

**Сейткалиева Марина Максатовна**

«Получение и структурное исследование биологически активных систем на основе имидазолиевых ионных жидкостей»

02.00.03

Химические науки

Д 002.222.01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский просп., 47

тел. (499) 137-13-79

e-mail: [sci-secr@ioc.ac.ru](mailto:sci-secr@ioc.ac.ru)

Предполагаемая дата защиты диссертации: 6 октября 2015 года

Дата размещения полного текста диссертации на сайте института

<http://zios.ru> 14 июля 2015 года

Дата приема к защите 21 июля 2015 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК

[vak2.ed.gov.ru](http://vak2.ed.gov.ru) 28 июля 2015 года

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

*На правах рукописи*



**СЕЙТКАЛИЕВА**

**Марина Максумовна**

**ПОЛУЧЕНИЕ И СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ИМИДАЗОЛИЕВЫХ ИОННЫХ  
ЖИДКОСТЕЙ**

02.00.03 – Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

**Научный руководитель:** **Анаников Валентин Павлович**  
член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией  
металлокомплексных и наноразмерных катализаторов  
ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН

**Официальные оппоненты:** **Брель Валерий Кузьмич**  
доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией  
фосфорорганических соединений Института элементоорганических  
соединений Российской академии наук (ИНЭОС РАН).

**Халилов Леонард Мухибович**  
доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией  
структурной химии Института нефтехимии и катализа Российской  
академии наук (ИНК РАН).

**Ведущая организация:** Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева  
Российской академии наук (ИМХ РАН).

Защита диссертации состоится « 6 » октября 2015 г. в 11 часов на заседании  
диссертационного совета Д 002.222.01 в Федеральном государственном бюджетном  
учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (ИОХ РАН)  
по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 47

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института органической химии им.  
Н.Д. Зелинского РАН на сайте [zioc.ac.ru](http://zioc.ac.ru)

Автореферат разослан 30 июля 2015 г.

Ваш отзыв в двух экземплярах, заверенный гербовой печатью, просим направлять по  
адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 47, ученому секретарю Диссертационного  
совета ИОХ РАН

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
Д 002.222.01  
Доктор химических наук



Л.А. Родиновская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В последние десятилетия ионные жидкости (ИЖ) нашли широкое применение в различных приложениях, в том числе биологических и биотехнологических процессах. Ионные жидкости показали способность растворять белки, углеводы, ферменты, ДНК и другие природные соединения и биомолекулы, которые в обычных растворителях растворяются плохо или быстро теряют свои свойства. При этом многие ионные жидкости увеличивают эффективность, активность и селективность ферментативных реакций, повышают термическую стабильность белков, позволяя в течение длительного времени сохранять их специфичные свойства. Немаловажным преимуществом использования ионных жидкостей является низкое давление насыщенных паров, негорючесть, высокая термическая и химическая устойчивость. Взаимодействие между ионными жидкостями и биомолекулами в настоящее время всесторонне изучается, однако связь между строением аминокислот, пептидов и белков и необычными свойствами, проявляемыми ими в системах на основе ионных жидкостей, остается неисследованной. Природа и последовательность аминокислот во многом отвечают за индивидуальные характеристики белковых молекул, поэтому исследование взаимодействий между ионными жидкостями и пептидами позволит получить важную информацию о стабильности белков и расширит возможности их применения в биотехнологии, химической и фармацевтической промышленности. Изучение биологических молекул в ионных жидкостях в отсутствие других растворителей является важной и одновременно сложной задачей, требующей соответствующих методологических подходов.

Важным этапом биотехнологических процессов является селективное выделение и очистка биомолекул. В качестве альтернативы низкокипящим органическим растворителям в процессах выделения и очистки с недавнего времени часто применяют ионные жидкости, обладающие превосходной растворяющей способностью, а также оказывающие активирующее/стабилизирующее воздействие. Изучение природы взаимодействий между биомолекулами и ионными жидкостями, а также влияния различных условий на распределение веществ между фазами в процессе экстракции и механизма, по которому протекает этот процесс, является актуальной задачей.

Исследования взаимодействий биологических объектов с ионными жидкостями неразрывно связаны с изучением биологической активности самих ионных жидкостей. Долгое время считалось, что они являются альтернативными экологически безопасными средами, однако эксперименты показали, что это предположение не всегда верно. Токсичность ионных жидкостей сравнима, а в некоторых случаях выше, чем токсичность органических растворителей. Предполагают, что введение природных биологических молекул, таких как аминокислоты, в состав ионных жидкостей является эффективным способом снижения их токсичности и повышения биосовместимости, однако детально этот вопрос не исследовался. Помимо изучения токсичности известных ионных жидкостей, также исследуется возможность создания ионных жидкостей с заданной биологической активностью. В настоящее время введение биологически

активных соединений в состав ионных жидкостей считается перспективным способом получения высокоактивных веществ, которые могут найти применение в медицине и биологии. Новые стратегии использования ионных жидкостей предполагают получение лекарственных средств с низкой температурой плавления, улучшенной растворимостью, повышенной биодоступностью и высокой биоразлагаемостью.

**Целью исследования** являлось получение и структурное исследование пептидных и биологически активных систем на основе имидазолиевых ионных жидкостей.

**Задачами данного исследования являлись:** 1) изучение взаимодействий между имидазолиевыми ионными жидкостями и модельными аминокислотами и пептидами с помощью спектроскопии ЯМР; 2) изучение механизма экстракции пептидных соединений из ионной жидкости в органическую фазу с помощью спектроскопии ЯМР и разработка эффективных систем для разделения смеси структурно схожих биомолекул; 3) изучение влияния аминокислотных заместителей на токсичность ионных жидкостей; 4) изучение биологической активности известных ионных жидкостей и ионных жидкостей, функционализированных фармацевтическими компонентами.

#### **Научная новизна и практическая значимость**

1. Впервые с помощью спектроскопии ЯМР было подробно изучено стабилизирующее/дестабилизирующее действие ионов серии Гофмейстера на ряд модельных соединений на основе аланина и валина в чистых ионных жидкостях. Было показано, что растворимость исследуемых соединений определяется гидрофобностью их боковых групп и природой катионов и анионов ионных жидкостей. На примере дипептида было показано, что стабилизирующее действие анионов не соответствует прямому порядку серии Гофмейстера.

2. Была обнаружена зависимость растворимости пептидов в ионной жидкости от их длины и аминокислотной последовательности. Выявленные закономерности взаимодействий между имидазолиевыми ионными жидкостями и модельными пептидами позволят в будущем подбирать наиболее эффективные и биосовместимые среды для биомолекул.

3. Впервые с помощью послойной спектроскопии ЯМР (slice-selective NMR) было показано, что процесс перехода молекулы пептида из ионной жидкости в органическую фазу соответствует случаю молекулярной экстракции, при которой молекулы вещества движутся индивидуально, не образуя супрамолекулярных ассоциатов. Была разработана эффективная система, позволяющая селективно выделять пептиды из смеси. Молекулярная природа механизма экстракции и сохранение структурной целостности биомолекул после выделения свидетельствуют о большом потенциале систем на основе ионных жидкостей для выделения биомолекул в нативном состоянии.

4. Впервые была изучена цитотоксичность ионных жидкостей, содержащих аминокислоты глицин, аланин и валин. Было показано, что введение аминокислот в состав ионных жидкостей не всегда приводит к снижению их токсичности. Токсичность

ионных жидкостей с аминокислотными анионами была сравнима с токсичностью хлоридных и лактатных имидазолиевых ионных жидкостей, в то время как введение аминокислот в состав катиона впервые синтезированных ионных жидкостей приводит к значительному повышению токсичности. Было показано, что ионные жидкости с аминокислотными анионами, как и обычные ионные жидкости, вызывают апоптоз клеток (запрограммированную клеточную смерть). Высокая биологическая активность, которую можно направленно менять посредством изменения структуры ионных жидкостей, и вызываемый ими апоптоз свидетельствуют о противоопухолевом потенциале аминокислотных ионных жидкостей.

5. Была изучена токсичность известных ионных жидкостей с салицилатным анионом и впервые синтезированных ионных жидкостей с функционализированными салициловой кислотой катионами. Было показано, что биологическая активность функционализированных ионных жидкостей сравнима с активностью салициловой кислоты; причем многие из функционализированных ионных жидкостей являются жидкими при комнатной температуре и обладают хорошей растворимостью в воде, что повышает их биодоступность. Использование салициловой кислоты в качестве аниона, а также функционализация ею катионов позволяет получать соединения с усовершенствованными физико-химическими свойствами, улучшенной растворимостью, низкой температурой плавления и высокой биологической активностью.

**Публикации и апробация работы.** По теме диссертации опубликовано три статьи в научных журналах, рецензируемых и индексируемых в признанных международных системах цитирования, и четыре тезиса в сборниках докладов научных конференций. Основные результаты работы представлены в виде докладов на: Всероссийской научной конференции с международным участием «Успехи синтеза и комплексообразования» (Москва, Россия, 2014); Всероссийской конференции «VI молодежная конференция ИОХ РАН» (Москва, Россия, 2014); Международной конференция «International Conference Molecular Complexity in Modern Chemistry (MCMC-2014)» (Москва, Россия, 2014); VI Всероссийской конференции «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» (Казань, Россия, 2015).

**Структура и объем работы.** Материал диссертации изложен на 162 страницах. Работа состоит из введения, обзора литературы, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов и списка используемой литературы. Библиография насчитывает 453 наименования.

**Благодарность.** Автор выражает глубокую благодарность к.х.н. Качале В.В. и к.х.н. Грачеву А.А. за совместные ЯМР-исследования; к.б.н. Посвятенко А.В. (институт Биологии гена РАН) и к.б.н. Егоровой К.С. за проведение экспериментов по определению токсичности.

Проведенные исследования поддержаны грантом РФФИ № 14-03-31478 мол\_а (2014-2015).

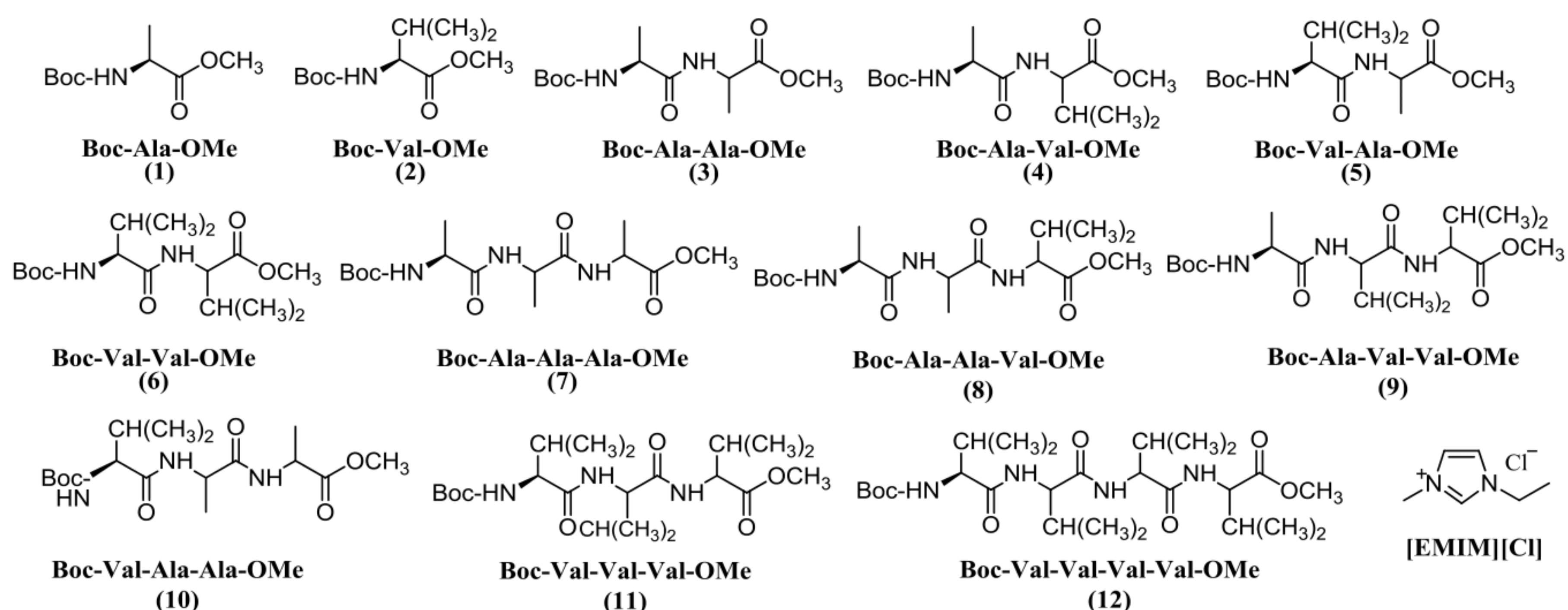
## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Исследование взаимодействий между ионными жидкостями и модельными аминокислотами и пептидами

Стабильность белков и активность ферментов во многом зависят от типа солей, присутствующих в водном растворе, поэтому влияние ионов лиотропного ряда Гофмейстера является важным для понимания стабилизирующего и дестабилизирующего действия растворителя на биомолекулы. В большинстве работ, рассматривающих взаимодействия между ИЖ и биомолекулами, исследуются водные системы на основе ИЖ, в то время как поведение биомолекул в чистых ИЖ изучено мало. Однако стоит отметить, что некоторые ИЖ в отсутствие или в присутствии небольшого количества воды позволяют сохранить ферментативную активность многих белков даже при высокой температуре ( $>100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); при этом в основном стабилизация белков происходит, когда вещество диспергировано и не образует истинный раствор.

В данной работе изучалось поведение аминокислот и пептидов на основе аланина и валина, алифатических нейтральных аминокислот с неполярными алкильными боковыми группами, входящих в состав практически всех важных белковых молекул, в имидазолиевых ИЖ. Для того чтобы исключить влияние взаимодействия между концевыми карбоксильной и амидной группами пептидов и ионами ИЖ, были синтезированы молекулы с защищенными концевыми группами. Синтез пептидов осуществляли согласно стандартной методике, все полученные соединения были полностью охарактеризованы.

