

ДИЗАЙН И СИНТЕЗ ГИДРОФОБНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ RGD-ПЕПТИДОВ

А.В. Добрынина, магистр, М.А. Цыкунова, студент,

Ю.Л. Себякин, профессор

кафедра Химии и технологии биологически активных соединений

им. Н.А. Преображенского МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: c-221@yandex.ru

Осуществлен синтез гидрофобных производных RGD- и RGDS-пептидов и исследована способность катионных липосом с их включением образовывать комплексы с ДНК.
Hydrophobic peptide derivatives containing RGD-amino acids sequence have been synthesized and ability of cationic liposomes to form complexes with DNA has been investigated.

Ключевые слова: RGD-последовательность, липосомы, направленная доставка.

Key words: RGD-amino acid sequence, liposomes, targeted delivery system.

Одной из важных и трудноразрешимых проблем, с которой обычно сталкиваются в процессе доставки биологически активных веществ (БАВ) *in vivo*, является неспособность систем переносчиков селективно узнавать клетки-мишени.

Многообещающим методом создания липосом направленного транспорта является модификация их поверхности лигандами, специфичными к рецепторам определенного типа клеток (рис. 1). Особый интерес, с этой точки зрения, представляет использование RGD-пептидов (последовательность аргинил-глицил-аспарагиновая кислота), обладающих сродством к некоторым типам интегринов [1], что создает возможность значительно повысить избирательность действия транспортных систем по отношению к клеткам-мишеням, например, к эпителию растущих сосудов, и расширить область их применения [2]. Кроме того, показано, что наиболее эффективное связывание с интегрин-ами проявляют RGDS-пептиды [3].

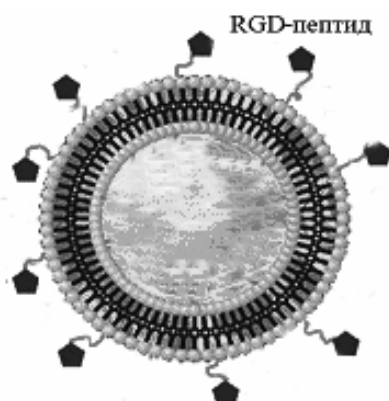


Рис. 1. RGD-модифицированная липосома.

Уникальная структура гуанидиновой группировки аргинина, входящего в состав агентов трансфекции, обеспечивает большую эффективность переноса репортерных генов по сравнению с коммерчески доступными препара-

татами за счет повышенного сродства гуанидиновой группировки аргинина к фосфатным группам нуклеотидов [4].

В данной работе осуществлен синтез алифатических производных RGD- и RGDS-пептидов (соединения 1, 2) (рис. 2) и исследовано их комплексообразование с ДНК.

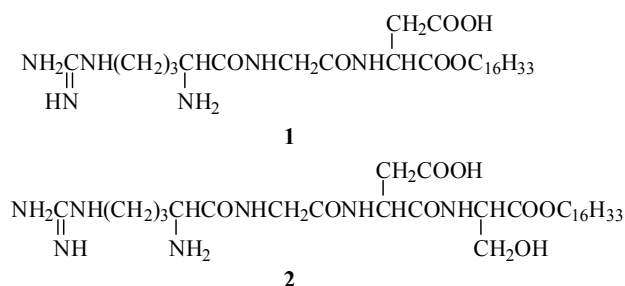


Рис. 2. Алифатические производные RGD-пептидов.

Предложенная модификация RGD-пептида обусловлена необходимостью введения в его структуру гидрофобного фрагмента, выполняющего роль якоря при встраивании соединений в состав липосом [5].

Для каждого соединения была предложена и отработана индивидуальная схема синтеза (схемы 1, 2), обусловленная особенностями их структур.

Синтез гидрофобных фрагментов 5, 9, 14, в основном, осуществлялся путем сплавления аминокислот с высшими насыщенными спиртами (гексадециловый и тетрадециловый) в присутствии *n*-толуолсульфокислоты с последующим удалением *n*-толуолсульфоновой соли [6]. Очистка соединений от избытка спирта осуществлялась перекристаллизацией из ацетона.

Введение в структуру соединения гидрофобного фрагмента также понижает его полярность в целом, увеличивает хроматографическую подвижность и тем самым облегчает синтез и выделение целевого соединения на следующей стадии.

