,00g	807,32mg	%Yield	

Рис. 5. Синтез N-метил-N-толилизосерина

Мы получили 5,0г конечной смеси. N-метил-N-толилизосерин является гидрофильным и хорошо растворяется в воде, поэтому мы не смогли его выделить.

Третья стадия (вариант Б) – гидрирование аминокетонной группы

Так как попытка гидролизовать сложноэфирную группу не удалась, мы решили сначала снять защитную группу с азота. Защитную группу снимали по методике из книги Питера Вудса [27]. Для синтеза мы использовали газометр, наполненный водородом (получили из алюминия с добавлением раствора щёлочи) и двугорлую колбу (250мл). В колбу залили водный раствор исходного вещества, затем добавили 3,6г палладия на угле, и заместили весь воздух в колбе водородом. Также мы дестабилизировали якорь, чтобы реакционная смесь начала разбрызгиваться по стенкам, тем самым увеличивая площадь соприкосновения с газом и ускоряя протекание реакции. Всего реактивы в колбе мешались около недели. По истечению этого времени, никаких признаков реакции не было, и мы сделали вывод, что гидрирование не прошло и завершили эксперимент.



Reactants				Products	
Formula	$C_{13}H_{19}NO_3$	H_2	Pd	Formula	$C_5H_{11}NO_3$
MW	237,30	2,02	106,42	MW	133,15
Limiting?	Yes	No	No	Equivalents	
Equivalents				%Completion	
Sample Mass	8,00g	67,96 mg	35,88g	Expected Mass	4,49g
%Weight			10,00%	Expected Moles	33,71 mmol
Molarity				Measured Mass	
Density				Purity	
Volume				Product Mass	
Reactant Moles	33,71 mmol	33,71 mmol	33,71 mmol	Product Moles	
Reactant Mass	8,00g	67,96 mg	3,59g	%Yield	

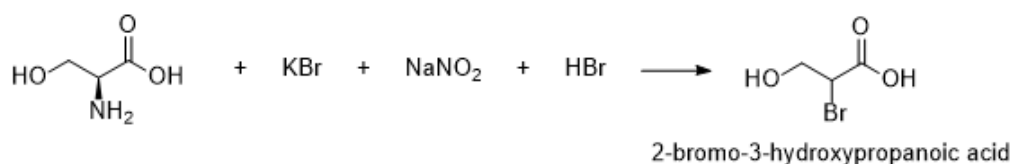
Рис. 6. Синтез метилового эфира N-метил-изосерина

Второй способ синтеза N-метил-изосерина

Так как почти все стадии в первом способе прошли неудачно, мы начали искать другие методики синтеза N-метил-изосерина, которые занимали бы меньше времени, и имели больший выход реакций. Мой научный руководитель нашёл такую методику по синтезу метилглицидата – эпоксидирование 2-бром-3-гидроксипропановой кислоты раствором щёлочи. Потом эпоксидную группу можно раскрыть метиламином. Так же была идея эпокидировать сразу метиламином и потом им же раскрыть эпоксидную группу, тем самым проведя две стадии *one pot*.

Первая стадия – синтез 2-бром-3-гидроксипропановой кислоты

2-бром-3-гидроксипропановая кислота может быть получена из серина по методике Петит и др. [26].



Reactants					Products	
Formula	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	BrK	NNaO_2	BrH	Formula	$\text{C}_3\text{H}_5\text{BrO}_3$
MW	105,09	119,00	68,99	80,91	MW	168,97
Limiting?	Yes	No	No	No	Equivalents	
Equivalents		1,68	1,40	4,83	%Completion	
Sample Mass	52,50g	200,00g	48,30g	406,76g	Expected Mass	84,41g
%Weight		50,00%		48,00%	Expected Moles	499,56mmol
Molarity					Measured Mass	
Density				3,31g/L	Purity	
Volume				123,00mL	Product Mass	
Reactant Moles	499,56mmol	840,32mmol	700,05mmol	2,41mol	Product Moles	
Reactant Mass	52,50g	100,00g	48,30g	195,25g	%Yield	

Рис. 7. Синтез 2-бром-3-гидроксипропановой кислоты

Серин (52,5 г, 0,5 моль) и бромид калия, KBr, (200 г, 1,7 моль) растворили в воде (400 мл). Бромистоводородную кислоту (48%, 123 мл, 1,09 моль) добавили при комнатной температуре и смесь охладили до -13°C при перемешивании. Воздух пропускали через раствор и медленно добавляли небольшими порциями нитрит натрия (42,8 г, 0,62 моль) около 5 г каждые 10-15 мин. После каждого добавления реакционная смесь становится коричневой, а затем цвет медленно тускнеет, но раствор не обесцвечивается полностью. Общее время, необходимое для добавления всего нитрит натрия составляет примерно 2,5 часа. Затем раствору дали нагреться до 0°C , смесь перемешивали в течение 6 часов. Затем эфиром (6 × 300 мл) экстрагировали бледно-зеленый раствор. Экстракт сконцентрировали до 0,5 л роторным выпариванием и высушили сульфатом магния. После фильтрации эфир выпарили и оставшийся растворитель выпарили при пониженном давлении. Бледно-желтое или зеленое масло (74-75 г, 87-89%) нужно использовать сразу после очистки.

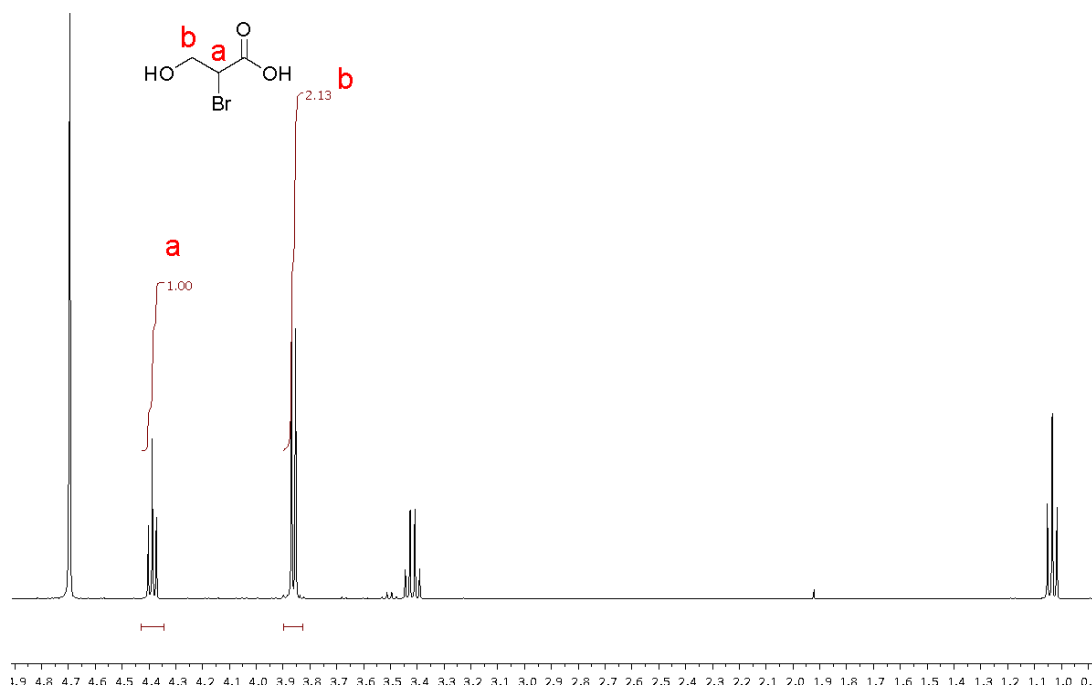
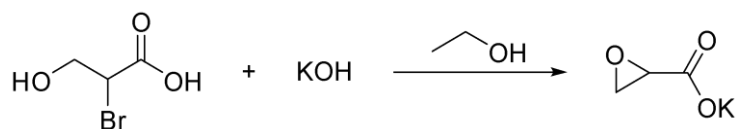


