



УДК 547.95:547.462.2.057

## СИНТЕЗ ГЛЮКОЗИЛДИГЛИЦЕРИДА ДЛЯ pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЛИПОСОМ

© 2003 г. З. Я. Альшоэйби<sup>#</sup>, Т. Ю. Андриюшина, Н. Г. Морозова, Г. А. Серебренникова

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
119571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 08.02.2002 г. Принята к печати 19.03.2002 г.

Синтезирован глюкозилдиглицерид, содержащий в своем составе остатки 11-аминоундекановой кислоты и предназначенный для конструирования pH-чувствительных липосом.

*Ключевые слова:* глюкозилдиглицериды, гликолипиды, pH-чувствительные липосомы, трансфекция.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большие надежды возлагаются на интенсивно развивающуюся область медицины – генную терапию, представляющую собой альтернативу традиционным методам лечения заболеваний, связанных с нарушениями в клеточном геноме [1]. Эта форма терапии заключается в исправлении врожденных генетических дефектов путем направленного введения терапевтического гена в дефектные клетки для последующей экспрессии.

Известны различные методы доставки генетического материала (трансфекция), в основе которых лежат электропорация, бомбардировка заряженными частицами, инъекция ДНК, использование вирусов, рецепторопосредованный эндоцитоз и др. [2].

Одним из наиболее современных методов генетической трансфекции является липофекция, использующая в качестве транспортного средства липосомы, обладающие рядом преимуществ по сравнению с другими векторами доставки генетической информации: неинфекционностью, неиммуногенностью, простотой в изготовлении и низкой стоимостью [3].

Наибольший прикладной интерес представляют липосомы, содержащие метаболизируемые липиды с минимальной цитотоксичностью. Среди них для целей генетической трансфекции хорошо зарекомендовали себя pH-чувствительные липосомы, уникальная способность которых изменять заряд при изменении величины pH, облегчает высвобождение молекул ДНК при попадании в клетку-мишень. Достигается это, в частности,

введением в липидную молекулу функциональных групп, способных к протонированию [4].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В целях проведения исследований в данном направлении нами был предпринят синтез pH-чувствительного биodeградируемого липида глюкозилдиглицеридной природы, содержащего в своем составе остатки 11-аминоундекановой кислоты.

Для построения глюкозилглицеринового синтона (I) был использован уже опробованный нами ранее подход [5]: гликозилирование изопропилиденглицерина ацетобромглюкозой в кипящем толуоле в присутствии  $\text{CdCO}_3$ . Выход соединения (I) составил 68%. Его структура подтверждена  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией. В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре сигнал аномального протона наблюдался при  $\delta$  4.54 м.д. ( $J_{1,2}$  7.8 Гц), что указывает на  $\beta$ -конфигурацию гликозидной связи. Присутствие  $\alpha$ -аномера обнаружено не было.

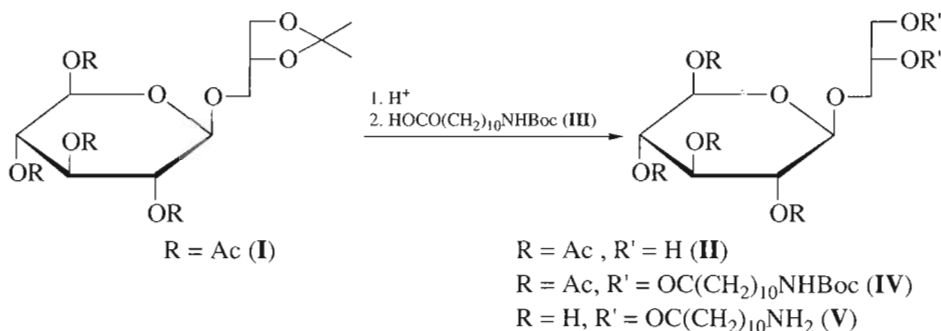
Удаление изопропилиденовой защитной группы осуществляли по стандартной методике [6]: обработкой глюкозида (I) 20% уксусной кислотой при 100°C. Структура полученного тетраацетата глюкозилглицерина (II) подтверждена данными  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра и элементного анализа.

