

ПЛЯВНИК НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

**СИНТЕЗ ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ АЛКИЛЬНОГО ТИПА, СОДЕРЖАЩИХ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ В ПОЛЯРНОМ ДОМЕНЕ**

Специальность 02.00.10 — Биоорганическая химия



АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Работа выполнена на кафедре Химии и технологии биологически активных соединений им. Н. А. Преображенского Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Серебренникова Галина Андреевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Шibaев Владимир Николаевич

доктор химических наук, профессор

Смирнов Леонид Дмитриевич

Ведущая организация: Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится «27» ноября 2004 г. в 15 часов на заседании Диссертационного Совета Д 212.120.01 при Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова по адресу: 119571, Москва, пр. Вернадского, 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МИТХТ им. М. В. Ломоносова (119831, Москва, М. Пироговская, 1)

Автореферат разослан «26» ноября 2004 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник



Лютик А. И.

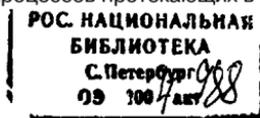
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Фосфорсодержащие глицеролипиды алкильного типа являются предметом интенсивных исследований. Это, прежде всего, связано с открытием липидного биорегулятора широкого спектра действия - фактора активации тромбоцитов (ФАТ). Поскольку сам ФАТ не может быть использован в терапевтических целях из-за его мощного тромбоцит-агрегирующего действия, было синтезировано большое количество его структурных аналогов. Оказалось, что многие структурные аналоги ФАТ алкильного типа проявляют сильную противоопухолевую активность, ингибируя действие клеточных ферментов и пролиферацию злокачественных клеток, что вызывает их лизис, а также активируют цитотоксические макрофаги, препятствуют образованию метастаз.

Одним из соединений, обладающих сильной противоопухолевой активностью, является Эдельфозин (Edelfosine, 1-октадецил-2-метил-гас-глицеро-3-фосфохолин, ET-18-OMe), близкий по структуре к ФАТ. Выяснилось, что ET-18-OMe ингибирует рост и пролиферацию различных опухолевых клеток *in vivo* и *in vitro*.

В настоящее время большое внимание привлекают неприродные представители катионных бесфосфорных глицеролипидов алкильного типа. Интерес к данному классу соединений, прежде всего, связан с возможностью их использования в липосомальной форме для доставки генетического материала в эукариотические клетки, что является центральной проблемой генной терапии. Данные соединения, как правило, являются производными длинноцепных 1,2-диалкилглицеринов. Модификация молекулы катионных алкильных глицеролипидов путем введения короткоцепного заместителя в С(2) положение глицеринового скелета (как у ФАТ) приводит к появлению у них таких биологических эффектов, как противоопухолевый, противовирусный (анти-ВИЧ-1), ФАТ-антагонистический или антибактериальный. В связи с этим, представляется актуальным создание новых положительно заряженных глицеролипидов алкильного типа с короткоцепными заместителями при С(2) атоме глицерина с целью выявления среди них соединений, обладающих биологической активностью.

Введение реакционноспособных функциональных групп в полярный домен алкильных глицеролипидов открывает широкие перспективы в использовании таких соединений для их конъюгации с различными биологически активными веществами или мечеными зондами. Так, для исследования действия ферментов, участвующих в метаболизме липидов. или для изучения процессов протекающих в биологических



мембранах, широко используют молекулярные липидные зонды, содержащие флуоресцентные, спиновые, фотореактивные метки. Кроме того, наличие функциональных групп открывает возможности для получения на основе таких липидов липофильных производных бора для борнейтронзахватной терапии рака.

Настоящая работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры ХТБАС МИТХТ им. М. В. Ломоносова по теме № 1Б-4-865 «Синтез супрамолекулярных структур на основе порфиринов, липидов и углеводов с целью изучения процессов, протекающих в клетке, и создания препаратов для онкологии, генной терапии и других областей медицины» и при поддержке РФФИ, проекты № 01-03-332334, 03-03-32482, 04-03-32452, научно-технической программы «Научные исследования высшей школы по приоритетным направлениям науки и техники», подраздел «Лекарственные и биологически активные вещества» № 203.05.04.005, фанта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ России №НШ-2013.2003.3.

Цель работы.

1. Синтез положительно заряженных глицеролипидов с набором функциональных групп в полярных «головках», представленных гетероциклическими и алифатическими аминами.
2. Получение модификационных рядов алкильных глицеролипидов со спейсерами различной длины, разделяющими гидрофильный и гидрофобный домены.
3. Разработка способов получения функционализированных алкильных глицеролипидов с использованием метода метилтиометилловых эфиров.
4. Проведение предварительных биологических испытаний полученных соединений на противоопухолевую активность *in vitro* и исследование возможности их применения в борнейтронзахватной терапии.

Научная новизна работы. В результате проведенных исследований нами получены новые типы алкильных липидов, различающиеся отдельными структурными фрагментами: алкильными заместителями при C(2) атоме глицеринового скелета, типом и длиной спейсера, а также природой полярных доменов, содержащих различные функциональные группы (гидроксильную,

карбоксильную и аминогруппу), для оценки влияния отдельных структурных участков на биологическую активность данных соединений.

С целью поиска потенциальных противоопухолевых агентов существенно расширен круг катионных глицеролипидов с короткоцепными заместителями в С(2) положении глицерина и положительно заряженными полярными «головками», представленными аминами алифатического и гетероциклического ряда.

Проведены предварительные биологические испытания *in vitro* синтезированных соединений на противоопухолевую активность.

Практическая значимость работы. В результате выполнения работы созданы новые ряды функционализированных алкильных глицеролипидов, отличающихся спейсерными и полярными группами, а также длиной и степенью ненасыщенности короткоцепного заместителя в С(2) положении глицерина. Направленная модификация молекулы катионного липида по определенным доменам создает возможность проведения структурно-функциональных исследований по выявлению зависимости возможной биологической активности этих соединений от строения каждой структурной единицы.

