

На правах рукописи

АНДИЯ-ПРАВДИВЫЙ ЮЛИАН ЭНРИКЕВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ ГЕМОЛИЗА  
ЗАРЯЖЕННЫМИ СУБСТАНЦИЯМИ**

02.00.10. - Биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук



Москва-2004

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Московской Государственной Академии тонкой химической технологии имени М.В. Ломоносова.

**Научный руководитель:**

доктор химических наук, профессор

Каплун Александр Петрович

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук, профессор

Варламов Валерий Петрович

кандидат химических наук,  
ст.научный сотрудник

Водовозова Елена Львовна

**Ведущая организация:**

Институт Биохимии им. А.Н.Баха РАН

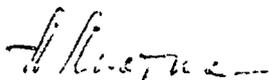
Защита диссертации состоится "26" апреля 2004 года в 15 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.120.01 при Московской Государственной Академии тонкой химической технологии имени М.В. Ломоносова по адресу: 119571, Москва, пр. Вернадского, 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Академии (119831, Москва, М. Пироговская, 1).

Автореферат разослан "22" марта 2004 года.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета  
кандидат химических наук



Лютик А.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Система комплемента (набор более 30 белков плазмы крови), появившаяся 600-700 миллионов лет назад, является важнейшей частью иммунной системы. Система комплемента обеспечивает связь между врожденным и адаптивным иммунитетом, усиливая гуморальный ответ. Атака комплементом сенсibilизированных антителами клеток приводит к их лизису. При этом выделяются факторы воспаления (C3a, C5a), которые индуцируют хемотаксис лейкоцитов к очагу воспаления, опсонизируют чужеродные бактерии, способствуя их фагоцитозу. Очищая организм от иммунных комплексов, система комплемента поддерживает внутренний воспалительный гомеостаз. После уничтожения чужеродных тел фагоцитами активация комплемента прекращается. Однако широкий спектр иммунных, аутоиммунных и иммунодефицитных заболеваний, сопровождающихся поражением собственных тканей организма, связан с чрезмерной и/или несвоевременной активацией системы комплемента (B. Morgan, 1994). К группе острых состояний можно отнести респираторный дистресс-синдром взрослых, ишемические повреждения (инфаркт миокарда, скелетных мышц, легких), сепсис, ожоговую, раневую болезнь, астму, повторный (послеоперационный) стеноз сосудов, синдром множественной органной недостаточности, кровотечения, синдром Гийена-Барре. В группу хронических состояний входят пароксизмальная ночная гемоглобинурия, гломерулонефрит, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, болезнь Альцгеймера, отторжение органов при трансплантациях, миастения, рассеянный склероз. Часто активация системы комплемента, приводящая к осложнениям, возникает из-за неполной биосовместимости материалов в аппаратах для гемодиализа, искусственного сердца и др.

Создание ингибиторов комплемента, способных предотвращать его деструктивное действие, - важная задача современной биоорганической химии. Разрабатываются терапевтические препараты на основе природных и рекомбинантных форм естественных ингибиторов системы комплемента (C1-ING и sCRI) (S S. Asghar, 1996). Привлекательность рекомбинантных белков как терапевтических агентов заключена в уже заложенных биологических свойствах. Однако высокая стоимость рекомбинантных белков и их возможная иммуногенность делают перспективными поиск и создание простых и дешевых низкомолекулярных ингибиторов системы комплемента. На сегодняшний день среди противоопухолевых, противовоспалительных, антифибринолитических агентов найдено много ингибиторов активации комплемента *in vitro*. Однако, одни из известных ингибиторов очень токсичны, другие малоактивны. В настоящее время не существует препаратов одобренных FDA (H Assefa, 1999, J D Lambus, 2003)

Несколько лет назад было обнаружено, что заряженные полимеры и липосомы ингибируют систему комплемента. В нашей лаборатории было показано влияние плотности заряда на антигемолитическую активность. Упрощающей модификацией были сконструированы низкомолекулярные заряженные вещества с аналогичными свойствами, и выявлены важнейшие параметры, определяющие эффективность ингибирования комплемента: жесткий гидрофобный скелет с отрицательными зарядами на концах (О.О.Бурделев, 2000).

Данная работа посвящена не просто поиску новых ингибиторов системы комплемента, хотя нам удалось обнаружить высокую антигемолитическую активность дисульфата бетулина ( $IC_{50}=6.9\pm 3.1$  мкМ). Мы исследовали структурные критерии взаимодействия системы комплемента с низкомолекулярными соединениями и установили количественную взаимосвязь «структура - активность» на основе классического метода QSAR для создания более активных эффекторов. Работа выполнена на кафедре биотехнологии МИТХТ в рамках госбюджетной темы НИР 1.5.00 "Синтез новых фармакологически активных веществ и изучение их биологических свойств и методов направленного транспорта с целью создания противоопухолевых, противовирусных, антипаркинсонических средств" и грантов РФФИ №99-04-48793, МАС № 01-04-06327.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в исследовании структурных критериев взаимодействия системы комплемента с низкомолекулярными соединениями. Главным критерием проявления высокой активности, по нашему мнению, является наличие заряженной группы в молекуле ингибитора. Таким образом, было необходимо установить дополнительные структурные критерии эффективного ингибирования, а именно: количество зарядов в структуре, их природа, расстояние между ними, особенности строения углеродного скелета между зарядами. Важнейшими задачами работы стали установление количественной взаимосвязи «структура - активность» в ряду полученных соединений и поиск возможных молекулярных мишеней.

Для этого предполагалось:

- синтезировать производные бисфенола А с различными анионными группами (карбокисильными, фосфатными, сульфатными), определить анионный заместитель, обеспечивающий проявление наибольшей  $AA^1$ , и модифицировать им серию бисфенолов, ароматических спиртов и бетулина;
- получить эффекторы с  $\varepsilon$ -г-анированными с помощью гидрофобных радикалов за-

<sup>1</sup> Список сокращений AA - антигемолитическая активность,  $IC_{50}$  - концентрация ингибитора, обеспечивающая 50%-ное снижение лизиса, яФХ - яичный фосфатидилхолин, RC1q - сыворотка

ряженными группами;

- получить амфифильный ингибитор для встраивания в бислои липосом, установить зависимость между АА и мольной долей активного вещества в липосоме, и определить оптимальное расстояние между парами заряженных групп для создания бидентатного эффектора;
- поскольку среди алифатических дикарбоновых кислот (от C2 до C12) наибольшей АА обладает малоновая кислота (О.О. Бурделев, 2000), для изучения влияния гидрофобности спейсера между зарядами на АА планировалось модифицировать малоновую кислоту гидрофобными заместителями, а именно: бензильным, циклопентильным, фенильным;
- определить АЛ полученных соединений и ряда дикарбоновых кислот аналогичного с бисфенолами строения, установить количественную взаимосвязь между структурой полученных соединений и проявляемой активностью;
- для полученных эффекторов определить возможные молекулярные мишени среди компонентов системы комплемента.