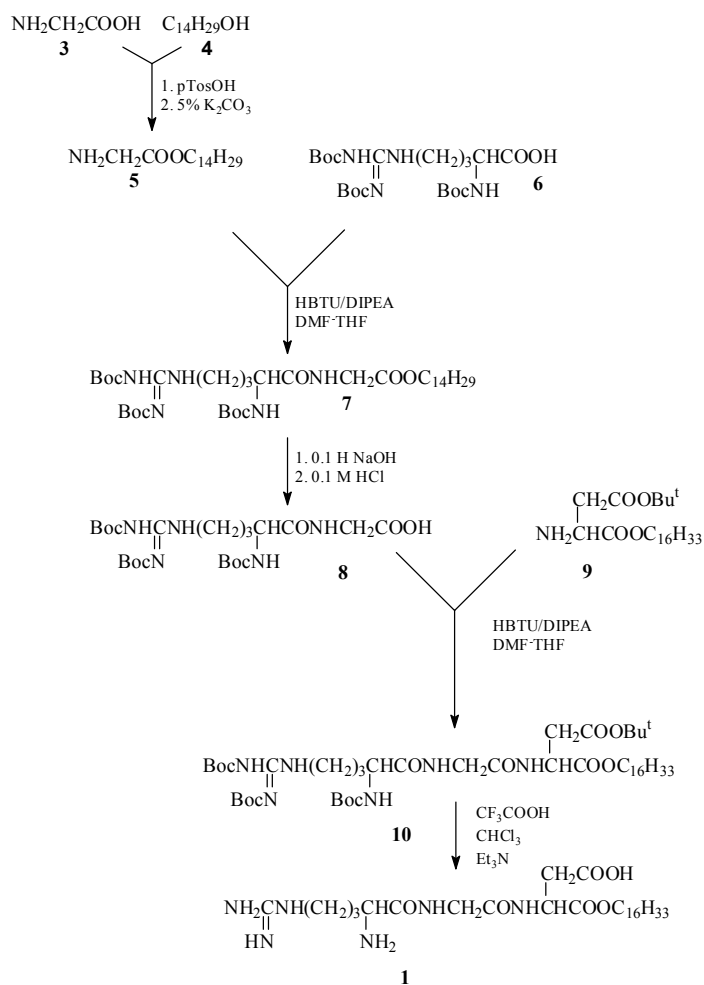


Схема 1.

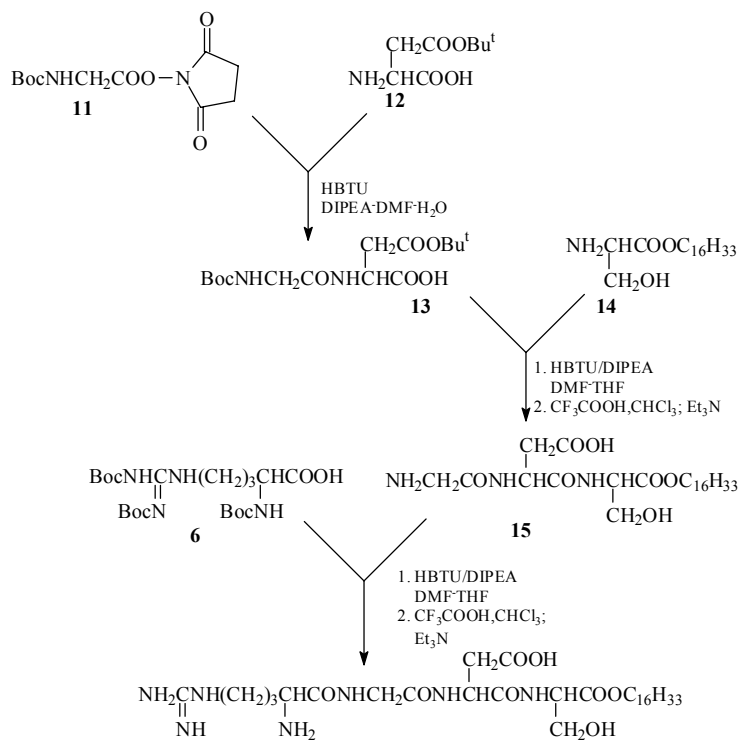


Схема 2.