Конденсацию [7] тетраацетата глюкозилглицерина (II) и *N*-Вос-аминоундекановой кислоты (III) осуществляли действием DCC в присутствии каталитического количества DMAP в пиридине при 55°C. Структуру соединения (IV) подтверждают данные  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра и элементного анализа.

Удаление защитных групп на заключительной стадии достигалось последовательным действием трифторуксусной кислоты в хлороформе (Вос-защита) [8] и гидразингидрата в кипящем метаноле (ацетильные группы) [9]. Строение конечно-

Сокращения: DCC – *N,N*-дициклогексилкарбодимид; DMAP – 4-(диметиламино)пиридин.

<sup>#</sup> Автор для переписки (эл. почта: [httos.mitht@g23.relcom.ru](mailto:httos.mitht@g23.relcom.ru)).



го соединения (V) подтверждено спектральными данными.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали перегнанные растворители и реагенты отечественного производства. *N*-Boc-аминоундекановую кислоту (III) получали взаимодействием эквимольных количеств аминокислоты и ди-*трет*-бутилокси-пирокарбоната [8]. Продукт выделяли экстракцией этилацетатом (выход 79%).

ТСХ проводили на силуфоле UV-254 (Chemapol, Чехия) и на силикагеле (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck); обнаружение йодом или прокаливанием. Для идентификации производных аминов и катионных липидов применяли нингидрин. Системы для ТСХ: хлороформ-метанол, 10 : 1 (А), петролейный эфир-эфир, 1 : 4 (Б), хлороформ-метанол-вода, 65 : 25 : 4 (В). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/63 мкм (Merck). Масс-спектры регистрировали на приборе VG AUTOSPEC (США) (матрица – 3-нитробензиловый спирт) методом FAB MS и на приборе FT-ICR-MS Apex II (Bruker Daltonics) методом ESI. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР (δ, м.д.) регистрировали на импульсном фурье-спектрометре “Bruker MSL-200” (200 МГц) (Германия) в дейтерохлороформе и дейтерометаноле. Температуры плавления определяли на приборе Voetius (Германия). Углы оптического вращения измеряли на фотоэлектрическом спектрополяриметре Digytor Yasco модель DIP 360 (Япония).

**rac-1-O-(2,3,4,6-Тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)глицерин (II).** Раствор 1.14 г (2.465 ммоль) глюкозилизопропилиденглицерина (I) [5] в 50 мл 20% AcOH выдерживали 45 мин при 100°C. Реакционную массу охлаждали, нейтрализовали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, разбавляли водой (25 мл). Смесь экстрагировали хлороформом (50 мл). Экстракт сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отфильтровывали и упаривали. Выход 0.75 г (72%). Т. пл. 100–102°C. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –5.83° (с 0.37, хлороформ), R<sub>f</sub> 0.54 (А). Найдено, %: С 48.39; Н 6.18. C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>. Вычислено, %: С 48.34; Н 6.20. <sup>1</sup>H-ЯМР: 1.80–2.10

(12H, 4с, 4 COCH<sub>3</sub>), 3.35–3.90 (6H, м, протоны G<sub>ro</sub> и H<sub>5</sub>, Glc), 4.1 (2H, м, H<sub>6</sub>, Glc), 4.48 (1H, д, J 7.8 Гц, H<sub>1</sub>, Glc), 4.75–5.25 (3H, м, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> и H<sub>4</sub>, Glc).

**rac-1,2-Ди-О-(11-N-Boc-аминоундеканойл)-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)глицерин (IV).** К раствору 0.578 г (1.368 ммоль) соединения (II) в 7.5 мл безводного пиридина добавляли 1.657 г (5.497 ммоль) *N*-Boc-аминоундекановой кислоты (III), 1.361 г (6.596 ммоль) DCC и 0.003 г (0.025 ммоль) DMAP и перемешивали 15 мин при 55°C. Растворитель отгоняли. Остаток обрабатывали эфиром, отфильтровывали дихлоргексилмочевину. Фильтрат упаривали и хроматографировали на колонке, элюируя смесью хлороформ-метанол, 100 : 3. Выход 1.27 г (94%).