Научная новизна работы. Разработан новый метод сульфатирования бисфенолов, ароматических спиртов и бетулина с высокими выходами при использовании простых и доступных реагентов. Синтез большинства описанных в данной работе соединений осуществлен впервые. Изучена антигемолитическая активность 53 новых низкомолекулярных ингибиторов системы комплемента, установлены структурные критерии для проявления веществами высокой АА:

- наличие одной или двух отрицательно заряженных групп (предпочтительны сульфатная и фосфатная);
- жесткий скелет с объемными гидрофобными заместителями;
- расстояние между заряженными группами должно находиться в пределах 0.9-1.4 нм;
- для двух серий соединений (дисульфатов бисфенолов и ароматических дикарбоновых кислот) предложены уравнения количественной взаимосвязи «структура — активность». Значения АА, рассчитанные по этим уравнениям хорошо согласуются с экспериментальными данными;
- с помощью ИФА установлено снижение функциональной способности субкомпонентов первого компонента комплемента C1q и C1s в присутствии дифосфата бисфенола А (5), дисульфата 9,9-бис-(4'-гидроксифенил)-флуорена (20) и 9,9-бис-(4'-карбоксифенил)-флуорена (40), что указывает на C1 как на молекулярную мишень для исследованных соединений.

Практическая значимость работы. Обнаружены низкомолекулярные соединения, обладающие высокой антигемолитической активностью, что даст основания для их дальнейшего изучения как потенциальных терапевтических препаратов комплемент-ингибирующего действия. Установленные в результате работы структурные критерии взаимодействия системы комплемента с низкомолекулярными соединениями и уравнения количественной взаимосвязи «структура - активность» могут быть использованы для направленного синтеза высокоактивных ингибиторов нового поколения с целью их дальнейшего использования как терапевтических препаратов. Данные препараты могут применяться как для блокирования активации системы комплемента при вызывающих ее острых состояниях (инфаркт миокарда, менингит, септический шок и т.п.), так и для покрытия материалов, используемых в экстракорпоральных устройствах и протезах. Установленная нами высокая АА дисульфата бетулина стала основой заявки на получение патента РФ. Предложен метод определения и расчета АА, позволяющий снизить относительную ошибку измерения АА.

Положения, выносимые на защиту.

1. Метод сульфатирования бисфенолов, ароматических спиртов и бетулина серной кислотой и уксусным ангидридом в пиридине.
2. Метод определения и расчета АА, предусматривающий использование эталонного соединения в каждой серии измерений, что позволяет учитывать отклонение значения АА эталонного вещества от истинного.
3. Субстанции, имеющие жесткий скелет, несущие объемные гидрофобные заместители и отрицательные заряды (предпочтительно сульфатные и фосфатные группы), расположенные на расстоянии 0,9-1,4 нм, обладают свойством эффективно ингибировать комплемент-зависимый гемолиз.
4. Уравнения количественной взаимосвязи «структура-активность» в рядах дисульфатов бисфенолов и ароматических дикарбоновых кислот.
5. Снижение функциональной способности субкомпонентов первого компонента комплемента C1g и C1s в присутствии дифосфата бисфенола А (5), дисульфата 9,9-бис-(4'-гидроксифенил)-флуорена (20) и 9,9-бис-(4'-карбоксифенил)-флуорена (40).

Публикации. По материалам работы опубликованы: 2 статьи и тезисы 5 докладов на научных конференциях. Подана заявка на патент РФ.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на: V конференции "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана" (Москва, Россия, 1999), школе-конференции "Горизонты физико-химической биологии" (Пушино, Россия, 2000), международной конференции молодых ученых "От фундаментальной науки к новым техно-

логиям. Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии" (Москва-Тверь, Россия, 2001), III Съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, Россия, 2002), II Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2003).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Работа изложена на \_\_\_\_\_ страницах, содержит \_\_\_\_\_ рисунков и \_\_\_\_\_ таблиц. Список литературы включает \_\_\_\_\_ источников.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

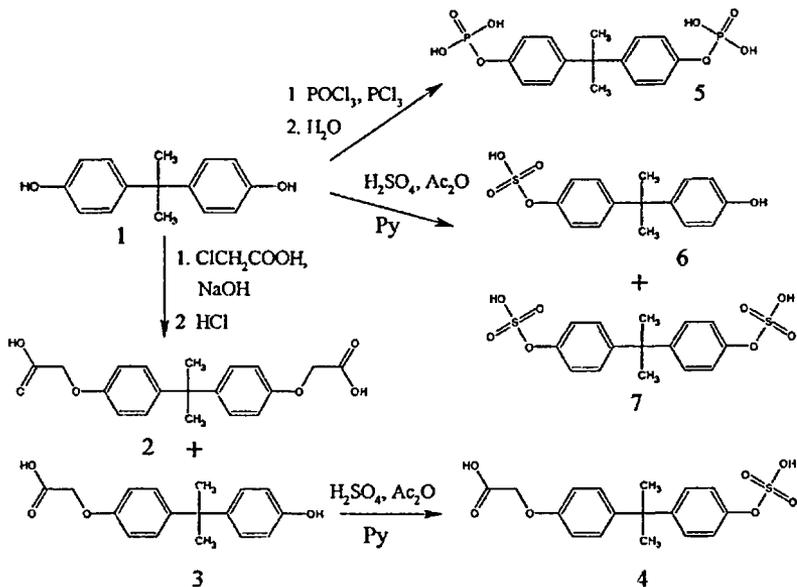
### 1. СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ БИСФЕНОЛА А С РАЗЛИЧНЫМИ АНИОННЫМИ ГРУППАМИ

Для установления структурных критериев проявления веществами высокой АА, необходимо было определить закономерности влияния природы заряженной группы на активность. В качестве исходного соединения для получения молекулярных моделей был выбран бисфенол А (1), как структура с жестким гидрофобным скелетом, позволяющая вводить одну или две сульфатные, фосфатные или карбоксиметильные группы.

О-Карбоксиметилбисфенол А (3) и ди-О-карбоксиметилбисфенол А (2) получали аеллированием бисфенола А хлоруксусной кислотой (схема 1) в щелочной среде при 95°C.

Для получения 2,2-бис-(4'-фосфоноксифенил)-пропана (5) (схема 1) в качестве фосфорилирующего агента использовали хлорокись фосфора. Синтез проводили при температуре 90-95°C. Полученный в ходе реакции тетрахлорфосфат растворяли в теплой воде (при этом происходил гидролиз до дифосфата (5)).