Центральным звеном в предложенных схемах синтеза является образование пептидных связей между соответствующими компонентами. Основным ранее используемым для этой цели методом был стандартный метод активированных *N*-оксисукцинимидных эфиров в среде тетрагидрофурана (THF) в присутствии *N*-гидроксисукцинимиды (HONSu) и дициклогексилкарбодиимиды (DCC) [7]. Он является эффективным при синтезе дипептидов, но тем не менее имеет ряд существенных недостатков, а именно: необходимость выделения активного интермедиата, освобождения от дициклогексимочевины, продолжительное время реакции (до 24 ч), невысокий выход. Более того, в ходе отработки методики было обнаружено, что *N*-оксисукцинимидный эфир *L*-аргинина крайне нестабилен и разлагается с образованием как более полярных, так и менее полярных соединений, структура которых не идентифицировалась, но наличие этих соединений однозначно фиксировалось с помощью ТСХ. Этот факт, безусловно, влиял на выходы пептидного синтеза с участием *L*-аргинина.

Использование в качестве конденсирующего агента соединения урониевого типа *O*-(бензотриазол)-1-ил-*N,N,N',N'*-тетраметилуридий гексафторфосфата (HBTU) в среде диметилформамида (DMF) в присутствии основания диизопропилэтиламина (DIPEA) [8] позволило сократить время протекания реакции до 2 ч и значительно облегчить синтез и выделение из реакционной массы пептидов, имеющих в своей структуре *L*-аргинин.

Синтез соединения **13** проводили с использованием другого сочетания активирующего и конденсирующего агентов. В качестве активирующего агента был выбран HONSu, а в качестве конденсирующего – HBTU, реакцию проводили в присутствии DIPEA в системе растворителей DMF–H₂O, 1 : 1 [9]. Такой выбор обусловлен необходимостью проведения реакции в водной среде из-за низкой растворимости 4-*трет*-бутилового эфира *L*-аспарагиновой кислоты (**12**) в органических растворителях.

Удаление *трет*-бутилоксикарбонильной защиты проводили действием безводной трифторуксусной кислоты (TFA) с последующей обработкой органическим основанием с целью получения свободной аминогруппы. Удаление алкильной защиты осуществляли щелочным гидролизом с последующим подкислением.

После удаления защит соединения **7**, содержащее тетрадециловый эфир глицина, благодаря гидрофобному фрагменту может использоваться самостоятельно в качестве компонента транспортных систем. Однако в предложенной схеме этот эфир использовался как защита карбоксильной группы глицина, поскольку это позволило использовать более мягкие условия

удаления защитной группы по сравнению со стандартно применяемыми этиловым и бензиловым эфирами.

Структура полученных промежуточных и целевых соединений подтверждалась данными ИК- и ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Комплексообразование с ДНК

Для изучения взаимодействия липопептидов **1** и **2** с ДНК было предпринято исследование с использованием различных соотношений компонентов комплекса. Чтобы оценить степень связывания ДНК и липопептида в составе липосом, сформированных из дигексадецил-*N*-(орнитил)глутамат бистрифторацетата, при электростатическом взаимодействии, использовался эксперимент с этидий бромидом. Этидий бромид в индивидуальном виде флуоресцирует очень слабо, но в комплексе с ДНК интенсивность флуоресценции сильно возрастает. При добавлении катионного амфифила происходит вытеснение красителя из комплекса, вследствие чего флуоресценция уменьшается. Точки перегиба на графике зависимости интенсивности флуоресценции комплекса от соотношения липопептид/ДНК, после которых наблюдаются слабые изменения флуоресценции, свидетельствуют об оптимальном комплексообразовании между липосомами и нуклеиновой кислотой.

На графике (рис. 3) видно, что интенсивность флуоресценции резко уменьшается до 83.5% при молярном зарядовом соотношении 1 : 1 (+/-) в случае использования липосом без включения RGD-производных и до 75-78% при соотношениях 1.2 : 1÷1.6 : 1 (+/-) в случае их включения. После этой точки наблюдаются слабые изменения флуоресценции, на основании чего мы предполагаем, что при таких соотношениях компонентов происходит максимальное комплексообразование между амфифилом и ДНК. Найденные значения соотношений планируется использовать при проведении экспериментов *in vitro*.

