



УДК 577.07:577.352.2:535.372:616-006

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛОГА ЛИПОФИЛЬНОГО
ПРОЛЕКАРСТВА МЕТОТРЕКСАТА© 2014 г. Ю. В. Власенко, А. С. Алексева, Е. Л. Водовозова[#]ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 27.08.2013 г.

Принята к печати 03.09.2013 г.

Синтезирован флуоресцентный зонд – аналог липофильного пролекарства противоопухолевого препарата метотрексата. Конъюгат несет остаток *rac*-1-[13-(Me₄-BODIPY-8)тридеcanoил]-2-олеоилглицерина, соединенного сложноэфирной связью с метотрексатом через *N*-(метилкарбонил)-β-аланиновую вставку (Me₄-BODIPY-8 – 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил). Зонд предназначен для встраивания в мембрану липосом-носителей с целью изучения механизма взаимодействия с опухолевыми клетками и внутриклеточного транспорта.

Ключевые слова: метотрексат, липофильные пролекарства, липосомы, BODIPY-метка.

DOI: 10.7868/S0132342314010126

Цитостатический препарат метотрексат (МТХ, антиметаболит фолиевой кислоты, схема) широко применяется в клинике для лечения солидных опухолей, гематологических злокачественных заболеваний и аутоиммунных патологий, таких как ревматоидный артрит, оставаясь до сегодняшнего дня “лекарством номер один” (обзоры [1–3]). МТХ конкурентно ингибирует дигидрофолатредуктазу (DHFR, КФ 1.5.1.3) и тем самым лишает клетку тетрагидрофолата, необходимого кофактора биосинтеза пуриновых нуклеотидов и тимидилата. Эффективность лечения МТХ ограничивается системной токсичностью и частым развитием лекарственной устойчивости, связанной, главным образом, с мутациями, приводящими к понижению активности белка-транспортера восстановленного фолата (*reduced folate carrier*, RFC), переносщего также и аналоги-антифолаты [3] (пассивный трансмембранный перенос полярной молекулы МТХ затруднен). Для улучшения фармакологических свойств МТХ в последние годы возобновились активные исследования различных наноразмерных систем его доставки [1, 4], в том числе полиамидных дендримеров (см. например, [5]), полимерных конъюгатов [6] и липосом

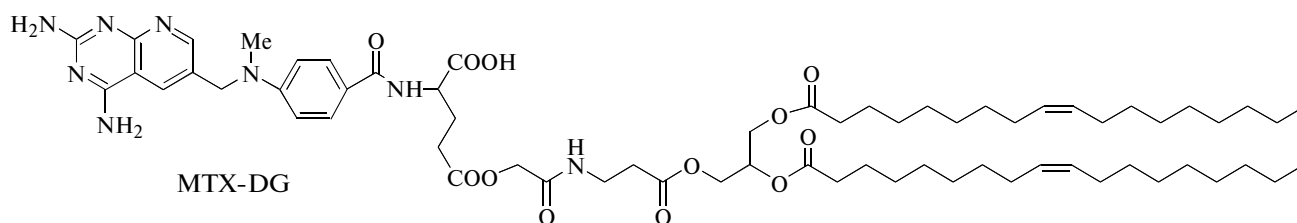
[7, 8]. Конъюгаты с сывороточным альбумином и липосомы признаны наиболее перспективными для системного введения МТХ в организм [1].

Включение в липосомы и другие наноносители диаметра ~100 нм позволяет защитить лекарство от преждевременного разложения и нецелевых взаимодействий с биомолекулами, обеспечивает его накопление в опухолях и очагах воспаления (ввиду повышенной проницаемости дефектных стенок капиллярных сосудов и нарушенного дренажа лимфы в очагах патологии – так называемый эффект повышенной проницаемости и удерживания [9]), а также способствует преодолению развития множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, связанной с флипазной функцией трансмембранных белков семейства АТР-связывающих кассет (например, Р-гликопротеина [10]). Для обеспечения эффективной концентрации лекарства в целевой ткани носитель должен обладать достаточно высокой емкостью загрузки. Однако внутренний объем наноразмерных липосом не позволяет стабильно инкапсулировать более 2–3 мол. % (от суммарных липидов) водорастворимого лекарства даже при практически максимальной достижимой концентрации его в растворе (см., например, [7]).

Нами ранее разработана липосомальная форма МТХ, в которой он включен в липидный бислой в виде биодеградируемого производного – липофильного пролекарства – конъюгата с *rac*-1,2-диолеоилглицерином (МТХ-DG) [11, 12].

