

УДК 541.64:547.466

ГИПЕРРАЗВЕТВЛЕННЫЙ ПОЛИ-*L*-ЛИЗИН,  
СОДЕРЖАЩИЙ МЕЖДУ ТОЧКАМИ “ВЕТВЛЕНИЯ”  
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ  
ИЛИ ИХ ОЛИГОМЕРЫ: СИНТЕЗ И СТРУКТУРА<sup>1</sup>

© 2005 г. Г. П. Власов\*, И. И. Тарабукина\*, С. В. Валуева\*, А. И. Киппер\*,  
Е. Б. Тарабукина\*, А. П. Филиппов\*, Е. В. Авдеева\*\*, В. И. Воробьев\*\*

\*Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук  
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

\*\*Институт цитологии Российской академии наук  
194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

Поступила в редакцию 02.02.2004 г.

Принята в печать 18.11.2004 г.

Разработан новый метод синтеза гиперразветвленного поли-*L*-лизина в условиях каталитического удаления N<sup>ε</sup>-карбобензоксизидитной группировки с N-карбоксиангидрида N<sup>ε</sup>-карбобензокси-*L*-лизина при действии водорода над активированным палладием. В аналогичных условиях из N-карбоксиангидрида N<sup>ε</sup>-карбобензокси-*L*-лизина и N-карбоксиангидридов γ-*трет*-бутил-*L*-глутамата или *L*-аланина получены гиперразветвленные полiamинокислоты, содержащие в своем составе между точками “ветвления” – остатками лизина или вне их наряду с остатками лизина или их олигомерами также остатки глутаминовой кислоты или аланина и их олигомеры. Структура и конформации макромолекул гиперразветвленных поли-*L*-лизинов была изучена с применением метода статического и динамического рассеяния света, седиментационно-диффузионного анализа и метода кругового дихроизма. Показано, что полимеры имеют компактную симметричную форму, сильно отличающуюся от палочкообразной структуры линейного поли-*L*-лизина.

## ВВЕДЕНИЕ

Создание новых полимеров необычной архитектуры, способных выступать в качестве носителей биологически активных веществ, например ДНК, в последние годы привлекают к себе пристальное внимание. Среди разнообразных подходов к созданию носителей для невирусной доставки ДНК именно разветвленные полимеры оказались наиболее перспективными. К ним прежде всего относятся разветвленный полиэтиленимин [1, 2] и дендримеры [3]. В качестве дендримерных носителей ДНК наиболее перспективными являются дендримеры на основе лизина, так как они являются биодеградирующими и биосовместимыми носителями, несущими на внешней сфере катионные группировки, способные свя-

зывать ДНК и подвергаться дополнительной модификации [4–7].

Дендримеры на основе лизина могут быть получены путем классического пептидного синтеза в растворе или на полимерных носителях [8] в результате последовательного наращивания числа генераций. Этот подход – процесс трудоемкий и длительный, несмотря на то, что он позволяет получать структурно однообразные и монодисперсные продукты. Альтернативой пошаговому пептидному синтезу аминокислотных дендримеров является комбинация синтеза отдельных генераций дендримера на основе лизина с использованием методологии классического синтеза пептидов в растворе и полимеризации N-карбоксиангидрида N<sup>ε</sup>-карбобензокси-лизина (или N<sup>ε</sup>-трифторацетил-лизина) на N-концевых аминогруппах лизина в точках “ветвления” [9]. В данном случае между фрагментами лизина в точках “ветвления”, определяющими число генераций дендримера, находятся линейные полилизиновые фрагменты, что позволяет получать более высокомолекулярные

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 01-03-32398) и грантов “Научные школы РФ” (проекты 00-15-97318 и 1823.2003.3).

E-mail: gpvlasov@hq.macro.ru (Власов Геннадий Петрович).

**Таблица 1.** Строение синтезированных полимеров и их краткое обозначение

Строение полимера	Соотношение аминокислот по данным аминокислотного анализа	Краткое обозначение*
Линейный поли- <i>L</i> -лизин	—	p(K)-100
Линейный поли- <i>L</i> -лизин	—	p(K)-140
Гиперразветвленный поли- <i>L</i> -лизин	—	hbp(K)
Гиперразветвленный поли-( <i>L</i> -лизин- <i>L</i> -аланин)	Lys : Ala = 1.30	hbp(K,A)-1.30
Гиперразветвленный поли-( <i>L</i> -лизин- <i>L</i> -аланин)	Lys : Ala = 2.26	hbp(K,A)-2.26
Гиперразветвленный поли-( <i>L</i> -лизин- <i>L</i> -аланин)	Lys : Ala = 0.27	hbp(K,A)-0.27
Гиперразветвленный поли-( <i>L</i> -лизин- <i>L</i> -глутаминовая кислота)	Lys : Glu = 1.96	hbp(K,E)-1.96

\* Обозначение аминокислот в однобуквенных коде: K = Lys, A = Ala, E = Glu.

