

УДК 547.415.1

СИНТЕЗ НОВЫХ ГУАНИДИНИЛИРОВАННЫХ АМФИФИЛОВ И ИХ АНАЛОГА, СОДЕРЖАЩЕГО ПИРЕН, ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКЕ-МИШЕНИ

© 2019 г. А. А. Лосева, У. А. Буданова*, Ю. Л. Себякин

ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»,
119454, Россия, г. Москва, пр. Вернадского 78
*e-mail: c-221@yandex.ru

Поступила в редакцию 22 апреля 2019 г.
После доработки 17 сентября 2019 г.
Принята к публикации 20 сентября 2019 г.

Синтезированы новые катионные амфифилы с гуанидиновой головной группой на основе липоаминокислот с целью создания систем доставки лекарственных препаратов и генетического материала, а также их аналога, содержащего пирен, для визуализации транспорта формируемых липосом в различных типах клеток.

Ключевые слова: катионные амфифилы; гуанидины; диамины; пирен; транспортные системы БАВ.

DOI: 10.1134/S0514749219120036

В качестве систем доставки лекарственных средств и генетического материала широко используются катионные биосовместимые невирусные векторы, среди которых катионные липосомы являются одними из самых безопасных [1]. Эффективность трансфекции и токсичность катионных липидов, в основном, зависят от их структуры. Мультивалентные катионные амфифилы обладают более высоким поверхностным зарядом липосом и демонстрируют более высокую эффективность переноса генетического материала в ядро клетки по сравнению с однозарядными аналогами [2]. Использование природных полиаминов, таких как спермидин и спермин, позволяет частицам взаимодействовать с фосфатными группами ДНК и образовывать прочные комплексы с переносимым материалом [3]. Также активно изучаются катионные пептидные векторы [4], которые выгодно отличаются от других невирусных систем тем, что при низкой токсичности способны плотно упаковывать и защищать генетический материал, узнавать целевые специфические рецепторы клеточной поверхности и доставлять конструкции в клетку [5–8].

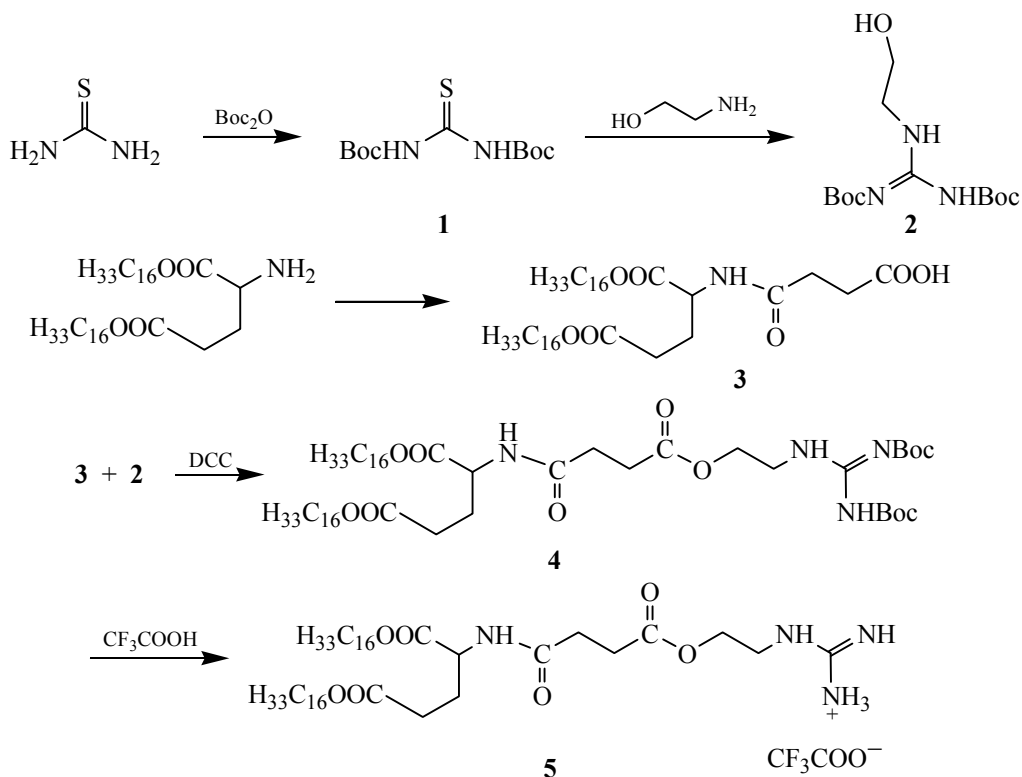
Описаны свойства гуанидинилированных катионных амфифилов с алифатическими углеводород-

