

УДК 577.112.34

## МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ЛИПОАМИНОКИСЛОТ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

В.В. Марусова (Соловьева), Р.И. Загитова, У.А. Буданова, Ю.Л. Себякин\*

*(кафедра химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского, Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий; \*e-mail: c-221@yandex.ru)*

Проделанная работа направлена на создание ряда мультифункциональных производных липоаминокислот, которые потенциально обладают разной биологической активностью. Для осуществления поставленной цели первоначально был проведен теоретический расчет гидрофильно-липофильного баланса ряда структур катионных амфифилов на основе L-глутаминовой кислоты и коротких диаминов. Разработанные схемы и проведенный синтез позволили наработать препаративные количества образцов, необходимых для дальнейших физико-химических и биологических испытаний. Проведенные расчеты, измерения и эксперименты на липосомальных дисперсиях синтезированных соединений демонстрируют возможность создания однотипных структур амфифильной природы на основе алифатических производных аминокислот и диаминов, применение которых возможно как в антибактериальной терапии, так и в качестве средств доставки генетического материала.

**Ключевые слова:** липоаминокислоты, диамины, алифатические производные L-глутаминовой кислоты, катионные липосомы, гидрофильно-липофильный баланс, катионные амфифилы.

Липиды относятся к важнейшему классу биологически активных соединений. Благодаря своей уникальной амфифильной структуре они могут формировать в водной среде бислойные агрегаты. Биологические мембраны, основным строительным элементом которых являются липиды, выполняют важнейшие функции в живых организмах (транспорт метаболитов, генерация энергии, взаимодействие клеток и их деление, передача нервного импульса, рецепция сигналов внешней среды и т.д.) [1, 2].

Для решения многих медицинских проблем терапевтического плана, таких как создание малотоксичных противоопухолевых средств направленного действия, борьба с наследственными заболеваниями, преодоление биологической несовместимости при пересадке органов и тканей, лечение некоторых сердечно-сосудистых заболеваний, профилактика лекарственной аллергии и др., были сконструированы искусственные мембраны, представляющие собой различные агрегаты (липосомы, мицеллы и др.), образованные природными или искусственными липидами. С их помощью осуществляется доставка в клетку лекарственных веществ, которые по ряду причин не могут самостоятельно преодолеть плазматическую мембрану. Их можно применять в качестве агентов трансфекции, а также антибактериальных средств [3, 4].

Поскольку системы доставки лекарств на основе липосом должны достигать определенных органов и тканей, их взаимодействие с клетками также необходимо принимать во внимание. Несмотря на сложности в подборе идеальных липосомальных конструкций для безопасной и эффективной доставки лекарственных средств (ЛС), было разработано множество препаратов, которые успешно прошли доклинические и клинические испытания и применяются на практике в различных областях медицины [5].

В генной терапии важна эффективность связывания транспортных систем с генетическим материалом и его переноса в клетку. Системы доставки должны иметь положительный заряд на своей поверхности, позволяющий взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфатными остатками нуклеозидов. В липосомах это достигается за счет использования катионных амфифилов в составе бислоя с относительно большим положительным зарядом полярной головной группы. Кроме того, контролируя состав липосомальных конструкций, можно изменять физико-химические характеристики поверхности липосом, такие как температура фазового перехода, заряд и стабильность.

Цель данной работы состояла в разработке ряда однотипных соединений на основе алифатических производных аминокислот и диаминов, а также

моделировании направления их применения в разных сферах медицины (антимикробная терапия, целевая доставка лекарственных средств и генная терапия). Такое разнообразие соединений позволит в дальнейшем сформировать библиотеку структур, различающихся размером полярных головных групп и вариациями гидрофобных фрагментов. Это даст возможность расширить спектр физико-химических и биологических исследований данного типа катионных амфифилов.

### Результаты и их обсуждение

Первый этап работы заключался в теоретическом расчете гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) диэфиров L-глутаминовой кислоты с диаминами с использованием программной обработки ряда структур и последующего анализа зависимости структура – биологическая активность. Расчет [6] проведен с помощью компьютерной программы ACD LogP для 60 структур катионных амфифилов, различающихся длиной алифатических цепей в гидрофобном блоке, а также числом и природой заряженных группировок в гидрофильном фрагменте, что позволило определить наиболее перспективные образцы для последующих исследований. Рассчитанные значения ГЛБ созданной библиотеки структур варьировали в интервале от 4,26 до 16,74.

