

*В.Н. Алдобаев¹, Л.А. Еременко¹, А.А. Мазанова¹, Н.Р. Дядищев¹, В.Е. Мурадян²,
А.А. Масликов³*

Получение субстанции водорастворимых модифицированных укороченных одностенных (однослойных) нанотрубок - перспектива создания наноструктурированных лекарственных форм для фармпрепаратов нового поколения

¹ФГБУН «Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НИЦ ТБП ФМБА России), Серпухов, Московская обл.

²Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка Московской области

³Международный Университет природы, общества и человека «Дубна», филиал «Протвино», Московская область

Введение

В настоящее время мировым учёным сообществом проявлен большой интерес к наночастицам различной химической природы в качестве потенциальных лекарственных носителей (DDS – drug delivery system) при противораковой терапии (и лечении иных заболеваний), что обусловлено прежде всего возросшим спросом на новые эффективные препараты в области онкологии. В связи с этим наблюдается рост количества разработок и усиленное развитие нанотехнологий в области фармакологии.

Одностенные (однослойные) углеродные нанотрубки (ОУНТ) по мнению многих исследователей уже в недалеком будущем найдут свое широкое применение в качестве DDS. Для этого нужно решить проблемы, связанные с инертностью, практической нерастворимостью в водных средах и неупорядоченностью состава этого наноматериала.

В данной статье изложены практические подходы к синтезу субстанции водорастворимых модифицированных укороченных ОУНТ, представляющих собой, с нашей точки зрения, перспективный вариант инертного, малотоксичного носителя для применения в области онкологии.

Материалы и методы исследований

Одностенные (однослойные) углеродные нанотрубки на коммерческой основе были приобретены у Cheap Tubes Inc., США. Основные характеристики ОУНТ по паспорту: внешний диаметр (OD) – 1-2 нм; внутренний диаметр (ID) – 0,8-1,6 нм; длина (length) – 0,5-2,0 мкм; зольность (ash) < 1,5 %; показатель удельной поверхности (SSA) - 407 м²/г; насыпная плотность (BD) - 0,14 г/см³; истинная плотность (TD) - 2,1 г/см³; остаточное содержание аморфного углерода < 3,0 %; остаточное содержание MWCT (многостенных углеродных нанотрубок) < 5,0 %; способ получения – CVD.

Были подобраны условия «нарезки», уменьшения средней длины углеродных нанотрубок и получения укороченных ОУНТ (УОУНТ) для дальнейшей модификации.

Методика приготовления укороченных нанотрубок была основана на подходе [1], при котором ОУНТ предварительно диспергируются в разбавленной азотной кислоте посредством ультразвуковой обработки, а затем кипятятся с обратным холодильником в смеси 3/1 концентрированных серной/азотной кислот. Осаждение ОУНТ (УОУНТ) из суспензий проводили методом центрифугирования с использованием напольной центрифуги Sorvall WX80 с угловым ротором А-621. Ультразвуковую обработку суспензий выполняли на ультразвуковой ванне Ultrasonic cleaner Cole-Parmer 8891. Полноту и качество «нарезки» ОУНТ контролировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100. Средняя длина углеродных нанотрубок, обработанных подобным образом, по данным ПЭМ уменьшалась до 100-200 нм, верхняя граница диапазона длин УОУНТ оценивалась на уровне 500 нм.

Модификацию графеновой поверхности УОУНТ проводили по реакции с 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овой кислотой (1,3-диполярное циклопри-соединение азометиновых илидов к ОУНТ с образованием пирролидиновых колец на графеновой поверхности [2]) с последующим снятием Вос- защиты аминогрупп.

Предварительно 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овую кислоту синтезировали по реакции 1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликоля с глиоксалевой кислотой в метаноле в присутствии каталитических количеств Pd/C, используя метод восстановительного аминирования.

Полноту протекания реакций и индивидуальность синтезированного соединения контролировали методом ТСХ на пластинах Alugram® Xtra SIL G/UV₂₅₄ в системе гексан-этилацетат (10:1); спектры ЯМР ¹H снимали на спектрометре «Varian Mercury VX 200» в растворителе CDCl₃, используя в качестве внутреннего стандарта ТМС; масс-спектры получали на приборе GC-MS «Varian 1200 L» с электронной ионизацией при 70 эВ, используя прямой ввод образца в ионный источник.