ными фрагментами [9]. Учитывая способность группы гуанидиния к связыванию биологических противоионов и их вовлечение в перенос через плазматические мембраны, разработка гуанидиний-содержащих систем доставки биологически активных соединений (БАС) в клетки является перспективной задачей [10].

Для визуализации процесса использования переносчиков на основе катионов гуанидиния целесообразно применение флуорофоров, например, производных пиренов. Показано, что липосомы, сформированные из амфифилов, содержащих производные пиренметанола в качестве гидрофобного фрагмента и остатки моно-, ди- и полиаминов в качестве головных групп, показали высокую способность ингибирования пролиферации опухолевых клеток с одновременной возможностью визуализации проникновения агрегатов в клетку-мишень [11].

Таким образом, поиск средств доставки БАС в ряду синтетических катионных амфифилов, в которых в качестве головной полярной группы используются гуанидин и его производные, а также их флуоресцентных аналогов важен для детального понимания процессов их биораспределения и

Схема 1.



внутриклеточной локализации, а также создания наиболее эффективных транспортных систем.

Целью данной работы является синтез новых катионных амфифилов **5**, **11** с гуанидиновой полярной головной группой, а также пиренового производного гуанидинилированного трипептида (OrnGlyGly) **19** для последующего изучения процессов внутриклеточной локализации и определения функциональной активности в клетке-мишени полярных головных групп.

Синтез целевого соединения **5** осуществлен по схеме 1.

Схема включает получение соединения **2** по реакции присоединения Boc-защищенной тиомочевины **1** [12] к этаноламину в присутствии хлорида ртути в качестве катализатора [13]. Для получения гуанидинилированного амфифила **4** использовали реакцию образования сложноэфирной связи между гидроксильной группой производного **2** и карбоксильной группой гидрофобного блока, представляющего собой дигексадециловый эфир L-глутаминовой кислоты **3**, модифицированный остатком янтарной кислоты [14].

Реакцию проводили в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC) и *N*-гидрохлоридэтил

мида (NHS) в качестве активаторов карбоксильной группы. Последующее удаление защитной группировки действием трифтороуксусной кислоты привело к получению целевого продукта **5** с выходом 60%. Структура данного соединения подтверждена данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