Полученные данные стали основой для разработки схем и синтеза соединений **5** (ГЛБ 5.78), **10** (ГЛБ 15.0), которые потенциально могут обладать антибактериальной активностью (ГЛБ 4–6) и использоваться в качестве транспортных систем в генной терапии (ГЛБ 14–16).

Диоктил-L-глутамат  $\text{Glu}(\text{C}_8)_2$  (**1**), полученный из L-глутаминовой кислоты и октилового спирта в присутствии *n*-толуолсульфокислоты, обрабатывали янтарным ангидридом в среде  $\text{Et}_3\text{N}$ . В результате был получен диоктил-L-глутамилсукцинат  $\text{Glu}(\text{C}_8)_2\text{Suc}$  (**2**) [7].

Для создания положительного заряда в структуре целевых амфифилов (**5**, **10**) было предложено использовать 1,3-пропандиамин (**3**) (схема 1) и аминоэтилэтанолламин (**8**) (схема 2). По схеме 1 соединение **3** первоначально обрабатывали дитрет-бутил-пирокарбонатом ( $\text{Woc}_2\text{O}$ ) в диоксане в качестве растворителя и с соотношением реагентов диамин- $\text{Woc}_2\text{O}$  1:0,13 в течение 6 ч. Это позволило получить моно-производное **4** с выходом 64%.

Конъюгацию полярной части и гидрофобного блока проводили по методу активированных эфиров с использованием N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) и N-гидроксисукцинимида

(HONSu) с последующим удалением Вос-защитных групп воздействием трифторуксусной кислоты в хлористом метиле. Структура полученного продукта **5** подтверждена данными ИК-,  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

По схеме 2 дигексадецил-L-глутамат  $\text{Glu}(\text{C}_{16})_2$  (**6**) обрабатывали шестикратным избытком 2-хлоруксусной кислоты в присутствии пиридина [8, 9]. Данная операция позволила получить разветвленную конструкцию амфифила **7** с выходом 58,9%. Реакцию получения Вос-производного аминоэтилэтанолламина (АЭЭА) (**8**) проводили в среде изопропанола при 40 °С и перемешивании в течение 8 ч. Выход продукта **9** составил 98,3%. Взаимодействие синтезированных соединений **7** и **9** осуществляли действием DCC и 4-диметиламинопиридина (DMAP) в качестве активирующего агента. После удаления защитных групп был получен двухантенный катионный амфирил **10** с выходом 31,2%. Структура всех промежуточных и конечных соединений была подтверждена данными  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии. В масс-спектре MALDI образца **10** присутствовал пик молекулярного иона.

Преимущество разработанных и реализованных схем синтеза катионных амфифилов на основе диэфиров L-глутаминовой аминокислоты и диаминов заключается в универсальности подхода, который можно применять при получении ряда производных и создавать различные комбинации продуктов в препаративных количествах, необходимых для проведения последующих биохимических исследований.

### Предварительный расчет ГЛБ катионных амфифилов

С помощью программы ACD/LogP нами проведена предварительная оценка значений ГЛБ для последующего определения зависимости структура – биологическая активность.