В результате было получено одиннадцать модельных соединений (рисунок 1): две защищенные аминокислоты и девять пептидов, различающихся аминокислотной последовательностью и длиной.



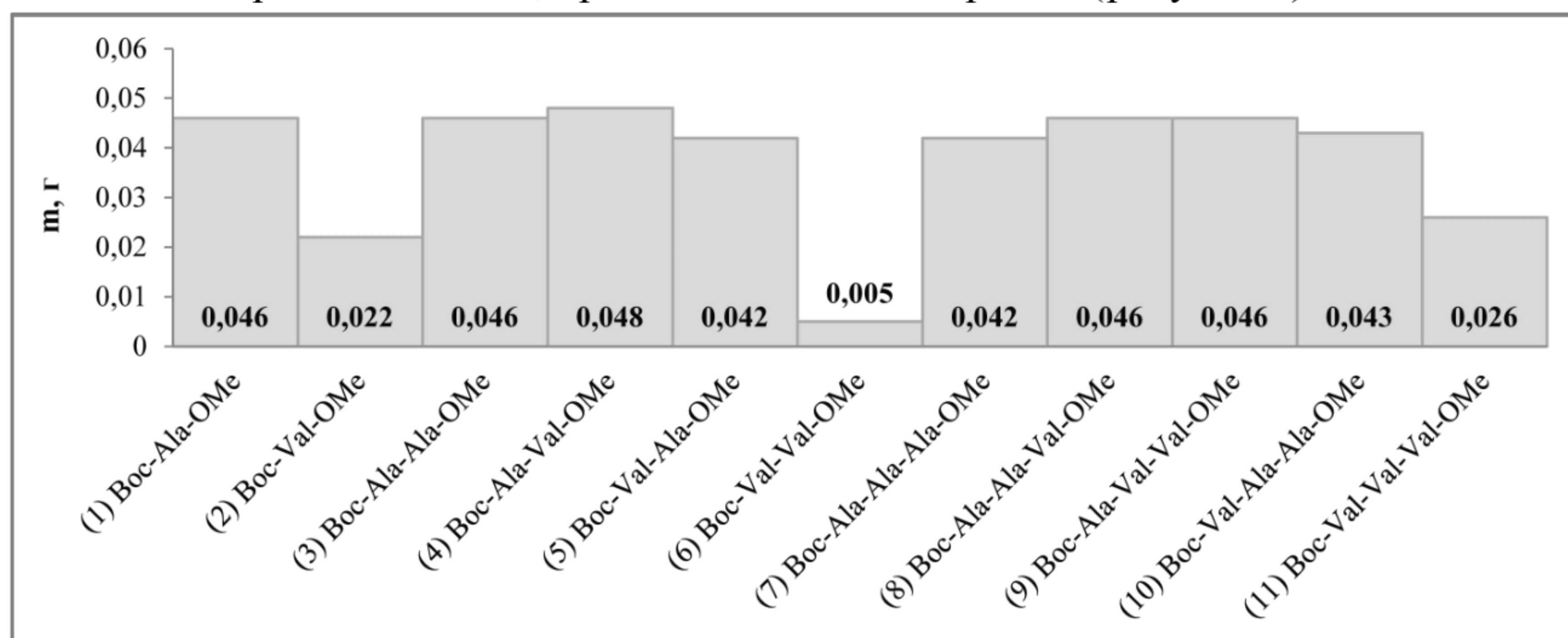
**Рисунок 1.** Структуры изучаемых модельных соединений и ИЖ.

Из ряда имидазолиевых ИЖ был выбран хлорид 1-этил-3-метилимидазолия ([EMIM][Cl]) (рисунок 1). И хлорид-анион, и EMIM<sup>+</sup>-катион находятся на граничной позиции ряда Гофмейстера и относятся к нейтральным ионам. Также данный катион имеет короткую боковую цепь, что является преимуществом при изучении

растворимости с помощью спектроскопии ЯМР (небольшое количество сигналов в ЯМР-спектре и отсутствие перекрытия с сигналами растворенных веществ).

Изучение взаимодействий между ИЖ и модельными соединениями, определение их растворимости и анализ поведения в чистых ИЖ проведены с помощью спектроскопии ЯМР. Снижение растворимости соединений свидетельствует о стабилизирующем действии ИЖ (высаливающий эффект), в то время как повышение растворимости свидетельствует о дестабилизирующем воздействии (всаливающий эффект). Спектроскопия ЯМР является высокоэффективным инструментом для изучения подобных систем на молекулярном уровне и позволяет определить реальные количества веществ, растворенных в ИЖ. Эксперимент проводили в отсутствие каких-либо добавок органических растворителей, чтобы сохранить исходные свойства системы, так как даже небольшое количество соразтворителей может значительно изменить их. Ранее изучение молекул в ИЖ с помощью спектроскопии ЯМР считалось достаточно трудной задачей вследствие высокой вязкости и неоднородности (низкой гомогенности) среды. Однако ранее в лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов ИОХ РАН был разработан новый метод регистрации таких спектров ЯМР, эффективно апробированный для процесса конверсии углеводов в ИЖ. В рамках данной работы этот метод был адаптирован к биологическим системам, для которых не существовало методологии исследования с помощью спектроскопии ЯМР в ИЖ.

Значения растворимости модельных соединений в [EMIM][Cl], полученные с помощью спектроскопии ЯМР, представлены на диаграмме (рисунок 2).



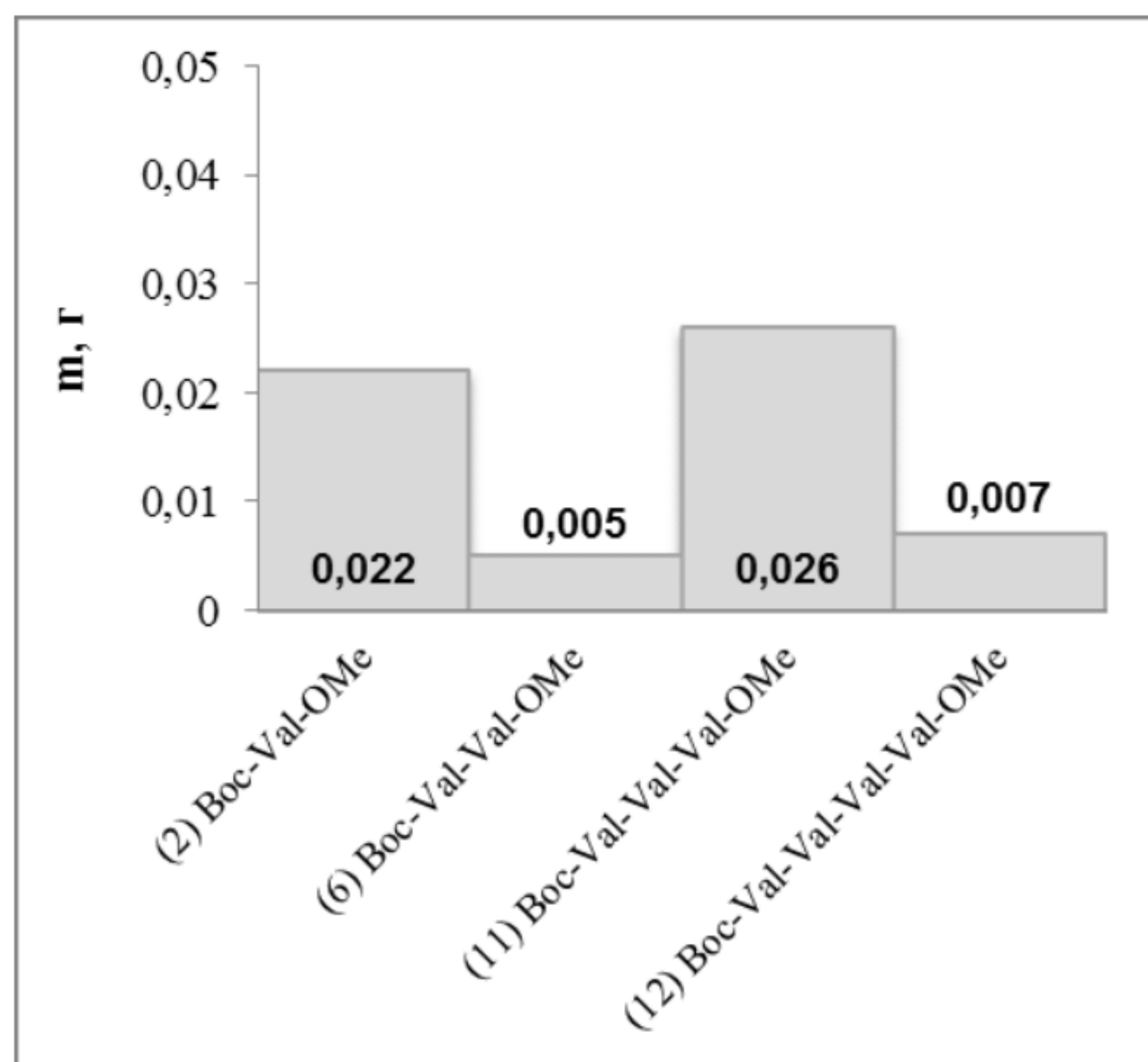
**Рисунок 2.** Количества веществ (в г), растворенных в [EMIM][Cl] (0.05 г исходного количества аминокислоты или пептида в 0.65 г [EMIM][Cl], 80 °C, 1 час), определенные при помощи  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  ЯМР-спектроскопии, 400 МГц.

В пределах точности измерения соединения 1, 3-5 и 7-10 обладали хорошей растворимостью, соединения 2 и 11 были растворимы частично, а соединение 6 было плохо растворимо. Согласно данным ЯМР, замена даже одной аминокислоты в ряде случаев вызывала значительное изменение растворимости пептида. Так, пептид 11 проявлял плохую растворимость, в то время как пептид 9 растворялся хорошо. Также



следует отметить, что пептид 6 был нерастворим, а пептиды 4 и 5 обладали хорошей растворимостью.

Таким образом, [EMIM][Cl] оказывает дестабилизирующий эффект на Boc-Ala-OMe, Boc-Ala-Ala-OMe, Boc-Ala-Val-OMe, Boc-Val-Ala-OMe, Boc-Ala-Ala-Ala-OMe, Boc-Ala-Ala-Val-OMe, Boc-Ala-Val-Val-OMe и Boc-Val-Ala-Ala-OMe и стабилизирующий эффект на три изученных соединения в следующем порядке: Boc-Val-OMe  $\approx$  Boc-Val-Val-Val-OMe < Boc-Val-Val-OMe.



**Рисунок 3.** Влияние четного/ нечетного числа остатков валина на количество вещества, растворенного в [EMIM][Cl]. Условия эксперимента, аналогично рис.2.

числа остатков (ди- и тетравалин) наблюдалось снижение растворимости по сравнению с нечетным числом остатков (моно- и тривалин) (рисунок 3).

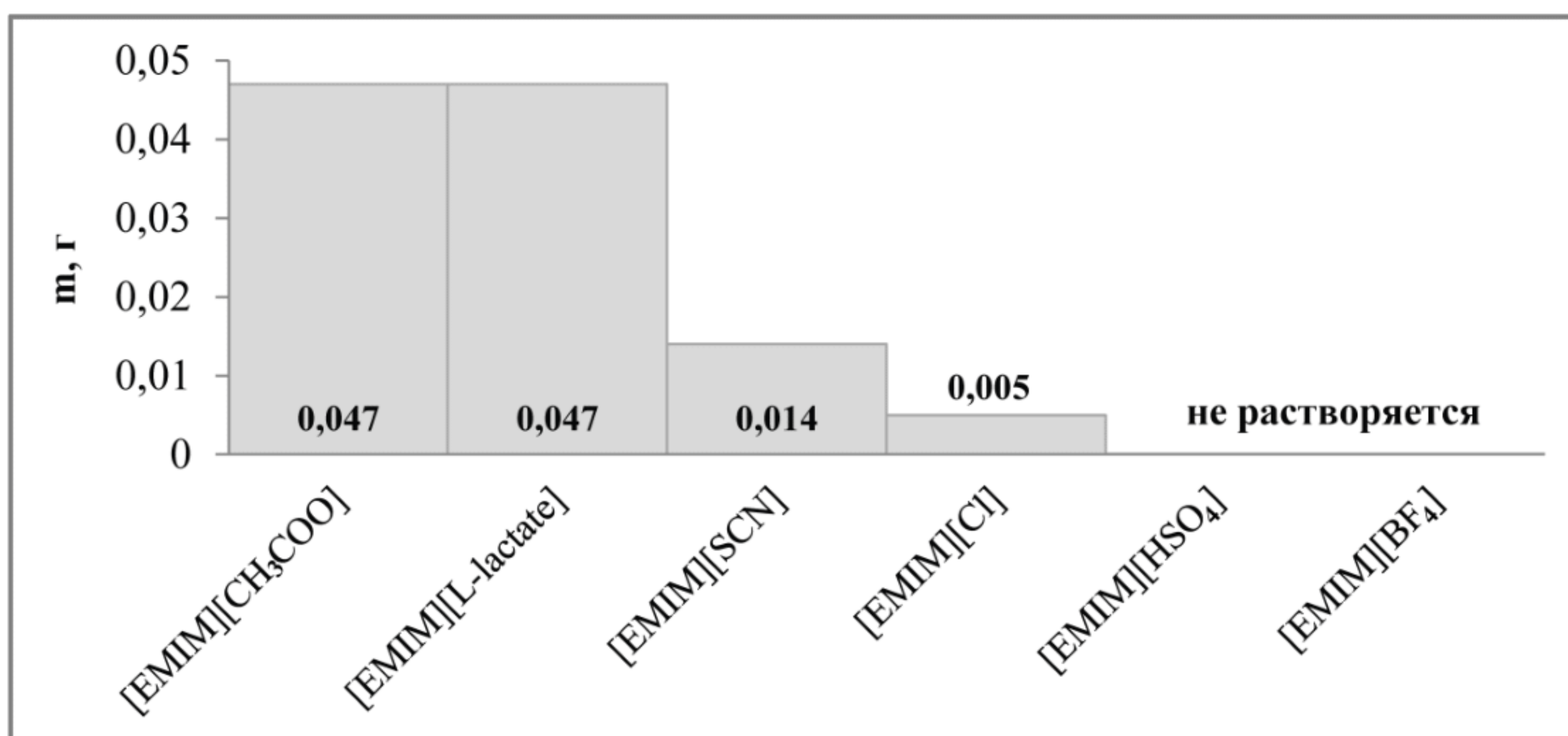
Таким образом, [EMIM][Cl] проявляет сильный стабилизирующий эффект не только по отношению к Boc-Val-Val-OMe, но и по отношению к Boc-Val-Val-Val-Val-OMe, при сравнении с другими пептидами. Для двух этих соединений было изучено влияние температуры на растворимость. Как и ожидалось, при повышении температуры (с 70 °C до 100 °C) растворимость увеличилась, но незначительно. Так, растворимость Boc-Val-Val-OMe повысилась с 0.05 г до 0.09 г, а Boc-Val-Val-Val-Val-OMe - с 0.07 до 0.10 г при одинаковых начальных концентрациях.