Схема 1.



Разработка метода сульфатирования бисфенола А. Обычно в качестве сульфатирующих агентов для модификации фенолов используют комплекс  $\text{SO}_3$  с пиридином или хлорсульфовую кислоту. Однако, мы обнаружили, что использование этих реагентов для сульфатирования бисфенолов имеет ряд недостатков: низкая конверсия исходного соединения, значительная примесь моносульфата, выделение целевого продукта осложняется присутствием в реакционной смеси большого количества полярных примесей. Разработанный в настоящей работе способ позволяет получать дисульфаты бисфенолов с высоким выходом при использовании простых и доступных реагентов.

Было найдено, что сульфатирование бисфенола А (1) (схема 1) эффективно протекает при использовании шестикратного избытка серной кислоты и уксусного ангидрида в пиридине. При перемешивании в течение 30 мин при  $55-60^\circ\text{C}$  наблюдалась полная конверсия исходного соединения. В реакционной смеси присутствовал преимущественно дисульфат (7) со следовыми количествами моносульфата (6) и продукта О-ацетилирования. Существенное влияние на ход реакции оказывает количество пиридина и порядок прибавления реагентов. По-видимому, до прибавления субстрата в реакционной смеси должны быть созданы условия для образования активного сульфатирующего комплекса - ацетилсульфата.

По окончании реакции смесь охлаждали в ледяной бане и нейтрализовали рас-

твором аммиака. Дисульфат бисфенола Л (7) выделяли в виде аммониевых солей колоночной хроматографией на силикателе. По аналогичной методике (схема 1) был получен сульфат О-карбоксиметилбисфенола А (4).

## 2. СИНТЕЗ ДИСУЛЬФАТОВ БИСФЕНОЛОВ, АРОМАТИЧЕСКИХ СПИРТОВ И БЕТУЛИНА

Определение АА производных бисфенола А с различными анионными заместителями показало, что введение в молекулу бисфенола А сульфатной или фосфатной групп обеспечивает наибольший антигемолитический эффект. Для установления влияния особенностей структуры дисульфатов на активность был выбран для модификации ряд бисфенолов и других диолов, различающихся гидрофобностью заместителей, их объемом, жесткостью скелета, расстоянием между заряженными группами. Таким образом, были синтезированы: ряд дисульфатов бисфенолов (8-34), с различной структурой центрального заместителя и заместителями в бензольных ядрах, но с практически одинаковым расстоянием между заряженными группами; а также дисульфаты резорцина (50), пирокатехина (51), гидрохинона (52), а также дисульфат бетулина (53).

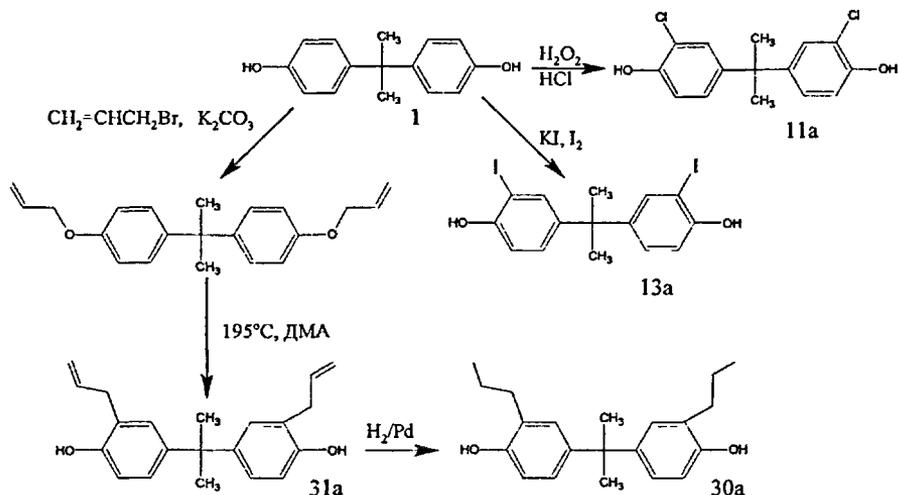
Перечисленные соединения получали по разработанной нами методике сульфатирования бисфенола А (схема 1) с выходами 58-95% (табл.1). Для определения АА сульфаты переводили в натриевые соли прибавлением эквивалентного количества NaOH в метаноле. Получить дисульфаты бисфенолов (35-37) не удалось, по-видимому, не только из-за пониженной нуклеофильности фенольного гидроксила в силу большого электрооакцепторного эффекта заместителей, но и из-за возможных стерических препятствий.

Попытки получить бисфенолы на основе а-нафтола и ацетона, Оf-нафтола и пропаналя не привели к успеху.

## 3. ПОЛУЧЕНИЕ ДИСУЛЬФАТОВ «тр/ло-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИСФЕНОЛА А

Для изучения влияния на активность заместителей в бензольных ядрах бисфенола А были синтезированы ор/ю-замещенные производные бисфенола А (схема 2). Мы предположили, что гидрофобные «зонтики» рядом с заряженными группами создадут экран от сольватной «шубы», усиливая электростатическое взаимодействие эффектора с мишенью.

Схема 2.



Для получения 2,2-бис-(4'-гидрокси-3'-хлорфенил)-пропана (Па) перемешивали смесь бисфенола А, 30%-ного раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  и концентрированной соляной кислоты при комнатной температуре в диэтиловом эфире. Реакцию проводили до полной конверсии  $\text{H}_2\text{O}_2$ , содержание которой определяли йодометрическим методом.

2,2-Бис-(4'-гидрокси-3'-йодфенил)-пропан (13а) получали взаимодействием бисфенола А с раствором йодида калия и йода в 25%-ном водном аммиаке.

Диаллильное производное бисфенола А (31а) получали перегруппировкой Кляйзена из О-аллилового эфира бисфенола А кипячением в дичетиланилине (ДМА). Последующим гидрированием получали дипропильное производное (30а).

Синтезированные орто-замещенные производные бисфенола А (11а, 13а, 30а, 31а) сульфатировали по вышеописанной методике с получением соответствующих дисульфатов (11,13, 30,31).