Для обработки ОУНТ, синтеза PEG-линкера, модификации графеновой поверхности и проведения других реакций использовали следующие реактивы: серная кислота, ХЧ, по ГОСТ 4204-77; азотная кислота, марки А, по ГОСТ 701-89; перекись водорода 30 %, по ГОСТ 177-88, медицинская; параформ, Ч, по ТУ 6-09-3208-78; соляная кислота, ХЧ, по ГОСТ 3118-77; диметилфосфамид, ХЧ, по ГОСТ 20289-74; метанол, марки А, по ГОСТ 2222-95; этиловый спирт по ГОСТ 18300-87; хлористый метилен, по ГОСТ 9968-86, CAS 75-09-2, сорт высший; дистиллированная вода по ГОСТ 6709-72; 1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликоль синоним N-Вос- 2,2'-(ethylenedioxy) diethylamine, ≥ 95%, Sigma-Aldrich Corporation, CAS #153086-78-3; моногидрат глиоксалевой кислоты, glyoxylic acid monohydrate, 98 %, Sigma-Aldrich Corporation, CAS# 563-96-2.

Результаты и обсуждение

На I-й стадии получения субстанции водорастворимых модифицированных УОУНТ были подобраны оптимальные условия уменьшения средней длины CVD ОУНТ, полученных из конкретного источника (см. материалы и методы), для дальнейшей модификации.

Вся процедура сводилась к следующим основным последовательным этапам:

1. обработка на ультразвуковой ванне (100 Вт) суспензии ОУНТ в смеси концентрированных серной и азотной кислот, взятых в объемном отношении 3:1, при температуре 40 °С в течение 1 часа, концентрация суспензии ~ 2 г / 500 мл кислотной смеси;
2. разбавление суспензии дистиллированной водой (в 3-5 раз) с последующим центрифугированием (≥ 12 000 g, 1-2 часа, до хорошо сформированного осадка) и определением pH центрифугата;

3. ресуспендирование осадка УОУНТ в дистиллированной воде в объеме по п.1 и повторение центрифугирования по п. 2. 5-6 раз до установления нейтрального значения pH центрифугата;

4. ресуспендирование осадка УОУНТ в объеме по п.1 в смеси концентрированной серной кислоты и 30 % перекиси водорода, взятых в объемном соотношении 4:1, на ультразвуковой ванне (100 Вт) при температуре от 40 °С в течение 30 минут;

5. разбавление суспензии водой (в 3-5 раз) с последующим центрифугированием ($\geq 12\ 000$ g, 1-2 часа до хорошо сформированного осадка) и определением pH центрифугата;

6. ресуспендирование осадка УОУНТ в воде в объеме по п.1 и повторение центрифугирования по п. 5 5-6 раз до установления нейтрального значения pH центрифугата;

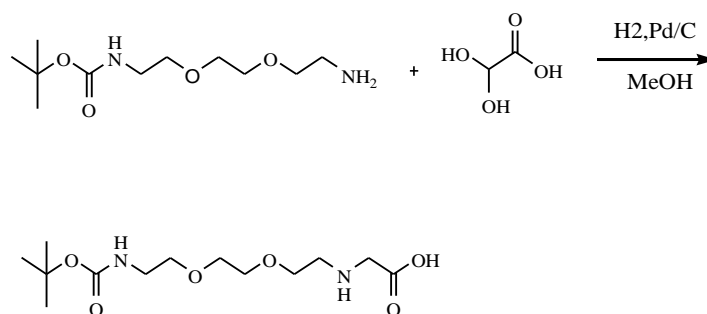
7. ресуспендирование осадка УОУНТ в перегнанном 96 % этиловом спирте с последующим центрифугированием полученной суспензии ($\geq 12\ 000$ g до хорошо сформированного осадка) в трехкратной повторности;

6. упаривание этанольной суспензии УОУНТ на роторном испарителе до сухого остатка с последующим высушиванием продукта в сухо-жаровом шкафу при 80 °С в течение 18 часов.

