

## Поликатионные производные *p*–*tert*–бутилтиакаликс[4]арена в стереоизомерной форме 1,3–альтернат: новые вещества для компактизации ДНК

Р. Р. Ибрагимова,<sup>a</sup> В. А. Бурилов,<sup>a@</sup> А. Р. Айметдинов,<sup>a</sup> Д. А. Миронова,<sup>a</sup>  
В. Г. Евтюгин,<sup>a</sup> Ю. Н. Осин,<sup>a</sup> С. Е. Соловьева,<sup>a,b</sup> И. С. Антипин<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Республика Татарстан, Россия

<sup>b</sup>ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, 420088 Казань, Республика Татарстан, Россия

@E-mail: [ultrav@bk.ru](mailto:ultrav@bk.ru)

Синтезированы новые водорастворимые амфифильные производные *p*–*tert*–бутилтиакаликс[4]арена в стереоизомерной форме 1,3–альтернат с разной длиной алкильных заместителей (C4, C8 и C14), содержащие в своем составе поликатионные фрагменты на основе диэтилентриамин. Данные макроциклы образуют устойчивые агрегаты в водных растворах с размерами 50–150 нм. С помощью флуоресцентного зонда – пирена получены значения критической концентрации агрегации, равные 24, 25 и 9 мкмоль/л для макроциклов с *O*–алкильными группами C4, C8 и C14, соответственно. Методом динамического и электрофоретического рассеяния света, а также люминесцентной спектроскопии с использованием интеркалятора – бромистого этидия – показано, что полученные макроциклы эффективно взаимодействуют с ДНК тимуса теленка. Причем интеркалятор эффективнее вытесняется из комплекса с ДНК более липофильным макроциклом: 28, 54 и 79 % в случае дибутил-, диоктил- и дитетрадецилпроизводных соответственно, что может быть обусловлено гидрофобными взаимодействиями между планарными ароматическими кольцами этидия катиона и алкильными заместителями макроцикла. Установлено, что синтезированные макроциклы приводят к конденсации ДНК и уменьшению его гидродинамического размера в воде до 5 раз, причем увеличение липофильности макроцикла ведет к более значительному уменьшению размера липоплекса с ДНК. Методами энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и ТЭМ установлены качественный элементный состав и дендриmero-подобная морфология агрегатов, перенесенных из водных растворов на углеродную подложку.

**Ключевые слова:** Катионные амфифилы, компактизация ДНК, *p*–*tert*–бутилтиакаликс[4]арен, ДНК тимуса теленка, этидий бромистый.

## Polycationic Derivatives of *p*–*tert*–Butylthiacalix[4]arene in 1,3–alternate Stereoisomeric Form: New DNA Condensing Agents

Regina R. Ibragimova,<sup>a</sup> Vladimir A. Burilov,<sup>a@</sup> Albert R. Aimetdinov,<sup>a</sup>  
Diana A. Mironova,<sup>a</sup> Vladimir G. Evtugyn,<sup>a</sup> Yurii N. Osin,<sup>a</sup> Svetlana E. Solovieva,<sup>a,b</sup>  
and Igor S. Antipin<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russian Federation

<sup>b</sup>A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry KSC RAS, 420088 Kazan, Russian Federation

@Corresponding author E-mail: [ultrav@bk.ru](mailto:ultrav@bk.ru)

One of the important challenges in gene therapy is to search safe and efficient gene carriers capable of compacting, protecting, transporting, and delivering nucleic acids into the cell. Most of condensing agents are functionalized on one side with appropriate cationic groups to act as DNA carriers, and, on the other side, with lipid-type chains that permit them to self-aggregate into well-defined aggregation patterns. Calixarenes and their thia-analogues are versatile

macrocyclic compounds that can combine the properties of both macrocyclic hosts and self-organizing systems, such as micelles and liposomes. In addition, their relatively easy synthesis, variety of stereoisomeric forms and their low toxicity levels make them really promising vectors in gene delivery applications. It is noteworthy that amphiphilic gene vectors based on calixarenes are generally presented only in cone stereoisomeric form, while 1,3-alternate stereoisomeric form also allows to achieve a spatial separation between hydrophilic and hydrophobic moieties of macrocycle. Herein we report the synthesis of new water-soluble amphiphilic derivatives of *p*-tert-butylthiacalix[4]arene in 1,3-alternate stereoisomeric form with different *O*-alkyl chain length (C4, C6, C14) containing polycationic diethylenetriammonium fragments. The synthesis of new macrocycles was done by stepwise functionalization of parent *p*-tert-butylthiacalix[4]arene using Mitsunobu reaction and the final introduction of diethylenetriammonium fragments using CuAAC protocol. The structure of new amphiphilic macrocycles was established by 1,2-D NMR and IR spectroscopy, MALDI-TOF spectrometry and elemental analysis. To evaluate their ability to form aggregates the values of critical concentrations of aggregation CCA were determined in aqueous solutions by a well-known fluorimetric method based on the pyrene emission spectra. The CCA values were equal to 24, 25 and 9  $\mu\text{mol}$  for *O*,*O*-dibutyl, *O*,*O*-dioctyl and *O*,*O*-ditetradecyl derivatives, respectively. A significant decrease of CCA value for more lipophilic macrocycle indicates the importance of hydrophobic interactions for aggregates formation. According to the dynamical and electroforetical light scattering data new macrocycles form stable aggregates with the diameter within 70–100 nm. Such size values indicate that all investigated macrocycles form vesicle-like structures. In the case of *O*,*O*-ditetradecyl derivative a significant size decrease up to 50–60 nm was found and can be associated with an increased packing density of the resulting vesicles by enhancing hydrophobic interactions between lipophilic molecule fragments. Also, zeta potential values were measured by electrophoretic light scattering method. Measured values are + 60–+70 mV, what is in agreement with the polycationic nature of macrocycles, and correspond to the formation of colloidal systems with high stability. Binding of new polycationic macrocycles with nucleic acid was investigated using calf thymus DNA as model biopolymer and well-known DNA intercalator ethidium bromide. According to the dynamical, electroforetical light scattering data and fluorescent spectroscopy it was found that new polycationic macrocycles effectively interact with calf thymus DNA. Addition of all synthesized macrocycles in concentrations below the CAC does not lead to a significant change in the size of the calf thymus DNA, while at concentrations higher than that of CAC a significant compression of DNA in 2–5 times is observed. Increased lipophilicity of the macrocycles leads to the formation of more compact lipoplex. Furthermore it was found that ethidium bromide removal can be promoted by hydrophobic interactions between the planar aromatic ethidium ring and the surfactant tail groups. The proof of the ethidium bromide migration onto the surfactant tail groups is the non-linear Stern-Volmer curve having pronounced plateau accompanied by a bathochromic shift of the emission maximum at high concentration of *o*-tetradecyl substituted macrocycle that may be due to the location of the dye in the hydrophobic unit of aggregate.

**Keywords:** Cationic amphiphiles, DNA condensation, *p*-tert-butylthiacalix[4]arene, calf thymus DNA, ethidium bromide.