На следующем этапе работы было исследовано влияние серии 1-этил-3-метилимидазолиевых ИЖ с различными анионами ([EMIM][BF<sub>4</sub>], [EMIM][HSO<sub>4</sub>], [EMIM][Cl], [EMIM][CH<sub>3</sub>COO], [EMIM][SCN] и [EMIM][L-lac]) на стабильность дивалина.

Аналогично предыдущим опытам, измерения проводили с помощью <sup>13</sup>C{H} ЯМР-спектроскопии. Полученные данные представлены на рисунке 4.

Стабилизирующий эффект [EMIM][Cl] проявлялся сильнее по отношению к соединениям валинового ряда, в которых отсутствовали аланиновые структурные элементы.

Чтобы проверить наблюдаемую закономерность, был синтезирован тетрапептид, состоящий из четырех валиновых остатков (Boc-Val-Val-Val-Val-OMe (12)) (рисунок 1). Анализ растворимости соединений, состоящих из одного, двух, трех и четырех валиновых остатков, в [EMIM][Cl] выявил интересную зависимость растворимости пептидов от четного или нечетного числа остатков валина в данном рассматриваемом ряду. В случае четного



**Рисунок 4.** Количество дивалина (в г), растворенного в 1-этил-3-метилимидазолиевых ИЖ с различными анионами. Условия эксперимента, аналогично рис.2.

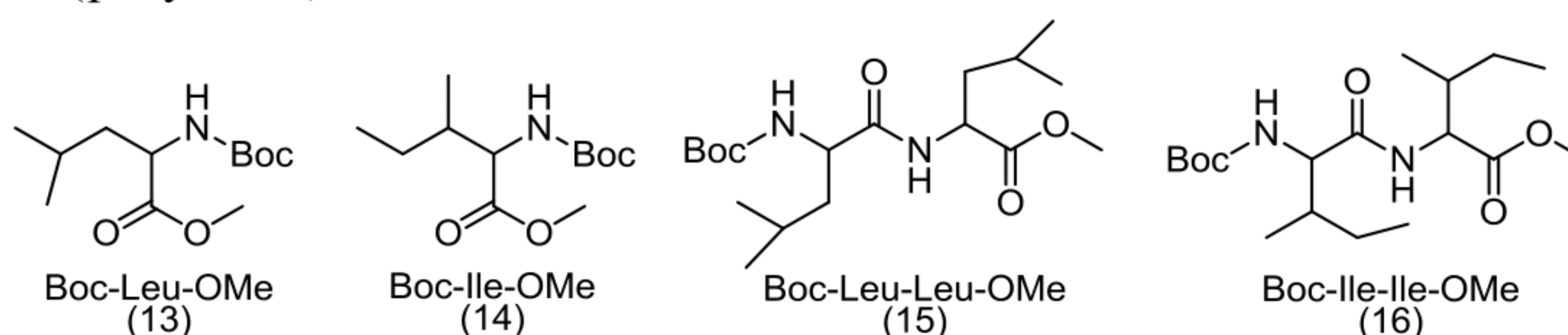
Наибольшее стабилизирующее действие на дивалин оказывают ИЖ с анионами  $\text{BF}_4^-$  и  $\text{HSO}_4^-$ , находящиеся в начале ряда Гофмейстера, затем следует анион  $\text{Cl}^-$ ; более выраженное дестабилизирующее действие оказывает  $\text{SCN}^-$ , что также согласуется с рядом, в то время как  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  и  $\text{L-lac}^-$  являются наиболее дестабилизирующими и приводят к практически полному растворению дивалина. Таким образом, для данного дипептида можно записать следующий ряд стабилизирующего влияния анионов:  $\text{BF}_4^- \approx \text{HSO}_4^- > \text{Cl}^- > \text{SCN}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- \approx \text{L-lac}^-$ .

Из структуры дивалина следует, что наиболее вероятными центрами связывания анионов ИЖ и пептида являются амидные группы. При изучении  $^1\text{H}$  ЯМР-спектров дивалина был обнаружен сдвиг амидного протона в слабое поле в  $[\text{EMIM}][\text{OAc}]$  (на 1 ppm) и в  $[\text{EMIM}][\text{L-lac}]$  (на 1.5 ppm) по сравнению с  $[\text{EMIM}][\text{SCN}]$ , для остальных протонов сдвигов сигналов обнаружено не было. Наблюдаемое изменение химического сдвига может являться следствием более сильного взаимодействия пептидной связи с анионом ИЖ, приводящего к лучшей растворимости, что согласуется с полученными результатами.

В данном случае стабилизирующее действие ионов не совпадает с прямым порядком серии Гофмейстера: ацетат-анион, стоящий в ряду слева от аниона  $\text{Cl}^-$ , должен проявлять высаливающие свойства, однако в данном концентрационном интервале дивалин растворялся в нем полностью. Анионы  $\text{BF}_4^-$  и  $\text{HSO}_4^-$  не взаимодействуют с пептидной связью дивалина, а также защищенными N- и C-концами пептида.  $\text{Cl}^-$  относится к нейтральным ионам в серии Гофмейстера и проявляет малое сродство к указанным группам, также как и анион  $\text{SCN}^-$ .  $\text{L-lac}$  демонстрирует поведение, аналогичное  $\text{OAc}^-$ . Растворимость тривалина в  $[\text{EMIM}][\text{OAc}]$  оказалась такой же, как и в случае дивалина, и составила 0.047 г из 0.05 г, что отличается от поведения данных пептидов в  $[\text{EMIM}][\text{Cl}]$ .

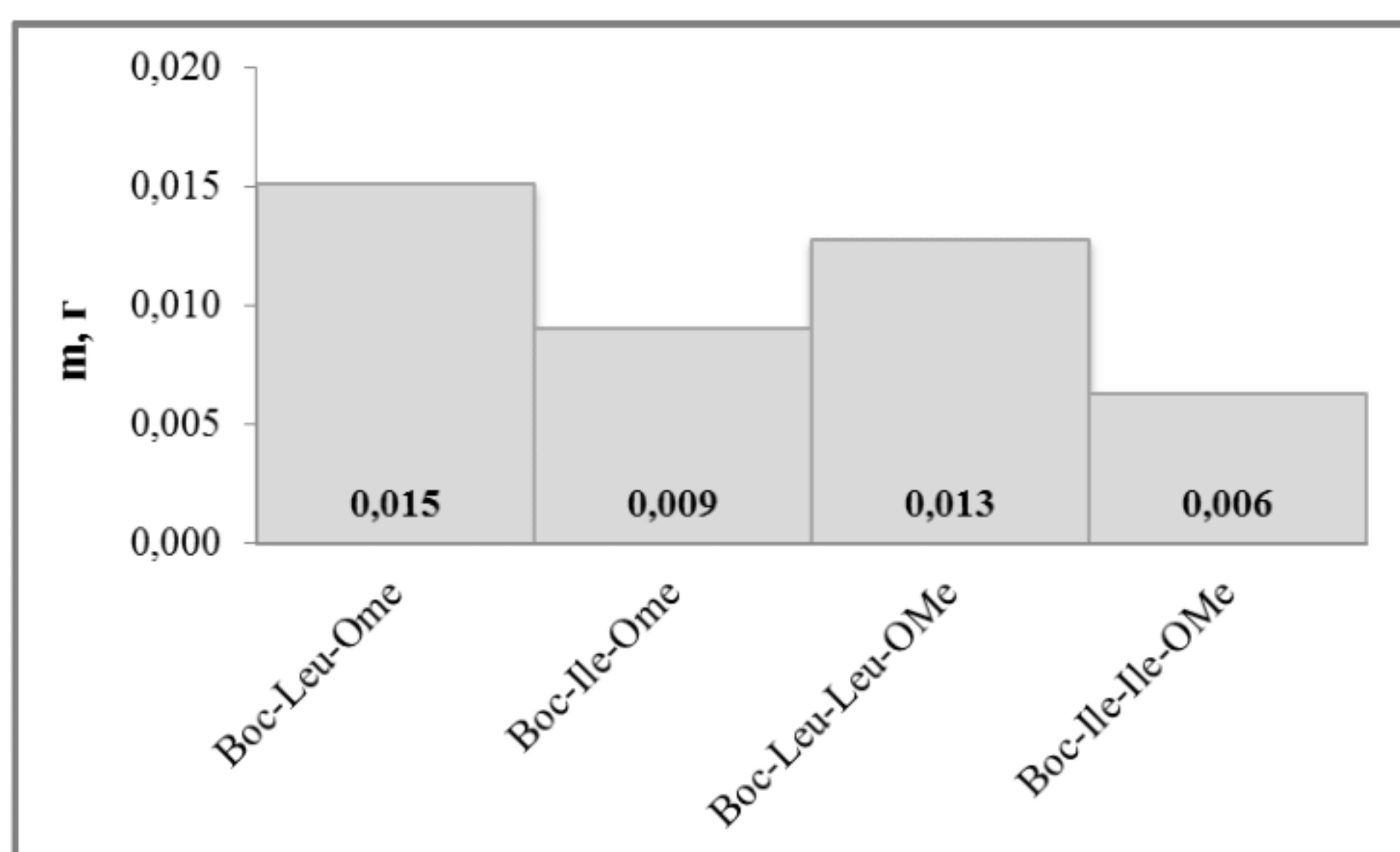
Полученные результаты позволяют предположить, что различная растворимость изучаемых соединений является следствием их различной гидрофобности.

Гидрофобность аланина ниже, чем гидрофобность боковых групп валина и лейцина; по-видимому, имеет место отталкивание между ионами ИЖ и боковыми алкильными группами пептидов. Чтобы подробнее исследовать наблюдаемое явление, были синтезированы еще четыре молекулы с неполярными боковыми группами. Были использованы аминокислоты лейцин и изолейцин, являющиеся структурными изомерами. На основе этих аминокислот были синтезированы две защищенные аминокислоты Boc-Leu-OMe и Boc-Ile-OMe и два дипептида Boc-Leu-Leu-OMe и Boc-Ile-Ile-OMe (рисунок 5).



**Рисунок 5.** Структуры синтезированных соединений лейцинового и изолейцинового ряда.

Полученные значения растворимости представлены на диаграмме (рисунок 6).



**Рисунок 6.** Количества веществ (в г), растворимых в [EMIM][Cl]. Условия эксперимента, аналогично рис.2.

Как и в случае соединений валинового ряда, [EMIM][Cl] также оказывает на эти соединения стабилизирующий эффект.

Наблюдаемые явления наглядно демонстрируют сложную природу взаимодействий «растворитель – растворенное вещество» в системах, содержащих пептиды и ИЖ. Обе пары аминокислот L-аланин/L-валин и L-лейцин/L-изолейцин относятся к одному структурному типу и

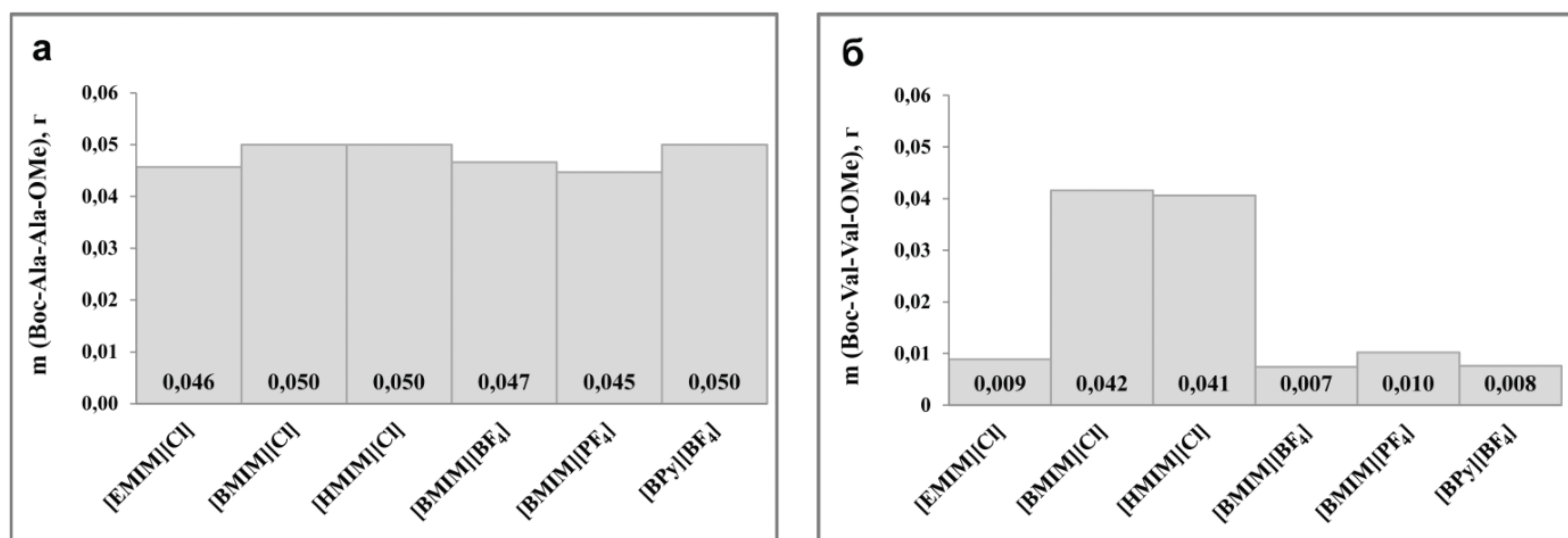
отличаются только длиной алкильной цепи или ее разветвленностью. Таким образом, ИЖ проявляют высокую «чувствительность» на молекулярном уровне к изменениям в аминокислотных последовательностях растворенных молекул.

