

На правах рукописи

*П. Веремеева*

ВЕРЕМЕЕВА

Полина Николаевна

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 3,7-ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНА

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

МОСКВА - 2014

Работа выполнена в лаборатории органического синтеза кафедры органической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: кандидат химических наук,  
ведущий научный сотрудник

**Палюлин Владимир Александрович**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор химических наук, профессор,  
декан факультета химико-фармацевтических технологий

**Офицеров Евгений Николаевич**

(Российский химико-технологический  
университет имени Д.И. Менделеева);

доктор химических наук,  
ведущий научный сотрудник

**Формановский Андрей Альфредович**

(Институт биоорганической химии имени  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской Академии наук)

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Институт органической химии имени  
Н.Д. Зелинского Российской Академии наук

Защита диссертации состоится 21 мая 2014 г. в 11 часов в аудитории 446 на заседании Диссертационного совета Д.501.001.69 по присуждению ученой степени кандидата химических наук при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.3, МГУ, Химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета [www.chem.msu.ru](http://www.chem.msu.ru).

Автореферат разослан 21 апреля 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

Д.501.001.69 при МГУ имени М.В. Ломоносова,

доктор химических наук, профессор



Магдесиева Т.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Липосомальные системы доставки лекарств позволяют улучшить фармакокинетические и фармакодинамические профили терапевтической полезной нагрузки и обеспечивают более низкую системную токсичность по сравнению со свободным препаратом. Для повышения терапевтического воздействия инкапсулированного биологически активного вещества (БАВ) поверхность липосом модифицируют так, чтобы вытекание БАВ происходило в области его целевой доставки. Выход БАВ из липосом инициируют различными способами, например, изменением pH среды, комплексообразованием.

Одной из успешных стратегий обеспечения направленного разрушения липосом является встраивание в липидный бислой амфифильных соединений, способных изменять конформацию под действием внешних факторов (pH, комплексообразование) и тем самым вызывать изменения в структуре бислоя, образование в нем пор и, в конечном счете, его разрушение. Перспективными соединениями для модификации липосом, как нами показано в диссертационной работе, являются производные 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана.

К достоинствам 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов в качестве молекулярных переключателей можно отнести возможность построения целой шкалы pH-индуцированных конформационных переходов за счет разнообразия вводимых в каркас заместителей, а также управление разрушением липосом не только при протонировании, но и при комплексообразовании с ионами двухвалентных металлов.

Таким образом, представленное исследование является актуальным как в плане практического применения – создания средств адресной доставки лекарственных средств, так и в плане фундаментальных исследований, поскольку везикулы представляют собой модель для изучения клеточной мембраны, и исследование управляемых процессов, происходящих в липидном бислое, представляет большой научный интерес.

**Цель работы.** Целью настоящей работы являлся синтез липидоподобных амфифильных соединений на основе 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана, способных встраиваться в липосомальную мембрану, претерпевать конформационные перестройки при добавлении водного раствора соли двухвалентной меди и протонировании, тем самым повышая проницаемость липидного бислоя, что обеспечивает управляемое выделение веществ, находящихся во внутреннем объеме липосом.

**Научная новизна.** Впервые разработаны методы синтеза 3,7-диалкил- и 3,7-диацил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов, а также 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов с длинными алкильными заместителями при атомах азота и показана возможность их встраивания в липидный бислой. Найдено, что образование комплекса  $\text{Cu}^{2+}$  с 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами, встроенными в липидный бислой липосом, за счет изменения конформации 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-она оказывает влияние на упаковку липидов в бислой, резко повышая его проницаемость, тем самым приводя к высвобождению инкапсулированных веществ. Показано, что для липосом, модифицированных 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами и 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло-[3.3.1]нонан-9-онами с длинными алкильными заместителями при атомах азота, наблюдается при определенных значениях pH нарушение целостности липидного бислоя.

**Практическая значимость.** Синтезированные производные 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана с длинными липофильными заместителями могут выполнять роль «молекулярных переключателей», которые будучи встроенными в липидный бислой липосом, при его взаимодействии с ионами меди (II) и протонировании способны стимулировать быстрый выход водорастворимых соединений из липосомальных контейнеров.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы докладывались на Первой Российской конференции по медицинской химии (Москва, Россия, 2013), на Международной конференции “Frontiers in Chemistry” (Ереван, Армения, 2013), на кластере конференций по органической химии «Оргхим-2013» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), на Всероссийских конференциях с международным участием «Ломоносов 2010, 2011» (Москва, Россия), на Международных конференциях «Менделеев -2011, 2012» (Санкт-Петербург, Россия).

**Публикации.** Основное содержание работы опубликовано в виде 3 статей и 7 тезисов докладов на конференциях.

**Личный вклад автора.** Автор участвовал в постановке целей и задач настоящей работы и проведении физико-химических исследований синтезированных соединений. Автором самостоятельно спланированы и проведены синтезы целевых соединений, выполнены эксперименты по их встраиванию в липидный бислой липосом и управляемому его разрушению,

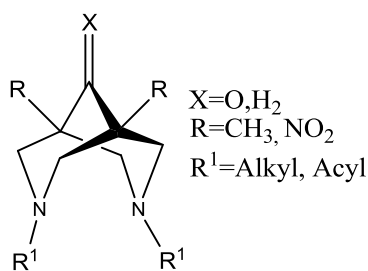
обобщены и интерпретированы полученные результаты, сформулированы выводы.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 136 наименований. Работа изложена на 122 страницах печатного текста и содержит 4 схемы, 19 рисунков, 6 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цели исследования и основные результаты, выносимые на защиту. В обзоре литературы обсуждается место 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов в современной научной литературе. В данной главе описаны различные подходы к синтезу производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов, их комплексообразующие свойства, обсуждается конформационный анализ 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов. Кроме того, в главе рассмотрены липосомы как системы направленной доставки лекарственных средств, а также некоторые свойства липосом. Глава обсуждение результатов посвящена ключевым результатам диссертационной работы, а именно обсуждению разработанных методик синтеза амфифильных производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана, встраиванию их в липосомы и управлению с их помощью проницаемостью липидного бислоя. В экспериментальной части описаны объекты и методы исследования, изложены экспериментальные результаты работы, приведены методики синтеза целевых соединений.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