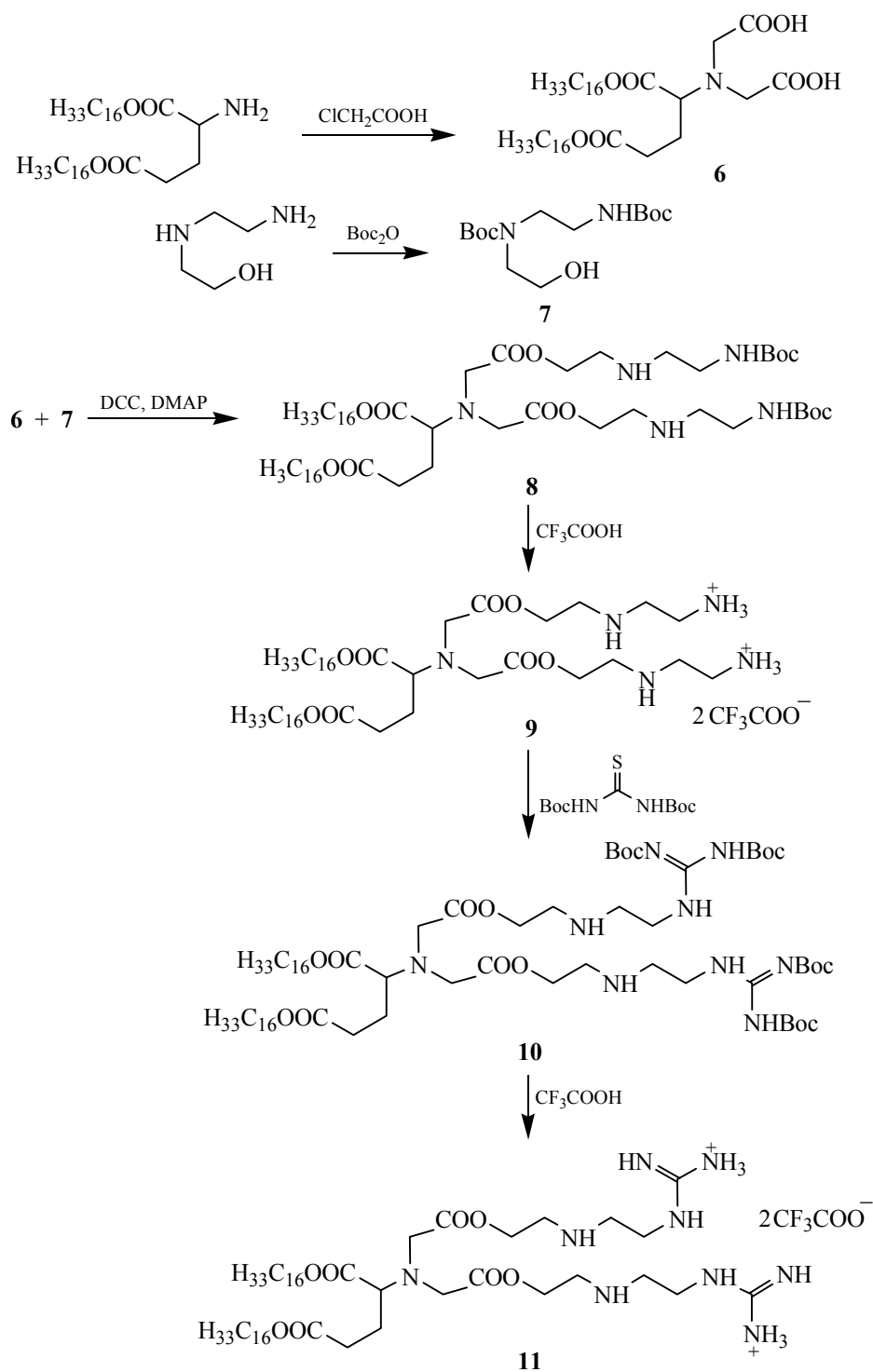
Синтез амфифила **11** осуществлен по схеме 2.

Разработанная схема включает получение гидрофобного блока в виде диэфира L-глутаминовой кислоты, разветвление на 2 свободные карбоксильные группы по реакции с монохлоруксусной кислотой, реакцию с ди-Boc-аминоэтилэтанолламином **7** [15] и заключительное гуанидирование аминов действием ди-Boc-тиомочевины **1**. В масс-спектре MALDI целевого соединения **11** присутствовал пик молекулярного иона $[M]^+$ 969.794. Данное соединение отличается повышенным количеством протонированных групп благодаря разветвлению в головной части и производному этилендиамину в его составе.

Для синтеза пиренового флуорофора **19** применяли блочный метод (схема 3).

Блок, представляющий собой гуанидинилированное производное L-Orn **14**, получали действием ди-Boc-тиомочевины **1** на гидрохлорид этилового

Схема 2.