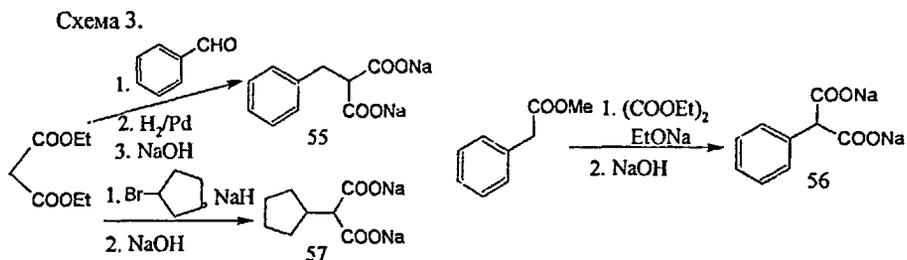
Попытки ввести трет-бутильную группу в молекулу бисфенола А (подбор алкилирующих агентов с различной алкилирующей силой, катализаторов различной активности, растворителей) окончились неудачей. Несмотря на то, что в литературе имеются сведения о получении таких продуктов (выходы до 9%, остальное - продукты разложения), нам удалось выделить лишь моно и ди-трет-бутилфенолы

Модифицировать бисфенол А ацетильными группами в орто-положении так же не удалось. Реакция в условиях перегруппировки Фриса предварительно полученно-

го ди-О-ацетилбисфенола А приводила к 4-ацетилфенолу и исходному бисфенолу Л. По-видимому, в присутствии катализаторов Фриделя-Крафтса молекула бисфенола А неустойчива и распадается.

#### 4. ПОЛУЧЕНИЕ 2-ЗАМЕЩЕННЫХ МАЛОНОВЫХ КИСЛОТ

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что из ряда алифатических дикарбоновых кислот (от C2 до C12) наибольшей активностью обладает малоновая кислота (О.О.Бурделев, 2000). Для изучения влияния гидрофобное™ спейсера на проявляемую активность были синтезированы следующие 2-замещенные аналоги: 2-бензилмалоновая кислота (55), 2-фенилмалоновая кислота (56), 2-циклопентилмалоновая кислота (57). Эфир 2-фенилмалоновой кислоты получали конденсацией Кляйзена с последующим декарбонированием (схема 3). Для получения эфира 2-бензилмалоновой кислоты бензальдегид конденсировали с малоновым эфиром по Кневенагелю с последующим гидрированием. Алкилированием малонowego эфира циклопентилбромидом в присутствии гидрида натрия получали эфир 2-циклопентилмалоновой кислоты. Полученные эфиры гидролизовали до динатриевых солей.

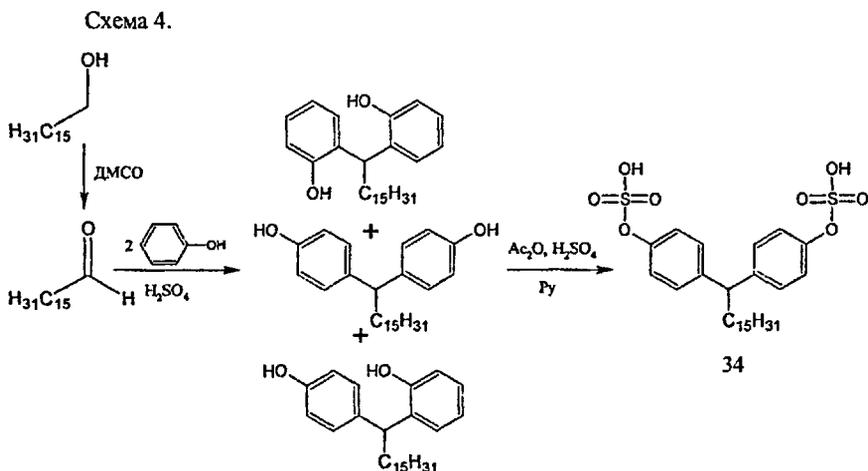


#### 5. СИНТЕЗАМФИФИЛЬНОГОДИСУЛЬФАТА БИСФЕНОЛАДЛЯ ВСТРАИВАНИЯ ВЛИПОСОМЫ

Одним из важнейших этапов конструирования лекарственных препаратов является определение молекулярной мишени, с которой взаимодействует лекарственная субстанция. Так как известно, что отрицательно заряженные полимеры взаимодействуют с Clq, очень вероятно, что и исследуемые эффекторы имеют ту же мишень. У этой молекулы 6 функциональных участков (рис. 2, 3), поэтому связывание эффектора с несколькими из них может приводить к получению более прочного комплекса и, следовательно, к лучшему ингибированию. Для проверки этой гипотезы мы синтезировали дисульфат аналога бисфенола А с жирным хвостом (34) для инкорпорации его в липосомы.

Предлагаемая модель удобна тем, что простым изменением соотношения эф- фектор.липид можно изменять расстояние между парами заряженных групп равномер- но распределенных в бислое (рис. 3).

Синтез дисульфата 1,1-ди-(4'-гидроксифенил)-гексадекана (34) проводили по схеме 4. Окислением пальмитинового спирта диметилсульфоксидом в присутствии пя- тиокиси фосфора получали соответствующий альдегид, который конденсировали с фе- нолом в кислой среде. В результате получали смесь изомерных бисфенолов. После третьей перекристаллизации из толуола выделяли конечный продукт с выходом 7.5%. Выход реакции сульфатирования составил 67%.



Структуру всех полученных соединений подтверждали данными <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии, хроматомасс-спектрометрии и элементного анализа.

## 6. АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

АЛ определяли *in vitro* в гемолитической системе, содержащей бараньи эритроци- ты, сенсibilизированные кроличьими антителами, вероналовый буфер (pH 7.4), ком- пlement морской свинки и раствор исследуемого вещества в различных концентрациях. В результате лизиса эритроцитов происходит высвобождение гемоглобина из эритроци- тов в раствор, по интенсивности окраски которого судят о степени гемолиза. ЛА вы- числяли по формуле:

$$AA = \left( 1 - \frac{AE - ACS - ACE}{AC - ACE} \right) \times 100\% \quad (I),$$

где  $A_E$  - оптическое поглощение при 414 нм в эксперименте,

$A_C$  - оптическое поглощение при 414 нм в контрольном образце системы при 70-80%-ном гемолизе, среднее арифметическое из трех измерений,

$A_{CS}$  - оптическое поглощение при 414 нм в контрольном образце испытуемого вещества (только для окрашенных или светорассеивающих образцов),

$A_{CE}$  - оптическое поглощение при 414 нм в контрольном образце на спонтанный лизис эритроцитов.

В связи со сложностью системы для детектирования АА наблюдается значительный разброс определяемых значений в различных сериях экспериментов. Для учета неконтролируемых изменений условий эксперимента каждая серия определения ЛА включала тестирование эталонного соединения - сульфетрона (49), активность которого составляет  $\text{эт}IC_{50} = 130 \pm 22 \text{ мкМ}$  и определена в более 50 опытах. Для сравнения АА измеряемых соединений рассчитывали значения, приведенные к АА эталона ( $AA_{пр} = IC_{50}^* / IC_{50c}$ , где  $IC_{50}^*$  - экспериментальное значение для исследуемого образца данной серии,  $IC_{50c}$  - значение активности сульфетрона, найденное в этой же серии). Значения АА, представленные в табл. 1, являются произведением  $AA_{пр}$  и  $\text{эт}IC_{50}$ . В результате такой обработки результатов экспериментов удалось значительно сократить разброс получаемых значений.