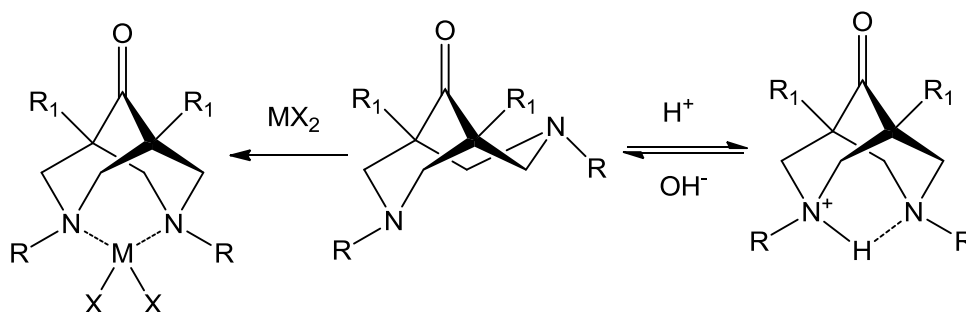
Настоящая работа посвящена синтезу и исследованию взаимодействия с липидными бислоями, построенными на основе фосфатидилхолина, липидоподобных амфифильных соединений, относящихся к классу N,N'-дизамещенных производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана **1**, а также изучению влияния комплексообразования и изменения pH на проницаемость модифицированных липосом и высвобождение инкапсулированных веществ.



**1**

Поскольку липидные бислои, модифицированные амфифильными производными 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана до сих пор не изучались, первый вопрос, который предстояло решить, был вопрос о самой возможности и параметрах встраивания производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана с длинными алкильными заместителями при атомах азота в липидный бислой (длина алкильного радикала, процентное содержание используемого амфифильного производного 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана в липидном бислое, буфер, температура получения липидной пленки, количество озвучиваний и температура при озвучивании). Второй задачей являлся выбор и синтез необходимых конформационных переключателей на основе 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана для встраивания в липидный бислой.

Ключевой задачей данной работы было встраивание полученных конформационных переключателей в липидный бислой на основе фосфатидилхолина и изучение проницаемости модифицированного липидного бислоя под действием таких внешних факторов, как комплексообразование, изменение pH среды. В качестве конформационных переключателей были выбраны N,N'-диалкилзамещенные 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаны, которые по литературным данным в кристалле и в ряде растворителей имеют конформацию KB, а при комплексообразовании с катионами двухвалентных металлов и протонировании принимают конформацию KK:



Такие конформационные перестройки должны приводить к изменению расположения в липидном бислое алкильных радикалов и, как следствие, к увеличению его проницаемости.

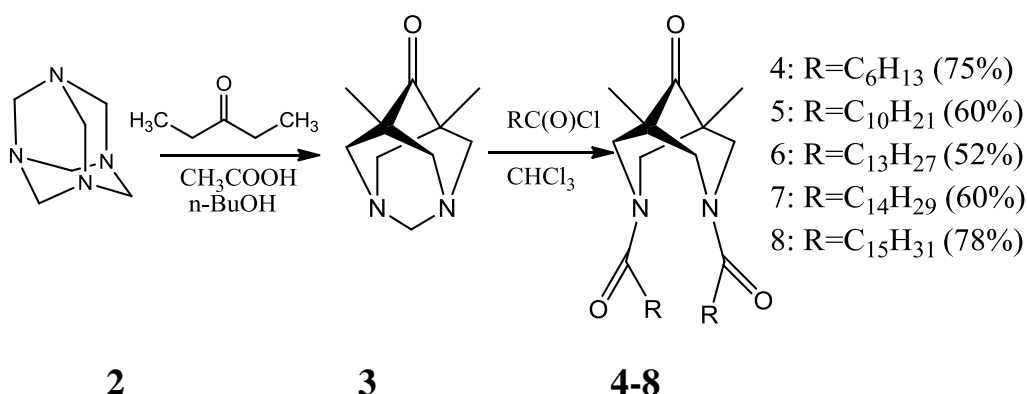
С целью решения ключевой задачи были синтезированы следующие производные 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана: 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-оны, 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаны и 3,7-диацил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-оны.

СИНТЕЗ НОВЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ  
3,7-ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНА

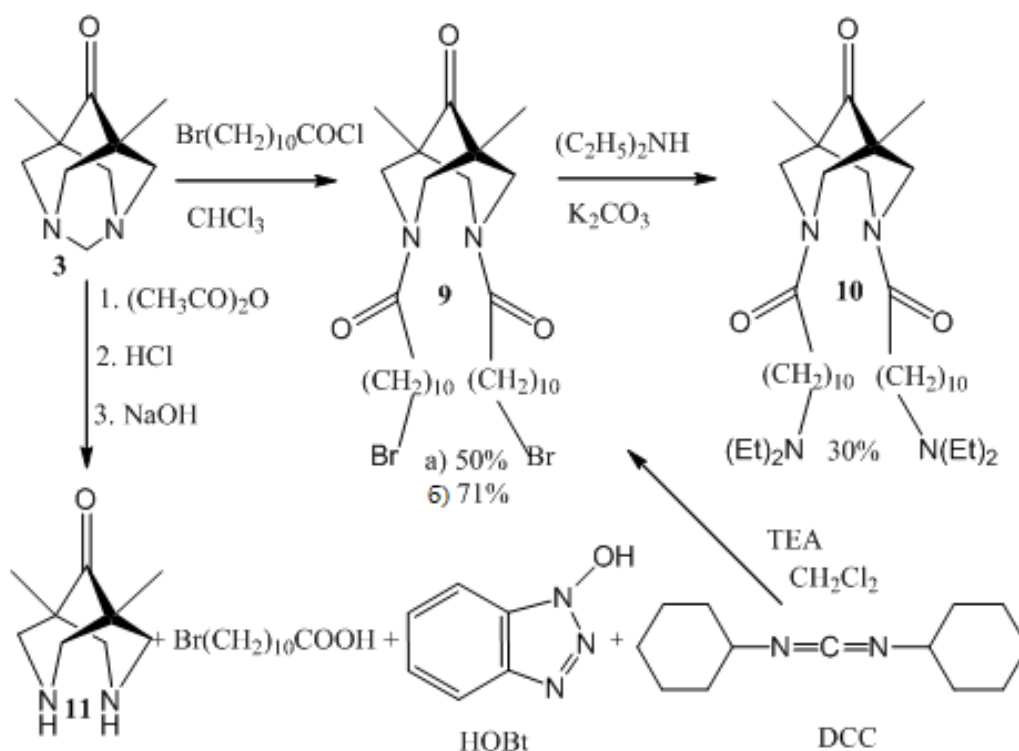
На основе имеющихся в литературе методов синтеза производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов были разработаны следующие пути синтеза целевых соединений.

1. Синтез 3,7-диацил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов

Соединения **4-8** с длинными ацильными заместителями были синтезированы с хорошими выходами ацилированием 5,7-диметил-1,3-диазаадамantan-6-она хлорангидридами соответствующих кислот в абсолютном хлороформе.