## Введение

Одной из основных проблем в генной терапии является поиск безопасных и эффективных трансфекционных агентов. В последние десятилетия много усилий исследователей было направлено на расширение спектра соединений, способных конденсировать, защищать и транспортировать нуклеиновые кислоты в клетку.<sup>[1,2]</sup> Невирусные трансфекционные агенты имеют ряд преимуществ по сравнению с вирусными, поскольку, как правило, они не вызывают иммунного ответа и позволяют переносить в клетку значительные количества ДНК.<sup>[3]</sup> Однако, жесткие требования к таким соединениям: эффективность трансфекции, малые концентрации, низкая цитотоксичность, биосовместимость, являются причиной постоянного интереса к синтезу и исследованию агрегационной активности новых амфифильных агентов-переносчиков. Наиболее часто используемыми невирусными векторами являются катионные липиды, поскольку они обеспечивают хорошие уровни трансфекции, структурно схожи с компонентами мембраны клетки и способны образовывать комплексы с отрица-

тельно заряженной ДНК – липоплексы за счет своего положительного заряда.<sup>[4]</sup> В свою очередь, среди катионных липидов наиболее перспективными являются поликатионные молекулы, поскольку они имеют меньшую цитотоксичность за счет уменьшения необходимых количеств липида на единицу ДНК.<sup>[5]</sup>

В последнее время был предложен ряд векторов на основе макроциклических соединений, таких как каликсарены,<sup>[6,7]</sup> пилларены,<sup>[8]</sup> циклодестрины.<sup>[7,9]</sup> Большинство этих молекул включают две четко пространственно организованные молекулярные области. Одна из них включает положительно заряженные центры для того, чтобы выступать в качестве ДНК переносчиков, а другая сторона – цепи липидного типа для осуществления направленной агрегации. В этом контексте каликсарены прекрасно подходят для дизайна подобных соединений и способны объединить свойства как макроциклических рецепторов, так и систем, самоорганизующихся в мицеллы и липосомы.<sup>[9–13]</sup> К тому же, их относительно легкий синтез и функционализация, а также низкая токсичность делает их перспективными молекулярными платформами для создания невирусных векторов для доставки

генов в клетки. В основном для создания амфифильных соединений каликсарены используются в стереоизомерной форме конус.<sup>[6,7]</sup>

Ранее нами была разработана универсальная стратегия синтеза амфифильных производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена (Т[4]СА) в стереоизомерной форме *1,3-альтернат* с возможностью функционализации макроцикла любыми полярными функциональными группами в условиях медь-катализируемой реакции циклоприсоединения азидов к алкинам (CuAAC).<sup>[9-13]</sup> В настоящей работе эта стратегия была эффективно применена для получения новых амфифильных поликатионных производных Т[4]СА в стереоизомерной форме *1,3-альтернат*, для которых были изучены их агрегация в водных растворах и взаимодействие с модельной нуклеиновой кислотой.

## Экспериментальная часть

Растворители перед применением очищали по известным методикам.<sup>[14]</sup> В работе использовались коммерчески доступные реагенты из каталогов фирм Sigma-Aldrich и Alfa-Aesar. Синтез исходного *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена,<sup>[15]</sup> 5,11,17,23-тетра-трет-бутил-25,27-дибутилокси-26,28-ди-3-азидопропилокси-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арена (**1a**),<sup>[11]</sup> 5,11,17,23-тетра-трет-бутил-25,27-диоктилокси-26,28-ди-3-азидопропилокси-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арена (**1b**),<sup>[11]</sup> 5,11,17,23-тетра-трет-бутил-25,27-дитетрадецилокси-26,28-ди-3-азидопропилокси-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арена (**1в**)<sup>[11]</sup> и *N,N*-бис[2-(трет-бутилкарбониламино)этил]пропаргиламина<sup>[16]</sup> произведен согласно литературным методикам. Чистоту веществ контролировали методом ТСХ на пластинках "Merck UV 254" с использованием ультрафиолетовой лампы VL-6.LC (6W –254 nm). Элементный анализ выполнен на CHNS/O анализаторе "Perkin Elmer PE 2400 series 2". ЯМР эксперименты выполнены на спектрометре Avance 400 Nanobay фирмы «Bruker». В качестве внутреннего стандарта использовали CDCl<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  7.26 м.д.). Масс-спектры MALDI получены на масс-спектрометре UltraFlex III TOF/TOF в линейном режиме, в качестве матрицы использовали *n*-нитроанилин. Лазер Nd:YAG,  $\lambda$ =355 нм. Фиксировались положительно заряженные ионы. Температура плавления веществ определялась с помощью нагревательного столика Stuart SMP10.

ДРС и ЭРС эксперименты были выполнены на приборе Zetasizer Nano (Malvern Instruments, USA) с использованием 10 mW 633 нм He-Ne лазера, полученные данные были обработаны программой DTS (Dispersion Technology Software 5.00). Растворы были предварительно отфильтрованы через фильтр Millex HV 0.45  $\mu\text{M}$ , эксперименты выполнены в пластиковых кюветах DTS 0012 (Sigma-Aldrich, USA) при 25 °С. Для каждого образца проводилось минимум три измерения.

Флуоресцентные эксперименты были выполнены в 10 мм. кварцевых кюветах на приборе Fluorolog FL-221 (HORIBA Jobin Yvon). Для измерения флуоресценции пирена использовались следующие параметры:  $\lambda_{\text{возб}}$ =335 нм, диапазон съемки 350–430 нм; для этидий бромид:  $\lambda_{\text{возб}}$ =500 нм, диапазон съемки 540–670 нм.

Трансмиссионная электронная микроскопия была выполнена на приборе Hitachi HT7700 Exalens (Japan) в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» Казанского Федерального Университета. Изображения были получены при ускоряющем напряжении 100 кВ. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия была выполнена с использованием детектора Oxford Instruments

X-Max<sup>n</sup> 80T. Образцы предварительно диспергировались в ультразвуковой ванне в течение 10 минут, затем распределялись на медной сетке с углеродной подложкой (200 mesh) и сушились при 80 °С в течение 3 часов.

**Общая методика синтеза соединений 2–4:** в круглодонную колбу поместили 0.2 г (0.2 ммоль) азидопроизводного *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, *N,N*-бис[2-(трет-бутилкарбониламино)этил]пропаргиламин (0.734 ммоль, 2 экв.), йодид меди (9.2·10<sup>−3</sup> ммоль, 0.05 экв.), 10 мл толуола и 2 мл триэтиламина (14 ммоль). Смесь перемешивали в инертной атмосфере при комнатной температуре 19 часов. За ходом реакции следили по ТСХ (элюент г/э=16/1). Для выделения соединений реакцию смесь упарили досуха на ротационном испарителе, добавили 50 мл хлористого метилена, промыли раствором аммиака (3×20 мл), затем промыли водой (3×50 мл), после чего органическую фазу сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали, затем упарили досуха на ротационном испарителе. Полученное желтое масло высаживали гексаном, выпавший осадок выделили, получив порошок кремового цвета.