Рис. 8. ЯМР 2-бром-3-гидроксипропановой кислоты

Вторая стадия – получение метилглицидата

Метилглицидат можно получить в данном случае двумя способами: добавлением щёлочи или добавлением метиламина (в обоих вариантах используется метанол в качестве растворителя).

Сначала попробовали получить метилглицидат по протоколу Петит и др. [26]. (реакция с щёлочью):



Кислоту, полученную на предыдущей стадии (74,5г), растворили в абсолютном этаноле (300 мл) и охладили до -20°C . Медленно добавили раствор гидроксида калия (55,5г, 86%) в чистом этаноле (300 мл). Через 2 часа смеси дали нагреться до 0°C и перемешивали при этой температуре в течение 14 часов. Раствор отфильтровали для удаления солей, выпавших в осадок. Большую часть растворителя удалили ротаторным испарением без нагревания и дополнительную порцию соли удалили фильтрованием. Смесь солей высушили в вакууме, получили литературный выход смеси 1:1 KBr и глицидата калия.

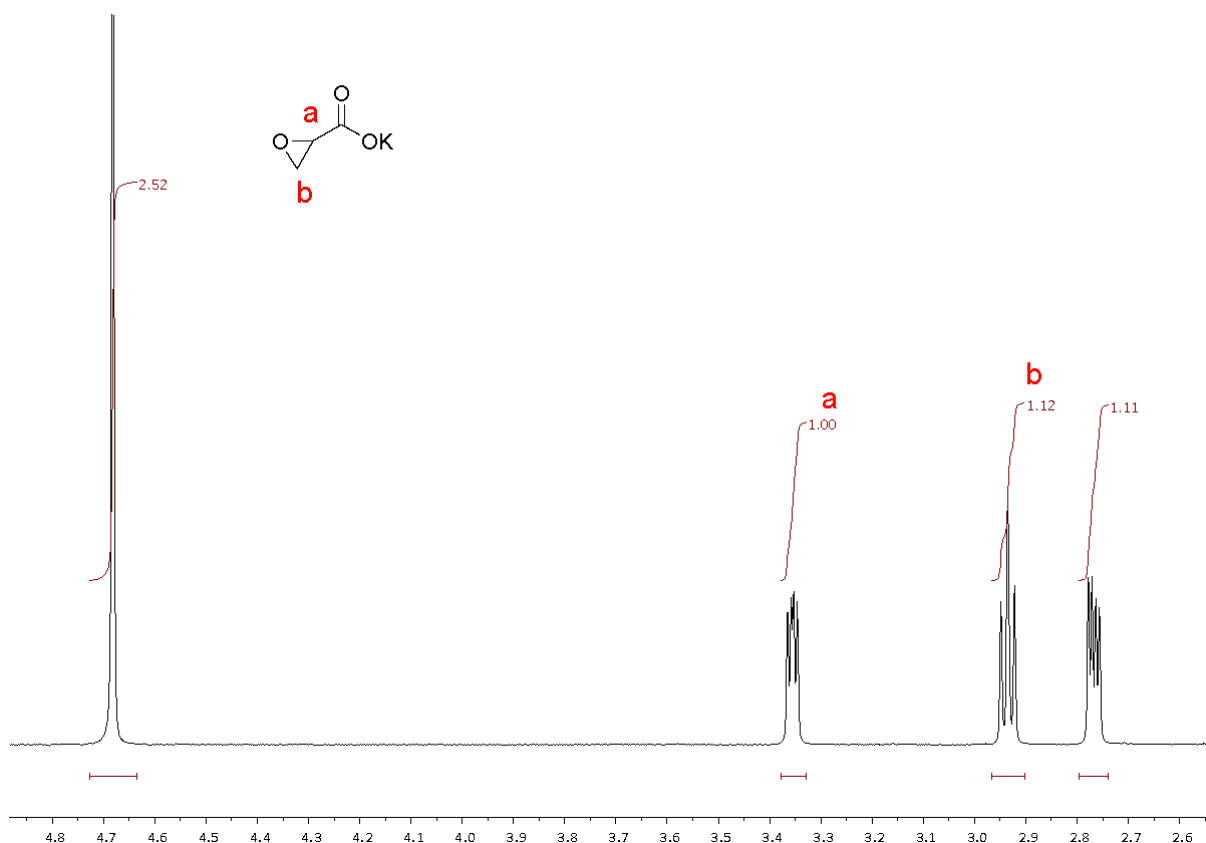
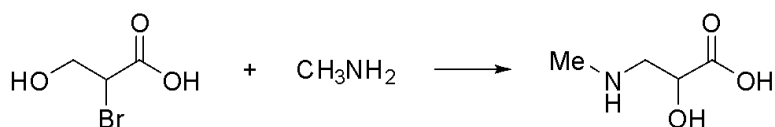


Рис. 9. ЯМР метилглицидата

Третья стадия – синтез N-метил-изосерина

В первый раз мы попробовали синтезировать N-метил-изосерин из калиевой соли метилглицидата, в этот раз мы попробовали сразу добавить метиламин к бромкислоте.



Reactants			Products	
Formula	C₃H₅BrO₃	CH₅N	Formula	C₄H₉NO₃
MW	168,97	31,06	MW	119,12
Limiting?	Yes	No	Equivalents	
Equivalents		7,00	%Completion	
Sample Mass	5,00g	6,43g	Expected Mass	3,52g
%Weight			Expected Moles	29,59mmol
Molarity			Measured Mass	
Density			Purity	
Volume			Product Mass	
Reactant Moles	29,59mmol	207,13 mmol	Product Moles	
Reactant Mass	5,00g	6,43g	%Yield	

Рис. 10. Синтез N-метил-изосерина

Порцию (5г) бромкислоты смешали при комнатной температуре с большим избытком (семикратным) метиламина, смесь сильно разогрелась. Получена смесь с содержанием метилизосерина ~ 90%.