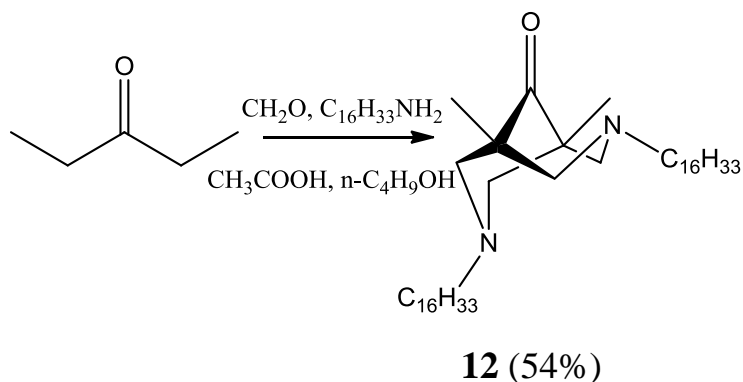


Соединение **10** было получено двумя способами: а) путем нуклеофильного замещения брома в 1,5-диметил-3,7-ди-( $\omega$ -бромундеканоил)-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-оне **9** диэтиламино (соединение **9** получали ацилированием 5,7-диметил-1,3-диазаадамantan-6-она **3** хлорангидридом  $\omega$ -бромундекановой кислоты), б) с использованием дициклогексилкарбодиимида (DCC) и 1-гидроксибензотриазола (HOBT) - данный способ существенно проще в исполнении и обеспечивает выход на стадии ацилирования на 21% выше:



## 2. Синтез 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазобифцикло[3.3.1]нонан-9-онов

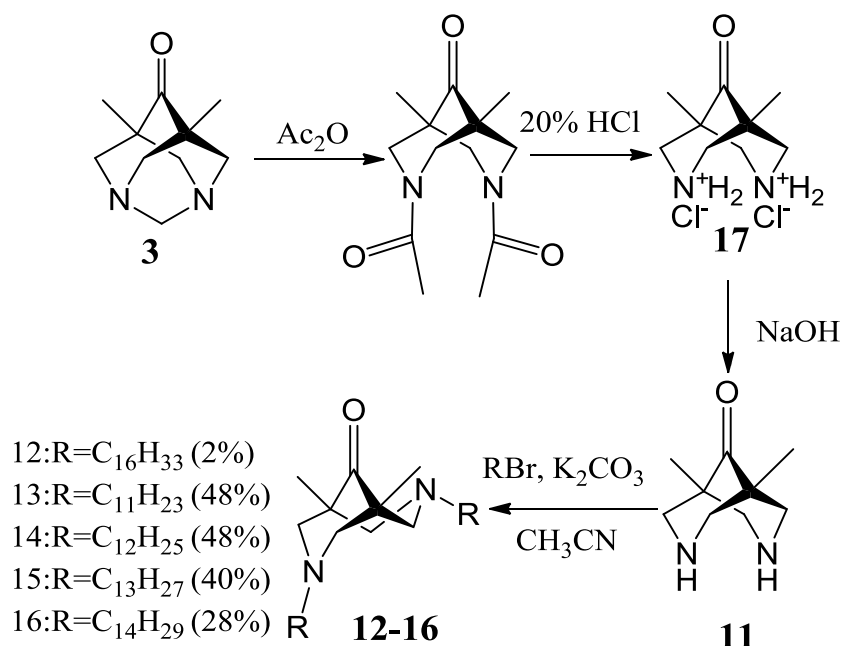
Наиболее простым способом получения диалкилпроизводных 1,5-диметил-3,7-диазобифцикло[3.3.1]нонан-9-она является синтез на основе реакции Манниха, а именно реакция между диэтилкетонем, формальдегидом и ацетатом соответствующего амина, однако данные об использовании аминов с длинными алкильными радикалами в такой реакции в литературе отсутствовали. Этот метод был использован нами для синтеза соединения **12**.



Оптимальный результат (выход 54%) мы получили при кипячении вышеуказанных реагентов в среде уксусной кислоты и *n*-бутанола в течение 6.5 часов. Ни изменение порядка прибавления реагентов, ни понижение температуры реакции за счет кипячения в этаноле не позволило повысить выход целевого продукта.



Для соединений **13-16** был использован альтернативный подход, а именно реакция алкилирования 1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-она **11** соответствующими алкилбромидами.



Для оптимизаций условий реакции, мы варьировали растворитель, температуру и время проведения реакции. Результаты отражены в таблице 1.

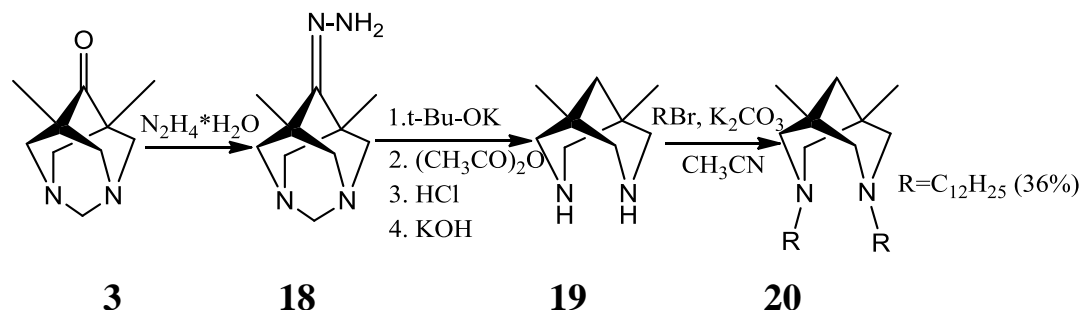
Таблица 1. Подбор условий реакции для получения соединения **14**.

Растворитель	Температура реакции	Время реакции	Выход, %
DMF	50°C	20 часов	45
CH <sub>3</sub> CN	50°C	8 часов	8
CH <sub>3</sub> CN	50°C	20 часов	48
CH <sub>3</sub> CN	82°C	40 часов	10

Таким образом, можно заключить, что с увеличением длины углеводородного радикала выход падает, а для гексадецильного производного **12** он совсем невелик. Также было установлено, что использование свободного основания **11**, а не дигидрохлорида **17** упрощает очистку конечного продукта.

