

На правах рукописи

ДЗЮРКЕВИЧ МИХАИЛ СТАНИСЛАВОВИЧ

**СИНТЕЗ МЕМБРАНОТРОПНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ
ТЕРПЕНОВ**

02.00.03 - Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического института им. А.М.Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Стойков Иван Иванович

Официальные оппоненты: **Никитина Лилия Евгеньевна,**
доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой
общей и органической химии ГБОУ ВПО
«Казанский государственный медицинский
университет», г. Казань

Вагапова Лилия Ильгизовна,
кандидат химических наук, научный сотрудник
лаборатории элементоорганического синтеза
ФГБУН «Институт органической и физической
химии имени А.Е. Арбузова» КНЦ РАН, г. Казань

Ведущая организация: ФГБУН «Институт химии» Коми научного центра
Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар.

Защита диссертации состоится «18» февраля 2016 года в 10 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 212.081.30 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», <http://www.kpfu.ru>.
Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.081.30
кандидат химических наук

Якимова Людмила Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ¹

Актуальность темы исследования. Одной из важнейших областей применения органической химии является получение новых эффективных лекарственных препаратов. Разработка лекарственных препаратов и средств их адресной доставки является весьма сложной и трудоемкой задачей. Эффективный препарат должен иметь очень высокую специфичность действия при минимальных побочных эффектах. Однако каким бы селективным ни было действующее вещество (ингибитор, модулятор, агонист или антагонист) *in vitro*, оно не освобождено от неспецифических взаимодействий, которые могут привести к его разрушению или выведению из организма прежде, чем оно успеет достигнуть своей терапевтической цели. Для решения этой проблемы должны применяться эффективные стратегии доставки лекарственных препаратов.

Многие препараты нацелены на внутриклеточные объекты. Способность проникать через плазматическую мембрану зачастую является лимитирующим фактором их активности. Одной из эффективных стратегий для преодоления барьера плазматической мембраны является закрепление действующего вещества на ее поверхности с последующим поглощением клеткой путем эндоцитоза. Такое закрепление можно осуществить при помощи мембранного якоря – амфифильной молекулы или фрагмента молекулы, - имеющего высокое сродство к липофильной части бислойных плазматических и внутриклеточных мембран.

Терпены – класс углеводов природного происхождения – являются прекрасными кандидатами на роль мембранного якоря. Они обладают такими преимуществами как высокое сродство к липофильной части бислойных фосфолипидных мембран, низкая токсичность и хорошая доступность из природных источников. В связи с этим нами было предложено разработать подходы к синтезу амфифильных производных монотерпенов и исследовать их взаимодействие с модельными бислойными мембранами.

Степень разработанности темы исследования. Создание амфифильных производных мирцена, потенциально способных играть роль мембрано-якорных фрагментов, открывает широкие возможности их использования в системах доставки лекарственных препаратов. Ранее описанные в литературе молекулярные фрагменты, используемые для этой цели, в большинстве случаев являются остатками холестерина, а также линейными или изопреноидными алкильными цепочками. Все эти фрагменты объединяет линейная или планарная геометрия. Амфифильные аддукты мирцена и N-замещенных малеинимидов по реакции Дильса-Альдера имеют неплоскую геометрию, что делает их принципиально новым классом мембрано-якорных фрагментов, синтез и взаимодействие которых с мембранами не описаны в литературных источниках.

Цели и задачи работы заключаются в разработке подходов к синтезу амфифильных аддуктов мирцена и аллооцимена с N-замещенными малеинимидами, содержащими карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы в полярной части, и исследовании взаимодействия полученных соединений с модельными биомембранами – везикулами дипальмитоилфосфатидилхолина. Задачами данной работы также являются получение и изучение свойств аддуктов

¹ Автореферат диссертации оформлен в соответствии с ГОСТ 7.0.11 – 2011 ДИССЕРТАЦИЯ И АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ Структура и правила оформления

вышеперечисленных имидами с монотерпенами аллооцименом и мирценом, а также с компактными диенами (изопреном и циклопентадиеном), имеющими альтернативное строение липофильной части.

Научная новизна работы состоит в следующем:

- впервые синтезированы амфифильные аддукты мирцена и N-замещенных малеинимидов, содержащие карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы в полярной части;
- впервые синтезированы амфифильные аддукты аллооцимена, изопрена и циклопентадиена, содержащие карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые группы в полярной части;
- впервые синтезированы липидоподобные соединения, содержащие в качестве липофильного фрагмента остаток мирцена;
- разработан синтетический подход к введению мембрано-якорного фрагмента мирцена в структуру фармакофорных молекул;
- впервые на модельной системе – суспензии везикул дипальмитоилфосфатидилхолина – методом турбидиметрии показана способность встраивания в липидный бислой аддуктов мирцена и аллооцимена с N-замещенными малеинимидами, содержащими карбоксильные и третичные аминогруппы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Синтезированы амфифильные аддукты мирцена и N-замещенных малеинимидов, содержащие карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы в полярной части, а также аналогичные аддукты аллооцимена, изопрена и циклопентадиена, содержащие карбоксильные, третичные аминогруппы в полярной части. Методом турбидиметрии на модельных везикулах дипальмитоилфосфатидилхолина показано, что способность к взаимодействию с мембраной без её разрушения показывают производные мирцена и аллооцимена, содержащие карбоксильные и третичные аминогруппы. Синтезированы липидоподобные соединения, содержащие остаток мирцена в липофильной части, для которых также показана возможность встраивания в фосфолипидную мембрану, ведущая, однако, к ее разрушению (солюбилизации) с ростом концентрации липидомиметика. Предложен и реализован синтетический подход введения мембрано-якорного фрагмента мирцена в структуру биологически-активных молекул, заключающийся в ацилировании спиртовых групп хлорангидридом малеинимидоуксусной кислоты с последующим присоединением по Дильсу-Альдеру остатка мирцена. Данный подход может быть расширен на биологически-активные молекулы, содержащие отличные от гидроксильной нуклеофильные группы, такие как первичные или вторичные amino- и меркаптогруппы.

Методология и методы исследования. В рамках проведенных исследований был использован широкий набор современных методов органической химии для получения амфифильных производных мирцена, а также установления их структуры и состава (ИК, ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия, элементный анализ). Взаимодействие синтезированных соединений с модельными фосфолипидными мембранами (везикулами дипальмитоилфосфатидилхолина) исследовалось методом турбидиметрического определения температуры фазового перехода мембран.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработка подхода к синтезу амфифильных производных мирцена, содержащих в полярной части незаряженные, положительно и отрицательно заряженные, а также цвиттер-ионные фрагменты, основанного на циклоприсоединении по Дильсу-Альдеру различно замещенных малеинимидов.

2. Разработка подхода к введению липофильного остатка мирцена в структуру биологически активных соединений на примере синтеза производного бис(2-хлорэтил)амина.

3. Синтез амфифильных производных мирцена, содержащих карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы в полярной части; синтез амфифильных производных аллооцимена, изопрена и циклопентадиена, содержащих карбоксильные и третичные аминогруппы в полярной части.

4. Закономерности, связывающие структуру липофильных частей и типы полярных групп синтезированных амфифильных соединений с их способностью взаимодействовать с модельной фосфолипидной биомембраной, состоящей из дипальмитоилфосфатидилхолина.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в постановке цели и задач исследования, анализе литературных данных, выполнении экспериментальных исследований, обсуждении результатов и формулировке выводов, подготовке публикаций по теме исследования. Все соединения, представленные в диссертационной работе, синтезированы соискателем лично.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается использованием целого ряда современных физических и физико-химических методов анализа.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Международном конгрессе «International congress of Organic Chemistry» (Казань, 2011), XI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2012), Итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского (Приволжского) федерального университета (Казань, 2013), Кластере конференций по органической химии «OrgХим-2013» (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 4 тезиса докладов.

Объём и структура работы. Диссертационная работа изложена на 124 страницах машинописного текста, включает 47 схем, 18 рисунков и 3 таблицы. Состоит из введения, трёх глав, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 144 ссылки.

В первой главе представлен обзор литературных данных по методам химического синтеза мембрано-якорных фрагментов и их применению; по взаимодействию терпеноидов с липидными мембранами, а также методам получения различно замещенных малеинимидов.

Основные результаты экспериментальных исследований, их обсуждение приведены во второй главе. Рассмотрены различные подходы к синтезу амфифильных производных мирцена, содержащих карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы в полярной части, а также аналогичных производных аллооцимена, изопрена и циклопентадиена. Проведено исследование

взаимодействия полученных соединений с модельными биомембранами. Разработан подход к введению липофильного остатка мирцена в структуру биологически активных молекул.

Экспериментальная часть работы, включающая описание проведённых синтетических, физико-химических, физических, биофизических экспериментов, а также квантово-механических расчетов, приведена в третьей главе диссертации.