Получены глицеролипиды алкильного типа с функциональными группами в полярном домене в количествах, достаточных для проведения биологических испытаний. Наличие в молекулах липидов реакционноспособных функциональных групп позволяет проводить дальнейшие модификации данных соединений, в частности присоединять другие биологически активные вещества, репортерные метки или различные полиэдрические борводороды для возможного применения в борнейтронзахватной терапии рака.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Получение глицеролипидов с набором алкильных заместителей при С(2) атоме углерода и полярных доменов, представленных гетероциклическими и алифатическими аминами, содержащими различные функциональные группы.
2. Разработка методов синтеза алкильных глицеролипидов со спейсерными группами различной длины.
3. Синтез функционализированных алкильных глицеролипидов с использованием метода метилтиометилэфиров.

4. Анализ результатов биологических исследований синтезированных липидов и их борсодержащих производных в экспериментах *in vitro*.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на 1-ом Международном Конгрессе «Биотехнология - состояние и перспективы развития» (2002, Москва), на III Съезде биохимического общества (2002, Санкт-Петербург), на VIII Международной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии - 2002» (2002, Уфа), на отчетной конференции за 2002 год «Химия и химические продукты» (2003, Москва), на X Международной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии - 2004» (2004, Волгоград).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и тезисы 6 докладов, 2 статьи находятся в печати.

Объем и структура работы.

Диссертационная работа изложена на 91 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения экспериментального материала, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 128 источника. Работа иллюстрирована 12 рисунками и содержит 21 схем и 9 таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы проводится интенсивное изучение различных представителей нового класса липидов - катионных бесфосфорных глицеролипидов алкильного типа с целью проведения структурно-функциональных исследований. Среди этих соединений выявлены перспективные медиаторы трансфекции генетического материала в эукариотические клетки. Многие липиды данного класса обладают антибактериальной, ФАТ-антагонистической, антивирусной и противоопухолевой активностью.

К настоящему времени сформулированы основные требования к структуре алкильных глицеролипидов с целью получения веществ, обладающих биологической активностью определенного типа. В большинстве случаев при атоме С(1) должен присутствовать длинноцепной углеводородный остаток (С₁₀ - С₂₀), присоединенный к глицериновому скелету простой эфирной, тиоэфирной или

амидной связью, а при C(2) - короткоцепной ($C_1 - C_4$), кроме тех случаев, когда липиды применяют в качестве медиаторов трансфекции (в этом случае гидрофобный домен состоит из двух длинноцепных насыщенных или ненасыщенных заместителей). Катионная головка - гетероциклического или алифатического ряда должна быть присоединена к глицериновому скелету либо непосредственно, либо с помощью спейсерной группы длиной от 1 до 8 углеродных атомов.

Учитывая широкий спектр биологического действия катионных липидов алкильного типа, интересным представляется создание конъюгатов этих соединений с другими классами биологически активных веществ для достижения аддитивного или синергического эффекта, а также введение в молекулу данных липидов фрагментов, облегчающих проведение биохимических и биофизических исследований (спиновые, флуоресцентные метки и т.д.).

Для развития структурно-функциональных исследований и для выявления потенциальных противоопухолевых агентов, были синтезированы новые модификационные ряды катионных глицеролипидов с простой эфирной связью, содержащих различные функциональные группы в полярном домене (рис. 1).

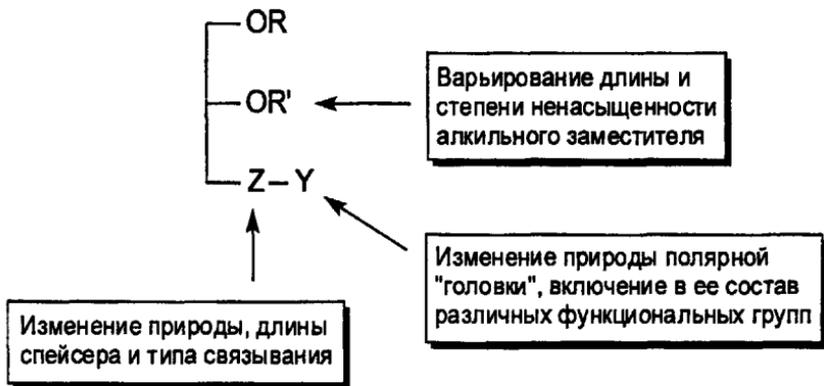


Рис. 1. Общие направления модификации структуры алкильных глицеролипидов.

1. ПОЛУЧЕНИЕ АЛКИЛЬНЫХ ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ В ПОЛЯРНОМ ДОМЕНЕ

В развитие структурно-функциональных исследований в области липидов нами синтезированы новые модификационные ряды глицеролипидов с простой эфирной связью. Изменение отдельных структурных единиц молекулы липида позволит определить влияние такой единицы на эффективность биологического действия, проявляемого данным соединением, а наличие функциональной группы открывает возможности для дальнейшей модификации липида путем присоединения разнообразных биологически активных соединений и маркерных меток.

Наши исследования по синтезу глицеролипидов с простой эфирной связью включали следующие направления модификации: 1) изменение длины и степени ненасыщенности алкильного заместителя при С(2) атоме глицерина, 2) изменение типа полярной группировки с включением в нее различных функциональных групп (гидроксильной, карбоксильной и аминогруппы), 3) изменение типа связи между гидрофильным и гидрофобным доменами, а также длины спейсерной группировки.

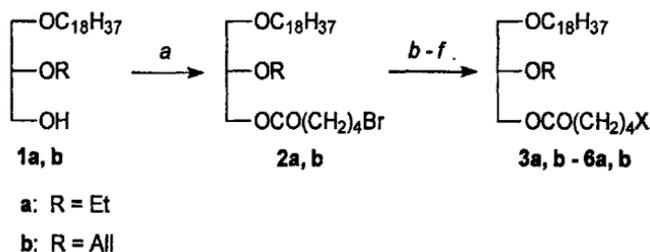
1.1. Синтез функционализированных глицеролипидов с полярными головками, представленными аминами гетероциклического и алифатического ряда

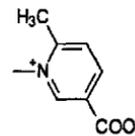
Для получения новых типов катионных липидов был проведен синтез положительно заряженных глицеролипидов с этильным (**Et**) и аллильным (**Al**) заместителями при С(2) положении глицерина и различными полярными «головками», присоединенными к глицериновому скелету через спейсерную группу, представленную остатком валериановой кислоты (схема 1).

