



УДК 547.918'426.2

© 1992 г. А. В. Любешкин, Ю. Л. Себякин, Р. И. Евстигнеева

**СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЛИКОЛИПИДОВ,
СОДЕРЖАЩИХ В АГЛИКОНЕ СУЛЬФИДРИЛЬНЫЕ ГРУППЫ***Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Осуществлен синтез модифицированных гликолипидов, содержащих терминальные сульфидрильные группы в составе агликона. Полученные соединения могут быть использованы для модельных исследований рецепторных взаимодействий в составе обратимо полимеризуемых фосфолипидных липосом, сформированных из липидов с аналогичными жирнокислотными остатками.

В настоящее время исследования в области моделирования клеточных мембран, связанные с применением липосом, получили широкое распространение. Однако при использовании липосомных систем в качестве мембранных моделей возникает ряд проблем.

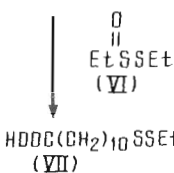
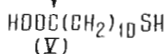
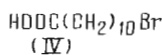
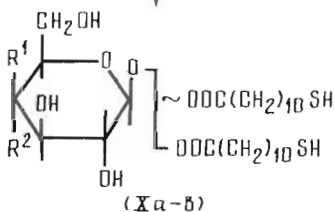
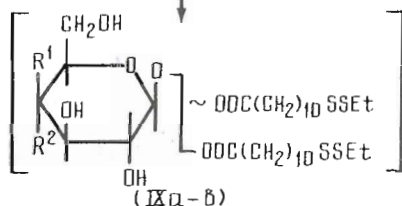
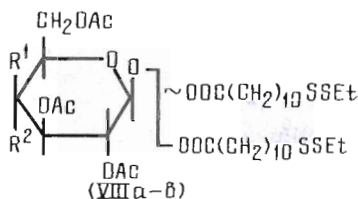
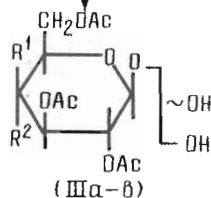
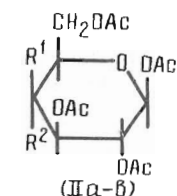
Одна из основных трудностей заключается в низкой стабильности липосом *in vivo*. При их введении в кровоток и взаимодействии с природными клеточными системами обычная липосомная мембрана разрушается: уже за несколько минут происходит дестабилизация бислоевой мембраны и слияние липосом за счет различных взаимодействий с компонентами плазмы и рядом ферментов крови [1–3].

Повышение стабильности искусственных мембран удалось достигнуть, например, путем создания околосмембранной оболочки: везикулы окружают полимерной сеткой, которая повышает их устойчивость [4]. Правда, это изменяет поверхностные свойства бислоя, что затрудняет применение таких моделей в области контактных взаимодействий. Более перспективным кажется реализовать способность самих липидов вступать в реакцию полимеризации в результате химической инициации или при облучении УФ-светом. Способными к полимеризации в составе липидов могут быть сопряженные диеновые и диациетиленовые системы, метакрильные и некоторые другие группы [5, 6].

В результате полимеризации полученные липосомы действительно оказываются значительно стабильнее своих мономерных аналогов. Однако при переносе модельных исследований на системы *in vivo* встает задача биodeградации полимерных структур. Полимерные липосомы, полученные на основе мономеров с перечисленными выше полимеризуемыми группами, не способны к биodeградации *in vivo* и имеют тенденцию к накоплению в организме [7, 8].

Чтобы решить эту проблему, было предложено использовать соединения, которые в полимерном состоянии способны разрушаться под действием ферментов. Ими могут служить липидные аналоги, которые полимеризуются за счет образования дисульфидных или пептидных связей. В последние годы получено несколько подобных соединений, для которых показана возможность образования липосом, их полимеризация и дальнейшая биodeградация [9–14].

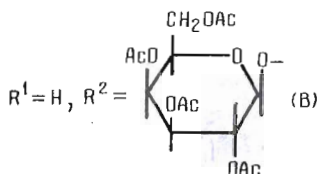
Другая важная задача заключается в возможности использования липосом для направленного транспорта заключенных в них соединений. Как и при межклеточном узнавании [15–17], большую роль в этом процессе



Для соединений (II α - β),
(III α - β) и (VIII α - β):

$\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OAc} \quad (\alpha)$

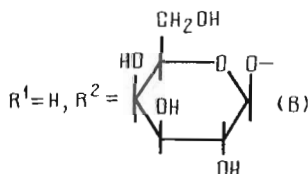
$\text{R}^1 = \text{OAc}, \text{R}^2 = \text{H} \quad (\beta)$



Для соединений (IX α - β) и (X α - β):