дендримеры, несмотря на некоторые потери, связанные с отходом от структурной однородности конечных продуктов на стадии полимеризации N-карбоксиангидрида. Однако этот подход остается многоступенчатым, длительным и трудоемким.

В настоящей работе мы сообщаем о новом способе быстрого получения гиперразветвленного полилизина, содержащего между точками “ветвления” – остатками лизина или на внешней сфере гиперразветвленного “ядра” наряду с лизиновыми остатками или олигомерами лизина также остатки глутаминовой кислоты и аланина или их олигомеры. В работе представлены данные о структуре и молекулярно-конформационных характеристиках полимеров, полученные с использованием метода статического и динамического рассеяния света и метода кругового диахроизма.

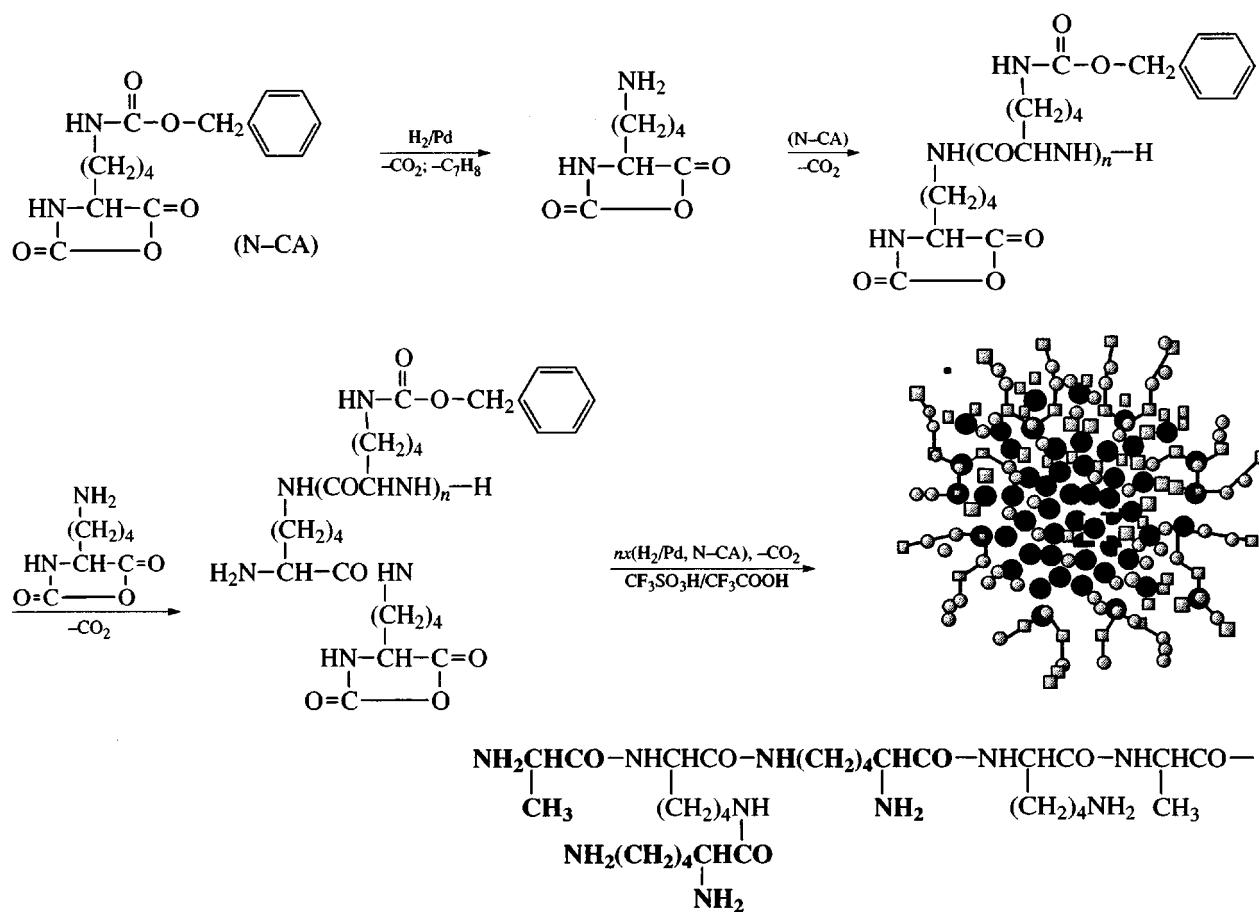
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Синтез гиперразветвленного поли-*L*-лизина*

Синтез гиперразветвленного полилизина проводили в условиях восстановительного удаления N<sup>ε</sup>-карбобензоксизащитной группировки с N-карбоксиангидрида N<sup>ε</sup>-карбобензокси-*L*-лизина при пропускании водорода через раствор N-карбоксиангидрида в диоксане или ТГФ в присутствии активированного палладия на угле. ε-Аминогруппа N-карбоксиангидрида *L*-лизина, освободившаяся в ходе каталитического удаления, сразу же выступает в роли инициатора полимеризации N-кар-

