

Х. І. Гаргай, В. А. Дончак, Л. М. Ріпак, С. А. Воронов
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра органічної хімії

ПОХІДНІ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ ДЛЯ МОДИФІКАЦІЇ ПОВЕРХНІ ЛІПОСОМ

© Гаргай Х. І., Дончак В. А., Ріпак Л. М., Воронов С.А., 2015

Взаємодією фолієвої кислоти зі спиртами за реакцією Стегліха (у присутності дициклогексилкарбодііміду) або з епоксипероксидами (у присутності каталізатора – четвертинної алкілариламонієвої солі або твердого лугу) одержано нові органорозчинні естери фолієвої кислоти, які містять як гідрофобні, так і гідрофільні фрагменти або пероксидні функційні групи. Синтезовані сполуки охарактеризовані ІЧ і ^1H ПМР спектроскопією та аналізом на вміст функційних груп. Пероксидні похідні фолієвої кислоти здатні іммобілізуватися на поверхні штучних ліпосом за рахунок реакції передачі ланцюга і в такий спосіб слугувати векторами для доставки цих ліпосом у клітини органу-мішені.

Ключові слова: фолієва кислота, естери фолієвої кислоти, пероксиди, ліпосоми, системи доставки ліків в орган-мішень.

New well soluble esters of folic acid containing both hydrophobic and hydrophilic fragments as well as peroxide groups were synthesized by Steglich reaction (at the presence N,N^1 -dicyclohexylcarbodiimide) or by interaction of folic acid with epoxyperoxides (at the presence of a catalyst - quaternary alkylarylammonium salt or solid alkali). Synthesized substances were characterized by IR, ^1H NMR spectroscopy as well as functional analysis. The peroxide derivatives of folic acid are capable to immobilize on the liposome's surface due chain transfer reaction and thus to serve as vectors for delivery of these liposomes into the targeted cells.

Key words: folic acid, folic esters, peroxides, liposome, target drug delivery systems.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень і публікацій. Обнадійливі перспективи в розвитку новітніх засобів цілеспрямованої доставки ліків у орган-мішень сьогодні пов'язані зі створенням штучних ліпосом [1]. Вони здатні не тільки інкапсулювати достатньо велику кількість молекул лікарських препаратів, але й захистити їх від швидкої фільтрації в нирках і руйнування протеазами, естеразами та іншими ферментами, підвищуючи тим самим час перебування препаратів в організмі людини. Після потрапляння в клітини-мішені ліпосоми сприяють цитоплазматичному вивільненню інкапсульованої лікарської субстанції через злиття з клітинною мембраною [1]. Однак, широке використання ліпосом як носіїв лікарських засобів обмежене через те, що вони не можуть перебувати у кровообігу тривалий час і видаляються макрофагами ретикулоендотеліальної системи протягом декількох годин після введення [2]. Не менш серйозним обмеженням є також часте непотрапляння ліпосом в орган-мішень.

Ефективно скерувати ліпосоми у клітини органу-мішені можна іммобілізацією на їх поверхні відповідного вектора [3]. Для реалізації цієї стратегії можливе використання антитіл, факторів росту або цитокінів тощо [4]. Ефективним вектором є фолієва кислота, яка може слугувати полегшенню проникнення лікарських препаратів [5, 6], антитіл [7], макромолекул [8, 9] або ліпосом [10–12] у клітини-мішені.

Фолієва кислота (фолат) бере участь як кофактор у великій кількості важливих клітинних реакцій, а також критично необхідна у процесі ділення клітин, оскільки бере участь у синтезі ДНК [13, 14]. Ракові клітини зазвичай потребують більше фолієвої кислоти, ніж нормальні. Для задоволення потреби у фолієвої кислоті деякі типи ракових клітин містять на своїй поверхні велику кількість фолат-рецепторів. Фолієва кислота входить у клітину теж через рецептор – посередник ендцитозу [15–19]. Використовуючи ці особливості, можна скеровувати ліпосоми з фрагментами фолієвої кислоти на поверхні безпосередньо до клітин ракових пухлин.

