



УДК 577.352.2:547.426' 18.057

## СТАБИЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ ЛИПОСОМЫ НА ОСНОВЕ 1,2-ДИ-[9-(2E,4E)-ГЕКСАДИЕНИЛОКСИКАРБОНИЛНОНАНОИЛ]- sn-ГЛИЦЕРО-3-ФОСФОХОЛИНА

© 1996 г. Т. Л. Рунова, А. В. Аникин, М. В. Аникин, Ю. Л. Себякин<sup>#</sup>Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова,  
117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 12.03.96 г.

Осуществлен синтез 1,2-ди-[9-(2E,4E)-гексаденилоксикарбонилнонаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолина, содержащего сопряженные диеновые группировки на концах гидрофобных цепей. Новый фосфолипид способен образовывать бислоиные мембраны и полимеризоваться в мягких условиях. Показана высокая стабильность полимеризованных мембран в присутствии этанола и Тритона X-100.

*Ключевые слова:* фосфолипиды, диеновая кислота, полимерные липосомы.

Введение способных к полимеризации групп в структуру липидных молекул позволяет резко повысить устойчивость самоорганизующихся липидных ансамблей за счет межмолекулярных ковалентных сшивок. Этот подход в значительной мере расширяет круг экспериментальных приемов при моделировании биологических мембран. В частности, высокостабильные полимерные липосомы предлагается использовать для моделирования межклеточных взаимодействий, фиксации ферментов в липидной мембране, создания средств направленного транспорта биологически активных веществ в организме и искусственных переносчиков кислорода [1,2].

К настоящему времени синтезировано несколько десятков полимеризуемых аналогов фосфолипидов, гликолипидов, нейтральных липидов и других соединений, способных образовывать мембранные структуры. Полимеризуемые группы вводили как в гидрофильную, так и в гидрофобную часть молекулы. В качестве полимеризуемых фрагментов использовали сопряженные диацетиленовые и диеновые группы, остатки акриловой кислоты, производные стирола и некоторые другие группы [3, 4].

Следует отметить, что создание моделей мембран на основе полимеризуемых липидов связано с рядом проблем. Введение полимеризуемой группы может препятствовать образованию мономером мембранных структур. Проведение полимеризации во многих случаях не увеличивает или даже

снижает устойчивость мембран. В результате полимеризации поверхностные свойства и поведение гидрофобных цепей могут значительно изменяться [2, 4].