боксиангидрида. В процессе каталитического гидрирования продолжается удаление карбобензоксизащитных групп с N<sup>ε</sup>-аминогрупп N-карбоксиангидрида лизина (это ведет к появлению новых инициирующих центров полимеризации N-карбоксиангидрида) и с N<sup>ε</sup>-аминогрупп, образовавшихся олигомерных/полимерных цепочек (это дает разветвление полимера). Возможна также реакция полимеризации N-карбоксиангидридного цикла, содержащего олиго-*L*-лизин на N<sup>ε</sup>-аминогруппах (это создает дополнительные точки “ветвления”). В результате лизин между точками “ветвления” полимера связан как за счет своих α-амино- и α-карбоксильных групп, так и за счет ε-амино- и ε-карбоксильных групп.

Использование на стадии каталитического гидрирования наряду с N-карбоксиангидридом N<sup>ε</sup>-карбобензокси-*L*-лизина других N-карбоксиангидридов α-аминокислот, например, N-карбоксиангидрида γ-*трет*-бутил-*L*-глутамата, γ-*трет*-бутильная группа которого устойчива в условиях каталитического гидрирования, или N-карбоксиангидрида аланина приводит к образованию гиперразветвленного гетерополи-*L*-лизина. Эти полимеры содержат между точками “ветвления” или вне их олигомерные фрагменты, состоящие из лизина и глутаминовой кислоты. Полученные гиперразветвленные полiamинокислоты и их краткое обозначение представлены в табл. 1. Схема получения и структура гиперразветвленных полимеров показаны ниже.



Здесь темный кружок – лизин в точке “ветвления”, входящий в полимерную цепь своими  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -амино- и  $\alpha$ -карбоксильными группами; светлый кружок – лизин, входящий в полимерную цепь своими  $\alpha$ -амино- (или  $\epsilon$ -амино) и  $\alpha$ -карбоксильной группами; светлый квадрат – аланин или глутаминовая кислота. Внизу справа выделен фрагмент структуры гиперразветвленного гетерополи-*L*-лизина, включающего наряду с лизином, аланин; полужирным показаны N-концевые аминокислоты – аланин и лизин, содержащие  $\alpha$ -амино- (аланин) и  $\alpha$ -амино- и  $\epsilon$ -аминогруппы (лизин) и фрагмент лизина, входящий в полимерную цепь своими  $\epsilon$ -амино- и  $\alpha$ -карбоксильными группами ( $\alpha$ -аминогруппа свободна).

В основе предложенного метода получения гиперразветвленных полiamинокислот лежит идея, разработанная ранее при синтезе циклических олигопептидов – фрагментов пентапептидлактона противоракового антибиотика актиномицина Д [10, 11], особенностью которого является удаление карбобензоксизиды с аминогруппы пептида-предшественника, имеющего активирован-

ную карбоксильную группу (например, пентахлорфенильную), при действии водорода над палладием [12]. Каталитическое удаление карбобензоксигруппы в пептиде-предшественнике сразу же приводит к внутримолекулярной циклизации. Этот подход оказался особенно полезен при получении циклопептидов, линейные пептиды-предшественники которых имеют в своем составе такие аминокислоты, как пролин или N-метиламинокислоты (например, сарказин, N-метилвалин), чрезвычайно склонные вследствие этого к различным внутримолекулярным превращениям [10, 11].

После завершения гидрирования полимер выделяли и частично оставшиеся на нем карбобензоксигруппы (в случае гиперразветвленного гомополи-*L*-лизина) и карбобензоксигруппы и  $\gamma$ -*трет*-бутильные группы фрагментов глутаминовой кислоты (в случае гиперразветвленного гетерополи-*L*-лизина) удаляли действием трифторметансульфокислоты в трифтормукусной кислоте в присутствии тиоанизола [6].

**Таблица 2.** Строение гиперразветвленного поли-*L*-лизина по данным аминокислотного анализа и аналитической ВЭЖХ

Гиперразветвленный поли- <i>L</i> -лизин	Аминокислотное производное	Содержание аминокислот в навеске, нмоля	Содержание лизина в точках "ветвления", %
Гомополи- <i>L</i> -лизин (hbp(K))	Лизин	4931*	—
	Лизин в точках "ветвления"***	3175	64
	N <sup>α</sup> -DNP-лизин	780****	—
	N <sup>ε</sup> -DNP-лизин	337****	—
	Ди-N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> -DNP-лизин	639****	—
Гетерополи- <i>L</i> -лизин (hbp(K,E)-1.96)	Лизин	1627**	—
	Лизин в точках "ветвления"***	1074	66
	Глутаминовая кислота	3300**	—
	N <sup>α</sup> -DNP-лизин	299****	—
	N <sup>ε</sup> -DNP-лизин	100****	—
	Ди-N <sup>α</sup> ,N <sup>ε</sup> -DNP-лизин	154****	—
	N <sup>α</sup> -DNP-глутаминовая кислота	236****	—

\* По данным аминокислотного анализа, при содержании полимера hbp(K) в навеске 65%.

