



УДК 577.07:535.372

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНОМЕЧЕНОГО ТРИГЛИЦЕРИДА, ПРОИЗВОДНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АГЕНТА САРКОЛИЗИНА

© 2004 г. И. А. Болдырев, И. В. Гречишникова, Ю. Б. Павлова, Юл. Г. Молотковский[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.09.2002 г. Принята к печати 16.12.2002 г.

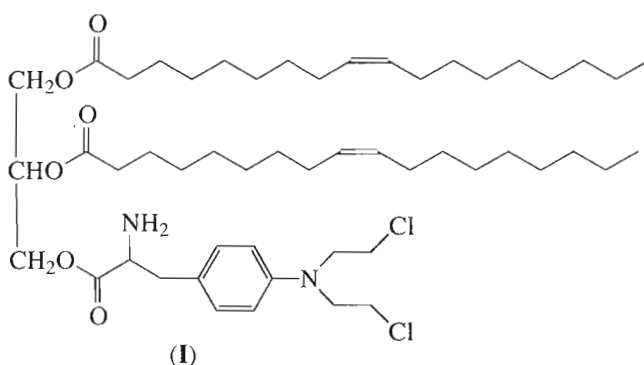
Синтезирован флуоресцентный зонд – 3-периленоильное производное липофилизированного противоопухолевого агента сарколизина. Зонд предназначен для исследования внутриклеточных путей миграции и метаболизма сарколизина и его производных. В зонде периленоильная флуоресценция частично затухает сарколизинным хромофором, что расширяет возможности его применения.

Ключевые слова: сарколизин, синтез; флуоресцентный зонд, 3-периленоил.

ВВЕДЕНИЕ

Липосомные формы доставки противоопухолевых лекарств интенсивно исследуются, а в последние годы получили и практическое применение, поскольку цитотоксическая эффективность препаратов в большинстве случаев возрастает при уменьшении системной токсичности (см., например, обзор [1]). Разрабатывая новые формы противоопухолевых веществ для такой доставки, ранее мы сообщили о синтезе липофильного производного сарколизина (4-[бис(2-хлорэтил)амино]-DL-фенилаланина; в англоязычной литературе именуется мерфаланом (merphalan) – *rac*-1,2-диолеил-3-сарколизилглицерина (I) [2]. Это вещество показало значительную цитотоксическую активность на культурах опухолевых клеток в опытах *in vitro* [3], а также хорошую противоопухолевую активность *in vivo* [4, 5].

Для изучения путей и механизмов проникновения лекарственных веществ в клетки и ткани, что крайне важно для совершенствования лекарств, в настоящее время широко применяются флуоресцентные методы, в частности конфокальная флуоресцентная микроскопия (КФМ) (см., например, [6]). Применение этого метода предполагает, что исследуемое вещество либо обладает собственной флуоресценцией [7], либо имеет включенный в молекулу в качестве метки флуорофор. Для изучения фармакодинамики производного (I) и других подобных веществ с помощью КФМ и других флуоресцентных методов, мы осуществили синтез флуоресцентного аналога соединения (I) – *rac*-1-(*Z*-9-октадеценил)-2-сарколизил-3-[3-(3-периленоил)пропионил]глицерина (V) (схема). Этот зонд несет в качестве флуорофора периленоильный остаток, показавший высокую эффектив-



[#] Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-66-01; эл. почта: jgmol@ibch.ru).