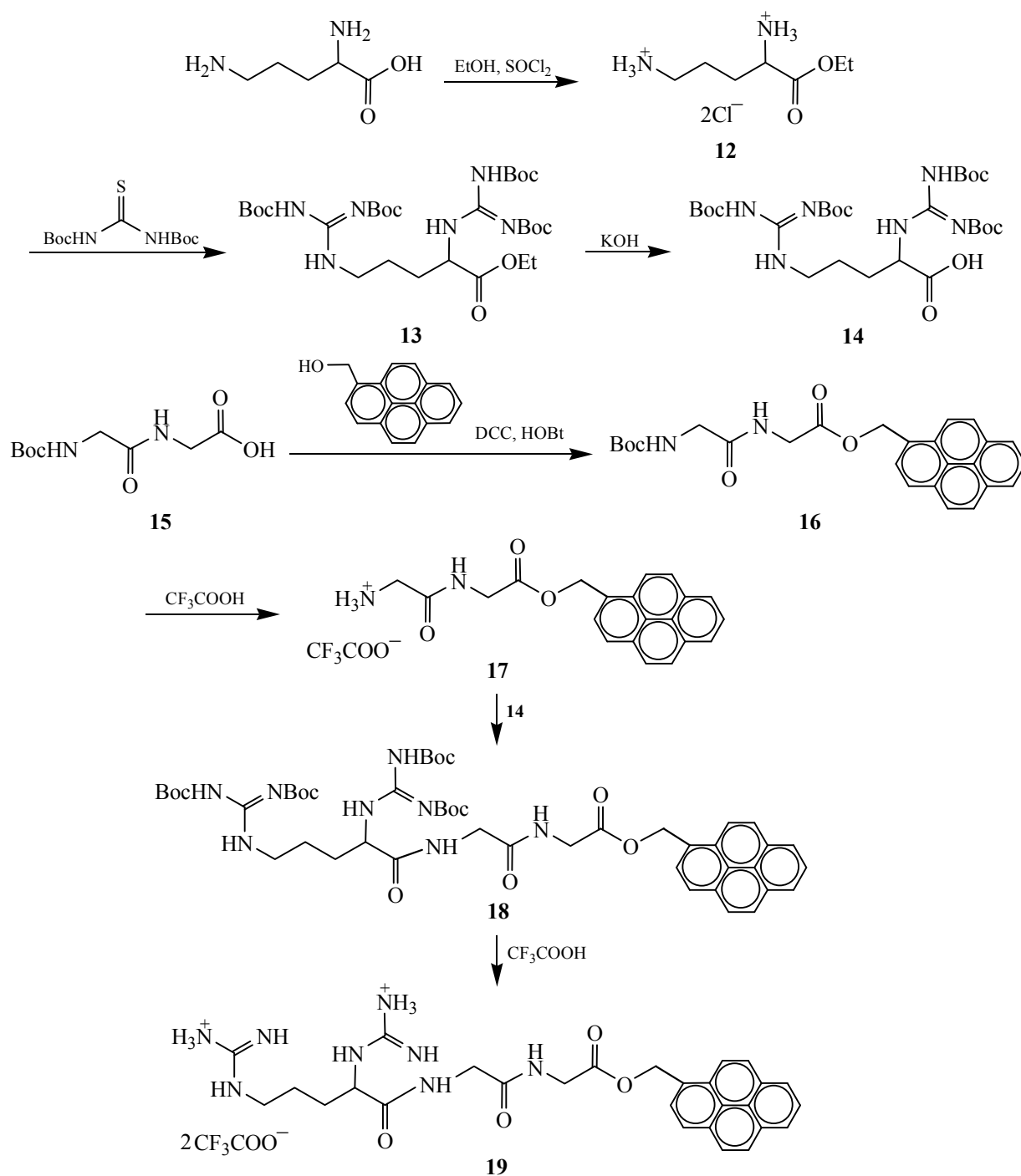


эфира L-орнитина (**12**) с последующим омылением эфирной группы в щелочных условиях.

В ИК спектре промежуточного соединения **14** наблюдались характерные полосы поглощения связей свободной карбоксильной группы.