Сокращения: МТХ – метотрексат; МТХ-DG – конъюгат МТХ с *rac*-1,2-диолеоилглицерином; DHFR – дигидрофолатредуктаза; RFC – белок, транспортирующий восстановленный фолат; Me₄-BODIPY-8 или BDP – 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-8-ил; Gro – глицерин; Ole – олеоил (9*Z*-гептадеценил-17-карбонил); TEA – триэтиламин.

[#] Автор для переписки (тел.: 8 (495) 330-66-10; факс: 8 (495) 330-66-01; эл. почта: elvod@lipids.ibch.ru).



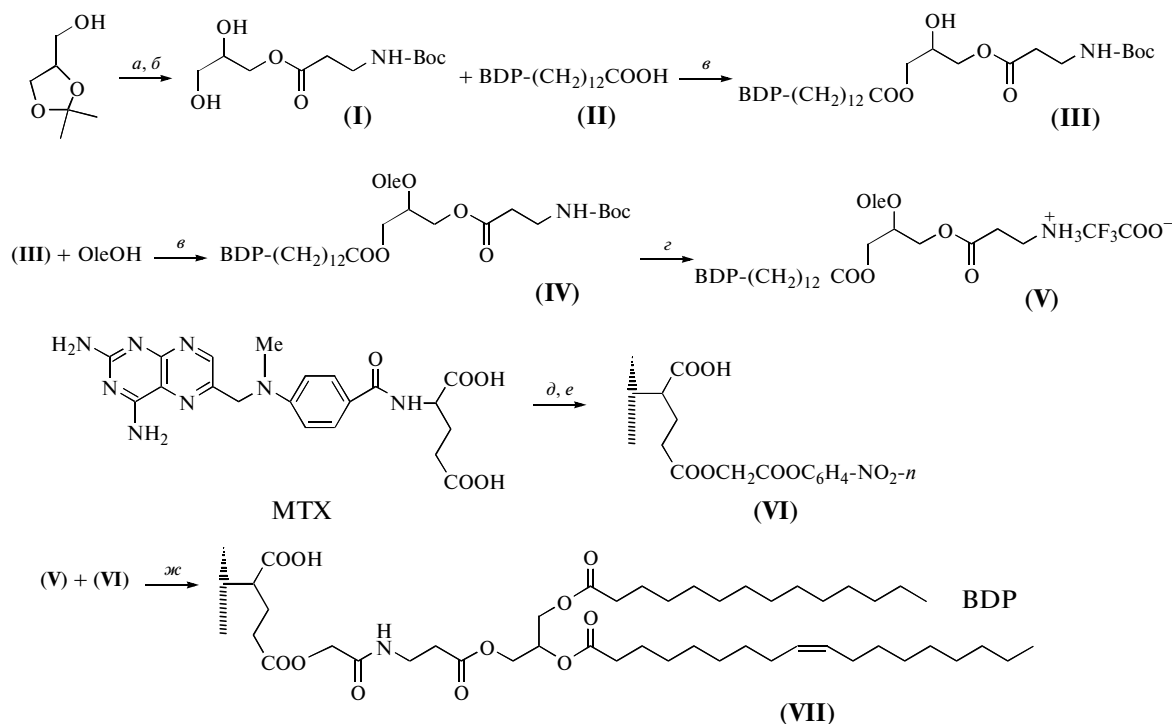
Объемистый остаток МТХ отделен от диглицеридного мембранного якоря короткой вставкой — *N*-метилкарбонил-β-аланиновым остатком, который в бислое находится на уровне полярных головок фосфолипидов, что позволяет меньше нарушать упаковку бислоя и включать в 100-нм-липосомы не менее 10 мол. % пролекарства [13]. Остаток МТХ соединен со вставкой сложноэфирной связью, которая должна легко гидролизываться в клетке-мишени ввиду низкой специфичности эстераз [14].