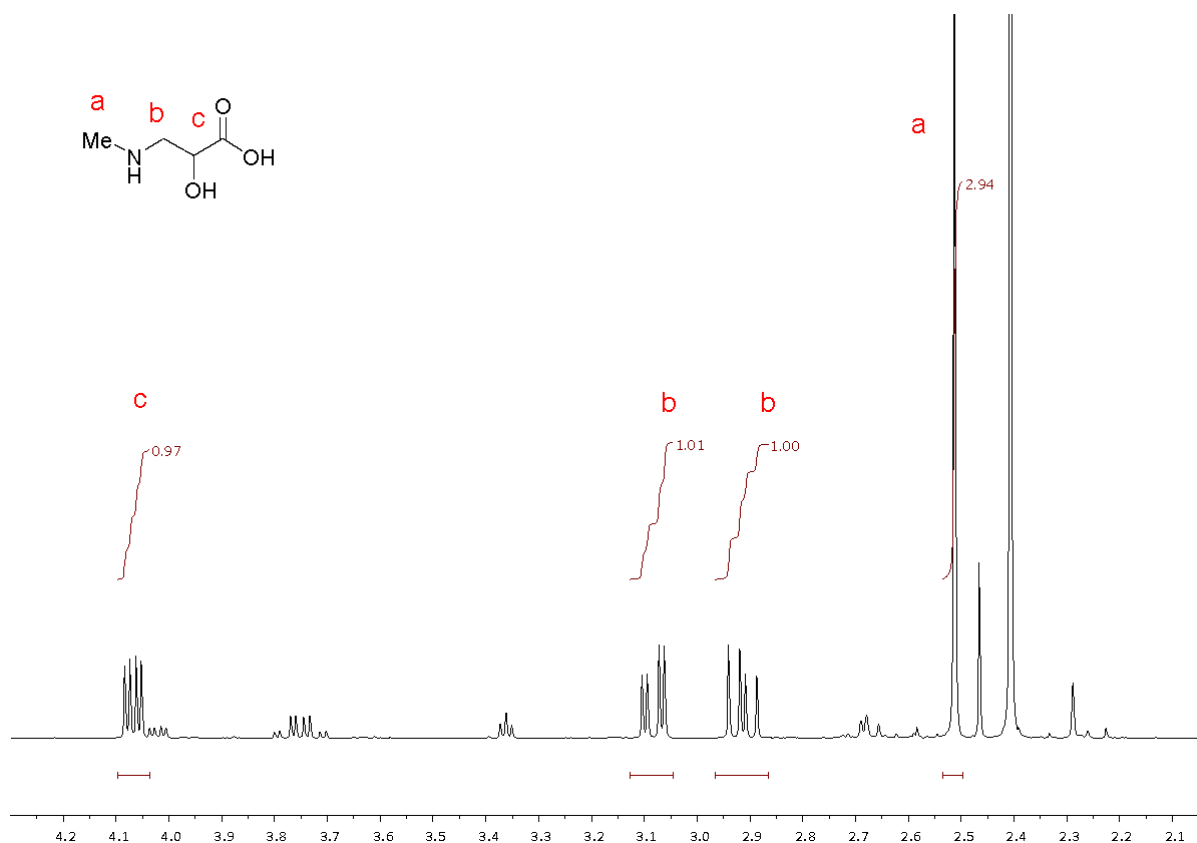


Рис. 11. ЯМР N-метил-изосерина

Синтез О-бензил-L-тирозина

О-бензил-L-тирозин синтезируется в пять стадий из L-тирозина по методике, разработанной в нашей лаборатории.

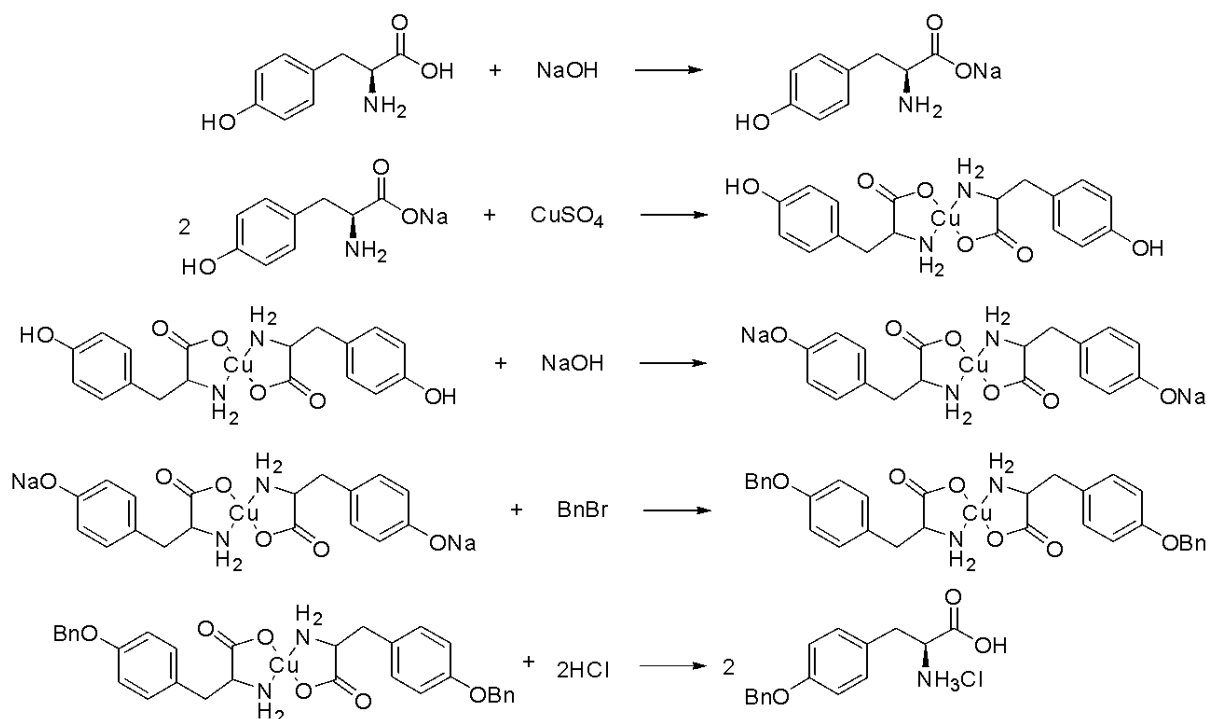


Рис. 12. Синтез О-бензил-L-тирозина

В 2л трехгорлой колбе смешали 90,6г тироцина и 20г NaOH разведённый в 200мл воды, по каплям при перемешивании, добавили к полученной суспензии раствор 62,42г медного купороса, разведённого в 200мл воды при нагревании (капали тёплым), полученную синюю суспензию перемешивали в течении получаса, затем по каплям прибавили раствор ещё 20г NaOH, растворённого в 100мл воды. В полученный сине-фиолетовый раствор влили 1л MeOH и 65мл BnBr (разом), почти сразу образовался осадок. Перемешивали при комнатной температуре в течении ночи и ещё часов 10 при кипячении на водяной бане; смесь стала очень густой. На следующие холодную смесь отфильтровали (зелёный цвет фильтрата указывает на полноту протекания реакции), промыли водой 3 раза (до бесцветного фильтрата). Полученную массу суспендировали в 1л воды, добавили 300мл соляной кислоты и перемешивали три часа; полученную отфильтровали, осадок на фильтре промыли 3×100 и много раз×100мл ИПС'ом (до бесцветного фильтрата), осушили в вакууме. Получено примерно 52г О-Вп-L-тирозина.