Так, ковалентне прищеплення фолієвої кислоти до поверхні ліпосом через ПЕГ спейсер спричиняє їх енергійне поглинання клітинами лінії KB (лінія клітин людського раку носоглотки) [17, 20, 21]. Водночас фолієва кислота погано розчиняється у воді та в більшості органічних розчинників, що значно утруднює її використання.

Мета роботи – розроблення методів синтезу органорозчинних похідних фолієвої кислоти; розроблення методів синтезу пероксидних похідних фолієвої кислоти для прищеплення до поверхні штучних ліпосом через реакцію передачі ланцюга.

Експериментальна частина. Фолієва кислота (Aldrich, Cat. № F7876).

Дициклогексилкарбодіїмід (DCC) (Aldrich, Cat. № 538-75-0).

Епіхлоргідрин (ЕХГ) (Aldrich, Cat. № E1055).

Триетилбензиламоній хлорид (ТЕБАХ) (Aldrich, Cat. № 284556).

Монометилловий етер полі етиленгліколю ($M_w=550$, Aldrich, Cat. № 20,248-7).

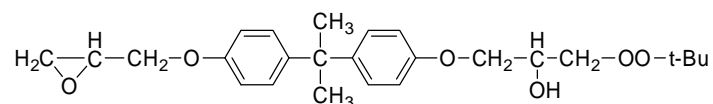
2-Етилгексанол очищували перегонкою при атмосферному тиску. $T_{\text{кип.}}=186$ °С (літ. 183,5), $n_d^{20}=1,4320$ (літ. 1, 4315 [22]).

Розчинники очищували за методиками [23].

Трет-бутилгідропероксид (ТБГП) одержували алкілюванням гідроген пероксиду трет-бутиловим спиртом у присутності концентрованої сульфатної кислоти за методикою [24], фракціонували на дефлегматорі ($T_{\text{кип.}}=32$ °С/1,6 кПа). Характеристики: $n_d^{20}=1,3998$ (літ. 1,4010), $O_{\text{акт.}}=18,1$ % (обчисл. 17,7).

1,2-Епокси (3-трет-бутилперокси) пропан одержували при взаємодії ТБГП та ЕХГ за методикою: 22,5 г (0,25 моль) ТБГП та 23,1 г (0,25 моль) ЕХГ завантажували в реактор. При перемішуванні за 15 °С прикапували 40 % водний розчин NaOH (11 г (0,25 моль) NaOH), слідкуючи, щоб температура в реакційній масі не перевищувала 35 °С. З часом реакційна маса ставала в'язкою, тому додавали 5 мл води. Реакційну масу перемішували 1 год за 35 °С. Після цього додавали ще 25 мл води, щоб розчинити осад NaCl, який утворюється у процесі реакції. Верхній органічний шар відділяли, додавали до нього 10 мл гексану та промивали 5–7 разів водою до нейтральної реакції промивних вод. Додавали 10 мл толуену та фракціонували на дефлегматорі ($T_{\text{кип.}}=37$ °С/0,3 кПа). Характеристики: $n_d^{20}=1,4190$ (літ. 1,4080), $O_{\text{акт.}}=11,3$ % (обчисл. 10,95).

Пероксидний олігомер (ПО) формули:



був люб'язно наданий проф. Братичаком М. М. ($M_n=424$ г/моль; Е.Ч.=11,0 %; $O_{\text{акт.}}=2,9$ %).

2-Етилгексилфоліат (1) одержували за методикою: до реактора завантажували 0,5 г (0,0011 моль) фолієвої кислоти, 15 мл диметилсульфоксиду (ДМСО) та 0,31 г (0,004 моль) піридину і перемішували за 20 °С протягом 1 год. Додавали 0,29 г (0,0022 моль) 2-етилгексанолу та 0,5 г (0,0023 моль) DCC. Реакційну масу охолоджували до 5 °С та витримували 1 хв. Після цього за 20 °С перемішували 11 год. Відфільтровували осад, а з фільтрату відганяли розчинник у вакуумі за 80 °С. Продукт промивали діетиловим етером (ДЕЕ) і сушили у вакуумі. Вихід: 0,56 г (90 %). Характеристики: К.Ч.=99,3 мг КОН/г (обчисл. 101,4).