**5,11,17,23-Тетра-трет-бутил-25,27-дибутилокси-26,28-бис[3-(4-((бис(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этил)амино)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропокси]-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен (2).** Выход 80 %. MALDI-TOF (*p*-NA) *m/z*: 1683 [M]<sup>+</sup>. Найдено (%): C, 62.71; H, 8.37; N, 9.88 S, 7.57. Вычислено для C<sub>88</sub>H<sub>138</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub> (%): C, 62.75; H, 8.26; N, 9.98 S, 7.61. T<sub>пл.</sub> (с разл.)= 286–287 °С. ИК (KBr)  $\nu_{\text{макс}}$  см<sup>−1</sup>: 3342 (–NH–) ср., 2962 (–CH<sub>3</sub>) с., 2929 (–CH<sub>2</sub>–) с., 1690 (–CO–) с., 1267 (=C–O–) с. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 0.80 (т, J = 7.3 Гц, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.85–1.00 (м, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.03–1.35 (м, 40H), 3.87–5 (м, 8H, OCH<sub>2</sub>, TrzCH<sub>2</sub>N), 4.03 (т, J=6.7 Гц, 4H, OCH<sub>2</sub>), 4.10 (т, J=7.95 Гц, 4H, CH<sub>2</sub>Trz), 5.18 (уш.с., 4H, NH), 7.23 (с, 4H, ArH), 7.35 (с, 4H, ArH), 7.56 (с, 2H, TrzH). <sup>13</sup>C ЯМР (100.6 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 146.16, 145.88, 143.71, 131.04, 128.95, 128.61, 128.20, 127.83, 126.85, 125.19, 122.84, 68.60, 66.28, 53.07, 48.06, 38.40, 34.34, 34.28, 31.43, 31.28, 30.54, 29.84, 28.64, 23.14, 19.00, 14.05.

**5,11,17,23-Тетра-трет-бутил-25,27-диоктилокси-26,28-бис[3-(4-((бис(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этил)амино)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропокси]-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен (3).** Выход 78%. MALDI-TOF (*p*-NA) *m/z*: 1796 [M]<sup>+</sup>. Найдено (%): C, 64.13; H, 8.75; N, 9.30 S, 7.11. Вычислено для C<sub>96</sub>H<sub>154</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub> (%): C, 64.18; H, 8.64; N, 9.36; S, 7.14. T<sub>пл.</sub> (с разл.)=290–291 °С. ИК (KBr)  $\nu_{\text{макс}}$  см<sup>−1</sup>: 3342 (–NH–) ср., 2962 (–CH<sub>3</sub>) с., 2929 (–CH<sub>2</sub>–) с., 1690 (–CO–) с., 1267 (=C–O–) с. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 0.79–0.90 (м, 14 H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1.02–1.32 (м, 52H, CH<sub>2</sub>, CMe<sub>3</sub>), 1.44 (с, 36H, Me<sub>3</sub>C<sup>Boc</sup>), 1.70–1.81 (м, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.57 (т, J=5.9 Гц, 8H, NCH<sub>2</sub>), 3.12–3.27 (м, 8H, CH<sub>2</sub>NH), 3.67–3.81 (м, 8H, OCH<sub>2</sub>, TrzCH<sub>2</sub>N), 4.03 (т, J=6.7 Гц, 4H, OCH<sub>2</sub>), 4.09 (т, J=7.3 Гц, 4H, CH<sub>2</sub>Trz), 5.18 (уш.с., 4H, NH), 7.22 (с, 4H, ArH), 7.34 (с, 4H, ArH), 7.55 (с, 2H, TrzH). <sup>13</sup>C ЯМР (100.6 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 56.82, 156.79, 156.34, 146.16, 145.85, 143.64, 131.00, 128.92, 128.81, 128.59, 128.22, 127.76, 127.48, 126.75, 125.65, 122.81, 79.18, 68.72, 66.29, 53.06, 48.03, 38.38, 34.37, 34.27, 31.97, 31.41, 31.25, 30.59, 29.82, 29.79, 28.61, 25.93, 22.71, 14.20.

**5,11,17,23-Тетра-трет-бутил-25,27-дитетрадецилокси-26,28-бис[3-(4-((бис(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этил)амино)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)пропокси]-2,8,14,20-тетратиакаликс[4]арен (4).** Выход 73 %. MALDI-TOF (*p*-NA) *m/z*: 1964 [M]<sup>+</sup>. Найдено (%): C, 65.95; H, 9.27; N, 8.47 S, 6.46. Вычислено для C<sub>108</sub>H<sub>178</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub> (%): C, 66.02; H, 9.13; N, 8.55; S, 6.53. T<sub>пл.</sub> (с разл.)=290–291 °С. ИК (KBr)  $\nu_{\text{макс}}$  см<sup>−1</sup>: 3342 (–NH–) ср., 2962 (–CH<sub>3</sub>) с., 2929 (–CH<sub>2</sub>–) с., 1690 (–CO–) с., 1267 (=C–O–) с. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 0.80 (т, J=7.3 Гц, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.84–0.98 (м, 16H, CH<sub>2</sub>), 1.00–1.33 (м, 68H, CH<sub>2</sub>, CMe<sub>3</sub>), 1.45 (с, 36H, Me<sub>3</sub>C<sup>Boc</sup>), 1.68–1.80 (м, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.57 (т, J=5.9 Гц, 8H, NCH<sub>2</sub>), 3.18–3.25 (м, 8H, CH<sub>2</sub>NH), 3.75–3.85 (м, 8H, OCH<sub>2</sub>, TrzCH<sub>2</sub>N), 4.03 (т, J=6.7 Гц, 4H, OCH<sub>2</sub>), 4.09 (т,



$J=7.4$  Гц, 4H, CH<sub>2</sub>Trz), 5.17 (уш.с., 4H, NH), 7.23 (с, 4H, ArH), 7.35 (с, 4H, ArH), 7.55 (с, 2H, TrzH). <sup>13</sup>C ЯМР (100.6 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 156.93, 156.76, 156.39, 146.16, 145.89, 143.66, 131.04, 129.33, 128.96, 128.61, 128.20, 127.83, 126.85, 122.83, 79.19, 77.48, 77.16, 76.84, 68.60, 66.29, 53.07, 48.06, 38.41, 34.42, 34.31, 31.43, 31.28, 30.55, 29.85, 28.64, 23.88, 19.00, 14.05.

**Общая методика синтеза соединений 5–7:** 0.1 ммоль соединения **1–3** растворяли в 10 мл 1,4-диоксана и по каплям добавляли 0.33 мл (4 ммоль) концентрированной соляной кислоты. Смесь перемешивали 30–45 часов при комнатной температуре. Для выделения соединений реакционную смесь упаривали досуха на роторном испарителе.