Ранее липофильная модификация глутаматных карбоксилатов МТХ, позволяющая сохранить сродство к DHFR, была предложена для преодоления резистентности клеток, обусловленной нарушением активного транспорта: алифатические сложные γ-эфиры [15] и амиды липоаминокислот [16] МТХ, образующие в водных средах мицеллярные формы, были активны в культуре клеток острой Т-лимфобластной лейкемии СЕМ/МТХ, резистентных к МТХ из-за дефицита RFC. В наших экспериментах МТХ-DG в липосомальной форме проявил цитотоксическую активность в культурах клеток меланомы М3 [12], а также лейкемии СЕМ-CCRF и ее резистентной сублинии СЕМ/МТХ [13, 17]. Очевидно, конъюгат высвобождает МТХ за счет гидролиза внутриклеточными эстеразами, будучи пролекарством, либо он способен непосредственно ингибировать DHFR (благодаря свободному α-карбоксилу). Таким образом, липосомальная форма МТХ-DG представляет интерес для наномедицины. В то же время, механизм проникновения в опухолевые клетки пролекарства МТХ (например, возможное участие фолатного рецептора) и его внутриклеточный транспорт еще не исследованы. Для изучения этих процессов полезным инструментом представляется флуоресцентный зонд — аналог МТХ-DG. Кроме того, недавно нами получены важные сведения о гемосовместимости липосомальной формы МТХ-DG: липосомы не оказывают отрицательного влияния на основные форменные элементы крови, однако в определенных условиях активируют систему комплемента [18]. Механизм активации также предполагается исследовать флуоресцентными методами — с применением этого зонда.

Цель данной работы — синтез аналога (VII) диглицеридного производного МТХ (схема), несущего высокочувствительную BODIPY-метку

(Me₄-BODIPY-8 — 4,4-дифтор-1,3,5,7-тетраметил-4-бора-3*a*,4*a*-диаза-*s*-индацен-8-ил) [19]. Полярность (Me₄-BODIPY-8)-группы (на схеме: BDP-группа) относительно невысока, поэтому, при закреплении ее в ω-положении алифатической цепи остатка диглицерида она находится в бислое липосом, в основном, в гидрофобной области, не вызывая значительных возмущений в его структуре. Выбор BODIPY-метки обусловлен не только высоким квантовым выходом этого флуорофора, но и отсутствием влияния на него полярности окружения, что особенно важно при изучении локализации зонда в различных клеточных органеллах. Спектры флуоресценции (Me₄-BODIPY-8)-метки и поглощения МТХ не перекрываются.

Целевой продукт (VII) синтезировали согласно разработанной ранее для МТХ-DG схеме [11, 12], вводя в реакцию активированный эфир МТХ (VI) и BDP-триглицерид (V) (схема). В качестве исходного вещества для получения синтона (V) использовали *rac*-изопропилиденглицерин. После его ацилирования Вос-β-аланином удаление кетальной защиты с продукта проводили в достаточной мягких условиях (0.2 М HCl). Полученный моноглицерид (I) ацилировали 13-BDP-тридекановой кислотой (II) в присутствии DCC и основных катализаторов (реакция протекает преимущественно по первичному гидроксилу; 4-аминопиридин позволяет ускорить ацилирование [20] и минимизировать образование продукта конденсации по двум OH-группам). Диглицерид (III) ацилировали действием 1.5 экв. олеиновой кислоты и выделяли триглицерид (IV) гелем-фильтрацией на липофильном сефадексе (выход 92%); все предшествующие продукты ацилирования выделяли хроматографией на силикагеле (выходы 35–37%). Вос-защиту снимали в максимально мягких условиях (TFA, 0°C, 30 мин), чтобы избежать присоединения TFA по двойной связи, а также деградации BDP-группы. Однако такая деградация все-таки происходит (выход продукта 30%). Другие известные методы деблокирования Вос-группы (например, 98% HCOOH) приводили к полному разрушению флуорофора. Спектр флуоресценции и УФ-спектр синтона (V) идентичны спектрам BODIPY-кислоты (II): (этанол) λ_{возб} 497 нм, λ_{эм} 506 нм; λ_{макс}, нм (ε): 498 (8.1 × 10⁴ М⁻¹ см⁻¹).



(a) Вос-β-аланин, DCC, 4-диметиламинопиридин, хлороформ; (б) 1 М НСl–MeOH, 1 : 4, 2 ч;
 (c) DCC, 4-аминопиридин, 4-диметиламинопиридин, хлороформ; (d) TFA; (e) Cs₂CO₃/DMSO;
 (ж) (*n*-нитрофенил)йодацетат; (жс) триэтиламин, DMSO.

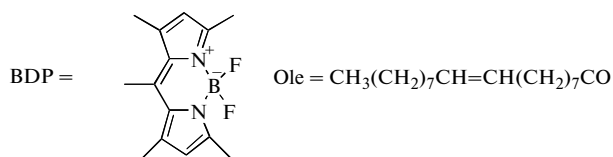


Схема.

