



УДК 547(.454+.953).057:546.22

СИНТЕЗ ЛИПОФИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО RGD-ПЕПТИДА

© 2004 г. Е. Г. Степаненко, Ю. Л. Себякин[#]

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

Поступила в редакцию 18.10.2002 г. Принята к печати 20.02.2003 г.

Методами классической пептидной химии синтезирован дигексадециловый эфир RGD-пептида с суммарным выходом 48%.

Ключевые слова: RGD-пептид; невирусная трансфекция.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с разработкой клинических протоколов генной терапии исследования, относящиеся к проблеме направленного переноса в клетки, поднялись на новый качественный уровень. Наряду с вирусными векторами, широко используемыми в качестве системы доставки функциональных генов и лекарственных веществ (трансфекции), все большее внимание уделяется разработке невирусных систем и методов переноса биологически активных веществ (БАВ) в клетки и ткани с использованием катионных липосом [1].

Катионные липосомы имеют ряд преимуществ по сравнению с вирусными векторами: защищают молекулы ДНК, мРНК или олигонуклеотидов от инактивации под действием клеточных ферментов, неинфекционны и неиммуногенны, обладают возможностью для направленного транспорта к определенным типам клеток. Катионные липосомы легко получать, они стабильны при хранении и экономически доступны. Тем не менее эффективность генного переноса с их участием на сегодняшний день все еще ниже, чем у вирусных векторов [2].

С целью поиска эффективных систем для доставки БАВ синтезированы и исследованы катионные конъюгаты гуанидина с холестерином. Показано, что гуанидиновые группы способны образовывать водородные связи с фосфатными группами полинуклеотидов, защищают их от деградации в поздних эндосомах и лизосомах и перспективны для целей трансфекции [3].

Исследована эффективность невирусной трансфекции плазмидной ДНК в клетки эпителия воздушных путей легких с использованием комплекса катионных липосом на основе коммерческого *Lipofectamine* и циклических пептидов, содержащих полилизин, а также RGD- или RGE-мотивы

[4]. Продемонстрировано значительное повышение эффективности трансфекции при добавлении пептидов по сравнению с экспериментами без них. Однако ожидаемого авторами существенного отличия в эффективности трансфекции с использованием RGD-содержащего пептида, обладающего преимущественным сродством к интегриновым рецепторам поверхности клеток легких и способностью быстро и селективно проникать в клетку по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза [5], перед его аналогом обнаружить не удалось. Авторы отмечают, что при использованном в протоколе трансфекции соотношении ДНК–пептид–липид (1 : 5 : 24, по весу) катионные липосомы, возможно, экранируют RGD-последовательность, делая ее недоступной для интегринов поверхности клетки, и, что трансфекция, в основном, управляется неспецифическим механизмом проникновения в клетку. Тем не менее повышение эффективности трансфекции путем дополнительного введения в состав комплексов ДНК–катионные липосомы пептидных фрагментов, способствующих активации механизма рецептор-опосредованного эндоцитоза или энергетически независимого процесса слияния с мембраной клетки, признано перспективным.

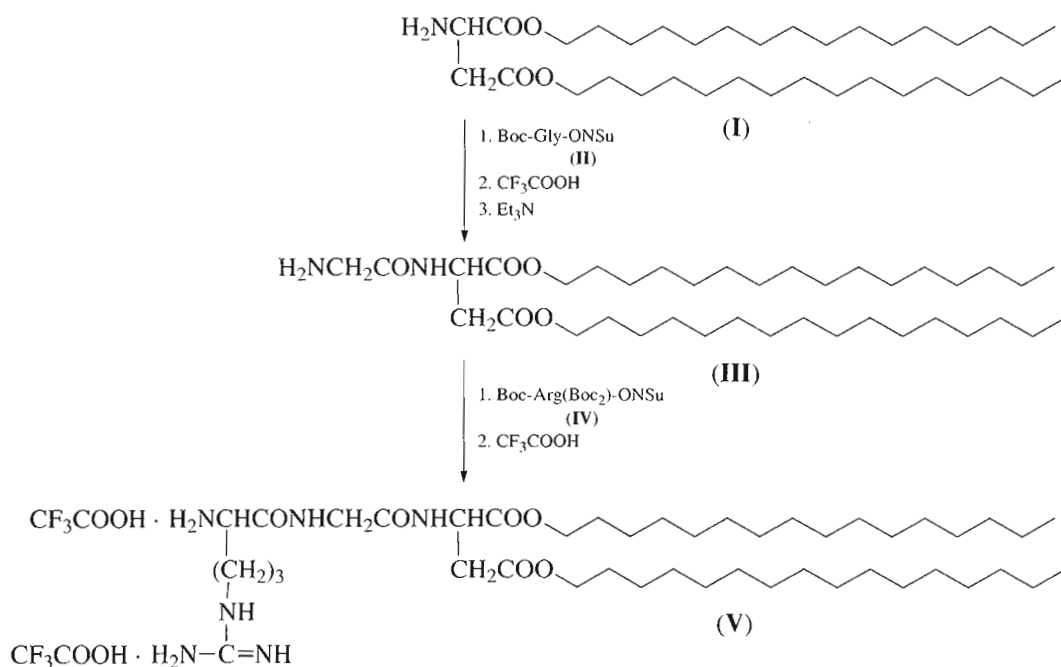
Продолжение исследований по поиску новых систем, способных повысить эффективность переноса репортерных генов в клетку, является весьма актуальным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В этой связи мы предприняли синтез липофильного производного RGD-пептида. В дальнейшем предполагаем изучение комплексов липопептида с ДНК, дополнительное включение его в состав комплексов катионные липосомы–ДНК и проведение сравнительного исследования эффективности невирусной трансфекции образующихся комплексов.