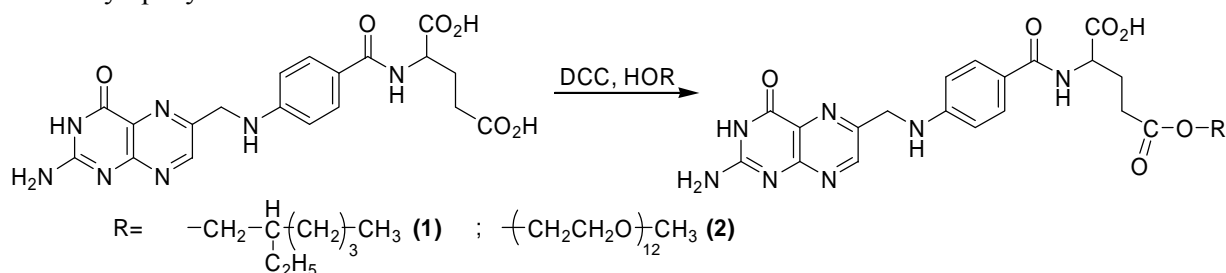
Естер фолієвої кислоти та монометилового етеру поліетиленгліколю (2) одержували за методикою: у реактор завантажували 0,5 г (0,0011 моль) фолієвої кислоти, 15 мл ДМСО та 0,17 г (0,0017 моль) ТЕА і перемішували за 20 °С протягом 1 год. Додавали 1,21 г (0,0022 моль) монометилового етеру поліетиленгліколю ($M_w=550$) та 0,5 г (0,0023 моль) DCC. Реакційну масу охолоджували до 5 °С та витримували 1 хв. Після цього за 20 °С перемішували 11 год. Відфільтровували осад, а з фільтрату відганяли розчинник у вакуумі за 80 °С. Продукт промивали ДЕЕ і сушили у вакуумі. Вихід: 1 г (91 %). Характеристики: К.Ч.=56,6 мг КОН/г (обчисл. 57,6).

2-Гідрокси-3-трет-бутилпероксипропілфоліат (3) одержували за методикою: у реактор завантажували 0,3 г (0,002 моль) 1,2-епокси (3-трет-бутилпероксипропану), 0,1 г (0,00044 моль) ТЕБАХ і розчиняли в 10 мл ДМСО, нагрівали до 50–55 °С та прикапували розчин 0,7 г (0,0016 моль) фолієвої кислоти в 20 мл ДМСО. Реакційну масу за 50 °С перемішували 20 год. Продукт висаджували 50 мл ацетону та відділяли на центрифугі, після чого осад двічі промивали CH_2Cl_2 та знову центрифугували. Сушили у вакуумі за 50 °С. Вихід: 0,9 г (90 %). Характеристики: К.Ч.=115,0 мг КОН/г (обчисл. 95,6), $O_{акт.}=2,2\%$ (обчисл. 2,7).

ПО-фоліат (4) одержували за методикою: у реактор завантажували 0,51 г (0,0012 моль) ПО, 0,08 г (0,00035 моль) ТЕБАХ і розчиняли в 10 мл ДМСО, нагрівали до 50–55 °С та прикапували розчин 0,5 г (0,0011 моль) фолієвої кислоти в 15 мл ДМСО. Реакційну масу за 50–55 °С перемішували 25 год. Продукт висаджували 50 мл ацетону та відділяли на центрифугі, після чого осад двічі промивали CH_2Cl_2 та знову центрифугували. Сушили у вакуумі за 50 °С. Вихід: 0,8 г (80 %). Характеристики: К.Ч.=90,4 мг КОН/г (обчисл. 64,9), $O_{акт.}=1,5\%$ (обчисл. 1,8).