$\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OH} \quad (\alpha)$

$\text{R}^1 = \text{OH}, \text{R}^2 = \text{H} \quad (\beta)$

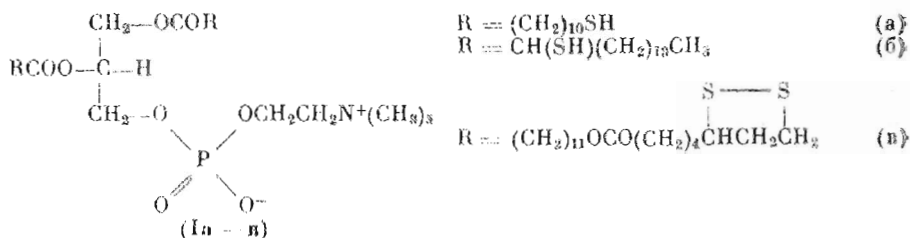


должны играть углеводные детерминанты, находящиеся на поверхности транспортных систем.

Возможность широкого варьирования состава липосом, а также амфифильность гликолипидов позволяют вводить последние в липидные бислои для имитации углеводной поверхности клеточных мембран [18-20]. Такие модифицированные липосомы способны специфически взаимодействовать с природными клеточными системами с достаточной степенью

эффективности. Это, наряду с сохранением функциональной активности включаемых в липосомы соединений, позволяет считать их более удобными транспортными средствами, чем липидные мицеллы, конъюгаты вещества — макромолекула или синтетические микрокапсулы.

Как уже говорилось, ранее был получен ряд фосфолипидов (Ia—v), содержащих сульфидильные или дисульфидные группы, которые в составе липосом могут образовывать полимеры [11—13].



Нам показалось интересным получить серию гликолипидов — гликозилдиглицеридов (Ха—в) (схема), которые, встраиваясь в фосфолипидные везикулы, могли бы обратимо полимеризоваться; при этом неполярная часть должна повторять структуру фосфолипида (Ia).

Углеводные компоненты получали по разработанному ранее в нашей лаборатории методу [21]. Диглицеридный фрагмент был синтезирован по известной схеме [22] с некоторыми методическими изменениями. Так, на стадии синтеза 11-меркаптоундекановой кислоты (V) была осуществлена замена растворителя (50% водного этанола на ацетонитрил), что повысило выходы с 60–70% [22] до практически количественных. Диэтилдисульфид окисляли мононафталевой кислотой, которую получали из фталевого ангидрида по стандартной методике [23]. Ацилирование углеводных компонентов (IIIa—в) проводили 11-(этилдитио)ундекановой кислотой (VII) в присутствии дициклогексилкарбодимиды (DCC) и диметиламинопиридина (DMAP). Снятие защит осуществлялось в две стадии без выделения промежуточных соединений (IXa—в). Сначала защищенные гликолипиды (VIIIa—в) кипятили в метаноле с расчетным количеством гидразингидрата, а затем, после нейтрализации реакционной массы смесью КУ-2 (H⁺), дисульфидные группировки превращали в тиольные обработкой трибутилфосфином, получая в итоге целевые гликолипиды (Ха—в).

Экспериментальная часть

(*rac*-Глицерил-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-*D*-глюко- (IIIa), (*rac*-глицерил)-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-*D*-галактопиранозиды (IIIб) и (*rac*-глицерил)-2,3,6,2',3',4',6'-гепта-О-ацетил-β-*D*-лактозид (IIIв) получены из полных ацетатов соответствующих сахаров (IIa—в) и *rac*-изопропилиденглицерина по методу [21]. Использовалась 11-бромундекановая кислота (IV) отечественного производства.

ПМР-спектры снимали на спектрометре Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой 250 МГц; внутренний стандарт — гексаметилдисилоксан. ИК-Спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435, УФ-спектры — на приборе Shimadzu UV-240 (Япония). Углы оптического вращения определяли на спектрополяриметре Perkin — Elmer 241МС (Англия). Температуру плавления измеряли на приборе Boetius (ФРГ).

Колоночную хроматографию осуществляли на фракционированном силикагеле L40/60 мкм, отсеянном из продажного силикагеля L40/100 мкм

(ЧСФР). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV-254 (ЧСФР) в системах растворителей: этилацетат — гептан, 1:1 (А); хлороформ — метанол — ацетон, 15:1:1 (Б); хлороформ — метанол — ацетон, 20:3:3 (В). Обнаружение пятен при ТСХ осуществляли прокаливанием при 350°С; серосодержащие соединения обнаруживали 10% водным раствором KMnO_4 .

