

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.12.3; 577.29

**ГЛИКОЛИПОТРИПЕПТИД (N-ЛАКТИТОЛ-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> И ЕГО  
ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫЙ АНАЛОГ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ  
ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ  
ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКИ-МИШЕНИ****Ксения Александровна Афанасьева<sup>1</sup>, Анастасия Михайловна Гилева<sup>2</sup>,  
Елена Арнольдовна Марквичева<sup>2</sup>, Ульяна Александровна Буданова<sup>1</sup>, Юрий  
Львович Себякин<sup>1</sup>**<sup>1</sup> МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, кафедра химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского)<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН**Автор, ответственный за переписку:** Ульяна Александровна Буданова, c-221@yandex.ru

**Аннотация.** Работа посвящена получению углеводного производного липотрипептида (N-лактитол-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> нерегулярного строения с двумя терминальными остатками D-галактозы, разветвляющим звеном на основе алифатического L-лизина и его безуглеводного аналога с 1-пиренбутанолом в качестве флуоресцентной метки в гидрофобном фрагменте. Разработанная схема синтеза включает универсальные подходы пептидной химии, а также стадии формирования ациклического углевода на основе лактозы в гидрофильном домене амфифила. Соединения предназначены для создания композиций векторных систем доставки БАВ с возможностью визуализации процесса взаимодействия с клетками-мишенями.

**Ключевые слова:** транспортные системы, клетки печени, асиалогликопротеиновые рецепторы (ASGPR), гликолипотрипептид, (Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub>, ациклическая форма лактозы, производные 1-пиренбутанола

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-5-478-489

**Список сокращений:** БАВ – биологически активные вещества.

**Финансирование.** Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП РТУ МИРЭА, получившего поддержку Минобрнауки РФ (соглашение от 01.09.2021 № 075-15-2021-689).

**Для цитирования:** Афанасьева К.А., Гилева А.М., Марквичева Е.А., Буданова У.А., Себякин Ю.Л. Гликолипотрипептид (N-лактитол-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> и его флуоресцентно-меченный аналог для визуализации векторных систем доставки биологически активных веществ в клетки-мишени // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023 Т. 64. № 5. С. 478–489.

ORIGINAL ARTICLE

**GLYCOLIPOTRIPEPTIDE (N-LACTITOL-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> AND ITS  
FLUORESCENTLY LABELED ANALOGUE FOR VISUALIZATION  
OF VECTOR SYSTEMS FOR BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES  
DELIVERY TO TARGET CELLS**

**Ksenia A. Afanasyeva<sup>1</sup>, Anastasia M. Gileva<sup>2</sup>, Elena A. Markvicheva<sup>2</sup>, Ulyana A. Budanova<sup>1</sup>, Yurii L. Sebyakin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>MIREA – Russian Technology University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, N. Ah. Preobrazhensky department of chemistry and technology of biologically active compounds, medical and organic chemistry), Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov RAS

**Corresponding author:** Ulyana Aleksandrovna Budanova, c-221@yandex.ru

**Abstract.** The work is devoted to the preparation of a carbohydrate derivative of lipotriptide (N-lactitol-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> of irregular structure with two terminal residues of D-galactose, a branching link based on aliphatic L-lysine and its carbohydrate-free analog with 1-pyrenbutanol as a fluorescent label in a hydrophobic fragment. The developed synthesis scheme includes universal approaches of peptide chemistry, as well as the stages of formation of an acyclic carbohydrate based on lactose in the hydrophilic domain of amphiphile. The compounds are designed to create compositions of vector BAS delivery systems with the ability to visualize the process of interaction with target cells.

**Keywords:** transport systems, liver cells, asialoglycoprotein receptors (ASGPR), glycolipotriptide, (Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub>, acyclic form of lactose, derivatives of 1-pyrenbutanol

**List of abbreviations:** BAS – biologically active substances.

**Financial Support.** The work was carried out using the equipment of the RTU MIREA Central Research Center, supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-689 dated 01.09.2021).

**For citation:** Afanasyeva K.A., Gileva A.M., Markvicheva E.A., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. Glycolipotriptide (N-lactitol-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> and its fluorescently labeled analog for visualization of vector systems for biologically active substances delivery to target cells // Vestn. Mosk. un-ta Ser. 2. Chemistry. 2023. T. 64. № 5. S. 478–489.

Печень – основной орган метаболизма, подверженный вирусным, генетическим, онкологическим и метаболическим патологиям [1]. Для лечения такого рода заболеваний существует необходимость в разработке направленных и эффективных систем доставки лекарственных средств. В качестве идеальной мишени для селективного транспорта в клетки печени (гепатоциты) в настоящее время рассматриваются асиалогликопротеиновые рецепторы (ASGPR).

ASGPR – это экспрессированный на поверхности гепатоцитов лектин С-типа, который эффективно взаимодействует с терминальными остатками D-галактозы (Gal) или N-ацетил-D-галактозамина (GalNAc) в составе полисахаридов или гликопротеинов. D-Галактоза является перспективным лигандом ASGPR благодаря

ее высокому сродству к рецептору [2]. Разработаны различные многофункциональные системы, включая наночастицы, мицеллы и липосомы, которые могут длительное время циркулировать в кровотоке, постоянно высвобождать препараты, увеличивать накопление объектов в клетках-мишенях, усилить противоопухолевую активность и уменьшать побочные эффекты [3–7]. Успех этих систем способствует дальнейшей разработке новых лигандов на основе N-ацетил-D-галактозамина с сопоставимой или более высокой аффинностью к асиалогликопротеиновым рецепторам, а также природных лигандов, таких как арабиногалактан-(AG), пуллулан-(PL) и лактобионовая кислота (LA) в составе наночастиц для лечения различных заболеваний [8–11].

Среди всех видов злокачественных новообразований поражения печени занимают четвертое место в мире по смертности, при этом гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является их наиболее распространенным подтипом [12–14]. Разработан ряд новых наночастиц хитозана, селективно нацеленных на ASGPR. Показано, что производные галактозилированного хитозана являются перспективными фармацевтическими препаратами подавления ГЦК с большим потенциалом для клинических исследований [15, 16].

Таргетная доставка олигонуклеотидов в гепатоциты в последние годы является прорывным подходом в их терапевтическом применении [17, 18]. Конъюгированные с GalNAc малые интерферирующие РНК (siРНК) позволяют целенаправленно ингибировать гены, связанные с развитием различных патологий печени [19].

