



УДК 577.07:577.352.2:616-006

СИНТЕЗ ЛИПИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА МЕТОТРЕКСАТА

© 2004 г. Е. Л. Водовозова[#], Д. В. Евдокимов, Юл. Г. МолотковскийИнститут биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 02.07.2004 г. Принято к печати 08.07.2004 г.

Разработан синтез липофильного предшественника метотрексата для встраивания в мембрану липосом-носителей. Конъюгат представляет собой липофильный якорь, остаток *rac*-1,2-диолеилглицерина, соединенный с метотрексатом через β -аланил-*N*-карбонилметиленовую вставку, которая в липидном бислое располагается в полярной зоне. Сложноэфирная связь между гидрофильной вставкой и активным веществом подвержена гидролизу внутриклеточными эстеразами. Производное в липосомной форме проявило цитотоксическую активность *in vitro*.

Ключевые слова: метотрексат, липофильные предшественники лекарств, липосомы.

Разработка методов избирательной (направленной) доставки противораковых агентов к опухолевым клеткам и тканям – насущная проблема онкологии. В последние годы интенсивные исследования в этой области ведутся по применению в качестве средств доставки – липосом [1]. Причиной уменьшения общего токсического действия на организм лекарств, заключенных внутри липосом, является, в первую очередь, способность липосом среднего диаметра (не более 100–150 нм) накапливаться в зонах неоплазмы из-за повышенной проницаемости дефектных стенок капиллярных сосудов, т. е. их способность к пассивному транспорту к опухоли (см. обзор [2]). Увеличение терапевтической эффективности некоторых противоопухолевых агентов, включенных во внутренний объем липосом, показано при клинических испытаниях [3].

Возможность доставки липидных производных цитотоксических агентов в составе липосом непосредственно в опухолевые клетки дает ряд преимуществ: уменьшаются потери лекарства в кровотоке и при взаимодействии липосомы с клеткой, значительно упрощается приготовление нагруженных лекарством липосом. Противоопухолевые препараты являются, в основном, гидрофильными веществами, и поэтому не могут удерживаться в мембране. Липофильные свойства препарату придает липидный остаток, который при попадании в клетку отщепляется внутриклеточными ферментами, высвобождая активный

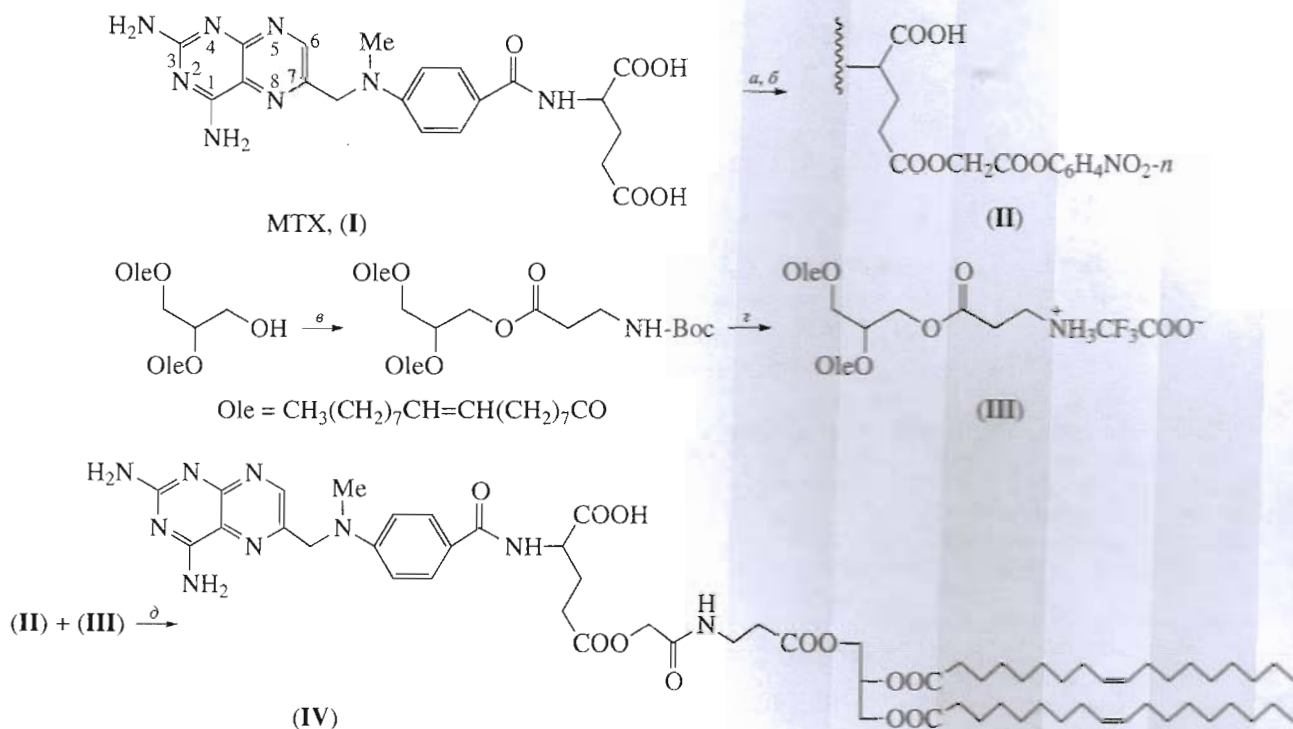
агент. Очевидно также, что липидные производные способны к прямому трансмембранному переносу, который может кардинально изменить пути эндоцитоза и внутриклеточного трафика и улучшить разгрузку липосом. Липофильные производные противораковых препаратов интенсивно исследуются. Показана большая эффективность липосомных форм липидных производных лекарственных препаратов по сравнению с исходными лекарствами по ряду показателей, таких, как понижение системной токсичности, преодоление явления множественной лекарственной устойчивости [4]. Ранее нами были получены цитотоксические липидные производные сарколизина [5, 6] и рубомицина [7]. По противоопухолевому действию *in vivo* липосомные формы липофильного сарколизина значительно превосходили интактное лекарство [8].