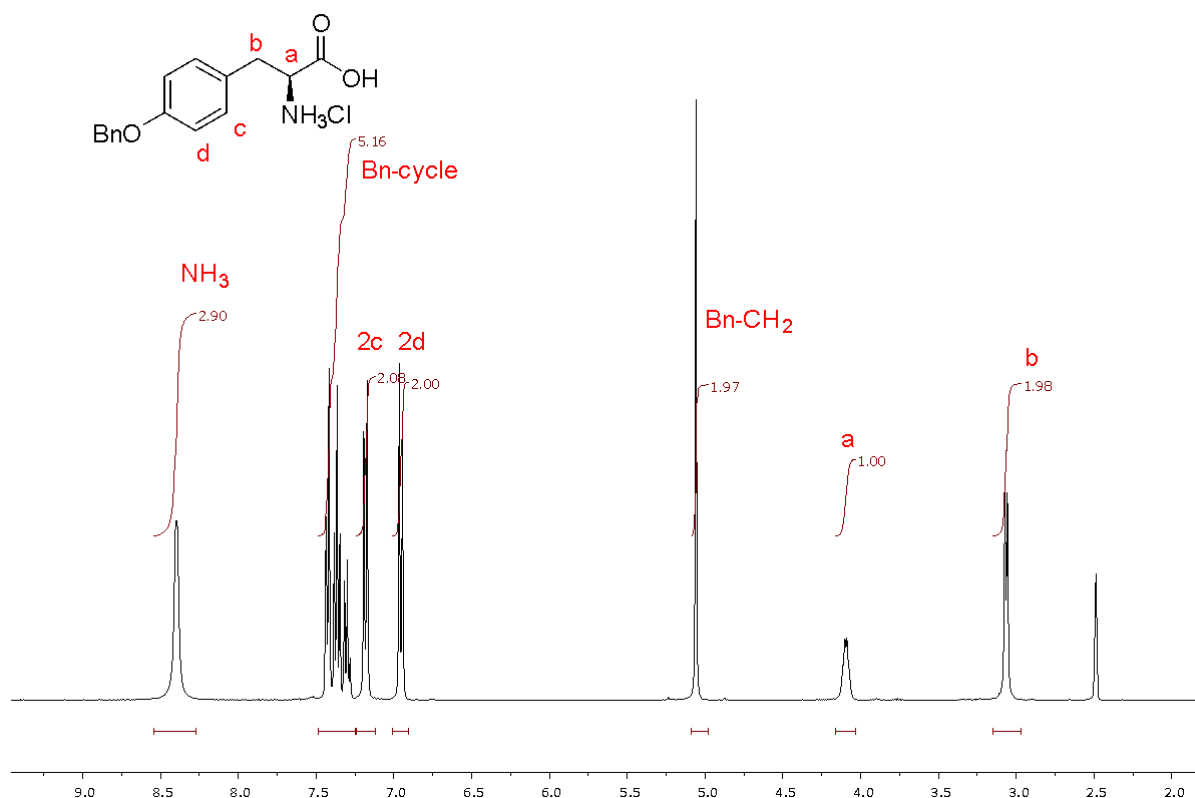


Рис. 13. ЯМР О-бензил-L-тирозина. Чистота по ЯМР составляет (95%), суммарный выход 73,5%.

Обсуждение результатов

Химическая часть проекта

В итоге мы успешно получили смесь с 90% содержанием N-метил-изосерина. На ЯМР-спектре (Рис.14) видим два симметричных дуплета на 2.9 и 3.1 м.д. – это сигналы от двух протонов в β -положении. На 4.08 наблюдается сигнал протона в α -положении, он левее двух предыдущих протонов, так как находится ближе к электроноакцепторным группам. На 2.5 м.д. присутствует сигнал метильной группы, интеграл этого синглета равен 3. На графике также видны сигналы метилсерина, и на 2.4 виден сигнал метиламина (т.к. реагент был взят в избытке). N-метил-изосерина получается больше чем N-метил-серина, так как по правилу раскрытия эпиксидного цикла амин атакует наименее защищенный углерод, т.е. тот, у которого меньше всего заместителей, а это углерод к которому присоединены два протона.

Также в ходе работы был синтезирован О-бензил-L-тирозин. (Рис.15) На 2.5 м.д. виден сигнал растворителя. На 4.2 м.д. находится синглет протона в α -положении, а на 3.1 м.д. находится сигнал двух протонов в β -положении. На 7.25-7.50 м.д. находится мультиплет протонов бензольного цикла, а на 5.0 м.д. находятся протоны углерода при бензиле. На 8.25-8.50 м.д. сигналият три протона аминогруппы. На 8.25 м.д. сигналият протоны фенольного цикла, которые находятся ближе к бензильной группе, а оставшиеся два сигналият 8.00-8.10 м.д.