Для поиска наиболее оптимальных конструкций, обладающих высокой силой связывания с ASGPR используют программное прогнозирование с оценкой влияния на этот показатель гидрофильно-липофильного баланса (HLB) в линкерном звене лигандов Gal/GalNAc. Показано превосходство линкеров с высокими значениями HLB [20]. Сравнительная оценка лигандов на основе моносахаридов и полисахаридов свидетельствует о том, что головные группы полисахаридов обладают улучшенным взаимодействием с рецептором в экспериментах *in silico* [21].

Для визуализации процессов связывания различных биомолекул с мембранами клеток-мишеней используют транспортные системы с включением в композицию флуоресцентной метки. В качестве такого объекта определенным интерес вызывают производные пирена, обладающие высоким квантовым выходом, химической стабильностью, длительным временем жизни, способностью образовывать возбужденные димеры и различные комплексы [22]. Пирен представляет собой ароматический углеводород с полициклической плоской структурой и четырьмя сопряженными бензольными кольцами, однако в составе некоторых меченых молекул, содержащих пирен, происходит тушение флуоресценции, вызванное высокой концентрацией или агрегацией [23]. В связи с этим весьма актуальны исследования, направленные на создание и применение подходящих флуоресцентных зондов.

Цель настоящей работы – разработка схемы получения и синтез углеводного производного липотрипептида (N-лактитол-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> нерегулярного строения с двумя терминальными

остатками D-галактозы, разветвляющим звеном на основе алифатического L-лизина и его безуглеводного аналога с 1-пиренбутанолом в составе конструкции.

## Экспериментальная часть

### Материалы и методы

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР регистрировали в дейтерированном растворителе на импульсном ЯМР-спектрометре «BrukerWM-300» с рабочей частотой 300 МГц. Внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках «Сорбфил» (Россия), препаративную тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках с силикагелем «Sigma-Aldrich TLC Standard grade» (Германия). Липосомальные дисперсии обрабатывали ультразвуком на приборе ЗАО ПКФ «Сапфир» (Россия) с рабочей частотой 35 кГц. Визуализацию липосомальных дисперсий проводили с помощью конфокального лазерного микроскопа («Nikon TE-2000», Япония). Обнаружение пятен при ТСХ осуществлялось нагреванием над пламенем спиртовки. Для выявления веществ, содержащих аминогруппы, применяли 5%-й раствор нингидрина с последующим нагреванием до 50 °С.

### Синтез гексадецилового эфира L-лизина (2)

К 2,06 г (0,0139 моль) L-лизина добавляли 4,11 г (0,017 моль) цетилового спирта и 0,031 г (0,031 моль) *para*-толуолсульфокислоты. Смесь перемешивали 2 ч на масляной бане при 130 °С. Затем реакционную массу охлаждали и перекристаллизовали из ацетона. Выпавший осадок растворяли в хлороформе, промывали 10% водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Отгоняли органический растворитель под вакуумом и получали 0,28 г (28%) продукта в виде аморфного вещества.

ИК-спектр ( $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>): 2922 (CH<sub>3</sub>), 2851 (CH<sub>2</sub>), 1740 (C=O эфир), 1472 (CH<sub>2</sub>), 1378 (CH<sub>3</sub>), 1187 (N–C), 863, 723 (C–H).

### Синтез гексадецилового эфира N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-бис(трет-бутоксикарбонилглицил)-L-лизина (3)

К раствору 0,17 г (0,97 ммоль) BocGly-OH [25] в 10 мл THF добавляли 0,079 г (0,38 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) и 0,044 г (0,38 ммоль) N-гидроксисукцинимида (NHS). Смесь перемешивали 2 ч при 0 °С.

Осадок отфильтровывали, прибавляли 0,121 г (0,32 ммоль) гексадецилового эфира L-лизина **2** и перемешивали 24 ч при комнатной температуре. Продукт выделяли с помощью препаративной тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем в системе толуол – этилацетат (1:1, v/v). Получали 0,035 г (17,5%) продукта **3**.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 0,87 (т, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,25 (с, 28H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,48 (м, 18H, CCH<sub>3</sub>); 1,95 (к, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,67 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2,84 (с, 1H, NH), 3,22 (с, 1H, NH), 3,63 (м, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4,09 (м, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4,41 (м, 4H, NHCH<sub>2</sub>CO), 4,81 (с, 1H, NHCHCO), 5,29 (дс, 2H, CONHCH<sub>2</sub>).

#### **Синтез гексадецилового эфира N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-бис(глицил)-L-лизина (4)**

К раствору 0,09 г (0,13 ммоль) продукта **3** в 5 мл безводного хлористого метилена при перемешивании добавляли по каплям 2 мл трифторуксусной кислоты. Смесь перемешивали 2 ч при 0 °С. Растворитель удаляли под вакуумом. Реакционную массу растворяли в 30 мл хлористого метилена, обрабатывали 5%-м водным раствором гидрокарбоната натрия, сушили над сульфатом натрия. Растворитель упаривали на роторном испарителе. Получали 0,02 г (30%) продукта **4**.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 0,87 (т, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,25 (с, 28H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,95 (к, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,67 (с, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2,84 (с, 1H, NH), 3,22 (с, 1H, NH), 3,63 (м, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4,09 (м, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4,23 (м, 4H, NHCH<sub>2</sub>CO), 4,81 (с, 1H, NHCHCO), 5,29 (дс, 2H, CONHCH<sub>2</sub>).

#### **Синтез гексадецилового эфира N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-бис(аминодезоксилактитолглицил)-L-лизина (5) [24]**

К раствору 0,015 г (0,03 ммоль) продукта **4** в 5 мл изопропилового спирта добавляли раствор 0,042 г (0,12 ммоль) лактозы в 5 мл дистиллированной воды и интенсивно перемешивали 16 ч при комнатной температуре и 12 ч при 60 °С. Контроль за ходом реакции осуществляли по данным ТСХ. Растворитель удаляли под вакуумом.

Полученное основание Шиффа без выделения растворяли в 10 мл метанола и обрабатывали 0,004 г (0,12 ммоль) боргидрида натрия. Смесь перемешивали 24 ч при комнатной температуре и 6 ч при 60 °С, осадок отфильтровывали и отгоняли растворитель под вакуумом. Продукт выделяли с помощью препаративной хромато-

графии на пластинках с силикагелем в системе хлороформ – метанол – вода (65:25:4, v/v). Получали 0,031 г (86 %) продукта **5**.

