

ХИМИЯ

УДК 547.7/8

К.В. Балакин, А.Б. Корнев, А.С. Перегудов, Е.В. Бовина, П.А. Трошин

Синтез водорастворимого пирролидинофуллерена и исследование его биологических свойств

Кислотным гидролизом пирролидинофуллерена **1**, синтезированного взаимодействием фуллерена C_{60} с пентаэтиловым эфиром диэтилентриаминпентауксусной кислоты в присутствии $Pb(OAc)_4$, получен пирролидинофуллерен **2**, содержащий четыре свободные карбоксильные группы, обеспечивающие его растворимость в полярных растворителях, в том числе в водной среде. Цитотоксичность пирролидинофуллерена **2** оказалась низкой, что указывает на его хорошую совместимость с живыми системами.

Ключевые слова: синтез, фуллерен, пирролидинофуллерен, адденды, кислота, растворимость, агрегация, наноструктура, спектроскопия ЯМР, противовирусная активность, цитотоксичность, биосовместимость.

K.V. Balakin, A.B. Kornev, A.S. Peregudov, E.V. Bovina, P.A. Troshin

Synthesis of Water Soluble Pyrrolidino fullerene and Study of its Biological Properties

Acid hydrolysis of pyrrolidino fullerene **1**, which was obtained by reaction of fullerene C_{60} with pentaethyl diethylenetriaminopentaacetate in the presence of $Pb(OAc)_4$, led to pyrrolidino fullerene **2**. The latter contains four free carboxylic groups that result in its solubility in polar solvents including water. The cytotoxicity of pyrrolydino fullerene **2** was low that indicates its compatibility with living systems.

Key words: synthesis, fullerene, pyrrolidino fullerene, addends, acid, solubility, aggregation, nanostructure, NMR spectroscopy, antiviral activity, cytotoxicity, biocompatibility.

Введение

Разработка метода получения фуллеренов в макроколичествах привела к бурному развитию исследований, направленных на всестороннее изучение свойств этих углеродных кластеров, в том числе биологических [1].

В последние годы активно обсуждается [2] возможность создания лекарственных препаратов на основе водорастворимых производных фуллеренов, содержащих в основном ионогенные группы — аминные [3] и карбоксильные [4, 5]. Это потенциальные противовирусные (в том числе анти-ВИЧ) [6] и нейропротекторные препараты [7], средства фотодинамической терапии рака [8] и т. д. Активным центром таких соединений является каркас фуллерена, что обеспечивает их уникальные фармакологические и мембранотропные свойства.

Развитию биомедицинской химии фуллеренов препятствует сложность получения водорастворимых производных фуллеренов, совместимых с биологическими средами. Для

обеспечения приемлемой растворимости в полярных (биологических) средах необходимо ввести в производное фуллерена не менее четырех карбоксильных или аминных групп; при этом каркас фуллерена может оказаться в значительной степени или даже полностью экранированным от взаимодействия с биологическими мишенями.

В данной работе сообщается о синтезе и исследовании нового водорастворимого производного фуллерена, совместимого с биологическими системами.

Экспериментальная часть

Получение пентаэтилового эфира диэтилентриаминпентауксусной кислоты

К раствору 25 г (64 ммоль) диэтилентриаминпентауксусной кислоты в 300 мл этилового спирта прибавляли тионилхлорид (80 г, 670 ммоль), раствор оставляли на ночь при перемешивании. Раствор кипятили с обратным холодильником в течение

1 часа, после чего упаривали на роторном испарителе. После добавления 100 мл воды, 15 г (256 ммоль) NaOH и карбоната калия до насыщения происходило отделение слоя целевого продукта. Продукт экстрагировали диэтиловым эфиром, раствор сушили над прокаленным карбонатом калия и упаривали на роторном испарителе. После упаривания было получено 26.35 г продукта — пентаэтилового эфира диэтилентриаминпентауксусной кислоты (выход 77%). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): $\delta = 1.26$ (т, 15H), 2.84 (м, 8H), 3.47 (с, 2H), 3.58 (с, 8H) м.д.