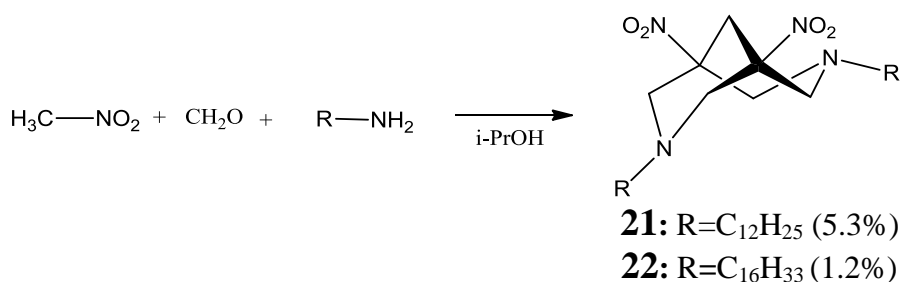
### 3. Синтез 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов

Соединение **20** было получено алкилированием додецилбромидом 1,5-диметилбиспидина **19**. Разложение гидразона **18** осуществлено с высоким выходом *tert*-бутилатом калия в относительно мягких условиях.



### 4. Синтез 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов

Соединение **21** нами было синтезировано с помощью реакции Манниха из нитрометана, формальдегида и додециламина. Существенный минус такой реакции, как уже отмечено выше, заключается в образовании большого количества побочных продуктов, причем их количество возрастает по мере увеличения длины и разветвленности алкильных радикалов, однако она удобна в качестве одностадийного синтеза.



Первые опыты позволили нам выделить 3,7-дидодецил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан **21** с выходом 1.2%. Оптимизация условий реакции позволила повысить выход продукта **21** до 5.3% (см. табл. 2):

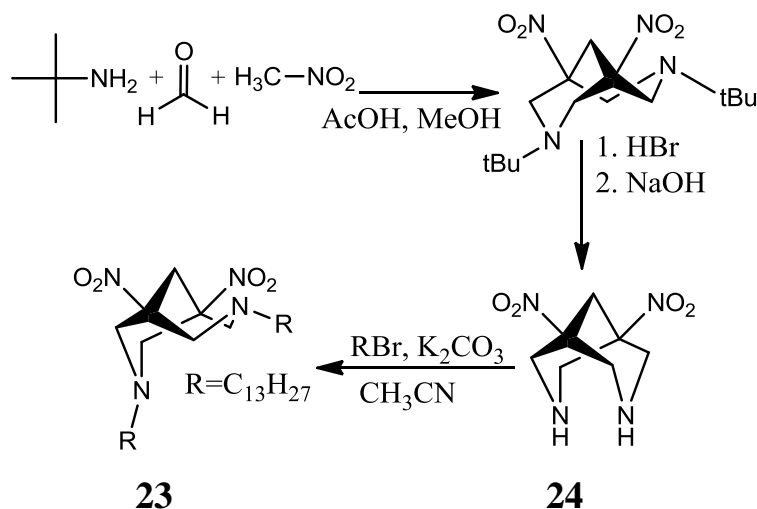
Таблица 2. Разработка условий синтеза 3,7-дидодецил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана **21**.

№ опыта	Растворитель	pH	Время кипячения, ч	Выход
1	MeOH	9-10	0.3	0.6%
2	iPrOH	9-10	3	1.2%
3	iPrOH	7-8	6	5.3%

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что положительное влияние на выход целевого продукта оказывают увеличение полярности используемого растворителя и увеличение времени проведения процесса до 6 часов. Дальнейшее увеличение времени кипячения в изопропанолe приводило к снижению выхода соединения **21**.

Для 1,5-динитро-3,7-дидодецил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана **23** мы решили разработать альтернативную схему синтеза, основанную на получении свободного 1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана **24** и его последующем алкилировании тридецилбромидом.

Варьируя время проведения реакции алкилирования соединения **24** и температуру, мы установили, что реакция проходит полностью при кипячении и интенсивном перемешивании компонентов в течение 12 часов, после очистки с помощью колоночной хроматографии целевой продукт алкилирования **23** был получен с выходом 40%.



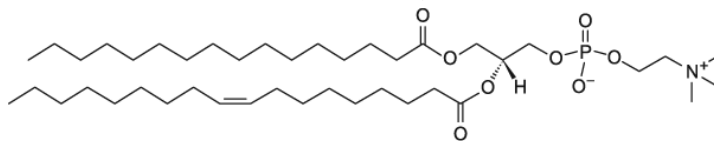
Мы исследовали возможность получения 3,7-дигексадецил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана **22** по методике, аналогичной методике получения соединения **23**. Однако образования целевого продукта зафиксировано не было, что, по-видимому, связано с большой длиной алкильного радикала. Поэтому для синтеза 3,7-дигексадецил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана **22** нами была использована методика, отработанная для 3,7-дидодецил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана **21**.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ

### 3,7-ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНА НА ЛИПОСОМАЛЬНУЮ МЕМБРАНУ

С целью исследования возможности встраивания в липосомы N,N'-замещенных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов были проведены следующие эксперименты.

Липосомы получали методом озвучивания из смеси фосфатидилхолина (ФХ) **25** и синтезированных производных 3,7-диацил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов **4-8** в соотношении 3:1 (мольная доля амфифильного соединения **4-8** составляла 0.25):



### **25**

Нами было установлено, что при встраивании в липидный бислой соединения с заместителями, содержащими 7 атомов углерода, а именно 3,7-дигептаноил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-она **4**, получаются липосомы с дефектами. Такие модифицированные липосомы не могут использоваться в качестве молекулярных контейнеров, так как инкапсулируемое вещество вытекает из липосом в процессе их приготовления. Это можно объяснить слишком «коротким» углеводородным радикалом, содержащим лишь 7 атомов углерода. Поэтому в дальнейшем нами были синтезированы для встраивания в липидный бислой производные с более длинными заместителями с числом углеродных атомов в радикале от 11 до 16.

Размер (гидродинамический диаметр) липосом, модифицированных 3,7-диацил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами, определялся методом динамического рассеяния света, а электрофоретическая подвижность (ЭФП) модифицированных липосом – методом лазерного микроэлектрофореза. Размер и ЭФП липосом контролировали в интервале pH от 10 до 5.

Изменение рН внешнего раствора с 10 до 5 («защелчение раствора») практически не влияло на размер модифицированных липосом: он сохранялся в пределах от 50 до 80 нм. Защелчение внешнего раствора приводило к появлению на поверхности липосом положительного заряда.

На следующем этапе нами исследовались липосомы, построенные из фосфатидилхолина и алкильных производных 1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-она **12-16**. Размер таких липосом находится в интервале 40-80 нм. Значительных изменений в размере модифицированных липосом в интервале рН 10-5 не наблюдается и через 24 часа. Результаты измерения ЭФП модифицированных липосом представлены на рисунке 1. Уменьшение рН внешнего раствора с 10 до 5 сопровождается повышением ЭФП липосом за счет протонирования атомов азота в молекуле амфифильного соединения.