**5, 11, 17, 23-Тетра-трет-бутил-25, 27-дибутилокси-26, 28-бис{3-(4-((бис(2-(амино)этил)амино)метил)-1H-1, 2, 3-триазол-1-ил)пропокси}-2, 8, 14, 20-тетратиакаликс[4]арена гексагидрохлорид (5).** Выход 95 %. MALDI-TOF (*p*-NA)  $m/z$ : 1282 [M-6HCl]<sup>+</sup>, 1305 [M-6HCl+Na]<sup>+</sup>. Найдено (%): C, 54.39; H, 7.62; N, 11.14; S, 8.47. Вычислено для C<sub>68</sub>H<sub>112</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>12</sub>O<sub>4</sub>S<sub>4</sub> (%): C, 54.35; H, 7.51; N, 11.19; S, 8.53.  $T_{пл}$  (с разл.)=230–231 °С. ИК (KBr)  $\nu_{макс}$  см<sup>-1</sup>: 3252 (–NH<sub>2</sub>) с., 2959 (–CH<sub>3</sub>) с., 2920 (–CH<sub>2</sub>–) с., 1268 (=C–O–) с. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 0.75 (т,  $J=7.3$  Гц, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.88–0.98 (м, 4H, CH<sub>2</sub>), 0.99–1.33 (м, 40H, CH<sub>2</sub>, CMe<sub>3</sub>), 1.52–1.67 (м, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.60–2.80 (м, 8H, NCH<sub>2</sub>), 3.00 (уш.с., 8H, CH<sub>2</sub>NH), 3.74 (т,  $J=7.46$  Гц, 4H, OCH<sub>2</sub>), 3.80–3.95 (м, 8H, OCH<sub>2</sub>, TrzCH<sub>2</sub>N), 4.19 (т,  $J=6.4$  Гц, 4H, CH<sub>2</sub>Trz), 5.18 (уш.с., 4H, NH), 7.28 (с, 4H, ArH), 7.33 (с, 4H, ArH), 8.01 (уш.с., 8H, NH<sub>2</sub>), 8.07 (с, 2H, TrzH). <sup>13</sup>C ЯМР (100.6 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 156.33, 156.15, 145.75, 145.71, 127.70, 127.54, 127.36, 127.30, 127.22, 76.63, 66.41, 65.74, 64.05, 50.06, 49.55, 46.94, 36.27, 33.98, 30.93, 30.86, 18.43, 13.82.

**5, 11, 17, 23-Тетра-трет-бутил-25, 27-диоктилокси-26, 28-бис{3-(4-((бис(2-(амино)этил)амино)метил)-1H-1, 2, 3-триазол-1-ил)пропокси}-2, 8, 14, 20-тетратиакаликс[4]арена гексагидрохлорид (6).** Выход 94 %. MALDI-TOF (*p*-NA)  $m/z$ : 1395 [M-6HCl]<sup>+</sup>, 1418 [M-6HCl+Na]<sup>+</sup>. Найдено (%): C, 56.61; H, 8.04; N, 10.36; S, 7.86. Вычислено для C<sub>76</sub>H<sub>128</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>12</sub>O<sub>4</sub>S<sub>4</sub> (%): C, 56.53; H, 7.99; N, 10.41; S, 7.94.  $T_{пл}$  (с разл.)=253–254 °С. ИК (KBr)  $\nu_{макс}$  см<sup>-1</sup>: 3252 (–NH<sub>2</sub>) с., 2959 (–CH<sub>3</sub>) с., 2920 (–CH<sub>2</sub>–) с., 1268 (=C–O–) с. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 0.75–0.87 (м, 14H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>), 1.03–1.30 (м, 52H, CH<sub>2</sub>, CMe<sub>3</sub>), 1.54–1.65 (м, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.60–2.69 (м, 8H, NCH<sub>2</sub>), 3.00 (уш.с., 8H, CH<sub>2</sub>NH), 3.70 (т,  $J=6.5$  Гц, 4H, OCH<sub>2</sub>), 3.79–3.91 (м, 8H, OCH<sub>2</sub>, TrzCH<sub>2</sub>N), 4.18 (т,  $J=6.8$  Гц, 4H, CH<sub>2</sub>Trz), 7.27 (с, 4H, ArH), 7.32 (с, 4H, ArH), 7.97 (уш.с., 8H, NH<sub>2</sub>), 8.07 (с, 2H, TrzH). <sup>13</sup>C ЯМР

(100.6 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 156.19, 145.79, 145.74, 127.51, 127.30, 127.11, 126.75, 126.72, 76.62, 68.00, 65.80, 62.74, 50.16, 49.52, 46.98, 36.28, 33.97, 33.24, 31.38, 30.91, 30.85, 29.80, 29.38, 29.23, 28.99, 28.27, 28.25, 25.22, 21.97.

**5, 11, 17, 23-Тетра-трет-бутил-25, 27-диоктилокси-26, 28-бис{3-(4-((бис(2-(амино)этил)амино)метил)-1H-1, 2, 3-триазол-1-ил)пропокси}-2, 8, 14, 20-тетратиакаликс[4]арена гексагидрохлорид (7).** Выход 94 %. MALDI-TOF (*p*-NA)  $m/z$ : 1563 [M-6HCl]<sup>+</sup>. Найдено (%): C, 59.35; H, 8.66; N, 9.36; S, 7.14. Вычислено для C<sub>88</sub>H<sub>152</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>12</sub>O<sub>4</sub>S<sub>4</sub> (%): C, 59.27; H, 8.59; N, 9.43; S, 7.19.  $T_{пл}$  (с разл.)=258–259 °С. ИК (KBr)  $\nu_{макс}$  см<sup>-1</sup>: 3252 (–NH<sub>2</sub>) с., 2959 (–CH<sub>3</sub>) с., 2920 (–CH<sub>2</sub>–) с., 1268 (=C–O–) с. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 0.86 (уш.с., 6H, CH<sub>3</sub>), 1.00–1.44 (м, 84H, CH<sub>2</sub>, CMe<sub>3</sub>), 1.58 (уш.с. 4H, CH<sub>2</sub>), 2.65–2.78 (уш.с. 8H, NCH<sub>2</sub>), 2.99 (уш.с., 8H, CH<sub>2</sub>NH), 3.57–3.94 (м, 12H, OCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>, TrzCH<sub>2</sub>N), 4.18 (уш.с., 4H, CH<sub>2</sub>Trz), 7.27 (с, 4H, ArH), 7.32 (с, 4H, ArH), 7.71–8.17 (м, 10H, NH<sub>2</sub>, TrzH). <sup>13</sup>C ЯМР (100.6 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °С)  $\delta$  м.д.: 156.19, 145.79, 145.74, 127.51, 127.30, 127.11, 126.75, 126.72, 76.62, 71.51, 68.00, 65.80, 62.74, 50.16, 49.52, 46.98, 40.40, 40.15, 39.94, 39.73, 39.52, 39.31, 39.10, 38.89, 36.28, 33.97, 33.24, 31.38, 30.91, 30.85, 29.80, 29.38, 29.23, 28.99, 28.27, 28.25, 25.22, 21.97.

## Результаты и их обсуждение

### Синтез поликатионных макроциклов

В качестве исходного соединения для получения целевых макроциклов были выбраны азид-содержащие прекурсоры **1a–в**, синтез которых был описан ранее.<sup>[10,11]</sup> Он основан на ступенчатой функционализации в условиях реакции Мицунобу исходного тиакаликсарена через образование дистальных диалкилпроизводных, свободные гидроксилы которых подвергаются дальнейшей модификации введением бромпропильных групп с последующим замещением атома брома на азидо-группу. Поликатионные ди-Вос-замещенные T[4]CA **2–4** (Схема 1) с разной длиной алкильных заместителей получают в условиях CuAAC реакции при комнатной температуре за 18 часов с использованием в качестве алкинильной компоненты *N,N*-бис[2-(трет-бутилкарбониламино)этил]-пропаргиламина, двустадийный синтез которого был

