Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 713-716.

УДК 54.057 615.015.1
©Коллектив авторов

СИНТЕЗ АДРЕСНОГО КОНЪЮГАТА ДЛЯ ФОСФОЛИПИДНОЙ СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА ЛЕКАРСТВ

М.А. Санжаков, Д.В. Игнатов, В.Н. Прозоровский, О.С. Дружиловская, Н.В. Медведева*, О.М. Ипатова

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
Погодинская ул., 10, 119121, Москва; тел.: +7(499) 2469491, +7(495)7083807

Одно из основных направлений повышения эффективности известных, хорошо зарекомендовавших себя в клинике лекарств – разработка систем их транспорта в организме с использованием новых технологических подходов и наноматериалов. В работе описан способ получения конъюгата, содержащего фолиевую кислоту в качестве адресного фрагмента к рецепторам, отличающимися повышенной экспрессией на опухолевых клетках. В качестве линкера, обеспечивающего включение конъюгата в липидные наночастицы, был использован додециламин. Модификация фолиевой кислоты не затрагивала структурную часть молекулы, ответственную за рецепторное связывание. В предварительных экспериментах на клетках Hep G2 показано увеличение связывания адресного фрагмента фосфолипидной системы транспорта с опухолевыми клетками.

Ключевые слова: направленный транспорт, амидная связь, онкология, фолиевая кислота, додециламин.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее важных причин, определяющих эффективность действия лекарств, является их способность накапливаться в очаге воспаления/поражения. Одним из подходов, оказывающих влияние на эффективность, а также позволяющих “продлить жизнь” лекарственным препаратам, уже зарекомендовавшим себя в клинической практике, является разработка систем их направленного транспорта [1, 2].

Для адресной доставки лекарства в патологические области (например, в ткани опухоли) используют различные векторы (адресные фрагменты). Основные имеющиеся в литературе способы придания направленности лекарственному соединению можно условно разделить на (1) модификацию адресным фрагментом лекарственного соединения и (2) модификацию поверхности системы транспорта. К недостаткам таких подходов можно отнести нарушение специфических свойств лекарственного соединения, сложность транспортной “конструкции”, снижение афинности вектора к соответствующему рецептору и др. В качестве альтернативного подхода мы предлагаем не модифицировать поверхность фосфолипидной наночастицы и/или лекарственное соединение, а конструировать композицию, в которой лекарство и адресный фрагмент встроены в фосфолипидную наночастицу. В таком случае выбранный для придания направленности адресный фрагмент должен обладать свойствами, обеспечивающими его встраивание в фосфолипидную матрицу.

В качестве адресного фрагмента нами предлагается использовать фолиевую кислоту, так как известно, что на опухолевых клетках существенно повышена экспрессия рецепторов, имеющих к ней высокое сродство [3, 4]. Фолиевая кислота – водорастворимый витамин, в структуре которого имеется две карбоксильных группы $COOH^-$. Их модификация не затрагивает структурную часть молекулы, ответственную за рецепторное связывание [5]. В качестве линкера был выбран первичный алифатический амин CH_3-$(CH_2)_n$-NH_2 – додециламин (n=11). Образование коньюгата выбранного вектора и линкера возможно путём образования амидной связи. Несмотря на то, что почти 25% лекарственных соединений содержат амидную

* - адресат для переписки

связь [6], в каждом конкретном случае условия её образования специфичны. Известны разные способы активации карбоксильной группы и подходы к образованию амидной связи [6, 7]. Однако в литературе нет сведений об образовании амидной связи карбоксильной группы с аминогруппой алифатических аминов с n 6.

Учитывая, что описание аналогичных реакций в литературе нами не обнаружено, целью настоящей работы было получить конъюгат фолиевой кислоты с додециламином в качестве адресного фрагмента для встраивания в фосфолипидные наночастицы предельно малого размера.

МЕТОДИКА

В работе использовали следующие материалы: фолиевая кислота ≥97% (мол.м. 441.40) (“Sigma-Aldrich Chemie GmbH”, Германия), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбомида гидрохлорид (мол.м. 191,7) (ДЭК) (Merck KGaA, Германия); додециламин 98% (мол. м. 185,34; d^{20} 0,8 г/мл), 2-пропанол LC-MS ≥99,9%, 3-[N-морфолино]-пропансульфокислота (МОПС) ≥99,5% (“Sigma-Aldrich Chemie”); метанол HPLC grade (“Fisher Scientific” UK Ltd, Великобритания); муравьиная кислота 98-100% (“Merck”, Германия).

При получении конъюгата использовали следующее оборудование: центрифуга Eppendorf 5810 R (“Eppendorf”, Германия) с ротором FA-45-30-11; испаритель ротационный Laborota 4000 (“Heidolph”, Германия); хроматограф Agilent 1100 Series со спектрофотометрическим детектором G1315B, хроматограф Agilent 1200 Series с масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS (“Agilent Technologies”, США); ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS HD 2070/2200 с наконечником MS-72 (BANDELIN, Германия); ультразвуковая ванна Elmasonic S300H (“Elma”, Германия).