Синтез пирролидинофуллерена 1

К раствору пентаэтилового эфира диэтилентриаминпентауксусной кислоты (1 г, 1.9 ммоль) и C_{60} (500 мг, 0.71 ммоль) в 1,2-дихлорбензоле (50 мл) в атмосфере аргона добавляли двукратное по отношению к фуллерену количество тетраацетата свинца (616 мг, 1.42 ммоль) и реакционную смесь нагревали до 100°C при перемешивании на магнитной мешалке в течение 30 минут. Из раствора после фильтрования с помощью колоночной хроматографии (элюирование смесью толуол + 0,5–0,6% MeOH) выделяли целевой продукт 1. Масса полученного продукта составила 189 мг (37,2% в расчете на прореагировавший фуллерен).

^1H ЯМР: (CS_2 -ацетон- D_6 , 600 МГц): $\delta = 1.27$ (м, 15H), 3.01 (м, 4H), 3.56 (м, 6H), 3.87 (м, 1H), 4.08 (м, 8H), 4.28 (м, 2H), 4.36 (д, 1H), 5.14 (с, 1H), 5.22 (д, 1H) м.д. ^{13}C ЯМР: (CS_2 -ацетон- D_6 , 150 МГц): $\delta = 14.67$, 14.72, 14.74, 14.79, 52.15, 52.64, 54.82, 60.1, 61.25, 65.23, 69.62, 71.57, 72.76, 73.65, 78.05, 128.43, 135.62, 136.17, 136.42, 136.53, 137.1, 137.74, 139.53, 139.8, 139.98, 140.3, 140.32, 141.78, 141.84, 141.88, 141.91, 141.95,

142.06, 142.08, 142.11, 142.2, 142.23, 142.29, 142.33, 142.68, 142.72, 142.74, 142.78, 143.11, 143.13, 143.15, 144.51, 144.59, 144.62, 144.74, 145.29, 145.31, 145.34, 145.42, 145.48, 145.52, 145.54, 145.64, 145.68, 145.7, 145.74, 145.77, 146.01, 146.04, 146.09, 146.28, 146.33, 146.37, 146.4, 146.59, 147.29, 147.39, 147.41, 151.46, 151.52, 154.03, 154.18, 154.99, 155.14, 168.87, 169.57, 170.1, 170.16 м.д.

Синтез пирролидинофуллерена 2

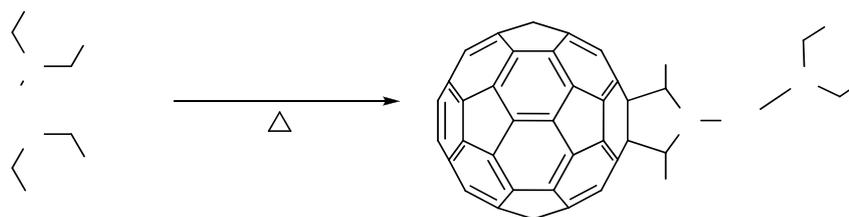
К раствору соединения 1 (133 мг, 0,24 ммоль) в 30 мл хлорбензола прибавляли 60 мл уксусной кислоты и 30 мл концентрированной соляной кислоты. Полученную двухфазную систему нагревали при перемешивании в колбе с обратным холодильником и термометром до 60°C в течение 36 часов, слой хлорбензола отделяли и упаривали на роторном испарителе. Выход целевого соединения 2 составлял 96% (118 мг).