Синтез дигексадецилового эфира трипептида Arg-Gly-Asp (V) был осуществлен последователь-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 434-85-44; эл. почта: htotos.mithit@g23.relcom.ru).



ным наращиванием цепи с использованием активированных эфиров [6] по схеме.

Продукт реакции *N*-гидроксисукцинимидного эфира *трет*-бутоксикарбонилглицина (II) с дигексадециловым эфиром *L*-аспарагиновой кислоты (I) обрабатывали трифторуксусной кислотой, а образовавшуюся соль переводили триэтиламинном в свободное основание. Структура полученного соединения (III) подтверждена данными ¹H-ЯМР-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. Далее синтезировали Boc-Arg(Boc₂)-OH [7] и его *N*-гидроксисукцинимидный эфир (IV), затем проводили реакцию взаимодействия с амином (III) и удаление защитных групп. Суммарный выход соединения (V) в расчете на три стадии составил 48%. Структура синтезированного липотрипептида была подтверждена спектральными данными.

Таким образом, в ходе проделанной работы была отработана методика получения дигексадецилового эфира аргинилглициласпарагиновой кислоты для проведения последующих биохимических исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *N*-гидроксисукцинимид, дициклогексилкарбодимид (DCC) отечественного производства ("х.ч."), *N*-гидроксисукцинимидный эфир *трет*-бутоксикарбонилглицина (Merck, Германия) и дигексадециловый эфир *L*-аспарагиновой кислоты, полученный согласно [8].

Спектры ¹H-ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-200 (Германия) с рабочей частотой

200 МГц. Внутренний стандарт – гексаметилди-силоксан. ИК-спектры записывали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония). Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре VISION 2000 (Великобритания) методом MALDI.

Температуры плавления определяли на приборе Voetius (Германия) и не корректировали. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV-245 (Чехия) в системах растворителей: А (хлороформ–метанол, 9 : 1); Б (хлороформ–этанол–аммиак, 3 : 4 : 1); В (хлороформ–метанол–уксусная кислота, 8.5 : 0.5 : 0.2); Г (петролейный эфир–этилацетат, 4 : 1). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100 мкм (Чехия).

Вещества детектировали при ТСХ в парах йода нагреванием при температуре 350°C и парами хлора с последующим опрыскиванием раствором, состоящим из 160 мг толидина, 1 г KI в 30 мл CH₃COOH и 470 мл H₂O [9]. Свободные аминокислоты обнаруживали 5% раствором нингидрина в смеси ацетона и уксусной кислоты (30 : 1) с последующим нагреванием до 50–80°C. *N*-Гидроксисукцинимидные эфиры обнаруживали последовательным опрыскиванием растворами (14% NH₂OH · HCl в 20 мл H₂O, 14% NaOH в 8.5 мл H₂O) и через 2 мин 5% FeCl₃ в 1.2 н. HCl [6].