При реализации данной методики выход УОУНТ из исходного покупного материала составлял ~ 30 %.

На II-й стадии был отработан метод синтеза PEG-линкера для модификации графеновой поверхности УОУНТ. Метод выгодно отличался от метода, предложенного авторами [3], тем, что реакция проводилась в одну стадию, необходимый продукт получался с высоким выходом и не требовал дополнительной очистки.

2,2-Диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овая кислота образовывалась при насыщении водородом смеси 1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликоля и глиоксалевого кислоты в метаноле в присутствии каталитических количеств Pd/C по схеме



Реакцию проводили при следующих условиях: к раствору 1 г (4 ммоль) 1-N-Вос-1,8-диаминопропиленгликоля в 50 мл MeOH прибавляли 0,39 г (4,2 ммоль) моногидрата глиоксалевой кислоты и 0,1 г Pd/C 10 %. Через полученный раствор пропускали ток водорода при атмосферном давлении и комнатной температуре в течение 2 ч. По окончании реакции раствор фильтровали и упаривали в вакууме на роторном испарителе. В результате получили 1,15 г (93 %) 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овой кислоты.

^1H ЯМР и масс-спектр продукта соответствовали литературным данным. Спектры приведены на рис. 1 и 2 соответственно.

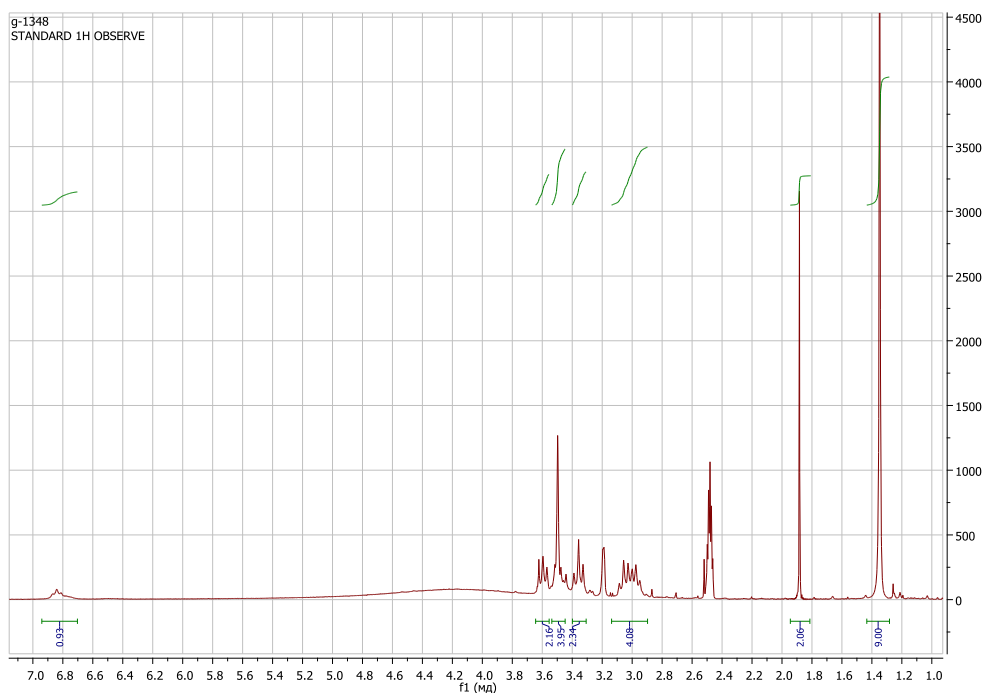
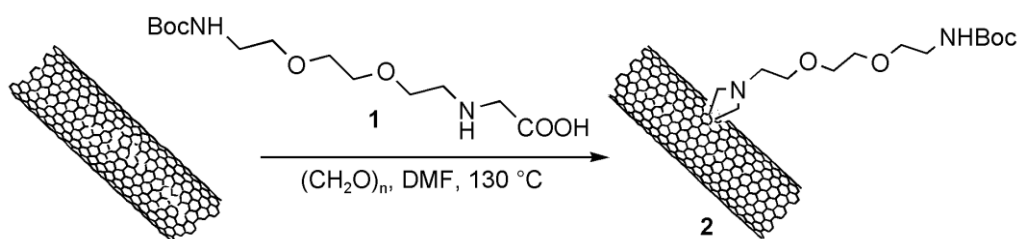