^1H ЯМР: ($\text{DMSO}-\text{D}_6$, 600 МГц) $\delta = 1.15$ (т, 3H), 3.61 (с, 4H), 3.64 (с, 2H), 3.67 (м, 2H), 3.83 (м, 2H), 4.02 (м, 1H), 4.30 (м, 2H), 4.47 (д, 1H), 4.75 (д, 1H), 4.85 (д, 1H), 5.19 (д, 1H), 5.43 (с, 1H) м.д. ^{13}C ЯМР: (CS_2 -ацетон- D_6 , 150 МГц): $\delta = 14.56$, 47.36, 49.06, 51.69, 52.89, 54.12, 55, 62.09, 64.38, 69.74, 72.81, 76.43, 135.95, 136.22, 136.24, 136.5, 137.51, 139.34, 139.51, 140.13, 140.16, 141.74, 141.76, 141.79, 141.81, 141.84, 141.96, 142.07, 142.14, 142.23, 142.31, 142.63, 142.66, 142.69, 143.05, 143.08, 144.42, 144.48, 144.53, 144.66, 145.19, 145.23, 145.28, 145.35, 145.43, 145.54, 145.73, 145.75, 145.96, 146.01, 146.03, 146.09, 146.21, 146.26, 146.36, 146.77, 147.23, 147.35, 151.71, 168.64, 168.66, 169.91, 173.55 м.д.

Результаты и обсуждение

Ранее нами был разработан новый метод синтеза пирролидинофуллеренов, основанный на окислительном присоединении эфиров аминокислот к фуллерену с использованием тетраацетата свинца (схема 1) [9].

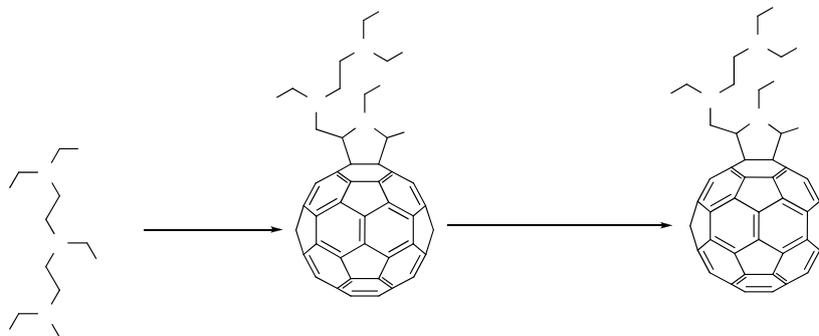
Схема 1



Достоинством данного метода является возможность присоединения к фуллерену многофункциональных аддендов с использованием дешевых и легкодоступных эфиров нитрилтриуксусной, этилендиаминтетрауксусной и гексаметилендиаминтетрауксусной кислот, широко используемых в промышленности в качестве комплексонов.

В данной работе в качестве исходного реагента использовали коммерчески доступную диэтилен-триаминпентауксусную кислоту. По стандартной методике кислоту превращали в пентаэтиловый эфир. Последний с помощью $Pb(OAc)_4$ присоединяли к фуллерену C_{60} (схема 2).

Схема 2



Пирролидинофуллерен **1** получали добавлением тетраацетата свинца к раствору пентаэтилового эфира диэтилен-триаминпентауксусной кислоты и фуллерена C_{60} в 1,2-дихлорбензоле в атмосфере аргона (мольное соотношение $C_{60} : Pb(OAc)_4 = 1 : 2$).