На изменение растворимости могут влиять два фактора: (1) энергия кристаллических решеток пептидов и (2) специфическая сольватация пептидов в ИЖ (молекулярные взаимодействия и структурная организация). Первый фактор должен проявляться во всех типах растворов, включая растворы в обычных органических растворителях и ИЖ. Второй фактор более специфичен и отражает уникальные свойства системы «растворитель – растворенное вещество». Кроме того, известно, что ИЖ ведут себя не как обычные соли, а образуют упорядоченные гетерогенные структуры. Было показано, что размер этих гетерогенных областей может меняться от нанометрового до микрометрового диапазона и зависит от типа аниона и катиона. Формирование данных

доменов значительно меняет характер ИЖ и является причиной многих уникальных свойств, обнаруживаемых ИЖ, в том числе по отношению к биомолекулам.

Чтобы проанализировать вклад обоих факторов, было проведено сравнение растворимости пептидов в ИЖ и органических растворителях. Растворимость в ДМСО и хлороформе при комнатной температуре равнялась 0.5 и 1.5 г/мл для Вос-Ala-Ala-ОМе и 0.2 и 0.45 г/мл для Вос-Val-Val-ОМе, соответственно. При нагревании растворимость обоих пептидов значительно возросла. Общий порядок растворимости Вос-Ala-Ala-ОМе > Вос-Val-Val-ОМе одинаков для органических растворителей и ИЖ в соответствии с термодинамическими факторами. Однако энергия кристаллической решетки пептидов - не единственный параметр, определяющий поведение изучаемых систем. Высокая чувствительность к природе пептидов не проявлялась в обычных органических растворителях в данном концентрационном интервале.

Далее было изучено влияние на растворимость пептидов таких факторов, как природа катиона, природа аниона и общий эффект, проявляемый катионами и анионами. Растворимость двух структурно схожих соединений Вос-Ala-Ala-ОМе и Вос-Val-Val-ОМе была исследована в различных ИЖ: [EMIM][Cl], [BMIM][Cl], [NMIM][Cl], [BMIM][BF<sub>4</sub>], [BMIM][PF<sub>6</sub>] и [BPy][BF<sub>4</sub>]. Хорошо растворимый в [EMIM][Cl] диаланин продемонстрировал схожую растворимость во всех изученных ИЖ с различными катионами и анионами (рисунок 7а). Однако в случае дивалина небольшие изменения структуры ИЖ оказывали влияние на его растворимость (рисунок 7б).



**Рисунок 7.** (а) – Количество растворенных Вос-Ala-Ala-ОМе (3) и (б) Вос-Val-Val-ОМе (6) в различных ионных жидкостях. Условия эксперимента, аналогично рис.2.

Удлинение боковой углеродной цепи с С<sub>2</sub> до С<sub>4</sub> и С<sub>6</sub> в имидазолиевых ИЖ с хлорид-анионом привело к повышению растворимости Вос-Val-Val-ОМе. Природа аниона имела существенное значение; в частности, дивалин хорошо растворялся в хлоридной ИЖ [BMIM][Cl], но оказался практически нерастворим в ИЖ с аналогичным катионом и анионами BF<sub>4</sub><sup>-</sup> и PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (Cl<sup>-</sup> стоит правее в ряду Гофмейстера и оказывает более сильный дестабилизирующий эффект, чем BF<sub>4</sub><sup>-</sup>).

Известно, что 1-бутил-3-метилимидазолий и бутилпиридиний являются космотропными катионами и имеют тенденцию стабилизировать белки вследствие сильных взаимодействий с космотропными остатками на поверхности биомолекул

(например, карбоксильными группами) и/или гидрофобными участками внутри свернутых белков. Они стоят рядом в ряду Гофмейстера и должны оказывать схожий эффект на стабильность биомолекулы, что подтверждается аналогичным поведением дивалина в ИЖ с катионами  $\text{BMIM}^+$  и  $\text{VPr}^+$ . Изменение действия ИЖ при изменении длины боковой цепи от  $\text{C}_2$  до  $\text{C}_6$  может быть объяснено повышением гидрофобности в связи с усилением вандерваальсовых взаимодействий между алкильными группами катиона и неполярными гидрофобными группами валиновых пептидов, которые способствуют растворению. Таким образом, подтверждается обнаруженная ранее прямая взаимосвязь гидрофобности имидазольных катионов и оказываемого ими дестабилизирующего эффекта. Гидрофобные ИЖ с длинной боковой цепью способствуют дестабилизации пептида, что можно наблюдать, сравнивая растворимость дивалина в  $[\text{EMIM}][\text{Cl}]$  и  $[\text{BMIM}][\text{Cl}]$  или  $[\text{EMIM}][\text{BF}_4]$  и  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$ .

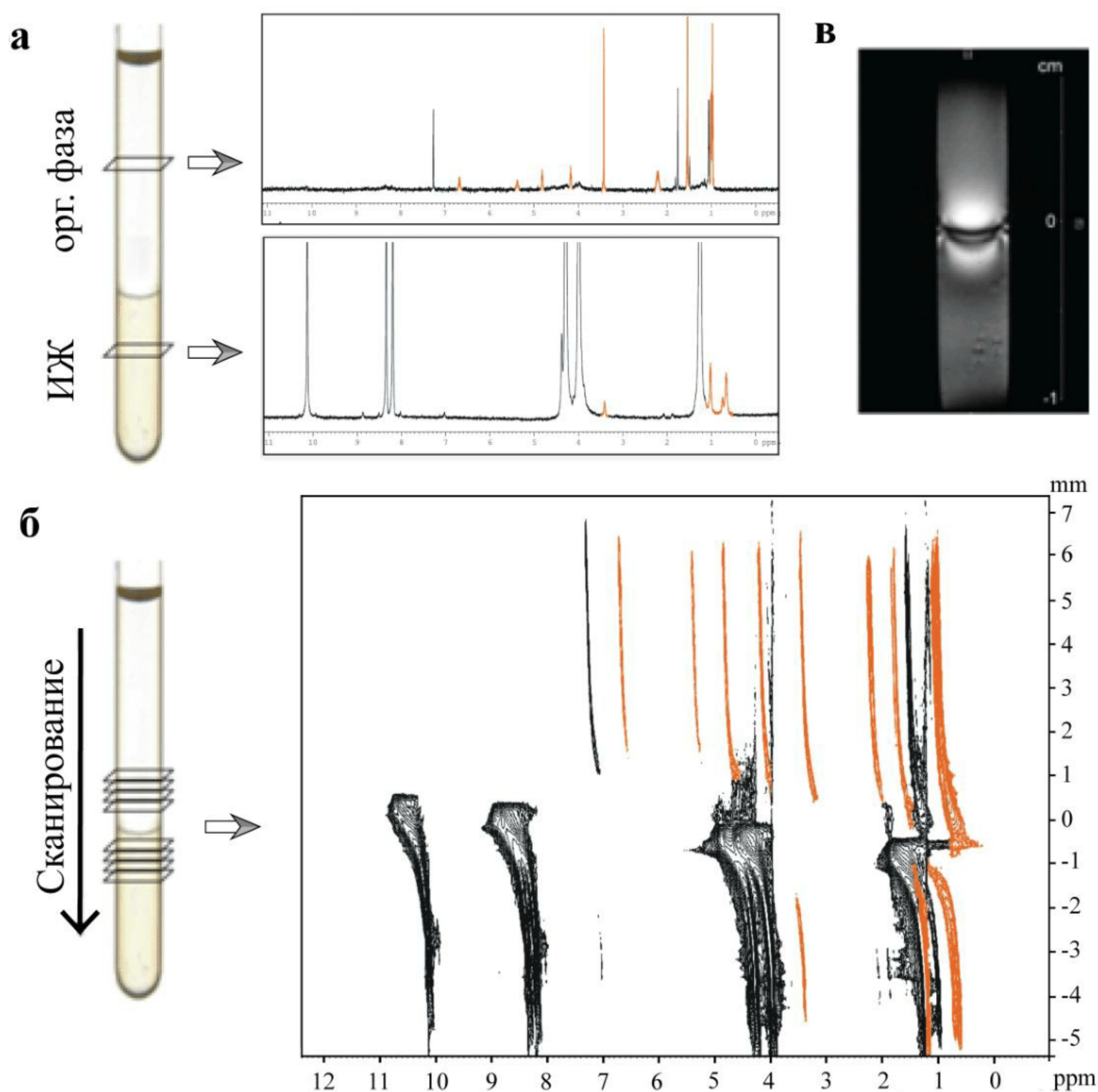
Раствор  $\text{Woc-Ala-Ala-OMe}$  и суспензия  $\text{Woc-Val-Val-OMe}$  в ионной жидкости  $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$  были исследованы с помощью сканирующей электронной микроскопии, которая показала наличие микрогетерогенности в системах на основе ИЖ в случае  $\text{Woc-Ala-Ala-OMe}$ .

Таким образом, ИЖ оказывают различное влияние на пептиды в зависимости от их структуры, аминокислотной последовательности и длины. В случае аланиновых и валиновых пептидов большую роль играет полярность их боковых групп. Также на растворимость пептидов значительно влияет природа ИЖ: в большей степени проявляется влияние природы аниона, хотя структура катиона также играет свою роль. Принимая во внимание значительные различия во взаимодействиях различных пептидов с ИЖ, последние можно использовать в качестве среды для селективного разделения структурно схожих пептидов.

## **2. Разработка систем для экстракции пептидов из ионных жидкостей и изучение механизма процесса**

Из литературных источников известно, что большинство ИЖ проявили себя как неинактивирующие среды, сохраняющие структурную целостность биомолекул. Эти важные свойства позволили использовать системы на основе ИЖ для экстракции таких важных биомолекул, как аминокислоты, белки, углеводы, антибиотики, алкалоиды из различных сред. В настоящее время для очистки и извлечения широкого ряда биомолекул активно применяются двухфазные системы с гидрофобными и гидрофильными ИЖ. На эффективность процесса экстракции влияют различные факторы, такие как природа, полярность и химические свойства биомолекул, а также природа и химические свойства ИЖ, поэтому для эффективного применения ИЖ в процессах экстракции необходимо подобрать оптимальные экспериментальные условия, обеспечивающие наилучшее распределение биомолекул между ИЖ и другой фазой. Немаловажным также является глубокое понимание взаимодействий, возникающих в таких системах и влияющих на их распределение между фазами в процессе экстракции, и механизма, по которому протекает этот процесс.

Изучение механизма процесса экстракции и визуализация границы раздела фаз были осуществлены при помощи специального ЯМР-эксперимента, в ходе которого спектры были зарегистрированы послойно вдоль вертикальной оси образца (положение и толщину слоя контролировали параметрами импульсной последовательности). Этот метод позволил зарегистрировать массив спектров вдоль двух фаз – ИЖ и органического растворителя – в одном образце. Спектры ЯМР высокого качества были зафиксированы для сигналов ИЖ и пептидов в нижней фазе так же хорошо, как и сигналы пептидов и органического растворителя в верхней фазе (рисунок 8а).



**Рисунок 8.** Изучение процесса перехода пептидов из ионной жидкости в органический растворитель с помощью спектроскопии ЯМР; а) послойная ЯМР-спектроскопия (slice-selective NMR) для двухфазного образца «ионная жидкость/органический растворитель»; б) вертикальный скан образца с двухфазной системой (ЯМР-сдвиги химических соединений, ppm; расстояние от границы раздела фаз, мм); в) магнитно-резонансная томография ЯМР-ампулы, содержащей двухфазную систему. (Сигналы пептидов показаны оранжевым цветом, сигналы ИЖ – черным;  $^1\text{H}$  ЯМР, 600 МГц, система [EMIM][Cl]/ $\text{C}_6\text{D}_6$ ; томография:  $^1\text{H}$  FLASH,  $256 \times 256$ ,  $\text{FOV} = 2 \times 2$  см).

Была зарегистрирована серия из 100 спектров ЯМР и получен вертикальный скан образца в виде двумерной диаграммы (рисунок 8б), в которой химические сдвиги (в ppm) отложены вдоль одной оси, а геометрическое положение в двухфазной системе – вдоль другой оси (расстояние от границы раздела фаз, мм). Также была проведена

магнитно-резонансная томография; полученное изображение наглядно демонстрирует характер границы раздела фаз (рисунок 8в).

В исследуемых образцах не было зафиксировано значительного изменения химических сдвигов молекул пептида в бензоле- $d_6$ , их значения не отклонялись от зарегистрированных в [EMIM][Cl] (рисунок 8а и б). Химический сдвиг ( $\delta_{CH_3}$ ) дивалина равнялся 1.0 ppm в бензоле- $d_6$  и 0.7 ppm в ИЖ (разница 0.3 ppm). Для других протонов также не наблюдалось значительных отклонений ( $\pm 0.1$  ppm), а в органической фазе не было зафиксировано сигналов, соответствующих молекулярным комплексам между пептидами и ИЖ. Магнитно-резонансная томография образца (рисунок 8в) демонстрирует неискаженную границу раздела фаз.

Следует отметить, что в процесс межфазного перехода могут вносить вклад различные механизмы, однако полученные экспериментальные данные наиболее соответствуют случаю молекулярной экстракции, осуществляющейся за счет молекулярной диффузии, при которой вещество движется индивидуально, не образуя ассоциатов с ИЖ.