Промежуточный блок **17** получали присоединением к коммерчески доступному Boc-Gly-Gly **15** пиренметанола в присутствии DCC и 1-гидоксибензотиазола (HOBT). В спектре ЯМР ^1H соединения **17** не наблюдались характерные сигналы протонов *трет*-бутилоксикарбонильной группы, при-

Схема 3.



существовали сигналы протонов CH_2 групп Gly-Gly [3.45 м.д., с (2H) и 3.90 м.д., с (2H)], а также остатка пирена (7.75–8.50 м.д., Pyr).

Конъюгат **19** получали по реакции образования амидной связи между производными **14** и **17** в присутствии DCC, NHS и диметиламинопиридина (DMAP) с последующим удалением защитных групп действием трифторуксусной кислоты. Структуры

полученных промежуточных соединений и целевого продукта подтверждали данными ЯМР-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. В масс-спектре MALDI присутствовал пик молекулярного иона $[M]^+$ 546.285.

Таким образом, предложена схема, по которой осуществлен синтез новых катионных амфифилов с гуанидиновой группировкой на основе липоами-

нокислот и диаминов, а также их пиренового аналога. Предполагается их использование в качестве систем доставки лекарственных веществ и генетического материала в клетки, а также для визуализации процесса внутриклеточной локализации формируемых на их основе катионных липосом и соответствующих липоплексов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты использовались без предварительной очистки: L-орнитин (L-Ala) (Acros Organics), 2-хлоруксусная кислота (L-Lys) (Sigma Aldrich), L-аспарагиновая кислота (L-Asp) (Sigma Aldrich), тиомочевина (Sigma Aldrich), этаноламин (Acros Organics), ди-*трет*-бутилдикарбонат (Boc_2O) (Sigma Aldrich), дициклогексилкарбодиимид (DCC) (Sigma Aldrich), трифторуксусная кислота (TFA) (Biochem).

Спектры ЯМР ^1H регистрировали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре «Bruker WM-400» (Германия) с рабочей частотой 400 МГц. Внутренний стандарт – гексаметилдисулfoxан. ИК спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре, модель EQUINOX 55, фирма «Bruker», Германия. Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 методом MALDI с использованием в качестве матрицы дигидроксibenзола (DHB). Элементный анализ выполняли на CHNS-элементном анализаторе Thermo Finnigan. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Сорбфил (Краснодар) в системах растворителей: (А) хлороформ–метанол, 9:1; (Б) хлороформ–метанол, 20:1; (В) толуол–этилацетат, 5:1; (Г) толуол–хлороформ–метилэтилкетон–изопропанол, 10:6:3:1. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле Acros 0.060–0.200 мм, 60 А (Бельгия). Обнаружение пятен веществ при ТСХ осуществляли нагреванием над пламенем спиртовки. Вещества, содержащие кратные углерод–углеродные связи, обнаруживали 10%-ным раствором перманганата калия. Вещества, содержащие свободные аминогруппы, обнаруживали 5%-ным раствором ninгидрина с последующим нагреванием до 50–80°C.

(*N,N'*-Ди-*трет*-бутилоксикарбонилгуанидино)этанол (2). К раствору 0.11 г (1.81 ммоль) этаноламина в ТГФ добавляли 0.50 г (1.81 ммоль) ди-*Вос*-тиомочевины 1. Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 10 ч. Очистку продукта проводили перекристаллизацией из метанола. Выход 0.05 г (86%), R_f 0.90 (Г).

Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 1.42 с (18H, CH_3), 3.54–3.62 м (2H, CH_2), 3.78 т (2H, CH_2), 4.36 т (1H, OH), 5.40–5.48 м (1H, CH), 8.70 д (1H, NH), 11.41 д (1H, NH).