Антиметаболит метотрексат (МТХ, (I), схема) ингибирует дигидрофолатредуктазу (КФ 1.5.1.3) и широко используется в клинике для лечения опухолей и аутоиммунных патологий (обзор [9]). Однако его применение ограничивается развитием клеточной устойчивости [9]. Липофильная модификация МТХ позволяет преодолеть клеточную устойчивость [10, 11].

Цель данной работы – синтез нового липофильного предшественника метотрексата, предназначенного для встраивания в липидный бислой липосом. Для надежного удерживания в мембране необходим липофильный якорь, содержащий, как и природные липиды, два алифатических ацильных остатка достаточной длины. Кроме того, между гидрофобной частью и объемистым остатком МТХ должна быть полярная вставка, которая в липидном бислое располагается в полярной зоне.

Сокращения: МТХ – метотрексат; ТЕА – триэтиламин; Ole – олеил [(9Z)-гептадецен-17-илкарбонил]; Gto – глицерин.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-6610; факс: (095) 330-6601; эл. почта: elvod@ibch.ru).



a – $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{DMSO}$; *б* – (*n*-нитрофенил)йодацетат; *в* – Boc- β Ala/DCC/4-аминопиридин/4-диметиламинопиридин; *г* – TFA; *д* – $\text{Et}_3\text{N}/\text{DMSO}$.

Схема.

Это позволит уменьшить нарушение структуры мембраны и встроить в нее больше препарата. Связь же между остатком лекарства и остальной частью молекулы предшественника должна легко гидролизироваться внутри клетки. Поскольку эстеразы малоспецифичны и присутствуют в большинстве клеток, желательнее, чтобы эта связь была сложноэфирной.

Исходя из этого был разработан синтез целевого продукта (IV) (схема). Цезиевую соль метотрексата получали его взаимодействием с карбонатом цезия в DMSO как описано ранее [10]. К суспензии добавляли 1.7 экв. (*n*-нитрофенил)йодацетата, и менее чем за минуту образование эфира (II) завершалось (в отличие от 40 ч при реакции с алкилбромидом [10]); побочными процессами были окисление алкилйодида DMSO до йода и альдегида, а также алкилирование DMSO. Образование шиффовых оснований с альдегидом по NH_2 -функциям птеринового остатка MTX, имеющим низкую основность, нами не отмечено.

Преимуществом быстрого алкилирования MTX йодацетатом является образование, в основном, моноэфира. При длительном времени реакции доля диэфира увеличивается [10]. Активированный эфир (II) выделяли хроматографией на силикагеле, элюируя градиентом метанола в хлороформе с добавкой 1% уксусной кислоты и 1% воды (5 \rightarrow 15%), выход 26%, и вводили в реакцию с *rac*-1-(β -аланил)-2,3-ди-

олеоилглицерином (III) (способ получения которого приведен на схеме) в DMSO/TEA. Целевой продукт (IV) выделяли гель-фильтрацией на липофильном сефадексе с последующей хроматографией на силикагеле (элюирование градиентом метанола в хлороформе с 1% уксусной кислоты, 10 \rightarrow 20%; выход 37%; ярко-желтое аморфное вещество). Спектр ^1H -ЯМР регистрировали на приборе WM 500 (Bruker, США) в $\text{DMSO-}d_6$ при 30°C (δ , м. д.; *J*, Гц); рабочая частота 500 МГц; внутренний стандарт – сигнал остаточных протонов растворителя (2.50 м. д.): 0.84 (6 H, уш. т, 2CH_3 , Ole); 1.22 (40 H, уш. м, C4-C7 и C12-C17, Ole); 1.48 (4 H, уш. м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, Ole); 1.95 (10 H, уш. м, $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}$, Ole); 1.95 (10 H, уш. м, $\text{CH}_2\text{-CHCOOH}$, Glu); 2.26 (6 H, м, CH_2CO , Ole и Glu); 2.45 (2 H, т, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, β Ala); 3.20 (3 H, с, NMe, MTX); 3.51 (2 H, с, CH_2CONH); 4.13–4.29 (6 H, набор м, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, β Ala; H1 и H3, Gro); 4.35 (1 H, м, NHCHCOOH , MTX); 4.78 (2 H, с, CH_2NMe , MTX); 5.18 (1 H, м, H2, Gro); 5.31 (4 H, уш. м, $\text{CH}=\text{CH}$, Ole); 6.57 (2 H, уш. с, NH_2); 6.81 (2 H, д, *J* 8.8, Ph); 7.39 (1 H, уш. с, NH_2); 7.64 (1 H, уш. с, NH_2), 7.71 (2 H, д, *J* 8.8, Ph); 8.32 (1 H, уш. д, *J* 6.8, CONHCH , MTX); 8.60 (1 H, с, H6, MTX). МС (TOF-MALDI) получен на приборе VISION 2000 (ThermoBioAnalysis, Англия): m/z 1187 [$M + \text{H}$] $^+$. УФ [(этанол), λ_{max} , нм (ϵ): 260 (22600), 300 (23700), 376 (9900).