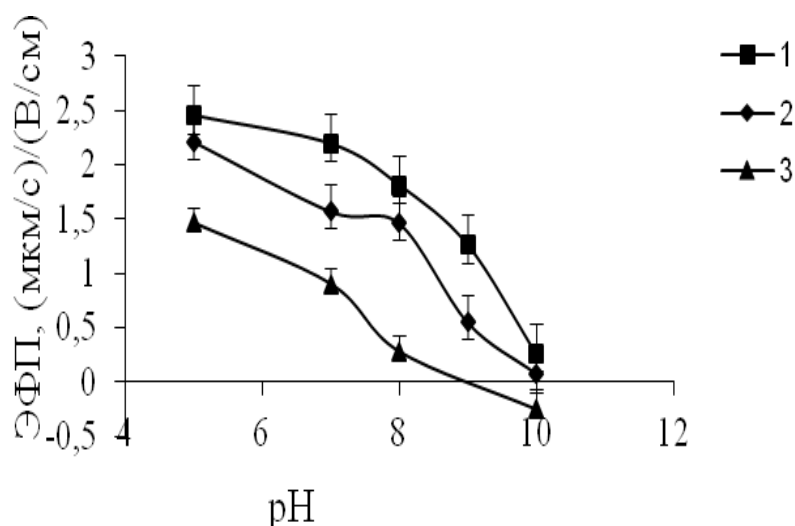


Рисунок 1. Зависимость электрофоретической подвижности липосом, модифицированных соединениями **13** (кривая 1), **15** (кривая 2) и **12** (кривая 3).

Аналогичные эксперименты были проведены для липосом со встроенными 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанами **21-23**. Такие липосомы сохраняли свой размер (60-80 нм) в интервале рН 10-5 и приобретали положительный заряд при защелчении внешнего раствора.

Таблица 3. Значения электрофоретической подвижности для липосом, модифицированных соединениями **21-23**.

рН	ЭФП, (мкм/с)/(В/см)				
	R= C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>		R=C <sub>13</sub> H <sub>27</sub>		R=C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>
		через 48 часов		через 36 часов	
рН 10	-0,32	-0,64	-0,36	-2,4	-0,31
рН 8	-0,85	-1,34	-0,52	-2,25	-0,54
рН 7	-1,43	-0,03	-0,28	-0,69	-0,58
рН 5	0,01	0,54	0,71	0,11	1,43

Примечание – В таблице обозначение «R» соответствует алкильным заместителям при атомах азота в положениях 3,7 для 1,5-динитро-3,7-диалкил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что электрофоретическая подвижность частиц (а значит, и их заряд) меняются с течением времени. в зависимости от рН окружающего водного раствора. Небольшой отрицательный заряд, наблюдаемый при рН 10 связан с присутствием примеси в фосфатидилхолине. При рН 5 во всех случаях наблюдается небольшой положительный заряд, свидетельствующий о протонировании третичных атомов азота в 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанах. Появляющийся со временем на поверхности липосом дополнительный отрицательный заряд связан, по-видимому, с окислением фосфатидилхолина.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЛИПОСОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМФИФИЛЬНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ 1,5-ДИМЕТИЛ-3,7-ДИАЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОНАНА

Нами была проведена серия экспериментов по управляемому изменению проницаемости липосомальной мембраны, содержащей встроенные в нее производные 1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана с длинными алкильными заместителям.

В частности, представляет интерес создание стимул-чувствительных липосомальных контейнеров, реагирующих на содержание катионов меди, что может быть использовано, при терапии ряда патологий, в том числе болезни Вильсона.

Для исследования изменения проницаемости липосом при комплексообразовании с катионами меди (II) использовали следующую схему. Во внутренний объем липосом мы включили флуоресцентную метку – карбоксифлуоресцеин (КФ). Исходная суспензия, содержащая флуорофор, концентрация которого внутри липосом превышает концентрацию самотушения, после появления дефектов в мембране и вытекания флуорофора во внешний раствор сопровождалось заметным увеличением интенсивности его флуоресценции. Целостность липосом со встроенными 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами контролировали, измеряя интенсивность флуоресценции полученной суспензии. Для этого использовали суспензии, предварительно разбавленные боратным буферным раствором (рН 9) до концентрации 1 мг/мл.

Добавление водного раствора  $\text{CuSO}_4$  к 1 мг/мл суспензиям липосом сопровождалось заметным увеличением флуоресценции, что указывало на вытекание КФ из внутреннего объема липосом в окружающий раствор.

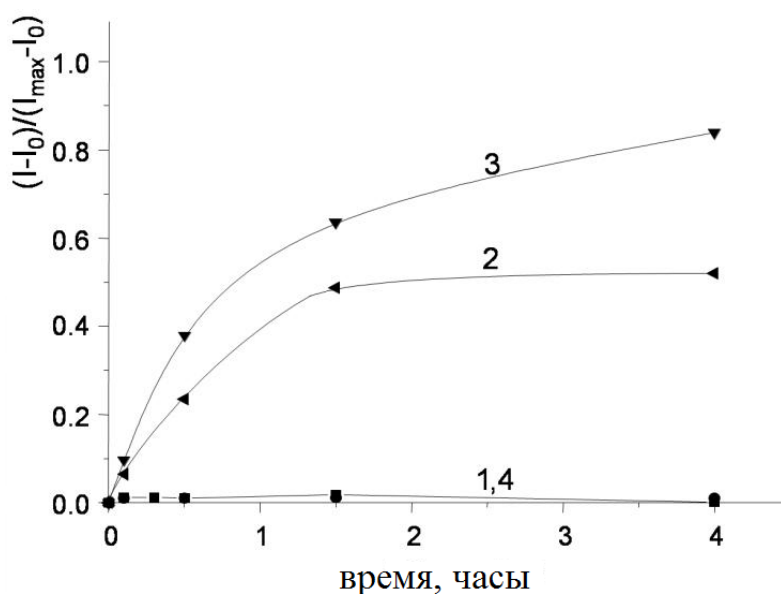


Рисунок 2. Влияние 3,7-дидодецил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-она **14** на липидный бислой в присутствии ионов меди (**14**/ФХ липосомы (кривая 1), **14**/ФХ липосомы +  $0.15 \times 10^{-4}$  М  $\text{CuSO}_4$  (кривая 2), **14**/ФХ липосомы +  $1.4 \times 10^{-4}$  М  $\text{CuSO}_4$  (кривая 3) и ФХ липосомы +  $1.4 \times 10^{-4}$  М  $\text{CuSO}_4$  (кривая 4),  $[\mathbf{14}] = 3.3 \times 10^{-4}$  М (кривые 1-3);  $10^{-2}$  М боратный буфер, рН 9). По оси ординат – относительная интенсивность флуоресценции.