11-Меркаптоундекановая кислота (V). Раствор 2,66 г (10 ммоль) 11-бромундекановой кислоты (IV) и 1,90 г (50 ммоль) тиомочевины в 20 мл ацетонитрила кипятили 3 ч с обратным холодильником. Затем к реакционной массе добавляли 12 мл 10% водного NaOH и кипятили еще 2 ч. Реакционную массу подкисляли 25% соляной кислотой до pH 3 и экстрагировали хлороформом (3×50 мл). Объединенные экстракты промывали раствором NaHCO_3 водой и сушили сульфатом натрия. После удаления растворителя в вакууме выход составил 2,08 г (95,5%), R_f 0,70 (А), т. пл. 59–61°С (гексан), УФ-спектр (MeOH), λ_{max} 227,5 нм; lg ϵ 2,713.

Этилэнтантиосульфидат (VI). К раствору 16,0 мл (130 ммоль) диэтилдисульфида в 150 мл безводного эфира, охлажденному до 0°С, прибавляли по каплям раствор 0,438 г (140 ммоль) моноадафталевой кислоты в 310 мл эфира в течение 30 мин. Образовавшийся осадок отфильтровывали, эфирный раствор промывали и сушили сульфатом натрия. После удаления растворителя в вакууме получали 16,5 г (92,0%) продукта, R_f 0,32 (А).

11-(Этилдитио)ундекановая кислота (VII). Смесь 1,10 г (5,0 ммоль) 11-меркаптоундекановой кислоты (V), 0,85 г (6,0 ммоль) этилэнтантиосульфидата (VI) и 0,75 мл (6,6 ммоль) триэтиламина в 30 мл эфира перемешивали 16 ч при 20°С. Раствор упаривали и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя продукт системой этилацетат — гептан (2:3). Выход 0,83 г (60,0%), R_f 0,71 (А), т. пл. 30,5–32,0°С (гептан). ПМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 1,20–1,45 (с+т, 15H, CH_3 и $(\text{CH}_2)_6$), 1,55–1,75 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ и $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2,30–2,40 (т, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 2,60–2,75 (т+к, 4H, CH_2SSCH_2). Найдено, %: C 56,05, H 9,42, S 23,25. $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{S}_2$. Вычислено, %: C 56,06, H 9,43, S 23,02.

1,2-Ди-[11-(этилдитио)ундеканойл] - 3-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиранозил)-гас-глицерин (VIIIa). К раствору 0,39 г (1,10 ммоль) 11-(этилдитио)ундекановой кислоты (VII) в 3 мл безводного хлороформа прибавляли 0,31 г (1,50 ммоль) DCC. Через 1 ч образовавшийся осадок отфильтровывали и к раствору прибавляли 0,27 г (0,64 ммоль) тетраацетата глицерилглицозиды (IIIa) и 0,16 г (1,30 ммоль) DMAP, растворенных в 2 мл безводного хлороформа. Смесь оставляли на 24 ч при 20°С. Затем раствор упаривали и остаток хроматографировали, элюируя продукт системой этилацетат — гептан (2:3). Выход 0,42 г (70,0%), бесцветный сироп, R_f 0,56 (А), $[\alpha]_D^{20} +9,5^\circ$ (с 2, CHCl_3). ИК-спектр (пленка, ν , cm^{-1}): 3450 (OH), 2920, 2960, 1450, 1370, 1230 (CH_2), 1750 (C=O), 1100–1020 (R-O-C-O-R', углевод). ПМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 1,15–1,35 (м, 30H, $(\text{CH}_2)_6$ и CH_3), 1,55–1,65 (м, 8H, SCH_2CH_2 и $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 1,90–2,10 (4с, 12H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$), 2,20–2,30 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 2,60–2,75 (т+к, 8H, CH_2SSCH_2), 3,60–3,75 (м, 1H, H-5), 3,90–4,35 (м, 4H, H-6, CH_2Gro), 4,50 (д, 1H, H-1, $J_{1,2}$ 7,5 Гц), 4,90–5,25 (м, 4H, H-2, H-3, H-4, CH Gro).

1,2-Ди-[11-(этилдитио)ундеканойл] - 3-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)-гас-глицерин (VIIIb) получен аналогично соединению (VIIIa). Выход 67,5%, бесцветный сироп, R_f 0,56 (А), $[\alpha]_D^{20} +8,5^\circ$ (с 2, CHCl_3). ИК-спектр аналогичен спектру соединения (VIIIa). ПМР-спектр (CHCl_3 , δ , м.д.): 1,10–1,40 (м, 30H, $(\text{CH}_2)_6$ и CH_3), 1,45–1,70 (м, 8H, SCH_2CH_2 и $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 1,90–2,10 (4с, 12H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$), 2,15–2,30 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 2,55–2,70 (т+к, 8H, CH_2SSCH_2), 3,55–3,70 (м, 4H, H-6, CH_2Gro), 4,50 (д, 1H, H-1, $J_{1,2}$ 7,5 Гц), 4,90–5,20 (м, 3H, H-2, H-4, CH Gro), 5,35 (м, 1H, H-3).

