



УДК 547.466'395

© 1994 Ю. Л. Себякин, Н. Л. Федякова,  
Т. Л. Рунова

## СИНТЕЗ АМФИФИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ L-СЕРИНА

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

Ключевые слова: алифатические производные L-серина, липопептиды, полимерные липосомы.

Осуществлен синтез ряда новых алифатических производных L-серина — гексадецилового эфира N-пальмитоил-L-серина, метилового эфира N-арахиноил-L-серина, а также 4-(O<sup>1</sup>-гексадецил-N-пальмитоил-L-серин-O<sup>3</sup>-ил)-2-метилсукцината, 4-(O<sup>1</sup>-метил-N-арахиноил-L-серин-O<sup>3</sup>-ил)-2-метилсукцината, 4-(O<sup>1</sup>-гексадецил-N-пальмитоил-L-серин-O<sup>3</sup>-ил)-2-метил-О<sup>1</sup>-сериносукцината, — содержащих группировку, способную полимеризоваться под действием УФ-облучения. Вещества синтезированы для проведения модельных исследований по получению полимерных липосом.

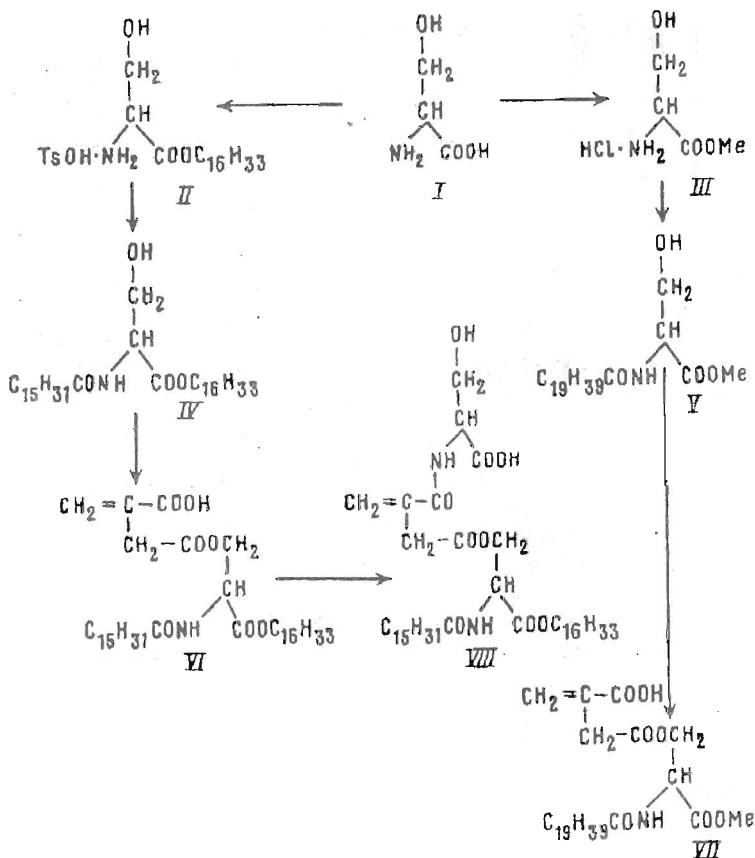
В настоящее время доказано, что способность самопроизвольно образовывать везикулы (липосомы) не является уникальным свойством только одних природных фосфолипидов. Такое поведение характерно для широкого ряда амфифильных структур различных классов соединений.

В связи с этим синтез новых веществ, обладающих амфифильностью, изучение их поведения в составе модельных мембран, проведение различных биохимических исследований и последующее экстраполирование полученных результатов на свойства биологических мембран представляет большой интерес.

Результаты подобных исследований могут иметь и потенциальное практическое применение, например для конструирования биологических «контейнеров» направленного транспорта биологически активных соединений в организме животных и человека [1—4].

Особое место среди изучаемых объектов занимают алифатические производные аминокислот. Это связано, во-первых, с природной физиологической совместимой основой объектов, а во-вторых, с полифункциональностью аминокислот, которая позволяет осуществлять разнообразные модификации на одном и том же соединении. Известен ряд примеров [5—7], когда производные аминокислот использовались в синтезе различных липидов в качестве гидрофобного фрагмента, а также для образования полярной головной группы.