Ключевыми соединениями в синтезе липидов **3a, b, 5a, и 6a, b** являлись гас-1-октадецил-2-этил-3-(5-бромпентаноил)глицерин (**2a**) и гас-1-октадецил-2-аллил-3-(5-бромпентаноил)глицерин (**2b**), которые были получены ацилированием исходных диглицеридов 1a, b хлорангидридом 5-бромвалериановой кислоты в присутствии пиридина (Py) с выходом 92%. Введение в молекулу липида катионной «головки», содержащей функциональную группу, проводилось путем кватернизации соответствующего третичного амина бромидом **2a** и **2b** в присутствии NaI в среде безводного диметилсульфоксида (ДМСО). Замена брома в условиях реакции Финкельштейна на более реакционноспособный йод позволила сократить продолжительность и смягчить температурный режим процесса, что помогло

избежать осмоления продуктов реакции. Реакцией бромидов **2a, b** с соответствующими аминами, содержащими функциональные группы, были получены липиды **3a, b** и **4a** с катионными группами алифатического ряда. После хроматографической очистки на силикагеле выходы данных соединений составили 65-78%.

Схема 1



Соединение	X	Соединение	X
3a, b	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N}^+ - (\text{CH}_2)_2\text{OH} \text{ } \Gamma \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	5a	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N}^+ - (\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{CH}_3 \\ 2 \text{CF}_3\text{COO}^- \end{array} $
4a	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N}^+ - (\text{CH}_2)_2\text{NHВос} \text{ } \Gamma \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	6a, b	

Реагенты и условия

Соединение	Стадия	Реагенты	Температура, °C	Время, ч	Выход, %
2a, b	a	Br(CH ₂) ₄ COCl, Py / CHCl ₃	20	0.5	92, 92
3a, b	b	Me ₂ N(CH ₂) ₂ OH, NaI / ДМСО	70	5	68, 65
4a	c	Me ₂ N(CH ₂) ₂ NHВос, NaI / ДМСО	70	4	78
5a	d	TFA / CH ₃ Cl	0	0.75	76
6a, b	f	Калиевая соль 6-метилникотиновой кислоты, NaI / CHCl ₃ , MeOH	100	3	74, 73

В случае синтеза липида **5a**, содержащего аминогруппу в катионной головке, непосредственная кватернизация **N,N**-метилэтилендиамина приводила к образованию большого количества побочных продуктов. Поэтому, первым этапом синтеза явилось получение Вос-защищенного соединения **4a**. Последующее

удаление защиты трифторуксусной кислотой (TFA) в хлороформе приводило к образованию глицеролипида 5a, содержащего в полярной головке аминогруппу в виде трифторацетатной соли.

Анализ условий реакции кватернизации калиевой соли 6-метилникотиновой кислоты бромидом 2a, б показал, что для получения липидов **6a, б** требуется более жесткий температурный режим реакции. Выходы этих липидов, полученных в цвиттер-ионной форме, составили 74% и 73%, соответственно.

Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии подтвердили структуру полученных катионных глицеролипидов (таблица 1).

Таблица 1

Физико-химические характеристики липидов **3a, б, 5a и 6a, б**

Соединение	Масс-спектр, m/z (MALDI-MS)	Спектр ЯМР ^1H , м.д.	
		CH_2N^+	катионная группа
3a	544.7 [M-I] ⁺	м, 3.75-3.81	с, 3.38 N ⁺ Me ₂ ; м, 3.58-3.69 N ⁺ CH ₂ CH ₂ OH; м, 4.13-4.22 N ⁺ CH ₂ CH ₂ OH
3b	556.2 [M-I] ⁺	м, 3.57-3.77	с, 3.34 N ⁺ Me ₂ ; м, 3.57-3.77 N ⁺ CH ₂ CH ₂ OH; м, 4.05-4.17 N ⁺ CH ₂ CH ₂ OH
5a	544.8 [M-2CF ₃ COO] ⁺	м, 3.65-3.92	уш.с., 8.60 N ⁺ H ₃ ; м, 2.96 CH ₂ N ⁺ H ₃
6a	614.8 [M+Na] ⁺	м, 4.28-4.37	д, 7.22, д.д, 8.15 и с, 9.07 протоны пиридинового кольца; с, 2.60 CH ₃
6b	626.8 [M+Na] ⁺	м, 4.26-4.38	д, 7.25, д.д, 8.16 и с, 9.10 протоны пиридинового кольца; с, 2.61 CH ₃

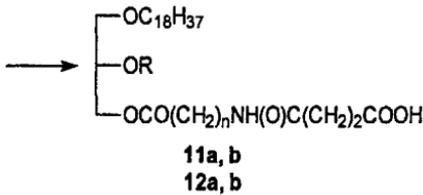
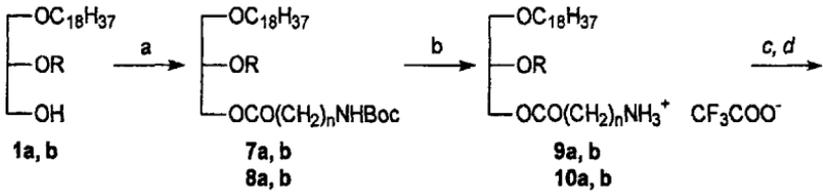
1.2. Синтез алкильных глицеролипидов со спейсерными группами различного типа и длины

Из литературных источников известно, что длина и тип спейсерной группы, соединяющей гидрофобный и гидрофильный домены липида, влияют на его биологическую активность. В связи с этим нами были синтезированы липиды, отличающиеся не только типом полярной группировки, но и длиной спейсера.

1.2.1. Получение катионных липидов с пептидами, представленными остатками длинноцепных аминокислот

Для выяснения влияния длины пептидной группы на биологическую активность соединения нами были синтезированы положительно заряженные глицеролипиды, содержащие остатки 6-аминогексановой и 11-аминоундекановой кислот при С(3) атоме глицеринового скелета (схема 2).