В результате тестирования было установлено, что все исследованные соединения проявляют АА (табл. 1). Мы установили следующие закономерности.

- Бисфенол А при рН 7.4 не заряжен и не проявляет активности даже при максимальных концентрациях (более 5000 мкМ) Введение одной заряженной группы приводит к появлению активности (541 мкМ, 380 мкМ для карбоксиметильной и сульфатной групп соответственно). Добавление еще одной такой же группы в случае с ди-О-карбоксиметилбисфенолом А (2) ухудшает активность (1022 мкМ), а в случае с дисульфатом бисфенола А (7) улучшает (247 мкМ) Дифосфат показал самую высокую активность (219 мкМ). Добавление карбоксильной группы к моносульфату не изменяет активности.

Таким образом, впервые показано, что для проявления АА достаточно одной анионной группы. Добавление второй отрицательно заряженной группы оказывает положительный, но не очень значительный эффект. Исключение составляет карбоксиметильная группа.

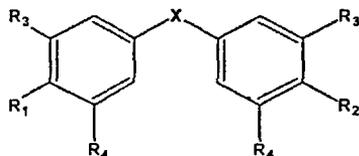
- Установлено, что по сравнению с дисульфатом дифенилолметана (8) (643 мкМ) соединения с объемными гидрофобными заместителями (циклогексильным, флуоренильным, антроновым) при центральном атоме углерода проявляют на порядок большую АА (40-45 мкМ, (19-21)). Этильные группы дисульфата тетрагидродиэтил-

стильбестрола (25), перфторированная углеродная цепь (16), бинафтиловый скелет (33) также обеспечивают высокую АЛ.

Мы установили, что введение атомов галогена в бензольные ядра также значительно увеличивает активность (46-48), причем она возрастает в ряду  $Cl < Br < I$  (11-13). Наибольшую активность проявляет дисульфат бисфенола, модифицированный более объемными и гидрофобными атомами йода (13).

Введение в бензольные ядра двух и четырех метальных групп (9, 10) вызвало неожиданное снижение активности при увеличении общей гидрофобности остова. По-видимому, на АА дисульфатов бисфенолов оказывают влияние электронные свойства заместителей в орто-положениях к сульфатной группе: донорные заместители вызывают снижение АЛ (9, 10), акцепторные - увеличение (11-13). Несмотря на электронодонорные свойства пропилового и аллильного радикалов (30, 31) их более высокая по сравнению с метильными заместителями гидрофобность и способность экранировать заряженные группы придают соединениям (30) и (31) высокую АА.

Табл. 1. Антигемолитическая активность исследованных соединений.

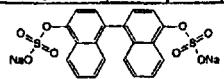
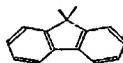
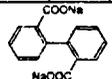
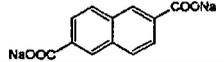
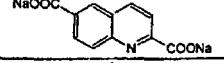
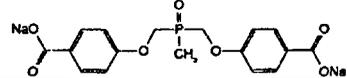
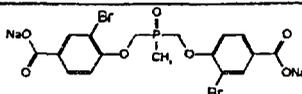
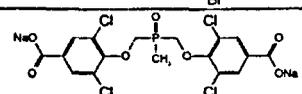


№	R1	R2	R3	R4	-X-	Выход, %	cLogP	IC <sub>50</sub> , мкМ
1	ОН	ОН	Н	Н		-	4.32	>5000
Производные бисфенола А (I) с различными анионными группами								
2	OCH <sub>2</sub> COONa	OCH <sub>2</sub> COONa	Н	Н		36	3.47	1022±54
3	ОН	OCH <sub>2</sub> COONa	Н	Н		52	4.22	541±15
4	OSO <sub>3</sub> Na	OCH <sub>2</sub> COONa	Н	Н		73	3.84	380
5	OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	OPO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	Н	Н		85	5.14	219±12
6	ОН	OSO <sub>3</sub> Na	Н	Н		53	4.26	380±15
7	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Н	Н		76	4.2	247±10
Дисульфаты бисфенолов								
8	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Н	Н	-CH <sub>2</sub> -	83	3.44	643

9	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	CH <sub>3</sub>	H		68	5.14	391±34
10	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		86	6.07	468±44
11	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Cl	H		82	5.24	218±65
12	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Br	H		83	5.79	103±11
13	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	I	H		88	6.72	50±5
14	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		69	5.03	222
15	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Cl	H		62	6.07	37 (IC <sub>30</sub> ) <sup>2</sup>
16	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		68	5.8	95±8
17	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		78	2.58	756±37
18	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		75	5.42	125±32
19	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		85	4.89	45±21
20	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		84	6.27	43±4
21	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		69	5.81	40±11
22	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		- <sup>3</sup>	4.47	237±38
23	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		69	4.18	278±9
24	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		78	3.53	405±34
25	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		79	5.29	169±3
26	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H	-O-	85	2.79	837±69
27			H	H		98	4.9	273±9
28	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H	-N=N-	72	3.66	568±60
29	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H	-SO <sub>2</sub> -	63	2.18	660±10

<sup>2</sup> Вещество обладает гемолитической способностью

<sup>3</sup> Пикосульфат натрия – субстанция препарата «Гутталакс»

30	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Pr	H		67	6.72	122±34	
31	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Allyl	H		63	6.29	175±37	
32	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H	-	81	3.04	494±158	
33						86	5.05	80±9	
34	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	H	H		67	10.16	10 (IC <sub>30</sub> ) <sup>2</sup>	
35	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Cl	Cl		-	6.27	-	
36	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	Br	Br		-	7.37	-	
37	OSO <sub>3</sub> Na	OSO <sub>3</sub> Na	NO <sub>2</sub>	H	-SO <sub>2</sub> -	-	2.09	-	
Дикарбоновые кислоты									
38	COONa	COONa	H	H		- <sup>4</sup>	2.66	1709±185	
39	COONa	COONa	H	H		-	4.26	382	
40	COONa	COONa	H	H		-	6.36	183	
41	COONa	COONa	H	H	-	-	3.13	584±58	
42	COONa	COONa	H	H	-O-	-	2.87	1110±48	
43						-	3.13	2270±230	
44						-	2.45	1200±190	
45						-	1.93	1440±160	
46						-	1.15	3297±499	
47						-	2.73	697±120	
48						-	3.22	352±18	

<sup>4</sup> Дикарбоновые кислоты любезно предоставлены проф Васневым В А (ИНЭОС им Несмеянова РАН)