Глициласпарагиновой кислоты дигексадециловый эфир (III). К раствору 0.41 г (1.51 ммоль) *N*-гидроксисукцинимидного эфира *трет*-бутоксикарбонилглицина в 5 мл тетрагидрофурана приливали раствор 0.8 г (1.38 ммоль) дигексадецилового эфира *L*-аспарагиновой кислоты в 5 мл тетрагидрофурана, добавляли 0.15 г (1.38 ммоль)

Na_2CO_3 и перемешивали реакционную массу в течение 8 ч при температуре 45°C. Реакцию контролировали с помощью ТСХ. Растворитель удаляли в вакууме, реакционную массу подкисляли 0.1 н. HCl до pH 6. Продукт экстрагировали этилацетатом, сушили сульфатом магния, растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе гексан–этилацетат (4 : 1), получали 0.59 г (60%), R_f (Г) 0.54, т. пл. 39–41°C, $[\alpha]_D^{20} + 12.3^\circ$ (с 1, CHCl_3) дигексадецилового эфира (*N*-трет-бутоксикарбонил)глициласпарагиновой кислоты. ИК (вазелиновое масло, ν_{max} , cm^{-1}): 3292 (NH); 2902 (CH); 2833 (CH); 1727 (C=O); 1647 (NHCO); 1545 (NHCO); 1460 (CH); 1375 (CH); 1289 (CO); 1215 (CO); 1175 (CO); 1090 (CH); 710 (CH). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.83 (т, 6H, CH_3); 1.26 (с, 52H, CH_2); 1.43 (с, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.62 (м, 4H, βCH_2); 2.86 (м, 2H, CH_2CH); 3.78 (с, 2H, CH_2); 4.06 (м, 4H, αCH_2); 4.79 (м, 1H, CH); 5.18 (м, 1H, NHoc); 7.18 (д, 1H, NH).

Полученное соединение (0.45 г, 0.61 ммоль) растворяли в 5 мл трифторуксусной кислоты. Через 30 мин (контроль ТСХ) растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в 5 мл абсолютно чистого хлороформа и прибавляли по каплям триэтиламин до pH 7–8. Продукт реакции промывали водой, сушили в вакууме. Получали 0.36 г [94%, R_f (А) 0.36, т. пл. 66–68°C, $[\alpha]_D^{20} + 8.3^\circ$ (с 1, CHCl_3)]. ИК (вазелиновое масло, ν_{max} , cm^{-1}): 3349 (NH); 2936 (CH); 2832 (CH); 1740 (C=O); 1649 (NHCO); 1604 (NHCO); 1485 (CH); 1298 (CH); 1312 (CO); 1279 (CO); 802, 710 (CH). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.89 (т, 6H, CH_3); 1.26 (с, 52H, CH_2); 1.6 (м, 4H, βCH_2); 2.7 (м, 2H, NH_2); 2.84 (м, 2H, CH_2CH); 3.56 (с, 2H, CH_2); 4.0 (м, 4H, αCH_2); 4.8 (м, 1H, CH); 6.9 (д, 1H, NH). Масс-спектр, m/z : 638.9 [M^+]; теоретически рассчитанная величина: 639.01.

Аргинилглициласпарагиновой кислоты дигексадециловый эфир бистрифторацетат (V). К раствору 0.5 г (2.87 ммоль) *L*-аргинина и 0.59 г (4.31 ммоль) поташа в 30 мл смеси изопропиловый спирт–вода (2 : 1) приливали раствор 2.2 г (10 ммоль) дитрет-бутилпирокарбоната в 15 мл смеси изопропиловый спирт–вода (2 : 1) и выдерживали при перемешивании при комнатной температуре в течение 24 ч при pH 11–12. Продукт реакции осторожно подкисляли лимонной кислотой до pH 3, экстрагировали этилацетатом, объединенные экстракты сушили, растворитель упаривали в вакууме. Получали 0.94 г (70%) Вос-Arg(Вос₂)-ОН, R_f (Б) 0.68 [7].

К охлажденному до 0°C раствору 0.8 г (1.69 ммоль) полученного соединения в 10 мл безводного этилацетата добавляли охлажденные растворы 0.23 г (2.03 ммоль) *N*-гидроксисукцинимиды в 5 мл этилацетата и 0.38 г (1.85 ммоль) дициклогексилкарбодиимида в 5 мл этилацетата и выдер-

живали при температуре 5–10°C в течение суток. Контроль за ходом реакции осуществляли по данным ТСХ. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали безводным этилацетатом. Растворитель удаляли в вакууме. Сырой продукт перекристаллизовывали из этанола. Получали 0.73 г (76%) *N*-гидроксисукцинимидного эфира Вос-Arg(Вос₂)-ОНСу (IV), R_f (В) 0.38, т. пл. 56–58°C (по лит. данным [7]; т. пл. 64–65°C).