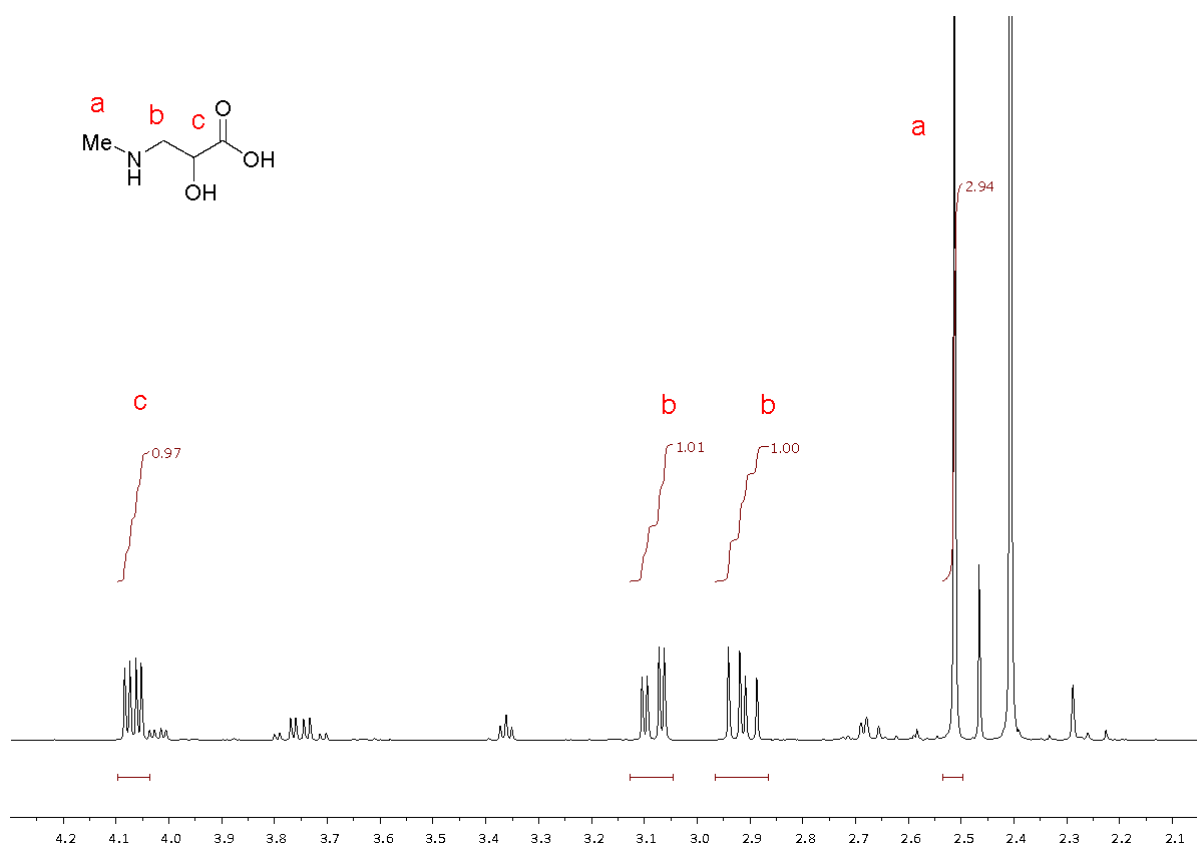


Рис. 14. ЯМР спектр N-метил-изосерина

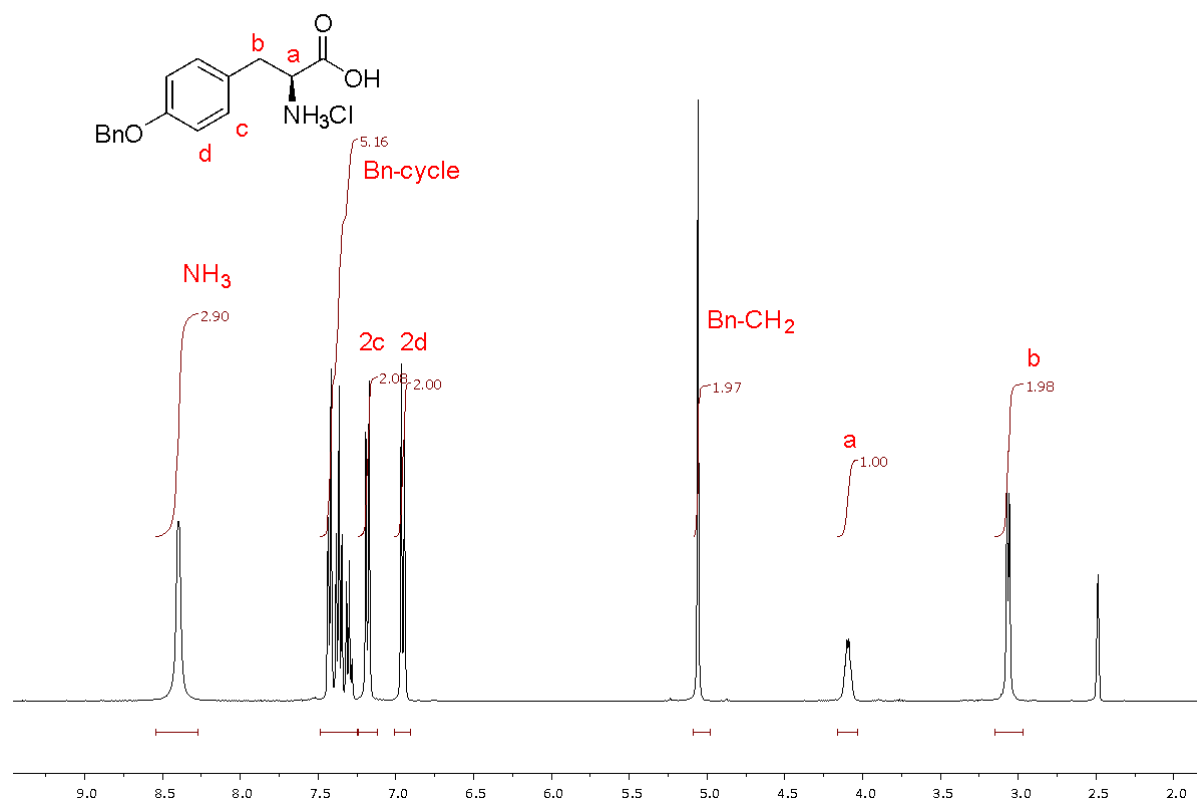
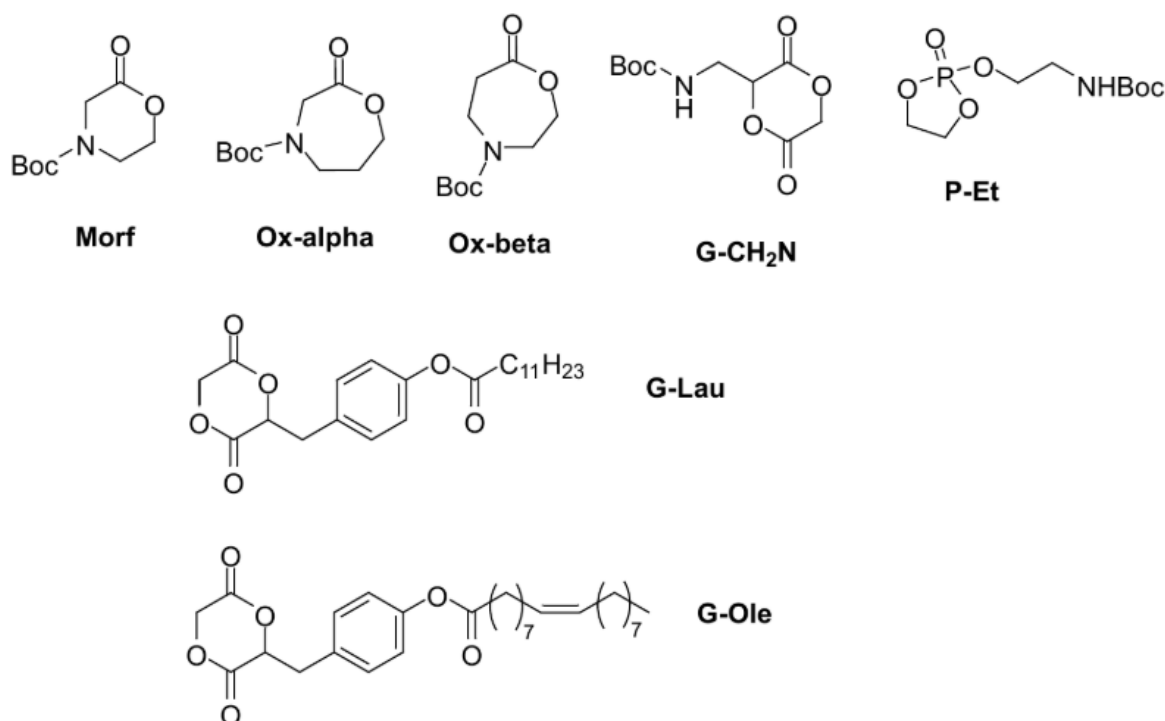


Рис.15. ЯМР-спектр O-бензил-L-тирозина

Биологическая часть проекта

В настоящей работе проведена серия трансфекционных экспериментов на линии макрофагов RAW 264.7 с использованием как siRNA, меченной флуоресцентным красителем, так и плазмид с eGFP-маркером. В качестве носителей использованы различные полимерные препараты (структурные формулы мономеров, мономерный состав и молекулярные массы полимеров приведены ниже).