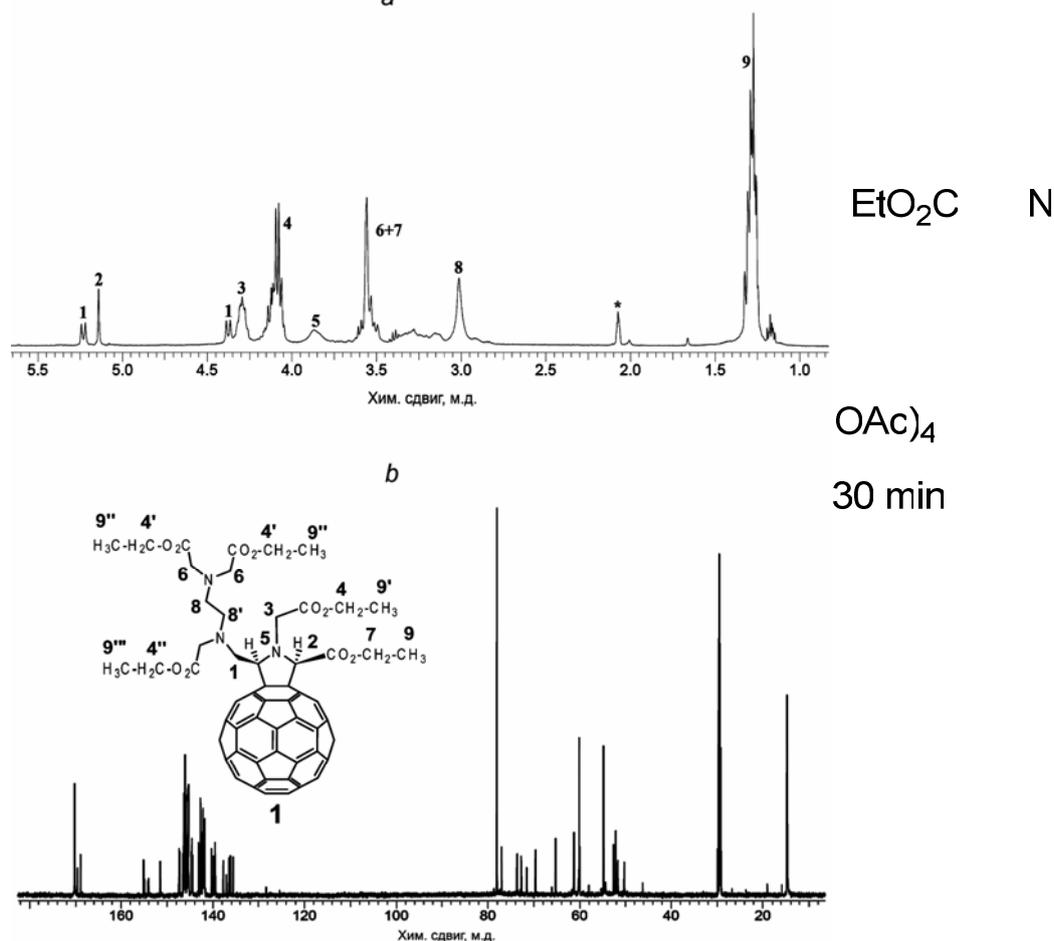


Рис. 1. Спектры ЯМР 1H (a) и ЯМР ^{13}C (b) соединения **1**. Сигнал, обозначенный «*», соответствует растворителю.

Выход полученного продукта составил 37,2% в расчете на прореагировавший фуллерен. Структуру полученного пирролидинофуллерена **1** идентифицировали с использованием спектроскопии ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C (см. рис. 1).

В спектре ЯМР ^1H соединения **1** было сделано отнесение отдельных групп сигналов. Отнесение сигналов подтверждено путем сопоставления спектра соединения **1** со спектром исходного пентаэтилового эфира диэтилентриаминпентауксусной кислоты, который интерпретируется однозначно, а также с использованием экспериментов Н-Н COSY и НС-НМВС. Значительное число сигналов в области слабых полей в спектре ^{13}C ЯМР (55–58 м.д.), соответствующих атомам углерода фуллеренового каркаса, свидетельствует о несимметричном строении молекулы соединения **1**. Наличие в молекуле **1** большого числа сходных по природе функциональных групп затрудняет интерпретацию области сильных полей в спектре ЯМР ^{13}C . Интенсивный сигнал при 78.05 м.д. принадлежит атомам углерода метиленовых групп, связанных со сложноэфирными СОО группами. Этот сигнал в значительной степени уширен, что связано с тем, что в него вносят вклад симметрически неэквивалентные CH_2 -группы. Неэквивалентность сложноэфирных групп по симметрии еще более наглядно подтверждается появлением четырех хорошо разрешенных сигналов при 14.67, 14.72, 14.74 и 14.79 м.д., соответствующих метильным фрагментам. Аналогичным образом обнаружено четыре сигнала карбонильных групп при 168.87, 169.57, 170.10 и 170.16 м.д.