К раствору 0.172 г (0.301 ммоль) соединения (IV) в 5 мл тетрагидрофурана приливали раствор 0.16 г (0.25 ммоль) (III) в 5 мл тетрагидрофурана. Выдерживали при интенсивном перемешивании в течение 10 ч. Контроль за ходом реакции осуществляли по данным ТСХ. Растворитель упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в системе гексан–этилацетат (4 : 1), получали 0.135 г (49%) дигексадецилового эфира (*N*^α,*N*^β,*N*^γ-трис-трет-бутилоксикарбониларгинил)глициласпарагиновой кислоты, R_f (Г) 0.59, $[\alpha]_D^{20} + 14.9^\circ$ (с 1, CHCl_3). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.86 (т, 6H, CH_3); 1.26 (с, 52H, CH_2); 1.56 (с, 27H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.5 (м, 4H, βCH_2); 2.2–2.6 (м, 6H, CH_2); 2.86 (м, 2H, CH_2CH); 3.89 (с, 2H, CH_2); 4.03 (м, 1H, CH); 4.08 (м, 4H, αCH_2); 4.28 (м, 1H, CH); 5.3 (м, 1H, NHoc); 6.8 (д, 1H, NH); 7.8 (д, 1H, NH); 11.15 (м, 2H, NHoc).

Полученное соединение (0.10 г, 0.091 ммоль) обрабатывали 2 мл трифторуксусной кислоты. Через 30 мин (контроль ТСХ) летучие вещества удаляли в вакууме. Перекристаллизовывали из этанола. Получали 0.05 г (70%) хроматографически чистого соединения (V) в виде бистрифторацетата, R_f (А) 0.39, $[\alpha]_D^{20} + 9.6^\circ$ (с 1, CHCl_3). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.83 (т, 6H, CH_3); 1.28 (с, 52H, CH_2); 1.61 (м, 4H, βCH_2); 1.6–2.4 (м, 6H, CH_2); 2.87 (м, 2H, CH_2CH); 3.8 (с, 2H, CH_2); 4.03 (м, 1H, CH); 4.1–4.3 (м, 5H, αCH_2 , CH); 5.3 (м, 1H, NH); 7.0–7.8 (м, 2H, NH); 10.6 (м, 1H, NH). Масс-спектр, m/z : 795.1 [M^+]; теоретически рассчитанная величина: 795.20.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 01-03-32410) и Межвузовской научно-технической программой “Фундаментальные исследования в области химических технологий” (грант № ТОО–9.3.–2053).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Подобед О.В., Жданов Р.И. // Вопросы биол. мед. и фарм. химии. 1999. № 4. С. 7–15.
2. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. // Изв. АН. Сер. хим. 2000. № 3. С. 385–400.
3. Pitard B., Oudrhiri N., Vigneron J., Hauchecorne M., Aguerre O., Toury R., Airiau M.R., Scherman R.

- Crouzeti J., Lehn J., Lehn P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 2621–2626.
4. Colin M., Harbottle R.P., Knight A., Kornprobst M., Cooper R.G., Miller A.D., Tragnan G., Capeau J., Coustelle C., Brahimi-Horn M.C. // Gene Therapy. 1998. V. 5. P. 1488–1498.
5. Ruoslahti E. // Annu. Rev. Cell Del. Biol. 1996. V. 12. P. 697–715.
6. Lapidot Y., Rappoport S., Wolman Y. // J. Lipid Res. 1967. V. 8. P. 142–145.
7. Позднев В.Ф. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. С. 1013–1022.
8. Hachisako H., Yamazaki T., Ihara H., Hirayama C., Yamada K. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. 1994. P. 1671–1680.
9. Nitecki D.E., Goodman J.W. // Biochemistry. 1966. V. 5. P. 665–673.

The Synthesis of a Lipophilic Derivative of RDG Peptide

E. G. Stepanenko and Yu. L. Sebyakin[#]

[#] Phone: +7 (095) 434-8544; e-mail: htos.mih@23.relcom.ru

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

Bishexadecyl ester of RDG peptide was synthesized in solution by the conventional methods of peptide chemistry in a total yield of 48%. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: RDG peptide, nonviral transfection