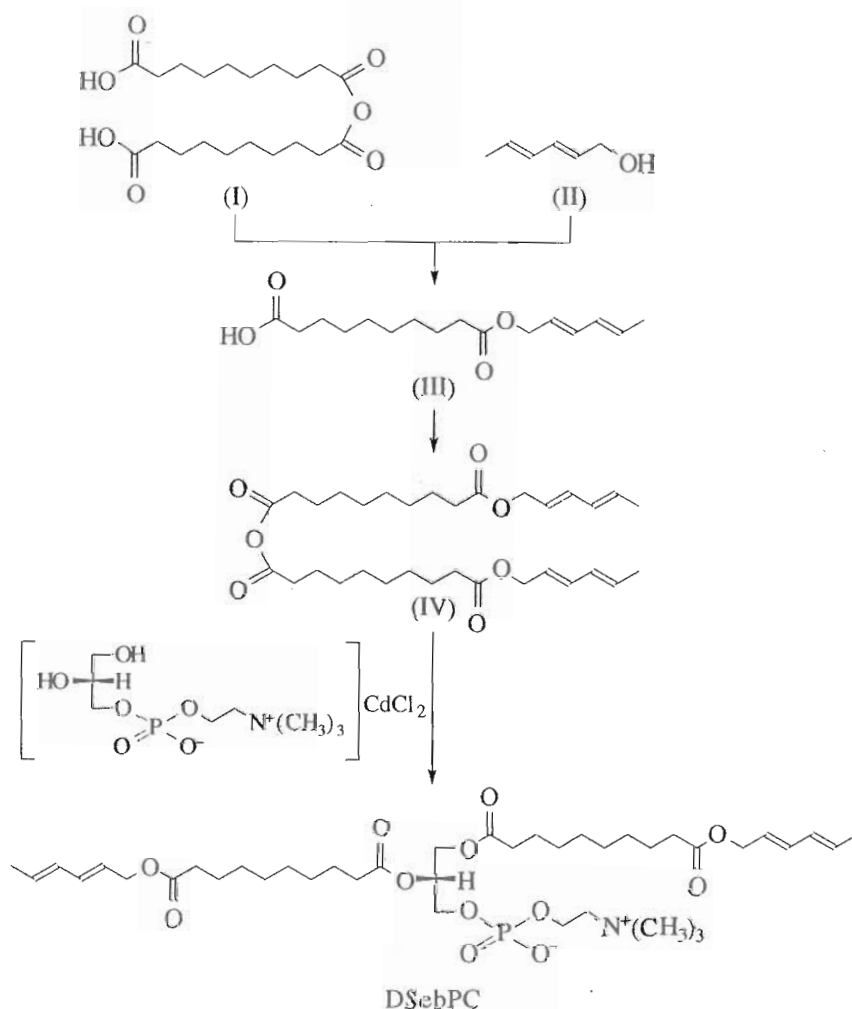
Эти обстоятельства стимулируют развитие синтетических исследований в области способных к полимеризации липидов. При этом особое значение приобретает упрощение схем синтеза, использование доступных исходных компонентов, простых и хорошо воспроизводимых методик.

В настоящей работе нами описан синтез нового способного к полимеризации фосфолипида – 1,2-ди-[9-(2E,4E)-гексаденилоксикарбонилнонаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSebPC). Структурно близкий к DSebPC липид был описан ранее [5], но в нашем случае полимеризуемый фрагмент (короткий диеновый спирт) присоединяли к глицериновому остову с помощью ω-дикарбоновой кислоты, тогда как в работе [5] для присоединения короткой диеновой кислоты использовали ω-гидроксикарбоновую кислоту.

Синтез DSebPC сводится практически к двум реакциям ацилирования (схема): 9-(2E,4E)-гексаденилоксикарбонилнонаноновую кислоту (III) получали этерификацией (2E,4E)-гексадиенола (II) ангидридом себаценовой кислоты (I) в присутствии 4-(диметиламино)пиридина (DMAP); ацилирование sn-глицеро-3-фосфохолина проводили по описанной методике [6] с помощью полученного из кислоты (III) ангидрида (IV) в присутствии DMAP. Индивидуальность и структура полученных соединений подтверждались хроматографическими методами и данными <sup>1</sup>H-ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопии.

Сокращения: AIBN – бисазонизобутиронитрил; DSebPC – 1,2-ди-[9-(2E,4E)-гексаденилоксикарбонилнонаноил]-sn-глицеро-3-фосфохолин; DMAP – 4-диметиламинопиридин.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



В спектре поглощения DSebPC  $\lambda_{\max} = 227$  нм (метанол). Молярный коэффициент поглощения равнялся  $4.3 \times 10^4$ , что составляло  $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  на каждый диеновый фрагмент и согласовывалось с данными, полученными для исходного (2E,4E)-гексадиенола ( $\lambda_{\max} 228$  нм,  $\epsilon 2.0 \times 10^4$ , метанол).

При диспергировании в воде DSebPC формирует ламеллярные структуры. На это указывают ти-

личные для бислойных мембран спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР дисперсий DSebPC – анизотропный сигнал с плечом, направленным в сторону слабого поля (рис. 1а). Величина анизотропии химического сдвига (46 м. д.) является обычной для бислойных липидных мембран в жидкокристаллическом состоянии [1].