MS (MALDI), m/z: 1136,67 [M<sup>+</sup>]. Вычислено: 1136,64.

#### **Синтез N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-бис(трет-бутоксикарбонил)-L-лизина (7) [25]**

К раствору 1 г (5,5 ммоль) L-Lys·HCl в 20 мл дистиллированной воды добавляли по каплям 5%-й водный раствор K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (до pH 9) и раствор 2,99 г (13,7 ммоль) ди-трет-бутилпирокарбоната в 10 мл изопропилового спирта, перемешивали при 40 °С в течение 2 ч. После завершения реакции органический растворитель удаляли под вакуумом. Остаток разбавляли 50 мл дистиллированной воды, обрабатывали петролейным эфиром, после чего подкисляли 20%-м раствором лимонной кислоты до pH 3, экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенные экстракты сушили над сульфатом натрия, растворитель отгоняли на роторном испарителе. Получали 1,87 г (98%) продукта **7** [25].

#### **Синтез N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-бис(трет-бутоксикарбонил)-O-1-пиренбутил-L-лизина (8)**

К раствору 0,153 г (0,44 ммоль) соединения **6** в 10 мл THF добавляли раствор 0,095 г (0,46 ммоль) DCC и 0,057 г (0,46 ммоль) 4-диметиламинопиридина (DMAP) в 5 мл THF. Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0 °С, добавляли 0,1 г (0,36 ммоль) 1-пиренбутанола. За ходом реакции следили по данным ТСХ. Реакционную массу оставляли перемешиваться на 3 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок отфильтровывали, растворитель отгоняли на роторном испарителе. Продукт выделяли методом препаративной хроматографии на пластинках с силикагелем в системе толуол – этилацетат (5:1, v/v). Выход продукта **7** составил 0,149 г (68%).

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 1,43 (16H, м, CCH<sub>3</sub>); 1,59 (4H, с, CH<sub>2</sub>); 1,87 (6H, м, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,34 (м, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3,01 (д, 2H, NH), 3,38 (м, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3,72 (м, 1H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4,20 (м, 2H, NHCH<sub>2</sub>CO), 4,47 (с, 1H, NHCHCO), 5,05 (д, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,69–8,31 (м, 9H, Pуг).

#### **Синтез N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-бис(трет-бутоксикарбонил-глицил)-O-1-пиренбутил-L-лизина (9)**

К раствору 0,149 г (0,25 ммоль) соединения **7** в 5 мл хлористого метилена добавляли по каплям 4 мл трифторуксусной кислоты. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре,

растворитель удаляли на роторном испарителе. Остаток растворяли в 40 мл хлороформа, промывали 5%-м раствором гидрокарбоната натрия и сушили над сульфатом натрия. Отгоняли растворитель под вакуумом. К остатку добавляли раствор 0,069 г (0,40 ммоль) BocGly-OH, 0,062 г (0,30 ммоль) DCC и 0,037 г (0,30 ммоль) DMAP в 10 мл THF. Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Контроль за реакцией осуществляли по данным ТСХ. Образовавшийся осадок отфильтровывали, растворитель удаляли под вакуумом. Продукт выделяли методом препаративной тонкослойной хроматографии на пластинках с силикагелем в системе толуол – этилацетат (3:1, v/v). Выход соединения **9** составил 0,015 г (21%).

<sup>1</sup>H-ЯМР- спектр (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 0,92 (м, 16H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) 1,26–1,45 (с, 18H, CCH<sub>3</sub>), 1,61 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2,83 (кв, 2H, NHCH<sub>2</sub>CO), 3,48 (с, 1H, NH), 3,70 (м, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3,99 (м, 2H, COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4,08 (м, 4H, NHCH<sub>2</sub>CO), 4,25 (дс, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,69 – 8,31 (м, 9H, P<sub>yr</sub>).

#### **Синтез бис-трифторацетат N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-бис(глицил)-O-1-пиренбутил-L-лизина (10)**

К 0,050 г (0,014 ммоль) соединения **9** в 10 мл хлороформа при перемешивании добавляли по каплям 1 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 1 ч. Растворитель удаляли на роторном испарителе. Получали 0,054 мг (94%) трифторацетатной соли **10**. MS (MALDI), m/z: 517.24 [M<sup>+</sup>]. Вычислено: 517,28.

#### **Приготовление липосомальных дисперсий**

Исследуемые соединения отбирали в количестве, необходимом для создания общей концентрации липидов 2 мг/мл. Раствор 4 мг липидной композиции в 2 мл смеси хлороформа и метанола (1:1, v/v) медленно отгоняли на роторном испарителе до образования тонкой пленки. Остаток высушивали в вакууме 1 ч при 25 °С. Затем в колбу добавляли 2 мл дистиллированной воды, встряхивали в течение 60 мин при 50 °С. Полученные мультимеллярные липосомы обрабатывали ультразвуком 2×10 мин с интервалом в 15 мин при 50 °С.

#### **Определение размера и ζ-потенциала частиц**

Распределение частиц по размерам и ζ-потенциал определяли методом динамического све-

торассеяния на анализаторе «Delsa™ Nano Common» («Beckman Coulter», США). Длина волны 658 нм. Угол определения 90 град. Для измерения ζ-потенциала в качестве эталона использовали дистиллированную воду. По величине ζ-потенциала судили об устойчивости коллоидной системы (0 ± 30 мВ – плохая устойчивость, больше ±30 мВ – хорошая устойчивость).

#### **Стабильность липосомальных дисперсий**

Стабильность липосомальных дисперсий изучали определением показателя оптической плотности при длине волны, равной 470 нм, на фотоколориметре «Экотест 2020» (Россия). В качестве фона использовали дистиллированную воду. О стабильности судили по изменению показателя оптической плотности во времени (допустимая погрешность 10%).