На заключительной стадии *rac*-1-[13-(Me₄-BODIPY-8)тридеcanoил]-2-олеоил-3-(3-аминопропионил)глицерин (V) ацилировали активированным эфиром (VI) в DMSO/TEA. Эфир (VI) получали взаимодействием цезиевой соли метотрексата с 1.5 экв. (*n*-нитрофенил)йодацетата, как описано ранее: быстрое алкилирование (менее 5 мин) соли МТХ йодацетатом дает преимущественно γ-моноэфир (γ/α-моноэфир ~16.6) [12] (при длительной реакции с алкилбромидами доля диэфира значительно увеличивается [15]). Целевой продукт (VII) выделяли гель-фильтрацией на липофильном сефадексе с последующей хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 10–15% метанола в хлороформе с 1% АсОН и 1% воды (выход 26%; желто-зеленое аморфное вещество). ¹Н-ЯМР-спектр (δ, м.д.; КССВ – J, Гц) регистрировали на приборе Bruker WM-700 (США) в смеси CDCl₃–MeOH-*d*₄, 1 : 1, при 30°С, используя остаточные сигналы протонов растворителей (7.6 и 4.6 м.д.) в качестве внутреннего стандарта: 0.90

(м, 3 Н, CH₃), 1.28 м (уш. м, 38 Н, С4–С7 и С12–С17 Ole, С4–С12 тридеcanoил), 1.51 (квинтет, 2 Н, COCH₂CH₂), 1.64 (м, 2 Н, COCH₂CH₂), 2.01 (м, 4 Н, CH₂CHCH₂CH₂), 2.32 (м, 4 Н, 2 COCH₂), 2.43 (с, 6 Н, 2 Me BDP), 2.47 (с, 6 Н, 2 Me BDP), 2.53–2.66 (м, 4 Н, COCH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH), 2.98 (м, 2 Н, CCH₂), 3.22 (м, 3 Н, NMe), 3.44 (м, 2 Н, NH–CH₂CH₂CO), 3.75 (м, 1 Н, NHCH₂CO), 4.16–4.33 (набор м, 6 Н, OCH₂CO, Н1 и Н3 Gro), 4.78 (м, 2 Н, CH₂NMe МТХ), 5.27 (м, 1 Н, Н2 Gro), 5.32 (м, 2 Н, CH=CH), 6.07 (с, 2 Н, BDP), 6.79 (м, 2 Н, Ph), 7.73 (дд, 2 Н, J_{3,2} = J_{5,6} 8.98, Ph), 7.81 (д, <1Н, ³J 8.98, NH, Glu), 8.57 (с, 1 Н, Н7 МТХ). УФ-спектр (этанол), λ_{max}, нм (ε): 309 (2.5 × 10⁴ М⁻¹ см⁻¹), 372 (0.9 × 10⁴ М⁻¹ см⁻¹), 498 (8.25 × 10⁴ М⁻¹ см⁻¹). Ацилирование NH₂-групп птеринового остатка *n*-нитрофениловыми эфирами происходит в более жестких условиях и сопровождается гипсохромным сдвигом в УФ-спектре (λ_{max} 377 → 350 нм) [21]. У образцов соединений МТХ (VI)

и (VII) такого сдвига нет, что подтверждает неизменность птероинового остатка.