***O*-(Гуанидиноэтанол)сукцинат дигексадецилового эфира L-глутаминовой кислоты (5).** К 0.07 г (0.10 ммоль) сукцината дигексадецилового эфира L-глутаминовой кислоты (3) [14] в CH_2Cl_2 добавляли 30 мг (0.15 ммоль) DCC и 16 мг (0.11 ммоль) NHS. Смесь перемешивали 1 ч при 0°C, выпавший осадок отфильтровывали и к реакционной массе прибавляли 0.03 г (0.20 ммоль) соединения 2, после чего перемешивали в течение 1 сут при комнатной температуре. Выделение продукта проводили препаративной хроматографией на силикагеле в системе (В). Защитные группы удаляли трифторуксусной кислотой в CH_2Cl_2 в течение 3 ч. Кислоту отгоняли под вакуумом. Выход 14.00 мг (60%) аморфного продукта, R_f 0.20 (Б). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 0.90 т (6H, CH_3); 1.30 с [52H, 2(CH_2)₁₃], 1.54–1.70 м (4H, β - CH_2), 1.98–2.40 м [2H, βCH_2 (Glu)], 2.50 т [2H, δ - CH_2 (Glu)], 2.55–2.65 м [4H, CH_2 (Suc)], 2.80 т (2H, NHCH_2CH_2), 3.44–3.56 м (4H, COOCH_2), 3.92–4.18 м (4H, α - CH_2), 4.48–4.52 м [1H, α -CH (Glu)], 6.44 с (3H, NH). Найдено, %: С 67.58; Н 10.79; N 7.21. $\text{C}_{44}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_7$. Вычислено, %: С 67.65; Н 10.84; N 7.17.

***O,O'*-Ди(аминоэтилэтаноламино)-*N,N'*-(ди-карбоксиметил)дигексадециловый эфир L-глутаминовой кислоты (9).** К 0.50 г (0.70 ммоль) *N,N*-дикарбоксиметильного производного дигексадецилового эфира L-глутаминовой кислоты 6 в CH_2Cl_2 добавляли 0.18 г (0.90 ммоль) DCC и 12 мг (0.10 ммоль) DMAP. Смесь перемешивали 1 ч при 0°C, выпавший осадок отфильтровывали и прибавляли 0.85 г (2.81 ммоль) *N,N*-ди-*трет*-бутоксикарбониламиноэтилэтанолamina (7), после чего перемешивали в течение 1 сут при комнатной температуре. Продукт выделяли колоночной хроматографией, защитные группы удаляли трифторуксусной кислотой в CH_2Cl_2 в течение 3 ч. Растворители удаляли в вакууме. Выход 0.15 г (31%), R_f 0.15 (В). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 0.81 т (6H, CH_3), 1.21 с [52H, 2(CH_2)₁₃], 1.47–1.64 м (4H, β - CH_2), 1.68 с (4H, NCH_2CO), 1.79–2.01 м (2H, CH_2 β -Glu), 1.96 т (4H, NH_2), 2.03–2.40 м (2H, δ - CH_2 Glu), 2.46 т (1H, CH Glu), 3.20–3.44 м (2H, α - CH_2), 3.56–3.74 м (4H, CH_2NH), 4.02 т (4H, CH_2OCO), 4.20–4.30 м (8H, $\text{NHCH}_2\cdot\text{CH}_2\text{NH}_2$), 4.31 т (4H, CH_2NH), 4.84–5.36 м (2H, NH).

O,O'-Ди(гуанидиноэтилэтаноламино)-N,N'-дикарбоксиметилдигексадециловый эфир L-глутаминовой кислоты (11). К 0.10 г (0.11 ммоль) соединения **9** в ТГФ добавляли 0.063 г (0.22 ммоль) ди-Вос-тиомочевины **1** и 0.074 г (0.27 ммоль) HgCl₂ с добавлением триэтиламина в каталитических количествах. Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 10 ч. Продукт реакции выделяли перекристаллизацией из метанола. Защитные группы удаляли трифторуксусной кислотой в CH₂Cl₂ в течение 3 ч. Выход 0.14 г (56%) аморфного продукта, *R_f* 0.70 (A). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 969.784 [*M*]⁺. Найдено, %: С 63.19; Н 10.79; N 12.87. С₄₄H₈₄N₄O₇. Вычислено, %: С 63.12; Н 10.70; N 12.99. *M* 969.793.