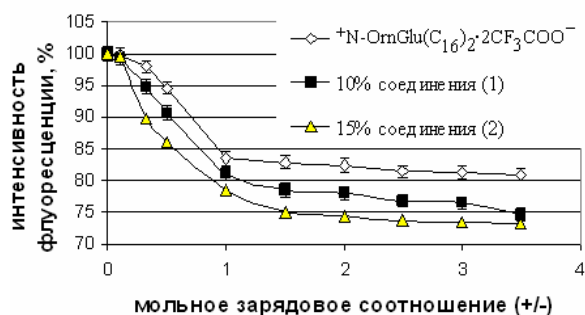


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции комплексов с различным молярным зарядовым соотношением липопептид/ДНК (+/-) по сравнению с комплексом этидий бромида с ДНК в отсутствие липопептидов.

Нами показано, что липосомы со встроенным RGD-мотивом эффективно вытесняют этидий бромид из комплекса с ДНК, что свидетельствует о более прочном связывании ДНК с модифицированными липосомами по сравнению с исходными.

Таким образом, в результате проделанной работы осуществлен синтез гидрофобных производных пептидов, содержащих RGD-последовательность, и исследовано их комплексообразование с ДНК в составе катионных липосом.

Экспериментальная часть

В работе использовали глицин (Chemapol), L-аргинин (Диаэм), 4-трет-бутиловый эфир L-аспарагиновой кислоты (Fluka), HBTU (Fluka), тетрадециловый спирт, DIPEA (Sigma-Aldrich), TFA (Лабтех). $N^{\alpha},N^{\beta},N^{\gamma}$ -Три-трет-бутилоксикарбонил-L-аргинин (**6**) получали по описанной методике [10], 1-гексадецил-4-трет-бутил-L-аспарагинат (**9**) – по методике [11], N-оксисукцинимидный эфир трет-бутилоксикарбонилглицина (**11**) – по методике [7], тетрадециловый эфир L-серина (**14**) – по методике [6]. Растворители очищались по стандартным методикам [12].

Препаративную тонкослойную хроматографию проводили на силикагеле TLC standart grade (Sigma-Aldrich), колоночную хроматографию – на силикагеле 0.060-0.200 мкм, 60 Å (Acros Organics).

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-400 с рабочей частотой 400 МГц, внутренний стандарт – гексаметилдисулфоксид. ИК-спектры регистрировали на спектрометре Bruker EQUINOX-55. Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 методом MALDI с использованием в качестве матрицы 2,4-дигидроксibenзойной кислоты (DHB). Интенсивность флуоресценции определяли на спектрофлуориметре JASCO 777. Температуры плавления определяли на приборе Boetus и не корректировали.

Тетрадециловый эфир глицина (5). Смесь 1 г (13.3 ммоль) тетрадецилового спирта (**4**) и 4.0 г (18.7 ммоль) глицина (**3**) нагревали при 125°C в течение 15 мин. После расплавления тетрадеканола добавляли 3.55 г (18.7 ммоль) n-толуолсульфокислоты и продолжали нагревание в течение 2 ч. Реакционную массу охлаждали до комнатной температуры, дважды обрабатывали ацетоном (2 x 50 мл). Полученную соль тетрадецилового эфира глицина (5.25 г) растворяли в хлороформе, промывали 5% раствором карбоната калия, водой до pH 7. Сушили сульфатом натрия. Растворитель отгоняли в вакууме. Продукт перекристаллизовывали из эфира. Выход 1.8 г

(72.5%), т.пл. 64-66°C, по лит. данным т.пл. 65-66°C [13].