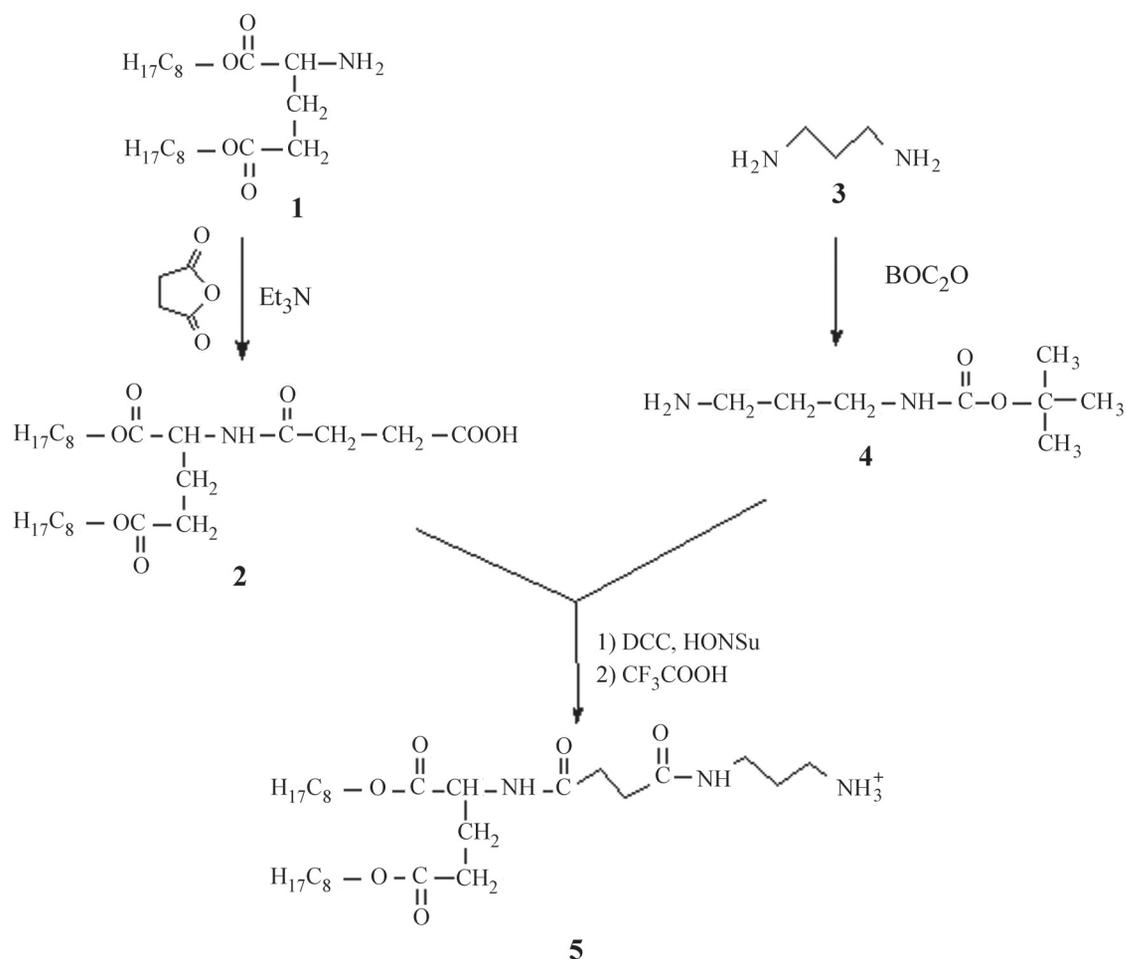
### Получение липосом

Для создания липосомальных агрегатов из синтезированных соединений **5** и **10** был применен классический метод гидратации тонкой пленки амфифилов с последующей обработкой на ультразвуковой бане [10].

### Определение размера частиц

К одной из основных характеристик липосом относится диаметр формируемых конструкций. Он определяет способность агрегатов проникать через поры кровеносных сосудов в экспериментах

Схема 1



*in vivo* и при этом не захватываться клетками иммунной системы [11]. Размер частиц был определен с помощью метода фотонно-корреляционной спектроскопии на приборе «BeckmanCoulter» фирмы «Delsa™ NanoCommon».

Средний размер полученных частиц составил 76 нм для соединения **5** и 101 нм для продукта **10** (рис. 1). В соответствии с литературными данными [12], полученные результаты потенциально перспективны для соединения **5** в исследованиях на антибактериальную активность, а для конъюгата **10** – при использовании в качестве трансфецирующего агента.

#### Определение стабильности частиц

Стабильность липосомальных дисперсий, сформированных на основе соединений **5** и **10**, фиксировали по изменению показателя оптической плотности водной дисперсии. Для всех соединений он оставался постоянным на протяжении месяца. Общая погрешность составляла не более 2,7%, что укладывается в требуемые параметры и позволяет считать их удобными для практического использования.