N,N'-бис-(Ди-трет-бутоксикарбонилгуанидино)-L-орнитин (14). К раствору 0.3 г (1.78 ммоль) этилового эфира L-орнитина **12** в 3 мл ДМФА при комнатной температуре добавляли раствор 1.00 г (3.60 ммоль) ди-Вос-тиомочевины **1** в 3 мл ДМФА. Растворитель отгоняли под вакуумом. Продукт **13** выделяли колоночной хроматографией в системе (Г). К выделенному промежуточному соединению в 20 мл метанола при комнатной температуре добавляли КОН до pH 12. Реакционную массу перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Добавляли смолу КУ-9 (H⁺) и перемешивали еще 3 ч. Смолу удаляли фильтрованием с получением 0.210 г продукта **14** (78%), *R_f* 0.25 (A). ИК спектр (в пленке), *v*_{max}, см⁻¹: 3353 (ОН), 3103 (NH), 2929 (CH₃), 1740 (C=O), 1251 (C–O–C), 1171 (C–N). Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1.50 с [36H, 4OC(CH₃)₃], 1.62–1.90 м (4H, β,γ-CH₂), 3.26–3.56 м (2H, δ-CH₂), 3.80 с (1H, CH), 7.80 к (2H, NH).

Глицил-глициновый эфир пиренметанола (17). К 0.15 г (0.60 ммоль) Вос-глицил-глицина **15** в безводном хлористом метиле добавляли 0.23 г (1.14 ммоль) DCC и 0.135 г (1.14 ммоль) 1-гидроксibenзориазола (HOBT) в ДМФА. Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч, затем отфильтровывали от выпавшего осадка дициклогексилмочевины. К фильтрату прибавляли 0.14 г (0.60 ммоль) пиренметанола и перемешивали при комнатной температуре 24 ч. Очистку проводили колоночной хроматографией в системе (Г). К полученному промежуточному соединению **16** в 50 мл CHCl₃ при перемешивании добавляли по каплям 0.20 г (1.68 ммоль) 50%-ной трифторуксусной кислоты в CHCl₃. Смесь выдерживали 1 ч на магнитной мешалке до образования белого осадка. Растворитель и кислоту удаляли в вакууме. Выход 0.13 г (48%), *R_f*

0.50 (A). Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 3.45 с (2H, CH₂), 3.90 с (2H, CH₂), 4.91 с (2H, CH₂O), 5.22–5.58 м (2H, NH₂), 7.75–8.50 м (9H, Pyr).

(Бис-гуанидино)-L-орнитил-глицил-глициновый эфир пиренметанола (19). К 0.21 г (0.34 ммоль) соединения **14** в ТГФ добавляли 0.14 г (0.68 ммоль) DCC, 78 мг (0.68 ммоль) NHS и 83 мг (0.68 ммоль) диметиламинопиридина. Смесь перемешивали 24 ч при температуре 0°C, затем отфильтровывали от осадка дициклогексилмочевины. К фильтрату прибавляли 0.13 г (0.34 ммоль) соединения **17** в 100 мл ТГФ и перемешивали 48 ч при 25°C. Выделение промежуточного продукта **18** проводили колоночной хроматографией в системе (Г). К полученному соединению в 50 мл CHCl₃ при перемешивании добавляли по каплям 0.20 г (1.68 ммоль) 30%-ной трифторуксусной кислоты в CHCl₃. Смесь перемешивали 1 ч на магнитной мешалке до образования белого осадка. Растворитель удаляли в вакууме. Выход белого порошкообразного осадка 0.05 г (55%), *R_f* 0.51 (A). Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д.: 1.70–2.00 м (4H, CH₂ β,γ-Orn), 3.37–3.43 м (2H, CH₂δ-Orn), 3.42–3.48 м (2H, CH₂), 3.50–3.70 м (2H, CH₂), 4.30 с (1H, CH), 5.48 с (2H, CH₂O), 7.75–8.50 м (9H, Pyr). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 546.285 [*M*]⁺. Найдено, %: С 61.59; Н 6.31; N 20.77. С₂₈H₃₄N₈O₄. Вычислено, %: С 61.52; Н 6.27; N 20.50. *M* 546.270.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ozpolat B., Sood A.K., Lopez-Berestein G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 110. doi 10.1016/j.addr.2013.12.008.
2. Martin B., Sinlos M., Aissaoui A., Oudrhiri N., Hauchecorne M., Vigneron J.-P., Lehn J.-M., Lehn P. *Cur. Pharm. Design.* **2005**, *11*, 375. doi 10.2174/1381612053382133
3. Leal C., Ewert K., Shirazi S., Bouxsein N., Safinya C. *Langmuir.* **2011**, *27*, 7691. doi 10.1021/la200679x
4. Hoyer J., Neundorff I. *Accounts Chem. Res.* **2012**, *45*, 1048. doi 10.1021/ar2002304