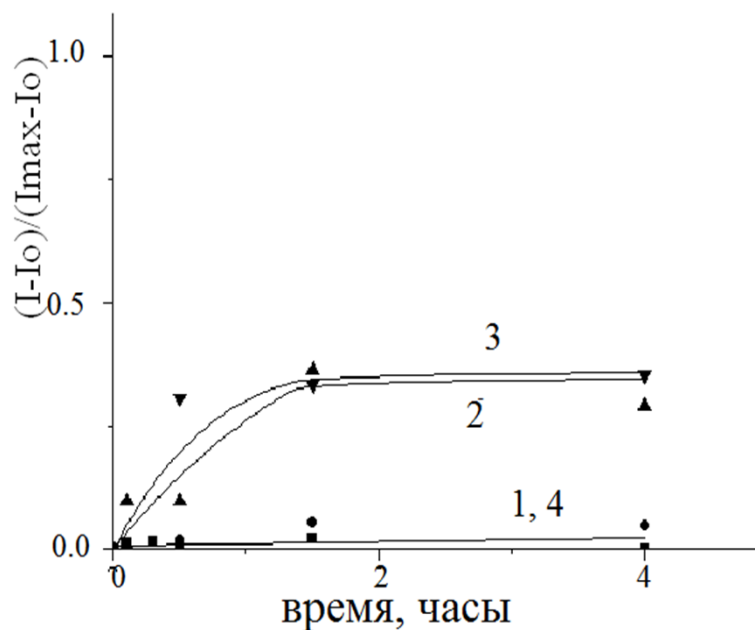


Рисунок 3. Влияние 3,7-дигексадецил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-она **12** на липидный бислой в присутствии ионов меди (**12**/ФХ липосомы (кривая 1), **12**/ФХ липосомы +  $0.45 \times 10^{-4}$  М  $\text{CuSO}_4$  (кривая 2), **12**/ФХ липосомы +  $1.4 \times 10^{-4}$  М  $\text{CuSO}_4$  (кривая 3) и ФХ липосомы +  $1.4 \times 10^{-4}$  М  $\text{CuSO}_4$  (кривая 4),  $[\mathbf{12}] = 3.3 \times 10^{-4}$  М (кривые 1-3);  $10^{-2}$  М боратный буфер, pH 9). По оси ординат – относительная интенсивность флуоресценции.

Увеличение концентрации  $\text{CuSO}_4$  приводило к повышению скорости вытекания КФ. Вытекание красителя из липосом сопровождалось резким возрастанием интенсивности флуоресценции суспензии. Результат сравнивали с интенсивностью флуоресценции суспензии после разрушения липосом детергентом, Тритоном X-100, которую принимали за 100%. На рисунке 2 показано, как флуоресценция суспензии модифицированных липосом, содержащих во внутреннем объеме КФ, изменилась, когда был добавлен раствор  $\text{CuSO}_4$ . В контрольном эксперименте при отсутствии во внешнем растворе катионов меди никакого увеличения флуоресценции суспензии липосом не было обнаружено (кривая 1), что указывает на отсутствие спонтанного высвобождения красителя. Добавление  $0,15 \times 10^{-4}$  М  $\text{CuSO}_4$  к суспензии липосом привело к значительному увеличению интенсивности флуоресценции (кривая 2); увеличение концентрации соли  $\text{CuSO}_4$  сопровождалось резким увеличением флуоресценции (кривая 3). Полученные результаты свидетельствуют, что добавление раствора  $\text{CuSO}_4$  индуцировало высвобождение КФ, большая часть которого просочилась из липосом в течение



1,5 часов после добавления раствора  $\text{CuSO}_4$ . Сравнивая графики на рисунках 2 и 3 можно утверждать, что длина алкильного радикала незначительно влияет на вытекание КФ из липосом, модифицированных 3,7-диалкилпроизводными 1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов в присутствии катионов меди (II).

Влияние  $\text{CuSO}_4$  на вытекание КФ логично связать с формированием комплекса  $\text{Cu}^{2+}$  с 3,7-диалкил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-оном и изменением конформации последнего, что, в свою очередь, оказывает влияние на упаковку липидов в бислое и резко повышает проницаемость липосомальной мембраны.

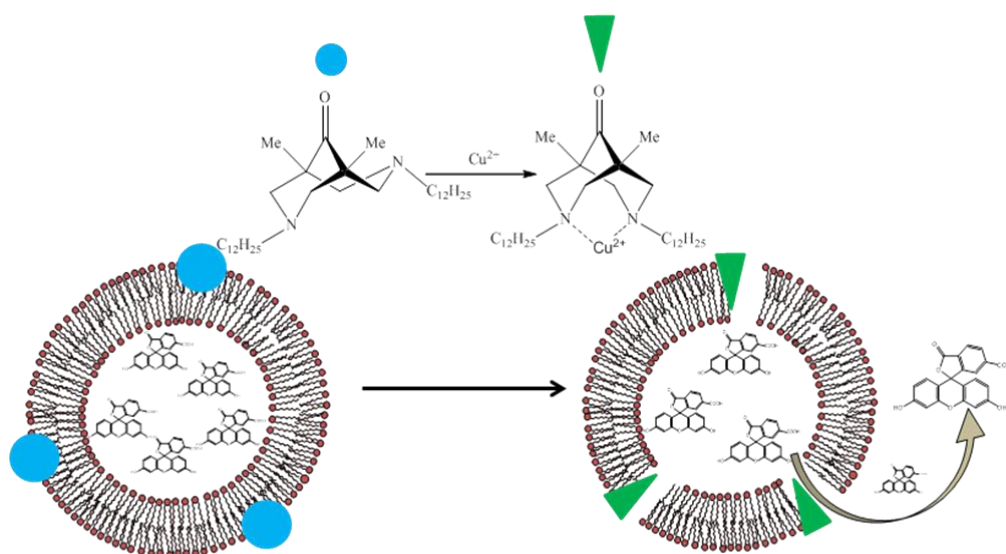


Схема 1. Вытекание КФ из внутреннего объема липосом при изменении конформации соединений **12-16** за счет комплексообразования с ионами меди.