Методики аналізів. Кислотне число (К.Ч.) визначали титруванням розчину продукту 0,1н КОН за методикою [25]. Активний кисень ($O_{акт.}$) визначали йодометрично за методикою [26]. ІЧ спектри записували на спектрофотометрі “Specord M-80”, зразки розтирали у вазеліновому маслі і наносили на призму з КВг. 1H NMR спектри записували для розчину зразка в DMSO-D6 на спектрофотометрі “Bruker AC-F” (300 MHz) відносно внутрішнього стандарту TMS.

Результати та їх обговорення. Фолієва кислота, як і більшість її похідних, погано розчиняються у воді і більшості органічних розчинників. З метою усунення цього недоліку розроблено методику синтезу та одержано зразки естерів фолієвої кислоти, що містять як гідрофобні, так і гідрофільні фрагменти, взаємодією фолієвої кислоти зі спиртами за реакцією Стегліха у присутності DCC за схемою:



Одержані сполуки охарактеризовано ІЧ спектроскопією та аналізом на вміст функційних груп (див. табл. 1).

Таблиця 1

Характеристики естерів фолієвої кислоти

№	Зовнішній вигляд	T _{топл.} , °С	Знайдено/обчислено			
			С, %	Н, %	Н, %	К.Ч., мг КОН/г
1	Оранжевий порошок	Розкл.	58,4/58,6	6,2/6,32	17,5/17,72	99,3/101,4
2	Оранжевий порошок	Розкл.	-	-	-	56,6/57,6

Як видно з рис. 1, зв'язки N–H у продукті (2) проявляються при 3500–3300 cm^{-1} та при 1650–1550 cm^{-1} , зв'язки C=C та C=N при 1528 cm^{-1} . Карбонільна група в естерних фрагментах

проявляється у вигляді смуги поглинання при 1728 см^{-1} , а в карбоксильній групі – при 1700 см^{-1} . Зв'язки С–О–С в естерних фрагментах проявляються інтенсивними смугами поглинання при 1088 см^{-1} .

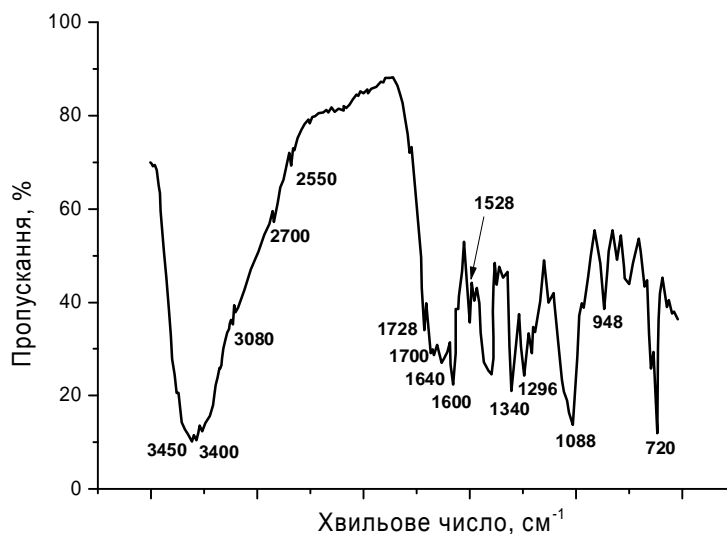
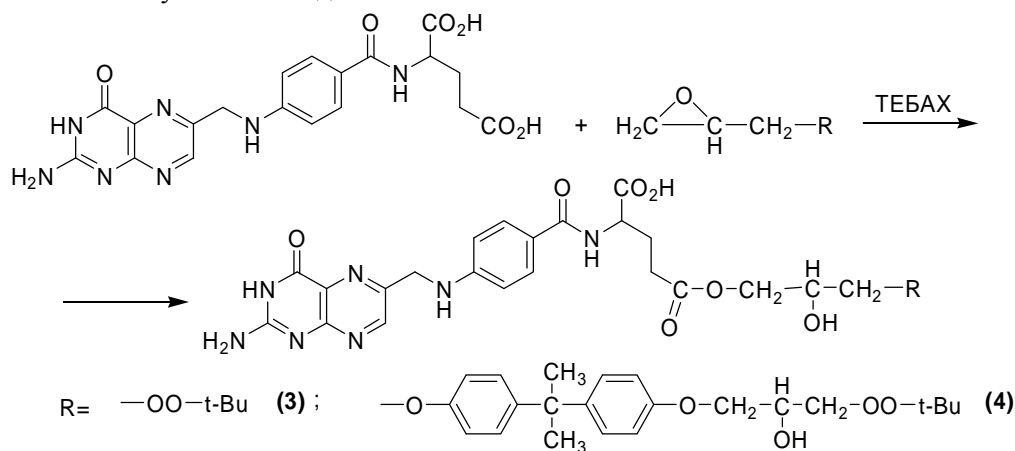