В спектре ^1H -ЯМР производного (IV) регистрируется синглетный сигнал протонов только одной CH_2 -группы в составе сложноэфирного заместителя глутаматных карбоксильных групп. Сигнал протонов метилена при γ -карбоксиле претерпевает небольшой сдвиг в сильное поле по сравнению с исходным метотрексатом (2.26 против 2.31 м. д.), в отличие от мультиплетного сигнала группы СН при α -СООН (4.35 м. д.). Мы полагаем, что образуется γ -моноэфир метотрексата, что подтверждается большей активностью γ -СООН при алкилировании [10]. Кроме того, при хроматографической очистке продукта алкилирования (II) было выделено наиболее полярное вещество (незначительную примесь чуть менее полярного соединения, видимо, α -эфира, отделяли). Такое отнесение моноэфиров МТХ по полярности соответствует данным работы [10], а также данным о кислотности α - и γ -СООН в свободном МТХ (pK 3.36 и 4.70 соответственно [12]).

Полученное диглицеридное производное МТХ в липосомной форме обнаружило цитотоксическую активность *in vitro* на клетках меланомы М3, причем цитотоксичность зависела от строения углеводной детерминанты на поверхности адресных противоопухолевых липосом [13].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке МНТЦ (проект № 1781). ^1H -ЯМР-спектры сняты при частичной поддержке Миннауки Российской Федерации (грант № 96-03-08).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. // *Science*. 1995. V. 267. P. 1275–1276.
2. Kim C.-K., Lim S.-J. // *Arch. Pharm. Res.* 2002. V. 25. P. 229–239.
3. Gabizon A., Schmeeda H., Barenholz Y. // *Clin. Pharmacokinet.* 2003. V. 42. P. 419–436.
4. Wong A., Toth I. // *Curr. Med. Chem.* 2001. V. 8. P. 1123–1136.
5. Водовозова Е.Л., Никольский П.Ю., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. С. 548–556.
6. Vodovozova E.L., Gayenko G.P., Razinkov V.I., Korzhagina E.Y., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. V. 44. P. 543–553.
7. Водовозова Е.Л., Хайдуков С.В., Гаенко Г.П., Бондарчук Т.И., Михалев И.И., Гречишников И.В., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 760–767.
8. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. // *Eur. J. Cancer*. 2000. V. 36. P. 942–949.
9. McGuire J.J. // *Curr. Pharm. Design.* 2003. V. 9. P. 2593–2613.
10. Rosowsky A., Forsch R.A., Yu C.-S., Lazarus H., Beardley G. P. // *J. Med. Chem.* 1984. V. 27. P. 605–609.
11. Pignatello R., Spampinato G., Sorrenti V., Di Giacomo C., Vicari L., McGuire J.J., Russell C.A., Puglisi G., Toth I. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000. V. 10. P. 237–245.
12. Poe M. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 3724–3729.
13. Водовозова Е.Л., Назарова А.И., Феофанов А.В., Холоденко Р.В., Пазынина Г.В., Гаенко Г.П., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г. // *Биол. мембраны*. 2004. Т. 21. С. 53–64.

Synthesis of a Lipid Derivative of the Antitumor Agent Methotrexate

E. L. Vodovozova[#], D. V. Evdokimov, and Jul. G. Molotkovsky

[#]Phone: +7(095) 330-6610; fax: +7(095) 330-6601; e-mail: elvod@ibch.ru
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A lipophilic methotrexate prodrug capable of incorporation into membranes of carrier liposomes was synthesized. The conjugate consists of a lipophilic *rac*-1,2-dioleoylglycerol anchor connected to methotrexate through β_{Ala} -*N*-carbonylmethylene linker, which should be located in the polar region of the lipid bilayer. The ester bond between the hydrophilic linker and the antitumor agent can be hydrolyzed by intracellular esterases. The liposomal formulation of the prodrug exhibited a cytotoxic activity *in vitro*. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: lipophilic prodrugs, liposomes, methotrexate

Поправка

В статье А.В. Громыко и др. (2004 г. № 4. С. 446–448) в подписи к рисунку концентрация ДНК в эксперименте – 7.7×10^{-5} М.