

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 547.426.2'268.17:577.164.17

СИНТЕЗ ФОЛАТСОДЕРЖАЩИХ ЛИПОКОНЬЮГАТОВ
С ГИДРОФОБНЫМИ СПЕЙСЕРНЫМИ ГРУППАМИ

Шмендель Е.В., аспирант, *Еремин С.В., старший преподаватель,

Морозова Н.Г., доцент, Маслов М.А., доцент

кафедра Химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского

*кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии

МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

e-mail: mamaslov@mail.ru

Представлен синтез фолатсодержащих липоконъюгатов, предназначенных для включения в липосомальные системы доставки противоопухолевых препаратов с целью придания им направленности на опухолевые клетки. Целевые соединения амфифильной природы выделены по разработанной оригинальной методике.

Ключевые слова: фолиевая кислота, адресная доставка, опухолевые клетки.

В настоящее время для лечения онкологических заболеваний предложены липосомальные композиции, содержащие как известные химиотерапевтические агенты [1], так и лекарственные средства нового поколения – терапевтические нуклеиновые кислоты [2]. Инкапсулирование лекарства в липосому обеспечивает защиту от преждевременной деградации в биологических жидкостях [3], а также способствует его эффективному накоплению в опухолевых клетках [4]. Известно, что опухолевые клетки по сравнению со здоровыми клетками сверхэкспрессируют фолатные рецепторы [2, 5–9], которые узнают, связывают и поглощают фолиевую кислоту. Поэтому модификация поверхности липосом фолиевой кислотой позволяет осуществлять направленную доставку переносимого лекарства для проведения успешной химиотерапии [5]. Целью данной работы является синтез фолатсодержащих липоконъюгатов, предназначенных для включения в липосомальные системы доставки лекарственных средств и придания им направленности на опухолевые клетки [6].

Структура липоконъюгата состоит из гидрофобного домена, связанного через спейсерную группу с остатком фолиевой кислоты. В качестве гидрофобного домена нами был выбран остаток 1,2-ди-О-тетрадецил-*rac*-глицерина, ответственного за встраивание в липидный бислой липосом, который ранее применялся в нашей лаборатории для синтеза компонентов липосомальных систем доставки НК [10, 11]. Известно, что длина спейсерной группы оказывает влияние на доступность лиганда для взаимодействия с рецептором. Поэтому для пространственного разнесения гидрофобного домена и фолиевой кислоты нами были использованы гидрофобные спейсеры различной длины.

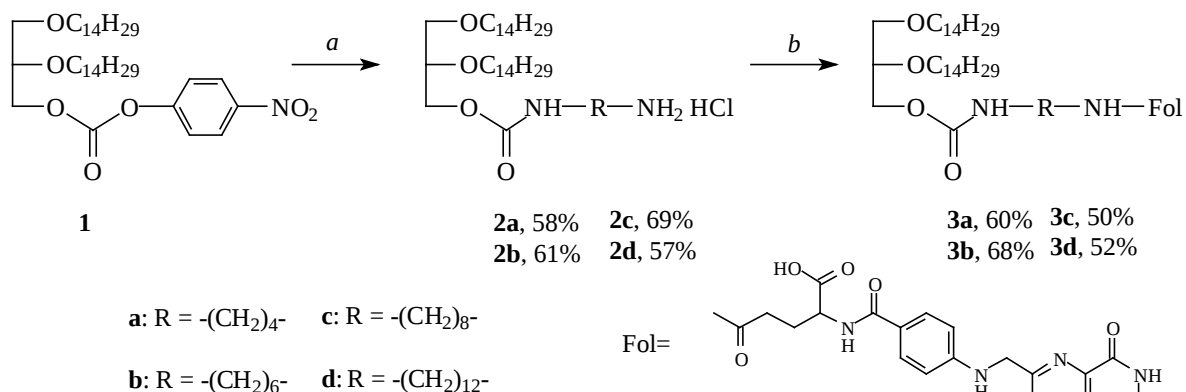
Синтез фолатсодержащих липоконъюгатов осуществлялся введением спейсерных групп в гидрофобный домен для дальнейшей конденсации с фолиевой кислотой. Ранее соединения

2a-d были получены в нашей лаборатории с общим выходом 23–48% в результате взаимодействия моно-Вос-защищенных диаминов с производным 1,2-ди-О-тетрадецил-*rac*-глицерина **1** и последующего удаления защитной группы [10]. Для сокращения количества стадий синтеза, времени и затрат нами предложен иной способ получения, который основан на непосредственном взаимодействии соединения **1** с двукратным избытком незащищенных диаминов (1,4-диаминобутаном, 1,6-диаминогексаном, 1,8-диаминооктаном, 1,12-диаминододеканом) в присутствии триэтиламина (Et_3N) (схема). С использованием данного подхода выход соединений **2a-d** был увеличен в 1.5–2 раза и составил 57–69%. Хроматографическая подвижность, данные спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии и элементного анализа для соединений **2a-d**, полученных по новому способу, совпадали с ранее описанными данными [10].

Конденсацию соединений **2a-d** (1 экв.) и фолиевой кислоты (3 экв.) проводили в присутствии N,N,N',N' -тетраметил-О-(бензотриазол-1-ил)уроний тетрафторбората (TBUTU , 3 экв.) и диизопропилэтиламина (DIPEA , 5 экв.) в безводном диметилсульфоксиде при 45°C в атмосфере аргона в течение 2 ч. Поскольку полученные фолатсодержащие липоконъюгаты **3a-d** обладают ярко выраженными амфифильными свойствами, процесс их очистки с использованием обычной колоночной хроматографии на силикагеле не позволяет выделить соединения в индивидуальном состоянии. Нами была предложена оригинальная двухстадийная процедура очистки соединений **3a-d**, которая включает два этапа. На первом этапе проводили твердофазную экстракцию в градиентном режиме с использованием системы растворителей: CHCl_3 – MeOH –водн. NH_3 , благодаря которой удавалось удалить из реакционной смеси диметилсульфоксид и избыток фолиевой кислоты. На втором этапе фракцию, содержащую целевые соединения, подвергали коло-

ночной хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента смесь CHCl_3 – MeOH –водн. NH_3 (4:2:0.2), что позволило избавиться от TBUTU и других продуктов реакции и получить соединения **3a–d** с выходами от 50

до 68%. Было отмечено, что увеличение длины спейсерной группы усиливает амфифильность фолатсодержащих липоконъюгатов и приводит к уменьшению их выходов.