Благодаря указанным свойствам алифатические производные аминокислот (липопептиды) могут служить основой для образования бислоиных систем (везикул, липосом) взамен фосфолипидов. Отличительными особенностями подобных соединений являются относительная простота их получения и возможность мо-



дификации поверхности липосом за счет свободных функциональных групп мономеров.

В работе [8] предпринята попытка использования липопептидов для образования полимерных биodeградируемых липосом обработкой липопептидных дисперсий водорастворимыми карбодиимидами. Полученные везикулы были непроницаемы для анионных и нейтральных молекул, хотя степень полимеризации оказалась невысокой, что авторы объясняют неэквивалентностью реакционных групп и возможностью образования лактамов.

Настоящая работа является продолжением ранее начатых исследований в области синтеза модифицированных липидов, способных к полимеризации, для изучения их поведения в составе липосом. Нами осуществлен синтез ряда новых алифатических производных *L*-серина: гексадецилового эфира *N*-пальмитоил-*L*-серина, метилового эфира *N*-арахиноил-*L*-серина, а также 4-(*O*<sup>1</sup>-гексадецил-*N*-пальмитоил-*L*-серин-*O*<sup>3</sup>-ил)-2-метилсукцината, 4-(*O*<sup>1</sup>-метил-*N*-арахиноил-*L*-серин-*O*<sup>3</sup>-ил)-2-метилсукцината, 4-(*O*<sup>1</sup>-гексадецил-*N*-пальмитоил-*L*-серин-*O*<sup>3</sup>-ил)-2-метил-1-сериносукцинамида, содержащих группировку, способную полимеризоваться под действием УФ-облучения. Второй остаток *L*-серина введен с целью увеличения полярности соединения. Вещества синтезированы для модельных исследований по получению полимерных липосом.

Гексадециловый эфир *L*-серина (II) (см. схему) получали сплавлением аминокислоты (I) с соответствующим спиртом и *n*-толуолсульфокислотой при температуре 130° С, а метиловый эфир *L*-серина (III) — кипячением (I) в метаноле в присутствии тионилхлорида.

Для проведения реакции *N*-ацилирования соединения (II) и (III) предварительно переводили в свободные основания обработкой 0,1 М раствором бикарбоната

натрия, а затем осуществляли взаимодействие с N-гидроксисукцинимидным эфиром пальмитиновой или арахидиновой кислоты соответственно [9]. Строение синтезированных алифатических производных L-серина (IV) и (V) было подтверждено данными ИК- и ПМР-спектров. В ИК-спектре соединений присутствовали характеристические групповые частоты свободной гидроксильной и амидной групп, алифатических цепей, сложноэфирных группировок и двух амидных полос.

Характерными сигналами в ПМР-спектре соединения (IV) являлись сигналы  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>-группы пальмитиновой кислоты ( $\delta$  2,25 м. д.) и гексадецилового спирта ( $\delta$  4,14 м. д.) и NH-группы в виде дублета с  $\delta$  6,43 м. д.,  $J$  7 Гц, а в ПМР-спектре соединения (V) — сигнал OCH<sub>3</sub> в виде синглета с  $\delta$  3,7 м. д. и NH-группы в виде дублета с  $\delta$  6,44 м. д.

Таким образом, были синтезированы производные L-серина с различными алифатическими фрагментами.

На следующем этапе соединения (IV) и (V) были использованы для получения липопептидов, способных к полимеризации. В качестве функциональной группировки, способной к полимеризации, была выбрана система сопряженных связей итаконовой кислоты. Данная кислота была выбрана в связи с тем, что условия ее полимеризации просты и хорошо изучены [10]. Кроме того, свободная карбоксильная группа в сочетании со сложноэфирной и амидной группами должна вносить свой вклад в формирование полярной головки.

Для получения итаконатов (VI) и (VII) ангидрид итаконовой кислоты и соответствующие спирты (IV) и (V) выдерживали в толуоле в присутствии триэтиламина в течение 16 ч.