Рисунок 1. ^1H ЯМР спектр 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овой кислоты

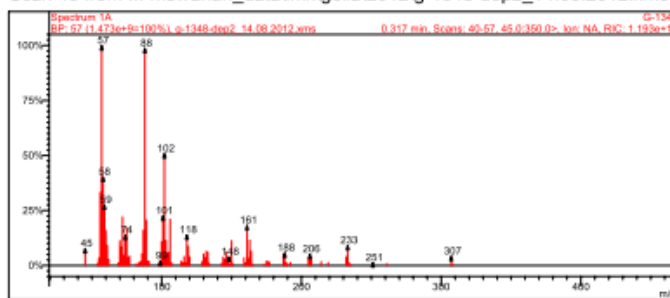
На III-й стадии модификацию УОУНТ проводили по методике, описанной в [4,5].

Полученная на II-й стадии 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овая кислота при нагревании в диметилформамиде в присутствии параформа образовывала соответствующий иминиевый катион, который в свою очередь вступал в реакцию 1-3 диполярного циклоприсоединения с соседними атомами углерода графеновой поверхности по схеме:



Реакцию проводили при следующих условиях: к суспензии 0,7 г механически измельченных УОУНТ в 200 мл диметилформамида (ДМФА) при интенсивном перемешивании прибавляли 0,1 г (0,33 ммоль) 2,2-Диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овой кислоты и 0,01 г (3,33 ммоль) параформа. Полученный раствор кипятили 90 ч в атмосфере аргона. По окончании реакции реакционную смесь фильтровали и промывали хлористым метиленом. Фильтраты объединяли и упаривали в вакууме на роторном испарителе ($P = 50 \text{ mbar}$, $T_{\text{бани}} = 90 \text{ }^\circ\text{C}$, скорость вращения колбы = 120 об/мин), сухой остаток растворяли в хлористом метиле и промывали водой $3 \times 25 \text{ мл}$. Органический слой отделяли, сушили над MgSO_4 и упаривали. К полученному сухому остатку прибавляли 10 мл сух. Et_2O . Выпавшее аморфное вещество коричневого цвета отделяли и сушили. Выход составил 22 мг.

Scan 48 from ...-ms\varian_data\imk\gella\2012\g-1348-dep2_14.08.2012.xms



Spectrum from ..._data\imk\gella\2012\g-1348-dep2_14.08.2012.xms

Scan No: 48, Time: 0.317 minutes

18 points averaged. Not background corrected.