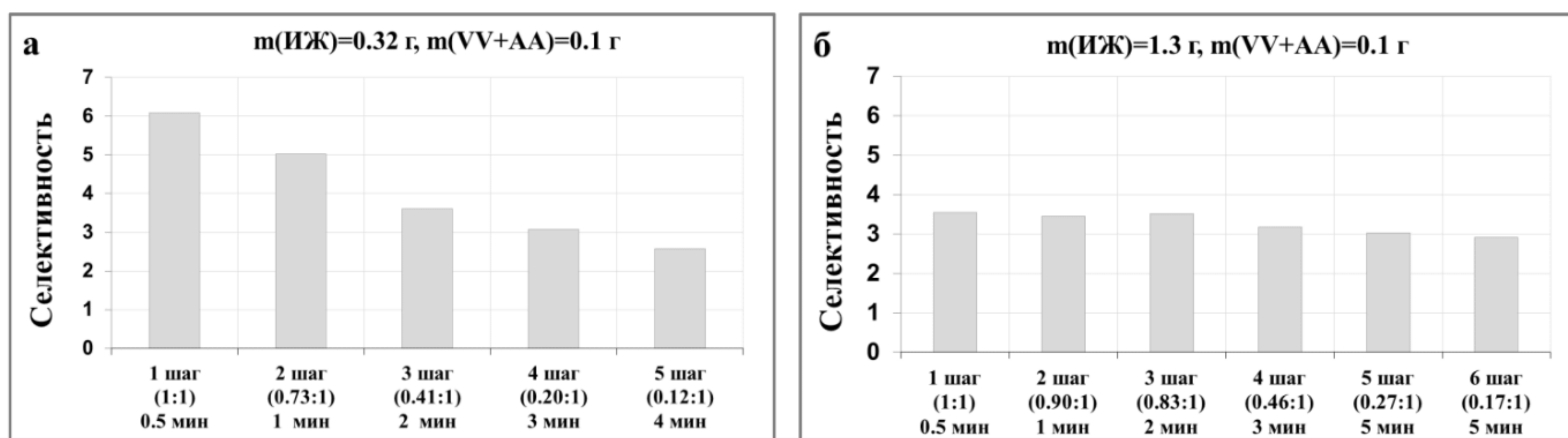
Различная растворимость пептидов в ИЖ позволила разработать эффективные системы для их разделения. В качестве модельных соединений была выбрана смесь двух структурно схожих пептидов, Boc-Ala-Ala-OMe и Boc-Val-Val-OMe, и смесь двух пептидов, различающихся длиной цепи, Boc-Val-Val-OMe и Boc-Val-Val-Val-OMe. Для этих соединений были подобраны оптимальные условия: природа растворителей, их количество, температура и время экстракции. После варьирования различных параметров для экстракции использовали [EMIM][Cl], [BMIM][BF<sub>4</sub>], [HMIM][Cl] в качестве ИЖ-фазы и смесь этилацетат/петролейный эфир = 1/9 в качестве органической фазы. Температура экстракции для различных ИЖ различалась в зависимости от температуры плавления ИЖ и не превышала 70 °С.

Первоначально была проведена экстракция 0.1 г смеси дипептидов (по 50 мг диаланина и дивалина) из 0.32 г [EMIM][Cl] (ИЖ-фаза) с помощью смеси растворителей этилацетат/петролейный эфир (органическая фаза). После первого шага экстракции (30 секунд) селективность экстракции ( $m$  (дивалина) /  $m$  (диаланина)) была равна 6, эффективность экстракции ( $m$  (экстрагированного дивалина) /  $m$  (исходного дивалина)) на данном шаге составила 30 %. Хотя оставшееся количество дивалина уменьшилось, на втором шаге общая селективность экстракции была равна 5, эффективность экстракции составила 63 %. Дивалин был практически полностью экстрагирован после пяти шагов экстракции, в то время как диаланин частично остался в ИЖ-фазе; общая селективность процесса составила 2.6 (рисунок 9а). Общая эффективность экстракции после пяти шагов была равна 95 %, а общее время контакта между ИЖ и органической фазой составило 13.5 минут (для 5 шагов экстракции).

Увеличение количества ИЖ (уменьшение концентрации пептидов) привело к меньшим значениям селективности. При использовании 0.5 г ИЖ значение селективности было равно 4.6-1.9, в то время как при 0.65 г ИЖ уменьшилось до 3.1-1.5.

Таким образом, общая селективность экстракции повышается с повышением концентрации дипептидов в ИЖ-фазе.

Затем экстракция 0.1 г смеси пептидов была проведена из 1.3 г ИЖ, дивалин экстрагировался на каждом шаге с постоянной селективностью от 3.5 до 3 (рисунок 9б). После шести шагов эффективность экстракции составила 96 %, общее время контакта двух фаз составило 16.5 минут. Когда количество ИЖ было увеличено до 2.6 г, селективность экстракции осталась постоянной, как и в предыдущем случае, однако эффективность оказалась ниже 78 %.



**Рисунок 9.** Экстракция дивалина из смеси дивалин (VV)/диаланин (AA) в системе, содержащей [EMIM][Cl] (ИЖ-фаза) и смесь этилацетат/петролейный эфир (органическая фаза), при 70 °С. Исходное количество смеси дипептидов - 0.1 г; исходное количество ИЖ - 0.32 г (а) или 1.3 г (б). Экстракция проводилась пошаговым способом. Селективность экстракции на первом шаге определяли как отношение количества ключевого экстрагируемого пептида к количеству второго экстрагируемого компонента смеси. После первого шага экстракции селективность рассчитывали как отношение суммы масс ключевого пептида (дивалина), экстрагированного на этом и предыдущих шагах экстракции, и суммы масс второго компонента смеси (диаланина). Общая селективность показана для каждого шага. Соотношение количеств дивалина/диаланина, остающихся в ИЖ-фазе после каждого шага, указано в скобках, также в каждом случае указано время контакта.

При сравнении двух случаев с различным количеством ИЖ, составляющим 0.32 и 1.3 г, наблюдались различные значения селективности процесса экстракции (рисунок 9). В первом случае (рисунок 9а) ИЖ оказывает избирательный высаливающий эффект, не растворившийся дивалин первым переходит в органическую фазу, в то время как хорошо растворимый диаланин остается в ИЖ-фазе. Таким образом, процесс протекает в гетерогенных условиях. Высокая селективность, равная 6 после 30 секунд контакта, объясняется быстрым переходом нерастворившегося дивалина из смеси в органическую фазу (рисунок 9а). Общая селективность была ниже вследствие меньшего количества нерастворившегося дивалина, остающегося в ИЖ после каждого шага. При повышении количества ИЖ (рисунок 9б) оба дипептида были хорошо растворимы, и экстракция протекала в гомогенных условиях. Однако даже в этом случае наблюдается селективное действие ИЖ: диаланин сильнее удерживался ИЖ по сравнению с дивалином. В результате селективность экстракции на первых шагах была меньше, чем в описанном



выше случае (при гетерогенных условиях); тем не менее, дивалин был экстрагирован с высокой общей эффективностью.

Хороших результатов удалось достигнуть и в случае системы, содержащей [BMIM][BF<sub>4</sub>] (ИЖ-фаза) и смесь этилацетат/петролейный эфир (органическая фаза). Дивалин был плохо растворим в тетрафторборате 1-бутил-3-метилимидазолия в отличие от хорошо растворимого диаланина. Селективность процесса экстракции в случае 0.1 г смеси дипептидов и 0.65 г [BMIM][BF<sub>4</sub>] находилась в диапазоне 6-3, а общая эффективность экстракции после 6 шагов и общего времени контакта 15.5 минут составила 93 %. Природа ИЖ оказывала большое влияние на процесс экстракции, в случае использования [HMIM][Cl] общая селективность и эффективность экстракции значительно снижались. Оба дипептида хорошо растворялись в [HMIM][Cl] и удерживались в ИЖ.

Наибольшее значение селективности (дивалин/диаланин), равное 6, было достигнуто в системе, содержащей [EMIM][Cl] (ИЖ-фаза) и смесь этилацетат/петролейный эфир (органическая фаза), при 70 °С. Стоит отметить, что для этого эксперимента понадобилось всего 0.32 г ИЖ, т.е. соотношение растворитель/растворенное вещество составило  $\approx 3/1$ , в то время как обычно для проведения процесса экстракции требуется значительно большее количество растворителя.

Различная растворимость пептидов в ИЖ позволила также селективно и эффективно экстрагировать дивалин из его смеси с тривалином. При начальной концентрации пептидов, равной 0.1 моль/л, в системе, содержащей [EMIM][Cl] (ИЖ-фаза) и смесь этилацетат/петролейный эфир (органическая фаза), селективность экстракции была равна 4.5-3.5, а общая эффективность после 7 шагов и общего времени контакта 20 минут составила 93 %.

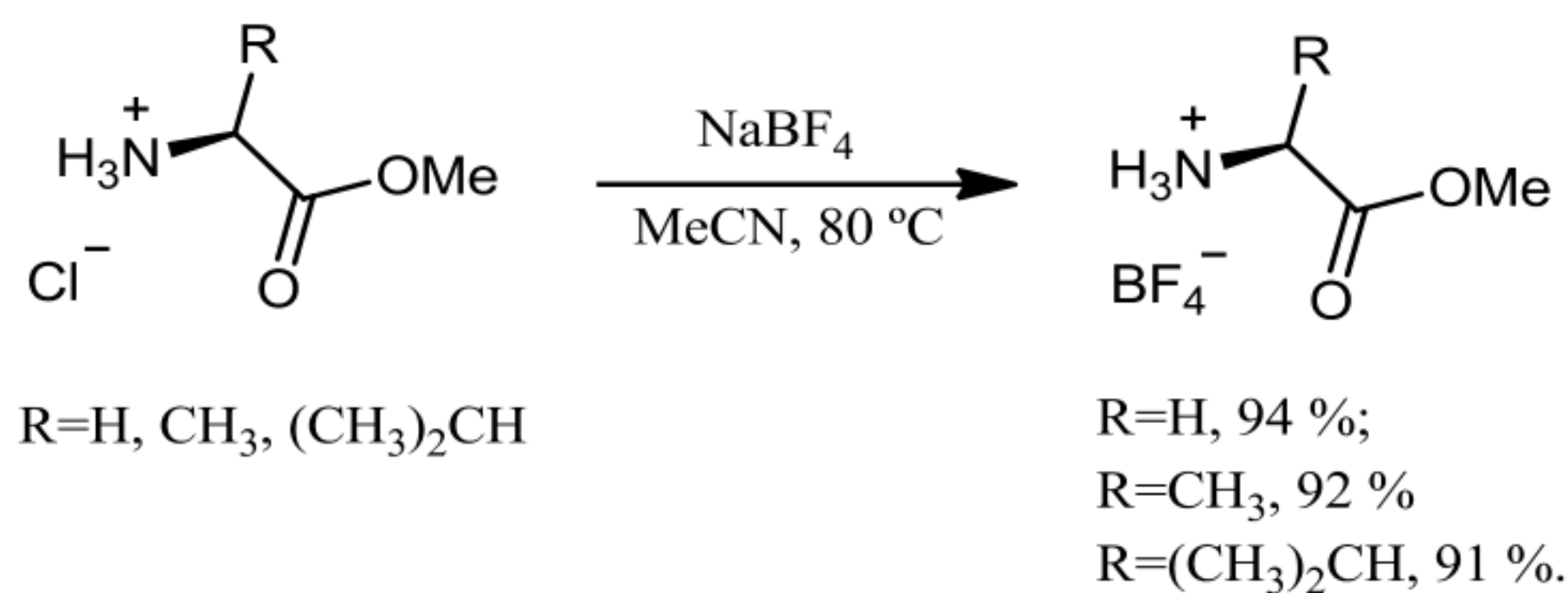
Таким образом, было показано, что высокие значения эффективности и селективности экстракции могут быть достигнуты выбором подходящей ИЖ и оптимизацией условий эксперимента. ИЖ не меняет своих свойств во время процесса экстракции и может быть использована многократно без потери селективности и эффективности процесса. После полного цикла экстракции пептидов процесс может быть возобновлен при добавлении новой порции пептидов. Молекулярный механизм экстракции позволяет предположить, что структура дипептида остается неизменной и не теряет своих свойств. Данная система обладает значительным потенциалом применения в процессах очистки и выделения пептидов и предоставляет новые возможности для химии устойчивого развития.

### **3. Токсичность ионных жидкостей, синтез функционализированных ионных жидкостей и определение их биологической активности**

В последние годы большое внимание уделяют влиянию ИЖ на окружающую среду и поиску нетоксичных ИЖ. Неоднократно высказывалось предположение, что функционализация ИЖ природными аминокислотами приведет к снижению их

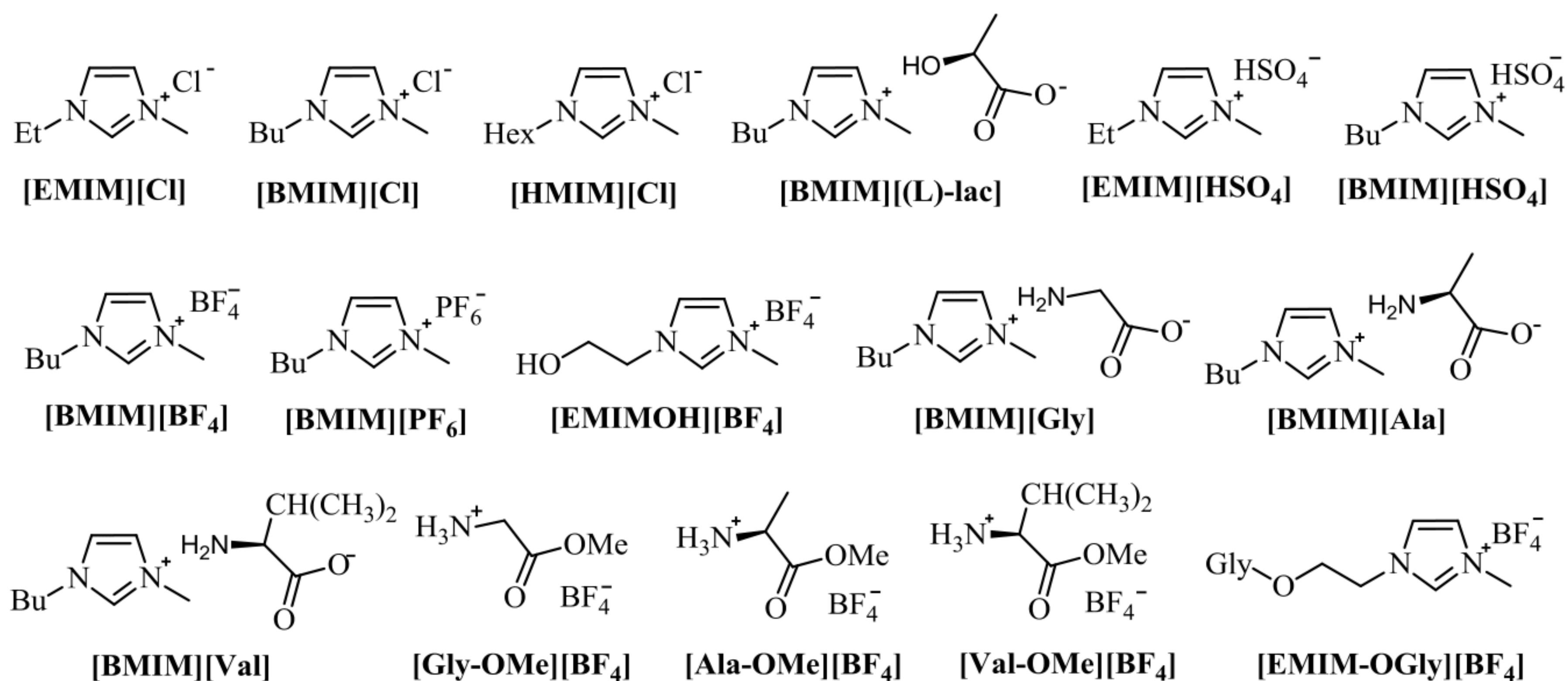
токсичности. Тем не менее, систематического изучения влияния аминокислотных молекул на токсичность ИЖ до сих пор не проводилось.