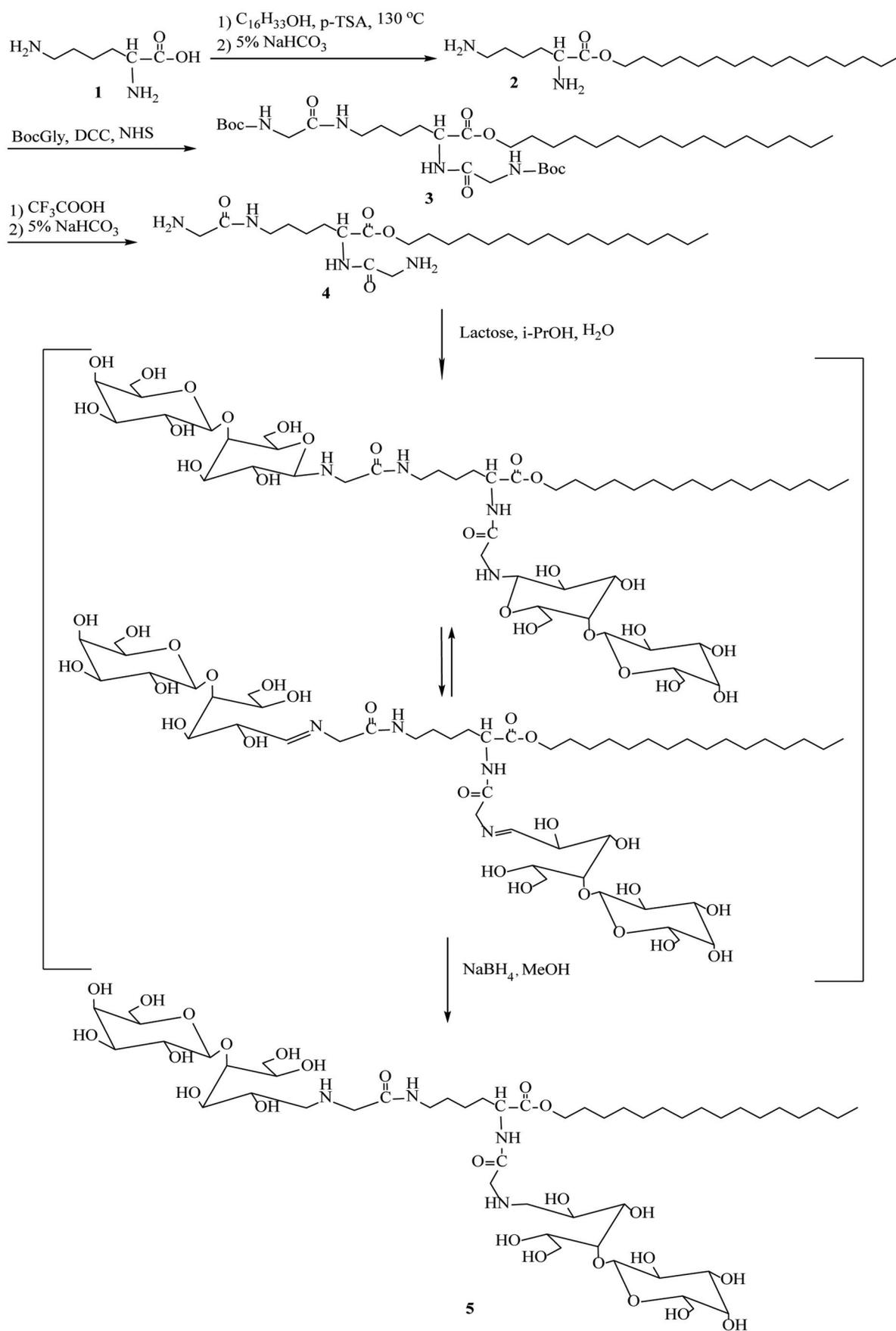
#### **Культивация клеточной линии**

Клетки MCF-7 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FBS) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37 °С). Наблюдение за ростом клеток осуществляли ежедневно с помощью светового инвертированного микроскопа. Каждые 3–4 дня проводили пересев клеток и замену культуральной среды. Для этого декантировали из культурального флакона старую питательную среду и промывали раствором трипсин-ЭДТА. Для открепления клеток с поверхности флакона добавляли 1,5–2,0 мл свежего раствора трипсин-ЭДТА и оставляли на 5 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем действие раствора трипсин-ЭДТА инактивировали добавлением 1,5–2,0 мл среды DMEM без сыворотки. Полученную суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость декантировали, а к оставшемуся осадку добавляли 5 мл свежей культуральной среды (10% FBS). Далее клетки аккуратно суспендировали, отбирали аликвоту суспензии, содержащую 1 млн клеток, и возвращали ее в культуральный флакон для последующего введения.

#### **Конфокальная микроскопия**

Эффективность накопления липосомальных дисперсий в клетках MCF-7 исследовали с помощью конфокального лазерного микроскопа («Nikon TE-2000», Япония). Клетки высевали на покровные стекла (по 40 000 клеток на стекло) в питательной среде DMEM (10% FBS) и переносили в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 24 ч. Для визуализации ядер и цитоплазмы среду заменяли на свежий

Схема 1



DMEM, содержащий раствор Propidium Iodide (50 мкм) и Calcein AM (100 мкм), и инкубировали в течение 15 мин с последующей промывкой PBS (рН 7,4). Затем клетки инкубировали в течение 15 мин и 1 ч с липосомальными дисперсиями, ресуспендированными в DMEM без сыворотки (0,5 мкл суспензии на 1 мл среды). Для удаления неинтернализованных частиц клетки трижды промывали PBS.

### Обсуждение результатов

Разработана схема синтеза углеводного производного липотрипептида (N-лактитол-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> нерегулярного строения с двумя терминальными остатками D-галактозы, разветвляющим звеном на основе алифатического L-лизина и его безуглеводного аналога с 1-пиренбутанолом в качестве флуоресцентной метки в гидрофобном фрагменте (схема 1). Центральным звеном предложенной конструкции является трипептид глицил-L-лизил-глицин, в структуре которого остатки глицина присоединены по N<sub>2</sub><sup>α</sup>- и N<sub>2</sub><sup>ε</sup>-аминогруппам L-лизина. Алифатическая углеводородная цепь C<sub>16</sub> является гидрофобным фрагментом, необходимым для встраивания и закоривания в липидном бислое липосом