\*\* По данным аминокислотного анализа, при содержании полимера hbp(K,E)-1.96 в навеске 63%.

\*\*\* Разница между общим содержанием *L*-лизина и его DNP-производных.

\*\*\*\* По данным ВЭЖХ.

#### Строение гиперразветвленных поли-*L*-лизинов

Для определения строения полученных гиперразветвленных гомо- и гетерополимеров гиперразветвленный гомополи-*L*-лизин (hyper branched poly(Lysine) (hbp(K)), где K – однобуквенное обозначение лизина) и гиперразветвленный гетерополи-*L*-лизин, содержащий в своем составе наряду с *L*-лизином также *L*-глутаминовую кислоту (hbp(K,E)-1.96, где E – однобуквенное обозначение глутаминовой кислоты, а 1.96 – соотношение лизина и глутаминовой кислоты, найденное по аминокислотному анализу) были обработаны в водно-диоксановой среде (бикарбонат натрия, pH 8.5) избытком 2,4-динитрофторбензола в течение 12 ч. После завершения реакции динитрофенилированные по свободным аминогруппам полимеры выделены и подвергнуты кислотному гидролизу соляной кислотой. С помощью аминокислотного анализа и аналитической обратнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии определено количество 2,4-динитрофенильных производных аминокислот (DNP-аминокислот) в виде N<sup>α</sup>-DNP-лизина, N<sup>ε</sup>-DNP-лизина и N<sup>α</sup>,N<sup>ε</sup>-ди-DNP-лизина (в случае гиперразветвленного гомополи-*L*-лизина) или N<sup>α</sup>-DNP-глутаминовой кислоты, N<sup>α</sup>-DNP-лизина, N<sup>ε</sup>-DNP-

лизина и N<sup>α</sup>,N<sup>ε</sup>-ди-DNP-лизина (в случае гиперразветвленного гетерополи-*L*-лизина). Это позволило найти долю остатков лизина в точках "ветвления". Она составила 64–66% от общей доли лизина в гиперразветвленных поли-*L*-лизинах. Из этих данных следует также, что лизин в олиголизиновые фрагменты между точек "ветвления" входит как с участием α-, так и ε-аминогрупп. Данные по структурным особенностям гиперразветвленных полимеров представлены в табл. 2.

#### Молекулярно-конформационные характеристики гиперразветвленных поли-*L*-лизинов

Свойства индивидуальных макромолекул гиперразветвленных гомополи-*L*-лизина (образец hbp(K)) и гетерополи-*L*-лизина (образец hbp(K,E)) исследованы методами молекулярной гидродинамики и оптики в разбавленных растворах в воде. Эти характеристики сопоставлены с данными для линейного поли-*L*-лизина, полученного полимеризацией N-карбоксиангидрида N<sup>ε</sup>-бензилокси-карбонил-лизина в присутствии изопропиламина как инициатора полимеризации (образцы p(K)-100 и p(K)-140). Методом статического и динамического рассеяния света [13] определены значения

молекулярной массы  $M_w$ , гидродинамического радиуса  $R_h$  и радиуса инерции  $R_g$  (табл. 3). В табл. 4 приведены характеристики изучаемых полимеров, полученные гидродинамическими методами – характеристическая вязкость  $[\eta]$ , коэффициенты седиментации  $S_0$  и диффузии  $D$ , удельный парциальный объем  $\bar{v}$ . С использованием формулы Сведберга по величинам  $S_0$  и  $D$  были рассчитаны значения гидродинамической молекулярной массы [14]

$$M_{SD} = \frac{S_0 RT}{D(1 - \bar{v}\rho_0)},$$

где  $\rho_0$  – плотность растворителя. Значения  $M_{SD}$  исследованных образцов также представлены в табл. 4.

Как следует из анализа полученных методом светорассеяния молекулярных характеристик (табл. 3), макромолекулы линейного поли-*L*-лизина с  $M_w = 10 \times 10^5$  (определение ММ с использованием метода гелевой хроматографии на колонке, калиброванной белками, приводит к значению  $M_w = 95 \times 10^4$ ) и  $R_h \approx 400$  нм имеют сильно асимметричную, приближающуюся к палочкообразной конформацию. Это связано, по-видимому, с наличием в боковых группах каждого мономерного звена полимера катионных группировок. Для гиперразветвленного гомополи-*L*-лизина с  $M_w = 195 \times 10^4$  (ММ, определенная с использованием метода гелевой хроматографии на колонке, калиброванной белками, составляет  $95 \times 10^4$ ) получены значения  $R_h = (100 \pm 20)$  нм и  $R_g = (110 \pm 30)$  нм. Как следствие этого, отношение  $R_g/R_h$  оказалось практически равным единице. Принимая во внимание эти данные и относительно невысокие значения  $R_h$ , можно сделать вывод о достаточно высокой плотности макромолекул гиперразветвленного поли-*L*-лизина в воде и о том, что их форма приближается к шарообразной.