Группа сигналов при 69.62, 71.57, 72.76 и 73.65 м.д. соответствует sp^3 -гибридизованным атомам углерода фуллеренового каркаса и атомам углерода пирролидинового цикла. Малоинтенсивные сигналы при 52.15 и 52.64 м.д. соответствуют, по-видимому, атомам углерода этилендиаминового фрагмента. Еще четыре сигнала при 54.82, 60.10, 61.25 и 65.23 м.д. принадлежат CH_2 -группам, непосредственно связанным с карбоксильными фрагментами.

Кипячение раствора соединения **1** в толуоле со смесью уксусной и соляной кислот позволило селективно гидролизовать четыре сложноэфирные группы, наиболее удаленные от фуллеренового каркаса. Сложноэфирная группа, находящаяся в пирролидиновом цикле, не подвергается гидролизу из-за стерического эффекта фуллеренового каркаса. Строение полученного целевого соединения **2** подтверждено методами ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии (рис. 2).

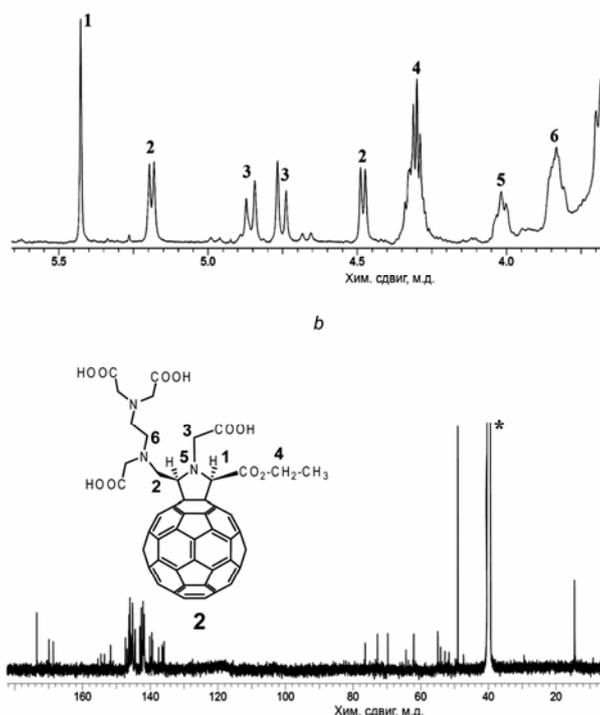


Рис. 2. Неэкранированная растворителем ($\text{DMSO-D}_6 + \text{H}_2\text{O}$) часть спектра ЯМР ^1H соединения **2** (a), спектр ЯМР ^{13}C соединения **2** (b) и отнесение некоторых сигналов в спектре ЯМР ^1H соединения **2**.

Частичное отнесение сигналов, обнаруженных в спектре ЯМР ^1H соединения **2**, показано на рис. 2. Важной особенностью спектра соединения **2** является появление четкого дублета дубле-

тов (АВ-система), соответствующего метиленовой группе «3», присоединенной к пирролидиновому атому азота. Это свидетельствует о затрудненном пространственном вращении фрагмента NCH_2COOH вокруг связи N–C. Подобная ситуация наблюдалась и в спектрах сходных по строению соединений, синтезированных ранее.

Полученная карбоновая кислота **2** оказалась плохо растворимой в воде при pH ~7. При pH ~10 наблюдалось некоторое увеличение растворимости, которая, тем не менее, не превышала величины 0.05 мг/мл. Значительно лучше соединение **2** растворялось в смеси диметилсульфоксида (10%) с водой (около 0.5 мг/мл). Несмотря на наличие в соединении **2** четырех способных к диссоциации карбоксильных групп, растворимость соединения в воде оказалась существенно ниже ожидаемой. Вероятно, причиной малой растворимости этого производного является его цвиттер-ионное состояние в водном растворе, благодаря чему проявляется высокая склонность к агрегации за счет электростатического взаимодействия положительно и отрицательно заряженных фрагментов молекул соединения **2**.