В ПМР-спектрах синтезированных соединений наблюдалось появление характерных сигналов протонов при двойной связи (CH<sub>2</sub>-группа) в виде двух синглетов с  $\delta$  5,8 и 6,4 м. д. По литературным данным [11], раскрытие кольца итаконового ангидрида простыми спиртами приводит к образованию структурных изомеров эфиров по 1-му и 4-му углеродным атомам в соотношении 1:9 (по данным ПМР-спектроскопии). В нашем случае сложность интерпретации ПМР-спектров итаконатов (VI) и (VII) не позволила произвести это отнесение. При ТСХ позиционные изомеры синтезированных соединений не разделялись.

Для увеличения полярности алифатических производных L-серина по методу N-гидроксисукцинимидных эфиров [9] к итаконату (VI) был присоединен остаток еще одной молекулы L-серина (VIII).

Таким образом, предложенная схема позволила осуществить синтез ряда амфифильных соединений на основе одной аминокислоты, различающихся длиной и количеством алифатических цепей, а также полярностью гидрофильной части, что позволяет проследить зависимость структура — свойства этого класса соединений.

Результаты работы по получению и свойствам липидных дисперсий и реакции полимеризации формируемых липосом будут описаны в следующей публикации.

Предварительные данные указывают на то, что синтезированные алифатические производные аминокислот могут служить интересной альтернативой фосфолипидам в качестве объекта для получения модельных мембранных систем.

### Экспериментальная часть

В работе использовали пальмитиновую, арахидиновую, итаконовую кислоты, N-гидроксисукцинимид, дициклогексилкарбодиимид (DCC) отечественного производства и гидрохлорид L-серина фирмы Merck (ФРГ).

Спектры ПМР регистрировали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-200 (ФРГ) с рабочей частотой 200 МГц. Внутренний стандарт — гексаметилдисилоксан. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония). Масс-спектры положительных и отрицательных ионов получены на биохимическом масс-спектрометре (МСБХ) производства НПО «Электрон» (г. Сумы, Украина) с использованием метода плазменно-десорбции.



онной масс-спектрометрии (ПДМС). Температуры плавления определяли на приборе Voethius (Германия) и не корректировали. Для ТСХ применяли силуфол UV-254 (ЧСФР) в системах хлороформ — метанол, 10 : 1 (А), эфир — гексан, 4 : 1 (В), хлороформ — метанол, 2 : 1 (С) с последующим обугливанием при 350° С; вещества, содержащие двойные связи, обнаруживали раствором марганцовокислого калия. Препаративную ТСХ проводили на силикагеле L 40/100 мкм (ЧСФР).

Свободные аминогруппы обнаруживали 5% раствором нингидрина с последующим нагреванием, алифатические производные аминокислот проявлялись при обработке параамида.

*n*-Толуолсульфонат гексадецилового эфира *L*-серина (II). Смесь 5,76 г (23,8 ммоль) цетилового спирта и 1 г (9,52 ммоль) *L*-серина нагревали на масляной бане при 130° С. После расплавления гексадеканола добавляли 2,13 г (12,3 ммоль) *n*-толуолсульфокислоты и продолжали нагревание в течение 2 ч. Ход реакции контролировали ТСХ. Реакционную массу охлаждали до 30—40° С и разбавляли 150 мл эфира. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, сушили в вакууме. Получали 3,78 г (79,2%) соединения (II),  $R_f$  0,33 (А), т. пл. 122—124° С (эфир).

Гексадециловый эфир *N*-пальмитоил-*L*-серина (IV). К 70 мл 0,1 М раствора гидрокарбоната натрия добавляли 3 г (5,08 ммоль) *n*-толуолсульфоната гексадецилового эфира *L*-серина (II) и смешивали с 50 мл ТНФ. Образовавшуюся массу интенсивно перемешивали 1 ч на магнитной мешалке. Прибавляли к реакционной смеси раствор 2,26 г (6,35 ммоль) пальмитоил-*N*-гидроксисукцинимидата [9] в 20 мл ТНФ и перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем выдерживали 2 ч при 80° С. Органический растворитель упаривали на роторном испарителе, остаток разбавляли 100 мл дистиллированной воды, подкисляли до pH 2 раствором HCl (1 н.), выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой до pH 7, сушили в вакууме. После перекристаллизации из смеси хлороформ—гексан получали 2,57 г (77,4%) соединения (IV),  $R_f$  (В) 0,52, т. пл. 80—82° С.