A new		B new		C new		H	
Morf	7	Ox-alpha	11,5	Ox-beta	7,5	G-CH ₂ N	7
G-Lau	9	G-Lau	9	G-Lau	9	G-Lau	7
Mr	5254,54	Mr	6383,92	Mr	5467,30	Mr	4753,62

D		E		F		G		P-Et	
Morf	8	Ox-alpha	7	Ox-beta	9	G-CH ₂ N	8	P-Et	7
G-Ole	7	G-Ole	7	G-Ole	8	G-Ole	8	G-Ole	7
Mr	6662,51	Mr	6545,57	Mr	7694,36	Mr	7705,09	Mr	

Рис. 16. Список мономеров и мономерный состав полимерных носителей нуклеиновых кислот

Мы осуществляем сополимеризацию жирных и азотсодержащих мономеров. В полученных сополимерах азотсодержащие звенья полимерной цепи, после удаления защитной группы с атома азота, приобретают положительный заряд (+1). В то время как нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) представляют собой полимеры с

отрицательным зарядом, обусловленным присутствием фосфатных групп с зарядом - 1, соединяющих остатки рибозы.

В нашем первом исследовании [29] по трансфекции установлено, что ключевым параметром эффективного взаимодействия полимера с нуклеиновой кислотой является соотношение зарядов - оптимальным является отношение 10:1, то есть десять положительных зарядов полимера на один отрицательный заряд нуклеиновой кислоты. При этом степень полимеризации и молекулярная масса полимера являются второстепенными факторами. Это означает, что несколько коротких полимерных молекул с малым количеством положительных зарядов или одна длинная молекула с достаточным их числом способны одинаково эффективно связывать нуклеиновые кислоты.

В каждом синтезе формируются сополимеры с небольшой вариабельностью длины цепи: количество азотсодержащих звеньев может варьироваться, например, от 8 до 11. Путём ЯМР-спектроскопии можно чётко определить число азотных звеньев в цепи. Во время проведения трансфекции концентрацию растворов полимеров адаптируют в зависимости от длины полимерной цепи: для более длинных полимеров растворы разбавляют, для более коротких — концентрируют, таким образом обеспечивая одинаковое общее количество положительных зарядов в одинаковом объёме раствора. Такой подход позволяет нивелировать влияние различий в степени полимеризации на эффективность связывания нуклеиновых кислот и упрощает дозирование.

На диаграмме ниже представлены результаты трансфекции (оценка методом проточной цитофлуометрии по маркеру eGFP), по оси Y отложен процент GFP+.

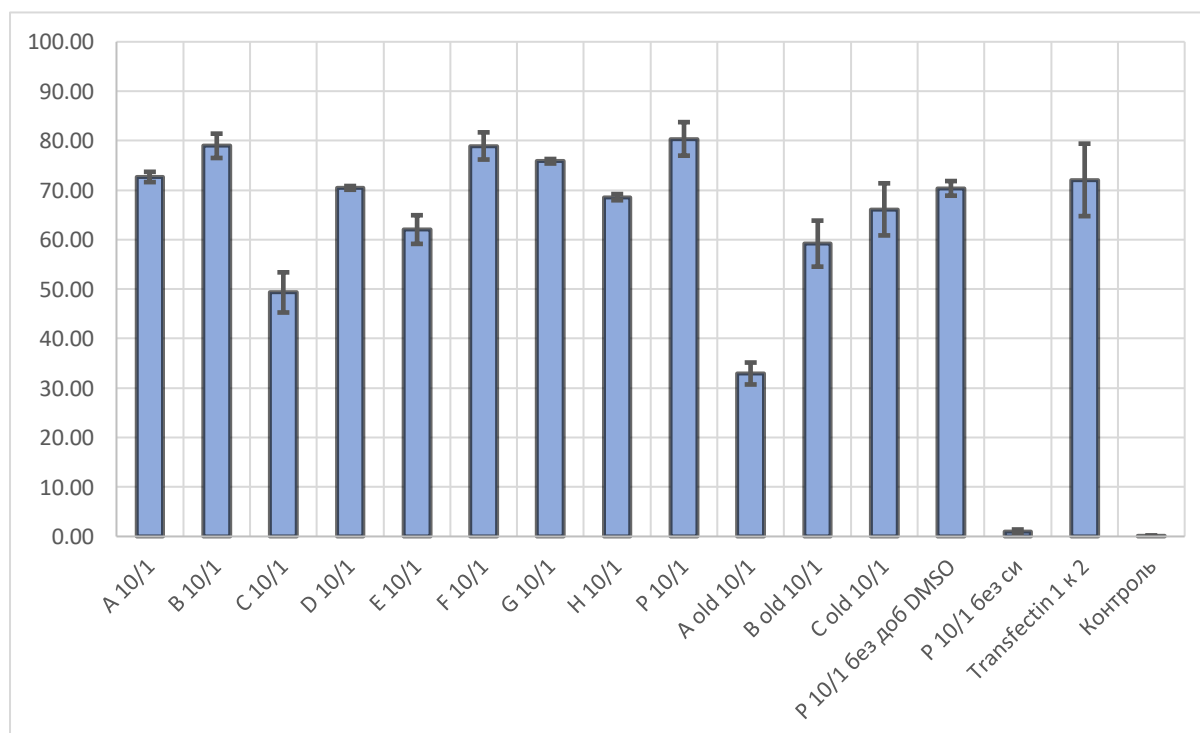


Рис. 17. Эффективность трансфекции клеток линии RAW по данным проточной цитометрии с помощью siRNA

Изучены также особенности влияния добавки диметилсульфоксида (ДМСО). Добавка не оказала значимого положительного влияния на эффективность доставки siRNA, но связана с увеличением цитотоксичности и агрегацией полимеров при высоких концентрациях. Это указывает на необходимость оптимизации дозы и условий применения ДМСО для улучшения профиля безопасности трансфекционных составов.

Интересным наблюдением стала различная агрегационная способность изомерных полимеров В и С. В случае полимера С ярко выражена агрегация носителя.