Рис. 1. ІЧ спектр естеру фолієвої кислоти на основі монометилового етеру поліетиленгліколю (2)

Іншим шляхом введення фрагментів фолієвої кислоти в полімерні носії є використання її пероксидних похідних. Для синтезу таких ініціаторів було використано реакцію взаємодії карбоксильних груп фолієвої кислоти з епоксидними циклами функційних пероксидів. Реакції одержання таких сполук можна подати схемою:



Процес проводили в ДМСО у присутності каталізатора – четвертинної алкілариламонієвої солі або твердого луку. Встановлено, що кращих виходів цільового продукту досягають за мольного співвідношення фолієвої кислоти та епоксипероксиду 1:1,2 у присутності ТЕБАХ за температури $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Час процесу 20–25 год.

Одержані сполуки охарактеризовані ІЧ, ПМР спектроскопією та аналізом на вміст функційних груп (див. табл. 2).

Таблиця 2

Характеристики пероксидованих похідних фолієвої кислоти

№	Зовнішній вигляд	T _{топл.} , °C	Знайдено/обчислено				
			С, %	Н, %	Н, %	К.Ч., мг КОН/г	O _{акт.} , %
3	Оранжевий порошок	Розкл.	52,9/53,15	5,5/5,62	17,2/16,69	115/95,6	2,2/2,7
4	Оранжевий порошок	Розкл.	59,4/60,6	5,9/6,08	12,3/11,25	90/64,4	1,5/1,8

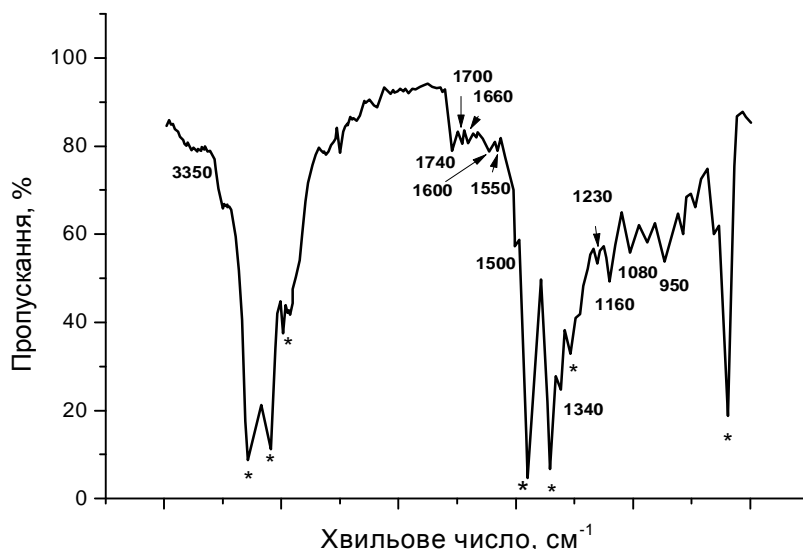


Рис. 2. ІЧ спектр 2-гідрокси-3-*трет*-бутилпероксипропілфоліату (3)