Масс-спектр,  $m/z$ : 568,9 ( $[M+H]^+$ ).

ИК-спектр (вазелиновое масло,  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ): 3320 (ОН), 2920 (CH<sub>3</sub>), 2850 (CH<sub>2</sub>), 1740 (C=O), 1720 (C=O), 1640 (I NHCO), 1540 (II NHCO), 1460 (CH<sub>3</sub>), 1375 (CH<sub>2</sub>), 1235 (C—O), 1442 (C—O), 1083 (C—O), 1023 (C—O), 718 (CH<sub>2</sub>).

ПМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , м. д.): 0,86 (т, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,25 (уш. с, 5OH, CH<sub>2</sub>), 1,64 (м, 4H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 2,25 (т, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 3,62 (м, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4,14 (м, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 4,65 (м, 1H, CH), 6,43 (д, 1H, NH).

4-(*O'*-Гексадецил-*N*-пальмитоил-*L*-серин-*O'*-ил)-2-метиленсукцинат (VI). К 1,01 г (1,78 ммоль) гексадецилового эфира *N*-пальмитоил-*L*-серина (IV) добавляли 0,2 г (1,78 ммоль) ангидрида итаконовой кислоты и растворяли при нагревании (50—70° С) в 100 мл толуола, добавляли по каплям 0,25 мл триэтиламина. Выдерживали 16 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли на роторном испарителе, остаток растворяли в 100 мл хлороформа, обрабатывали 30 мл 30% раствора серной кислоты, промывали водой до нейтральной среды, сушили сульфатом натрия. Органический растворитель удаляли в вакууме, остаток промывали 3 × 50 мл гексана, сушили в вакууме. После препаративной хроматографии на пластинках с силикагелем получали 0,95 г (78%) целевого продукта (VI),  $R_f$  0,65 (В), 0,84 (А), т. пл. 63—65° С.

Масс-спектр,  $m/z$ : 679,1 ( $[M-H]^-$ ).

ИК-спектр (вазелиновое масло,  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ): 3300—3000, 2920 (CH<sub>3</sub>), 2850 (CH<sub>2</sub>), 1740 (C=O), 1700 (C=O), 1670 (C=C), 1640 (I NHCO), 1540 (II NHCO), 1460 (CH<sub>3</sub>), 1375 (CH<sub>2</sub>), 1235 (C—O), 1142 (C—O), 1083 (C—O), 1023 (C—O), 718 (CH<sub>2</sub>).

ПМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , м. д.): 0,86 (т, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,25 (уш. с, 5OH, CH<sub>2</sub>), 1,64 (м, 4H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 2,25 (т, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 3,72 (м, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3,93 (м, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 4,14 (т, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 4,65 (м, 1H, CH), 5,88 (с, 1H, CH<sub>2</sub>=), 6,35—6,5 (м, 2H, CH<sub>2</sub>=, NH).

4-(*O*<sup>1</sup>-Гексадецил-*N*-пальмитоил-*L*-серин-*O*<sup>3</sup>-ил)-2-метилен-*O*<sup>1</sup>-сериносуццинат (VIII). К раствору 34,5 мг (0,3 ммоль) *N*-гидроксисуццинимиды в 3 мл безводного этилацетата прибавляли последовательно раствор 204 мг (0,3 ммоль) соединения (VI) в 3 мл безводного хлороформа и раствор 61,8 мг (0,3 ммоль) DCC в 1 мл безводного этилацетата. Смесь выдерживали в течение 16 ч, выпавший осадок отфильтровывали, промывали безводным этилацетатом. Органический растворитель удаляли в вакууме, получали 209,3 мг (91,3%) хроматографически гомогенного *N*-гидроксисуццинимидного эфира соединения (VI) ( $R_f$  0,67 (B), т. пл. 49—51° С), который без дополнительной очистки использовали на следующей стадии.