Другие заряженные структуры				
49		- <sup>3</sup>	5.16	130±31
50	Дисульфат резорцина	58	1.36	1633±218
51	Дисульфат пирокатехина	62	1.36	1831±154
52	Дисульфат гидрохинона	65	1.36	1656±195
53	Дисульфат бетулина	95	9.55	6.9±3.1
2-Замещенные малоновые кислоты				
54	Малоновая кислота	-	-0.52	2418±160
55	2-Бензилмалоновая кислота	55	1.87	2756±430
56	2-Фенилмалоновая кислота	37	1.47	3107±520
57	2-Циклопентилмалоновая кислота	78	1.27	3341±650

Активность полученных 2-замещенных малоновых кислот (55-57), содержащих гидрофобные заместители, не превысила значений АА исходной малоновой кислоты (54). Можно предположить, что малоновые кислоты с расстоянием между зарядами 0.24 нм имеют другую мишень связывания и закономерности, установленные для дисульфатов бисфенолов (расстояние между заряженными группами 0.9-1.4 нм) и дикарбоновых кислот аналогичного бисфенолам строения (0.6-1.3 нм), для 2-замещенных малоновых кислот не выполняются.

Самым активным соединением оказался дисульфат бетулина (53), наиболее гидрофобное соединение. Многие производные выделяемого из березовой коры тритерпена бетулина обладают противораковой, противотуберкулезной (А. Podgrebnyak, 2003), противогрибковой (Р. Krasutsky, 2003), анти-ВИЧ (К. Lee, 2003) активностью. Их отличают высокие терапевтические индексы и низкая токсичность. Установленная нами высокая АА дисульфата бетулина стала основой оформленной нами заявки на патент РФ.

## 7. Количественная взаимосвязь «структура-активность» (QSAR)

В последние десятилетия лекарственная химия широко использует методы математического моделирования для создания новых активных соединений. Компьютерное молекулярное моделирование на основе фрагментного подхода, молекулярный докинг и исследование количественных соотношений «структура-активность» (QSAR) позволяют изучать рецептор-лигандные взаимодействия, предсказывать активность соединений, объединенных в электронные банки данных, оптимизировать уже известные структуры, направлено синтезировать активные соединения.

Сульфетрон любезно предоставлен проф. Голошаповым Н.М (ОЭП «Иммунопрепарат» пос. Зеленая Дубрава, п/о Краснозаводск)

В основе классического метода QSAR лежит регрессионный анализ взаимосвязи между биологической активностью ряда подобных соединений и описывающих их свойства дескрипторов. Среди этих дескрипторов - гидрофобность (LogP), молекулярная рефракция (MR), донорно-акцепторные свойства молекулы, поляризуемость, объем и площадь поверхности молекулы и т. п. Вывести регрессионное уравнение QSAR означает найти физико-химические свойства, оказывающие наибольшее влияние на проявляемую биологическую активность и вычислить значения коэффициентов при описывающих эти свойства дескрипторах (уравнение II).

$$\text{Log}(1/IC_{50}) \approx A \cdot X_1 + B \cdot X_2 + \dots + Y \cdot X_n + D \quad (\text{II}), \text{ где}$$

$X_1 \dots X_n$  - переменные (дескрипторы), описывающие структурные особенности молекул и физико-химические свойства эффекторов;

$A, B, \dots, Y, D$  - коэффициенты и свободный член регрессионного уравнения.

В качестве возможных дескрипторов мы рассматривали гидрофобность (**cLogP**)<sup>6</sup>, расстояние между зарядами, объем и площадь молекулы, молярную рефракцию (MR), поляризуемость (Pol), энергию гидратации (Eh), энергии высшей заселенной и низшей незанятой молекулярных орбиталей ( $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ ), частичные заряды на различных атомах молекулы. Большинство параметров рассчитывались как для всей молекулы, так и для ее фрагментов. Из всего множества дескрипторов для выборки из 21 соединения необходимо было выбрать не более 4-х, значения которых максимально коррелировали с экспериментальными данными, и вывести математическую модель, параметры адекватности которой были бы наилучшими: коэффициент корреляции  $r^2$  стремился к единице, а критерий Фишера F был выше своего табличного значения  $F_{\text{табл}}$ .

В результате построения ряда моделей и оценки их адекватности нами были выбраны следующие значимые структурные переменные:

- для ряда дисульфатов бисфенолов (7-14, 16-23, 25-29) - вычисленная гидрофобность молекулы (**cLogP**), поляризуемость радикала -X- при центральном атоме углерода (Pol), сумма частичных отрицательных зарядов - на углеродных атомах в орто-положении относительно сульфатной группы (Sz). После нормировки значений дескрипторов регрессионное уравнение имеет вид:

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 0.647(\pm 0.093) \cdot \text{cLogP} + 0.616(\pm 0.098) \cdot \text{Pol} - 0.643(\pm 0.101) \cdot \text{Sz} + 15.242(\pm 6.604)$$

$n=21, r^2=0.916, s=0.135, F=61.6$  (III),

<sup>6</sup> Значения дескрипторов были рассчитаны методом PM3 в программе HyperChem Pro 7.0

Хорошую корреляцию экспериментальных и вычисленных значений АА иллюстрирует рис.1. Найденные коэффициенты регрессионного уравнения III показывают, что существует положительная корреляция АА со всеми значимыми дескрипторами. При этом дескрипторы имеют примерно равный вес, что указывает на то, что и гидрофобные, и электростатические (меру которых выражают  $Pol$  и  $S$ ) взаимодействия эффектора с мишенью имеют большое значение.

Соединения (24, 30, 31) составили контрольную группу, значения активности которых были предсказаны с помощью уравнения III:  $cIC_{50}(24)$  218 мкМ (ошибка 85%),  $cIC_{50}(30)$  191 мкМ (36%),  $cIC_{50}(31)$  234 мкМ (25%).

- Для ряда ароматических дикарбоновых кислот (38-48) значимыми дескрипторами оказались гидрофобность молекулы ( $cLogP$ ) и расстояние между зарядами ( $R$ ). После нормировки значений дескрипторов регрессионное уравнение имеет вид:

$$\text{Log}(1/IC_{50})=1.008(\pm 0.191)*cLogP+0.334(\pm 0.172)*R-10.458(\pm 3.248) \quad (IV),$$

$$n=11, r^2=0.791, s=0.195, F=15.2$$

Найденные коэффициенты регрессионного уравнения IV показывают, что гидрофобность вносит наибольший вклад в проявляемую АА.