Name: G-1348

Comment: Varian1200L.EI:70eV

Pair Count: 90 MW: 0 Formula: None

CAS No: None Acquired Range: 45 - 350 m/z

Method Description: EI

Scan 1 Channel Description: 45.0:350.0> EI;Dat 0;W1 Q1 Cal;ST 0.010

Scan Information: cp = 1.0 mTorr

Precursor Mass Range: 45 - 350 m/z

Ion	Int	Norm	Ion	Int	Norm	Ion	Int	Norm
45	1.110e+8	75	99	2.834e+7	19	151	1.017e+7	7
54	1.050e+7	7	100	1.583e+8	107	159	4.997e+7	34
55	4.718e+7	32	101	3.291e+8	223	160	1.583e+7	11
56	4.886e+8	331	102	7.435e+8	506	161	2.660e+8	180
57	1.473e+9	999	103	1.661e+8	113	162	4.579e+7	31
58	5.901e+8	400	104	8.101e+7	55	163	1.688e+8	115
59	4.031e+8	273	105	8.425e+7	57	164	9.327e+7	63
60	2.342e+8	159	106	3.085e+8	209	165	7.924e+6	5
61	1.320e+8	90	107	1.506e+7	10	173	7.926e+6	5
62	3.889e+7	26	114	2.723e+7	18	175	2.807e+7	19
69	1.544e+7	10	115	1.762e+7	12	176	2.411e+7	16
70	1.648e+8	112	116	5.861e+7	40	177	2.132e+7	14
71	1.226e+8	83	117	1.658e+7	11	187	7.178e+7	49
72	3.243e+8	220	118	2.017e+8	137	188	8.138e+7	55
73	6.677e+7	45	119	1.277e+8	87	189	1.621e+7	11
74	2.006e+8	136	120	5.661e+7	38	190	9.263e+6	6
75	2.530e+8	172	129	2.498e+7	17	192	1.741e+7	12
76	5.015e+7	34	130	7.540e+7	51	205	4.783e+7	32
77	6.360e+7	43	131	4.837e+7	33	206	7.368e+7	50
82	9.528e+6	6	132	9.513e+7	65	207	5.547e+7	38
83	8.431e+6	6	133	8.690e+7	59	214	2.415e+7	16
84	1.943e+7	13	134	1.271e+7	9	219	1.879e+7	13
85	2.443e+7	17	143	1.203e+7	8	232	5.740e+7	39
86	7.699e+7	52	144	5.430e+7	37	233	1.322e+8	90
87	2.340e+8	159	145	3.893e+7	26	234	1.534e+7	10
88	1.451e+9	984	146	8.858e+7	60	235	7.651e+6	5
89	3.013e+8	204	147	1.801e+7	12	251	1.609e+7	11
90	2.721e+7	18	148	5.515e+7	37	261	1.182e+7	8
91	2.486e+7	17	149	9.286e+6	6	307	5.907e+7	40
98	9.537e+6	6	150	1.652e+8	112	308	9.153e+6	6

Рисунок 2. Масс-спектр 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овой кислоты; EI-MS: m/z 307 (M+)

На ¹H ЯМР спектре полученного продукта (рис. 3) отчетливо видны сигналы α-протонов глицина и олигоэтилен гликоля на 3,5-3,8 ppm, уширенные сигналы 2,9 и 8,0 ppm соответствуют метильным и амидным группам остаточного количества диметилформаида. Авторы отмечали, что ДМФА находится в ловушке внутри нанотрубок и не удаляется даже при интенсивной сушке [6]. Сигнал протонов трет-бутильного радикала находится при 1,4 ppm. Сигналы протонов пирролидинового цикла, по всей видимости, находятся при 1,5-2,0 ppm, такое смещение сигнала в сильное поле можно объяснить как результат экранирования от внешнего магнитного поля собственным полем УОУНТ.