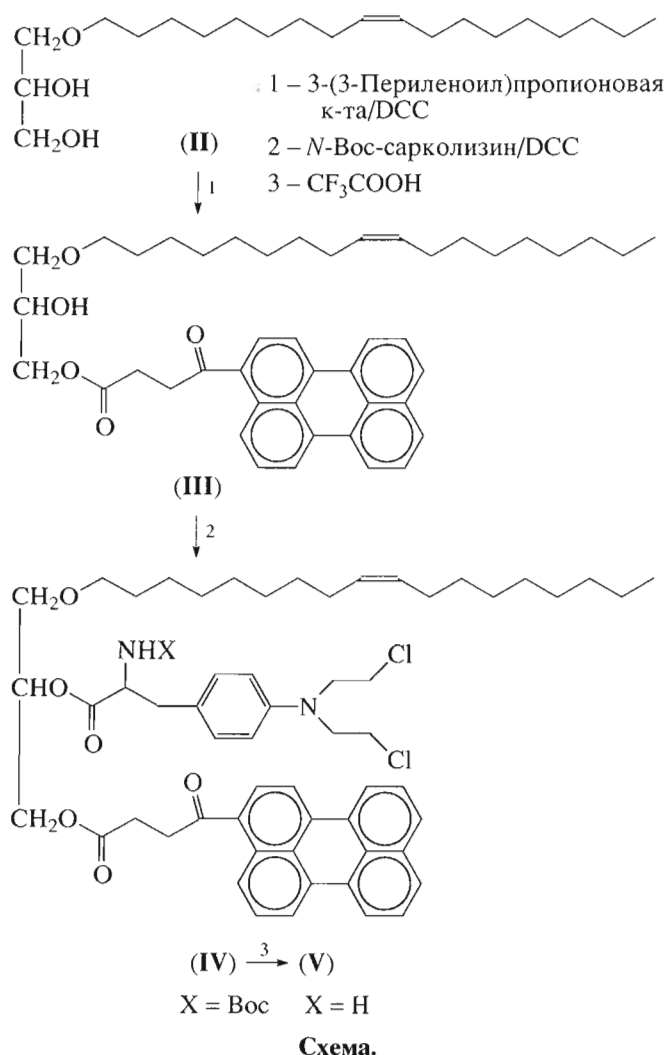
ность при флуоресцентной микроскопии и точной цитофлуориметрии [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходным веществом в синтезе служил 1-октадецилглицерин (селахиловый спирт) (II). В этом соединении гидрофобная цепь присоединена к глицериновому остатку простой эфирной связью вместо сложноэфирной, что представляет собой небольшое отступление от структуры триглицерида (I), однако бóльшая устойчивость простой эфирной связи к ферментам клеточного катаболизма по сравнению со сложноэфирной, при весьма близкой полярности, должна обеспечивать более длительное существование зонда в изучаемой системе. При ацилировании селахилового спирта 3-(3-периленоил)пропионой кислотой карбодимидным способом этерификация происходит преимущественно по положению 3 глицеринового остатка; диэфир (III) был выделен колоночной хроматографией. Ацилирование последнего *N*-Вос-сарколизином также с помощью карбодимидного метода привело к триэфиру (IV); после удаления Вос-защиты трифторуксусной кислотой был получен зонд (V). Строение веществ (III)–(V) подтверждается, помимо хода синтеза и хроматографического поведения, прежде всего данными ¹H-ЯМР- и масс-спектров; спектры флуоресценции характерны для периленоильных соединений [9] – с $\lambda_{\text{возб}}$ 450–452 нм и $\lambda_{\text{исп}}$ 526–527 нм в этаноле (см. “Эксперимент. часть”).

В зонде (V), как и в синтоне (IV), флуоресцентная периленоильная группа находится достаточно близко от сарколизиновой *n*-бис(2-хлорэтил)аминофенильной, которая может быть тушителем флуорофора. Мы не обнаружили в литературе данных о применении сарколизинового остатка в качестве тушителя флуоресценции, но исходя из общих закономерностей данного явления, к настоящему времени достаточно хорошо изученных [10], такую способность у этого остатка мы, приступая к синтезу, предполагали. Оказалось, что флуоресценция соединений (IV) и (V) действительно частично затухает по сравнению с испусканием диэфира (III). Относительный квантовый выход, представленный как отношение интенсивности в максимуме испускания (в отн. ед.) к молярному коэффициенту поглощения в максимуме [11] в том же образце, составляет 1.00 для диэфира (III), 0.59 для триэфира (IV) и 0.58 для зонда (V) (в этаноле). То есть в двух последних веществах квантовый выход периленоильного флуорофора почти вдвое ниже нормального из-за тушения сарколизиновым остатком.