Количественное определение фолиевой кислоты проводили с помощью метода ВЭЖХ на приборе Agilent 1100 с оптическим детектированием на колонке Eclipse XDB-C18 размером (4,6×150) мм и дисперсностью сорбента 5 мкм (“Agilent Technologies”). Для получения калибровочной зависимости готовили растворы фолиевой кислоты в 0,1 М МОПС (pH 7,2-7,4). По 20 мкл растворов фолиевой кислоты с известной концентрацией вводили на колонку. Подвижная фаза: метанол и 0,1% водный раствор муравьиной кислоты. По полученным значениям площадей пика (S) для разных концентраций фолиевой кислоты калибровочная зависимость S от её концентрации в образце (C) имела вид: S=18746×C (с коэффициентом корреляции 0,994).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фолиевая кислота – водорастворимый витамин, в структуре которого имеется две карбоксильные группы. Для образования амидной связи с додециламином необходимо было провести активацию карбоксильной группы фолиевой кислоты. Нами в качестве активирующего агента был использован водорастворимый N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид (ДЭК). Основной сложностью при проведении этой реакции является то, что один из компонентов – водорастворим, а другой в водной среде образует мицеллярный раствор.

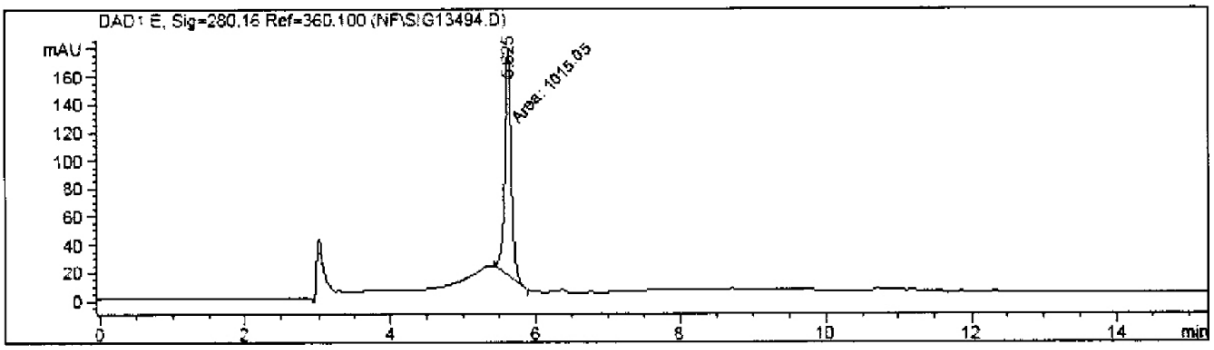
Синтез адресного конъюгата

Получение конъюгата адресного фрагмента вида RA-COOH с линкерами вида R-NH_2 с использованием водорастворимого активатора карбоксильных групп ДЭК осуществляли следующим образом. Готовили 0,02 М раствор RA-COOH в буфере (0,1 М МОПС с pH 7,2-7,4). К 5 мл полученного раствора добавляли по 38 мг ДЭК и оставляли при комнатной температуре на 2 ч.

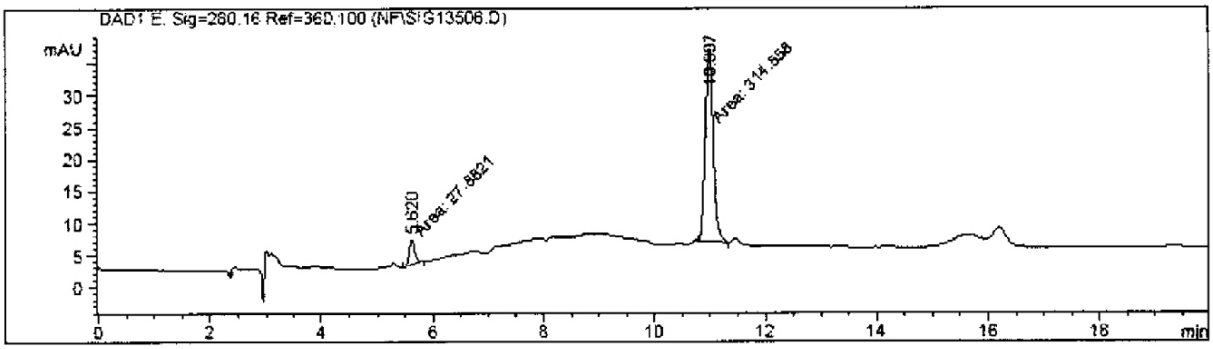
Отдельно готовили 0,02 М раствор R-NH_2 в 0,1 М буфере МОПС, который озвучивали течение 1 мин. Затем 3 мл полученной эмульсии амина по каплям при постоянном перемешивании добавляли к 5 мл раствора фолиевой кислоты RA-COOH с активированной карбоксильной группой.

Реакционную смесь оставляли на ночь при комнатной температуре. Реакция образования конъюгата сопровождалась выпадением осадка. Осадок отделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин, промывали, ресуспендируя в воде, и повторно осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин. Процедуру промывки повторяли дважды для удаления не прореагировавших водорастворимых RA-COOH, ДЭК и побочного продукта реакции изомочевины. Полученный осадок лиофилизовали для полного удаления воды. Высушенный продукт растворяли в метаноле, при необходимости центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин для удаления примесей, нерастворимых в спирте.