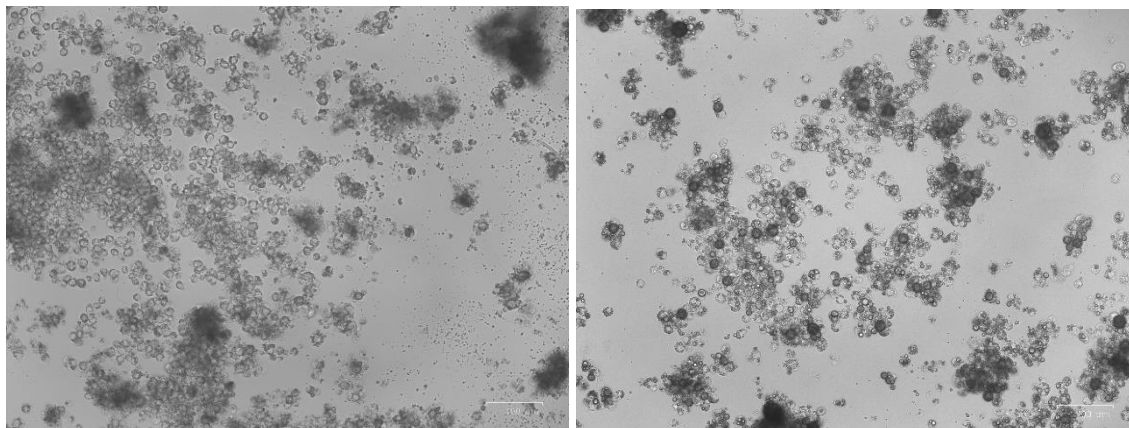


Рис. 18. Микрофотография клеток RAW после трансфекции при помощи полимеров В и С, соответственно.

Наибольшую эффективность в данном эксперименте продемонстрировали полимеры В, F и Р. В рамках нашей работы решено было подробнее изучить свойства полимера В (и изомерного ему С для сравнения).

В данном эксперименте были использованы два 48-луночных планшета, на которых параллельно проведены идентичные опыты с одинаковыми наборами условий, за исключением типа применяемого полимера: в одном планшете использовался полимер В, в другом — полимер С. В результате были сформированы два контрольных образца и по две лунки с коммерческим полимером Трансфектин на каждом планшете. Полимер С, даже при низких объемах введения, вызывал агрегацию и значительные морфологические изменения клеток, включая формирование раздутых сферических структур. В то же время полимер В демонстрировал большую стабильность, сохраняя целостность клеток при более высоких концентрациях. Эти различия являются существенными для дальнейшей оптимизации трансфекционных агентов с целью уменьшения токсичности и повышения биосовместимости. (Рис.19).

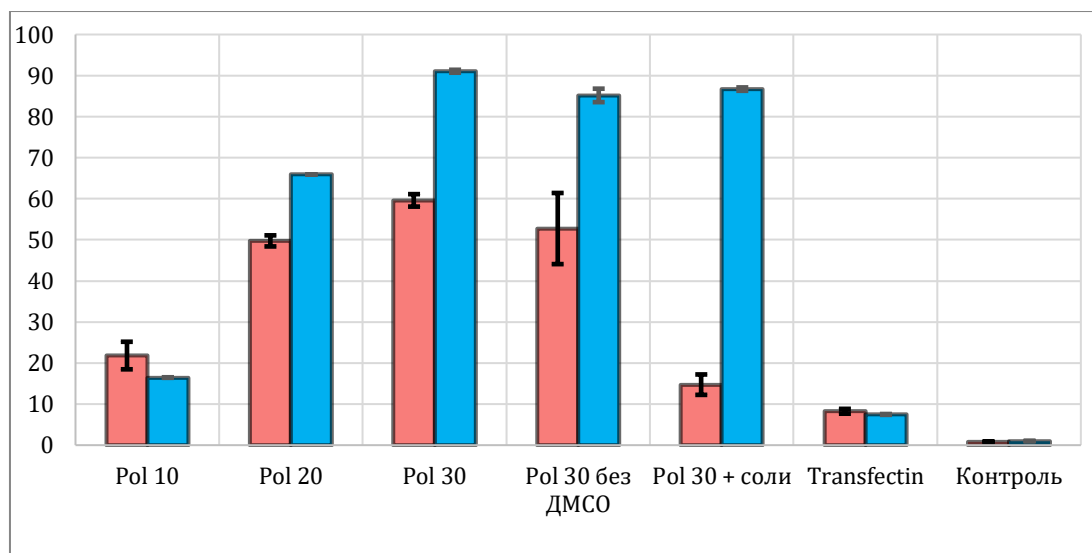


Рис.19. Результаты трансфекции полимерами С (синий) и В (красный).

В сравнении с коммерческим реагентом Transfectin BioRad полимерные агенты показали равную или превосходящую эффективность трансфекции при существенно меньшей цитотоксичности. Однако в некоторых экспериментах контрольный коммерческий препарат проявил низкую или нулевую эффективность, что требует дополнительного подтверждения на других плазидах. Например, это видно на графике (Рис.19.).

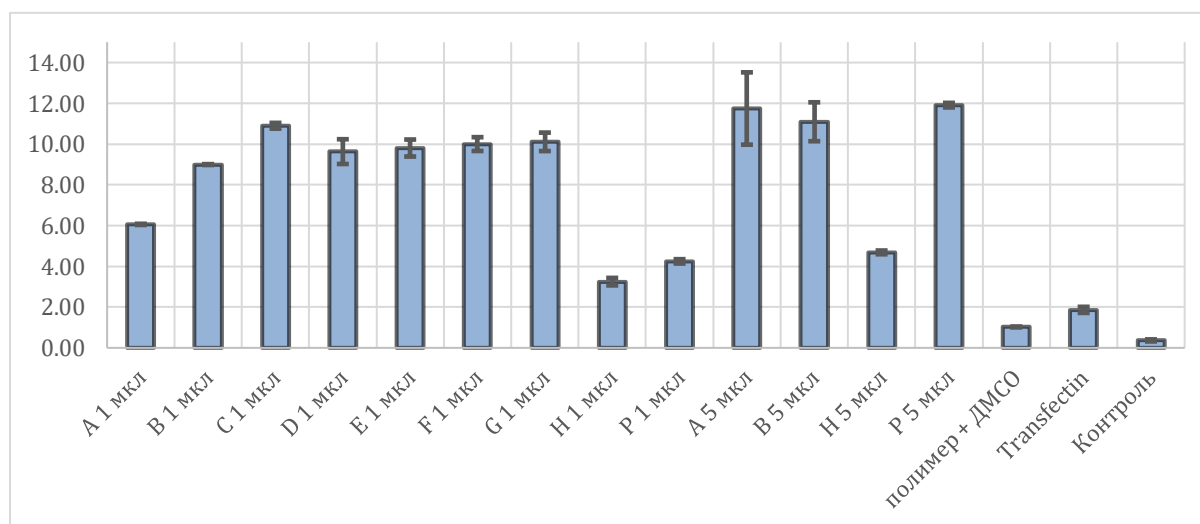


Рис.19. График эффективности трансфекции полимеров с помощью pDNA

Полученные данные подтверждают потенциал полимерных трансфектантов на основе производных аминокислот для использования в трансфекции макрофагов. Высокая эффективность доставки флуоресцентно помеченных нуклеиновых кислот, низкая токсичность и возможность тонкой настройки свойств полимеров открывают перспективы их применения в генной терапии, особенно в контексте модуляции функции макрофагов для лечения онкологических и воспалительных заболеваний. Тем не менее, для повышения стабильности и контроля агрегации полимеров необходимы

дальнейшие исследования, включая изучение структуры-поведения и взаимодействия с клетками *in vivo*.

Таким образом, совместный химический и биологический анализ результатов подчеркивает важность комплексного подхода в разработке трансфекционных систем с высокой эффективностью и хорошим профилем безопасности, что способствует прогрессу в области регенеративной медицины и генной терапии.