Несомненно, что разъединение этих остатков при расщеплении одной из сложноэфирных связей в зонде (V), например под действием эстеразы, должно сопровождаться увеличением интенсивно-



сти флуоресценции. Подобный методический подход, сочетание в одной молекуле флуорофора и тушителя, разъединение которых под действием фермента позволяет изучать активность фермента, находит все большее применение – см., например, [6]. В нашем случае, такое качество зонда (V) расширяет его возможности при исследовании поведения сарколизиновых производных в различных системах.

Предварительные опыты показали, что зонд (V) эффективно встраивается в липосомы из яичного фосфатидилхолина, достаточно равномерно распределяясь в них при концентрации около 1%; это свойство зонда существенно для успешного проведения экспериментов на клетках с применением конфокальной микроскопии, что будет предметом наших дальнейших сообщений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали DCC, 4-диметиламинопиридин (DMAP), триэтиламин и TFA (Fluka, Швейцария),

rac-1-(*Z*-9-октадеценил)глицерин (селахиловый спирт) (Supelco, США), остальные реактивы и растворители фирмы "Реахим" (Россия). Сухой хлороформ получали перегонкой над пятиокисью фосфора, остальные растворители (отечественного производства) использовали после обычной очистки. Для колоночной хроматографии применяли силикагель Kieselgel 60 (Merck, Германия) и оксид алюминия (Реахим); для ТСХ – пластинки с флуоресцентным индикатором Kieselgel 60 F₂₅₄ и без индикатора Kieselgel 60 (Merck), а также пластинки с обращенной фазой Nano-SIL C₁₈-100 (Macherey-Nagel, Германия). Обнаружение при ТСХ – фосфорномолибденовой кислотой (А), УФ-облучением (Б) и Cl₂-бензидином (В). 3-(3-Периленоил)пропионовая кислота [12] и *N*-Вос-сарколизин [2] были получены как описано ранее; селахиловый спирт (препарат 20-летней давности) был очищен колоночной хроматографией на оксиде алюминия в системе CH₂Cl₂-этилацетат-метанол, 9 : 9 : 1.

Масс-спектры снимали на MALDI-времяпролетном приборе Vision 2000 (Thermobioanalysis, Англия; матрица – 2,5-дигидроксибензойная кислота; N₂-лазер, 337 нм, 3 нс-импульс, максимальная энергия импульса 250 мкДж) или на ESI-времяпролетном приборе Finnigan MAT 900S (ввод в смеси хлороформ-метанол, 1 : 1); УФ-спектры веществ регистрировали на спектрофотометре Ultrospec II (LKB, Швеция); спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония) в кварцевых кюветах 10 × 10 мм при 20°C. Спектры ¹H-ЯМР (δ, м.д. относительно Me₄Si) регистрировали на спектрометре Bruker WM 500 (Германия) в CDCl₃. Удаление растворителей проводили в вакууме на роторном испарителе при температуре не более 40°C.

***rac*-1-(*Z*-9-Октадеценил)-3-[3-(3-периленоил)пропионил]глицерин (III) и 1,2-изомер.** К раствору 40 мг (0.12 ммоль) селахилового спирта (II), 30 мг (0.085 ммоль) 3-(3-периленоил)пропионовой кислоты и 40 мг (0.33 ммоль) DMAP в 2 мл сухого хлороформа прибавляли при перемешивании 100 мкл 50% раствора DCC в CCl₄, через сутки – еще 50 мкл, всего 75 мг (0.36 ммоль). Затем смесь разбавляли 20 мл CH₂Cl₂ и перемешивали 30 мин при охлаждении льдом с 1 мл 1 н. H₂SO₄. Из органического экстракта двухкратной колоночной (~1 × 13 см) хроматографией на силикагеле в градиентной системе этилацетат (5 → 15%) против смеси пентан-CH₂Cl₂, 1 : 1, выделяли (контроль ТСХ в системе пентан-CH₂Cl₂-этилацетат, 45 : 45 : 10; А, Б, В) 26 мг (45%) флуоресцентномеченого диэфира (III), R_f 0.18, и 17 мг (30%) вещества с такой же флуоресценцией, несомненно, 1,2-изомера диэфира (III) с R_f 0.15.