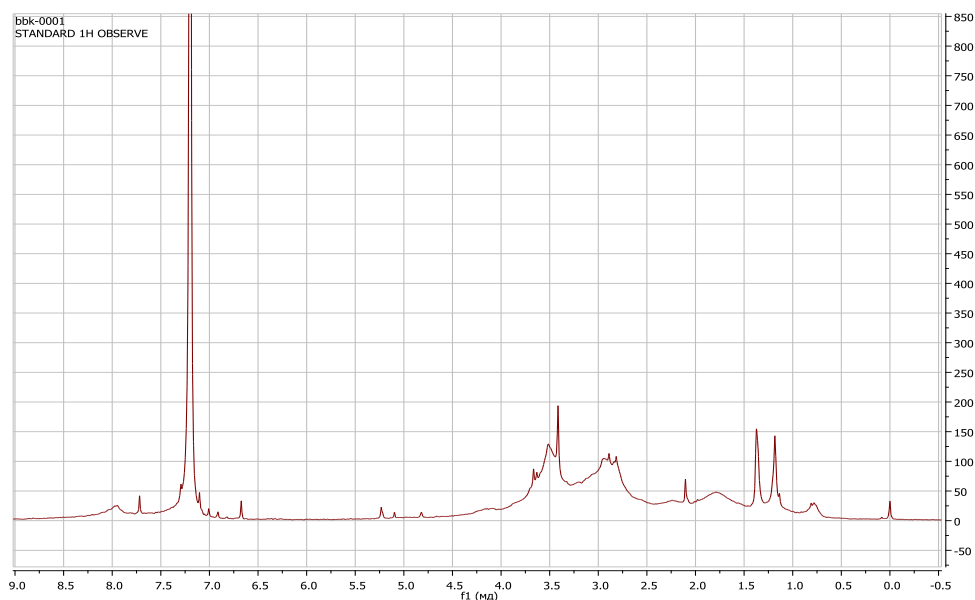


Рисунок 3. ^1H ЯМР спектр УОУНТ с присоединённой 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овой кислотой

Полученная на III стадии субстанция была хорошо растворима в метаноле, хлористом метиле, ацетонитриле, диметилсульфоксиде. Субстанция не имела определенной температуры плавления и кипения, обладала значительной термостабильностью. На рисунке 4 представлена электронная микрофотография образца субстанции, полученной на III стадии.

Для перевода субстанции в водорастворимую форму и получения конечного продукта проводили снятие Вос-защиты в следующих условиях.

Растворили 10 мг субстанции, полученной на III-й стадии, в 1мл 30 % соляной кислоты и выдерживали на ледяной бане при температуре $0-5^{\circ}\text{C}$ и интенсивном перемешивании на магнитной мешалке в течение 15 мин до прекращения выделения CO_2 . По окончании реакции удаляли избыток соляной кислоты на роторном испарителе в вакууме при перемешивании без нагревания ($P = 500 \text{ mbar}$, скорость вращения колбы = 120 об/мин). По окончании вскипания раствора колбу нагревали на водяной бане роторного испарителя до 70°C и удаляли остаток воды под вакуумом. Образовавшийся аморфный остаток сушили при комнатной температуре 24 ч. Выход конечного продукта составил 8,5 мг.

Полученный целевой продукт - субстанция водорастворимых модифицированных УОУНТ была хорошо растворима в метаноле, хлористом метиле, ацетонитриле, диметилсульфоксиде, растворимость в воде составляла $\approx 30 \text{ мг/см}^3$. Субстанция не имела определенной температуры плавления и кипения, была не гигроскопична и могла храниться при комнатной температуре неопределенно долго без признаков разложения.