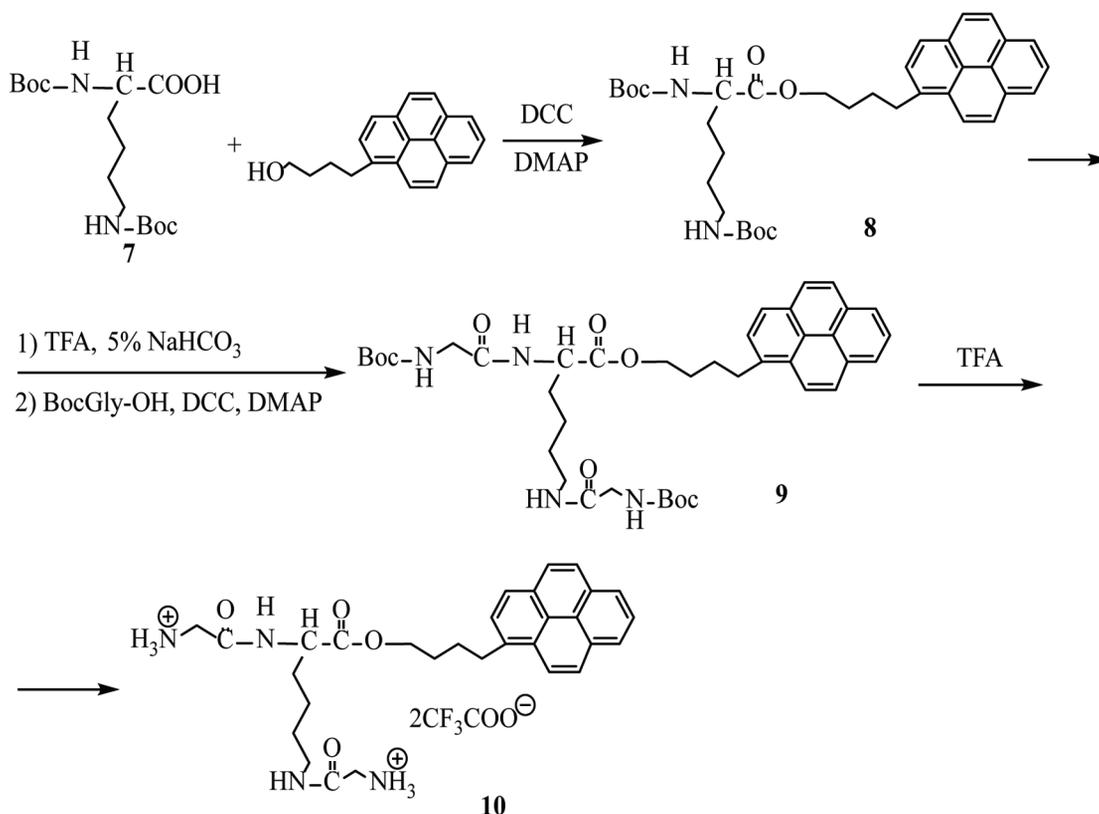
[25]. Гидрофильный домен целевого амфифила представлен двумя терминальными остатками D-галактозы в составе ациклического производного лактозы. Для визуализации процессов проникновения липосомальных систем в клетку-мишень синтезирован безуглеводный пиреновый аналог липотрипептида (схема 2).

### Синтез углеводного производного липотрипептида (N-лактитол-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub>

Схема 1 включает этерификацию L-лизина гексадециловым спиртом (2) в присутствии *n*-толуолсульфокислоты в качестве катализатора при повышенной температуре [26].

Для образования промежуточного продукта 4 к полученному гексадециловому эфиру L-лизина 2 добавляли *трет*-бутоксикарбонилглицин в присутствии DCC и NHS в качестве активаторов карбоксильной группы с последующим удалением Boc-защитных групп трифторуксусной кислотой. Получение конечного соединения 5 включало в себя реакцию липотрипептида 4 с лактозой в изопропиловом спирте с последующим восстановлением основания Шиффа боргидридом натрия в метаноле. Структура целевого продукта подтверждалась данными масс-спектрометрии.

Схема 2



### Синтез безуглеводного аналога липотрипептида с 1-пиренбутанолом

При получении флуоресцентно-меченного аналога синтезированного ранее липотрипептида вместо гидрофобного фрагмента  $C_{16}$  к защищенному  $\text{Woc-L-лизину}$  **7** присоединяли 1-пиренбутанол в присутствии DCC и DMAP (схема 2). Продукт **8** выделяли методом препаративной хроматографии в системе толуол – этилацетат (5:1, v/v) с выходом 68%. Удаление  $\text{Woc-защиты}$  проводили под действием трифторуксусной кислоты в хлороформе с последующей обработкой

гидрокарбонатом натрия. Синтез катионного амфифила **10** осуществляли путем взаимодействия  $\text{WocGly-OH}$  с пиреновым производным **9** с последующей обработкой TFA. Структура соединений подтверждена данными  $^1\text{H-ЯМР-}$  спектроскопии и масс-спектрометрии.

Целевые соединения использовали для создания двух вариантов липосомальных систем на основе соевого фосфатидилхолина (PC): один содержал синтезированное углеводное производное **5** (Lact) и его флуоресцентный аналог **10** (Pyr) в соотношении Lact : Pyr : PC, равном