Тетрадециловый эфир $N^{\alpha},N^{\beta},N^{\gamma}$ -три-трет-бутилоксикарбонил-L-аргинил-глицина (7). К раствору 0.178 г (0.38 ммоль) $N^{\alpha},N^{\beta},N^{\gamma}$ -три-трет-бутилоксикарбонил-L-аргинина (**6**) в 3 мл THF добавили раствор 0.142 г (0.38 ммоль) HBTU в 2 мл DMF и 2 мл DIPEA. Через 30 мин добавили раствор 0.098 г (0.38 ммоль) соединения **5** в DMF. Выдерживали без доступа света при интенсивном перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. Растворитель отгоняли в вакууме. Продукт реакции выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой растворителей петролейный эфир-эфир, 2 : 1. Выход 0.14 г (56%). ИК-спектр (вазелиновое масло, $\nu_{\max}$, см⁻¹): 3500 (NH); 2910 (CH); 2902 (CH); 1740 (C=O); 1700 (C=O); 1630 (C=O, I амидная полоса); 1560 (NH, II амидная полоса); 1450 (CH); 1400 (CH); 1364 (CH); 1210; 1100 (C-O). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 0.92 (т, 3H, CH₃); 1.27 (с, 22H, CH₂); 1.41 (с, 9H, C(CH₃)₃); 1.45 (с, 18H, 2C(CH₃)₃); 1.53-1.62 (м, 2H, β CH₂); 1.76-1.85 (м, 2H, α CH₂); 3.55-3.67 (м, 4H, CH₂CH₂ Arg); 3.75-3.82 (м, 1H, CH Arg); 3.92-4.13 (м, 2H, NCH₂ Arg), 5.8 (д, 1H, CONH), 6.5 (с, 2H, CH₂), 8.0 (с, 3H, NH).

$N^{\alpha},N^{\beta},N^{\gamma}$ -Три-трет-бутоксикарбонил-L-аргинил-глицин (8). К раствору 0.110 г (0.167 ммоль) соединения **7** в 5 мл THF добавляли эквимолярное количество 0.1 н. раствора гидроксида натрия, выдерживали 2 ч при 40°C при воздействии ультразвука. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 25 мл воды, добавляли 15 мл эфира, осторожно подкисляли 0.1 М соляной кислотой до pH 2.55, экстрагировали эфиром, эфир отгоняли в вакууме. Продукт выделяли с помощью препаративной хроматографии в системе толуол-хлороформ-метилэтилкетон-изопропанол, 10 : 6 : 3 : 1. Выход 0.018 г (20%). ИК-спектр (пленка, $\nu_{\max}$, см⁻¹): 3500 (NH); 2890 (CH); 1740 (COOH); 1650 (NH); 1640 (C=O, I амидная полоса); 1515 (NH, II амидная полоса). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.40 (с, 9H, C(CH₃)₃); 1.45 (с, 18H, 2C(CH₃)₃); 3.61-3.74 (м, 4H, CH₂CH₂ Arg); 3.8-3.82 (м, 1H, CH Arg); 3.9-3.98 (м, 2H, конц. CH₂ Arg); 5.8 (д, 1H, CONH); 6.5 (с, 2H, CH₂); 8.0 (с, 3H, NH).

1-Гексадецил-4-трет-бутил-N-($N^{\alpha},N^{\beta},N^{\gamma}$ -три-трет-бутилоксикарбонил-L-аргинил-глицил)-L-аспарагинат (10) получали аналогично соединению **7** исходя из 0.406 г (0.765 ммоль) соединения **8** и 0.632 г (1.53 ммоль) 1-гексадецил-4-трет-бутил-L-аспарагината (**9**). Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, последовательно элюируя системами растворителей гексан-эфир: 2 : 1, 1.5 : 1, 1 : 1. Выход 0.453 г (64%).

ИК-спектр (пленка, $\nu_{\max}$, см^{-1}): 3690 (NH); 2930 (CH_2); 2857 (CH); 1734 ($\text{C}=\text{O}$); 1668 ($\text{C}=\text{O}$, I амидная полоса); 1575 (NH, II амидная полоса); 1453 (CH_3); 1360 (CH_3); 1088 (CO). Масс-спектр, m/z : 926.63 (M^+).

1-Гексадецил-N-(L-аргинил-глицил)-L-аспарагинат (1). Раствор 0.087 г (0.1 ммоль) соединения (10) в 5 мл хлороформа выдерживали с 3.85 мл (5.0 ммоль) трифторуксусной кислоты в атмосфере аргона при комнатной температуре. Через 1 ч растворитель и кислоту отгоняли в вакууме, остаток растворяли в 5 мл хлороформа, прибавляли по каплям триэтиламин до pH 7-8, промывали водой, сушили, растворитель отгоняли в вакууме. Выход 0.051 г (89%). ИК-спектр (пленка, $\nu_{\max}$, см^{-1}): 3335 (NH_2); 2890 (CH); 1737 ($\text{C}=\text{O}$); 1667 ($\text{C}=\text{O}$, I амидная полоса); 1548 (NH, II амидная полоса); 1450 (CH_3); 1360 (CH_3); 1282 (CO); 1183 (CO); 1038 (C-C). Масс-спектр, m/z : 570.41 (M^+).