Квантовый выход (Q) для нового зонда (VII) ($\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}} 498 \text{ нм}/506 \text{ нм}$) рассчитан по формуле: $Q = Q_R \times I/I_R \times OD_R/OD = 0.636$, где Q_R , I , I_R , OD_R — соответственно: квантовый выход, интеграл испускания и оптическое поглощение стандартного спиртового раствора родамина-6G. Значения интегралов испускания (I и I_R) получены с применением корректировочной функции для использованного спектрофлуориметра (Hitachi F-4000, Япония). Уменьшение квантового выхода по сравнению с самой BODIPY-меткой ($Q \approx 1$) по видимому обусловлено внутримолекулярным взаимодействием BODIPY-группы и птероинового остатка МТХ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-00069) и Минобрнауки РФ (соглашение № 8098).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abolmaali S.S., Tamaddon A.M., Dinaryvand R. // Cancer Chemother. Pharmacol. 2013. V. 71. P. 1115–1130.
2. Purcell W.T., Ettinger D.S. // Curr. Oncol. Rep. 2003. V. 5. P. 114–125.
3. McGuire J.J. // Curr. Pharm. Design. 2003. V. 9. P. 2593–2613.
4. Khan Z.A., Tripathi R., Mishra B. // Expert Opin. Drug Deliv. 2012. V. 9. P. 151–169.
5. Kaminskas L.M., Kelly B.D., McLeod V.M., Sberna G., Boyd B.J., Owen D.J., Porter C.J. // Mol. Pharm. 2011. V. 8. P. 338–349.
6. Homma A., Sato H., Tamura T., Okamachi A., Emura T., Ishizawa T., Kato T., Matsuura T., Sato S., Higuchi Y., Watanabe T., Kitamura H., Asanuma K., Yamazaki T., Ikemi M., Kitagawa H., Morikawa T., Ikeya H., Maeda K., Takahashi K., Nohmi K., Izutani N., Kanda M., Suzuki R. // Bioorgan. Med. Chem. 2010. V. 18. P. 1062–1075.
7. Srisuk P., Thongnopnu P., Raktanonchai U., Kanokpanont S. // Int. J. Pharm. 2012. V. 427. P. 426–434.
8. Prabhu P., Shetty R., Koland M., Vijayanarayana K., Vijayalakshmi K.K., Nairy M.H., Nisha G.S. // Int. J. Nanomedicine. 2012. V. 7. P. 177–186.
9. Maeda H., Sawa T., Konno T. // J. Control. Release. 2001. V. 74. P. 47–61.
10. Mamot C., Drummond D.C., Hong K., Kirpotin D.B., Park J.W. // Drug Resist. Updates. 2003. V. 6. P. 271–279.
11. Водовозова Е.Л., Евдокимов Д.В., Молотковский Ю.Г. // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 663–665. [Vodovozova E.L., Evdokimov D.V., Molotkovsky Ju.G. // Rus. J. Bioorgan. Chem. 2004. V. 30. P. 599–601.]
12. Водовозова Е.Л., Гаенко Г.П., Бобрикова Е.С., Пазынина Г.В., Молотковский Ю.Г. // Хим.-Фарм. журн. 2007. Т. 41. С. 10–14.
13. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I., Kadykov V., Gaenko G., Molotkovsky J., Vodovozova E. // J. Drug Deliv. Sci. Techn. 2009. V. 19. P. 51–59.
14. Liederer B.M., Borchardt R.T. // J. Pharm. Sci. 2006. V. 95. P. 1177–1195.
15. Rosowsky A., Forsch R.A., Yu C.-S., Lazarus H., Beardsley G.P. // J. Med. Chem. 1984. V. 27. P. 605–609.
16. 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.
17. Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г. // Биоорганическая химия. 2007. Т. 33. С. 470–473. [Vodovozova E.L., Kuznetsova N.R., Gaenko G.P., Molotkovsky Ju.G. // Rus. J. Bioorgan. Chem. 2007. V. 33. P. 436–438.]
18. Kuznetsova N.R., Sevrin C., Lespineux D., Bovin N.V., Vodovozova E.L., Mészáros T., Szébeni J., Grandfils C. // J. Control. Release. 2012. V. 160. P. 394–400.
19. Болдырев И.А., Молотковский Ю.Г. // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32. С. 87–92. [Baldyrev I.A., Molotkovsky Ju.G. // Rus. J. Bioorgan. Chem. 2006. V. 32. P. 78–83.]
20. Vodovozova E.L., Molotkovsky J.G. // Tetrahedron Lett. 1994. V. 35. P. 1933–1936; ibid. Correction. V. 35 (44). P. 8062.
21. Cheung H.T.A., Boadle D.K., Tran T.Q. // Heterocycles. 1989. V. 28. P. 751–758.

Synthesis of a Fluorescent Analog of Methotrexate Lipophilic Prodrug

Yu. V. Vlasenko, A. S. Alekseeva, E. L. Vodovozova[#]

[#] Phone: +7 (495) 330-66-10; fax: +7 (495) 330-66-01; e-mail: elvod@lipids.ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

A fluorescent analog of the lipophilic prodrug of antitumor agent methotrexate has been synthesized. The conjugate consists of a residue of *rac*-1-[13-(Me₄-BODIPY-8)tridecanoyl]-2-oleoylglycerol connected to methotrexate by ester bond *via* β-Ala-N-carbonylmethylene linker (Me₄-BODIPY-8,4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-8-yl). The probe is designed for incorporation in the membrane of liposomal vehicle to study a mechanism of interaction with tumor cells and an intracellular traffic.

Keywords: methotrexate, lipophilic prodrugs, liposomes, BODIPY-label