К аналогичному заключению можно прийти рассматривая результаты седиментационно-диффузионного анализа для гиперразветвленного гетерополи-*L*-лизина, содержащего между точками “ветвления” или вне их олигомеры, построенные из лизина и глутаминовой кислоты. При переходе от линейного поли-*L*-лизина к гиперразветвленному гетерополимеру удельный парциальный объем  $\bar{v}$  сильно уменьшается, что свидетельствует

**Таблица 3.** Характеристики линейного и гиперразветвленного гомополи-*L*-лизинов, полученные методом светорассеяния

Полимер	Значения $M_w^* \times 10^{-4}$	$R_h$ , нм	$R_g$ , нм
p(K)-100**	9.5/10.0	400	–
hbp(K)	9.5/19.5	$100 \pm 20$	$110 \pm 30$

\* В числителе значения получены методом гель-фильтрации, в знаменателе – методом светорассеяния.

\*\* Линейный полилизин, полученный при полимеризации N-CA с использованием изопропиламина как инициатора.

**Таблица 4.** Характеристики линейного и гиперразветвленного гетерополи-*L*-лизина, содержащего в своем составе *L*-лизин и *L*-глутаминовую кислоту, полученные гидродинамическими методами

Полимер	$\bar{v}$ , $\text{cm}^3/\text{г}$	$[\eta]$ , дп/г	$S_0 \times 10^{13}$ , с	$D \times 10^7$ , с/см <sup>2</sup>	$M_{SD} \times 10^3$
p(K)-140	0.68	0.29	1.2	2.7	34
hbp(K,E)-1.96	0.44	0.14	3.0	5.1	26

ет об увеличении плотности молекулярного клубка гиперразветвленного полимера по сравнению с линейным (табл. 4). При этом значения характеристической вязкости  $[\eta]$  для линейного и гиперразветвленного полимера различаются в 2 раза, что указывает на меньшую величину гидродинамического радиуса молекулярного клубка для гиперразветвленного гетерополи-*L*-лизина. Сопоставление значений коэффициентов седиментации  $S_0$  и диффузии  $D$  показывает, что эти величины для гиперразветвленного полимера в 2–2.5 раза выше соответствующих величин для линейного поли-*L*-лизина, что также отражает уменьшение гидродинамического радиуса и увеличение плотности молекулярного клубка гиперразветвленного полимера.

#### Вторичная структура линейного и гиперразветвленного гомо- и гетерополи-*L*-лизина

Полученные гиперразветвленные гомо- и гетерополи-*L*-лизины были изучены с помощью метода кругового диахроизма. Из табл. 5 следует, что гиперразветвленный гомополи-*L*-лизин по сравнению с линейным полилизином двух различ-

Таблица 5. Элементы вторичной структуры линейного и гиперразветвленного гомополи-*L*-лизина

Полимер	$M_w \times 10^{-4}$	Растворитель	Элементы вторичной структуры*, %			
			$\alpha$ -спираль	$\beta$ -структура (антипараллельная)	$\beta$ -поворот	клубок
p(K)	10**	0.1 N NaOH	40.1 ± 4.8	6.5 ± 4.8	15.6 ± 4.8	28.8 ± 4.8
		Трифтор-этанол (80%)	66.0 ± 4.8	3.3	12.4 ± 4.8	15.6 ± 4.8
p(K)	14**	0.1 N NaOH	33.9 ± 4.8	7.7 ± 4.8	16.6 ± 4.8	32.9 ± 4.8
		Трифтор-этанол (80%)	66.1 ± 4.8	3.3	12.4 ± 4.8	15.6 ± 4.8
hbp(K)	10***	0.1 N NaOH	9.9 ± 6.9	28.0 ± 6.4	21.1 ± 6.4	35.3 ± 6.4
		Трифтор-этанол (80%)	14.6 ± 6.4	24.7 ± 6.39	19.6 ± 6.4	34.4 ± 6.4

\* Величины  $\beta$ -структур (параллельной) не приведены в связи с низкими значениями.

\*\* Определен методом гель-хроматографии.

\*\*\* Определен методом светорассеяния.

Таблица 6. Элементы вторичной структуры гиперразветвленных гетерополи-*L*-лизинов