Схема 2



Соединения	R	n
7a, 9a, 11a	Et	10
7b, 9b, 11b	All	10
8a, 10a, 12a	Et	5
8b, 10b, 12b	All	5

Реагенты и условия

Соединение	Стадия	Реагенты	Температура, °C	Время, ч	Выход, %, (a/b)
7a, b	a	ВосNH(CH ₂) ₁₀ COOH, DCC / Py	20	1.5	78/74
8a, b		ВосNH(CH ₂) ₅ COOH, DCC / Py			73/70
9a, b;	b	TFA / CH ₃ Cl	40	1.5	93/91
10a, b					90/90
11a, b;	c	Et ₃ N / CH ₃ Cl	20	1	91/89
12a, b					d

Путем прямого ацилирования гас-1-октадецил-2-этилглицерина (**1a**) и гас-1-октадецил-2-аллилглицерина (**1b**) N-Вос-11-аминоундекановой или N-Вос-6-аминогексановой кислотами в среде пиридина в присутствии DCC были получены соответствующие Вос-производные **7a, b** и **8a, b**, которые после очистки с помощью колоночной хроматографии на силикагеле были выделены с выходами 70-78%. Структура полученных липидов подтверждена данными масс-спектров, а также ¹H-ЯМР-спектров, в которых наблюдались сигналы, относящиеся к протонам нововведенных элементов: синглет ($\delta = 1.42$ м.д.) Vu^1 -группы и триплет ($\delta = 2.31$ м.д., $J 7.3$ Гц) $\alpha\text{-CH}_2\text{COO}$ -группы остатков Вос-защищенных аминокислот.

Последующее удаление Вос-защиты действием трифторуксусной кислоты в хлороформе приводило к образованию гас-1-октадецил-2-этил/аллил-3-(11-аммиоундеканоил)глицеринов (**9a, b**) и гас-1-октадецил-2-этил/аллил-3-(6-аммиогексаноил)глицеринов (**10a, b**) в виде трифторацетатных солей с выходами 90-93%. ¹H-ЯМР-спектры данных липидов указывали на отсутствие сигнала протонов Vu^1 -группы при 1.42 м.д., что свидетельствует о полном удалении защитной группировки.

Полученные катионные глицеролипиды можно использовать для проведения структурно-функциональных исследований с целью выявления влияния длины спейсера на противоопухолевую активность, предположительно проявляемую данными веществами. С другой стороны, при действии триэтиламином в хлороформе на вышеупомянутые трифторацетатные соли **9a, b** и **10a, b** они легко переходят в соединения, содержащие свободную аминогруппу, на базе которой возможны дальнейшие превращения этих липидов. Так, взаимодействие данных свободных аминов с янтарным ангидридом в присутствии Py и каталитического количества *N,N*-диметиламинопиридина (DMAP) приводит к получению глицеролипидов **11a, b** и **12a, b**, содержащих карбоксильную группу в полярном домене. Строение полученных соединений было подтверждено данными ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

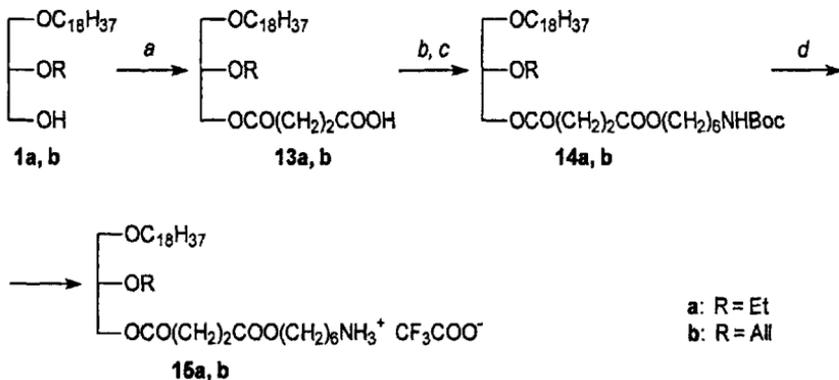
12.2 Получение алкильных глицеролипидов со спейсером сукцинильной природы

В данной части диссертационной работы при синтезе липидов мы изменяли как длину спейсерной группы, так и природу полярной «головки».

Взаимодействие гас-1-октадецил-2-этилглицерина (**1a**) и гас-1-октадецил-2-аллилглицерина (**1b**) с янтарным ангидридом в присутствии каталитического количества DMAP приводило к гас-1-октадецил-2-этил/аллил-3-сукцинилглицеринам

(13a, b) с выходами 97% и 96%, соответственно. Последние действием тионилхлорида переводили в хлорангидриды, которые затем вводили в реакцию с *N*-Вос-6-аминогексанолом в присутствии пиридина (схема 3). Выходы соединений 14a, b составили 91% и 88%, соответственно, а наличие в ¹H-ЯМР-спектрах характеристических сигналов **Bu^t-групп** подтвердило присутствие в их структуре Вос-защитной группы. Трифторацетатные соли гас-1-октадецил-2-этил-3-(6-аммионогексил)сукцинилглицерина (15a) и гас-1-октадецил-2-аллил-3-(6-аммионогексил)сукцинилглицерина (15b) получали аналогично соединениям 9a, b и 10a, b действием трифторуксусной кислоты в хлороформе. После хроматографической очистки выходы полученных соединений составили 92 и 91%, соответственно. Структура синтезированных соединений подтверждена данными ¹H-ЯМР- и масс-спектров.

Схема 3



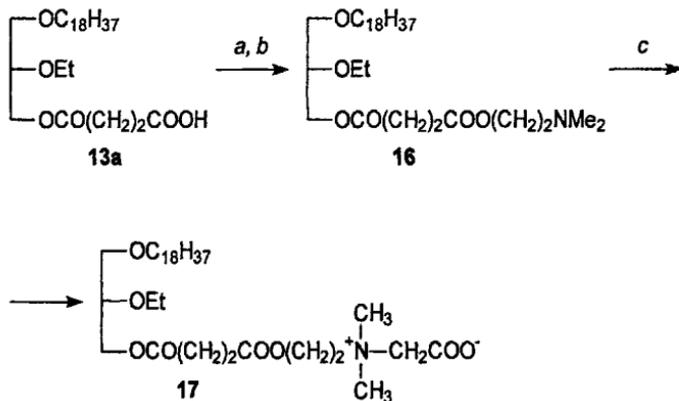
Реагенты и условия: а) янтарный ангидрид, DMAP, Py, DMSO, CHCl₃, 3 ч, 100°C, 97% и 96%; б) SOCl₂, CHCl₃, 8 ч, 20°C, в) ВосNH(CH₂)₆OH, Py, CHCl₃, 25 мин., 20°C, 91% и 88%; г) трифторуксусная кислота (TFA), CHCl₃, 1.5 ч., 40°C, 92% и 91%.