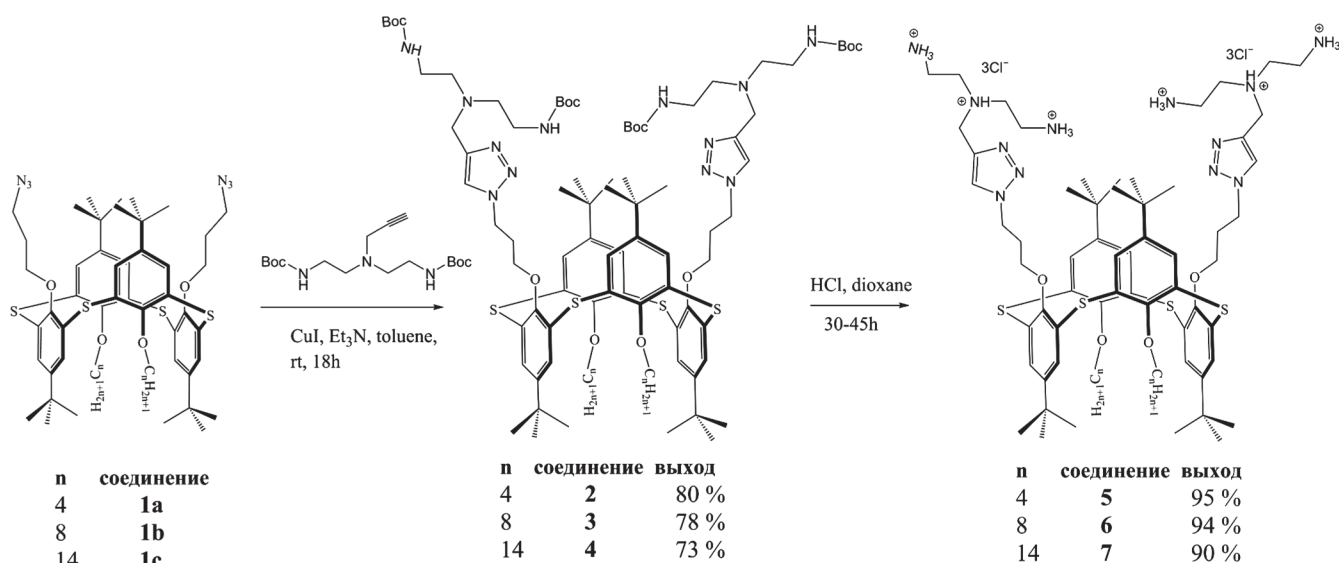


Схема 1

осуществлен по литературной методике.<sup>[16]</sup> Авторами работы<sup>[16]</sup> показано, что использование данного амина при модификации циклодекстрина позволило получить высокоэффективные макроциклические трансфекционные агенты. Последующее снятие Вос защиты было проведено в диоксане в присутствии соляной кислоты, в результате чего соединения **5–7** были выделены в виде гексагидрохлоридов с практически количественными выходами. Структура и состав продуктов были доказаны комплексом физических методов исследования: ЯМР и ИК-спектроскопией, MALDI-TOF спектрометрией и элементным анализом.

Приписание сигналов в ЯМР  $^1\text{H}$  спектрах было проведено с помощью 2D ЯМР – NOESY экспериментов. В качестве примера на Рисунке 1 приведен NOESY спектр соединения **6**. Как видно, в спектре наблюдается ряд характерных кросс-пиков, указывающих на образование стереоизомерной формы *1,3-альтернат* для данных макроциклов: (а) между сигналом протона триазольного цикла ( $\delta=8.07$  м.д.) и сигналами протонов метиленовых фрагментов диэтилентриаммонийного фрагмента ( $\delta=2.64$ ,  $2.99$  м.д.); (б) между сигналом протона ароматического кольца каликсарена ( $\delta=7.28$  м.д.) и сигналами протонов триметиленового линкера; (в) между ароматическими протонами с  $\delta=7.32$  м.д. и протонами метиленовых и метильных фрагментов октильных заместителей ( $\delta=3.70$ ,  $0.87$  м.д.), (г) между сигналом протонов первичных аминогрупп ( $\delta=7.97$  м.д.) и сигналами протонов метиленовых фрагментов диэтилентриаммонийного фрагмента ( $\delta=2.64$  и  $3.02$  м.д.).

### Изучение агрегации макроциклов **5–7** в воде

Как и следовало ожидать, полученные поликатионные макроциклы **5–7** прекрасно растворимы в воде. Для

оценки их способности образовывать агрегаты в водных растворах были определены критические концентрации агрегации (ККА). Для этого был использован хорошо известный флуориметрический метод, основанный на измерении отношения интенсивностей первого ( $373$  нм) и третьего ( $383$  нм) максимумов в спектре испускания пирена, которые крайне чувствительны к изменению полярности среды при солюбилизации пирена в гидрофобном слое мицелл или везикул.<sup>[17]</sup> Согласно расчётам, значения ККА оказались равны  $24$ ,  $25$  и  $9$  мкмоль для макроциклов **5**, **6** и **7**, соответственно. Существенное уменьшение величин ККА в случае макроцикла **7** хорошо согласуется с его большей липофильностью по сравнению с соединениями **5** и **6**.

Образование наноагрегатов в водных растворах было подтверждено данными метода динамического рассеяния света (ДРС). Полученные данные представлены в Таблице 1. Важно отметить, что образование наночастиц в воде наблюдается при концентрациях каликсаренов выше величин ККА. Судя по большим размерам агрегатов, можно предположить, что все макроциклы образуют везикулоподобные структуры. В случае каликсарена **5** размер агрегатов составляет порядка  $70$ – $90$  нм, в случае каликсарена **6** – несколько больше, около  $100$  нм, а в случае тетрадецилпроизводного **7** происходит резкое уменьшение размеров до  $50$ – $60$  нм, что может быть связано с увеличением плотности упаковки образующихся везикул за счет усиления гидрофобных взаимодействий между липофильными фрагментами молекулы. Также при помощи метода электрофоретического рассеяния света для всех макроциклов были измерены значения дзета-потенциала, которые составили  $+(60$ – $70)$  мВ, что хорошо согласуется с поликатионной природой макроциклов и соответствует коллоидным системам с высокой стабильностью.

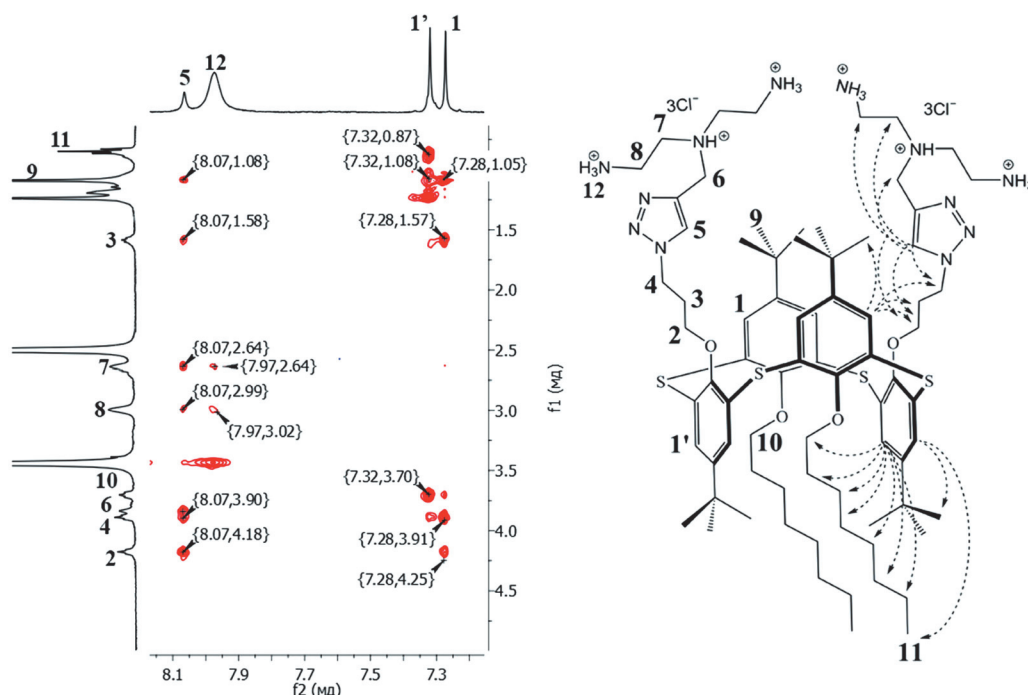


Рисунок 1. ЯМР 2D NOESY ( $\text{DMSO}-d_6$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) спектр соединения **6**.

**Таблица 1.** Величины среднего гидродинамического диаметра ( $Z_{\text{average}}$ ), индекса полидисперсности (PDI) и величины электрофоретического потенциала ( $\xi$ ) в водных растворах соединений **5–7** при разных концентрациях ( $C_{\text{каликс}}$ ).

$C_{\text{каликс}},$ ммоль	$Z_{\text{average}},$ нм	PDI	$\xi,$ мВ	$Z_{\text{average}},$ нм	PDI	$\xi,$ мВ	$Z_{\text{average}},$ нм	PDI	$\xi,$ мВ
Соединение 5				Соединение 6			Соединение 7		
0.01	—	—	—	—	—	—	61±1	0.343±0.09	—
0.025	78±2	0.259±0.02	—	83±3	0.315±0.01	—	48±1	0.252±0.01	—
0.05	88±2	0.195±0.01	+59±1	94±2	0.249±0.02	+67±5	51±1	0.301±0.03	+72±2
0.1	93±3	0.210±0.02	—	106±2	0.174±0.05	—	50±1	0.328±0.01	—
0.25	84±2	0.177±0.02	—	100±3	0.249±0.01	—	48±1	0.319±0.04	—
0.5	80±2	0.173±0.01	—	100±2	0.247±0.01	—	49±1	0.330±0.04	—
0.75	77±2	0.202±0.01	—	128±3	0.268±0.01	—	62±1	0.235±0.01	—
1.0	74±2	0.221±0.01	+66±5	123±4	0.290±0.02	+61±2	62±1	0.205±0.01	+74±5

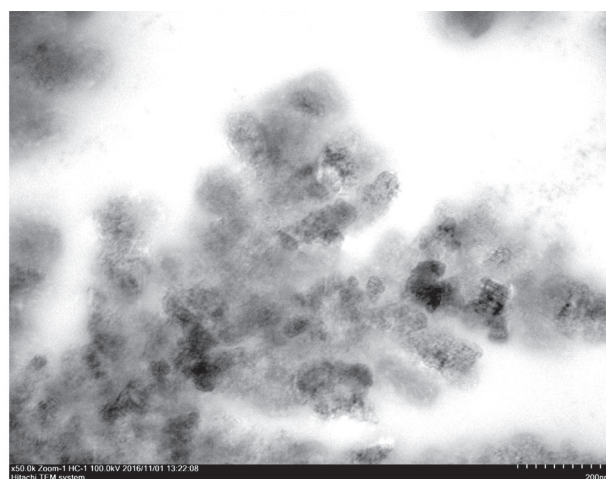
Интересные результаты были получены при изучении морфологии агрегатов соединений **5–7**, перенесенных из водного раствора соединения на углерод-напыленную медную сетчатую пластину (200 mesh) с последующим высушиванием при комнатной температуре. По данным трансмиссионной электронной микроскопии на подложке образуются дендримеро-подобные агрегаты с четко-выраженным центром зарождения (Рисунок 2). На снимке со шкалой 200 нм (Рисунок 2) хорошо видно, что каждая ветвь дендримера состоит из конгломератов сферических агрегатов с размерами порядка 100 нм.

Образец также был проанализирован при помощи метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии для установления качественного элементного состава образующихся супрамолекулярных архитектур и подтверждения участия в их образовании синтезированных тиакаликсаренов. Из ЭДР-спектра (Рисунок 3) видно, что помимо меди, присутствующей в спектре вследствие попадания части электронов на медную сетчатую подложку с последующей эмиссией, а также натрия, калия, кремния и кальция, присутствующих в стеклянной химической посуде, в образце присутствуют сигналы углерода, азота, кислорода, серы и хлора,

в полном соответствии с составом синтезированных соединений.

#### Взаимодействие макроциклов **5–7** с ДНК тимуса теленка

В качестве модельной нуклеиновой кислоты для изучения взаимодействия биополимеров с синтезированными катионными амфифилами была выбрана ДНК тимуса теленка (ТТ ДНК), которая широко используется для установления взаимодействия с различными молекулами, в том числе и производными каликсаренов.<sup>[6,18–19]</sup> Одним из наиболее распространённых методов изучения связывания молекул с ДНК является флуоресцентный метод, основанный на конкурентном вытеснении красителя – бромистого этидия (ЭБ) из молекулы ДНК. При интеркаляции ЭБ в ДНК фенантридиновое кольцо ЭБ располагается между смежными парами оснований двойной спирали.<sup>[20]</sup> Об образовании комплекса, как правило, свидетельствуют синий сдвиг максимума эмиссии и ее существенное увеличение. Любые небольшие изменения в структуре ДНК вследствие его взаимодействия с какими-либо молекулами оказывают влияние

**Рисунок 2.** ТЭМ-микрофотографии агрегатов, образованных соединением **5** ( $C=0.5$  ммоль).

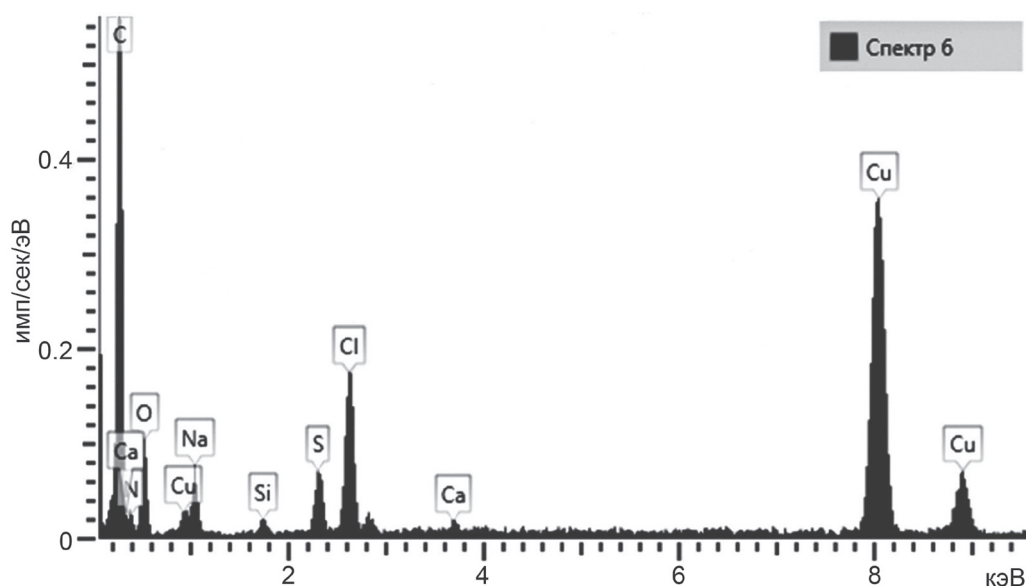
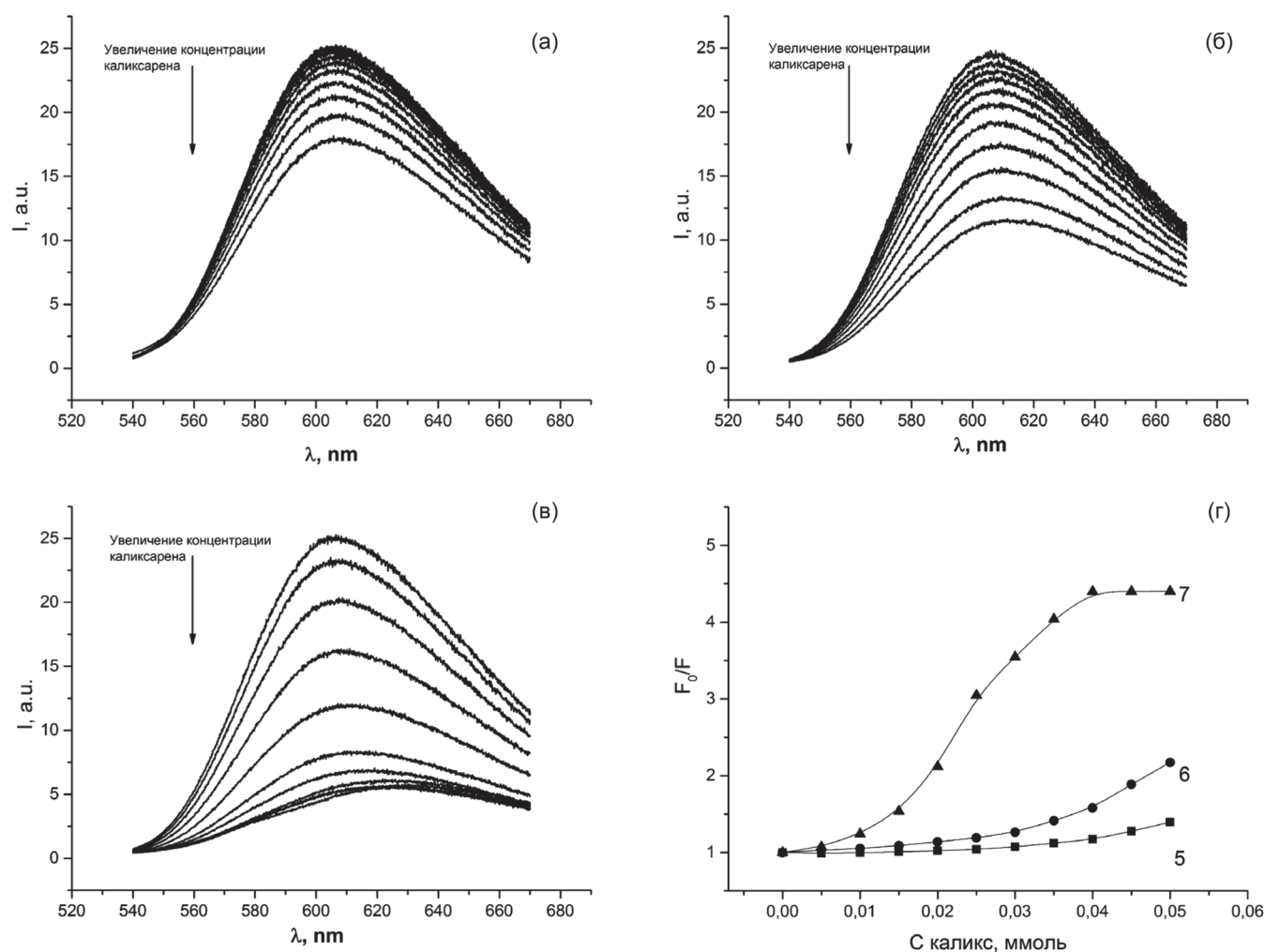


Рисунок 3. ЭДР-спектр агрегатов соединения 5.

Рисунок 4. Спектры флуоресценции ЭБ в системе ТТ ДНК–тиакалисарен **5** (а), **6** (б), **7** (в) и кривые в координатах Штерна-Фольмера, где  $F_0/F$  - отношение интенсивностей люминесценции ЭБ-ТТ ДНК при 612 нм в отсутствии и присутствии исследуемых макроциклов (г).  $C(\text{ЭБ})=1$  мкмоль,  $C(\text{ТТ ДНК})=1$  мкмоль,  $C(\text{ТРИС})=50$  ммоль,  $\text{pH}=7.3$ .



на микроокружение ЭБ и приводят к изменению его фотофизических характеристик. При взаимодействии с конкурентными молекулами-интеркаляторами часть ЭБ вытесняется. Таким образом, за счет уменьшения количества центров связывания происходит тушение эмиссии ЭБ. Максимум эмиссии ЭБ при возбуждении  $\lambda_{\text{возб}} = 500$  нм проявляется при 612 нм.

Согласно полученным данным (Рисунок 4,а-в), при добавлении производных тиакаликсарена **5–7** к раствору комплекса ТТ ДНК–ЭБ наблюдается существенное тушение люминесценции ЭБ. Наблюдаемый гипохромизм свидетельствует о вытеснении молекул ЭБ из соответствующих центров ТТ ДНК. При этом прослеживается четкая связь эффективности вытеснения ЭБ от липофильности макроцикла. В то время, как дибутилзамещенный макроцикл **5** вызывает лишь 28 % тушение люминесценции ЭБ, диоктил- (производное **6**) – 54 %, то в случае ди-тетрадецильного производного **7** наблюдается уже 79 % тушение люминесценции ЭБ. В случае макроцикла **7** при достижении концентрации макроцикла 40 мкмоль наблюдается батохромный сдвиг с  $\Delta\lambda = 18$  нм в люминесцентном спектре ЭБ (Рисунок 4,в). Это наглядно демонстрируется при представлении зависимости максимумов эмиссии от концентрации макроцикла в координатах Штерна-Фольмера (Рисунок 4,г) – при концентрации 40 мкмоль наблюдается выход на плато. Важно отметить, что графики тушения в координатах Штерна-Фольмера как для соединения **7**, так и для соединений **5** и **6** являются нелинейными, что свидетельствует о смешанном статическом и динамическом механизме тушения люминесценции ЭБ<sup>[21]</sup> и делает невозможным (некорректным) расчёт константы тушения.

Важно отметить, что головная группа макроциклов остается неизменной, поэтому наблюдаемая разница в тушении обусловлена увеличением липофильности макроциклов. Если принять во внимание значения ККА макроциклов, то становится ясным, что отклонение от линейности в графике начинается в концентрационном диапазоне, превышающем значения ККА. Таким образом, становится очевидным, что при взаимодействии амфифильных макроциклов с ТТ ДНК «высвобождение» ЭБ существенно облегчается при увеличении липофильности вследствие миграции красителя в гидрофобный слой образованных агрегатов. Косвенным свидетельством миграции ЭБ в случае соединения **7** является выход на плато кривой Штерна-Фольмера, сопровож-

жающийся батохромным сдвигом максимума эмиссии, что может быть следствием расположения красителя в гидрофобном слое агрегата. Этот вывод хорошо согласуется с литературными данными по изучению фотофизических характеристик комплекса ЭБ-ДНК в присутствии катионных ПАВ.<sup>[22]</sup> Однако остается неясным вопрос, что же происходит с ДНК при взаимодействии с макроциклами. По данным динамического рассеяния света (Таблица 2), средний гидродинамический диаметр ТТ ДНК составляет  $266 \pm 124$ , при этом система коллоидно неустойчива, что хорошо видно по значению электрофоретического потенциала (–6 мВ) и высокого значения индекса полидисперсности (0.740).

Добавление макроциклов **5–7** в концентрации ниже ККА не приводит к существенному изменению размеров ТТ ДНК, однако при увеличении концентрации макроциклов до значений, превышающих ККА, размеры частиц уменьшаются, причем при увеличении липофильности макроцикла размеры становятся меньше. Поверхностный отрицательный заряд увеличивается до значений ~20 мВ. Таким образом, все макроциклы вызывают сжатие ТТ ДНК в 2 и более раз причем самым эффективным является дитетрадецилокси производное **7**, сжимающее ТТ ДНК в 5 раз. Исходя из полученных данных, можно предположить, что при взаимодействии ТТ ДНК с агрегатами производных каликсарена происходит образование липоплекса, в котором ДНК «обматывает» агрегат, при этом часть молекул ЭБ мигрирует в гидрофобное ядро липоплекса.

## Выводы

Путем поэтапной функционализации *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена в условиях реакции Мицунобу азидопропильными фрагментами и последующей модификации в условиях CuAAC реакции впервые получены амфифильные поликатионные макроциклы, содержащие диэтилентриаммогнийные фрагменты с разной длиной *O*-алкильных заместителей. Обнаружено, что данные макроциклы образуют устойчивые агрегаты в водных растворах, а при высыхании формируют дендримероподобные агрегаты. С помощью метода динамического и электрофоретического рассеяния света, а также люминесцентной спектроскопии с использованием бромистого этидия показано, что полученные макроциклы эффектив-

**Таблица 2.\*** Величины среднего гидродинамического диаметра ( $Z_{\text{average}}$ ), индекса полидисперсности (PDI) и величины электрофоретического потенциала ( $\xi$ ) в водных растворах ТТ ДНК в присутствии соединений **5–7**.

Каликсарен / концентрация (мкмоль)	$Z_{\text{average}}$ , нм	PDI	$\xi$ , мВ
–	$266 \pm 124$	$0.740 \pm 0.40$	$-6 \pm 2$
<b>5</b> /10	$310 \pm 271$	$0.686 \pm 0.54$	
<b>5</b> /50	$140 \pm 22$	$0.388 \pm 0.30$	$-21 \pm 5$
<b>6</b> /10	$244 \pm 46$	$0.950 \pm 0.08$	
<b>6</b> /50	$91 \pm 8$	$0.139 \pm 0.04$	$-20 \pm 3$
<b>7</b> /5	$205 \pm 7$	$0.522 \pm 0.10$	
<b>7</b> /50	$57 \pm 1$	$0.344 \pm 0.02$	$-19 \pm 1$

\*C(ТТ ДНК) = 1 мкмоль, C(ТРИС) = 50 ммоль, pH = 7.3



но взаимодействуют с ДНК тимуса теленка, что приводит к пятикратному сжатию ДНК. Обнаружено, что при взаимодействии агрегатов поликатионных макроциклов с комплексом ДНК-бромистый этидий высвободившийся краситель мигрирует в гидрофобный слой агрегатов.

**Благодарности.** Благодарим Российский научный фонд (грант No. 14-13-01151) за финансовую поддержку.

## Список литературы

### References

1. Ibraheem D., Elaissari A., Fessi H. *Int. J. Pharm.* **2014**, 459, 70–83.
2. Verma I.M., Somia N. *Nature* **1997**, 389, 239–242.
3. Felgner P.L. *Sci. Am.* **1997**, 276, 102–106.
4. de Ilarduya C.T., Sun Y., Duezguenes N. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, 40, 159–170.
5. Boussein N.F., McAllister C.S., Ewert K.K., Samuel C.E., Safinya C.R. *Biochemistry* **2007**, 46, 4785–4792.
6. Barrán-Berdón A.L., Yélamos B., García-Río L., Domènech O., Aicart E., Junquera E. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 14404–14414.
7. Gallego-Yerga L., Lomazzi M., Franceschi V., Sansone F., Ortiz Mellet C., Donofrio G., Casnati A., García Fernández J.M. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 1708–1723.
8. Nierengarten I., Nothisen M., Sigwalt D., Biellmann T., Holler M., Remy J.-S., Nierengarten J.-F. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 17552–17558.
9. Burilov V.A., Ibragimova R.R., Gafiatullin B.H., Solovieva S.E., Antipin I.S. *Butlerov Commun.* **2016**, 8, 23–29 (in Russ.).
10. Burilov V.A., Nugmanov R.I., Ibragimova R.R., Solovieva S.E., Antipin I.S. *Mendeleev Commun.* **2015**, 25, 177–179.
11. Burilov V.A., Mironova D.A., Ibragimova R.R., Solovieva S.E., König B., Antipin I.S. *RSC Adv.* **2015**, 5, 101177–101185.
12. Burilov V., Mironova, D.A., Ibragimova R.R., Solovieva S.E., Antipin I.S. *BioNanoSci.* **2016**, 6, 427–430.
13. Burilov V., Valiyakhmetova A., Mironova D., Safiullin R., Kadirov M., Ivshin K., Kataeva O., Solovieva S., Antipin I. *RSC Adv.* **2016**, 6, 44873–44877.
14. Armarego W.L.F., Chai C.L.L. *Purification of Laboratory Chemicals*. New York: Elsevier, **2009**. 743 p.
15. Iki N., Kabuto C., Fukushima T., Kumagai H., Takeya H., Miyanari S., Miyashi T., Miyano S. *Tetrahedron* **2000**, 56, 1437–1443.
16. Méndez-Ardoy A., Gómez-García M., Mellet C., Sevilano N., Girón D., Salto R., Santoyo-González F., García-Fernández Org. *Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2681–2684.
17. Ranganathan R., Vautier-Giongo C., Bales B.L. *J. Phys. Chem., B* **2003**, 107, 10312–10318.
18. Rodik R.V., Anthony A.-S., Kalchenko V.I., Mély Y., Klymchenko A.S. *New J. Chem.* **2015**, 39, 1654–1664.
19. Ostos F.J., Lebron J.A., Moyá M.L., Deasy M., López-Cornejo P. *Colloids Surf., B* **2015**, 127, 65–72.
20. Guo Q., Lu M., Marky L.A., Kallenbach N.R. *Biochemistry* **1992**, 31, 2451–2455.
21. Lakowicz J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy. Quenching of Fluorescence*. New York: Kluwer Academic, **1999**.
22. Izumrudov V.A., Zhiryakova M.V., Goulko A.A. *Langmuir* **2002**, 18, 10348–10356.

Received 28.11.2016

Accepted 29.12.2016