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета, является частью исследований по основному научному направлению «Синтез, строение, реакционная способность и практически полезные свойства органических, элементоорганических и координационных соединений».

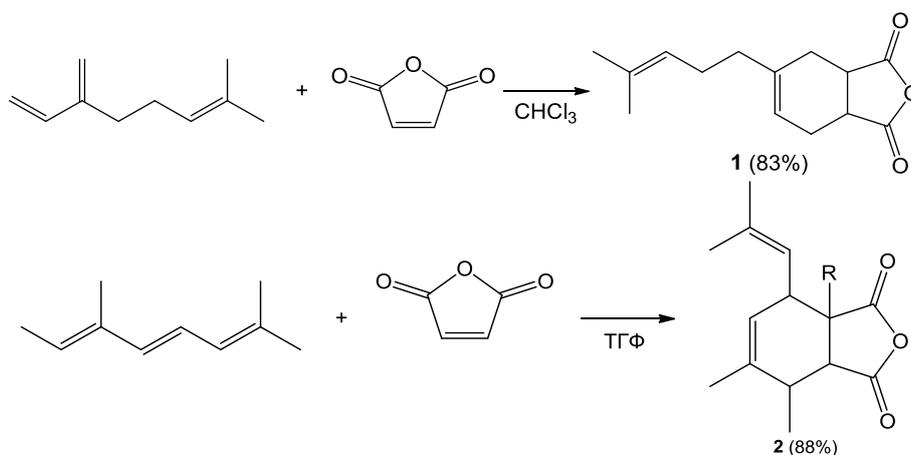
Рентгеноструктурный анализ выполнялся под руководством д.х.н. О.Н. Катаевой. Регистрация масс-спектров выполнена в лаборатории физико-химического анализа Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова к.х.н. И.Х. Ризвановым.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Синтез аддуктов малеинового ангидрида и их модификация нуклеофильными реагентами

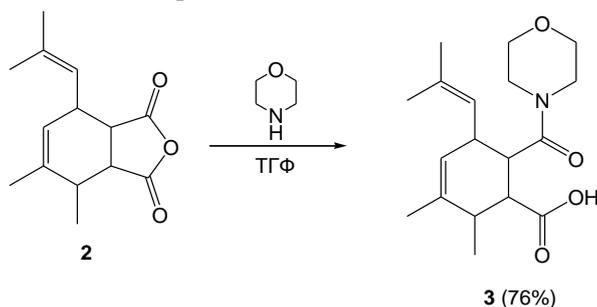
Для исследования возможности применения остатков монотерпенов в качестве мембрано-якорных фрагментов, были проведены синтез и сравнительное изучение свойств амфифильных производных мирцена и аллооцимена, содержащих различные гидрофильные группы. Оба вышеупомянутых монотерпена обладают сопряженной системой двойных связей, что делает пригодным использование реакции Дильса-Альдера для введения полярных остатков в их молекулы. В качестве диенофилов удобно использовать малеиновый ангидрид или N-замещенные малеинимиды.

Исходной стратегией введения гидрофильных фрагментов в структуру монотерпенов мирцена и аллооцимена было получение их аддуктов с малеиновым ангидридом с последующей модификацией нуклеофильными реагентами. Для реализации данного подхода был проведен синтез соответствующих аддуктов **1** и **2**.



Далее было изучено раскрытие ангидридного фрагмента морфолином, пиперазином и аминокислотами: глицином и аланином. Однако почти во всех случаях реакции проходили неселективно и приводили к смеси структурных изомеров. Исключением явился только

продукт **3**, выделенный в индивидуальном виде в реакции между морфолином и ангидридом **2**. Структура продукта реакции подтверждена методом РСА.

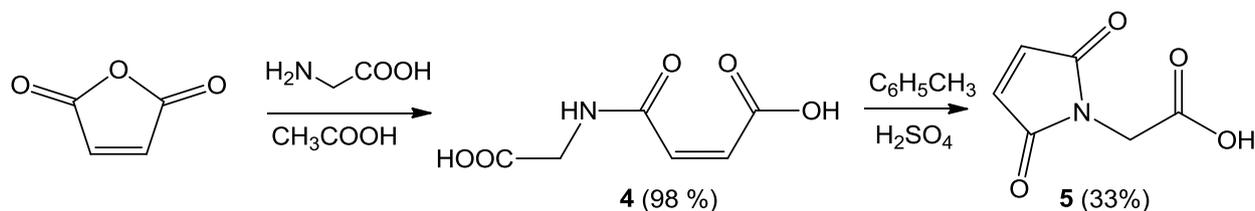


Таким образом, пример соединения **3** является скорее исключением из правила, что делает сам метод введения гидрофильных остатков в структуру через раскрытие циклического ангидридного фрагмента весьма ненадежным, несмотря на кажущуюся синтетическую простоту. В дальнейшем было решено отказаться от данного подхода.

2 Синтез аддуктов N-замещенных малеинимидов, содержащих карбоксильные и четвертичные аммониевые группы, и исследование их взаимодействия с модельными биомембранами

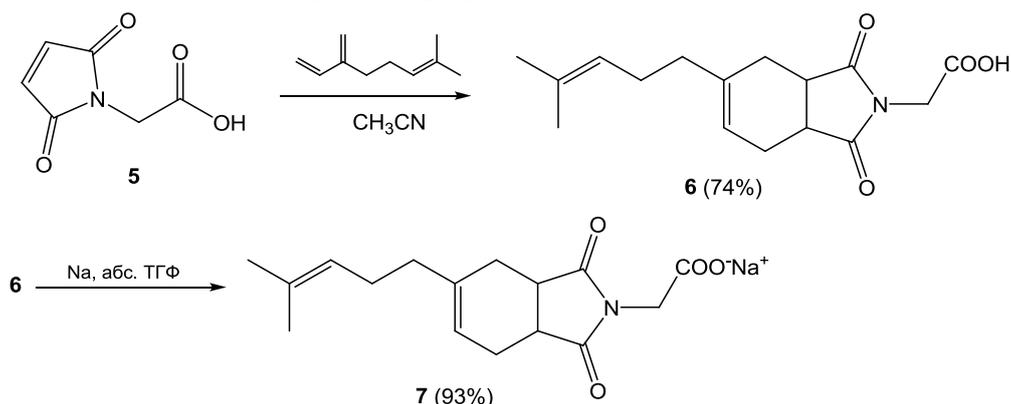
В качестве альтернативного подхода получения амфифильных соединений было предложено использование N-замещенных малеинимидов, которые так же, как малеиновый ангидрид, являются активными диенофилами. Варьирование заместителя при атоме азота позволяет вводить различные гидрофильные остатки в структуру амфифила. Кроме того, вопросы региоселективности в реакциях с малеинимидами полностью снимаются ввиду их симметричности. Большой интерес с синтетической точки зрения представляло получение имида на основе аминокислоты. Аддукты на основе малеинимидоуксусной кислоты имеют большой потенциал функционализации по карбоксильной группе, например, с применением синтетических методов пептидной химии.

Синтез малеинимидоуксусной кислоты проводился в две стадии. На первой стадии с высоким выходом был выделен продукт **4**. Однако его замыкание в циклический имид **5** вызвало ряд трудностей. Синтезы, проведенные нами по литературным методикам, либо не приводили к получению целевого продукта, либо давали крайне низкие выходы 3-5%. В связи с этим, была разработана оригинальная методика синтеза с применением серной кислоты в качестве катализатора, что позволило добиться получения продукта **5** с выходом до 33%.