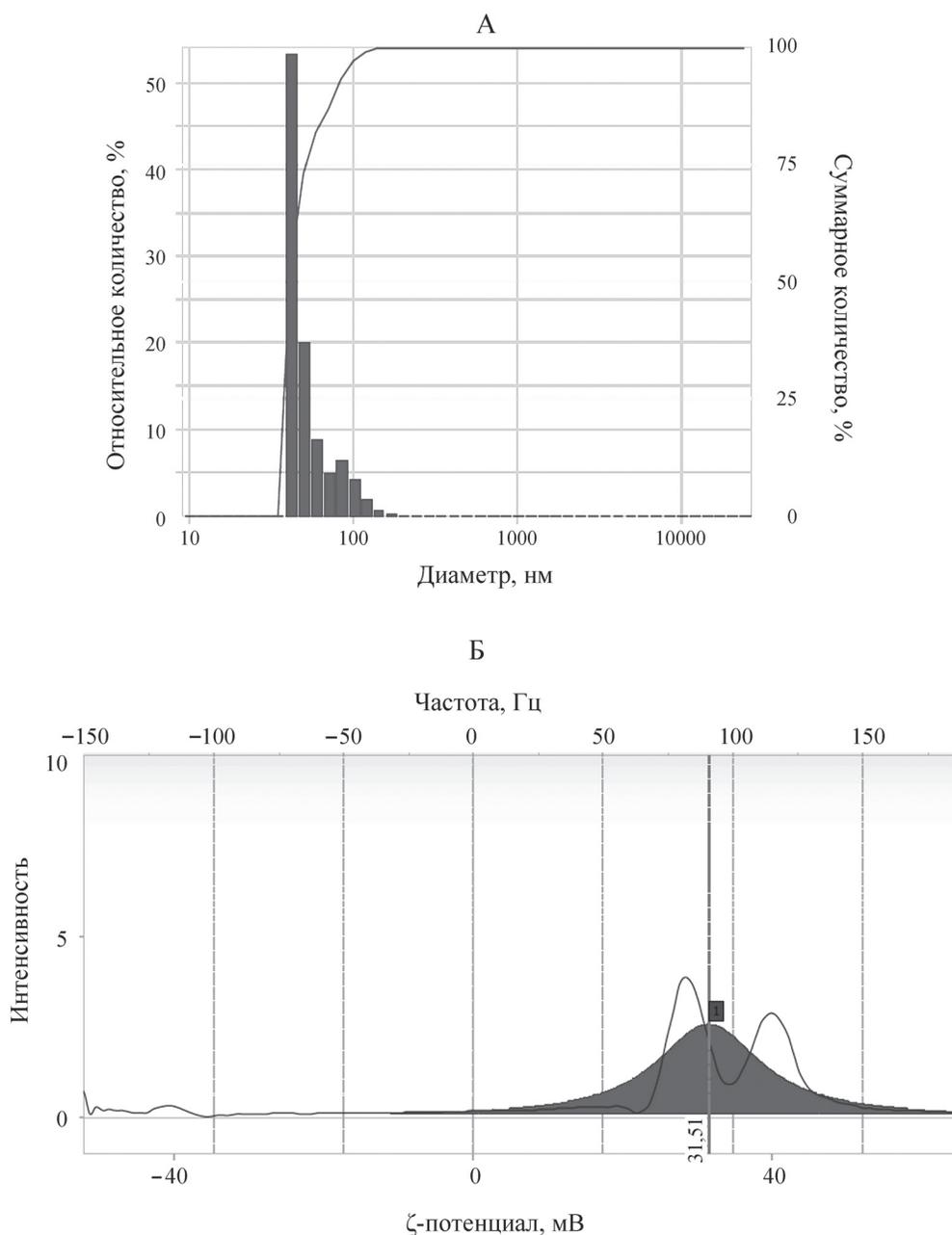


Рис. 1. Размер (А) и  $\zeta$ -потенциал (Б) частиц липосомальных дисперсий Lact – Pyr – PC в соотношении 20:10:70 (m/m, %)

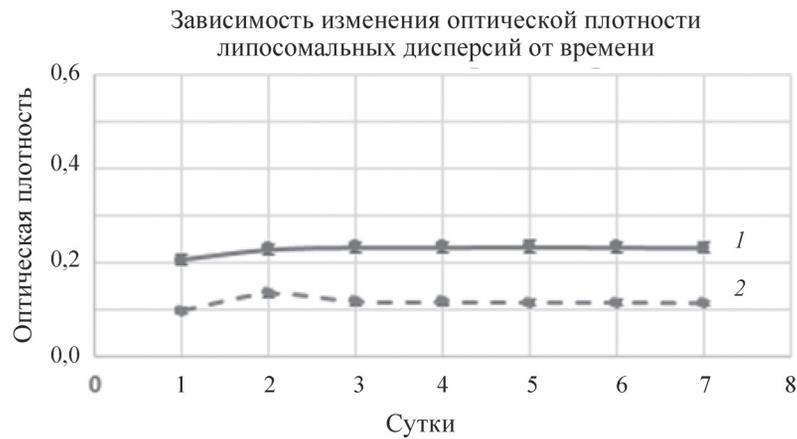


Рис. 2. Стабильность липосомальных дисперсий Chol-Pyr-PC (1) в соотношении 20:10:70 (*m/m, %*) и Lact-Pyr-PC (2) в соотношении 20:10:70 (*m/m, %*)