Далее нами был получен липид со спейсерной группой, укороченной на 4 метиленовых фрагмента (схема 4). Как и в случае соединений 14a, b, реакцией гас-1-октадецил-2-этил-3-сукцинилглицерина (13a) с тионилхлоридом, а затем с *N,N*-диметилаэтаноломином получали амин 16. После хроматографической очистки выход последнего составил 90%.

Для введения карбоксильной группы в гидрофильный домен проводилась кватернизация третичного амина 16 натриевой солью иодуксусной кислоты. В результате реакции липид 17, также как и глицеролипиды 6a, b, был получен в цвиттер-ионной форме. При сравнении спектров ¹H-ЯМР соединений 16 и 17

наблюдался сдвиг сигнала протонов метильных групп при атоме азота в область слабого поля ($\delta = 2.25$ м.д. для **16** и $\delta = 3.29$ м.д. для **17**) и появление сигнала протонов группы $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ - синглета с химическим сдвигом 3.90 м.д., что подтверждает наличие в молекуле липида остатка уксусной кислоты.

Схема 4



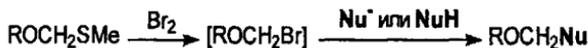
Реагенты и условия: а) SOCl_2 , CHCl_3 , 8 ч, 20°C , б) $\text{Me}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, Py , CHCl_3 , 25 мин, 20°C , 90%, в) ICH_2COONa , MeOH , CHCl_3 , 5 ч, 60°C , 70%.

1.3. Синтез функционализированных алкильных липидов с ацетальной связью между гидрофильными гидрофобным доменами.

Для расширения области поиска соединений, обладающих биологической активностью мы предприняли синтез алкильных глицеролипидов с ацетальной связью между гидрофильным и гидрофобным участками молекулы.

При получении липидов такого типа в качестве исходных соединений обычно используют метилтиометилвые эфиры диглицеридов, которые при взаимодействии с бромом легко образуют высокорекреационноспособные α -бромэфиры, реагирующие с нуклеофильными реагентами различного типа (схема 5).

Схема 5

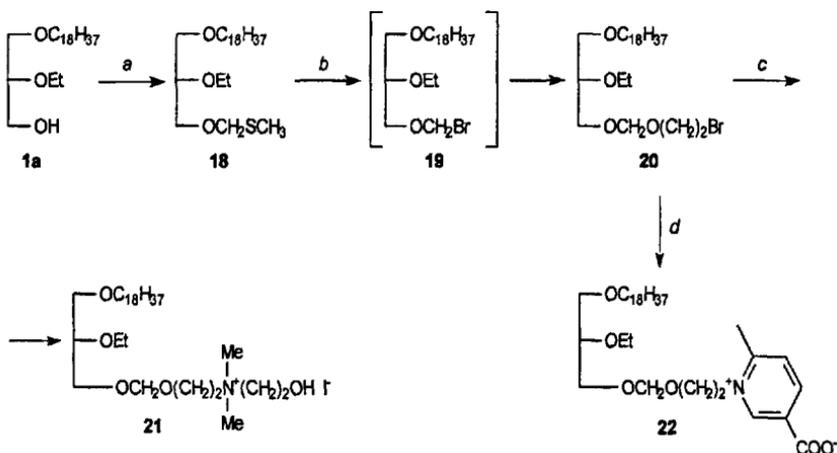


$\text{Nu} = \text{CN}, \text{F}, \text{N}_3, \text{OMe}, \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$

Таким образом, на основе гас-1-октадецил-2-этил-3-метилтиометилглицерина (18) нами были синтезированы алкильные глицеролипиды с гидроксильной (21) и карбоксильной (22) группами в полярном домене (схема 6).

гас-1-Октадецил-2-этилглицерин (1a) переводили в соответствующий метилтиометилэфир 18 обработкой смесью ДМСО-уксусный ангидрид-уксусная кислота (мольное соотношение 6.5: 3.4 : 1) в течение 72 ч.

Схема 6



Реагенты и условия: а) ДМСО-Ас₂О-АсОН, 20°С, 72 ч, 86%; б) Br₂, 2,6-лутидин, Br(CH₂)₂ОН, дихлорэтан, 20°С, 20 мин., 56%; в) Me₂N(CH₂)₂ОН, NaI, ДМСО, 70°С, 5 ч., 62%; д) калиевая соль 6-метилникотиновой кислоты, MeОН, CHCl₃, NaI, 100°С, 3 ч., 71%.

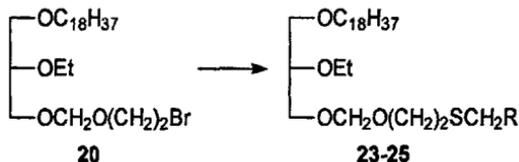
Для получения ключевого соединения 20 на метилтиометилэфир диалкилглицерина 18 воздействовали бромом в присутствии 2,6-лутидина. Образующийся α-бромэфир 19 без выделения вводили во взаимодействие с 2-бромэтанолом. В результате после хроматографической очистки соединение 20 было получено с выходом 56%. ¹Н-ЯМР-спектр данного соединения содержит характеристический сигнал протонов ацетальной группы - синглет с химическим сдвигом 4.73 м.д.

Функционализированные липиды 21 и 22 синтезировали аналогично соединениям 3а, б и 4а, переводя их в четвертичные аммониевые производные путем кватернизации бромидом 20 соответствующих аминов.

Кроме того, на основе соединения 20 были получены серосодержащие глицеролипиды, содержащие гидроксильную, карбоксильную или аминогруппу в полярном домене.

Взаимодействием бромида 20 с соответствующими меркаптанами в среде безводного этанола в присутствии избытка KOH были получены функционализированные липиды 23-25 (схема 7). Во избежание окисления SH-группы в процессе реакции синтез проводили в атмосфере аргона.