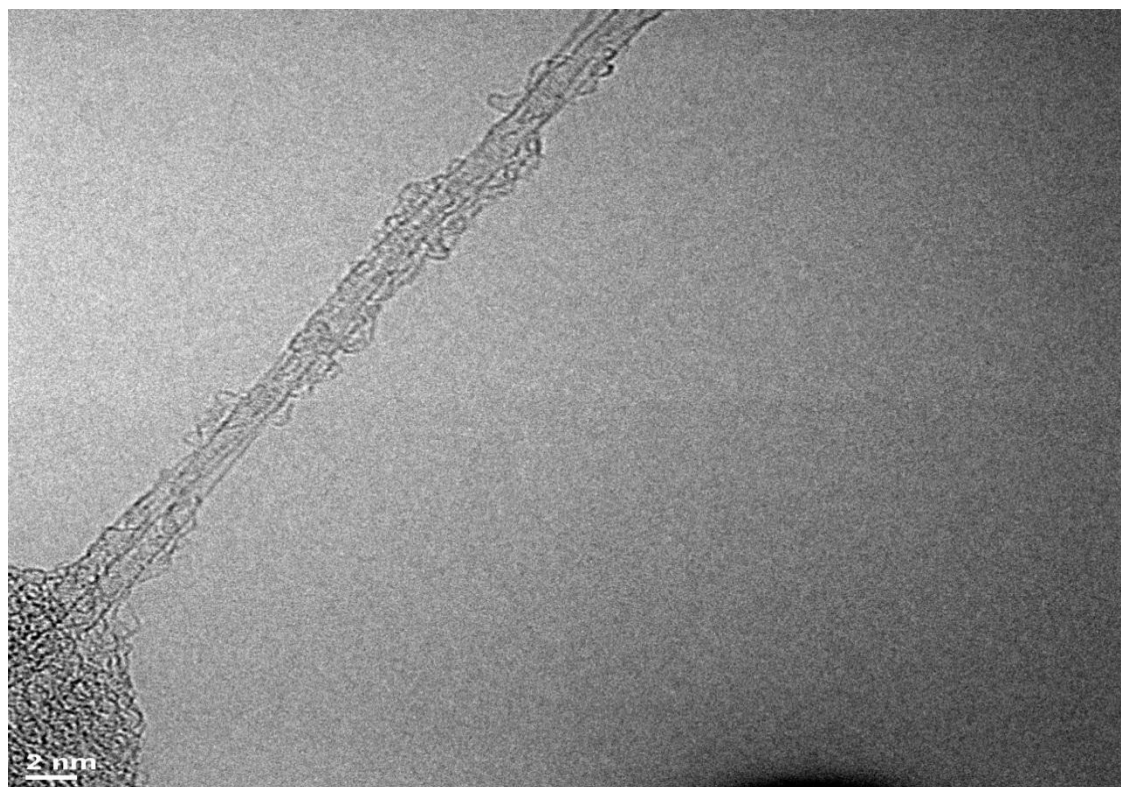


Рисунок 4 - Электронная фотография (ПЭМ) УОУНТ с присоединённой 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-14-диазагексадекан-18-овой кислотой

Выводы

1. Была получена субстанция водорастворимых модифицированных УОУНТ с целью исследования ее потенциала в качестве универсального носителя для цитостатиков и моноклональных гуманизированных антител против специфических поверхностных антигенов опухолевых клеток.

2. На лабораторном уровне были решены основные задачи на пути превращения одностенных (однослойных) углеродных нанотрубок в DDS. Целевой продукт в отличие от УОУНТ приобрёл значительную водорастворимость и достаточное количество функциональных NH_2 -групп для ковалентного присоединения к ним различных фармакологических субстанций.

3. Был предложен оригинальный способ одностадийного синтеза PEG-линкера для модификации графеновой поверхности УОУНТ.

4. Водорастворимость конечной субстанции и поглощение в коротковолновой ультрафиолетовой области спектра позволят использовать традиционные хроматографические методы (гель-проникающая/эксклюзионная высокоэффективная хроматография высокого давления/среднего давления GPC/SEC HPLC/MPLC с УФ-детектированием) для фракционирования наночастиц по размерам и, таким образом, для стандартизации субстанции по составу.

Литература

1. Li Y., Zhang X. B., Luo J. H., et al. Purification of CVD Synthesized Single-Wall Carbon Nanotubes by Different Acid Oxidation Treatments. // *Nanotechnology*. 2004. V. 15. No. 11. P. 1645–1649.
2. Georgakilas V., Kordatos K., Prato M., et al. Organic Functionalization of Carbon Nanotubes. // *Journal of the American Chemical Society*. 2002. V. 124. No. 5. P. 760–761.
3. Konstantinos Kordatos, Tatiana Da Ros, Susanna Bosi, Ester Vazquez, Massimo Bergamin, Claudia Cusan, Federica Pellarini, Veronique Tomberli, Benedetta Baiti, Davide Pantarotto, Vasilios Georgakilas, Giampiero Spalluto, and Maurizio Prato. Novel Versatile Fullerene Synthons. // *J. Org. Chem.* 2001. V. 66. P. 4915-4920.
4. Pastorin G., Wu W., Wieckowski S., et al. Double Functionalisation of Carbon Nanotubes for Multimodal Drug Delivery. // *Chemical Communications*. 2006. V. 11. P. 1182–1184.
5. Vasilios Georgakilas, Konstantinos Kordatos, Maurizio Prato, Dirk M. Guldi, Michael Holzinger, Andreas Hirsch. Organic Functionalization of Carbon Nanotubes. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. No. 5. P.760–761.
6. Vasilios Georgakilas, Nikos Tagmatarchis, Davide Pantarotto, Alberto Bianco, Jean-Paul Briand and Maurizio Prato. Amino acid functionalisation of water soluble carbon Nanotubes. // *Chem. Commun.* 2002. P. 3050–3051.