Диэфир (III): аморфное оранжевое вещество; ESI-MS, *m/z* : 699.5 [*M* + Na]⁺. УФ (в этаноле), λ_{max}

446.5 нм (ε 1.15 × 10⁴); ¹H-ЯМР (δ, м.д.): 0.89 (т, *J* 6.8 Гц, 3H, CH₃), 1.3–1.4 (м, 24H, H₂–H₇ и H₁₂–H₁₇), 2.01 (м, 4H, H₈ и H₁₁), 2.90 (т, *J* 6.4 Гц, 2H, CH₂COO), 3.44, 3.52 (2м, 6H, CH₂COAr, CH₂OCH₂), 4.05 (с, 1H, C₁ОН), 5.35 (м, 2H, CH=CH); 7.54 (к, 2H), 7.61 (м, 1H), 7.74 (д, 1H), 7.79 (д, 1H), 7.99 (д, 1H), 8.22 (д, 1H), 8.27 (асим. т, 3H), 8.59 (д, 1H) (периленил). Флуоресценция: λ_{возб} 451 в этаноле и 459 нм в хлороформе (при испускании 515 нм), λ_{исп} 527 в этаноле и 511 нм в хлороформе (при возбуждении 450 нм), относит. квантовый выход 1.00.

1,2-Изомер: ESI-MS, *m/z* : 700.5 [*M* + Na]⁺. Спектр флуоресценции повторяет спектр вещества (III).

***rac*-1-(*Z*-9-Октадеценил)-2-(*N*-Вос-сарколизин)-3-[3-(3-периленоил)пропионил]глицерин (IV).** К раствору 10 мг (15 мкмоль) диэфира (III), 10 мг (25 мкмоль) *N*-Вос-сарколизина и 20 мг (0.16 ммоль) DMAP в 0.7 мл сухого хлороформа прибавляли при перемешивании 60 мкл 50% раствора DCC (0.29 ммоль) в CCl₄, через сутки смесь обрабатывали (см. выше), хроматографировали на колонке (0.5 × 7.5 см) на силикагеле в системе пентан-CH₂Cl₂-этилацетат, 10 : 10 : 1 (контроль ТСХ, см. выше), продукт дополнительно фильтровали через колонку (0.5 × 4 см) с оксидом алюминия в CH₂Cl₂ для отделения следов дициклогексилмочевины, получали 11 мг (70%) триэфира (IV) в виде красной аморфной массы, R_f 0.45 в системе пентан-CH₂Cl₂-этилацетат, 45 : 45 : 10 (А, Б, В). ESI-MS, *m/z* : 1087.5 [*M* + Na]⁺. λ_{max} 445 нм (ε 1.26 × 10⁴); ¹H-ЯМР (δ, м.д.): 0.89 (т, *J* 6.7 Гц, 3H, CH₃), 1.20–1.38 (м, 24H, H₂–H₇ и H₁₂–H₁₇), 2.01 (м, 4H, CH₂CH=), 2.87 (т, *J* 7.3 Гц, 2H, CH₂COO), 2.97, 3.04 (2м, 2H, CH₂Ar), 3.42, 3.49 (2м, 6H, CH₂COAr, CH₂OCH₂CH₂), 3.52, 3.62 (2м, 10H, NCH₂CH₂Cl, OCH₂CH₂), 4.24, 3.43 (2м, 2H, CH₂OOC), 4.56 (с, 1H, NH), 4.98 (м, 1H, C₁НН), 5.25 (м, 1H, C₁ОН), 5.34 (с, 2H, CH=CH), 6.58, 7.04 (2м, 4H, фенилен), 7.54 (м, 2H), 7.59 (к, 1H), 7.74 (д, 1H), 7.79 (д, 1H), 7.98 (к, 1H), 8.21 (к, 1H), 8.27 (асим. т, 3H), 8.59 (т, 1H) (периленил). Флуоресценция: λ_{возб} 450 в этаноле и 452 нм в хлороформе (при испускании 515 нм), λ_{исп} 526 в этаноле и 506 нм в хлороформе (при возбуждении 450 нм), относит. квантовый выход 0.59.