У ІЧ спектрі 2-гідрокси-3-*трет*-бутилпероксипропілфоліату (3) (рис. 2) можна спостерігати інтенсивні смуги поглинання, які відповідають валентним коливанням карбонільної групи в естерному фрагменті при 1740 см^{-1} , в карбоксильній групі при 1700 см^{-1} , в С (O)–NH– при 1660 см^{-1} . Зв'язки С–O–С в естерних фрагментах проявляються інтенсивними смугами поглинання при 1160 та 1230 см^{-1} . Валентні коливання ОН групи проявляються при 3350 см^{-1} , а зв'язок С–O у вторинній гідроксильній групі проявляється смугою поглинання при 1080 см^{-1} . Наявність –O–O– зв'язку підтверджується інтенсивною смугою поглинання *трет*-бутоксигрупи ОС (CH₃)₃ при 950 см^{-1} . Про наявність ароматичного кільця свідчать смуги поглинання при 1600 та 1500 см^{-1} . Аміногрупи в фрагменті фолієвої кислоти проявляються групою смуг, а саме: ароматичний амін – при 1340 см^{-1} та вторинний амін – при 1550 см^{-1} .

У ¹H NMR спектрі 2-гідрокси-3-*трет*-бутилпероксипропілфоліату (3) протони фрагмента фолієвої кислоти проявляються у вигляді характеристичної серії сигналів в області $1.87\text{--}7.33\text{ ppm}$ (18H). Протони в *трет*-бутильному фрагменті (9H, (CH₃)₃C) дають сигнал при 1.24 ppm .

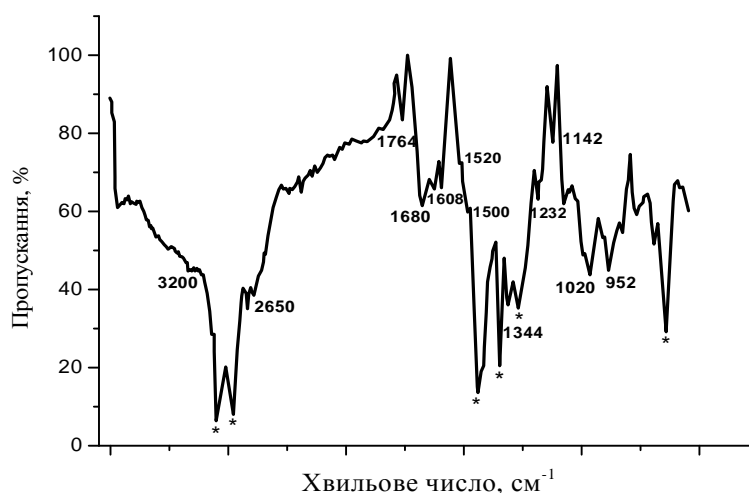


Рис. 3. ІЧ спектр ПО-фоліату (4)

Як видно з рис. 3, у спектрі ПО-фоліату (4) можна спостерігати інтенсивні смуги поглинання, які відповідають валентним коливанням карбонільної групи в естерному фрагменті при 1764 см^{-1} , в карбоксильній групі при 1680 см^{-1} та в С (O)–NH– при 1640 см^{-1} . Про наявність ароматичного кільця свідчать смуги поглинання при 1608 , 1500 та 1460 см^{-1} . Зв'язки С–O–С в естерних фрагментах

проявляються інтенсивними смугами поглинання при 1125 та 1232 cm^{-1} . Валентні коливання зв'язку С–О в гідроксильній групі проявляються смугою поглинання при 1020 cm^{-1} . Наявність –О–О– зв'язку підтверджується інтенсивною смугою поглинання *трет*-бутоксигрупи ОС (CH₃)₃ при 952 cm^{-1} . Аміногрупи в фрагменті фолієвої кислоти проявляються групою смуг, а саме: ароматичний амін – при 1344 cm^{-1} та вторинний амін – при 1520 cm^{-1} .

Одержані продукти значно краще розчинні в ацетоні, ДМСО, метилетилкетоні, диметилформаміді, ніж вихідна фолієва кислота.

Висновки. Розроблено методи синтезу та синтезовано нові органорозчинні похідні фолієвої кислоти та пероксидні похідні, які здатні іммобілізуватися на поверхні штучних ліпосом за рахунок реакції передачі ланцюга і в такий спосіб слугувати векторами для доставки цих ліпосом в організми.