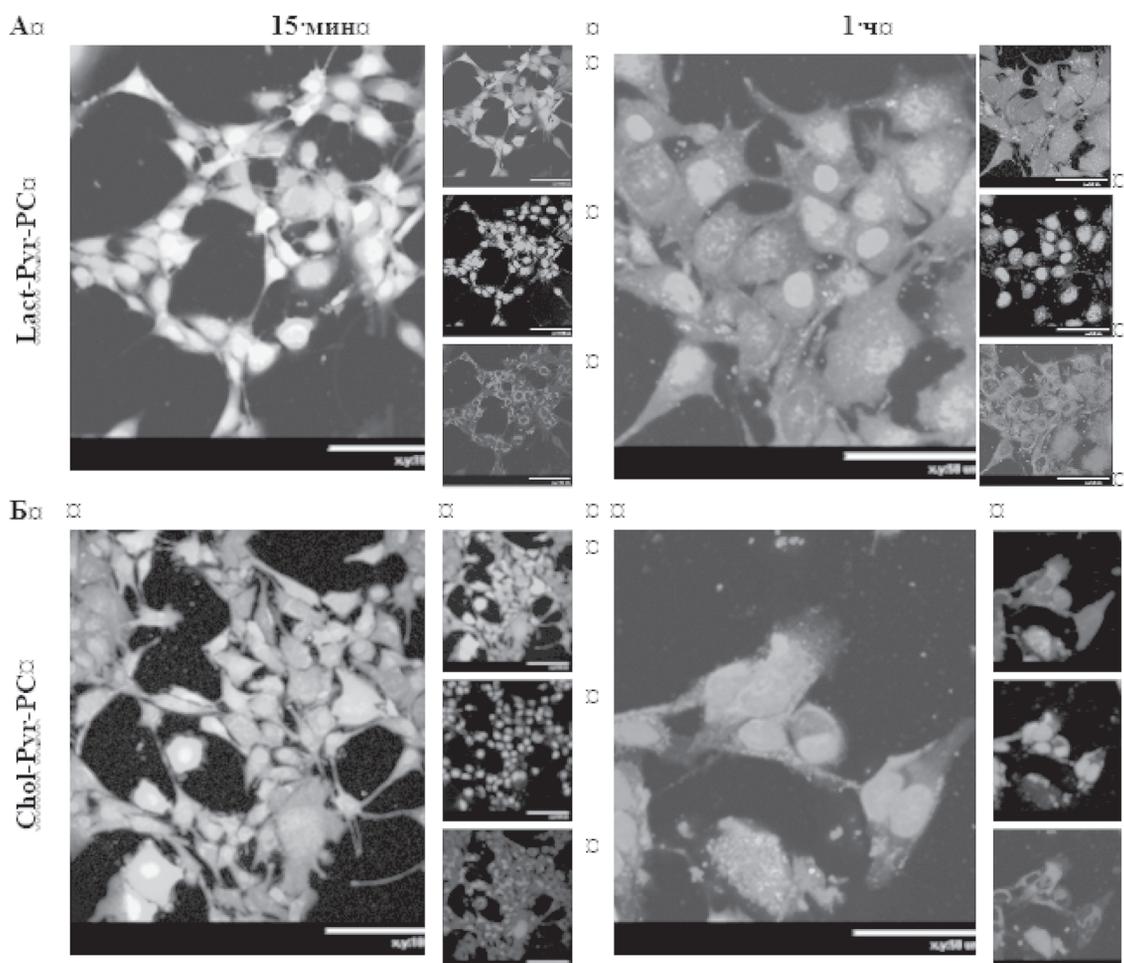


Рис. 3. Накопление и локализация фосфатидилхолиновых липосомальных дисперсий Lact-Pyr-PC (А) и Pyr-PC (Б) в монослойной культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 после 15 мин и 1 ч инкубации. Отдельно прокрашенные элементы справа: цитоплазма клеток (calcein AM) – сверху, ядра клеток (propidium iodide) – в центре, липосомы (pyrene) – снизу. Конфокальная микроскопия *in vitro*. Размерная шкала для 15 мин – 100 мкм, для 1 ч – 50 мкм

20:10:70 (*m/m*, %), другой вариант вместо амфифила **5** включал холестерин (Chol) в соотношении Chol : Prg : PC, равном 20:10:70 (*m/m*, %).

Размер является одной из основных характеристик липосомальных структур. Частицы с размером в диапазоне 50–200 нм могут использоваться в качестве транспортных систем направленной доставки лекарственных веществ в клетки. Размер частиц был определен с помощью фотонно-корреляционной спектроскопии (рис. 1, А).

Средний размер частиц полученных агрегатов (А) составил 54,5 нм, что соответствует предъявляемым требованиям для транспортных липосом. Определено значение  $\zeta$ -потенциала для липосомальных дисперсий, равное 31,51 мВ (рис. 1, Б). Этот показатель служит одним из факторов устойчивости дисперсных систем в водной среде. Известно, что наличие заряда на поверхности частиц препятствует их агрегации за счет электростатического отталкивания. Значения  $\zeta$ -потенциала, лежащие в диапазоне 30–50 мВ характеризуют коллоидную систему как стабильную.

Полученные дисперсии сохраняли стабильность в течение семи суток, при этом изменение оптической плотности наблюдалось в диапазоне менее 5% (рис. 2).

Исследование эффективности накопления и внутриклеточной локализации липосомальных дисперсий было проведено с помощью конфокальной микроскопии на клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (рис. 3). Показано, что уже через 15 мин инкубации оба варианта липосом начинают накапливаться внутри клеток, причем вариант Lact–Prg–PC локализуется во всем внутриклеточном пространстве, тогда как вариант Prg–PC формирует крупные скопления, пре-

имущественно вокруг ядер. При этом после 1 ч инкубации число поглощенных клетками частиц существенно возрастает для обоих образцов, о чем свидетельствует более интенсивная флуоресценция пирена в этой временной точке. Следует отметить, что после 1 ч инкубации локализация образцов одинакова (Lact–Prg–PC и Prg–PC равномерно распределены во всем внутриклеточном объеме, кроме ядер клеток). Можно предположить, что Lact–Prg–PC и Prg–PC накапливаются в клетках с приблизительно одинаковой эффективностью, поскольку для обеих временных точек интенсивность их флуоресценции совпадает.

### Заключение

Таким образом, синтезированы углеводное производное липотрипептида (N-лактитол-Gly)<sub>2</sub>-LysC<sub>16</sub> нерегулярного строения с двумя терминальными остатками D-галактозы, разветвляющим звеном на основе алифатического L-лизина и его безуглеводный аналог с 1-пиренбутанолом в качестве флуоресцентной метки в гидрофобном фрагменте. С помощью конфокальной микроскопии *in vitro* продемонстрирована возможность использования флуоресцентно-меченого бис-трифторацетата N<sup>α</sup>, N<sup>ε</sup>-бис(глицил)-O-1-пиренбутил-L-лизина для визуализации процессов проникновения модифицированных липосом в клетки-мишени. На модели клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 оценена эффективность накопления и внутриклеточной локализации липосомальных дисперсий на основе синтезированных соединений. Углеводсодержащие меченые липосомы распределяются во всем внутриклеточном пространстве клеток уже через 15 мин, что подтверждается высокой интенсивностью их флуоресценции.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gauthier L., Chevallet M., Bulteau F., Thépaut M., Delangle P., Fieschi F., Vivès C., Texier I., Deniaud A., Gateau C. // *J. Drug Target*. 2021. Vol. 29. N 1. P. 99 (DOI: 10.1080/1061186X.2020.1806286).
2. Zhang T., Li G., Li S., Wang Z., He D., Wang Y., Zhang J., Li J., Bai Z., Zhang Q., Liu B., Zhao Q., Liu Y., Zhang H. // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019. Vol. 182. P. 110397 (DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110397).
3. Li Y.L., Zhu X. M., Liang H., Orvig C., Chen Z.F. // *Curr. Med. Chem*. 2021. Vol. 28. N 8. P. 1508 (DOI: 10.2174/0929867327666200505085756).
4. Cordeiro R., Carvalho A., Durães L., Faneca H. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. Vol. 23. N 11. P. 6243 (DOI: 10.3390/ijms23116243).
5. Wang H., Ellipilli S., Lee W.J., Li X., Vieweger M., Ho Y.S., Guo P. // *J. Control Release*. 2021. Vol. 330. P. 173 (DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.12.007).
6. Sharma V.K., Osborn M.F., Hassler M.R., Echeverria D., Ly S., Ulashchik E.A., Martynenko-Makaev Y.V., Shmanai V.V., Zatsepin T.S., Khvorova A., Watts J.K. // *Bioconjug Chem*. 2018. Vol. 29. N 7. P. 2478 (DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00365).
7. Petrov R.A., Maklakova S.Y., Ivanenkov Y.A., Petrov S.A., Sergeeva O.V., Yamansarov E.Y., Saltyko-