#### Биохимические исследования

Предварительная оценка антибактериальных свойств липосомальных дисперсий на основе соединения **5** была проведена на клетках штамма *E. coli* JS5 при разной концентрации (от 0,05 до 1,5 мг/мл) с шагом 0,05–0,3. Полученные результаты (рис. 2), демонстрирующие снижение роста клеток при действии образца **5**, наблюдались при концентрации от 1 мг/мл. Способность водной дисперсии бивалентного конъюгата **10** доставлять генетический материал в клетки линии НЕК 293Т оказалась на уровне ранее синтезированного и исследованного в нашей лаборатории липотрипептида OrnOrnGlu(C<sub>16</sub>)<sub>2</sub> [13]. Исследования проведены в Отделе молекулярной иммунологии Государственного научного центра «Институт иммунологии» под руководством канд. биол. наук О.О. Колосковой.

#### Экспериментальная часть

Для компьютерного расчета ГЛБ использовали программное обеспечение ACD LogP. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР снимали в дейтерированном хлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре



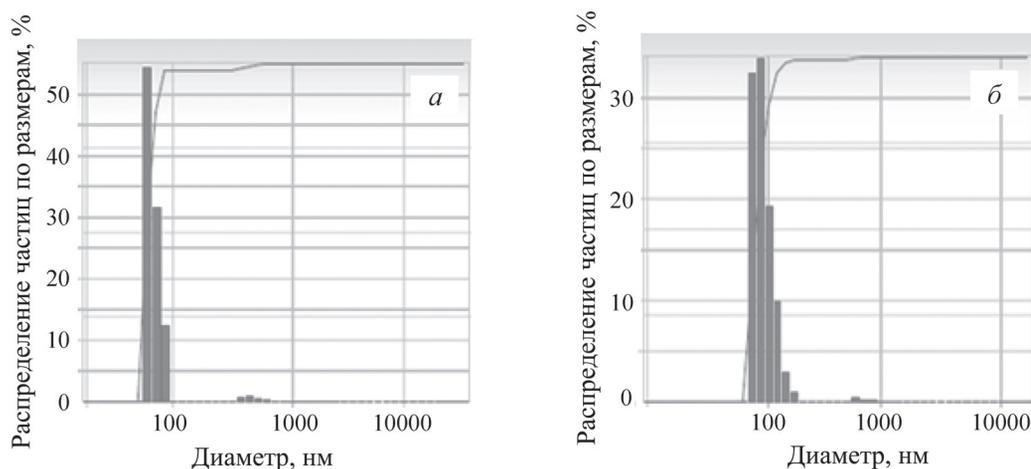


Рис. 1. Средний размер частиц для водных дисперсий соединений: а – N-(диоктил-L-глутамилсукцинил)-1,3-пропандиамин (5); б – дигексадецил-L-глутамил-N,N-ди(карбоксиметил)-O,O'-ди(аминоэтил)этаноламин (10)