1. Litzinger D. C., Huang L. *Phosphatidylethanolamine liposomes: Drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – 1113(2). – P. 201–227.
2. Papahajopoulos D., Allen T. M., Gabizon A., Mayhew E., Matthey K., Huang S. K., Lee K.-D., Woodle M. C., Lasic D. D., Redemann C., Martin F. J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1991. – 88(24). – P. 11460–11464.
3. Leserman L. D., Weinstein J. N., Blumenthal R., Terry W. D. *Receptor-mediated endocytosis of antibody-opsonized liposomes by tumor cells* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1980. – 77(7). – P. 4089–4093.
4. Duncan R., Connors T. *Drug targeting in cancer therapy* // *J. Drug Targeting.* – 1996. – 3. – P. 317–410.
5. Ladino C. A., Chari R. V., Bourret L. A., Kedersha N. L., Goldmacher V. S. *Folate-maytansinoids: target-selective drugs of low molecular weight* // *Int. J. Cancer.* – 1997. – 73(6). – P. 859–864.
6. Sudimack J., Lee R. J. *Targeted drug delivery via the folate receptor* // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2000. – 41(2). – P. 147–162.
7. Coney L. R., Tomasetti A., Carayannopoulos L., Frasca V., Kamen B. A., Colnaghi M. L., Zurawski V. R. Jr. *Cloning of a tumor-associated antigen: MOv18 and MOv19 antibodies recognize a folate-binding protein* // *Cancer Res.* – 1991. – 51. – P. 6125–6132.
8. Mislick K. A., Baldeschwieler J. D., Kayyem J. F., Meade T. J. *Transfection of folate-polylysine DNA complexes: evidence for lysosomal delivery* // *Bioconjugate Chem.* – 1995. – 6(5). – P. 512–515.
9. Kono K., Liu M., Frechet, J. M. J. *Design of dendritic macromolecules containing folate or methotrexate residues* // *Bioconjugate Chem.* – 1999. – 10(6). – P. 1115–1121.
10. Gabizon A., Horowitz A. T., Goren D., Tzemach D., Mandelbaum-Shavit F., Qazen M. M., Zalipsky S. *Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly (ethylene glycol)-grafted liposomes: in-vitro studies* // *Bioconjugate Chem.* – 1999. – 10(2). – P. 289–298.
11. Anderson K. E., Stevenson B. R., Rogers J. A. *Folic acid-PEO-labeled liposomes to improve gastrointestinal absorption of encapsulated agents* // *J. Controlled Release.* – 1999. – 60. – P. 189–198.
12. Dube D., Francis M., Leroux J.-Ch., Winnik F. M. *Preparation and Tumor Cell Uptake of Poly (N-isopropylacrylamide) Folate Conjugates* // *Bioconjugate Chem.* – 2002. – 13(3). – P. 685–692.
13. Rosenblatt D. S. *Inherited disorders of folate transport and metabolism.* In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* – New York: McGraw-Hill, 1995. – P. 3111–3128.
14. Mudd S. H., Levy H. L., Skovby F. *Disorders of transsulfuration.* In: Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* – New York: McGraw-Hill, 1995. – P. 1279–1327.
15. Rothberg K. G., Ying Y., Kolhouse J. F., Kamen B. A., Anderson R. G. W. *The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated endocytic pathway* // *J. Cell. Biol.* – 1990. – 110(3). – P. 637–649.
16. Anderson R. G. W., Kamen B. A., Rothberg K. G. *Potocytosis sequestration and transport of small molecules* // *Science.* – 1992. – 255(5043). – P. 410–411.
17. Lee R. J., Low P. S. *Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis* // *J. Biol. Chem.* – 1994. – 269(5). – P. 3198–3204.
18. Wang S., Lee R. J., Mathias C. J., Green M. A., Low P. S. *Synthesis, purification, and tumor cell uptake of ⁶⁷Ga-desferoxamine-folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging* // *Bioconjugate Chem.* – 1996. – 7. – P. 56–62.
19. Wang S., Low P. S. *Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells* // *J. Controlled Release.* – 1998. – 53(1-3). – P. 39–48.
20. Lee R. J., Low P. S. *Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped*