



УДК 547.426.057

ТВЕРДОФАЗНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА КАТИОННЫХ ЛИПИДОВ

© 1999 г. А. Ю. Суровой[#], Н. С. Егорова, Ж. О. Гребенникова, О. Г. ШамборантИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 26.10.98 г. Принято к печати 30.10.98 г.

Предложен новый подход к структурно-функциональным исследованиям катионных липидов, включающий в себя их полный химический синтез на твердофазных полимерных носителях.

Ключевые слова: катионные липиды; системы доставки; нуклеиновые кислоты; трансфекция; генная терапия.

Способы и механизмы доставки генетического материала в клетки эукариот *in vitro* (трансфекция) и *in vivo* (генная терапия) интенсивно разрабатываются в последнее время в связи с реальной возможностью генетической коррекции многих заболеваний, не поддающихся лечению методами традиционной терапии. Перенос генов достигается либо с помощью вирусных векторов, либо с помощью невирусных систем доставки. Большинство невирусных систем доставки основано на использовании положительно заряженных соединений, таких, как катионные липиды либо катионные полимеры. Подобные соединения спонтанно взаимодействуют с молекулами ДНК (РНК) с образованием компактных структур, способных проникать в клетку. Невирусные системы доставки нуклеиновых кислот потенциально имеют ряд преимуществ, например простое производство, безопасность, стабильность, отсутствие ограничений по объему доставляемой ДНК (РНК), и, наконец, низкая иммуногенность.

Катионные липосомы прекрасно зарекомендовали себя как системы доставки нуклеиновых кислот в эукариотические клетки *in vitro*. Более того, в настоящее время они рассматриваются как возможные кандидаты для доставки генов *in vivo*. На сегодняшний день известно более двух десятков катионных липидов различного строения. Существенные различия между ними не позволяют проследить связь между структурой и функцией. Очевидно, что необходим системный подход, предполагающий синтез катионных липидов с определенными отличиями в структуре,

для поиска более активных аналогов и выяснения механизма их действия.

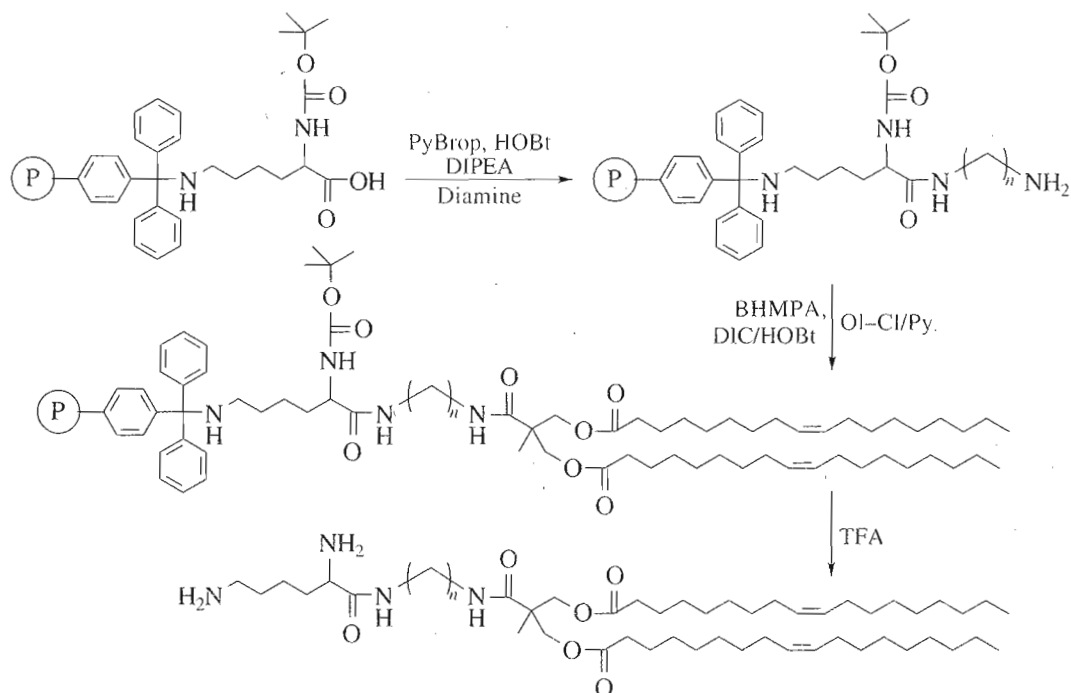
Традиционный химический синтез липидов, в том числе катионных, часто представляет собой трудоемкую задачу, связанную с многостадийностью синтеза и необходимостью очистки промежуточных соединений. В связи с этим описаны лишь единичные попытки системного изучения катионных липидов. Твердофазный метод синтеза пептидов, предложенный Меррифилдом еще в 1963 г. [1], в настоящее время находит применение при получении органических соединений других классов. С целью системного изучения структурно-функциональных связей в ряду катионных липидов мы использовали твердофазный метод для их полного химического синтеза. При этом предполагается варьировать многие фрагменты их структуры, включая гидрофильную, спейсерную, якорную и гидрофобную группировки. В настоящей работе в качестве примера мы приводим описание синтеза, характеристик и активностей одной серии катионных липидов, отличающихся между собой по спейсерной группировке.

В предыдущих работах мы показали, что липосомы, приготовленные из катионных липидов на основе лизина в качестве гидрофильной группировки, способны эффективно трансфицировать клетки *in vitro* [2]. В отличие от других известных катионных липидов, липиды на основе лизина проявляли более высокую активность в присутствии сыворотки в экспериментах *in vitro* [2]. Последнее обстоятельство позволяет ожидать их более высокой активности при использовании *in vivo*.

Синтез липидных производных лизина (схема) проводили в ручном варианте на 50 мг полимера в параллельных реакторах. Присоединение лизина по его N^ε-аминогруппе к хлортритилированно-

Сокращения: ВНМРА – 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовая кислота; DIPEA – диизопропилэтиламин; RuVтор – бромтрипирилодинофосфонийгексафторфосфат; НОВт – гидроксibenзотриазол; DIC – диизопропилкарбодимид; TFA – трифторуксусная кислота; ОI-Cl – олеилхлорид; Ру – пиридин.

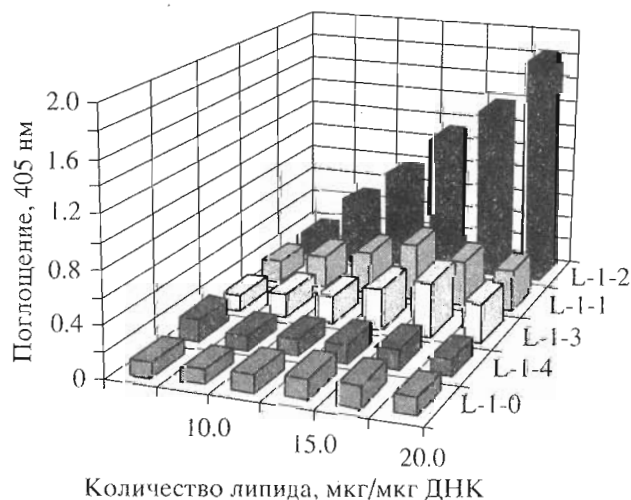
[#] Автор для переписки (e-mail: surovoy@ibch.siocb.ras.ru).



Синтез катионных липидов на твердофазном полимерном носителе. (P) – полимер.