4-трет-Бутил-N-(N-трет-бутилоксикарбонил-глицил)-L-аспарагинат (13). К раствору 0.231 г (0.85 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира трет-бутилоксикарбонилглицина (11) в 2 мл DMF добавили раствор 0.492 г (1.3 ммоль) HBTU в 2 мл DMF и 0.321 г (1.7 ммоль) 4-трет-бутилового эфира L-аспарагиновой кислоты (12) в 2 мл воды и 0.28 мл DIPEA. Выдерживали без доступа света при интенсивном перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. Растворитель отгоняли в вакууме. Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии, последовательно элюируя системами растворителей гексан-эфир, 1 : 1, гексан-хлороформ, 2 : 1, 1 : 1 и гексан-хлороформ-метанол, 1 : 2 : 0.5. Выход 0.294 г (58%). ИК-спектр (пленка, $\nu_{\max}$, см^{-1}): 3300 (NH); 2926 (CH_2); 2849 (CH); 1700 (COOH); 1665 ($\text{C}=\text{O}$, I амидная полоса); 1577 (NH, II амидная полоса); 1450 (CH_3); 1360 (CH_3); 1084 (CO). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 1.43 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.45 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.5-2.9 (м, 2H, CH_2 Asp); 3.9 (с, 2H, CH_2 Gly); 4.9 (т, 1H, CH Asp); 5.0 (с, 3H, NH и OH).

Гексадециловый эфир глицил-L-аспартил-L-серина (15) получен из 0.084 г соединения 13 в две стадии: 1) образование пептидной связи аналогично соединению 7; 2) обработка TFA аналогично соединению 1. Выход 0.04 г (42%). ИК-спектр (пленка, $\nu_{\max}$, см^{-1}): 3680 (NH); 2927 (CH_2); 2852 (CH); 1735 ($\text{C}=\text{O}$); 1667 ($\text{C}=\text{O}$, I амидная полоса); 1575 (NH, II

амидная полоса); 1450 (CH_3); 1360 (CH_3); 1085 (CO). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 0.9 (т, 3H, CH_3); 1.28 (с, 26H, CH_2); 1.45-1.59 (м, 2H, βCH_2); 2.6-2.9 (м, 2H, CH_2 Asp); 3.7 (т, 2H, CH_2 Ser); 3.9 (с, 2H, CH_2 Gly); 4.0 (т, 4H, αCH_2 сп.); 4.3 (т, 1H, CH Ser); 5.0 (т, 1H, CH Asp).

Гексадециловый эфир L-аргинил-глицил-L-аспартил-L-серина (2) получен из 0.04 г соединения 15 в две стадии: 1) образование пептидной связи аналогично соединению 7; 2) обработка TFA аналогично соединению 1. Выход 0.069 г (38%). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 0.9 (т, 3H, CH_3); 1.3 (с, 26H, CH_2); 1.56-1.69 (м, 2H, βCH_2); 1.7-1.73 (м, 2H, CH_2 Arg); 2.5-2.9 (м, 2H, CH_2 Asp); 3.0 (т, 2H, NHCH_2 Arg); 3.8 (т, 2H, CH_2 Ser); 3.9 (с, 2H, CH_2 Gly); 4.0 (т, 4H, αCH_2 сп.); 4.3 (т, 1H, CH Ser); 5.0 (т, 1H, CH Asp); 5.1 (с, 8H, NH и OH). Масс-спектр, m/z : 657.44 (M^+).