В ходе полимеризации DSebPC в УФ-спектре происходило уменьшение поглощения при  $\sim 227$  нм, соответствующего сопряженному диеновым

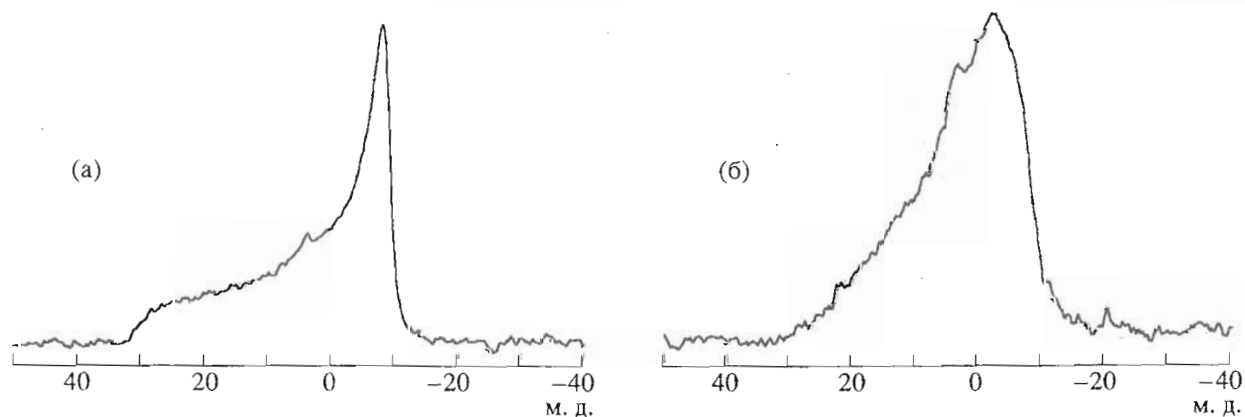


Рис. 1.  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры водной дисперсии DSebPC до (а) и после (б) полимеризации.

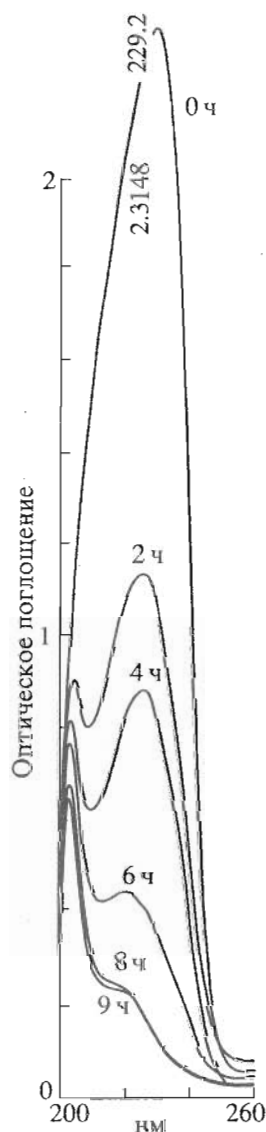


Рис. 2. Изменения в УФ-спектрах водной дисперсии DSebPC в процессе полимеризации под действием AIBN. Спектры получены через 0, 2, 4, 6, 8 и 9 ч инкубации при 55–60°C.

группам (рис. 2), что использовалось для количественной характеристики хода полимеризации (рис. 3). Липосомы из DSebPC могут быть полностью заполимеризованы за 6–8 ч при 55–60°C в присутствии 1% инициатора радикальной полимеризации бисазоизобутиронитрила (AIBN) или самопроизвольно за 3 сут при комнатной температуре.