- va I.V., Kireev I.I., Alieva I.B., Deyneka E.V., Sofronova A.A., Aladinskaia A.V., Trofimenko A.V., Yamidanov R.S., Kovalev S.V., Kotelianski V.E., Zatssepin T.S., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. // *Bioorg Med. Chem. Lett.* 2018. Vol. 28. N 3. P. 382 (DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.12.032).
8. Reshitko G.S., Yamansarov E.Y., Evteev S.A., Lopatukhina E.V., Shkil' D.O., Saltykova I.V., Lopukhov A.V., Kovalev S.V., Lobov A.N., Kislyakov I.V., Burenina O.Y., Klyachko N.L., Garanina A.S., Dontsova O.A., Ivanenkov Y.A., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. // *Bioconjug Chem.* 2020. Vol. 31. N 5. P. 1313 (DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00202).
9. Warriar D.U., Dhanabalan A.K., Krishnasamy G., Kolge H., Ghormade V., Gupta C.R., Ambre P.K., Shinde U.A. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. Vol. 207. P. 683 (DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.176).
10. Naidoo S., Daniels A., Habib S., Singh M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. N 3. P. 1492 (DOI: 10.3390/ijms23031492).
11. Ahmed I.S., Rashed H.M., Fayez H., Farouk F., Shamma R.N. // *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12. N 2. P. 107 (DOI: 10.3390/pharmaceutics12020107).
12. Li T., Yu P., Chen Y., Sun B., Dong P., Zhu T., Meng X. // *Eur J Med Chem.* 2021. Vol. 222. P. 113605 (DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113605).
13. Petrov R.A., Mefedova S.R., Yamansarov E.Y., Maklakova S.Y., Grishin D.A., Lopatukhina E.V., Burenina O.Y., Lopukhov A.V., Kovalev S.V., Timchenko Y.V., Ondar E.E., Ivanenkov Y.A., Evteev S.A., Vaneev A.N., Timoshenko R.V., Klyachko N.L., Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Beloglazkina E.K., Majouga A.G. // *Mol. Pharm.* 2021. Vol. 18. N 1. P. 461 (DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00980).
14. Nair A.B., Shah J., Al-Dhubiab B.E., Patel S.S., Morsy M.A., Patel V., Chavda V., Jacob S., Sreeharsha N., Shinu P., Attimarad M., Venugopala K.N. // *Molecules*. 2019. Vol. 24. N 24. P. 4566 (DOI: 10.3390/molecules24244566).
15. Sun R., Fang L., Lv X., Fang J., Wang Y., Chen D., Wang L., Chen J., Qi Y., Tang Z., Zhang J., Tian Y. // *Drug Deliv.* 2021. Vol. 28. N 1. P. 2071-2084 (DOI: 10.1080/10717544.2021.1983077).
16. Yousef S., Alsaab H.O., Sau S., Iyer A.K. // *Heliyon*. 2018. Vol. 4. N 12. P. 1071 (DOI:10.1016/j.heliyon.2018.e01071).
17. Debacker A.J., Voutila J., Catley M., Blakey D., Habib N. // *Mol. Ther.* 2020. Vol. 28. N 8. P. 1759 (DOI:10.1016/j.ymthe.2020.06.015).
18. Thangamani L., Balasubramanian B., Easwaran M., Natarajan J., Pushparaj K., Meyyazhagan A., Piramanayagam S. // *Pharmacol Res.* 2021. Vol. 173. P. 1058 (DOI:10.1016/j.phrs.2021.105864Z).
19. Holland R.J., Lam K., Ye X., Martin A.D., Wood M.C., Palmer L., Fraser D., McClintock K., Majeski S., Jarosz A., Lee A.C.H., Thi E.P., Judge A., Heyes J. // *Mol. Ther.* 2021. Vol. 29. N 10. P. 2910 (DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.06.002).
20. Nie H., Liu X.M., Yang Q.X., Luo X.D., Zhao Y., Zhang S.Y. // *Int. J. Pharm.* 2022. Vol. 624. P. 1219 (DOI:10.1016/j.ijpharm.2022.121967).
21. Dhawan V., Joshi G., Sutariya B., Shah J., Ashtikar M., Nagarsekar K., Steiniger F., Lokras A., Fahr A., Krishnapriya M., Warawdekar U., Saraf M., Nagarsenker M. // *Carbohydr Res.* 2021. Vol. 509. P. 1084 (DOI: 10.1016/j.carres.2021.108417).
22. Yin J., Wang Z., Zhao F., Yang H., Li M., Yang Y. *Mol. Biomol. Spectrosc.* 2020. Vol. 239. P. 1184 (DOI: 10.1016/j.saa.2020.118470).
23. Shellaiah M., Sun K.W. *Pyrene-Based AIE Active Materials for Bioimaging and Theranostics Applications. Biosensors (Basel)*. 2022. Vol. 12. N 7. P. 550 (DOI: 10.3390/bios12070550).
24. Perez-Anes, A., Mazères, S., Caminade, A.-M., Blanzat, M., & Turrin, C.O. 2015. Vol. 56. N 1. P. 1566 (DOI:10.1016/j.tetlet.2015.02.011).
25. Denieva Z.G., Romanova N.A., Bodrova T.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2019. T. 74. № 6. P. 300 (DOI:10.3103/S0027131419060087).
26. Gleue L., Schupp J., Zimmer N., Becker E., Frey H., Tuettenberg A., Helm M. // *Cells*. 2020. Vol. 9. N 10. P. 2213. (DOI: 10.3390/cells9102213).
27. Denieva Z.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. // *Mendelev Commun.* 2021. Vol. 31. P. 509 (DOI: 10.1016/j.mencom.2021.07.024).

### Информация об авторах

Афанасьева Ксения Александровна – магистр кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, РТУ МИРЭА (с-221@yandex.ru);

Гилева Анастасия Михайловна – мл. науч. сотр. лаборатории биомедицинских материалов института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (с-221@yandex.ru);

Марквичева Елена Арнольдовна – гл. науч. сотр., руководитель лаборатории биомедицинских материалов института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, докт. хим. наук (c-221@yandex.ru);

Буданова Ульяна Александровна – доцент кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, РТУ МИРЭА, канд. хим. наук (c-221@yandex.ru);

Себякин Юрий Львович – профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, РТУ МИРЭА, профессор, докт. хим. наук (c-221@yandex.ru).

#### **Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

#### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 05.01.2023;  
одобрена после рецензирования 10.02.2023;  
принята к публикации 15.02.2023.