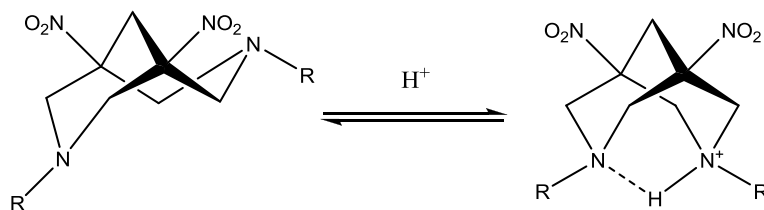
Возможность осуществления направленной доставки лекарств к опухолевым клеткам с помощью модифицированных липосом напрямую зависит от способности бислоя изменять проницаемость при изменении кислотности окружающего водного раствора.

На первом этапе нами были проведены эксперименты по измерению методом кондуктометрии проницаемости липидного бислоя, содержащего 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-он при различных значениях pH. Для этого во внутренний объем липосом мы включили хлорид натрия. Целостность липосом со встроенными 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами контролировали, измеряя электропроводность полученной суспензии. При вытекании соли из внутреннего объема липосом наблюдается увеличение электропроводности внешнего раствора.

Вытекание соли (увеличение относительной электропроводности) наблюдается в интервале рН 8-5, в большей мере при рН 5. При этом доля вытекшей соли сравнительно невелика (не более 8% за 1 час).

Известно, что рН многих опухолевых клеток находится в слабокислой области (рН может достигать значения 5.6). Так как достичь быстрого увеличения проницаемости липосом при рН 5-7 при использовании 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов не удалось, перед нами встала задача синтезировать новые конформационные переключатели.

Основой для них были выбраны 1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаны. По литературным данным 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаны существуют в конформации КВ и для них по аналогии с 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами возможен переход КВ-КК при протонировании в кислых средах.



Введение акцепторных заместителей (нитрогрупп) в положения 1,5 должно способствовать смещению увеличения проницаемости бислоя липосом при протонировании в более кислую область по сравнению с 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами. В связи с этим был осуществлен синтез ряда 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов с 12, 13, 16 атомами углерода в алкильном радикале.

Для исследования проницаемости липосом в зависимости от рН среды использовали метод кондуктометрии. Наблюдаемое увеличение электропроводности происходило в результате вытекания соли из внутреннего объема липосом, что, в свою очередь, свидетельствовало об образовании пор в липидном бислое (схема 2). Причиной образования пор в липосомах при протонировании, по-видимому, является движение алкильных заместителей внутри бислоя при изменении конформации биспидинового скелета.

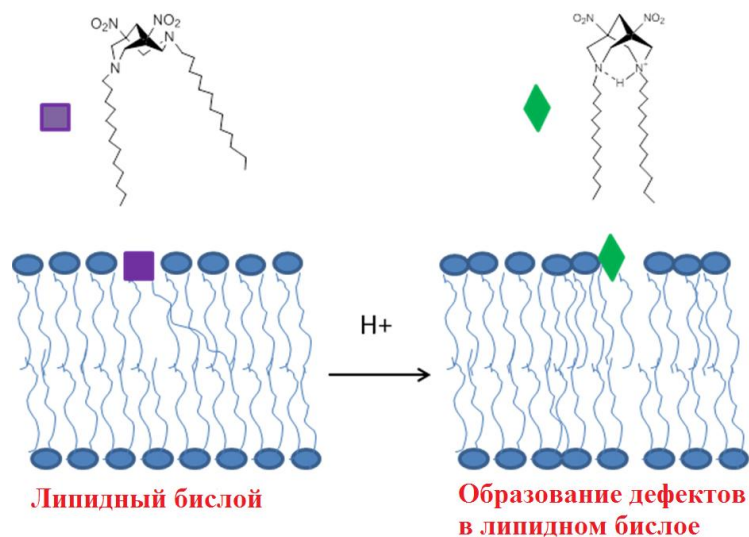


Схема 2. Схема увеличения проницаемости липидного бислоя при уменьшении pH среды

Измерения электропроводности проводили в первые 10 минут после добавления аликвоты липосом в буферный раствор с соответствующим pH (рисунок 4а, б):

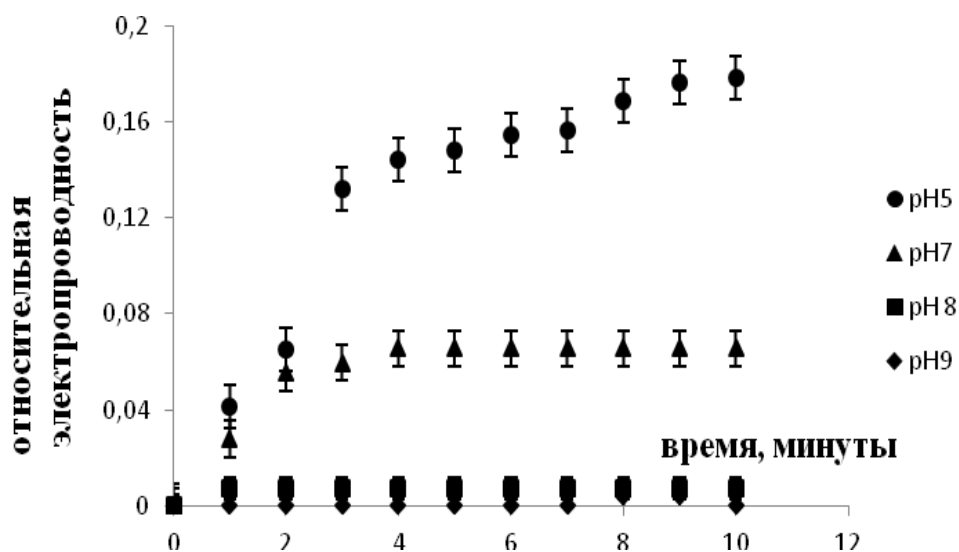


Рисунок 4а. Зависимость относительной электропроводности липосом, заполненных NaCl, от времени; липосомы модифицированы 1,5-динитро-3,7-дитридецил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаном **23**.