Полимеризация отражается в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (рис. 1б) значительным увеличением ширины линии по сравнению с мономерными образцами, что может объясняться понижением молекулярной подвижности в мембране в результате полимеризации. Следует отметить, что типичная для бислоя форма сигнала в полимерных мембранах сохраня-

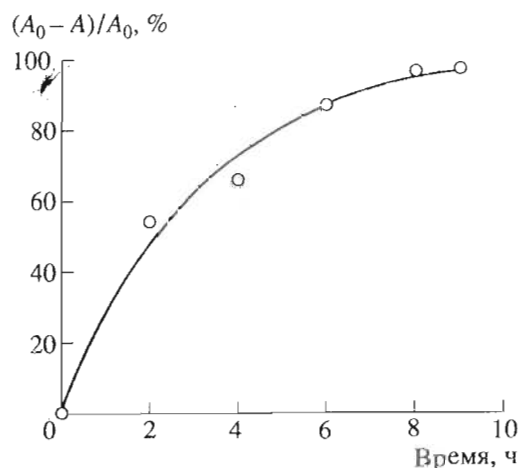


Рис. 3. Полимеризация липосом из DSebPC под действием AIBN по данным УФ-спектров.  $A$ ,  $A_0$  – поглощение при 227 нм.

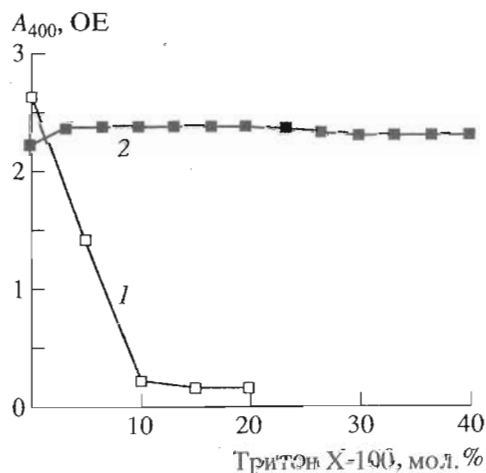


Рис. 4. Изменение оптического поглощения липосомных дисперсий из яичного фосфатидилхолина (1) и полимерного DSebPC (2) под действием Тритона X-100.

ется. Интересно, что анизотропия химического сдвига в  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрах при полимеризации мембран практически не меняется.

Полимерные липосомы приобретают свойства стабильных мембран и устойчивы к разрушающему действию Тритона X-100 (рис. 4). При добавлении детергента происходит быстрое падение оптического поглощения липосомной дисперсии яичного фосфатидилхолина, очевидно, в результате разрушения мембранных структур и образования смешанных мицелл, обладающих наименьшим светорассеянием. В случае полимерных липосом из DSebPC оптическое поглощение дисперсии не меняется в широком диапазоне концентраций детергента, что указывает на

сохранение их структуры. Повышенная стабильность полимеризованных мембран из DSebPC была обнаружена также при действии на них этанола (данные не приведены).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали себациновую кислоту, N,N'-дициклогексилкарбодимид, алюмогидрид лития и AIBN отечественного производства, DMAP фирмы Fluka. Комплекс *sn*-глицеро-3-фосфохолина с хлоридом кадмия был получен в соответствии с работой [7], (2*E*,4*E*)-гексадиенол получали как описано в [8].

Спектры ЯМР регистрировали на импульсном спектрометре Bruker MSL-200 (Германия), рабочие частоты 200.13 и 81.02 МГц для ядер  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  соответственно. Химические сдвиги приведены в миллионных долях, константы спин-спинового взаимодействия – в герцах. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония). Температуру плавления определяли на приборе Voetius (Германия) и не корректировали. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV-245 (Чехо-Словакия) в системе растворителей хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4), если не указано другое; обнаружение веществ осуществляли нагреванием при 350°C или опрыскиванием раствором  $\text{KMnO}_4$ . Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100 мкм (Chemapol). Все вещества, содержащие диеновую группировку, защищали от дневного света. Растворители очищали по стандартным методикам.