Схема 7



Реагенты и условия: HSCH₂R, KOH, EtOH, 5 ч, 20°C.

Соединение	R	Выход, %
23	-CH ₂ OH	77
24	-COOH	72
25	-CH ₂ NH ₂	65

После хроматографической очистки полученные соединения были выделены с выходами 65-77%, а данные ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии подтвердили их структуру.

Дальнейшие модификации полученных соединений можно проводить не только по функциональным группам, но и по атому серы с целью получения положительно заряженных глицеролипидов с катионной головкой сульфониевого типа.

Таким образом, в результате проделанной работы были получены новые модификационные ряды глицеролипидов алкильного типа, отличающиеся по определенным структурным доменам (рис. 2). Характерной особенностью полученных соединений является наличие функциональной группы (карбоксильной, гидроксильной или аминогруппы) в полярном домене, что позволяет проводить дальнейшие химические превращения данных липидов, с целью поиска потенциальных терапевтически активных веществ, а также для проведения биохимических и биофизических исследований.

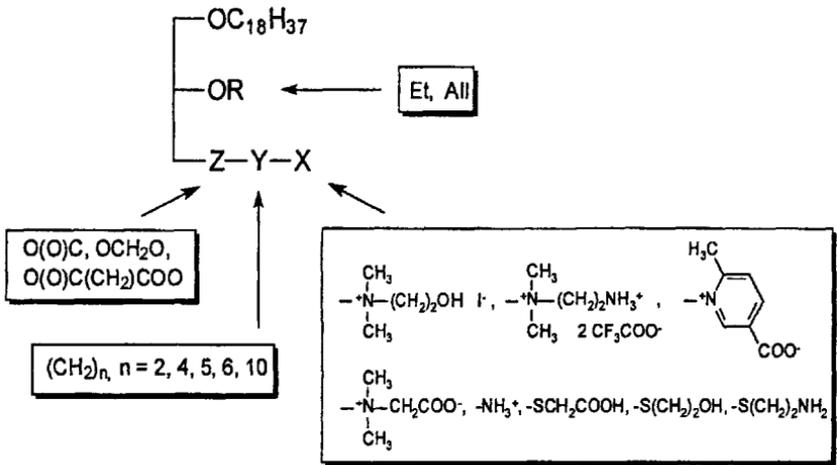
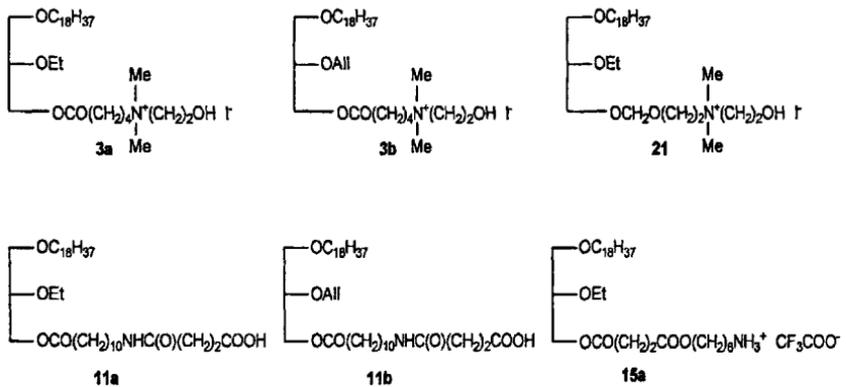


Рис. 2. Проведенные модификации структуры алкильных глицеролипидов.

2. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ЛИПИДОВ

2.1. Исследование цитотоксического действия синтезированных соединений

Для поиска потенциальных противоопухолевых агентов нами проводилось изучение цитотоксичности отдельных представителей всех типов синтезированных липидов, а именно - **3a, b, 11a, b, 15a** и **21**. Различия в строении соединений данного ряда позволяют проследить и выявить влияние отдельных структурных элементов на появление у этих глицеролипидов противоопухолевой активности.



Изучение цитотоксической активности исследуемых липидов проводили с использованием колориметрического МТТ-теста на клетках лейкоза человека K562 и на неопухолевых фибробластах кожи¹.

Исходя из полученных данных (рис. 3) можно заключить, что наиболее токсичными для клеток лейкоза оказались липиды **3a** и **21** (IC_{50} 4.7 ± 1.0 мкМ и 4.0 ± 0.9 мкМ, соответственно). В то время как IC_{50} Эдельфозина, проходящего клинические испытания, для этих же клеток составляет 57.9 ± 3.2 мкМ [Civoli F., Daniel LW. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 1998. - Vol. 42. - P. 319-326]. Остальные соединения (**3b**, **11a**, **b** и **15a**) проявили более низкую цитотоксическую активность.

Полученные результаты позволяют сделать выводы о влиянии отдельных структурных единиц на активность липида. Так, введение ненасыщенного аллильного заместителя вместо этильного в С(2) положение глицерина (липиды **3a** и **3b** или **11a** и **11b**) снижает противоопухолевую активность соединения. Отсутствие в молекуле катионной группы также уменьшает цитотоксичность соединения (**15a** и **11a**, **b**). В то же время изменение типа связи между гидрофильным и гидрофобным доменами не оказывает заметного влияния на активность липида (соединения **3a** и **21**).

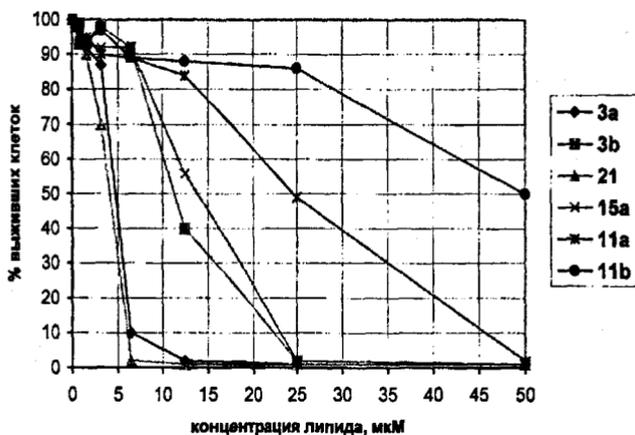


Рис. 3. Токсичность алкильных глицеролипидов **3a**, **b**, **11a**, **b**, **15a** и **21** по отношению к опухолевым клеткам лейкоза человека K562. Время инкубации клеток с липидами - 72ч.