- Martin M, Rice K. *AAPS J.* **2007**, *9*, E18. doi 10.1208/aapsj0901003
- Koloskova O.O., Gileva A.M., Drozdova M.G., Grechihina M.V., Suzinae N.E., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L., Kudlay D.A., Shilovskiy I.P., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I., Markvicheva E.A., Khaitov M.R. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2018**, *167*, 328. doi 10.1016/j.colsurfb.2018.04.003
- Koloskova O.O., Nikonova A.A., Budanova U.A., Shilovskiy I.P., Kofiadi I.A., Ivanov A.V., Smirnova O.A., Zverev V.V., Sebyakin Yu.L., Andreev S.M., Khaitov M.R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *102*, 159. doi 10.1016/j.ejpb.2016.03.014
- Zhang X.-X., La Manna C.M., Kohman R.E., McIntosh T.J., Han X., Grinstaff M.W. *Soft Matter.* **2013**, *9*, 4472. doi 10.1039/C3SM27633C
- Sen J., Chaudhuri A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 812. doi 10.1021/jm049417w
- Wexselblatt E., Esko J., Tor Y. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6766. doi 10.1021/jo501101s
- Sheng R., An F., Wang Z., Li M. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 12338. doi 10.1039/C4RA06879C
- Exposito A., Fernandez-Suarez M., Iglesias T., Munoz L., Riguera R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4206. doi 10.1021/jo010076t
- Katritzky R., Rogovoy V. *Arkivoc.* **2005**, *49*. doi 10.3998/ark.550190.0006.406
- Колоскова О.О., Бородин Ю.Г., Буданова У.А., Себякин Ю.Л. *Биофарм. ж.* **2010**, *2*, 16. [Koloskova O.O., Borodin Yu.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. *Russ. J. Biopharm.* **2010**, *2*, 16.]
- Марусова (Соловьева) В.В., Загитова Р.И., Буданова У.А., Себякин Ю.Л. *Вестн. МГУ. Сер. 2. хим.* **2018**, *59*, 157. [Marusova (Soloveva) V.V., Zagitova, R.I., Budanova, U.A., Sebyakin, Y.L. *Moscow Univ. Chem. Bull.* **2018**, *73*, 74.] doi 10.3103/S0027131418020098

Synthesis of New Guanidinylated Amphiphiles and Their Analog, Containing Pyrene for Liposomal Delivery Systems and Their Visualizing in Target Cell

A. A. Loseva, U. A. Budanova*, and Yu. L. Sebyakin

MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies),
119454, Russia, Moscow, pr. Vernadskogo 78

*e-mail: c-221@yandex.ru

Received April 22, 2019; revised September 17, 2019; accepted September 20, 2019

New cationic amphiphiles with a guanidine head group on the basis of lipoamino acids for drug and gene delivery systems, as well as their pyrene derivative for visualization transport liposomes in a cells have been synthesized.

Keywords: cationic amphiphiles, guanidines, diamines, pyrene, liposomes delivery systems