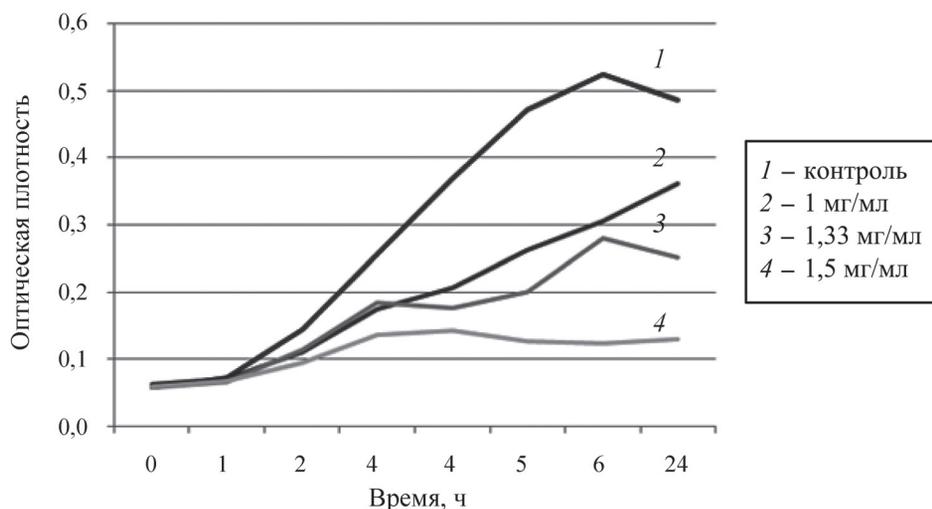


Рис. 2. Действие на клетки *E. coli* JS5 агрегата на основе соединения 5 при разной концентрации. Исследования проводились в Группе кросс-сшивающих ферментов ИБХ РАН им. Шемякина М.М. и Овчинникова Ю.А. под руководством канд. хим. наук Н.Б. Пестова

**N-(диоктил-L-глутамилсукцинил)-1,3-пропандиамин (5).** К охлажденному до 0 °С раствору 0,60 г (1,30 ммоль) диоктил-L-глутамилсукцината (2) и 0,18 г (1,56 ммоль) N-гидроксисукцинимид в 10 мл безводного хлористого метилена при перемешивании добавляли раствор 0,32 г (1,56 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида. Смесь выдерживали 30 мин при охлаждении, затем 2 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, а к фильтрату добавляли 0,12 г (1,56 ммоль) 1-N-трет-бутоксикарбонил-1,3-пропандиамина (4) и выдерживали смесь при интенсивном перемешивании 24 ч. Контроль за

реакцией осуществляли по данным ТСХ. Продукт реакции очищали колоночной хроматографией в системе толуол – этилацетат (1:5). Далее 0,35 г полученного соединения растворяли в 5 мл безводного хлористого метилена и добавляли при перемешивании раствор 1 мл трифторуксусной кислоты в 5 мл безводного хлористого метилена. Смесь выдерживали 3 ч, растворитель упаривали в вакууме. Выход продукта 5 составил 0,14 г (47,8%). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 0.88 (м, 6H, CH<sub>3</sub>); 1.10 (м, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1.31 (с, 20H, CH<sub>2</sub>); 1.62 (м, 4H, β-CH<sub>2</sub>); 1.93 (м, 2H, β-CH<sub>2</sub> (Glu)); 2.44 (т, 2H, δ-CH<sub>2</sub> (Glu)); 2.75 (м, 4H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 2.82 (м, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 3.40-3.65 (м, 2H,

$\text{CH}_2\text{NH}_3$ ); 4.24 (м, 4Н,  $\text{COOCH}_2$ ); 4.35 (т, 1Н,  $\alpha\text{-CH}_2$  (Glu)). Масс-спектр,  $m/z$ : 549.68 ( $M^+ + \text{Na}^+$ ).

**Дигексадецил-L-глутамил-N,N-ди(карбокси-метан) (7).** К раствору 0,33 г (3,43 ммоль) монохлоруксусной кислоты в 5 мл ТГФ и 0,30 мл пиридина при перемешивании и температуре 56 °С прибавляли раствор 1 г (1,68 ммоль) дигексадецилового эфира L-глутаминовой кислоты (6) в 2 мл ТГФ и продолжали перемешивание еще 1 ч. Далее приливали раствор 0,65 г (6,86 ммоль) монохлоруксусной кислоты в 10 мл ТГФ и 0,60 мл пиридина, поддерживая слабощелочную среду. За ходом реакции следили по данным ТСХ. По окончании реакцию массу подкисляли 0,1 N HCl, выпавший осадок перекристаллизовывали из воды, получали 0,73 г (61%) продукта 7.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 0.88 (т, 6Н,  $\text{CH}_3$ ); 1.32 (с, 52Н,  $\text{CH}_2$ ); 1.7 (м, 4Н,  $\beta\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$ ); 2.12 (с, 4Н,  $\text{NCH}_2\text{COOH}$ ); 2.38 (м, 2Н,  $\beta\text{-CH}_2$ ); 2.65 (т, 2Н,  $\delta\text{-CH}_2$ ); 3.62 (т, 1Н, CH); 4.09 (т, 2Н,  $\alpha\text{-CH}_2\text{OCO}$ ); 4.22 (т, 2Н,  $\alpha\text{-CH}_2\text{OCO}$ ). ИК-спектр ( $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3365 (COOH), 2916 (CH), 2848 ( $\text{OH}_{\text{карб}}$ ), 1742 (C=O), 1510, 1466, 1219 (C–O), 1214 (C–N), 1177 (CH).

**N,N'-ди-трет-бутоксикарбониламиноэтилэтаноламин (9).** К раствору 2 г (19,2 ммоль) аминоэтилэтанолamina (8) в 5 мл изопропанола и 5,3 г (38,5 ммоль) карбоната калия в 10 мл дистиллированной воды прикапывали раствор 10,5 г (48,1 ммоль) ди-трет-бутилпирокарбоната в 30 мл изопропанола. Реакционную смесь перемешивали при 40 °С в течение 8 ч с поддержанием pH 10. Далее массу упаривали досуха, разбавляли водой, экстрагировали хлороформом. Выход продукта 9 в виде масла составил 5,7 г (98,3%).  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 1.43 (с, 9Н,  $\text{CH}_3$ ); 1.46 (с, 9Н,  $\text{CH}_3$ ); 3.35 (м, 6Н,  $\text{CH}_2$ ); 3.51 (м, 2Н,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ). ИК-спектр ( $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3345 (OH), 2973, 2927 (CH), 1670 (C=O), 1514 (N–H), 1476, 1408 (OH), 1364 (C( $\text{CH}_3$ )), 1243 (N–COO), 1158 (C–O), 1049 (CH–OH), 753 ( $\text{CH}_2$ ).

**Дигексадецил-L-глутамил-N,N-ди(карбоксиметил)-O,O'-ди(аминоэтилэтаноламин) (10).** Аналогично получению соединения 6 из 0,50 г (0,70 ммоль) дигексадецил-L-глутамил-N,N-ди(карбоксиметана) (7) и 0,85 г (2,81 ммоль) N,N'-ди-трет-бутоксикарбонил-аминоэтилэтанол-амин (9) получали двухвалентный амфифил 10. Выход продукта составил 0,17 г (31,2%).  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 0.67

(т, 6Н,  $\text{CH}_3$ ); 1.23 (с, 52Н,  $\text{CH}_2$ ); 1.55 (м, 4Н,  $\beta\text{-CH}_2$ ); 1.66 (с, 4Н,  $\text{NCH}_2\text{COOH}$ ); 1.87 (м, 2Н,  $\beta\text{-CH}_2$  (Glu)); 2.18 (м, 2Н,  $\delta\text{-CH}_2$ ); 2.45 (т, 1Н, CH); 3.34 (м, 2Н,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ); 3.67 (м, 2Н,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ); 3.99 (т, 4Н,  $\alpha\text{-CH}_2\text{OCO}$ ); 4.20 (м, 2Н,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ); 4.32 (т, 2Н,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ); 5.0 (с, 1Н, NH). Масс-спектр,  $m/z$  883.73 ( $M^+$ ).

**Диаметр липосом** изучали с помощью фотонно-корреляционной спектроскопии на приборе «Beckman Coulter» (фирма «Delsa™ Nano Common»).

**Стабильность** полученных частиц подтвердили измерением оптической плотности дисперсии во времени на спектрофотометре «Jasco-7800» при длине волны 400–475 нм (допустимая погрешность 3%). В качестве эталона использовали дистиллированную воду.

**Получение липосом.** Исследуемые соединения 5 и 10 отбирали в количестве, необходимом для создания концентрации 2 мг/мл и растворяли в минимальном количестве хлороформа (0,5–1,5 мл). Растворитель отгоняли в вакууме до образования тонкой пленки, которую затем высушивали в вакууме в течение 3 ч, добавляли необходимое количество дистиллированной воды и оставляли пленку на 1,5 ч. Затем в течение 1 ч проводили ультразвуковую обработку полученной дисперсии при нагревании до 50 °С.