Полимер	Элементы вторичной структуры*, %			
	$\alpha$ -спираль	$\beta$ -структура (антипараллельная)	$\beta$ -поворот	клубок
В воде				
hbp(K,A)-1.30**	7.5 ± 6.20	26 ± 6.2	25.5 ± 6.2	39.7 ± 6.2
hbp(K,A)-2.26	3.4	25.5 ± 6.2	32.2 ± 6.2	43.7 ± 6.2
hbp(K,A)-0.26	80.5 ± 6.39	0.5	6.5 ± 6.4	6.7 ± 6.4
hbp(K,E)-1.96	32.4 ± 6.20	7.8 ± 6.2	22.1 ± 6.2	34.7 ± 6.2
В 0.01 N HCl				
hbp(K,A)-1.30	12.3 ± 6.4	24.5 ± 6.4	22.6 ± 6.4	35.7 ± 6.4
hbp(K,A)-2.26	6.4 ± 6.4	32.1 ± 6.4	24.2 ± 6.4	35.9 ± 6.4
hbp(K,A)-0.27	83.8 ± 6.39	0.3	5.1	5.1
hbp(K,E)-1.96	37.7 ± 6.45	5.7	22.3 ± 6.5	29.9 ± 6.5
В 0.01 N NaOH				
hbp(K,A)-1.30	45.7 ± 6.6	8 ± 6.6	16.2 ± 6.6	28.4 ± 6.6
hbp(K,A)-2.26	42.9 ± 6.45	6.6 ± 6.5	9.2 ± 6.5	21 ± 6.5
hbp(K,A)-0.27	89.2 ± 6.60	0.2	3.3	3.1
hbp(K,E)-1.96	3.6	43.4 ± 6.6	19.7 ± 6.6	34.8 ± 6.6
В 80%-ном трифторэтаноле				
hbp(K,A)-1.30	56.7 ± 6.4	4	15 ± 6.4	21.8 ± 6.4
hbp(K,A)-2.26	87.6 ± 6.60	0.3	3.8	3.8
hbp(K,A)-0.27	93.4 ± 6.60	0.1	1.4	1
hbp(K,E)-1.96	87.2 ± 6.39	0.4	3.6	5.3

\* Величины  $\beta$ -структур (параллельной) не приведены в связи с низкими значениями.

\*\* Отношение аминокислот по данным аминокислотного анализа.

ных молекулярных масс, существует преимущественно в форме беспорядочного клубка и частично в  $\beta$ -структурной конформации. Доля  $\alpha$ -спиральности мала даже в щелочной среде и в таком

хорошем  $\alpha$ -спиральобразующем растворителе как трифторэтанол. Это указывает на то, что между точками "ветвления" – остатками лизина, входящими в полимерные цепи своими  $\alpha$ - и

$\epsilon$ -аминогруппами или содержащимися на N-концах полимерных цепей, имеются сравнительно короткие олиго-*L*-лизиновые фрагменты.

В то же время из рассмотрения данных кругового дихроизма для гиперразветвленного гетерополи-*L*-лизина (табл. 6), имеющего между точками "ветвления" или вне их олигомеры, содержащие в своем составе кроме лизина также *L*-аланин или лизин и *L*-глутаминовую кислоту, следует, что введение дополнительной аминокислоты приводит в определенных условиях к увеличению доли  $\alpha$ -спиральности. Особенно четко это проявляется в щелочной среде для сополимера с *L*-аланином. При высоком содержании аланина в сополимере с лизином (например, при отношении Ala : Lys = 3.7), доля  $\alpha$ -спиральности практически не зависит от использованного растворителя и находится в пределах 80–93%, несколько возрастая в трифторэтаноле (табл. 6). По-видимому, в этом случае  $\alpha$ -спиральность определяется в основном *L*-аланином. Гиперразветвленный гетерополи-*L*-лизин, содержащий в своем составе *L*-глутаминовую кислоту в воде и 0.01 N HCl имеет умеренный уровень  $\alpha$ -спиральности порядка 32–37%, который также определяется прежде всего вкладом олигомерных фрагментов глутаминовой кислоты. Видимо, отрицательно заряженные группы этой кислоты в воде компенсируются положительно заряженными  $\epsilon$ -аминогруппами лизина. Данный факт подтверждается тем, что в 0.01 N NaOH, когда  $\epsilon$ -аминогруппы теряют положительный заряд и отрицательный заряд  $\gamma$ -карбоксильных групп некомпенсирован, полимер полностью лишен  $\alpha$ -спиральности.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

В работе использовали  $N^{\epsilon}$ -карбобензокси-*L*-лизин, *L*-аланин, *L*-глутаминовую кислоту, трифосген, палладий на угле, трифтормукусную кислоту, трифторметансульфокислоту, тиоанизол, этандитиол, DNP-производные ( $N^{\alpha}$ -DNP-лизина,  $N^{\epsilon}$ -DNP-лизина,  $N^{\alpha},N^{\epsilon}$ -ди-DNP-лизина и  $N^{\alpha}$ -DNP-глутаминовой кислоты) производства "Fluka" (Германия). Растворители были получены из ОАО "Вектон" (Санкт-Петербург), очищены и высушены перед использованием.