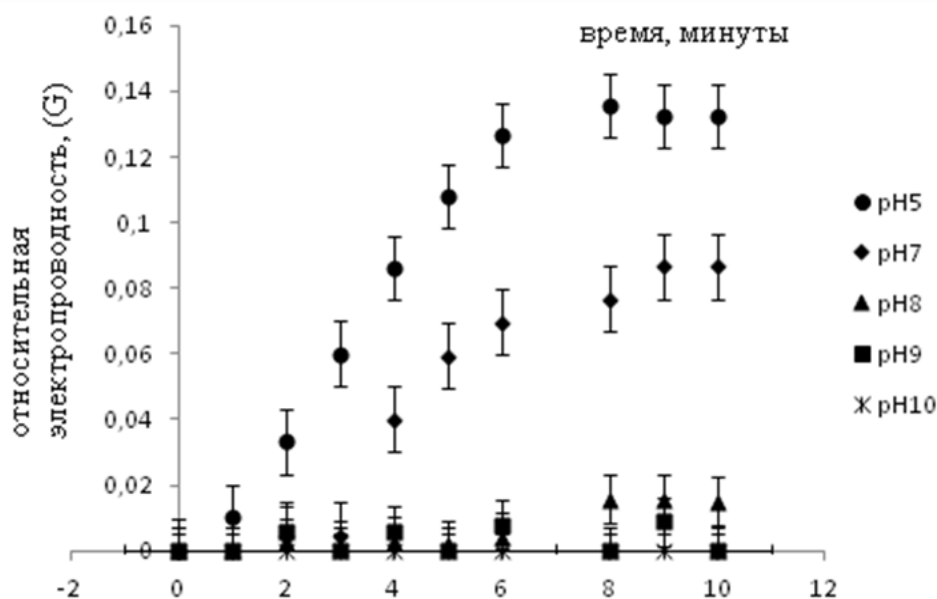


Рисунок 4б. Зависимость относительной электропроводности липосом, заполненных NaCl, от времени; липосомы модифицированы 3,7-дигексадецил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаном **22**.

Следует отметить, что характерным для всех встраиваемых соединений является отсутствие вытекания хлорида натрия при pH 10, а также существенное увеличение электропроводности, а значит и вытекание хлорида натрия из внутреннего объема липосом в интервале pH 5-7.

С целью дополнительного исследования возможного механизма образования пор в липосомах при изменении конформации КВ-КК нами были проведены эксперименты с соединением **20**, 3,7-дидодецил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаном, которое и в щелочной, и в кислой среде по литературным данным существует в конформации КК. Для исследования проницаемости липосом, модифицированных соединением **20**, в зависимости от pH среды использовали метод кондуктометрии. Проведенные эксперименты показали, что в исследованном интервале pH 10 – 5 из внутреннего объема липосом не вытекает хлорид натрия, что свидетельствует об отсутствии дефектов в липидном бислое. Так как при протонировании одного из атомов азота изменения конформации данного соединения не происходит, не происходит и движения длинных алкильных заместителей, ведущего к нарушению целостности мембраны.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы синтеза 3,7-диалкил- и 3,7-диацил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов с длинными алкильными заместителями при атомах азота.
2. Впервые получены 3,7-дидодецил-, 3,7-дитридецил- и 3,7-дигексадецил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонаны с длинными алкильными заместителями при атомах азота.
3. Показано, что производные 1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана с липофильными заместителями при атомах азота способны встраиваться в липидный бислой без нарушения целостности липосом.
4. Впервые обнаружено, что 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-оны в присутствии катионов меди (II) способны повышать проницаемость липидного бислоя и индуцировать высвобождение вещества, инкапсулированного во внутренний объем липосом.
5. Показано повышение проницаемости липосом, модифицированных 3,7-диалкил-1,5-динитро-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанами и 3,7-диалкил-1,5-диметил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онами при изменении pH среды.
6. Обнаружено, что для создания стимул-чувствительных липосом (реагирующих на изменение pH и концентрации ионов меди (II)), наиболее приемлемыми являются производные 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана с углеводородными радикалами при атомах азота, содержащими 11-13 атомов углерода.

## Список публикаций

1. П.Н. Веремеева, В.Л. Лаптева, В.А. Палюлин, Д.А. Давыдов, А.А. Ярославов, Н.С. Зефирова Новые амфифильные соединения для создания стимул-чувствительных липосомальных контейнеров. // *ДАН*. 2012. т. 447. №4. с. 407-409.
2. P. N. Veremeeva, V. L. Lapteva, V. A. Palyulin, A. A. Yaroslavov, N. S. Zefirov Bispidone-based switches for construction of stimulus-sensitive liposomal containers. // *Tetrahedron*. 2014. v. 70. p. 1408-1411.
3. P. N. Veremeeva, V. L. Lapteva, V. A. Palyulin, I. V. Grishina, A. A. Yaroslavov, N. S. Zefirov pH-Sensitive liposomes with embedded 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane derivative. // *Mendeleev Communications*. 2014. v. 24. p. 152-153.

4. П.Н. Веремеева, В.Л. Лаптева, В.А. Палюлин, И.В. Гришина, А.А. Ярославов, Н.С. Зефирова Синтез производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана и исследование их влияния на стабильность липидных бислоев. // Сборник тезисов докладов Первой Российской конференции по медицинской химии "MedChem Russia – 2013". 8-12 сентября 2013 г. Москва. с. 210.
5. P. N. Veremeeva, V. L. Lapteva, V. A. Palyulin, I. V. Grishina, A. A. Yaroslavov, N. S. Zefirov Novel amphiphilic compounds for construction of stimulus-sensitive liposomal containers. // Conference Frontiers in Chemistry. 25-29 August 2013. Yerevan. ACF2013 PS092.
6. П.Н. Веремеева, В.Л. Лаптева, В.А. Палюлин, И.В. Гришина, А.А. Ярославов, Н.С. Зефирова Амфифильные соединения для создания липосомальных контейнеров. // Сборник тезисов докладов Кластера конференций по органической химии "ОргХим-2013". 17-21 июня 2013 г. Санкт-Петербург. с. 62.
7. П.Н. Веремеева, В.Л. Лаптева, В.А. Палюлин, Д.А. Давыдов, А.А. Ярославов, Н.С. Зефирова Управление стабильностью липосом с помощью замещенных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов. // Сборник тезисов докладов Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием "Менделеев 2012". 3-6 апреля 2012 г. Санкт-Петербург. с. 48.
8. П.Н. Веремеева, В.Л. Лаптева, В.А. Палюлин, Д.А. Давыдов, А.А. Ярославов, Н.С. Зефирова Новые амфифильные соединения для создания липосомальных контейнеров как потенциальных носителей лекарственных веществ. // Сборник тезисов докладов Пятой Всероссийской конференции молодых ученых, студентов и аспирантов «Химия в современном мире». 17-22 апреля 2011 г. Санкт-Петербург. с. 429.
9. П.Н. Веремеева Синтез производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов для управления стабильностью липосом. // Сборник тезисов докладов конференции «Ломоносов 2011». 11-15 апреля 2011 г. Москва. ISBN 978-5-317-03634-8.
10. П.Н. Веремеева Синтез 3,7-диацил- и 3,7-диалкил-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан-9-онов и исследование их взаимодействия с липидными бислоями. // Сборник тезисов докладов конференции «Ломоносов 2010». 12-15 апреля 2010 г. Москва. ISBN 978-5-317-03197-8.