Несмотря на низкую растворимость кислоты **2**, нам удалось исследовать ее цитотоксичность и противовирусную активность в экспериментах на клеточных культурах. При тестировании на культурах клеток MDCK, HeLa, HEL, CRFK, Vero было установлено, что полученное поликарбоксильное производное обладает низкой цитотоксичностью. Пролиферация клеточной культуры подавляется на 50% по сравнению с контролем (CC_{50}) при концентрациях пирролидинофуллерена **2** более 100 мкг/мл. Столь низкая цитотоксичность препарата указывает на его хорошую совместимость с биологическими системами.

Библиографический список

1. Krätchmer, W. Solid C_{60} : a new form of carbon / W. Krätchmer, L.D.Lamb, K. Fostiropoulos, et al. // Nature – 1990. – 347. – p. 354–358.
2. Пиотровский, Л.Б. Фуллерены в биологии [Текст] / Л.Б. Пиотровский, О.И. Киселев. – СПб: Росток, 2006. – 335 с.
3. Troshina, O. Photoaddition of N-substituted piperazines to C_{60} : An efficient approach to the synthesis of water-soluble fullerene derivatives / O. Troshina, P.

Была изучена также противовирусная активность соединения при инфицировании указанных клеточных культур различными вирусами: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, штаммами вирусов гриппа, герпеса первого и второго типа, вируса везикулярного стоматита и коронавируса. Установлено, что соединение **2** не обладает активностью против указанных вирусов при концентрациях ниже токсических для клеток-носителей.

Низкая цитотоксичность и отсутствие противовирусной активности соединения **2** может быть следствием его агрегации в большие наноструктуры, не обладающие способностью проходить через клеточные мембраны. Подтверждение этого предположения требует исследования мембранотропных свойств соединения **2**, а также особенностей его самоорганизации в водных растворах. Эти исследования проводятся в настоящее время.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований нами показано, что синтезированный водорастворимый пирролидинофуллерен **2** имеет низкую цитотоксичность и высокую совместимость с биологическими системами. Это соединение представляется перспективным объектом для дальнейших исследований его биологических и физико-химических свойств.

Авторы выражают благодарность руководителю лаборатории вирусологии и химиотерапии Института медицинских исследований Католического университета Левена (Laboratory of Virology and Chemotherapy of the Rega Institute for Medical Research of Katholieke University in Leuven) профессору Я. Бальзарини за проведение испытаний пирролидинофуллерена **2** на противовирусную активность.

- Troshin, A. Peregudov, et al. // Chem. Eur. Journal – 2006. – 12. – p. 5569–5577.

4. Brettereich, M. A highly water-soluble dendro[60]fullerene. / M. Brettereich, A. Hirsch // Tetrahedron Lett. – 1998. – 39. – p. 2731–2734.

5. Troshina O. Chlorofullerene $\text{C}_{60}\text{C}_{16}$: a precursor for straightforward preparation of highly water-soluble polycarboxylic fullerene derivatives active against HIV / O. Troshina, P. Troshin, A. Peregudov, et al. // Org. Biomol. Chem. – 2007. – 5. – p. 2783–2791.

6. Wilson, S. The Potential of Fullerenes in Biology and Medicine. / S. Wilson // Perspectives of Fullerene Nanotechnology. – Ed. Osawa, E. – Kluwer Academic Publ., – Dordrecht, Boston, London. – 2001. – P. 155-163.

7. Lin, A. Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain . / A. Lin, S. Fang, S. Lin, et al. // Neuroscience Research – 2002. – 43. – p. 317–321.

8. Tabata, Y. Sonodynamic Effect of Polyethylene Glycol-Conjugated Fullerene on Tumor . / Y. Tabata, T. Ishii, T. Aoyama, et al. // Perspectives of Fullerene Nanotechnology. – Ed. Osawa, E. – Kluwer Academic Publ., – Dordrecht, Boston, London. – 2001. – P. 185-196.

9. Troshina, O. Lead (IV) acetate: an efficient reagent for synthesis of pyrrolidinofullerenes via oxidative coupling of C60 with esters of amino acids / O. Troshina, P. Troshin, A. Peregudov, et al. // Mendeleev Commun. – 2007. – 17. – p. 113–115.