В ходе данной работы были синтезированы следующие ИЖ: с аминокислотным анионом ([BMIM][Gly], [BMIM][Ala], [BMIM][Val]), с аминокислотным катионом ([Gly-OMe][BF<sub>4</sub>], [Ala-OMe][BF<sub>4</sub>], [Val-OMe][BF<sub>4</sub>]) и с функционализированным аминокислотой катионом ([GlyO-EMIM][BF<sub>4</sub>]). ИЖ с аминокислотным катионом были получены впервые, согласно опубликованной ранее общей стратегии, по реакции между солями гидрохлорида метилового эфира аминокислоты и тетрафторборатом натрия (схема 1).



**Схема 1**

Также были протестированы коммерческие ИЖ ([EMIM][Cl], [BMIM][Cl], [HMIM][Cl], [EMIM][HSO<sub>4</sub>], [BMIM][HSO<sub>4</sub>], [BMIM][BF<sub>4</sub>], [BMIM][PF<sub>6</sub>], [BMIM][(L)-lac]) и [EMIMOH][BF<sub>4</sub>] (рисунок 10). Токсичность изучали на клеточных линиях NIH/3T3 (мышинные фибробласты) и CaCo-2 (аденокарцинома ободочной кишки человека). В качестве контроля были протестированы аминокислоты (глицин, L-аланин и L-валин) и их гидрохлориды (Gly•HCl, Ala•HCl, Val•HCl).



**Рисунок 10.** Структуры изученных ионных жидкостей.

Результаты исследований представлены в таблице 2 (чем меньше значение IC<sub>50</sub> (концентрация полумаксимального ингибирования), тем выше токсичность/биологическая активность ИЖ).

При сравнении двух клеточных линий видно, что почти во всех случаях ИЖ демонстрируют более низкую токсичность по отношению к фибробластам NIH/3T3, чем

опухолевым клеткам CaCo-2, за исключением [BMIM][BF<sub>4</sub>] и [HMIM][Cl], которые демонстрируют схожую токсичность по отношению к обеим культурам (IC<sub>50</sub> 11.19 и 6.21 мМ (CaCo-2) и 11.30 и 6.95 мМ (NIH/3T3), соответственно) (таблица 1, № 6, 9).

Для других случаев эта разница была более значительной: так, IC<sub>50</sub> равнялась 32.10 и 51.82 мМ для [EMIM][Cl] или 19.16 и 33.65 мМ для [BMIM][(L)-lac] по отношению к CaCo-2 и NIH/3T3, соответственно (таблица 1, № 4, 11). С удлинением боковой углеродной цепи токсичность ИЖ растет, что демонстрируют следующие значения IC<sub>50</sub>: 32.10, 18.85 и 6.21 мМ или 51.82, 25.93 и 6.95 мМ для [EMIM][Cl], [BMIM][Cl] и [HMIM][Cl] (по отношению к CaCo-2 или NIH/3T3, соответственно). Схожие результаты были получены для гидросульфатных ИЖ (таблица 1, № 7-8).

**Таблица 1.** Цитотоксичность изучаемых соединений по отношению к клеточной культуре NIH/3T3 и клеточной культуре CaCo-2 (<sup>a</sup> указана стандартная ошибка среднего).

№	ИЖ	24-ч IC <sub>50</sub> , мМ <sup>a</sup>	
		NIH/3T3	[CaCo-2]
1	[BMIM][Gly]	22.34±0.93	[16.31±0.42]
2	[BMIM][Ala]	30.23±0.53	[19.35±1.03]
3	[BMIM][Val]	25.18±0.64	[16.86±0.58]
4	[EMIM][Cl]	51.82±0.45	[32.10±1.84]
5	[BMIM][Cl]	25.93±0.07	[18.85±1.27]
6	[HMIM][Cl]	6.95±0.14	[6.21±0.08]
7	[EMIM][HSO <sub>4</sub> ]	23.06±0.33	[17.64±1.51]
8	[BMIM][HSO <sub>4</sub> ]	18.66±0.20	[13.70±0.78]
9	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	11.30±1.15	[11.19±0.63]
10	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]	16.65±0.11	[11.50±1.08]
11	[BMIM][(L)-lac]	33.65±0.53	[19.16±0.31]
12	[EMIMOH][BF <sub>4</sub> ]	25.45±0.07	
13	[Gly-OMe][BF <sub>4</sub> ]	9.94±0.60	
14	[Ala-OMe][BF <sub>4</sub> ]	9.56±0.37	
15	[Val-OMe][BF <sub>4</sub> ]	6.57±0.10	
16	[GlyO-EMIM][BF <sub>4</sub> ]	17.90±0.58	
17	Gly•HCl	30.07±0.25	
18	Ala•HCl	30.27±0.47	
19	Val•HCl	30.07±0.56	
20	Gly	>80	
21	Ala	>80	
22	Val	>80	

Эти данные согласуются с данными, полученными ранее для имидазолиевых ИЖ на клетках CaCo-2. Природа аниона также оказывала влияние на токсичность. Среди протестированных 1-бутил-3-метилимидазолиевых ИЖ [BMIM][Ala], [BMIM][Cl] и [BMIM][(L)-lac] продемонстрировали низкую токсичность по отношению к клеткам CaCo-2 (IC<sub>50</sub> 19.35, 18.85 и 19.16 мМ, соответственно) (таблица 1, № 2, 5, 11), в то время как [BMIM][Ala] и [BMIM][(L)-lac] оказались наименее токсичными по отношению к NIH/3T3 (30.23 и 33.65 мМ, соответственно) (таблица 1, № 2, 11). Самая высокая токсичность наблюдалась для [BMIM][BF<sub>4</sub>] и [BMIM][PF<sub>6</sub>] по отношению к CaCo-2 (IC<sub>50</sub> 11.19 и 11.50 мМ, соответственно) и для [BMIM][BF<sub>4</sub>] по отношению к NIH/3T3 (IC<sub>50</sub>

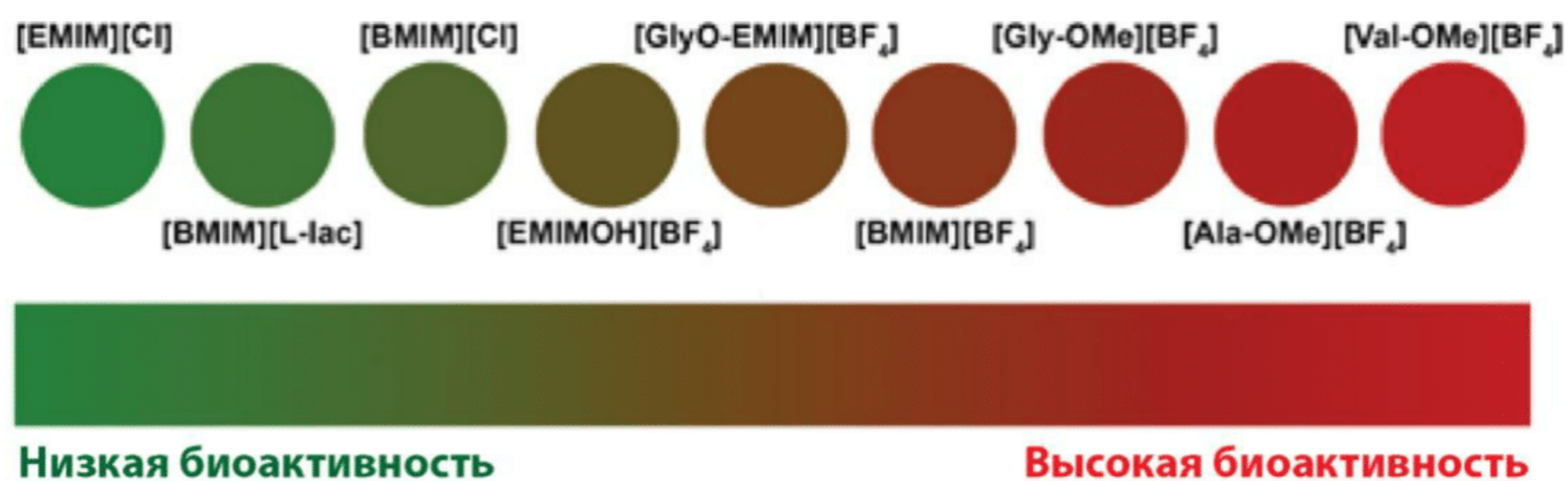
11.30 мМ). Gly<sup>-</sup> и Val<sup>-</sup> в качестве анионов были менее токсичны, чем BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, и HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, но более токсичны, чем L-lac<sup>-</sup> (таблица 1, № 1, 3, 8-11).

Неожиданные результаты были получены для ИЖ с аминокислотными катионами, [Gly-OMe][BF<sub>4</sub>], [Ala-OMe][BF<sub>4</sub>] и [Val-OMe][BF<sub>4</sub>]. Они продемонстрировали самую высокую токсичность среди всех протестированных ИЖ. По отношению к клеткам NIH/3T3 IC<sub>50</sub> [Gly-OMe][BF<sub>4</sub>], [Ala-OMe][BF<sub>4</sub>] и [Val-OMe][BF<sub>4</sub>] составила 9.94, 9.56 и 6.57 мМ (таблица 1, № 13-15), соответственно; по токсичности эти ИЖ оказались сравнимы и даже более токсичны, чем [HMIM][Cl] и [BMIM][BF<sub>4</sub>] (6.95 и 11.30 мМ, соответственно) (таблица 1, № 6, 9).

Полученные данные можно объяснить следующим образом. Тетрафторборатный анион проявляет относительно высокую токсичность в составе [BMIM][BF<sub>4</sub>]. Его токсичность по отношению к клеткам NIH/3T3 была более высокой, чем токсичность других BMIM-содержащих ИЖ, изученных в этой работе. Возможно, это связано с высвобождением токсичных фторид-ионов, что ранее было показано в других исследованиях. Роль аминокислотного катиона может заключаться в ускорении транспорта токсичного BF<sub>4</sub><sup>-</sup> в клетки, что, в свою очередь, приводит к усилению токсичности ИЖ в целом. Согласно ранее опубликованным исследованиям, аминокислоты поступают в клетки с помощью специальных транспортных белков. Сообщалось, что предшественники лекарств, связанные с аминокислотами, с большей легкостью проникают через клеточную мембрану, чем их несвязанные аналоги.

Было замечено, что функционализация катиона ИЖ остатком аминокислоты также может повысить ее биологическую активность, что подтверждается при изучении цитотоксичности [GlyO-EMIM][BF<sub>4</sub>]. По сравнению с [BMIM][BF<sub>4</sub>], [Gly-OMe][BF<sub>4</sub>], [Ala-OMe][BF<sub>4</sub>] и [Val-OMe][BF<sub>4</sub>] (таблица 1, № 9, 13-15), значение IC<sub>50</sub> 17.9 мМ для [GlyO-EMIM][BF<sub>4</sub>] было средним, однако оказалось выше, чем у исходной ИЖ [EMIMOH][BF<sub>4</sub>] (IC<sub>50</sub> 25.45 мМ) (таблица 1, № 16, 12) (рисунок 11).

Протестированные гидрохлориды аминокислот Gly•HCl, Ala•HCl и Val•HCl показали достаточно низкую токсичность по сравнению с другими изученными соединениями (IC<sub>50</sub> 30.07, 30.27 и 30.07 мМ, соответственно) (таблица 1, № 17-19) по отношению к клеточной линии NIH/3T3. Аминокислоты Gly, Ala и Val оказались нетоксичными в исследованном интервале концентраций (IC<sub>50</sub> >80 мМ) (таблица 1, № 20-22).



**Рисунок 11.** Биологическая активность (цитотоксичность) исследованных ИЖ (зеленый цвет – низкая токсичность, красный цвет – высокая токсичность).

Высокая биологическая активность аминокислотных ИЖ свидетельствует не только об их опасности для окружающей среды, но и о возможности успешного использования подобных соединений в биологии и медицине. Чтобы оценить влияние ИЖ на клеточную линию NIH/3T3, был проведен аннексиновый тест на апоптоз с использованием двух ИЖ, [BMIM][Cl] и [BMIM][Gly]. После 24 часов инкубации [BMIM][Cl] вызвал апоптоз по крайней мере в 45 % клеток (в контрольном образце – только в 6 %). Аналогичные результаты были получены для [BMIM][Gly]. Клетки NIH/3T3 после обработки [BMIM][Cl] окрасили реагентом Hoechst, в результате чего была отчетлива видна характерная для апоптоза фрагментация клеточных ядер.