**Изучение трансфекции.** Накануне трансфекции клетки высаживали в планшет в количестве  $7 \cdot 10^5$  клеток на лунку в 300 мкл полной питательной среды DMEM и инкубировали сутки при 37 °С в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе до достижения 75% конfluenceности. Дисперсию трансфекционного агента в четырех концентрациях общим объемом 80 мкл, состоящего из 0,2 мкг плазмиды (pGFP или pGL3) и липосомальной дисперсии соответствующей концентрации, готовили в бессывороточной среде OPTIMEM. В качестве положительного контроля использовали коммерческий трансфекционный агент Lipofectamine 2000. В качестве отрицательного контроля использовали голую плазмиду. Смеси выдерживали 20 мин при комнатной температуре и вносили в лунки с монослоем клеток. Клетки инкубировали при 37 °С в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение суток, а затем определяли люциферазную активность методом люциферазного теста или определяли число трансфицированных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-01141).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Akhtar N., Khan R.A. // Prog. Lipid Res. 2016. Vol. 64. P. 192.
2. Routon C.W. // Eur. J. Pharm. Sci. 2000. Vol. 11. N 2. P. 93.
3. Trivedi R., Kompella U.B. // Nanomedicine (Lond). 2010. Vol. 5. N 3. P. 485.
4. Барышников А.Ю. // Вестн. РАМН. 2012. № 3. С. 23.
5. Bulbake U. et al. // Pharmaceutics. 2017. Vol. 9. N 2. P. 1.
6. Szymanowski J., Hiron C.G. // Chem. Tech. Biotechnol. 1984. P. 218.
7. Работкина М.А., Себякин Ю.Л. // Биофармацевтический журнал. 2011. Т. 34. № 3. С. 21.
8. Zhen M., Peng Y. // Org. Biomol. Chem. 2016. Vol. 14. N 13. P. 3443.
9. Ластовский Р.П., Колпакова И.Д., Иванова Н.И. // Методы получения химических реактивов и препаратов. 1962. С. 60.
10. Patel H.M. // FEBS Lett. 1990. Vol. 275. N 1–2. P. 242.
11. Gabizon A.A., Torchilin V.P. Nanoparticulates as drug carriers. L., 2006. P. 437.
12. Oliver M. et al. // Environ. Sci. Technol. 2016. Vol. 50. N 13. P. 7135.
13. Koloskova O.O. et al. // Mendeleev Commun. 2014. Vol. 24. P. 262.

Поступила в редакцию 23.11.17

## MULTIFUNCTIONALITY DERIVED LIPOAMINO ACIDS WITH POTENTIAL BIOLOGICAL ACTIVITY

V.V. Marusova (Soloveva), R.I. Zagitova, U.A. Budanova, Yu.L. Sebyakin

(Moscow Technology University (Fine Chemical Technology Institute); e-mail: c-221@yandex.ru)

**The aim of this work is study and obtainment of a number of multifunctional derivatives of lipoamino acids, which potentially have different biological activity. To find the most perspective molecules the theoretical calculation of hydrophilic-lipophilic balance of a series of structures of cationic amphiphiles based on L-glutamic acid and short diamines was carried out. Designed the schemes and the synthesis allowed to produce preparative quantities of samples for further physico-chemical and biological tests. Liposomal dispersions of the synthesized compounds was investigated and it was concluded that it is possible to create a series of similar structures of amphiphilic nature on the basis of aliphatic amino acids and derivatives of diamines which can be used in antibacterial therapy and as delivery vehicles for genetic material.**

**Key words:** lipoamino acids, diamines, aliphatic derived L-glutamic acid, cationic liposomes, hydrophilic-lipophilic balance, cationic amphiphiles.

**Сведения об авторах:** Марусова (Соловьева) Варвара Владимировна – магистр кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского Московского технологического университета (c-221@yandex.ru); Загитова Рената Ильясовна – бакалавр кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского Московского технологического университета (c-221@yandex.ru); Буданова Ульяна Александровна – ассистент кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского Московского технологического университета (c-221@yandex.ru); Себякин Юрий Львович – профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского Московского технологического университета, докт. хим. наук (c-221@yandex.ru).