К раствору 138,5 мг (0,18 ммоль) полученного соединения в 5 мл THF прибавляли раствор 19 мг (0,18 ммоль) *L*-серина и 15 мг (0,18 ммоль) бикарбоната натрия в 5 мл воды. Образовавшуюся смесь нагревали на масляной бане при 85° С в течение 10 ч. По окончании реакции (контроль ТСХ) смесь охлаждали, нейтрализовали 1 н. раствором соляной кислоты. Органический растворитель удаляли в вакууме, остаток разбавляли 10 мл дистиллированной воды, выпавший осадок отфильтровывали, сушили на воздухе. Полученный технический продукт очищали препаративной хроматографией на пластинках с силикагелем. Выход 94 мг (68%) соединения (VIII),  $R_f$  0,39 (A), т. пл. 111—115° С.

Масс-спектр,  $m/z$ : 766,1 ( $[M-H]^+$ ), 679,4, 564,7, 535,1.

ИК-спектр (вазелиновое масло,  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ): 3700—3000, 2920 ( $CH_3$ ), 2868 ( $CH_2$ ), 1740 (C=O), 1700 (C=O), 1673 (C=C), 1645 (I NHCO), 1551 (II NHCO), 1475 ( $CH_3$ ), 1380 ( $CH_2$ ), 1235 (C—O), 1140 (C—O), 1090 (C—O), 1020 (C—O).

ПМР-спектр ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 0,86 (т, 6H,  $CH_3$ ), 1,25 (уш. с, 5OH,  $CH_2$ ), 1,64 (м, 4H,  $\beta-CH_2$ ), 2,27 (т, 2H,  $\alpha-CH_2$ ), 3,75 (м, 2H,  $CH_2COO$ ), 3,95 (м, 2H,  $COOCH_2$ ), 4,14 (т, 2H,  $\alpha-CH_2$ ), 4,6 (м, 2H, 2CH), 5,88 (с, 1H,  $CH_2=$ ), 6,3—6,5 (м, 3H,  $CH_2=$ , 2NH).

Хлоридрат метилового эфира *L*-серина (III). К 25 мл метанола при охлаждении до 0° С прибавляли 1,36 мл (19 ммоль) тионилхлорида и перемешивали 30 мин. К полученному раствору при 0° С добавляли 2 г (19 ммоль) *L*-серина и смесь нагревали на масляной бане при 50° С в течение 2 ч. По окончании реакции массу выливали в 150 мл охлажденного эфира, выпавший осадок отфильтровывали, сушили в вакууме-эксикаторе над KOH. Получали 2,75 мл (85,4%) соединения (III),  $R_f$  0,34 (C), т. пл. 140—142° С. ПМР-спектр ( $CDCl_3-CD_3OD$ , 10 : 1,  $\delta$ , м. д.): 3,7 (с, 3H,  $COCH_3$ ), 3,82 (м, 1H, CH), 3,98 (с, 2H,  $CH_2$ ).

Метиловый эфир *N*-арахиноил-*L*-серина (V). К раствору 1,25 г (2,94 ммоль) арахиноил-*N*-гидроксисуццинимиды [9] в 30 мл THF добавляли 0,5 г (2,94 ммоль) соединения (III) и раствор 0,24 г (2,98 ммоль)  $NaHCO_3$  в 30 мл воды. Реакционную смесь нагревали на масляной бане при 85° С в течение 2 ч. Органический растворитель удаляли в вакууме, остаток разбавляли 100 мл воды, подкисляли 1 н. раствором соляной кислоты до pH 2. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной среды, сушили в вакууме. После перекристаллизации из смеси хлороформ — гексан получали 1,2 г (95%) соединения (V),  $R_f$  0,29 (B), т. пл. 89—91° С.

Масс-спектр,  $m/z$ : 414,7 ( $[M+H]^+$ ); 412,2 ( $[M-H]^+$ ).

ИК-спектр (вазелиновое масло,  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ): 3300—3000, 2920 ( $CH_3$ ), 2850 ( $CH_2$ ), 1738 (C=O), 1720 (C=O), 1645 (I NHCO), 1540 (II NHCO), 1455 ( $CH_3$ ), 1375 ( $CH_2$ ), 1235 (C—O), 1140 (C—O), 1083 (C—O), 1020 (C—O), 720 ( $CH_2$ ).

ПМР-спектр ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , м. д.): 0,9 (т, 3H,  $CH_3$ ), 1,3 (уш. с, 32H,  $CH_2$ ), 1,6 (м, 2H,  $\beta-CH_2$ ), 2,0—2,4 (м, 2H,  $\alpha-CH_2$ ), 3,35 (с, 3H,  $COOCH_3$ ), 4,6—4,9 (м, 1H, CH), 6,35 (д, 1H, NH).