Выводы

Все поставленные цели работы были успешно достигнуты:

1. Выполнен синтез O-Vn-тирозина
2. Выполнен синтез N-метил-изосерина и его производных
3. Осуществлена трансфекция макрофагов при помощи синтетических полимерных трансфицирующих агентов
4. Осуществлена оценка эффективности доставки siRNA и pDNA с помощью проточной цитометрии и системы флуоресцентной визуализации клеток

Результаты проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии демонстрируют высокую эффективность трансфекции полимерными агентами — эффективность превышала 90% в ранних экспериментах, хотя позднее снижалась до 70-80%, что может быть связано с вариациями в пробах или условиями проведения.

Полученные данные подтверждают потенциал полимерных трансфицирующих агентов на основе производных аминокислот для использования в трансфекции макрофагов. Высокая эффективность доставки флуоресцентно помеченных нуклеиновых кислот, низкая токсичность и возможность тонкой настройки свойств полимеров открывают перспективы их применения в генной терапии, особенно в контексте модуляции функции макрофагов для лечения онкологических и воспалительных заболеваний. Тем не менее, для повышения стабильности и контроля агрегации полимеров необходимы дальнейшие исследования, включая изучение структуры-поведения и взаимодействия с клетками *in vivo*.

Таким образом, совместный химический и биологический анализ результатов подчеркивает важность комплексного подхода в разработке трансфекционных систем с высокой эффективностью и хорошим профилем безопасности, что способствует прогрессу в области регенеративной медицины и генной терапии.

Список литературы

- 1) Masaki, I., Yonemitsu, Y., Komori, K., Ueno, H., Nakashima, Y., Nakagawa, K., Fukumura, M., Kato, A., Hasan, M. K., Nagai, Y., Sugimachi, K., Hasegawa, M., & Sueishi, K. (2001). Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature:

a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(7), 1294–1296.

- 2) Qie, B., Tuo, J., Chen, F., Ding, H., & Lyu, L. (2025). Gene therapy for genetic diseases: challenges and future directions. *MedComm*, 6(2), e70091.
- 3) Harrington, K.J., Spitzweg, C., Bateman, A.R., Morris, J.C., & Vile, R.G. (2001). Gene therapy for prostate cancer: current status and future prospects. *The Journal of Urology*, 166(4), 1220–1233.
- 4) Kurreck J. (2009). RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(8), 1378–1398.
- 5) Taxman, D.J., Livingstone, L.R., Zhang, J., Conti, B.J., Iocca, H.A., Williams, K.L., Lich, J.D., Ting, J.P., & Reed, W. (2006). Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC biotechnology*, 6, 7.
- 6) Deng, Y., Chen, J., Zhao, Y., & Tang, T. Therapeutic Applications of RNA Interference. *eLS*, 1-7.
- 7) Wang, T., Shigdar, S., Shamaileh, H.A., Gantier, M.P., Yin, W., Xiang, D., Wang, L., Zhou, S.F., Hou, Y., Wang, P., Zhang, W., Pu, C., & Duan, W. (2017). Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment. *Cancer Letters*, 387, 77–83.
- 8) Lam, S., Chen, K.C., Ng, M.M., & Chu, J.J. (2012). Expression of plasmid-based shRNA against the E1 and nsP1 genes effectively silenced Chikungunya virus replication. *PloS One*, 7(10), e46396.
- 9) Robbins, P.D., Tahara, H., & Ghivizzani, S.C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology*, 16(1), 35-40.
- 10) Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS Journal*, 23(4), 78.
- 11) Sung, Y.K., & Kim, S.W. (2020). Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research*, 24, 12.
- 12) Gary, D.J., Puri, N., & Won, Y.Y. (2007). Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *Journal of Controlled Release: official journal of the Controlled Release Society*, 121(1-2), 64–73.
- 13) Aranaz, I., Alcántara, A.R., Civera, M.C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, 13(19), 3256.
- 14) Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., & Ciccarone, V.C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, 33(2), 95-103.
- 15) Hunt, M.A., Currie, M.J., Robinson, B.A., & Dachs, G.U. (2010). Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 21(2), 66–72.
- 16) Kawakami, S., Sato, A., Nishikawa, M., Yamashita, F., & Hashida, M. (2000). Mannose receptor-mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes. *Gene therapy*, 7(4), 292-299.
- 17) Burke, B., Sumner, S., Maitland, N., & Lewis, C.E. (2002). Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. *Journal of leukocyte biology*, 72(3), 417-428.

- 18) Zhang, X., Edwards, J.P., & Mosser, D.M. (2009). The expression of exogenous genes in macrophages: obstacles and opportunities. *Macrophages and Dendritic Cells: Methods and Protocols*, 123-143.
- 19) Shapouri- Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., ... & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 6425-6440.
- 20) Coffelt, S.B., Hughes, R., & Lewis, C.E. (2009). Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1796(1), 11-18.
- 21) Xia, Y., Rao, L., Yao, H., Wang, Z., Ning, P., & Chen, X. (2020). Engineering macrophages for cancer immunotherapy and drug delivery. *Advanced materials*, 32(40), 2002054.
- 22) Chen, Y., Emtage, P., Zhu, Q., Foley, R., Muller, W., Hitt, M., ... & Wan, Y. (2001). Induction of ErbB-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells: enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12. *Gene Therapy*, 8(4), 316-323.
- 23) Spiller, K.L., & Koh, T.J. (2017). Macrophage-based therapeutic strategies in regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 122, 74-83.
- 24) Yang, S., Li, W., Liu, W., Gao, C., Zhou, B., Li, S., ... & Kong, Y. (2006). IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis. *Clinical immunology*, 121(1), 63-73.
- 25) Stevenson, C.P., Nielsen, L.P., & Jacobsen, E.N. (2006). Preparation of (S)-Methyl Glycidate via Hydrolytic Kinetic Resolution. *Organic Syntheses*, 162-169.
- 26) Cui, J.J. (Inventor). (2022). Macrocytes and their use (International patent publication No. WO 2022/011123 A1). World Intellectual Property Organization. Published January 13, 2022. Filed July 8, 2021. Blossomhill Therapeutics, Inc., Assignee
- 27) Wuts, P.G.M. (2014). *Greene's protective groups in organic synthesis*. John Wiley & Sons, Inc.
- 28) Petit, Y., & Larcheveque, M. (1998). ETHYL GLYCIDATE FROM (S)-SERINE: ETHYL (R)-(+)-2, 3-EPOXYPROPANOATE:(OXIRANECARBOXYLIC ACID, ETHYL ESTER,(R)-). *Organic syntheses*, 75, 37-44.
- 29) Shaputkin, E.D., Nifant'ev, I.E., Bagrov, V.V., Shlyakhtin, A.V., Abashkin, D.A., Galiakberova, A.A., & Ivchenko, P.V. (2022). Lipophilic poly (glycolide) blocks in morpholin-2-one-based CARTs for plasmid DNA delivery: Polymer regioregularity, sequence of lipophilic/polyamine blocks, and nanoparticle stability as factors of transfection efficiency. *European Polymer Journal*, 181, 111644.