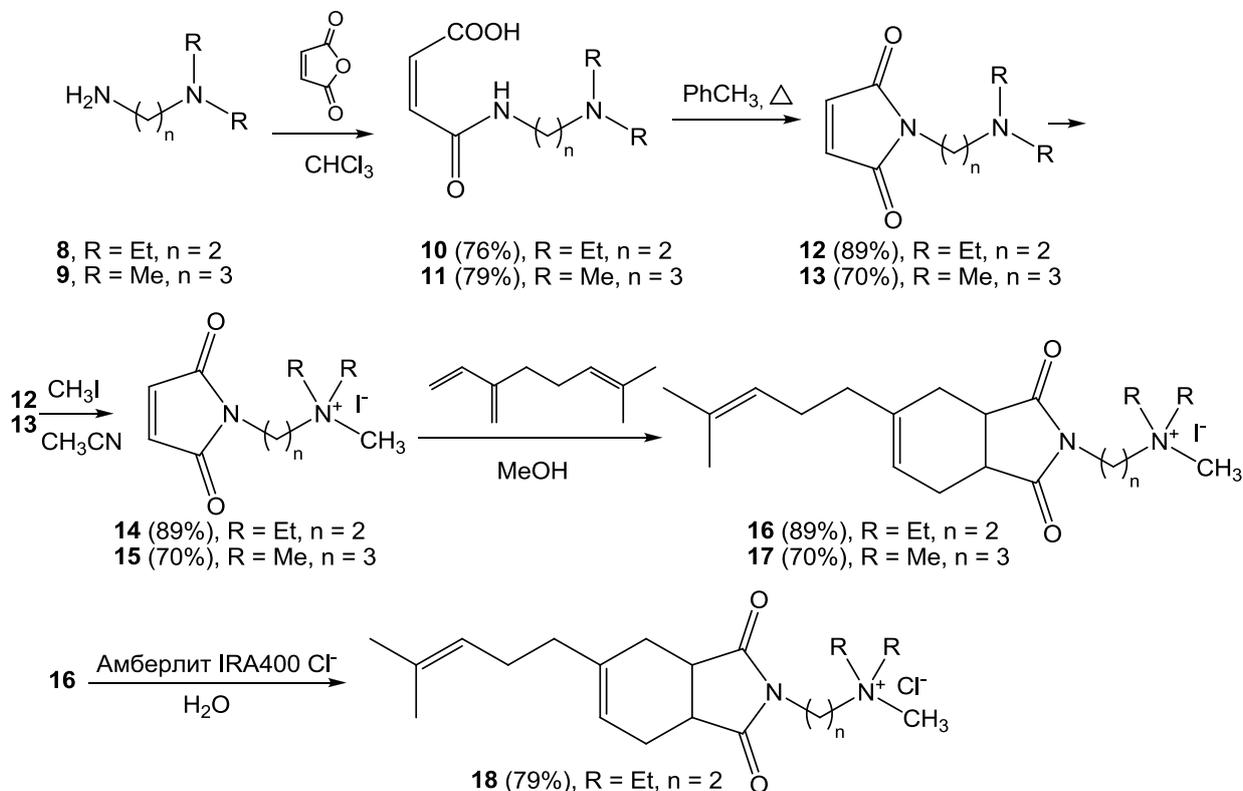
Малеинимидоуксусная кислота **5** была введена в реакции с мирценом и аллооцименом. При этом в первом случае был выделен продукт **6**. Аддукт аллооцимена выделить не удалось, несмотря на его наличие в спектре ЯМР ^1H реакционной смеси. Это связано с сильным осмолением, вызванным полимеризацией аллооцимена в условиях реакции, что обусловлено, с одной стороны, каталитическим действием карбоксильной группы, а с другой – медленным расходом аллооцимена в реакции Дильса-Альдера.

Образующиеся олигомеры аллоцимена препятствуют как кристаллизации целевого продукта, так и выделению его хроматографическими методами.



Соединение **6** далее было переведено в хорошо растворимую в воде форму соли **7** реакцией с металлическим натрием в абсолютном тетрагидрофуране. Использование такого метода синтеза связано с тем, что имидный цикл устойчив в нейтральной среде. Попытки перевода соединения **6** в форму соли **7** действием щелочи приводили к частичному или полному гидролизу имидного цикла. Таким образом, была получена амфифильная структура, содержащая анионную полярную часть.

Для создания амфифила с катионной полярной частью была изучена возможность получения имидов на основе диаминов **8** и **9**, содержащих третичную аминогруппу. Такие соединения являются удобными реагентами для дальнейшего алкилирования с получением четвертичных аммониевых солей – часто встречающейся полярной группы среди известных поверхностно-активных веществ (ПАВ).



По литературным методикам с незначительными изменениями был проведен синтез соединений **10** – **15** с высокими выходами. После этого имид **14** был введен в реакцию с мирценом в ацетонитриле, которая привела к выделению соединения **16**. Стоит обратить

внимание на то, что на стадии замыкания имидного цикла для соединения **15** потребовалось существенно большее время синтеза (7 часов), чем для соединения **14**, где реакция проходила менее чем за час. Такое поведение может быть объяснено с точки зрения внутримолекулярного катализа процесса замыкания третичной аминогруппой. Очевидно, что в данном случае наблюдается влияние удлинения спейсера на один метиленовый фрагмент, что приводит к снижению эффективности внутримолекулярного катализа и, соответственно, к снижению скорости реакции. Это также привело к снижению выхода соединения **15** в результате осмоления реакционной смеси за время синтеза. В литературе нами были найдены примеры влияния различных типов противоионов в четвертичной аммониевой соли в структуре ПАВ на способность его взаимодействия с биомембраной. В связи с этим нами была также произведена замена йодид-иона в соединении **16** на хлорид (**18**) при помощи ионообменной смолы.

Соединение **6** также было охарактеризовано методом РСА (рис. 1). Как и ожидалось, образовался эндо-аддукт с характерной неплоской геометрией, связанной с фиксированием циклогексенового фрагмента в конформации «ванна».

Неплоское строение отличает полученные соединения от уже известных мембрано-якорных фрагментов. Алкильные и ацильные группы, применяемые в существующих мембрано-якорных фрагментах, имеют либо линейное, либо изопреноидное плоское строение. Полициклическая

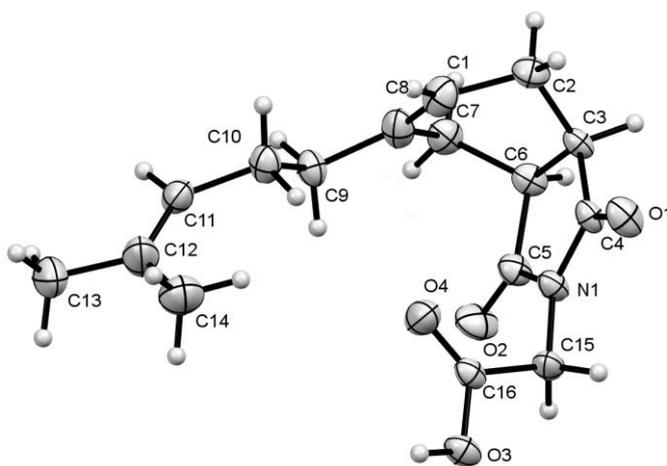


Рис. 1. Структура соединения **6**, полученная методом рентгеноструктурного анализа.

система холестерина, также применяемого в качестве мембрано-якорного фрагмента, находится в энергетически выгодной конформации «кресло» и имеет плоское строение.

Сохранение конформационной жесткости циклического фрагмента соединения **6** в растворе было подтверждено нами, исходя из анализа мультиплетности и спиновых систем данного соединения в спектрах ЯМР ^1H . Более того, аналогичная геометрия, сохраняющаяся в растворе, предполагается и для других синтезированных нами аддуктов на основании аналогии сигналов протонов циклогексенового кольца.

Таким образом, был получен набор соединений **6**, **7**, **16-18**, обладающих одинаковым строением липофильной части, но различающихся строением и природой гидрофильной части. В связи с этим было решено провести исследования взаимодействия перечисленных соединений с модельными биомембранами: везикулами (липосомами), состоящими из дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) диаметром 100 нм.

Готовые эмульсии везикул липида были оттитрованы растворами исследуемых соединений в воде (для соединения **6** – в метаноле), и были определены температуры фазового перехода везикул в широком диапазоне мольных соотношений вещество : липид (1:10 – 2:1). Был осуществлен контрольный эксперимент с внесением чистого метанола, и

показано отсутствие влияния данного растворителя на везикулы в диапазоне концентраций, соответствующем основному эксперименту.

Температура фазового перехода мембраны из гелеобразного состояния в жидкокристаллическое (T_m) имеет постоянное значение для каждого индивидуального липида. Встраивание соединений в липидный бислой неизбежно приводит к понижению температуры фазового перехода, что делает его индикатором взаимодействия исследуемых соединений с модельной мембраной. Понижение происходит вследствие нарушения упаковки ацильных цепочек липида вносимым веществом. Соответственно, чем больше вещества попадает в липофильную часть мембраны, тем сильнее наблюдаемая депрессия T_m . Температура фазового перехода определялась методом турбидиметрии.

Для чистого липида значение T_m было определено как 41.78 ± 0.17 °C, что находится в хорошем соответствии с литературными данными (41.2–41.75°C по разным данным). Как видно из графиков на рис. 2, добавление соединений **6** и **7** к везикулам липида приводит к понижению их температуры фазового перехода примерно на 1 °C, что значительно превышает погрешность эксперимента.