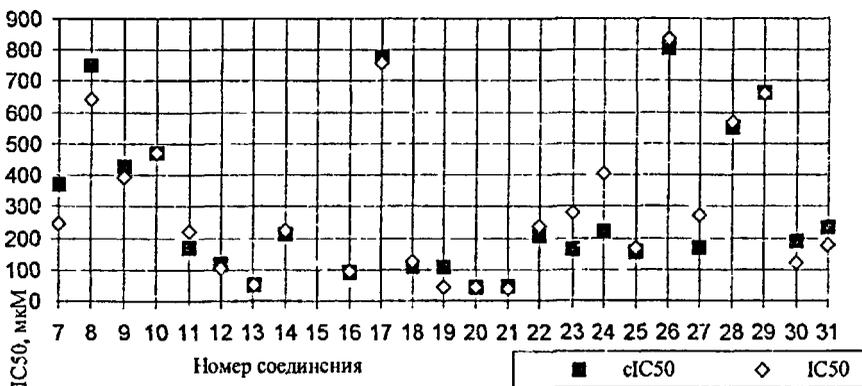


Рис. 1. Корреляция значений активности экспериментальных ( $IC_{50}$ ) и вычисленных ( $cIC_{50}$ ) по уравнению III.

## 8. ПОИСК БИОЛОГИЧЕСКОЙ МИШЕНИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Известно, что полианионные соединения, в частности полисульфаты, ингибируют большинство стадий активации комплемента (D.Walb, 1971). Lauenstein (1965) и Raepfle (1976) установили, что сульфатированные полисахариды ингибируют действие компонента C1, взаимодействуя с его субкомпонентом C1q. Это действие сохранил ближайший низкомолекулярный аналог сурамин, имеющий 6 сульфогрупп. В нашей лаборатории также было показано, что отрицательно заряженные полимеры взаимодействуют с C1q (O. Burdelev, 1998).

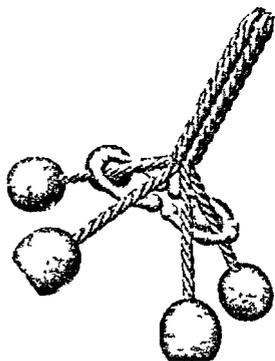
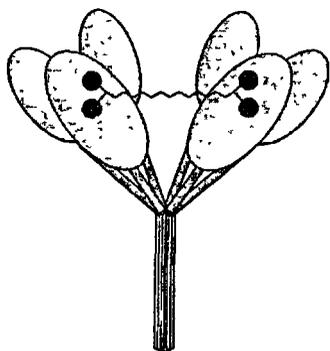


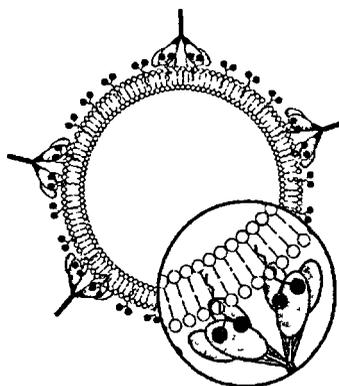
Рис. 2. Структура комплекса C1. Коллагеновые стебли C1q переплетены гетеродимером из C1r и C1s.

C1q состоит из 18 полипептидных цепей (6A, 6B и 6C цепей), каждая из которых содержит N-концевой коллагеноподобный участок и C-концевую глобулярную область. Цепи ассоциированы вместе таким образом, что полная молекула содержит шесть глобулярных головок, прикрепленных к центральному участку посредством гибких стеблей и внешне напоминает букет тюльпанов (H R.Knobel, 1975).

Поскольку молекула C1q состоит из шести идентичных функциональных субъединиц и, следовательно, содержит шесть мест связывания с отрицательно заряженными субстанциями, эффекторы, способные взаимодействовать с двумя и более фрагментами C1q должны быть на порядок активней. Так, Anderson (1999) включил дипептид Tgr-Tug, ингибирующий комплемент путем связывания с C1q ( $IC_{50} \approx 15$  мМ), в состав полимерной матрицы (в качестве матрицы использовались бычий сывороточный альбумин и декстран) и показал увеличение АА в 115 раз



А



Б

Рис. 3. Схема связывания эффекторов с глобулярными головками С1q.  
 А. Бидентатный эффектор. Б. Амфифильный эффектор (34) в составе липосомы.

Мы предположили, что липосома, в бислое которой включен отрицательно заряженный амфифильный эффектор (34), будет связываться с С1q на порядок эффективнее (рис. 3Б). Изменение концентрации эффектора при формировании липосом позволяет менять расстояние между парами заряженных групп на поверхности мембраны. Из графика зависимости между ЛА и мольной долей активного вещества в липосоме можно будет определить оптимальное расстояние между заряженными молекулами и создать бидентатный эффектор, расстояние между парами заряженных групп которого будет соответствовать максимально эффективному (рис. 3А).

Значительное увеличение активности линосомных и бидентатных эффекторов по сравнению с монодентатными могло бы косвенно подтвердить, что дисульфаты бисфенолов ингибируют комплемент посредством связывания с С1q.

Для синтезированного амфифильного дисульфата 1,1-ди-(4'-гидроксифенил)-гексадекана (34) удалось установить только  $IC_{30}=10$  мкМ, так как эффектор кроме АА проявляет свойства детергента ( $KKM=1.5 \times 10^{-5}$  М) и при более высоких концентрациях преимущественно лизировал эритроциты. Включение дисульфата 1,1-ди-(4'-гидроксифенил)-гексадекана (34) в липосомы частично нивелировало гемолитические свойства, что позволило изучить зависимость АЛ от содержания активного вещества в бислое. Максимальная активность проявляется при мольной доле эффектора в липосомах 0.049-0.069, что соответствует расстоянию 4.2-3.5 нм между парами зарядов на поверхности мембраны.

IC<sub>30</sub> для дисульфата 1,1-ДИ-(4'-гидроксифенил)-гексадекана (34) в составе липосом составляет 385 мкМ<sup>7</sup>. Низкая ЛА может объясняться не только гемолитическими свойствами амфифильного бисфенола, который, по-видимому, частично находился в растворе, но и тем, что Clq не является биологической мишенью для дисульфатов бисфенолов.

Для формирования более активных и стабильных полидентатных липосом необходимо использовать эффекторы с меньшей ККМ. Такими свойствами может обладать, например, аналог (34) с двумя алифатическими углеродными цепями (возможно частично ненасыщенными).

Мы использовали еще один подход для поиска мишеней для синтезированных соединений. Он основан на определении функциональной способности Clg и Cls с помощью ИФА. К иммобилизованным на плашках молекулам Clq добавляли RClq и эффектор либо смесь предварительно инкубированных RClq и эффектора. Во всех случаях фиксировали уменьшение активности Clg и Cls. Причем для сульфетрона (4 сульфогруппы) эффективность ингибирования для двух вариантов не различалась, что можно идентифицировать как отсутствие ингибирования Clg и Cls. Следовательно, его действие связано лишь с взаимодействием с Clq. Эффекторы (5), (20), (40) ингибировали активность Clg и Cls лучше при предварительной инкубации с RClq (содержащей Clg и Cls). Это может свидетельствовать о том, что эти вещества могут ингибировать также Clg и Cls<sup>8</sup>.