Систематизированные в нашей работе данные по токсичности известных ИЖ, а также ИЖ, содержащих аминокислоты, демонстрируют, что присутствие аминокислот не всегда приводит к снижению токсичности. Более того, если в составе ИЖ аминокислота связана с токсичным анионом, биологическая активность ИЖ повышается. Токсичность ИЖ с аминокислотными анионами была сравнима с токсичностью [BMIM][Cl] или [BMIM][(L)-Iac], в то время как ИЖ с аминокислотными катионами проявили необычно высокую токсичность, что предполагает целесообразность дальнейшего изучения возможности использования их в медицине. Контролируемый апоптоз в сочетании с направленным действием оптимизированных противоопухолевых препаратов лежат в основе одной из стратегий борьбы с раковыми заболеваниями. Способность вызывать апоптоз наряду с высокой биологической активностью, которую можно направленно менять посредством изменения структуры ионных жидкостей, на клетки свидетельствует о противоопухолевом потенциале аминокислотных ИЖ.

#### **4. Синтез функционализированных фармацевтическими компонентами ионных жидкостей и определение их биологической активности**

Применения ИЖ в фармацевтической промышленности и медицине – важное направление, которое стало развиваться благодаря наличию у некоторых ИЖ биологической активности, а также возможности изменять физико-химические свойства ИЖ, используя различные комбинации анионов и катионов. Основными преимуществами использования ИЖ в фармацевтике являются: (а) возможность изменять гидрофобность/липофильность ИЖ, что позволяет регулировать способность новых активных фармацевтических компонентов (АФК) проникать через клеточные и другие биологические мембраны; (б) ионная природа, позволяющая модулировать силу ионного связывания; (в) варьирование линкера между ионным ядром и АФК, данный линкер может содержать функциональные группы, являющиеся ферментативными мишенями; (г) возможность преобразования плохо растворимых АФК в хорошо растворимые АФК-ИЖ.

В настоящее время существуют две основные стратегии комбинирования ИЖ и АФК: (а) использование АФК в виде аниона или катиона (ионный транспорт) и (б) ковалентное связывание АФК и ИЖ (ковалентный транспорт). Кроме того,

варьирование ионов в структуре ИЖ позволяет комбинировать АФК с различными свойствами в одной молекуле (одинаковые или различные АФК могут входить в состав ИЖ в виде катиона или аниона одновременно).

В данной работе были получены модельные ИЖ, в состав катиона и аниона которых входят активные фармацевтические компоненты, и их биологическая активность была определена по отношению к клеточным культурам 3215 LS (фибробласты человека) и CaCo-2 (аденокарцинома ободочной кишки человека).

В качестве АФК были выбраны салициловая кислота, которая является нестероидным противовоспалительным средством и часто используется в медицинских и косметических препаратах, и меселазин (5-аминосалициловая кислота), противовоспалительный и антибактериальный препарат, применяемый для лечения неспецифического язвенного колита и болезни Крона. Оба этих лекарства представляют собой твердые вещества, плохо растворимые в воде (салициловая кислота – 2 мг/мл воды, меселазин – 0.84 мг/мл воды при 20 °С).

Сначала были получены АФК-ИЖ на основе салициловой кислоты и меселазина. Методом анионного обмена были получены имидазолиевые ИЖ с салицилатным анионом ([EMIM][Sal], [BMIM][Sal] и [HMIM][Sal]) и с 5-аминосалицилатным анионом (аминогруппа была предварительно защищена третбутоксикарбонильной группой) ([EMIM][5-ASA-Вос], [BMIM][5-ASA-Вос] и [HMIM][5-ASA-Вос]). Все эти соединения представляют собой масла, хорошо растворимые в воде.

Также были получены ИЖ с имидазолиевым катионом, функционализированным салициловой кислотой. Сначала были получены хлоралкиловых эфиры салициловой кислоты Sal-OEtCl и Sal-OPrCl, которые далее вводились в реакцию с метилимидазолом с получением искомым соединений (схема 2).

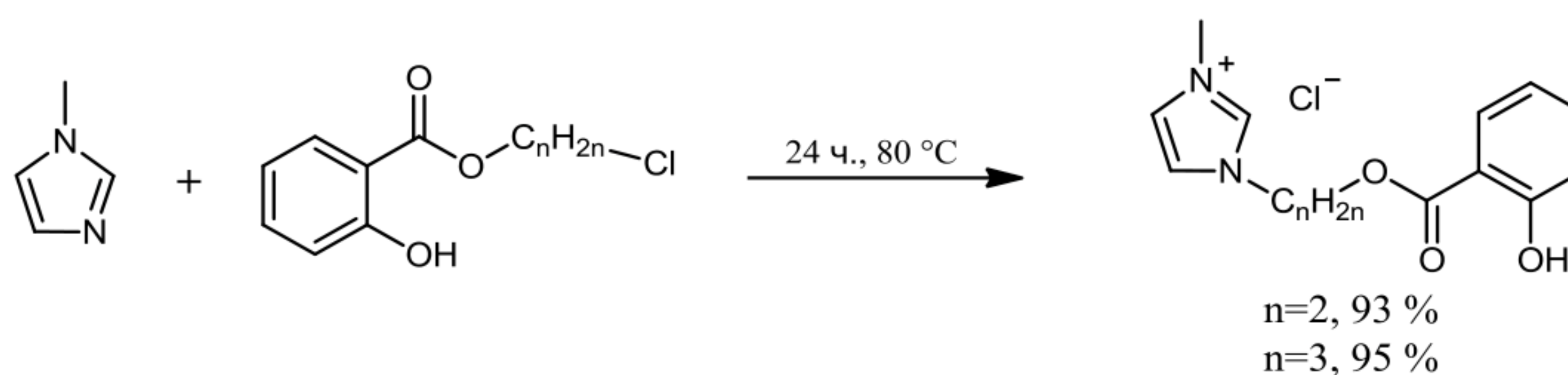


Схема 2.

Впервые были получены соединения, [EMIM-OSal][Cl] и [PrMIM-OSal][Cl], представляющие собой твердые вещества, хорошо растворимые в воде.

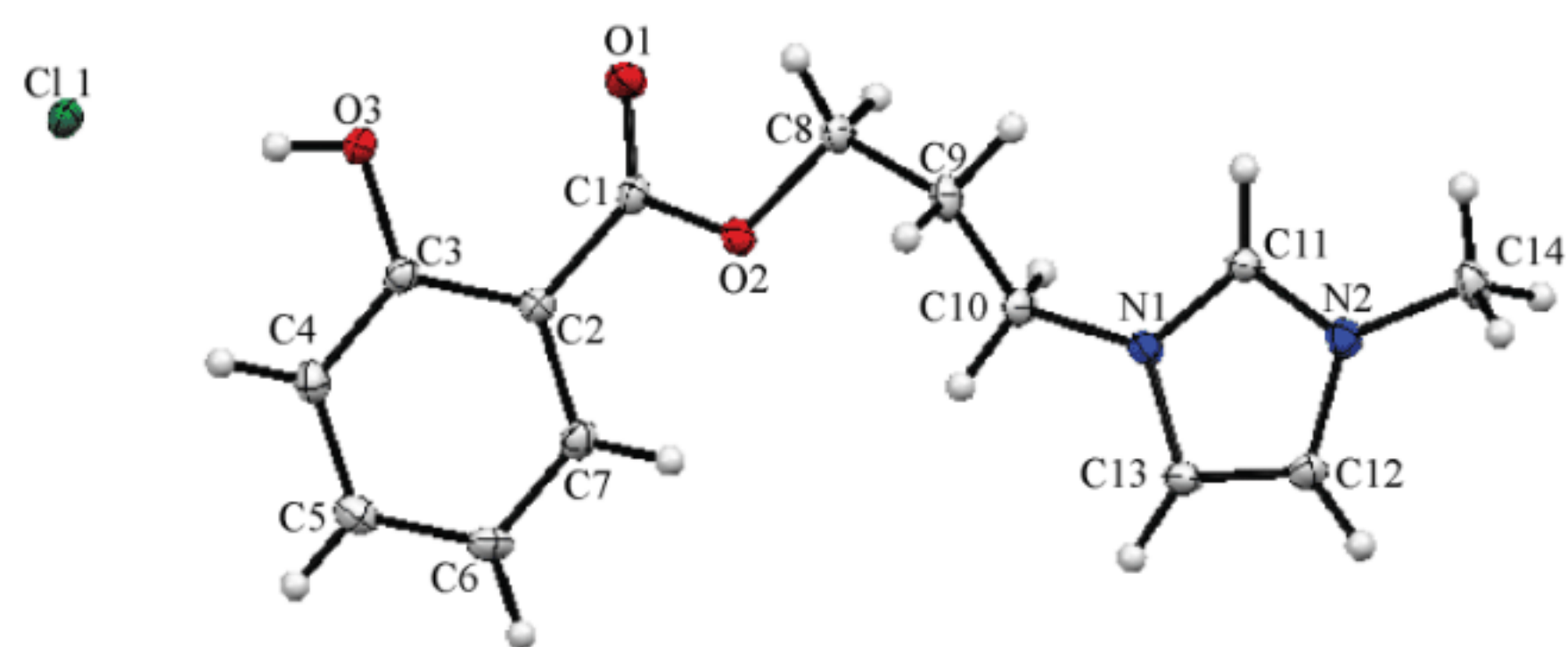


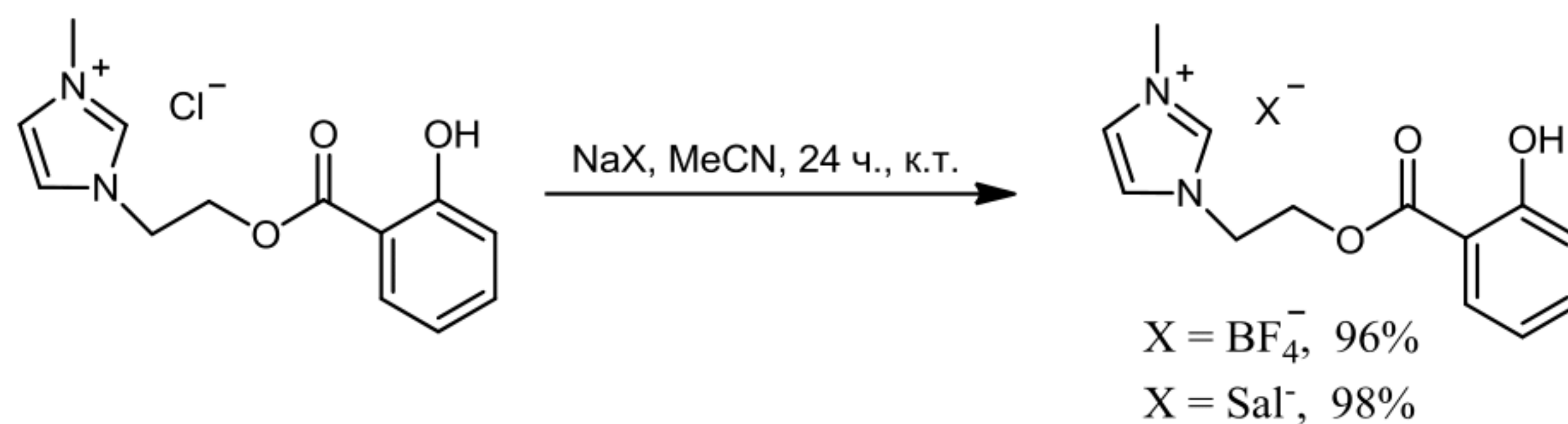
Рисунок 12. Структура [PrMIM-OSal][Cl]

Кристалл высокоплавкой соли [PrMIM-OSal][Cl] был выращен в диметилсульфоксиде, состав и структура кристалла были подтверждены с помощью рентгеноструктурного анализа (рисунок 12).

Имидазольное кольцо связано с салициловым фрагментом с помощью алкильного линкера, который принимает t-g(+)-t-g(-) (t - транс, g- гош) конформации. В случае [PrMIM-OSal][Cl] атом водорода

гидроксильной группы салициловой кислоты образует прочную водородную связь  $O-H \cdots Cl$  с хлорид-анионом, в то время как кислый протон имидазольного кольца соединяет два атома кислорода карбоксильной группы салициловой кислоты бифуркационной связью (рисунок 12).