### Оборудование

При очистке полимеров с помощью гель-хроматографии использовали BioGel P2 (BIORAD Laboratories, США), детекцию проводили на спектрометре 2138 Uvicord S (Швеция). Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе AAA T339 M ("Microtechna", Прага, Чехословакия). Оптическая часть установки для измерения динамического рассеяния света укомплектована гoniометром ALV-SP (источник света Не-Не-лазер Spectra-Physics с длиной волны  $\lambda = 632.8$  нм, мощностью ~20 мВ). Корреляционную функцию интенсивности рассеянного света получали с помощью коррелятора Photo Cor-FC с числом каналов 288 (Закрытое акционерное общество "Антекс", Россия). Данные обрабатывали методом кумулянтов и методом регуляризации Тихонова. Эксперименты по статическому рассеянию света проводили на стандартном нефелометре "Fica". Седиментационные исследования выполняли на аналитической ультрацентрифуге МОМ 3180 при частоте вращения ротора 45 000 об/мин. Седиментационную границу формировали методом наслаждания растворителя на раствор. Удельный парциальный объем определяли пикнометрически. Коэффициенты поступательной диффузии  $D$  измеряли с помощью поляризационного диффузометра [14], расчеты проводили по методу площадей и максимальных ординат. Характеристическую вязкость  $[\eta]$  измеряли с использованием капиллярных вискозиметров с временем истечения растворителей 120–167 с. Спектры кругового дихроизма снимали на дихрографе "Mark V" ("Jobin Iyon", Франция). Вторичную структуру рассчитывали, используя программу CDNN V2.1 (Gerald BÖhm / Institute für Biotechnologie Martin-Luther-Universität Hall-Wittenberg, Germany. [http://bioinformatics.biochemtech.uni-hall.de/cd\\_spec/references.htm](http://bioinformatics.biochemtech.uni-hall.de/cd_spec/references.htm)).

### Синтез гиперразветвленного поли-*L*-лизина в условиях каталитического удаления карбобензоксиазиды

Раствор 1.38 г  $N^{\epsilon}$ -карбоксиангидрида  $N^{\epsilon}$ -карбобензокси-*L*-лизина в 30 мл диоксана, полученного при взаимодействии  $N^{\epsilon}$ -карбобензокси-*L*-лизина с трифосгеном по методу [15], помещали в круглоудонную трехгорлую колбу с магнитной мешалкой и к нему прибавляли 140 мг палладиевой черни и несколько капель ледяной уксусной кислоты. Ни-

жний конец газоприводной трубки опускали над раствором таким образом, чтобы он находился выше поверхности раствора на 5–7 мм. Гидрирование проводили при пропускании равномерного тока водорода и перемешивании раствора в течение 4 ч при 40–45°C. Через 4 ч палладиевую чернь отфильтровали, промывали 10 мл диоксана и раствор оставляли на 7 дней при 40–45°C. Затем диоксан отгоняли на вакуумном испарителе до объема 5 мл, и полимер высаждали в петролейный эфир. Выпавший полимер отфильтровали, сушили в экскаторе. Получили 670 мг полимера. Оставшиеся защитные группы полимера удаляли действием трифторметансульфокислоты в трифтормуксусной кислоте.

#### *Снятие защитных групп с полимера*

В круглодонную колбу с магнитной мешалкой помещали 670 мг полимера, растворенного в 6.7 мл трифтормуксусной кислоты. К раствору прибавили при перемешивании 0.67 мл тиоанизола и 0.67 мл трифторметансульфокислоты. Смесь перемешивали 0.5 ч при 0°C, затем 1 ч при комнатной температуре. После окончания перемешивания к раствору деблокированного полимера в трифтормуксусной кислоте добавляли 50 мл сухого серного эфира. Выпавший полимер отфильтровывали, вновь растворяли в 10 мл трифтормуксусной кислоты и высаждали в 50 мл серного эфира. Полимер фильтровали и сразу подвергали очистке с использованием гель-хроматографии.

#### *Очистка полимера с использованием гель-хроматографии*

Полимер растворяли в 2 мл 6%-ной уксусной кислоты и наносили на колонку (60 × 2.5 см), заполненной Биогелем P-2. В качестве подвижной фазы использовали 6%-ную уксусную кислоту. Соответствующую фракцию лиофилизовали. Получили 71.1 мг полимера.

Аналогично синтезировали другие полимеры, структура которых приведена в табл. 1.

#### *Определение строения гиперразветвленных поли-L-лизинов (типичная методика)*

1.2 мг высущенного полимера растворяли в 3 мл бикарбонатного буфера (pH 8.6) и обрабатывали раствором 5 мг динитрофторбензола в диоксане.

Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 12 ч. Выпавший модифицированный полимер отфильтровывали, промывали водой, спиртом и эфиром. После сушки в экскаторе полимер гидролизовали в ампуле при 110°C действием 6 N соляной кислоты в течение 24 ч. После отгонки водного раствора соляной кислоты на вакуумном испарителе остаток использовали для определения количества DNP-производных аминокислот с помощью ВЭЖХ. Использовали аналитическую колонку Nucleosil C 18 и подвижную фазу – ацетонитрил/трифтормуксусная кислота в градиенте 5–35%. Содержание DNP-производных аминокислот определяли по площади соответствующих пиков при сравнении с калибровочными образцами DNP производных лизина и глутаминовой кислоты, хроматографию которых проводили в тех же условиях. Содержание основного вещества (полимера) в навеске, так же как соотношение аминокислот для гиперразветвленного гетерополи-L-лизина определяли с помощью аминокислотного анализа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан одностадийный метод получения гиперразветвленного поли-L-лизина и его сополимеров с другими  $\alpha$ -аминокислотами. Показано, что полученные полимеры являются компактными соединениями с весьма высокой плотностью и со структурой близкой к шарообразной. В случае гиперразветвленного гомополи-L-лизина в точках “ветвления” находятся примерно две трети остатков лизина, входящих в полимеры. Показано, что гиперразветвленные поли-L-лизины, являясь компактными шарообразными образованиями, имеют неразветвленные аминокислотные участки, расположенные как между точками “ветвления” – остатками лизина, так и, вероятно, вне гиперразветвленного “ядра”. Их можно рассматривать, по-видимому, в качестве аналогов “звездообразных” полилизиновых конъюгатов лизиновых дендримеров третьей генерации, полученных нами ранее при полимеризации N-карбоксиангидрида N<sup>ε</sup>-карбобензокси-L-лизина на заранее синтезированном лизиновом дендримере [6, 16].

Авторы благодарят А.В. Жукова за участие в синтезе и анализе полимеров.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pollard H., Remy J.-S., Loussouarn G., Demolombe S. // Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 7507.
2. Boletta A., Benigni A., Lutz J., Remuzzi G., Soria M.S., Monaco L. // Human Gene Ther. 1997. V. 8. P. 1243.
3. Newkome G. R., Moorefield C.N., Vogtle F. // Dendritic Molecules (Concepts, Synthesis, Perspectives). Wienheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo: VCH, 1996.
4. Ohsaki M., Okuda T., Wada A., Hirayama T., Niidome T., Aoyagi H. // Bioconjug. Chem. 2002. V. 13. P. 510.
5. Okuda T., Kidoaki S., Ohsaki M., Koyama Y., Yoshikawa, Niidome T., Aoyagi H. // Organic Biomol. Chem. 2003. V. 1. P. 1270.
6. Власов Г. П., Корольков В. И., Панкова Г. А., Тарасенко И. И., Баранов А. Н., Глазков П. В., Киселев А. В., Остапенко О. В., Лесина Е. А., Баранов В. С. // Биоорган. химия. 2004. № 1. Т. 30. С. 1.
7. Okuda T., Sugiyama A., Niidome T., Aoyagi H. // Biomaterials. 2004. V. 25. P. 537.
8. Denkewalter R.G., Kolc J., Lukasavage W.J. Pat. 4 289 872 USA. 1981.
9. Rodriguez-Hernandez J., Gatti M., Klok H.-A. // Biomacromolecules. 2003. V. 4. P. 249.
10. Vlasov G.P., Lashkov V.N. // Proc. 15 Eur. Peptide Symp. "Peptides 1978" / Ed. by Simion I. Z., Kupryszebski G. Gdansk, Poland. 1979. P. 365.
11. Власов Г.П., Лашков В.Н., Куликов С.В., Гинзбург О.Ф. // Журн. орган. химии. 1978. Т. 14. С. 1961.
12. Bergman M., Zervas L. // Ber. 1932. V. 65. P. 1192.
13. Эскин В.Е. Рассеяние света растворами полимеров и свойства макромолекул. Л.: Наука, 1986.
14. Цветков В.Н. Жесткоцепные полимерные молекулы. Л.: Наука, 1986.
15. Daly W., Poche D. // Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 46. P. 5859.
16. Vlasov G. P. // Macromol. Revs. 2003. V. 197. P. 331.

### Hyperbranched Poly(*L*-lysine) Containing Additional Amino Acids or Their Oligomers Between Branching Points: Synthesis and Structure

G. P. Vlasov\*, I. I. Tarasenko\*, S. V. Valueva\*, A. I. Kipper\*,  
E. B. Tarabukina\*, A. P. Filippov\*, E. V. Avdeeva\*\*, and V. I. Vorob'ev\*\*

*\*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,  
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia*

*\*\*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,  
Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

**Abstract**—A new method of preparing hyperbranched poly(*L*-lysine) was developed. This method includes the catalytic removal of a N<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy blocking group from N<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-*L*-lysine-N-carboxyadhydride by hydrogen in the presence of an activated palladium. Under similar conditions, hyperbranched poly(amino acids) containing residues of glutamic acid or alanine and their oligomers along with residues of lysine or their oligomers between the branching points, lysine residues, or outside of them were prepared from N<sup>ε</sup>-carbobenzyloxy-*L*-lysine-N-carboxyadhydride and N-carboxyadhydrides of γ-*tert*-butyl-*L*-glutamate or *L*-alanine. The macromolecular structure and conformation of hyperbranched poly(*L*-lysines) were examined by static and dynamic light scattering, sedimentation-diffusion analysis, and circular dichroism. It was demonstrated that the polymers have a compact symmetric shape that differs appreciably from the rodlike structure of a linear poly(*L*-lysine).