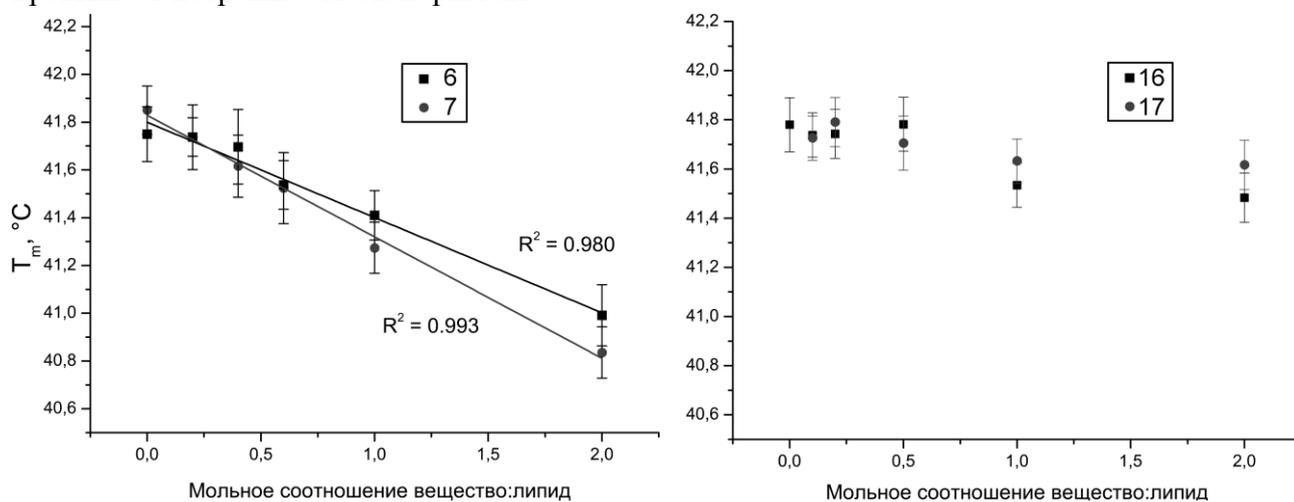


Рис. 2. Зависимости температуры фазового перехода везикул DPPC от количества внесенных соединений **6**, **7**, **16** и **17**.

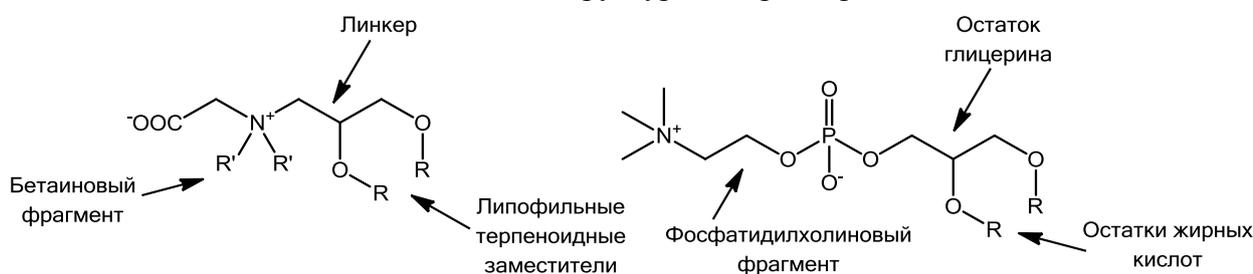
Из полученных данных можно сделать несколько выводов. Во-первых, факт концентрационно-зависимого изменения T_m в присутствии соединений **6** и **7** указывает на их взаимодействие с везикулами DPPC. Во-вторых, понижение T_m может быть вызвано только нарушением упаковки ацильных цепочек липида, что указывает на встраивание исследуемых соединений в липофильную часть бислоя. В-третьих, линейный характер зависимости T_m от концентрации исследуемых соединений указывает на то, что в ходе эксперимента не происходит сольubilизации (разрушения) везикул липида, по крайней мере, в исследованном нами широком диапазоне концентраций. В противном случае, зависимость температуры фазового перехода имела бы резкий перелом в сторону понижения при некоторой критической концентрации исследуемого соединения, чего не наблюдалось. Данный вывод также подтвержден методом динамического светорассеяния: распределение везикул липида по размерам не изменялось при внесении соединений **6** и **7** в указанные выше концентрации.

В случае соединений **16** и **17** нельзя говорить о достоверном взаимодействии. Зависимости T_m от концентраций этих соединений выражены крайне слабо, а изменения не превышают погрешности измерений. Для наглядности графики выполнены в одинаковом масштабе осей. Тем не менее, можно сделать некоторые заключения. Так, можно наблюдать некоторое уменьшение T_m , выходящее на «плато» выше мольного соотношения 1:2, что указывает на наличие некоторого насыщения везикул DPPC вносимыми соединениями, выше которого связывания не происходит. Соединение **18** показало результат, аналогичный соединениям **16** и **17**.

Таким образом, на данном этапе работы было синтезировано два соединения (**6** и **7**), способных встраиваться в модельную биомембрану. При этом процесс встраивания не приводит к нарушению структуры мембраны даже при высоких концентрациях исследуемых соединений. Однако соединения **16**, **17** и **18**, содержащие четвертичную аммониевую группу, достоверно не показали способности встраиваться в модельный липидный бислои. Также было показано, что линейность зависимости T_m от количества внесенного вещества является хорошим индикатором сохранения целостности бислоя.

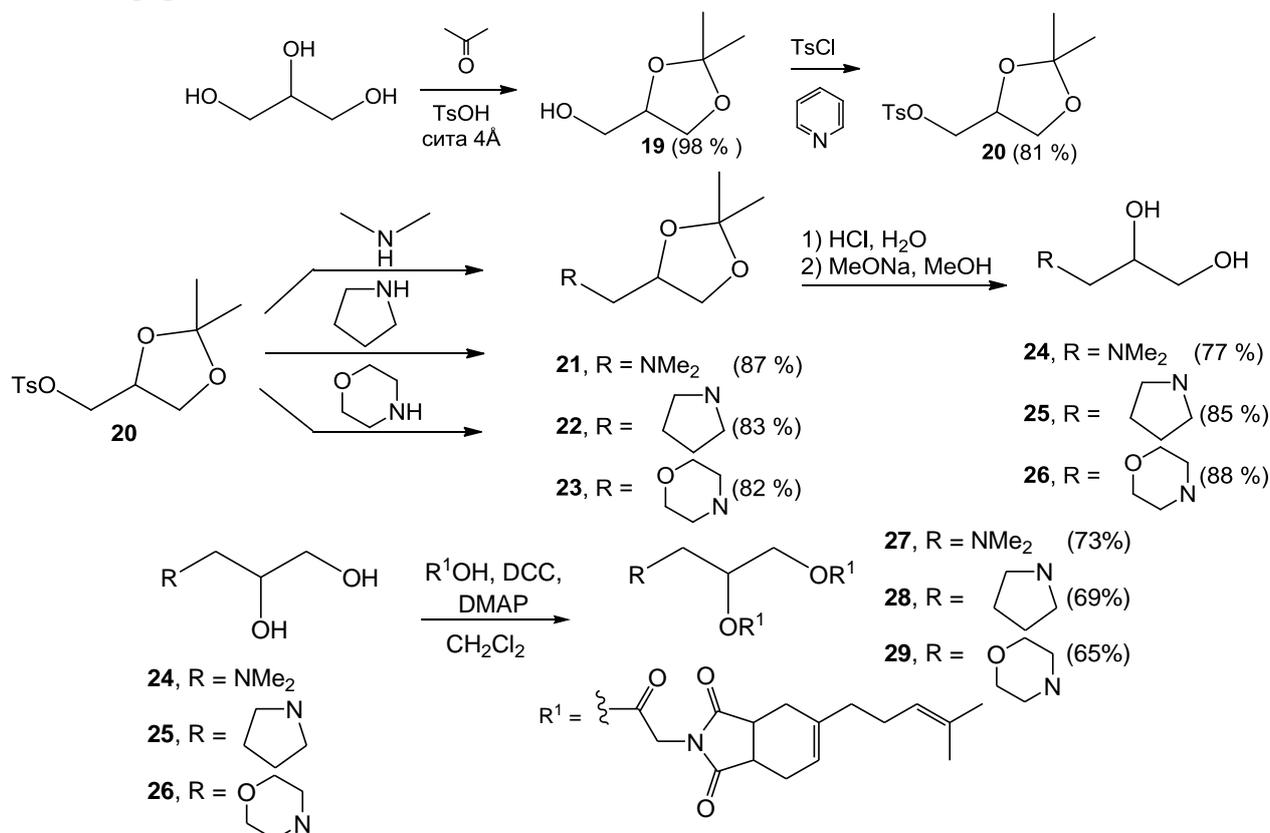
3 Синтез амфифильных соединений, содержащих два терпеноидных фрагмента

Нами было высказано предположение, что конструирование соединений, структурно подобных природным липидам, может привести к заметному повышению их сродства к липидному бислою и одновременному снижению влияния таких соединений на свойства мембраны при встраивании. Поэтому мы предположили, что лучшим способом сочетать два терпеноидных фрагмента и гидрофильную часть в одной молекуле будет синтез «липидоподобных» соединений, общая структура которых приведена ниже.