му полимеру (0.9 ммоль Cl/г полимера, стирол-дивинилбензол 1%; PepChem, Германия) осуществляли при помощи триметилсилилового эфира N^α-Вос-лизина. Нагрузка на этой стадии синтеза составляла 0.4 ммоль лизина на г полимера. Триметилсилильную группу удаляли мягким гидролизом. Карбоксильную группу активировали превращением в гидроксibenзотриазоловый эфир и вводили в реакцию с 10-кратным избытком соответствующего диамина. Далее свободную ами-

ногруппу ацилировали 10-кратным избытком 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовой кислоты и затем этерифицировали гидроксильные группы 10-кратным избытком олеилхлорида в пиридине. Липидные производные удаляли со смолы обработкой смесью трифторуксусной кислоты в дихлорметане. Липиды выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и характеризовали методами ВЭЖХ и масс-спектрологии (таблица). Выход очищенных липидов составлял около 40% от теоретического.



Трансфекция L929 мышинных фибробластов rCMVβ-Gal плазмидой в комплексе с различными липидами.

Первичный скрининг синтезированных липидов проводили на культурах мышинных фибробластов L929 *in vitro*. 5×10^3 клеток трансфицировали 0.1 мкг плазмиды rCMVβ-Gal, содержащей ген β-галактозидазы под контролем цитомегаловирусного промотора, в комплексе с различными концентрациями липидов. Эффективность трансфекции оценивали по продукции β-галактозидазы через 24 ч с использованием 2-нитрофенилгалктопиранозида. Более подробно метод тестирования будет опубликован отдельно. Как видно из рисунка, все синтезированные липиды способны трансфицировать L929 мышинные фибробласты. Активность липидов распределялась так: L-1-2>L-1-1=L-1-3>L-1-0=L-1-4. В этой серии липидов наибольшую активность проявил липид L-1-2, в котором в качестве спейсера был использован диаминобутан. Более того, активность L-1-2-липида превышала более чем в 4 раза активность L-1-3-липида. При этом последний отлича-

Катионные липиды

Шифр соед.	Спейсер	<i>M</i> вычисл.	[<i>M</i> + <i>H</i>] + + эксперим.*	Шифр соед.	Спейсер	<i>M</i> вычисл.	[<i>M</i> + <i>H</i>] + + эксперим.*
L-1-0	NH ₂ -NH ₂	805.25	805.8	L-1-3	NH ₂ -(CH ₂) ₅ -NH ₂	875.38	875.7
L-1-1	NH ₂ -(CH ₂) ₂ -NH ₂	833.30	833.4	L-1-4	NH ₂ -(CH ₂) ₂ -(CH ₂ OCH ₂) ₃ - (CH ₂) ₂ -NH ₂	993.54	993.4
L-1-2	NH ₂ -(CH ₂) ₄ -NH ₂	861.36	861.4				

* Определение методом масс-спектрометрии на времяпролетном масс-спектрометре с методом ионизации МАЛДИ (Vision 2000, Thermobioanalyses, Англия). Матрица – 2,5-дигидроксibenзойная кислота.

ется наличием только одной дополнительной метиленовой группы.

Таким образом, нами показана возможность быстрого синтеза катионных липидов на твердофазных полимерах с последующим скринингом их активности на культурах клеток *in vitro*.

Авторы выражают свою признательность М.В. Серебряковой и М.И. Титову за масс-спектрометрический анализ липидов, а также В.Т. Ива-

нову и И.П. Родионову за ценные советы и консультации по работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merrifield R.B. // J. Am. Chem. Soc. 1963. V. 85. P. 2149–2154.
2. Surovoy A., Flechsler I., Jung G. Gene Therapy of Cancer. N.Y.: Plenum, 1998. P. 245–253.

The Solid Phase Synthesis of Cationic Lipids

A. Yu. Surovoy[#], N. S. Egorova, Zh. O. Grebennikova, and O. G. Shamborant

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

A new approach to studying structure–function relations in cationic lipids was proposed, which includes their total solid phase synthesis.

Key words: cationic lipids, delivery systems, nucleic acids, transfection, gene therapy

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: surovoy@ibch.siobc.ras.ru.