¹ Экспериментальная работа выполнена д.м.н. Штилем А.А. в лаборатории механизмов клеточной гибели НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина, РАМН.

Одним из главных требований, предъявляемых к противораковым препаратам, является их минимальная токсичность для неопухолевых клеток. Для выяснения этого аспекта были проведены испытания образцов липидов на токсичность по отношению к неопухолевым фибробластам кожи.

В соответствии с экспериментальными данными, представленными на рис. 4., катионные липиды **3a, b, 11a, b, 15a и 21** оказались гораздо менее токсичными по отношению к неопухолевым фибробластам кожи, чем к злокачественным клеткам. При этом наблюдались те же структурно-функциональные закономерности, которые были обнаружены для клеток K562, кроме влияния типа связи между гидрофильным и гидрофобным участками. Так, липид 21 с кислотолabileй ацетальной связью обладает намного большим IC_{50} (38.2 ± 2.0 мкМ), чем липид 3a, у которого гидрофильный домен присоединен к гидрофобному участку сложноэфирной связью (IC_{50} 9.0 ± 1.2 мкМ).

Таким образом, исследования цитотоксичности синтезированных алкильных глицеролипидов **3a, b, 11a, b, 15a и 21** позволили проследить влияние таких структурных элементов, как длина и степень ненасыщенности заместителя в C(2) положении глицерина, природа полярной «головки» и тип связи между гидрофильным и гидрофобным доменами, на противоопухолевую активность этих соединений. По результатам биологических испытаний липиды 3a и 21, обладающие низкой IC_{50} для опухолевых клеток K562 и малотоксичные для нормальных клеток, были рекомендованы для дальнейших исследований с целью изучения возможности их применения в качестве противоопухолевых агентов.

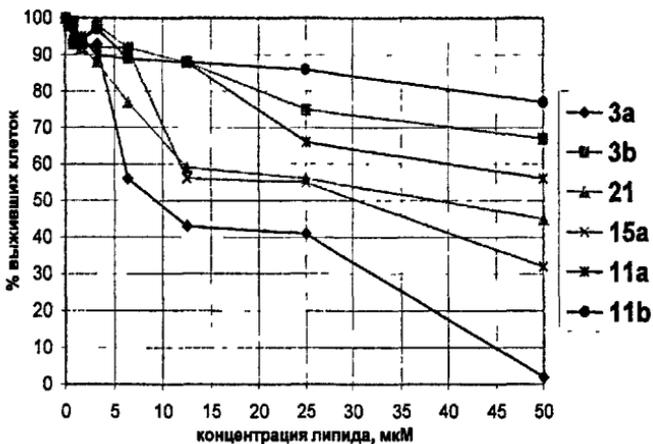
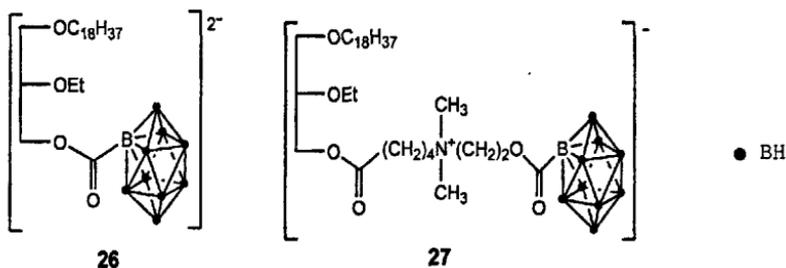


Рис. 4. Токсичность синтезированных глицеролипидов **3a, b, 11a, b, 15a и 21** по отношению к неопухолевым фибробластам кожи. Время инкубации клеток с липидами - 72 ч.

2.2. Изучение возможности применения катионных глицеролипидов алкильного типа борнейтронзахватной терапией раковых опухолей

Из литературных источников известно, что положительно заряженные алкильные глицеролипиды с короткоцепными заместителями при С(2) атоме глицерина обладают способностью накапливаться в раковых клетках. В связи с этим целесообразным представляется изучение возможности применения таких липидов для доставки соединений бора в опухолевые клетки, что лежит в основе одного из перспективных методов лечения рака - борнейтронзахватной терапии (БНЗТ).

С этой целью гас-1-октадецил-2-этилглицерин (1а) и гидроксилсодержащий катионный глицеролипид 3а были переданы в Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, где на их основе были синтезированы борсодержащие липофильные соединения 26 и 27².



В отличие от положительно заряженного липида 3а, в опытах *in vitro* соединения 26 и 27 оказались малотоксичными и для опухолевых (А) и для нормальных (В) клеток (рис. 5).

Предварительные опыты *in vivo*³ показали, что для соединения 27 накопление бора в опухоли (меланома В-16) в 1.4 раза больше (11.3 мкг В/г), чем для BSH - одного из двух препаратов для БНЗТ, используемых в мировой практике для клинической БНЗТ. В случае соединения 26 концентрация бора в опухолевой ткани была 5.3 мкг/г - в 2 раза ниже, чем требуется для проведения БНЗТ.

² Данная работа проведена под руководством с.н.с., к.х.н. Жижина К.Ю. в лаборатории энергоемких веществ и материалов, ИОХ им. Н. С. Курнакова, РАН.

³ Эксперименты *in vivo* проведены к б.н. Григорьевой Е.Ю. в лаборатории радиоизотопных методов исследования, НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина, РАМН.

На основании полученных экспериментальных данных борсодержащее липофильное производное 27 можно рекомендовать для дальнейших исследований с целью выяснения возможности его использования в борнейтронзахватной терапии рака.