На рисунке приведены хроматограммы фолиевой кислоты (рисунок, А) и конъюгата фолиевой кислоты с додециламином (рисунок, Б).



А)



Б)

Рисунок. Хроматограммы фолиевой кислоты (А) и продукта реакции фолиевой кислоты с додециламином (Б). Подвижная фаза метанол и 0,1% водный раствор муравьиной кислоты. Условия хроматографирования: линейный градиент метанола от 30 до 90% за 5 мин, затем изократический режим 90% метанола до 20 мин. Детектирование осуществляли при длине волны 280 нм.

Из рисунка А видно, что время удерживания фолиевой кислоты составляет 5,6 мин. При хроматографировании продукта, полученного в результате взаимодействия фолиевой кислоты и додециламина, время удерживания основного пика около 11 мин (рисунок), наблюдаемый минорный пик по времени выхода соответствует свободной фолиевой кислоте. Методом ВЭЖХ с использованием масс-спектрометрического детектирования было показано, что пик, время удерживания которого составляет 11 мин, соответствует *m/z*=609,7 – иону конъюгата додециламина с фолиевой кислотой при её модификации по одной карбоксильной группе.

Используемый способ образования конъюгата фолиевой кислоты с додециламином не затрагивал ароматические группы фолиевой кислоты, отвечающие за поглощение адресного фрагмента в ультрафиолетовой области спектра [8]. Поэтому площадь пика коньюгата при ВЭЖХ анализе с оптическим детектированием соответствует количеству фолиевой кислоты в составе конъюгата. Следовательно, количественное определение конъюгата возможно по содержанию фолиевой кислоты, концентрация которой может быть определена из соотношения C=S/18746, и мол. массе конъюгата – 608,7. С учётом этого, расчётный выход продукта – конъюгата фолиевой кислоты с додециламином – составил около 30%.

Таким образом, был получен адресный конъюгат фолиевой кислоты с додециламином с использованием активатора карбоксильной группы N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида. В настоящее время ведутся работы по оптимизации условий проведения синтеза RA-COOH с линкером $R\text{-}NH_2$ с целью повышения выхода конъюгата, а также получения конъюгатов с другими адресными фрагментами с карбоксильной группой (например, биотин) и линкеров вида $R\text{-}NH_2$. В предварительных экспериментах на клетках Hep G2 показано увеличение связывания адресного фрагмента фосфолипидной системы транспорта с опухолевыми клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60414X0021).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Mainardes R.M., Silva L.P.* (2004) Curr. Drug Targets, **5**, 449-455.
2 *McNeil S.E.* (2005) J. Leukoc. Biol., **78**, 585-594.
3 *Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., Sobolev A.S.* (2014) Curr Pharm Des. 2014 Oct 13. [Epub ahead of print].
4 *Akhtar M.J., Ahamed M., Alhadlaq H.A., Alrokayan S.A., Kumar S.* (2014) Clin. Chim. Acta, **436**, 78-92.
5 *Della-Longa S., Arcovito A.* (2014) J. Comput. Aided Mol. Des., DOI10.1007/s10822-014-9801-8
6 *Lanigan R.M., Starkov P., Sheppard T.D.* (2013) J. Org. Chem., **78**, 4512-4523.
7 *Verma S.K., Chorpade R., Pratar A., Kaushik M.P.* (2012) Tatrahedron Letters, **53**, 2373-2376.
8 *Majoros I.J., Becker A., Thomas T., Shukla R., Sho X.* (2008) in: Dendrimer conjugates for cancer treatment (Majoros I.J., Baker J.R. Jr., eds.) Han Stanford Publishing Pte. Ltd, USA, pp. 153-155.

Поступила: 03. 12. 2014.

DEVELOPMENT OF TARGETED DRUG DELIVERY SYSTEM: SYNTHESIS OF CONJUGATES OF ADDRESS FRAGMENT (RA-COOH) WITH LIGAND ($R\text{-}NH_2$)

M.A. Sanzhakov, D.V. Ignatov, V.N. Prozorovskyi, O.S. Druzhilovskaya, N.V. Medvedeva, O.M. Ipatova

Institute of Biomedical Chemistry,
10, Pogodinskaya str., Moscow,119121, Russia; tel. +7(499)2469491, +7(495)7083807

One of the main ways to increase the effectiveness of well-known medical formulations well-established in clinical medicine – development of delivery systems using new technological approaches and nanomaterials. Currently, much attention is given to targeted delivery systems. At the same time drug carrier has in addition to medication the so-called vector/address with a high affinity for binding to specific receptors on cells/tissue target. In this paper it is described the method for producing of address conjugates to over-expressed receptors on the tumor cells. As address fragment it was folic acid and as a linker it was dodecylamine, causing inclusion the conjugate into lipid nanoparticles.

Key words: targeted delivery system, amide bond, oncology, folic acid, dodecylamine.