**9-(2*E*,4*E*)-Гексаденилоксикарбонилнонановая кислота (III).** К раствору 28.9 г (143 ммоль) себациновой кислоты в 100 мл безводного этилацетата прибавляли раствор 29.4 г (143 ммоль) DCC в 20 мл безводного этилацетата. Реакционную массу выдерживали в течение ночи при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 100 мл безводного хлороформа и прибавляли к раствору 7.0 г (71.4 ммоль) (2*E*,4*E*)-гексадиенола (II) в 50 мл безводного хлороформа. Реакционную массу оставляли на ночь в атмосфере азота. По окончании реакции (контроль ТСХ, бензол–этилацетат, 2 : 1) растворитель удаляли в вакууме, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя продукт реакции смесью бензол–этилацетат (6 : 1). Получали 5.4 г (26.8%) соединения (III),  $R_f$  0.74 (бензол–этилацетат, 2 : 1), т. пл. 37.0–38.5°C (гептан).

ИК (вазелиновое масло,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300–3000 (OH); 2920 ( $\text{CH}_3$ ); 2850 ( $\text{CH}_2$ ), 1730, 1700 (C=O); 1640 ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 1460 ( $\text{CH}_3$ ); 1375 ( $\text{CH}_2$ ); 1235, 1140, 1080, 1020 (C–O); 718 ( $\text{CH}_2$ ).

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 1.28 (8H, уш. с,  $\text{CH}_2$ ), 1.58 (4H, м, 2  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.74 (3H, д,  $J$  6.8,

$\text{CH}_3$ ), 2.28 (2H, т,  $J$  7.9,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$ ), 2.32 (2H, т,  $J$  7.9,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$ ), 4.56 (2H, д,  $J$  6.8,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.62 (1H, дт,  $J$  15.0 и 6.8,  $=\text{CHCH}_2$ ), 5.73 (1H, дк,  $J$  15.0 и 6.8,  $=\text{CHCH}_3$ ), 6.03 (1H, ддк,  $J$  10.0, 15.0 и 1.5,  $\text{CH}=\text{CHCH}_3$ ), 6.23 (1H, дд,  $J$  15.0 и 10.0,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ).

**1,2-Ди-[9-(2*E*,4*E*)-гексаденилоксикарбонилнонанол]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин.** К раствору 4.93 г (17.4 ммоль) соединения (III) в 50 мл  $\text{CCl}_4$  прибавляли раствор 1.98 г (9.62 ммоль) DCC в 20 мл  $\text{CCl}_4$ . Смесью выдерживали 4 ч в атмосфере азота в темноте при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 50 мл безводного хлороформа, прибавляли 1.07 г (8.7 ммоль) DMAP и 1.54 г (3.5 ммоль) кадмиевого комплекса *sn*-глицеро-3-фосфохолина. Полученную суспензию перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре в темноте 48 ч. По окончании реакции (контроль ТСХ) осадок отфильтровывали, остаток из фильтрата хроматографически очищали на колонке с силикагелем в ступенчатом градиенте растворителей: хлороформ  $\rightarrow$  хлороформ–метанол (10 : 1)  $\rightarrow$  хлороформ–метанол (5 : 1)  $\rightarrow$  хлороформ–метанол (3 : 1)  $\rightarrow$  хлороформ–метанол–7 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (65 : 25 : 1)  $\rightarrow$  хлороформ–метанол–7 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$  (65 : 25 : 4). Выход 1.4 г (51%),  $R_f$  0.26. Липид хранили в виде раствора в этаноле в атмосфере азота.

ИК: (вазелиновое масло,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2930 ( $\text{CH}_3$ ); 2870 ( $\text{CH}_2$ ); 1730 (C=O); 1640 ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 1460 ( $\text{CH}_3$ ); 1380 ( $\text{CH}_2$ ); 1240 (P=O); 1145, 1085, 1023 (C–O); 720 ( $\text{CH}_2$ ).