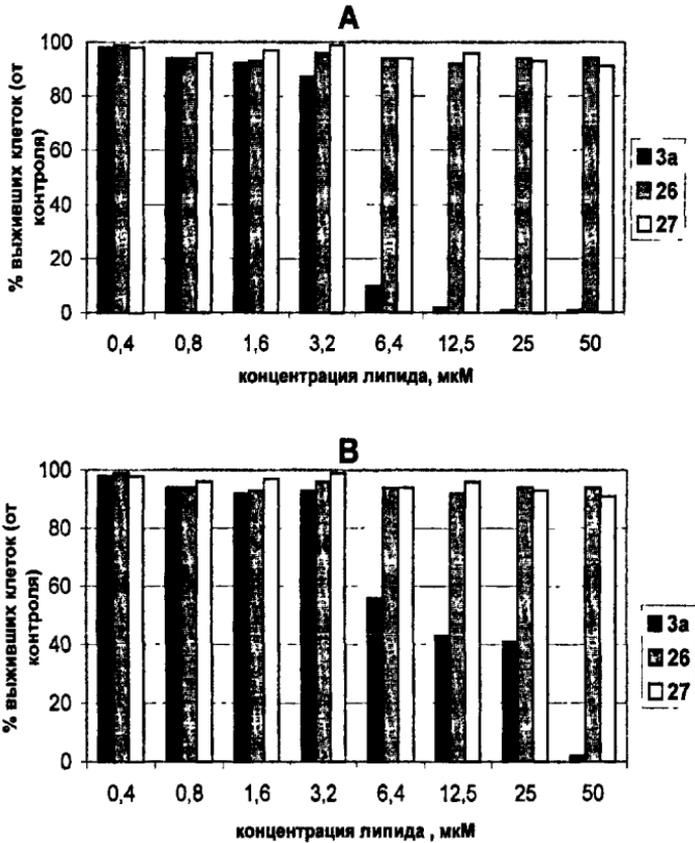


Рис. 5. Токсичность катионного глицеролипида **3a** и карбонил-клозо-боратных липофильных производных **26** и **27** по отношению к клеткам K562 (А) и неопухолевым фибробластам кожи (Б). Инкубация клеток с данными соединениями продолжалась 72 ч.

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы новые глицеролипиды с набором алкильных короткоцепных заместителей при С(2) атоме углерода и аммониевыми «головками» гетероциклического и алифатического ряда, содержащими различные функциональные группы.
2. Созданы модификационные ряды алкильных глицеролипидов, в которых гидрофильный домен отделен от гидрофобного участка спейсерными группами различной длины.
3. С использованием метода метилтиометилловых эфиров получены новые функционализированные глицеролипиды алкильного типа с ацетальной связью между гидрофильным и гидрофобным доменами.
4. Липиды наработаны в количествах, достаточных для биологических испытаний на противоопухолевую активность *in vitro*, по результатам которых выявлены соединения, перспективные для дальнейших исследований.
5. Показана перспективность дальнейшего исследования липофильного борсодержащего соединения 27, полученного на основе катионного глицеролипида 3а с гидроксильной группой в полярном домене, для использования в борнейтронзахватной терапии.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Плявник Н.В., Маслов М.Л., Серебренникова Г.А. Синтез катионных глицеролипидов алкильного типа с функциональными группами в полярном домене. // Биоорганическая химия. - 2004. - Т. 30, № 5. - С. 507-511.
2. Плявник Н.В., Серебренникова Г.А. Синтез катионных алкильных глицеролипидов с функциональными группами в полярном домене. // Ученые записки МИТХТ. - 2003. - Вып. 8. - С. 36-38.
3. Маслов М.А., Серебренникова Г.А., Морозова Н.Г., Альшээйби З.Я., Константинова Т.В., Плявник Н.В. Катионные липиды и перспективы их применения в генной терапии. // Тезисы научных докладов 1-го Международного Конгресса «Биотехнология - состояние и перспективы развития». - Москва. - 2002. - С. 31.

4. Плявник Н.В., Серебренникова Г.А. Получение положительно заряженных функционализированных глицеролипидов. // Тезисы научных докладов III съезда биохимического общества. - Санкт-Петербург. - 2002. - С. 354.
5. Плявник Н.В., Серебренникова Г.А. Синтез положительно заряженных глицеролипидов алкильного типа с функциональными группами в гидрофильном домене. // Материалы VIII Международной научно-технической конференции «Научоемки химические технологии - 2002». - Уфа. - 2002. - С. 98.
6. Серебренникова Г.А., Морозова Н.Г., Маслов М.А., Соколова Т.В., Плявник Н.В. Разработка методов синтеза физиологически активных катионных липидов с различным набором спиртов, гидрофобных компонентов, азотистых оснований и аминокислот с целью использования их в генной терапии и других областях медицины. // Тезисы докладов отчетной конференции за 2002 год «Химия и химические продукты». - Москва. - 2003. - С. 183-184.
7. Плявник Н.В., Серебренникова Г.А. Разработка методов синтеза катионных глицеролипидов, содержащих гидроксильную и аминогруппу в полярном домене. // Тезисы докладов X Международной научно-технической конференции «Научоемки химические технологии - 2004». - Волгоград. - 2004. - Т. 1. - С. 217-218.
8. Лисовский М.В., Плявник Н.В., Серебренникова Г.А., Жижин К.Ю., Малинина Е.А., Кузнецов Н.Т. Получение новых липофильных производных кластерных анионов бора $[B_{10}H_{10}]^{2-}$ и $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ для нейтронозахватной терапии. // Тезисы докладов X Международной научно-технической конференции «Научоемки химические технологии - 2004». - Волгоград. - 2004. - Т. 1. - С. 271-274.
9. Лисовский М.В., Плявник Н.В., Серебренникова Г.А., Жижин К.Ю., Малинина Е.А., Кузнецов Н.Т. Карбонил-клозо-боратные анионы $[2-B_{10}H_9(CO)]^-$ и $[B_{12}H_{11}(CO)]^-$ в синтезе липофильных соединений. // Журн. неорганической химии, (в печати).
10. Plyavnik N.V., Maslov M.A., Serebrennikova G.A. Synthesis of novel alkyl-type functionalised glycerolipids from methylthiomethyl ethers // Mendeleev Commun. (in press).

24687

Принято к исполнению 22/11/2004
Исполнено 23/11/2004

Заказ № 478
Тираж 90 экз

ООО«11-й ФОРМАТ»ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр т, 20-2-93
(095) 747-64-70
(095) 318-40-68
[www autoreferat ru](http://www.autoreferat.ru)