Получение липосом. Катионные липосомы на основе дигексадецил-N-(орнитил)глутамат бистрифторацетата ($^+\text{N-OrnGlu}(\text{C}_{16})_2 2\text{CF}_3\text{COO}^-$), содержащие 10 и 15% по массе алифатических производных RGD-трипептидов 1 и 2, соответственно, формировали следующим образом: раствор 0.5 мг соединения 1 и 5 мг $^+\text{N-OrnGlu}(\text{C}_{16})_2 2\text{CF}_3\text{COO}^-$ в 2 мл хлороформа медленно упаривали на ротаторном испарителе в круглодонной колбе. Остаток высушивали в вакууме в течение 1 ч при 20°C. Затем прибавляли 2 мл дистиллированной воды и при нагревании до 60°C встряхивали в течение 15 мин. Аналогично получали дисперсии из 0.8 мг вещества 2 и 5 мг $^+\text{N-OrnGlu}(\text{C}_{16})_2 2\text{CF}_3\text{COO}^-$. Дисперсии разбавляли дистиллированной водой до концентрации амфифилов 0.15 мкг/мкл.

Комплексообразование с ДНК. Вытеснение катионными амфифилами этидий бромида из комплексов с ДНК наблюдали при добавлении аликвот (3 мкл) липосомной дисперсии с концентрацией амфифилов 0.15 мкг/мкл (0.0001 мМ $^+\text{N-OrnGlu}(\text{C}_{16})_2 2\text{CF}_3\text{COO}^-$) к раствору 86.7 мкг (0.0013 мкмоль) этидий бромида и 1 мкг ДНК (0.006 мкмоль фосфатных остатков) (high molecular weight from *Escherichia coli*, host train, Sigma) в 3 мл воды и фиксировали уменьшение интенсивности флуоресценции (λ_{exc} 546 нм, λ_{em} 600 нм, ширина кюветы 1 см, размер щелей 3 нм).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-01150) и АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» 2.1.1/2889.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Schaffner, P. Structure and function of RGD peptides involved in bone biology / P. Schaffner, M. M. Dard // Cell. Mol. Life Sci. – 2003. – Vol. 60. – P. 119–132.
2. Zakutskii, A. N. Functional arginine-containing amino acid sequences in peptides and proteins A. N. Zakutskii, N. I. Chalisova, T. F. Subbotina // Russian J. Bioorg. Chem. – 2008. – Vol. 34, № 2. – P. 135–

144.

3. Pozzetto, U. RGDS peptide inhibits activation of lymphocytes and adhesion of activated lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells *in vitro* / U. Pozzetto // Immunology and Cell Biol. – 2005. – Vol. 83. – P. 25–32.

4. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers / D. J. Mitchell [et al.] // J. Pept. Res. – 2000. – Vol. 56. – P. 318–325.

5. Optimized conventional synthesis of «RGD» and «RGDS» peptides and their sarcosine mimics as integrin GP IIb/IIIa antagonists / M. Abo-Ghaila [et al.] // Amino Acids. – 2003. – Vol. 24. – P. 405–411.

6. Себякин, Ю. Л. Синтез амфифильных производных L-серина / Ю. Л. Себякин, Н. Л. Федякова, Е. А. Рунова // Биоорг. химия. – 1994. – Т. 20. – С. 1101–1106.

7. Гринштейн, Д. Химия аминокислот и пептидов / Д. Гринштейн, М. Винниц. – М. : Мир, 1965. – 821 с.

8. Han, S.-Y. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis / S.-Y. Han, Y.-A. Kim // Tetrahedron. – 2004. – Vol. 60. – P. 2447–2467.

9. Synthesis of RGD amphiphilic cyclic peptide as fibrinogen or fibronectin antagonist / M. A. Sow [et al.] // Lett. in Peptide Science. – 1997. – Vol. 4. – P. 455–461.

10. Позднев, В. Ф. $N^{\alpha},N^{\beta},N^{\gamma}$ -Три-трет-бутилокси-пирокарбониларгинин – новое производное аргинина для пептидного синтеза / В. Ф. Позднев // Биоорг. химия. – 1986. – Т. 12, № 8. – С. 1013–1022.

11. Себякин, Ю. Л. pH-Чувствительные катионные липопептиды для создания транспортных систем медицинского назначения / Ю. Л. Себякин, У. А. Буданова // Биоорг. химия. – 2006. – Т. 32, № 5. – С. 453–458.

12. Органикум / Г. Беккер [и др.] – Т. 2. – М. : Мир, 1979. – 442 с.

13. Себякин, Ю. Л. Синтез модифицированного аналога природного липопептида из бактериальной стенки *E. coli* / Ю. Л. Себякин, М. П. Усанова // Биоорг. химия. – 1999. – Т. 25, № 5. – С. 329–333.