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ( $\text{CDCl}_3$ – $\text{CD}_3\text{OD}$ – $\text{D}_2\text{O}$ , 1 : 1 : 0.15,  $\delta$ ): 1.28 (16H, уш. с,  $\text{CH}_2$ ), 1.60 (8H, м, 4  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.74 (6H, д,  $J$  6.5, 2  $\text{CH}_3$ ), 2.31 (8H, м, 2  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$ ), 3.20 (9H, с,  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.60 (2H, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.97 (2H, дд,  $\text{CHCH}_2\text{OP}$ ), 4.15 (1H, дд,  $J$  7 и 12,  $\text{CH}_A\text{H}_B\text{OCO}$ ), 4.24 (2H, м,  $\text{POCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.40 (1H, дд,  $J$  3 и 12,  $\text{CH}_A\text{H}_B\text{OCO}$ ), 4.56 (4H, д, 2  $=\text{CHCH}_2\text{O}$ ), 5.22 (1H, м,  $\text{CHOCO}$ ), 5.62 (1H, дт,  $J$  15.0 и 6.5,  $=\text{CHCH}_2$ ), 5.74 (1H, дк,  $J$  15.0 и 6.5,  $=\text{CHCH}_3$ ), 6.04 (1H, ддк,  $J$  10.0, 15.0 и 1.5,  $\text{CH}=\text{CHCH}_3$ ), 6.24 (1H, дд,  $J$  15.0 и 10.0,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ).

**Приготовление липосом.** Раствор 20 мг DSebPC в 1 мл этанола упаривали в вакууме с помощью ротормного испарителя. К образовавшейся на стенках колбы тонкой пленке липида добавляли 2 мл дистиллированной воды, выдерживали 10 мин при комнатной температуре и затем осторожно встряхивали.

**Полимеризация.** Дисперсию липосом из DSebPC, содержащего 1% AIBN, выдерживали при 55–60°C в атмосфере азота. Ход полимеризации

контролировали по данным ТСХ (исчезало пятно мономера с  $R_f$  0.26 и увеличивалось пятно на старте), а также по данным УФ-спектроскопии (см. рис. 3). Для полной полимеризации липида требовалось 8 ч.

**Определение устойчивости липосом.** а) *К этанолу.* К аликвотам дисперсии липосом, образованных фосфолипидом DSebPC, подвергнутых и не подвергнутых полимеризации, прибавляли этанол до его концентрации в дисперсии в разных аликвотах от 0 до 70%. Измеряли оптическое поглощение при 400 нм.

б) *К детергенту.* К дисперсии липосом из яичного фосфатидилхолина и дисперсии липосом из фосфолипида DSebPC, подвергнутых полимеризации, порциями добавляли 10% раствор Тритона X-100 в воде и измеряли оптическое поглощение при 400 нм при разных концентрациях детергента.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грегореадис Г. Липосомы в биологических системах. М.: Медицина, 1983. С. 36–93.
2. Чупин В.В., Аникин А.В., Серебренникова Г.А. // Биол. мембраны. 1993. Т. 10. С. 229–254.
3. Любешкин А.В., Себякин Ю.Л. // Успехи биол. химии. 1994. Т. 34. С. 131–166.
4. Рингсдорф Г., Шмидт Б. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. 32. С. 487–501.
5. Tuminaki P.N., Ponticello I.S., O'Brien D.F. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 6541–6542.
6. Gupta C.M., Radhakrishnan R., Khorana H.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 4315.
7. Препаративная биохимия липидов / Ред. Л.Д. Бергельсон, Э.В. Дятловицкая. М.: Наука, 1981. С. 236–238.
8. Nystrom R. F., Brown W. G. // J. Am. Chem. Soc. 1947. V. 69. P. 2548–2549.

## Stable Polymeric Liposomes from 1,2-Di-[9-(2E,4E)-hexadienyloxycarbonylnonanoyl]-sn-Glycero-3-Phosphocholine

T. L. Runova, A. V. Anikin, M. V. Anikin, and Yu. L. Sebyakin

*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia*

**Abstract**—1,2-Di-[9-(2E,4E)-hexadienyloxycarbonylnonanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine with conjugated dienic fragments at the ends of the hydrophobic chains was synthesized. It was shown to form bilayer membranes and to polymerize under mild conditions. The polymerized membranes demonstrated high stability in the presence of ethanol and Triton X-100.

*Key words:* phospholipids, dienic acid, polymeric liposomes.