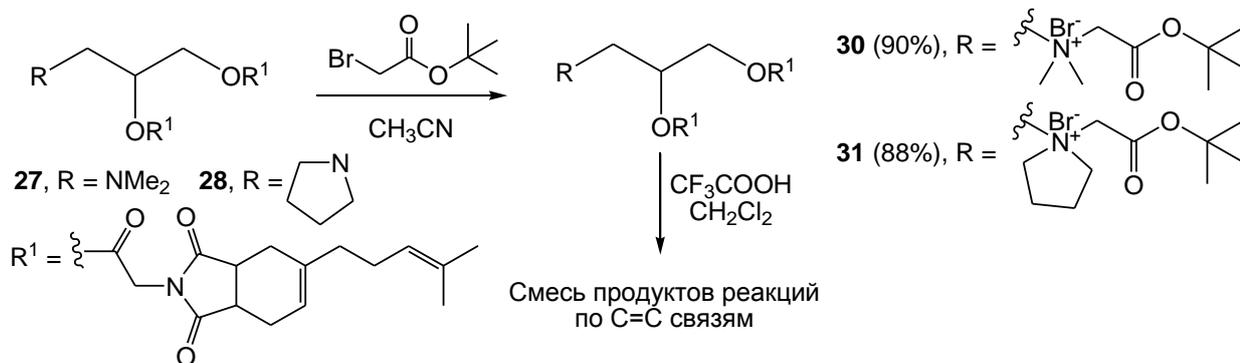


Синтез целевых структур было решено начать с получения линкера, представляющего собой диол, содержащий третичную аминогруппу. Для получения таких структур удобно использовать глицерин в качестве стартового реагента. В молекулу глицерина была введена кетальная защита с образованием соединения **19**. Литературная методика синтеза этого соединения была изменена, и вместо удаления воды отгонкой азеотропной смеси с пентаном нами были применены молекулярные сита 4 Å. Взаимодействием соединения **19** с тозилхлоридом в пиридине был синтезирован алкилирующий агент – эфир толуолсульфокислоты **20**. Далее по реакции соединения **20** с диметиламином, пирролидином и морфолином были получены защищенные аминодиолы **21** – **23**. В случае взаимодействия с диметиламином, кипящем при $6^\circ C$, синтез проводился под избыточным давлением в толстостенной колбе. Кетальная защита была удалена кислотным гидролизом 1 М водным раствором соляной кислоты при комнатной температуре с получением продуктов **24** – **26**, содержащих различные заместители при атоме азота. В целом, данный подход к получению аминодиолов на основе глицерина показал свою универсальность по отношению к вводимым

аминогруппам. С его помощью возможно получение широкого набора производных 1,2-пропандиола. Далее была проведена этерификация соединений **24** – **26** по *Steiglich* с карбоновой кислотой **6**, содержащей терпеноидный фрагмент. В результате были получены амидоэферы **27** – **29**.



Затем было изучено алкилирование третичной аминогруппы *трет*-бутилбромацетатом в ацетонитриле. Для соединений **27** и **28** это привело к целевым продуктам **30** и **31**, а в случае с соединением **29**, содержащим морфолиновое кольцо, были выделены исходные вещества, а целевой продукт обнаружен не был. Такой результат может быть объяснен стерической загруженностью реакционного центра в соединении **29**. К сожалению, при попытке удаления *трет*-бутильной группы действием трифторуксусной кислоты целевые бетаиновые структуры выделить не удалось. Применение трифторуксусной кислоты вызывало сильное осмоление реакционной смеси, а использование более слабой муравьиной кислоты приводило к ее присоединению по двойным связям хвостового терпеноидного фрагмента.



Сtereoхимия получаемых соединений заслуживает отдельного рассмотрения. Карбоновая кислота **6**, несмотря на присутствие в ее структуре двух асимметрических

центров, является рацемической смесью *R,S*- и *S,R*-стереоизомеров. В результате реакций этерификации с аминокдиолами **24–26** образуются два диастереомера: *R,S,R,S*- и *R,S,S,R*-, и соответствующие им энантимеры *S,R,S,R*- и *S,R,R,S*-. Однако картина дополнительно усложняется существованием асимметрического центра в остатке аминированного глицерина, что приводит к набору из четырех диастереомеров и соответствующих им энантимеров. Разделение данной смеси диастереомеров, к сожалению, не представлялось возможным ввиду их крайне близких физико-химических свойств. В тонкослойной хроматографии (ТСХ) они имели разницу $\Delta R_f = 0$, колоночная препаративная хроматография также не привела к разделению данных смесей диастереомеров на фракции.

Несмотря на то, что синтез целевой бетаиновой структуры не привел к успеху, амфифильные структуры все же были получены. Ими являются соединения **30** и **31**. Для соединения **30** было решено провести исследования по взаимодействию с модельными биомембранами (рис. 3). На графике (рис. 3) приведен существенно более узкий диапазон мольных соотношений по сравнению с предыдущими экспериментами. Это объясняется тем, что при мольном соотношении вещество : липид выше 0.1 моль/моль происходила сольбилизация везикул, наблюдаемая визуально (образование прозрачного раствора). В приведенном диапазоне соединение **30** показало заметное понижение температуры фазового перехода везикул DPPC, которое также имеет концентрационно-зависимый характер. Это однозначно указывает на встраивание исследуемого соединения в модельную мембрану, которое, тем не менее, приводит к разрушению последней уже при относительно низких мольных соотношениях.

Таким образом, были получены амфифильные структурные предшественники бетаиновых структур, которые сами по себе представляют интерес для проведения испытаний на модельных биомембранах. Для одного из них была показана способность к встраиванию в мембрану, приводящая при повышенных концентрациях к разрушению последней. Однако основным недостатком полученных структур является не повреждение липидного бислоя, а невозможность практического разделения образующихся диастереомеров.

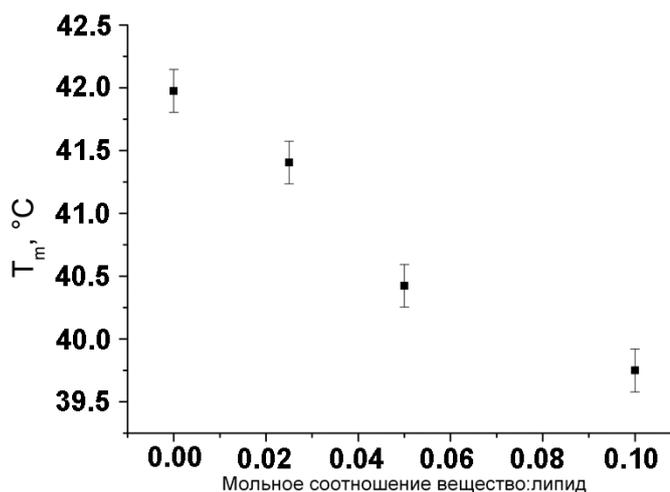
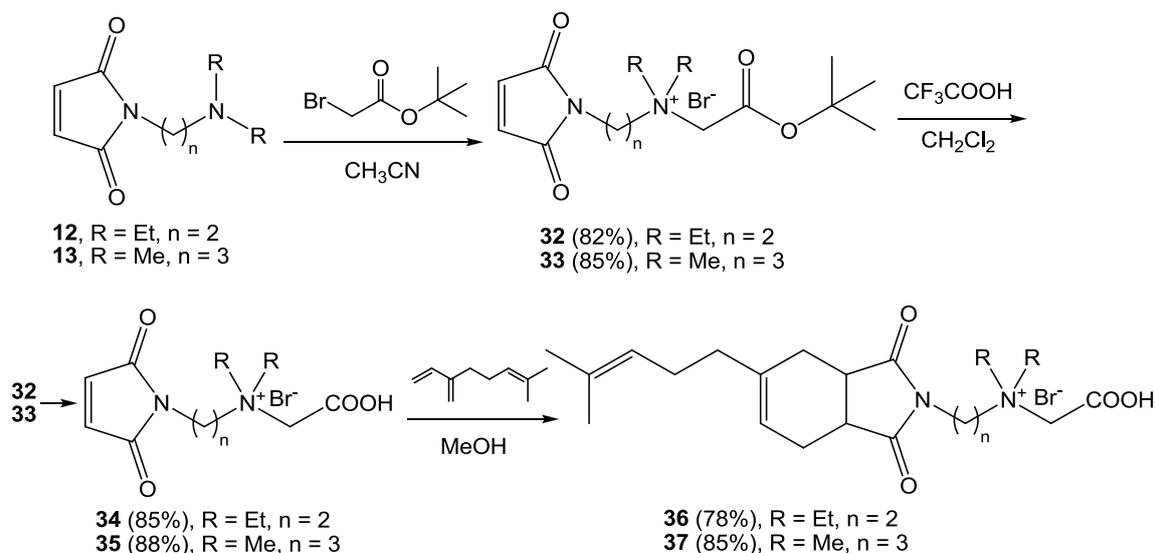


Рис. 3. Зависимость температуры фазового перехода везикул DPPC от количества внесенного соединения **30**.