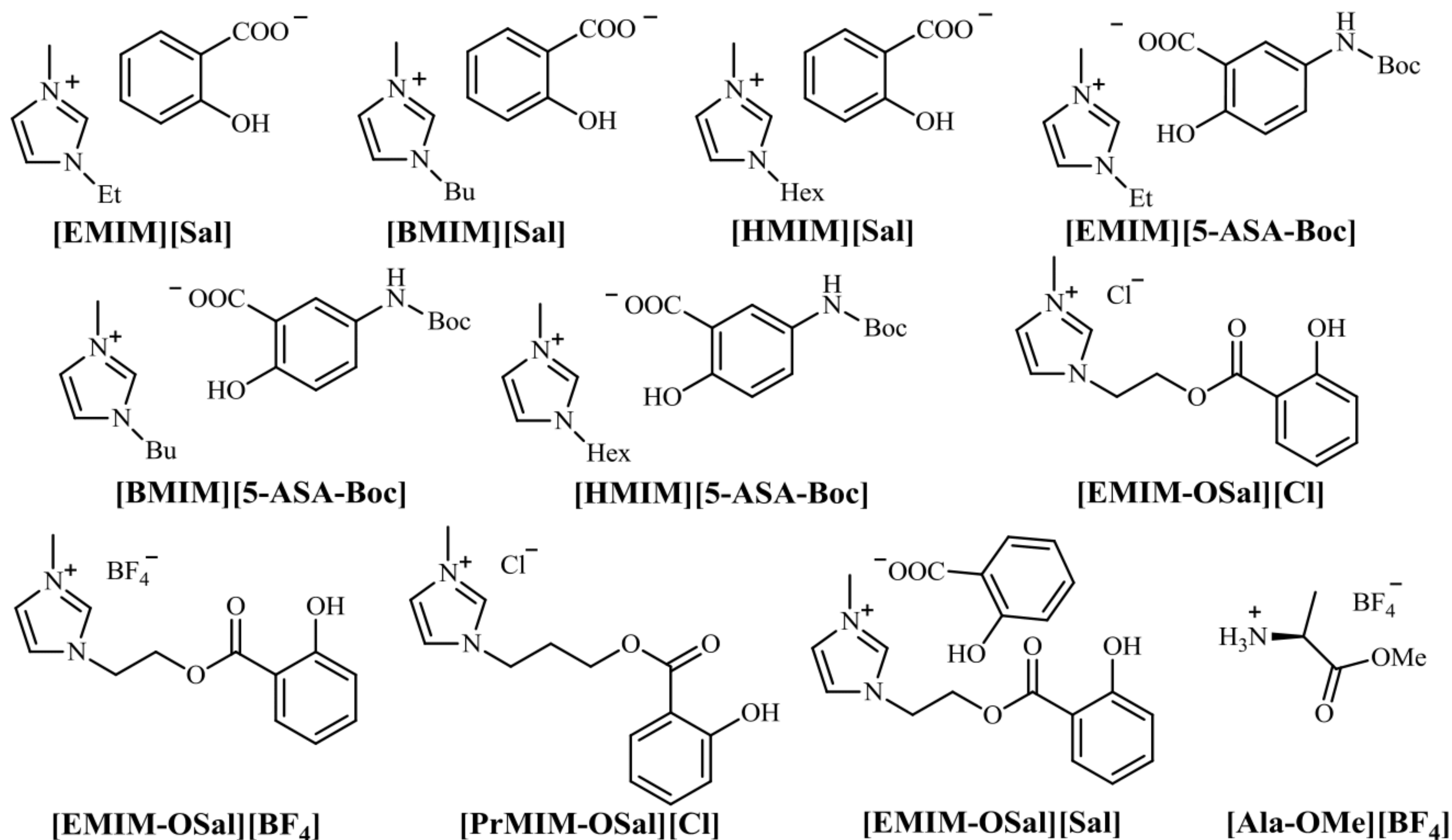
Также впервые были получены ИЖ с имидазольным катионом, функционализированным салициловой кислотой, тетрафторборатным и салицилатным анионами. Для этого провели реакцию анионного обмена  $[EMIM-OSal][Cl]$  с тетрафторборатом натрия или салицилатом натрия (схема 3).



**Схема 3.**

Полученная соль  $[EMIM-OSal][BF_4]$  представляет собой твердое вещество, в то время как  $[EMIM-OSal][Sal]$  – очень густое масло; оба этих вещества хорошо растворимы в воде.

Синтезированные (рисунок 13) и коммерческие ИЖ ( $[EMIM][Cl]$ ,  $[BMIM][Cl]$ ,  $[HMIM][Cl]$ ,  $[BMIM][BF_4]$ ) протестировали на клеточных линиях CaCo-2 (аденокарцинома ободочной кишки человека) и 3215 LS (фибробласты человека). Также для сравнения на токсичность были протестированы  $[Ala-OMe][BF_4]$  и салициловая кислота.



**Рисунок 13.** Структуры исследованных коммерческих и синтезированных ИЖ.

Результаты исследований представлены в таблице 2 (чем меньше значение  $IC_{50}$ , тем выше токсичность/биологическая активность ИЖ).

При сравнении двух клеточных линий видно, что изученные ИЖ (коммерческие и синтезированные) продемонстрировали схожую токсичность по отношению к раковым и нормальным клеткам. Некоторые ИЖ, такие как [BMIM][BF<sub>4</sub>], [Ala-OMe][BF<sub>4</sub>], [EMIM][Sal] и [BMIM][Sal], показали значительно более высокие значения токсичности по отношению к клеткам 3215 LS по сравнению с клетками CaCo-2 (таблица 2).

**Таблица 2.** Цитотоксичность изучаемых соединений по отношению к клеточным культурам CaCo-2 (аденокарцинома ободочной кишки человека) и 3215 LS (фибробласты человека) (в скобках указан 95 % доверительный интервал).

№	ИЖ	CaCo-2 (24-ч $IC_{50}$ , мМ)	3215 LS (24-ч $IC_{50}$ , мМ)
1	[EMIM][Cl]	32.10	46.15 (45.70-46.59)
2	[BMIM][Cl]	18.85	30.08 (19.47-40.70)
3	[HMIM][Cl]	6.21	7.54 (2.55-12.54)
4	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	11.19	4.88 (4.27-5.50)
5	[Ala-OMe][BF <sub>4</sub> ]	6.24 (4.32-8.17)	2.63 (2.32-2.94)
6	[EMIM][Sal]	5.97 (4.51-7.91)	1.39 (0.64-2.14)
7	[BMIM][Sal]	4.34 (2.48-7.61)	0.64 (0.19-1.09)
8	[HMIM][Sal]	1.96 (0.79-3.14)	2.00 (0.69-3.31)
9	[EMIM-OSal][BF <sub>4</sub> ]	4.77 (3.27-6.27)	4.12 (2.51-5.73)
10	[EMIM-OSal][Cl]	3.82 (3.34-4.31)	2.85 (1.30-4.40)
11	[PrMIM-OSal][Cl]	2.55 (2.08-3.13)	3.19 (0.84-5.54)
12	[EMIM-OSal][Sal]	-	0.71 (0.58-0.84)
13	Салициловая кислота	Раствор макс. концентрации (~18 мМ) убивает ~95% клеток	1.28 (0.75-2.19)

Салициловая кислота проявила схожую токсичность по отношению к обеим клеточным линиям. Введение салициловой кислоты в состав имидазолиевых ИЖ значительно увеличило их цитотоксичность (снижение 24-ч  $IC_{50}$ ). Так, 24-ч  $IC_{50}$  на культуре клеток 3215 LS составила 1.39, 0.64 и 2.00 мМ для [EMIM][Sal], [BMIM][Sal] и [HMIM][Sal], соответственно (таблица 2, № 6, 7, 8), в то время как для [EMIM][Cl], [BMIM][Cl] и [HMIM][Cl] - 46.15, 30.08 и 7.54 мМ, соответственно (таблица 2, № 1, 2, 3). Для данной клеточной линии зависимость токсичности салициловых ИЖ от длины алкильной цепи не прослеживается, в то время как для CaCo-2 клеточной линии она видна, хотя разница между значениями токсичности незначительна (5.97, 4.34 и 1.96 (для [EMIM][Sal], [BMIM][Sal] и [HMIM][Sal], соответственно) (таблица 2, № 6, 7, 8).

Введение салициловой кислоты в состав катиона ИЖ ([EMIM-OSal][BF<sub>4</sub>], [EMIM-OSal][Cl], [PrMIM-OSal][Cl]) привело к аналогичному увеличению цитотоксичности, (24-ч  $IC_{50}$  на культуре клеток 3215 LS - 4.12, 2.85 и 3.19 мМ, соответственно (таблица 2, № 9, 10, 11)). Сходные результаты были получены на культуре клеток CaCo-2 - 4.12, 2.85 и 3.19 мМ, соответственно (таблица 2, № 9, 10, 11). Интересно отметить, что в данном случае замена хлорид-аниона на тетрафторборат-анион не оказала существенного влияния на токсичность ИЖ, в то время как токсичности коммерческих ИЖ [BMIM][Cl] и [BMIM][BF<sub>4</sub>] заметно различаются (24-ч  $IC_{50}$  на культуре клеток 3215



LS - 30.08 и 4.88 мМ, соответственно) (таблица 2, № 2, 4). Изменение природы аниона в ИЖ с катионом EMIM-OSal<sup>+</sup> оказывало незначительное влияние на токсичность, как и удлинение алкильного линкера до PrMIM-OSal<sup>+</sup>.

Цитотоксичность ИЖ с салициловой кислотой в катионе была сравнима с цитотоксичностью аминокислотной ИЖ [Ala-OMe][BF<sub>4</sub>]. Ранее было показано, что наличие аминокислоты в катионе ведет к значительному увеличению токсичности ИЖ с тетрафторборатным анионом, возможно, вследствие специфичных взаимодействий между аминокислотами и транспортными белками на поверхности клетки. По сравнению с [BMIM][Cl] и [BMIM][BF<sub>4</sub>], [EMIM-OSal][BF<sub>4</sub>] и [EMIM-OSal][Cl] показали схожую токсичность (таблица 2, № 1,2,4,9).

Также была изучена токсичность [EMIM-OSal][Sal], которая содержит салициловую кислоту в катионе (ковалентное связывание) и анионе (ионное взаимодействие). Значение IC<sub>50</sub> составило 0.71 мМ и существенно не отличалось от ИЖ с салициловой кислотой только в анионе (таблица 2, № 6-8), т.е. в случае имидазолиевых ИЖ введение салициловой кислоты в состав одного из ионов достаточно для достижения максимально возможной цитотоксичности, и повышение доли салициловой кислоты не приводит к более высокой биологической активности. IC<sub>50</sub> трех различных видов АФК-ИЖ не различается значительно, хотя ИЖ с салициловой кислотой, ковалентно связанной с катионом, демонстрируют более низкую токсичность (IC<sub>50</sub> 2.85-4.12 мМ), чем ИЖ с салицилатным анионом (IC<sub>50</sub> 0.64-2.00 мМ).

Известно, что салициловая кислота способна вызывать апоптоз *in vitro* и *in vivo*, однако детальный механизм ее действия до конца не известен. Сохранение способности салициловой кислоты вызывать гибель клеток, будучи связанной с ИЖ посредством ковалентной или ионной связи, позволяет предположить, что механизм ее действия остается неизменным и не включает метаболические изменения.

Таким образом, можно сделать вывод, что биологическая активность ИЖ с салициловым анионом и функционализированными салициловой кислотой катионами сравнима с биологической активностью салициловой кислоты, однако полученные ИЖ обладают рядом преимуществ. Так, многие из них находятся в жидком состоянии и лишены ряда недостатков, связанных с полиморфизмом, присущим твердым формам лекарств. Кроме того, они обладают хорошей растворимостью в воде, что повышает их биологическую доступность, в то время как исходные лекарственные препараты плохо растворимы. Наличие сложноэфирной связи в боковой цепи и ароматические кольца полученных ИЖ являются потенциальными ферментными мишенями, что будет благоприятствовать их биоразложению.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана методика получения имидазолиевых ионных жидкостей, функционализированных салициловой кислотой, и выполнено исследование их биологической активности. Показано, что введение салициловой кислоты в состав катиона или аниона ионных жидкостей не приводит к потере биологической активности. В отличие от салициловой кислоты, многие функционализированные ионные жидкости представляли собой жидкие вещества и обладали хорошей растворимостью в воде.

2. Изучена биологическая активность ионных жидкостей, функционализированных аминокислотами, в сравнении с известными ионными жидкостями. Показано, что введение аминокислот в состав ионных жидкостей не всегда приводит к ожидаемому снижению их токсичности. Токсичность ионных жидкостей с аминокислотными анионами была сравнима с токсичностью хлоридных и лактатных имидазолиевых ИЖ, в то время как введение аминокислот в состав катиона ионных жидкостей привело к значительному повышению токсичности.

3. Подробно изучено стабилизирующее/дестабилизирующее действие ионов серии Гофмейстера на ряд модельных пептидных соединений на основе аланина и валина в ионных жидкостях с помощью спектроскопии ЯМР. На примере дипептида показано, что стабилизирующее действие анионов не соответствует прямому порядку серии Гофмейстера.

4. Обнаружена высокая чувствительность ионных жидкостей к структуре пептидов и зависимость растворимости пептидов от длины, аминокислотной последовательности, гидрофобности их боковых групп и природы анионов и катионов ионных жидкостей. Изученные взаимодействия ионных жидкостей с модельными пептидными соединениями свидетельствуют о том, что имидазолиевые ИЖ способны стабилизировать биомолекулы.

5. Показано, что процесс перехода молекулы пептида из ионной жидкости в органическую фазу в двухфазной системе соответствует случаю молекулярной экстракции, при которой вещество движется индивидуально, не образуя стабильных супрамолекулярных ассоциатов. Разработана эффективная система, позволяющая селективно выделять модельные пептиды из смеси.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:**

1. Seitkalieva M. M., Grachev A. A., Egorova K. S., Ananikov V. P. Nanoscale organization of ionic liquids and their interaction with peptides probed by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy // *Tetrahedron*. - **2014**. - Vol. 70. - P. 6075 - 6081
2. Egorova K. S., Seitkalieva M. M., Posvyatenko A. V., Ananikov V. P. Unexpected increase of toxicity of amino acid-containing ionic liquids // *Toxicol. Res.* - **2015**. - Vol. 4. - P. 152-159
3. Seitkalieva M. M., Kachala V. V., Egorova K. S., Ananikov V. P. Molecular Extraction of Peptides in Ionic Liquid Systems // *ACS Sustainable Chem. Eng.* - **2015**. - Vol. 3. - P. 357–364
4. Сейткалиева М. М., Грачев А. А., Анаников В. П. Изучение поведения олигопептидов в среде ионной жидкости с помощью  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии. VI Молодежная конференция ИОХ РАН посвященная 80-летию со дня основания ИОХ РАН, Москва, 16-17 апреля **2014**. Сборник тезисов докладов, с. 278-279
5. Сейткалиева М. М., Грачев А. А., Анаников В. П.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопия для изучения пептидов в среде ионной жидкости Третья всероссийская научная конференция с международным участием "Успехи синтеза и комплексообразования", Москва, 21-25 Апреля **2014**. Сборник тезисов докладов. Часть 1, с. 280
6. Seitkalieva M. M., Kachala V. V., Egorova K. S., Ananikov V. P. Molecular interactions and extraction of peptides in ionic liquids systems International Conference Molecular Complexity in Modern Chemistry (MCMC-2014), Moscow, Russia, September 13-19, **2014**. Book of Abstracts, P. 253
7. Сейткалиева М. М., Качала В. В., Егорова К. С., Анаников В. П. Молекулярная экстракция пептидов в ионных жидкостях VI Всероссийская конференция "Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях", Казань 6-9 апреля **2015**. Сборник тезисов докладов, с.168