4-(*O*<sup>1</sup>-Метил-*N*-арахиноил-*L*-серин-*O*<sup>1</sup>-ил)-2-метиленсуццинат (VII). К раствору 724 мг (1,75 ммоль) соединения (V) и 200 мг (1,75 ммоль) ангидрида



итаконовой кислоты в 30 мл толуола прикапывали 0,25 мл триэтиламина и смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 16 ч. Затем растворитель удаляли на роторном испарителе, остаток растворяли в 100 мл хлороформа, промывали 30 мл 30% раствора серной кислоты, водой до pH 7, сушили сульфатом натрия. Хлороформ упаривали, остаток промывали 3 × 50 мл гексана, сушили в вакууме. После препаративной хроматографии на пластинках с силикагелем получили 0,9 г (69%) соединения (VII), R<sub>f</sub> 0,59 (A), 0,45 (B), т. пл. 56—58° С.

Масс-спектр, *m/z*: 526,6 ( $[M + H]^+$ ), 414,6; 524,9 ( $[M - H]^-$ ).

ИК-спектр (вазелиновое масло,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300—3000, 2920 (CH<sub>3</sub>), 2855 (CH<sub>2</sub>), 1740 (C=O), 1700 (C=O), 1670 (C=C), 1640 (I NHCO), 1540 (II NHCO), 1460 (CH<sub>3</sub>), 1375 (CH<sub>2</sub>), 1235 (C—O), 1142 (C—O), 1080 (C—O), 1020 (C—O), 720 (CH<sub>2</sub>).

ПМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , м. д.): 0,86 (т, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,25 (уш. с, 32H, CH<sub>2</sub>), 1,64 (м, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 2,25 (т, 2H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 3,35 (с, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3,72 (м, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 3,93 (м, 2H, COOCH<sub>2</sub>), 4,65 (м, 1H, CH), 5,88 (с, 1H, CH<sub>2</sub>=), 6,35—6,5 (м, 2H, CH=, NH).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kunitake T., Okahata Y.//J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. № 7. P. 3860—3861.
2. Bader H., Dorn K., Hupfer B., Ringsdorf H.//Adv. Polym. Sci. 1985. V. 64. № 1. P. 1—62.
3. O'Brien D. F., Klingbiel R. T., Specht D. P., Tyminski P. N.//Ann. N. Y. Acad. Sci. 1985. V. 446. № 1. P. 282—295.
4. Любешкин А. В., Себякин Ю. Л., Евстигнеева Р. П.//Биол. мембраны. 1993. Т. 10. № 4. С. 456—462.
5. Kunitake T., Tawaki S., Nakashima N.//Bull. Chem. Soc. Jap. 1983. V. 56. № 2. P. 3235—3242.
6. Marr-Leisy D., Neumann R., Ringsdorf H.//Colloid Polym. Sci. 1985. V. 263. P. 791—798.
7. Neumann R., Ringsdorf H.//J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 106. № 1. P. 487—490.
8. Neumann R., Ringsdorf H., Patron E. V., O'Brien D. F.//Biochim. et. biophys. acta. 1987. V. 898. № 1. P. 338—348.
9. Lapidot Y., Rappoport S., Wolman Y.//J. Lipid Res. 1967. V. 8. № 1. P. 142—145.
10. Takane U., Shigehara K., Tsuchida E.//Makromol. Chem. 1986. V. 187. № 2. P. 853—862.
11. Elbert R., Folda T., Ringsdorf H.//J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 14. P. 7687—7691.

Поступила в редакцию  
22.IX.1993

После доработки  
5.II.1994

*Yu. L. Sebyakin, N. L. Fedyakova, T. L. Runova*  
SYNTHESIS OF AMPHIPHILIC L-SERINE DERIVATIVES

*M. V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology,  
Moscow*

Key words: *L*-serine derivatives, lipoproteines, polymeric liposomes.

Derivatives of *L*-serine with aliphatic chains of different length and various polar groups were synthesized. The compounds obtained contain a fragment allowing for polymerization upon UV-irradiation.