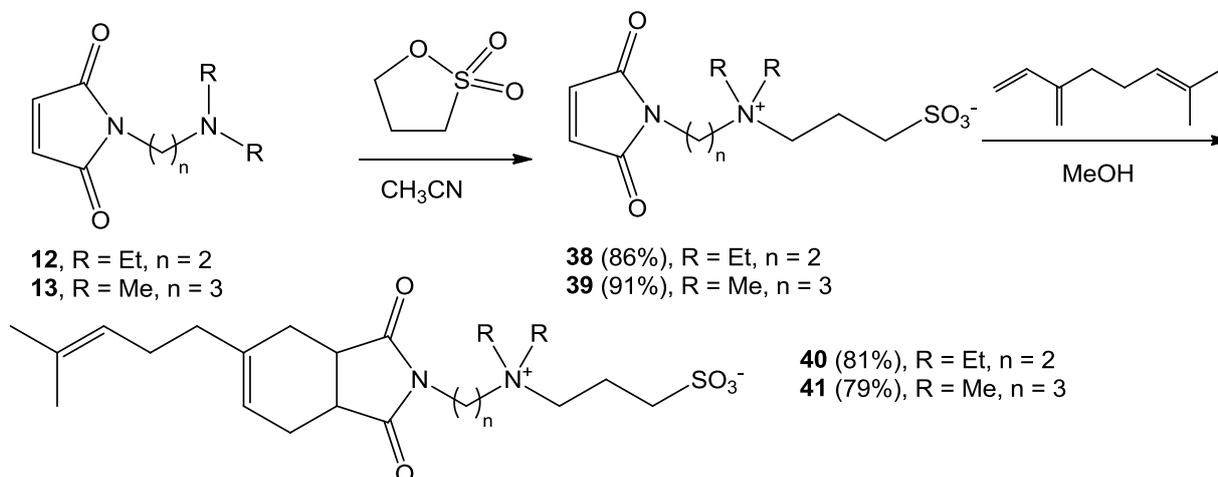
4 Синтез амфифильных соединений, содержащих бетаиновые фрагменты

Несмотря на неудачную попытку синтеза «липидо-миметических» структур, мы не отказались от идеи присоединения бетаинового фрагмента к терпеноидному остатку. Такие структуры могут обладать повышенным сродством к мембране за счет электронной комплементарности к цвиттер-ионным полярным группам липида, а их встраивание в мембрану не будет приводить к поляризации последней.

Присоединение бетаинового фрагмента к монотерпеноидному остатку является существенно более простой задачей с синтетической точки зрения по сравнению с введением его в предложенные нами ранее «липидоподобные» структуры. В связи со сложностью удаления *tert*-бутильной защиты в присутствии терпеноидного фрагмента формирование бетаинового фрагмента решено было осуществить до присоединения мирцена, т.е. непосредственно на N-замещенном малеинимиде. Для этого синтезированный ранее малеинимид **12** был введен в реакцию с *tert*-бутилбромацетатом с образованием соединения **32**. Далее *tert*-бутильная защитная группа была удалена действием трифторуксусной кислоты с образованием гидробрида бетаиновой структуры **34**, из которого реакцией с мирценом было получено соединение **36**. По аналогичной схеме было синтезировано соединение **37** на основе имида **13**.



Кроме того, набор целевых структур было решено расширить соединениями, содержащими сульфобетаиновые фрагменты в своей структуре. Сульфобетаины входят в структуру некоторых поверхностно-активных веществ, обладающих высоким сродством к природным липидам. Были изучены реакции имидов **12** и **13**, содержащих третичные аминогруппы, с 1,3-пропансультоном. В результате с хорошими выходами были выделены сульфобетаин-содержащие имиды **38** и **39**, которые были введены в реакцию Дильса-Альдера с мирценом с образованием продуктов **40** и **41**.



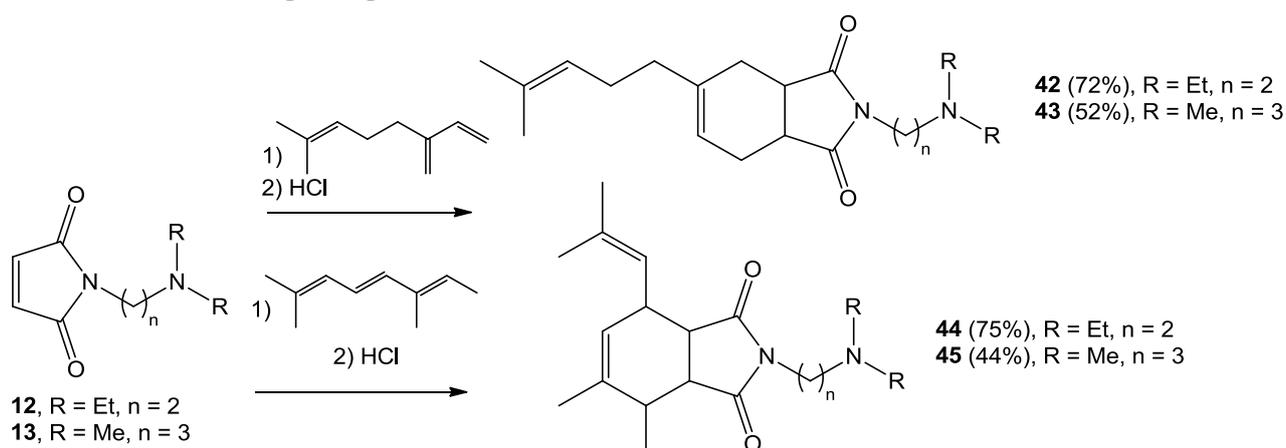
В итоге было получено четыре соединения **36**, **37**, **40** и **41**, содержащих одновременно с терпеноидным остатком бетаиновый (в форме гидробрида) либо сульфобетаиновый

фрагмент. Далее были исследованы взаимодействия вышеупомянутых соединений с модельными мембранами для проверки гипотезы о повышенном сродстве бетаиновых структур к везикулам DPPC. Однако в присутствии исследуемых соединений изменения температуры фазового перехода везикул были весьма незначительны. Таким образом, можно судить о том, что ни одно из исследованных соединений **36**, **37**, **40** и **41** достоверно не показало встраивание в липидный бислой, т.е. бетаиновый гидрофильный фрагмент препятствует встраиванию амфифильных соединений, несущих гидрофобный остаток мирцена, в модельную мембрану. Возможно, это связано с крайне высокой гидрофильностью бетаинового фрагмента.

5 Синтез амфифильных соединений, содержащих третичные аминогруппы

Из ряда изученных соединений способность встраиваться в мембрану проявили только производные мирцена, содержащие карбоксильные либо карбоксилатные группы. Соединения, содержащие четвертичную аминогруппу как с простыми алкильными заместителями (**16** – **18**), так и в виде гидробромида бетаина либо сульфобетаина (**36**, **37**, **40** и **41**), такой способности не показали. В связи с этим нами было высказано предположение, что наличие четвертичной аммониевой группы в структуре в том или ином виде блокирует возможность монотерпенового остатка достигать липофильной части бислоя. Поэтому интерес представляло исследование возможности встраивания в мембрану структурных предшественников вышеупомянутых соединений – структур, включающих третичные аминогруппы. Данные соединения предполагалось получать в виде гидрохлоридов, что, с одной стороны, повышает водорастворимость, а с другой, – предотвращает окисление аминогрупп при хранении.

Синтезы амфифильных соединений, содержащих третичные аминогруппы, были проведены непосредственным взаимодействием мирцена с полученными ранее аминами **12** и **13**. Кроме того, было решено расширить набор соединений аналогичными аддуктами аллооцимена **44** и **45**, которые были получены в сходных условиях. Продукты **42** – **45** были выделены в виде гидрохлоридов.



Исследование взаимодействия с модельными биомембранами – везикулами DPPC, показало положительный результат. Все четыре соединения, содержащие третичные аминогруппы, продемонстрировали значительное снижение T_m везикул (рис. 4). Хорошо видно, что зависимости температуры фазового перехода от концентрации (молярного соотношения) веществ имеют линейный характер, как и для соединений **6** и **7**. Но в данном

случае максимальное понижение T_m существенно больше: в случае соединения **42** его величина превышает 3 °С.