***rac*-1-(*Z*-9-Октадеценил)-2-сарколизин-3-[3-(3-периленоил)пропионил]глицерин (V).** Раствор 10 мг (9.4 мкмоль) амида (IV) в 0.5 мл CH₂Cl₂ и 2 мл TFA выдерживали 1 ч при 35°C в атмосфере аргона, смесь дважды упаривали с толуолом. Остаток очищали на колонке с 1 г LiChroprep RP-18 в системе метанол-CH₂Cl₂-TFA, 95 : 4.5 : 0.5. Получали 7.8 мг (86%) красного аморфного продукта (IV), R_f 0.55 на Nano-SIL C₁₈-100 (метанол-CH₂Cl₂-TFA, 89 : 10 : 1) и 0.45 при ТСХ на Kieselgel 60 без ин-

дикатора (CHCl_3 -изопропанол- CH_3COOH , 94 : 5 : 1) обнаружители А, Б, нингидрин.

Оранжевое аморфное вещество; MALDI-MS, m/z : 965 $[M + H]^+$; λ_{max} 445 нм (ϵ 1.45×10^4). Флуоресценция: $\lambda_{\text{возб}}$ 450 в этаноле и 452 нм в хлороформе (при испускании 515 нм), $\lambda_{\text{исп}}$ 527 в этаноле и 507 нм в хлороформе (при возбуждении 450 нм), относит. квантовый выход 0.58.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 00-04-48416 и 02-04-48287).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bally M.B., Lim H., Cullis P.R., Mayer L.D. // *J. Liposome Res.* 1998. V. 8. P. 299–335.
2. Водовозова Е.Л., Никольский П.Ю., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганич. химия.* 1996. Т. 22. С. 548–556.
3. Водовозова Е.Л., Хайдуков С.В., Гаенко Г.П., Бондарчук Т.Н., Михалев И.И., Гречишникова И.В., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганич. химия.* 1998. Т. 24. С. 760–767.
4. Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г. // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 1997. Т. 123. С. 439–441.
5. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. // *Eur. J. Cancer.* 2000. V. 36. P. 942–947.
6. Hendrickson H.S., Hendrickson E.K., Johnson I.D., Farber S.A. // *Anal. Biochem.* 1999. V. 276. P. 27–35.
7. Feofanov A., Sharonov S., Kudelina I., Fleury F., Nabitiev I. // *Biophys. J.* 1997. V. 73. P. 3317–3327.
8. Молотковский Ю.Г. // *Биоорганич. химия.* 1999. Т. 25. С. 855–867.
9. Molotkovsky J.G., Manevich Y.M., Babak V.I., Bergelson L.D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 778. P. 281–288.
10. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ., 1999. P. 238–266.
11. Bramhall J. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 3479–3486.
12. Молотковский Ю.Г., Карюхина М.О., Бергельсон Л.Д. // *Биол. мембраны.* 1987. Т. 4. С. 387–394.

Synthesis and Properties of a Fluorescent-Labeled Triglyceride Derivative of the Antitumor Drug Merphalan

I. A. Boldyrev, I. V. Grechishnikova, Yu. B. Pavlova, and Yul. G. Molotkovsky[#]

[#] Phonelfax: +7 (095) 330-6601; e-mail: jgmol@ibch.ru

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

A new fluorescent probe, a 3-perylenoyl derivative of the lipophilized antitumor drug merphalan (sarcocylsine), was synthesized. The probe is suitable for studying intracellular traffic and metabolism of merphalan and its derivatives. The perylenoyl fluorescence is partially quenched by the merphalan chromophore, which broadens the probe potentialities. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: fluorescent probe, merphalan, 3-perylenoyl, synthesis