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –2.37° (с 1, хлороформ), R<sub>f</sub> 0.46 (Б). Найдено, %: С 59.91; Н 8.57; N 2.77. C<sub>49</sub>H<sub>84</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>. Вычислено, %: С 59.50; Н 8.56; N 2.83. <sup>1</sup>H-ЯМР: 1.20 (28H, уш.с, 2 (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>), 1.43 (18H, с, 6 CH<sub>3</sub>), 1.55 (4H, м, 2 ОСОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>), 1.80–2.10 (12H, 4с, 4 СОСН<sub>3</sub>), 2.25 (4H, т, J 7.8 Гц, ОСОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>), 3.05 (4H, т, J 6.8 Гц, 2 СН<sub>2</sub>NH-), 3.60–4.05 (6H, м, протоны G<sub>ro</sub> и H<sub>5</sub>, Glc), 4.25 (2H, м, H<sub>6</sub>, Glc), 4.50 (1H, дд, J<sub>1,2</sub> 7.6 Гц, H<sub>1</sub>, Glc), 4.85–5.25 (3H, м, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, Glc).

**rac-1,2-Ди-О-(11-аминоундеканойл)-3-О-(β-D-глюкопиранозил)глицерин (V).** Раствор 0.04 г (0.04 ммоль) соединения (IV) и 0.12 мл трифторуксусной кислоты в 1.3 мл хлороформа перемешивали 30 мин при 40°C. Реакционную массу упаривали на роторном испарителе с эфиром (3 × 2 мл). Остаток растворяли в 1 мл метанола, добавляли 0.017 мл гидразингидрата и кипятили 50 мин. Реакционную смесь нейтрализовали трифторуксусной кислотой при 0°C, затем упаривали на роторном испарителе с эфиром (3 × 2 мл). Продукт выделяли с помощью препаративной ТСХ в системе В. Выход 0.018 г (72%). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –15.5° (с 1, хлороформ-метанол, 1 : 1), R<sub>f</sub> 0.36 (В). Масс-спектр, m/z: 438.27 [M – NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>COO]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-ЯМР: 1.20 (28H, уш.с, 2 (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>), 1.50 (4H, м, 2 ОСОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>), 2.25 (4H, т, J 7.5 Гц, ОСОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>), 3.05 (4H, т, J 6.6 Гц, 2 СН<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.60–4.05 (6H, м, протоны G<sub>ro</sub> и 3H, м,

H2, H3, H4 и H5, Glc), 4.25 (2H, м, H6, Glc), 4.50 (1H, дд,  $J_{1,2}$  7.5 Гц, H1, Glc).

Работа поддержана грантом РФФИ государственной поддержки ведущих научных школ РФ № 00-1597866, грантом РФФИ № 01-03-33234.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / Ред. В.Н. Горбунова, В.С. Баранов. СПб.: Спец. лит., 1997. С. 175.
2. Тараховский Ю.С., Иваницкий Г.Р. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 723–736.
3. Lasic D.D. Liposomes in Gene Delivery. N.Y.: CRC Press, 1997. P. 67.
4. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. // Изв. АН. Сер. хим. 2000. № 2. С. 385–400.
5. Альшоэйби З.Я., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 703–706.
6. Башкатова А.И., Смирнова Г.В., Швец В.И., Евстигнеева Р.П. // Журн. орган. химии. 1971. Т. 7. С. 1644.
7. Fujishima Y., Kigawa K., Ogawa Y., Kiso M., Hasegawa A. // Carbohydr. Res. 1987. V. 167. P. 317–324.
8. Химический синтез пептидов / Ред. А.А. Гершкович, В.К. Кибирев. Киев: Наукова думка, 1992. С. 144.
9. Морозова Н.Г., Коробова Т.Б., Аникин М.В., Чупин В.В., Серебренникова Г.А. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 697–700.

## The Synthesis of a Glucosyldiglyceride for Constructing pH-Sensitive Liposomes

Z. Ya. Alshoaibi<sup>#</sup>, T. Yu. Andryushina, N. G. Morozova, and G. A. Serebrennikova

<sup>#</sup>E-mail: htos.mitht@g23.relcom.ru

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

A glucosyldiglyceride containing residues of 11-aminoundecanoic acid was synthesized for constructing pH-sensitive liposomes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* glucosyldiglycerides, glycolipids, pH-sensitive liposomes, transfection