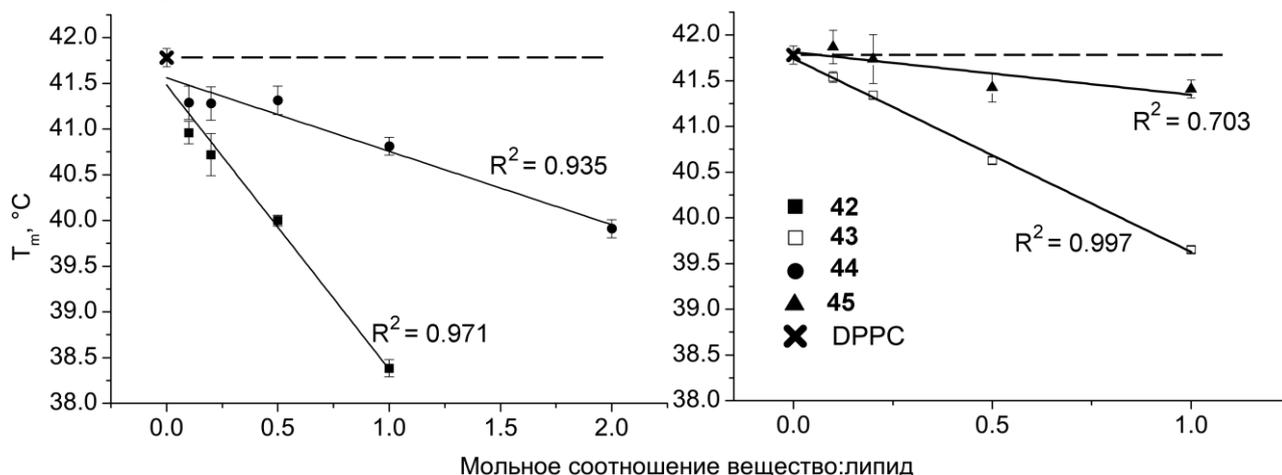


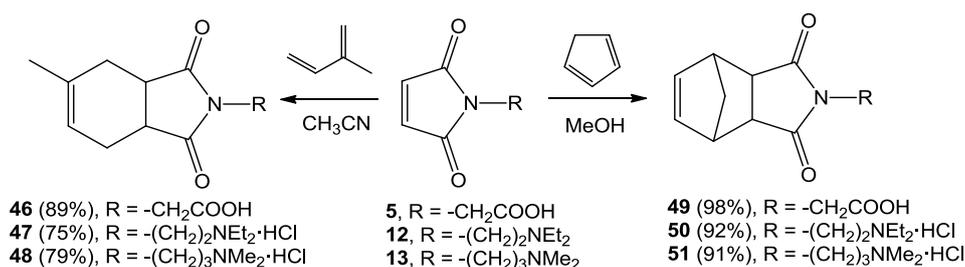
Рис. 4. Зависимости температуры фазового перехода везикул DPPC от количества внесенных соединений **42** – **45**. Прерывистой линией показано значение T_m для чистого липида.

6 Синтез производных изопрена и циклопентадиена, содержащих карбоксильные и третичные аминогруппы

В свете полученных данных можно выделить два типа полярных групп – третичная амино- и карбоксильная, которые не препятствовали встраиванию производных монотерпенов мирцена и аллооцимена в модельную мембрану. При этом эффект от полярных групп оказался настолько значителен, что возникает вопрос о значимости липофильной части как таковой. Чтобы ответить на этот вопрос, важно было установить значение размера липофильного остатка и выяснить, будет ли сохраняться возможность встраивания в везикулы соединений, обладающих укороченной липофильной частью.

Изопрен, как гемитерпен, обладает высоким структурным сходством с мирценом. Его аддукты по Дильсу-Альдеру являются, по сути, гомологами по отношению к аддуктам мирцена. Помимо изопрена, в качестве диеновой структуры нами было решено использовать циклопентадиен, который также является C_5 липофильным фрагментом.

Было решено синтезировать ряд соединений, содержащих третичную амино- и карбоксильную группы, так как продукты именно с такими полярными частями показали наилучшие результаты по встраиванию в везикулы. Синтезы были проведены на основе полученных ранее имидов **5**, **12** и **13**. В результате с хорошими выходами были выделены соединения **46–51**. Амины так же, как и в предыдущих случаях, были выделены в виде гидрохлоридов.



Далее были осуществлены исследования взаимодействия полученных соединений с везикулами DPPC. В данном случае титрование исследуемыми веществами не проводилось,

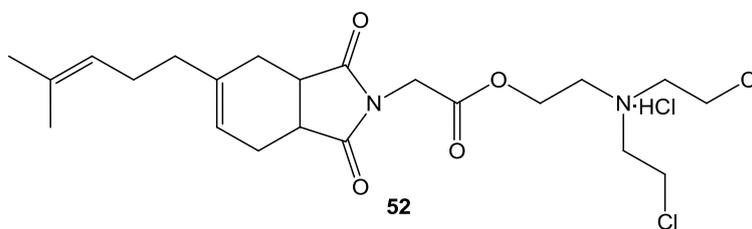
они добавлялись в заданном высоком мольном соотношении к липиду, а именно 1:1. Как показал опыт предыдущих исследований, при таком мольном соотношении в случае встраивания вещества в мембрану температура фазового перехода заметно понижается: депрессия составляет от 0.6 до 3.3 °С, т.е. по результатам такого исследования можно на качественном уровне отследить взаимодействие и при его наличии провести дополнительные эксперименты с титрованием. Тем не менее, ни одно из исследованных на данном этапе веществ не оказало значимого влияния на температуру фазового перехода мембраны DPPC.

Таким образом, липофильной части объемом в пять атомов углерода оказалось явно недостаточно для встраивания в липидный бислой. Отсюда можно сделать вывод, что при недостаточном размере гидрофобного остатка карбоксильная и третичная аминогруппы уже не способны вносить решающий вклад в способность соединения встраиваться в модельную мембрану.

7 Синтез мембрано-якорной структуры, объединенной с фармакофорным фрагментом

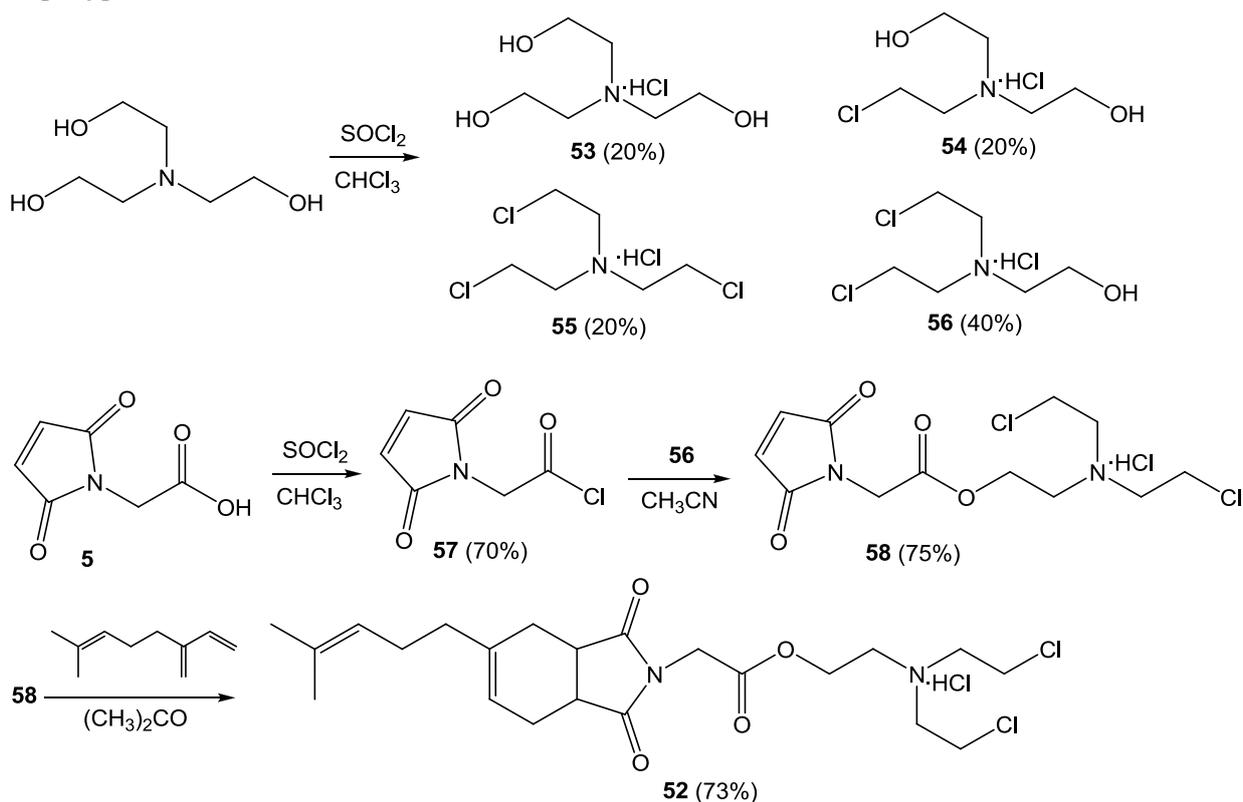
По итогам всей проделанной работы можно выделить среди исследованных гидрофобных и гидрофильных частей наиболее эффективные для потенциальной молекулы-доставщика. Это остаток мирцена с одной стороны и третичная аминогруппа с другой. Было важно продемонстрировать эффективность выбранного подхода на примере уже известного фармакофорного фрагмента. Мы остановили свой выбор на фрагменте бис(2-хлорэтил)амин: при введении в структуру целевого продукта данный фрагмент будет представлять собой третичную аминогруппу, которая, как показано выше, положительно влияет на способность соединений к взаимодействию с бислоем. Данный остаток известен как классический алкилирующий агент, применяемый в противораковой химиотерапии. Он входит в структуру и непосредственно отвечает за активность многих противораковых препаратов, таких как хлорамбуцил, циклофосфамид, хлорметин, мелфалан, прошедших все стадии клинических испытаний и в настоящее время применяемых в медицинской практике.