## 8. Выводы

1. Разработан метод сульфатирования бисфенолов, ароматических спиртов и бетулина действием серной кислоты и уксусного ангидрида в пиридине.
2. Синтезированы производные бисфенола Л с различными анионными заместителями (сульфатными, фосфатными, карбоксиметильными), ряд дисульфатов бисфенолов, ароматических спиртов и бетулина.
3. Определена АЛ полученных соединений, а также ряда дикарбоновых кислот аналогичного с бисфенолами строения. Установлены следующие закономерности.
  - Впервые показано, что для проявления АА достаточно одной анионной группы. Добавление второй отрицательно заряженной группы оказывает положительный,

---

<sup>7</sup> Липосомы из яФХ, диаметр 200 нм, мольная доля эффектора в число 0 069. Значение IC<sub>30</sub> представлено в пересчете на индивидуальное вещество

<sup>8</sup> Эксперимент проведен в лаборатории проф Л В Козлова (НИИ Эпидемиологии и микробиологии им Габричевского)

но не очень значительный эффект, исключение составляет карбоксиметильная группа. Наибольшую активность обеспечивают две фосфатные группы.

- Установлено, что введение в структуру объемных гидрофобных заместителей (циклогексильного, флуоренильного, антронового) приводит к существенному увеличению активности.
- Показано, что электронодонорные заместители (металльные группы) в бензольных ядрах в орто-положениях к сульфатной группе вызывают снижение АА, электроноакцепторные (атомы галогена) - увеличение. Несмотря на электронодонорные свойства пропильного и аллильного радикалов, их высокая гидрофобность и способность экранировать заряженные группы оказывают активирующее воздействие.

4. Выявлена количественная взаимосвязь «структура - активность» (QSAR) в ряду дисульфатов бисфенолов. Значимыми дескрипторами являются сумма частичных отрицательных зарядов на орто-углеродных атомах бензольных ядер относительно сульфатной группы, гидрофобность молекулы и поляризуемость центрального радикала. С помощью этого уравнения для трех соединений контрольной группы была предсказана ЛА с ошибкой 25-85%.

В уравнении количественной взаимосвязи «структура - активность» для ароматических дикарбоновых кислот значимыми дескрипторами являются расстояние между зарядами и гидрофобность молекул.

5. Изучена зависимость АА дисульфата 1,1-ди-(4'-гидроксифенил)-гексадскана (34) в составе липосом от содержания активного вещества. Показано, что максимальная активность проявляется при мольной доле эффиктора 0.049-0.069, что соответствует расстоянию 4.2-3.5 нм между парами зарядов на поверхности мембраны.
6. С помощью ИФА показано взаимодействие сульфетрона (49) с С1q и снижение функциональной способности С1г и С1s в присутствии дифосфата бисфенола А (5), дисульфата 9,9-бис-(4'-гидроксифенил)-флуорена (20) и 9,9-бис-(4'-карбоксифенил)-флуорена (40), что позволяет рассматривать эти белки наряду с С1q в качестве возможных молекулярных мишеней.
7. Разработан методический прием, позволяющий уменьшить разброс экспериментальных значений при определении АА. Он заключается в тестировании эталонного соединения — сульфетрона (49) в каждой серии экспериментов для учета неконтролируемых изменений условий опыта. Для сравнения АА измеряемых соединений рассчитывали значения, приведенные к АА эталона.
8. Установлена высокая АА дисульфата бетулина ( $IC_{50} = 6.9 \pm 3.1$  мкМ).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим проф. Васнева В.А. (ИНЭОС им. Несмеянова РАН) за любезно предоставленные образцы бисфенолов и дикарбоновых кислот, проф. Голощапова Н.М. (ОЭП «Иммунопрепарат» пос. Зеленая Дубрава, п/о Краснозаводск) за предоставлен-

ный препарат сульфетрон, фирму «Биолек» Харьков, проф. Козлова Л.В. (НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Габричевского) за предоставленные биологические материалы. Благодарим Лапина А. и компанию «ChemBridge Corp.» за техническую помощь, в.н.с. Веселовского А.В. (ИБМХ) за консультации в области молекулярного моделирования.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Каплун А.П., Бурделев О.О., Андия-Правдивый Ю.Э. Модулирование активности комплемента заряженными субстанциями. // Материалы 5 конференции "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана".- Москва.-1999.- С. 146-148.
2. Андия-Правдивый Ю.Э., Бурделев О.О., Цветкова Т.Н., Бурева СВ., Каплун А.П. Подходы к направленному конструированию ингибиторов активации комплемента. // Материалы школы-конференции "Горизонты физико-химической биологии".- Пушкино.- 28.05-02.06.2000.- Т.1.- С.76.
3. Андия-Правдивый Ю.Э., Бурделев О.О., Бурева СВ., Безруков Д.А., Орищенко Д.А., Голицына Ю.В., Каплун А.П. Изучение механизма ингибирования гемолиза заряженными субстанциями. // Материалы III съезда биохимического общества.- Санкт-Петербург.- Россия.- 2002.- С.133.
4. Бурева СВ., Андия-Правдивый Ю.Э., Орищенко Д.А., Каплун А.П. Исследование структурных критериев взаимодействия белков комплемента с заряженными субстанциями. // Материалы II Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития».- Москва.- Россия.- 2003.- Т.1.- С. 136.
5. Андия-Правдивый Ю.Э., Бурева СВ., Каплун А.П., Швец В.И. Получение и антигемолитическая активность дисульфатов бисфенолов. // Ученые записки МИТХТ.- 2003.- Вып. 8.- С.51-55.
6. Андия-Правдивый Ю.Э., Бурева СВ., Каплун А.П., Швец В.И., Козлов Л.В. Производные бетулина как ингибиторы комплемента. // Приоритетная справка от 24 декабря 2003 г на выдачу патента РФ №2003136931.
7. Андия-Правдивый Ю.Э., Бурева СВ., Каплун А.П., Швец В.И. Получение и антигемолитическая активность дисульфатов бисфенолов и ряда дикарбоновых кислот. //Хим.-Фарм. Журнал. -2004. -В печати.

Подписано в печать 9.03.2004 Формат 60\*84/16. Бумага писчая.

Отпечатано на ризографе. Уч. изд. листов 1,6. Тираж 90 экз. Заказ № 32

Лицензия на издательскую деятельность ИД № 03507 от 15.12.2000

Московская государственная академия тонкой химической технологии им М.В.Ломоносова.

Издательско-полиграфический центр.

119571 Москва, пр. Вернадского, 86.