Реагенты и условия: (a) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ($n = 4, 6, 8, 12$), Et_3N , 24°C , 1 ч;
 (b) фолиевая кислота, TBUTU, DIPEA, 45°C , 2 ч.

Для подтверждения структуры всех синтезированных соединений нами была использована спектроскопия ЯМР ^1H и ^{13}C и масс-спектрометрия. Так, в спектрах ЯМР ^1H наряду с характерными сигналами протонов гидрофобного домена (0.79 и 1.09–1.30 м.д.) присутствуют сигналы остатка *L*-глутаминовой кислоты (1.85–2.24, 2.25–2.50 и 4.40–4.60 м.д.), *p*-аминобензойной кислоты (6.47–6.59 и 7.47–7.61 м.д.) и гетероциклического основания (8.66 м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C содержит сигналы всех атомов углерода липоконъюгата, наиболее характерными из которых являются сигналы четвертичных углеродов *L*-глутаминовой кис-

лоты (173.2 и 175.8 м.д.) и карбамоильного линкера (156.0 м.д.), а также метильной группы алкильных остатков (14.6 м.д.).

Таким образом, получены новые фолатсодержащие липоконъюгаты, отличающиеся длиной спейсерной группы. Для выделения липоконъюгатов предложена оригинальная двухстадийная процедура, которая включает твердофазную экстракцию в градиентном режиме и последующую колоночную хроматографию на силикагеле.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 13-04-40183-н комфи).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Jun Wu, Qing Liu, Robert J. Lee. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel // *Int. J. Pharmaceutics*. 2006. V. 316. P. 148–153.
2. Faneca H., Cardoso A.L., Trabulo S., Duarte S., Pedroso de Lima M.C. Cationic liposome-based systems for nucleic acid delivery: from the formulation development to therapeutic applications / *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment* / Ed. Jorge Coelho. 2013. V. 4. P. 153–184.
3. Zhu C., Jung S., Luo S., Meng F., Zhu X., Park T.G., Zhong Z. Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers // *Biomaterials*. 2010. V. 31. P. 2408–2416.
4. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting // *Adv. Enzyme Regul.* 2001. V. 41. P. 189–207.
5. Xiang G., Wu J., Lu Y., Liu Z., Lee R.J. Synthesis and evaluation of a novel ligand for folate-mediated targeting liposomes // *Int. J. Pharmaceutics*. 2008. P. 29–36.
6. Chen S., Zhao X., Chen J., Chen J., Kuznetsova L., Wong S.S., Ojima I. Mechanism-based tumor-targeting drug delivery system. validation of efficient vitamin receptor-mediated endocytosis and drug release // *Bioconjug. Chem.* 2010. V. 21(5). P. 979–987.
7. Saeed A.O., Magnusson J.P., Moradi E., Soliman M., Wang W., Stolnik S., Thurecht K.J., Howdle S.M., Alexander C. Modular construction of multifunctional bioresponsive cell-targeted nanoparticles for gene delivery // *Bioconjug. Chem.* 2011. V. 22. P. 156–168.
8. Xia W., Low P.S. Folate-targeted therapies for cancer // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. P. 6811–6824.
9. Kamaly N., Kalber T., Thanou M., Bell J.D., Miller A.D. Folate receptor targeted bimodal liposomes for tumor magnetic resonance imaging // *Bioconjug. Chem.* 2009. V. 20. P. 648–655.

10. Шмендель Е.В., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. Синтез неоглико-липидов для применения в невирусных системах доставки генетического материала // Изв. АН. Сер. хим. 2010. Т. 12. С. 2225–2233.

11. Шмендель Е.В., Тимакова А.А., Маслов М.А., Морозова Н.Г., Чупин В.В. Синтез маннозил-содержащего неогликолипоконъюгата как компонента адресных систем доставки нуклеиновых кислот в антигенпредставляющие клетки // Изв. АН. Сер. хим. 2012. № 7. С. 1480–1484.

SYNTHESIS OF FOLATE LIPOCONJUGATES WITH HYDROPHOBIC SPACERS

E.V. Shmendel, S.V. Eremin, N.G. Morozova, M.A. Maslov[@]

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

[@]Corresponding author e-mail: mamaslov@mail.ru

Folate lipoconjugates were synthesized by induction of spacers to 1,2-di-O-tetradecyl-rac-glycerol for future condensation with folic acid. The intermediates hydrophobic compounds were obtained by treatment of 1-O-(4-nitrophenyloxycarbonyl)-2,3-di-O-tetradecyl-rac-glycerol with free diamines (1,4-diaminobutane, 1,6-diaminohexane, 1,8-diaminooctane, 1,12-diaminododecane) in the presence of triethylamine. Condensation of intermediate compounds (1 eq.) and folic acid (3 eq.) were carried out in the presence of (O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (3 eq.) and N,N-diisopropylethylamine (5 eq.) and gave targeted folate lipoconjugates. The structures and purity of the compounds synthesized were confirmed by analytic physicochemical methods.

Key words: *folic acid, targeting delivery, cancer cells.*