Липофильный фрагмент мирцена удобно вводить, используя как основу имид **5** или аддукт **6**. Наличие карбоксильной группы в обоих соединениях позволяет вводить заместители, используя широкий набор синтетических методов. В качестве исходного соединения для получения бис(2-хлорэтил)аминового фрагмента было решено использовать триэтаноламин. Конечная структура должна соответствовать соединению **52**.



Для синтеза целевой структуры была предложена альтернативная схема встречного синтеза, приведенная ниже. Согласно этой схеме, дихлорзамещенный триэтаноламин **56** образуется в реакции триэтанолamina с тионилхлоридом в соотношении 1:2. Ограничивающим фактором применения такой реакции является необходимость разделения сложной смеси продуктов **53–56**, которые будут неизбежно образовываться. Тем не менее,

такое разделение удалось осуществить с количественным выделением всех продуктов по литературной методике.



Далее было предложено осуществить встречный синтез хлорангирида малеинимидоуксусной кислоты **57** с последующим ацилированием соединения **56**. В результате с хорошим выходом было получено соединение **58**, которое было введено в реакцию с мирценом, в результате чего был выделен целевой продукт **52**.

Завершающим этапом работы стало исследование взаимодействия соединения **52** с модельными биомембранами (рис. 5). Как видно из графика (рис. 5), продукт **52** встраивается в липидный бислой, что вызывает понижение температуры фазового перехода везикул липида (максимально на 5°C). В широком диапазоне концентраций сохраняется зависимость температура-концентрация, близкая к линейной, что говорит о ненарушении целостности структуры мембраны.

Таким образом, нами был осуществлен синтез соединения,

обладающего способностью встраиваться в мембрану благодаря наличию мембрано-якорного фрагмента монотерпена, а также несущего в своей структуре фармакофорный фрагмент. Данное соединение с высокой долей вероятности может обладать противораковой

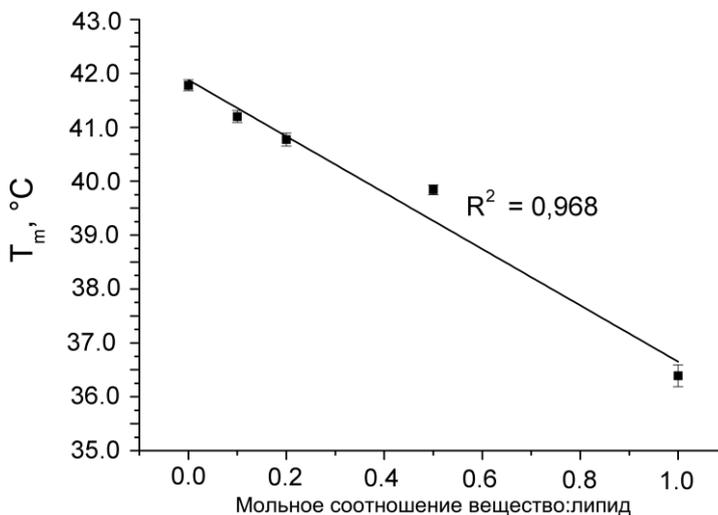


Рис. 5. Зависимость температуры фазового перехода везикул DPPC от количества внесенного соединения **52**.

активностью, а за счет способности связываться с клеточными мембранами может проявить специфичность по отношению к определенным видам тканей.

Также разработан удобный метод присоединения якорного фрагмента к фармакофорным структурам через сложноэфирную группу, позволяющий создавать новые лекарственные формы уже известных препаратов. Данный метод может быть легко расширен. Так, ацилирование хлорангидридом **57** может быть осуществлено как по спиртовой группе, так и по амино- и меркаптогруппам с получением соответствующих амидов и тиоэфиров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Синтезировано 37 новых соединений, в том числе амфифильные производные мирцена, аллооцимена, циклопентадиена, изопрена и N-замещенные малеинимиды, содержащие в полярной части карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы. Структура всех впервые полученных соединений охарактеризована комплексом физических и физико-химических методов (ЯМР ^1H , ^{13}C и ИК спектроскопией, МАЛДИ или ЭС масс-спектрометрией).

2. Разработан синтетический подход к получению амфифильных производных монотерпенов мирцена и аллооцимена, основанный на применении реакции Дильса-Альдера с участием N-замещенных малеинимидов, содержащих различные полярные заместители при атоме азота.

3. Установлено существенное влияние липофильной части исследованных амфифильных производных мирцена, аллооцимена, циклопентадиена и изопрена, содержащих в полярной части карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы, на их взаимодействие с модельными бислойными мембранами: варьирование терпеноидного фрагмента позволяет как предотвращать взаимодействие синтезированных соединений с липидным бислоем (производные изопрена и циклопентадиена), так и встраиваться в него (производные мирцена и аллооцимена), не приводя к нарушению его целостности даже при высоких концентрациях (до 2:1 моль/моль вещество:липид), или разрушать (два остатка мирцена) при невысоких концентрациях (более 1:10 моль/моль вещество:липид).

4. Показано, что в ряду синтезированных амфифильных терпеноидных производных, содержащих в полярной части карбоксильные, третичные amino-, четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы, производные мирцена, содержащие третичные аминогруппы, вызывают большее изменение температуры фазового перехода изученных везикул, свидетельствующее о более эффективном взаимодействии.

5. На примере синтезированных амфифильных производных мирцена выявлено, что природа гидрофильной части соединения может как способствовать взаимодействию с липидным бислоем (карбоксильные и третичные аминогруппы), так и препятствовать встраиванию (четвертичные аммониевые, бетаиновые и сульфобетаиновые группы).

6. На примере производного бис(2-хлорэтил)амин разработан и реализован синтетический подход объединения мембрано-якорного мирценового и фармакофорного фрагментов, заключающийся в предварительном введении последнего в остаток

малеинимидоуксусной кислоты с последующим присоединением мирцена по реакции Дильса-Альдера, и с помощью метода турбидиметрии показана способность полученного производного к взаимодействию с модельным липидным бислоем – везикулами DPPC диаметром 100 нм.

Основное содержание работы отражено в следующих публикациях

1. Дзюркевич М.С. Синтез и молекулярная структура аддуктов аллооцимена с малеиновым и цитраконовым ангидридами / М. С. Дзюркевич, Д. Б. Криволапов, О. А. Лодочникова, И. А. Литвинов, В. В. Племенков // Журн. общ. химии. – 2011. – Т. 81 – № 6 – С. 988–991.
2. Миронова Е.В. Молекулярная и кристаллическая структура 2,3-диметил-5-(2'-метилпроп-1'-енил)-6-(морфолил-4'-карбонил)- циклогекс-3-ен-1-карбоновой кислоты / Е.В. Миронова, М.С. Дзюркевич, О.А. Лодочникова, Д.Б. Криволапов, И.А. Литвинов, В.В. Племенков // Журн. структ. химии. – 2012. – Т. 53 – № 2 – С. 378–381.
3. Dzyurkevich M.S. Amphiphilic adducts of myrcene and N-substituted maleimides as potential drug delivery agents / M.S. Dzyurkevich, K.N. Timofeeva, D.A. Faizullin, Y.F. Zuev, I.I. Stoikov, V.V. Plemenkov // Mendeleev Commun. – 2014. – Т. 24 – № 4 – С. 224–225.
4. Dzyurkevich M.S. Chemical modification of monoterpenes by diels-alder reaction / M.S. Dzyurkevich, V.V. Plemenkov, O.A. Lodochnikova, D.B. Krivolapov, I.A. Litvinov, O.V. Kazimirchenko // Book of abstracts of International congress on Organic Chemistry. – Kazan, 2011. – P. 176.
5. Дзюркевич М.С. Синтез амфифильных иминов на основе монотерпенов и изучение их взаимодействия с модельными биомембранами / М.С. Дзюркевич, Д.А. Файзуллин, Ю.Ф. Зуев, И.И. Стойков, В.В. Племенков // Тезисы докладов Кластера конференций по органической химии «ОргХим-2013». – Санкт-Петербург, 2013. – С. 368.
6. Тимофеева К.Н. Синтез амфифильных иминов на основе ациклических монотерпенов и изучение их взаимодействия с модельными биомембранами / К.Н. Тимофеева, М.С. Дзюркевич, Ю.Ф. Зуев, И.И. Стойков // Сборник тезисов Итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского (Приволжского) федерального университета 2013 года. – Казань, 2013. – С. 114–115.
7. Дзюркевич М.С. Синтез амфифильных амидов на основе терпеноидных ангидридов / М.С. Дзюркевич, И.И. Стойков, В.В. Племенков // Тезисы докладов XI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века». – Казань, 2012. – С. 30.