1,2 - Ди-[11-(этилдитио)ундеканол]-3-(2,3,6,2',3',4',6'-гепта - О - ацетил-β-D-лактозил)-гас-глицерин (VIIIв) получен аналогично соединению (VIIIа). Выход 52,0%, бесцветный сироп, R_f 0,33 (А), $[\alpha]_D^{20} +11,5^\circ$ (с 2, CHCl_3). ИК-спектр аналогичен спектру соединения (VIIIа). ПМР-спектр (CDCl_3 , δ , м. д.): 1,20–1,40 (м, 30H, $(\text{CH}_2)_6$ и CH_3), 1,50–1,70 (м, 8H, SCH_2CH_2 и $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 1,90–2,15 (7с, 21H, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$), 2,20–2,35 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 2,60–2,75 (т+к, 8H, CH_2SSCH_2), 3,55–4,15 (м, 8H, H-5, H-5', H-6, H-6', CH_2 Gro), 4,40–4,50 (2д, 2H, H-1), 4,80–5,35 (м, 7H, H-2, H-3, H-4, H-2', H-3', H-4', CH Gro).

1,2-Ди-(11-меркаптоундеканол)-3-β-D-глюкопиранозил-гас-глицерин (Ха). К раствору 0,22 г (0,23 ммоль) соединения (VIIIа) в 10 мл метанола прибавляли по каплям 0,55 мл (1,15 ммоль) гидразингидрата и смесь кипятили 2 ч, охлаждали, нейтрализовали смесью КУ-2 (H^+) до pH 7, к отфильтрованному раствору прибавляли 0,14 мл (0,45 ммоль) трибутилфосфида и выдерживали 1,5 ч при 20°С. Растворитель удаляли в вакууме, из остатка препаративной хроматографией на силикагеле выделяли в системе хлороформ – метанол – ацетон (15:1:1) вещество (Ха) (масло). Выход 0,06 г (40,5%), R_f 0,47 (Б), т.пл. 54,5–56,0°С. ДОВ (с 1, CHCl_3 – MeOH, 1:1, $[\alpha]_D^{20}$, град (λ, нм)): –3,5 (579,1), –3,5 (546,1), –5,0 (436,5), –6,0 (407,8), –12,0 (334,1), –28,0 (296,5), –58,0 (289,3), –77,5 (280,4). УФ-спектр (MeOH), λ_{max} 254,9 нм; lg ε 2,752. Найдено, %: C 57,15, H 8,65, S 9,68. $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{S}_2\text{O}_{10}$. Вычислено, %: C 56,84, H 8,94, S 9,79.

1,2-Ди-(11-меркаптоундеканол)-3-β-D-галактопиранозил-гас-глицерин (Хб) получен аналогично соединению (Ха). Выход 36,0%, бесцветный сироп, R_f 0,47 (Б). ДОВ (с 1, CHCl_3 – MeOH, 1:1, $[\alpha]_D^{20}$, град (λ, нм)): +5,5 (579,0), +6,0 (546,1), +9,5 (435,8), +10,5 (407,8), +6,5 (334,1), –62,5 (296,8). Найдено, %: C 56,75, H 8,82, S 9,71. $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{S}_2\text{O}_{10}$. Вычислено, %: C 56,84, H 8,94, S 9,79.

1,2-Ди-(11-меркаптоундеканол)-3-β-D-лактозил-гас-глицерин (Хв) получен аналогично соединению (Ха). Выход 24,0%, бесцветный сироп, R_f 0,25 (В). ДОВ (с 1, CHCl_3 – MeOH, 1:1, $[\alpha]_D^{20}$, град (λ, нм)): +4,0 (579,1), +4,5 (546,0), +7,0 (407,8), +8,5 (366,3), +8,0 (334,1), –9,0 (296,8), –39,0, (289,4). Найдено, %: C 53,92, H 8,07, S 8,01. $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{S}_2\text{O}_{10}$. Вычислено, %: C 54,38, H 8,40, S 7,85.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scherphof G., Roerdink G., Waite M., Parks J. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 542. № 2. P. 296–307.
2. Allen J. M., Cleland L. G. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 597. № 2. P. 418–426.
3. Горчилин В. П., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. // Вопр. мед. химии. 1982. Т. 28. № 1. С. 3–14.
4. Pears B. // Trends Biochem. Sci. 1980. V. 5. P. 131–134.
5. Bader H., Dorn K., Hupfer B., Ringsdorf H. // Adv. Polym. Sci. 1985. V. 64. P. 1–62.
6. Бадер Х., Дорн К., Хупфер Б., Рингсдорф Х. // Успехи химии. 1987. Т. 56. Вып. 12. С. 2028–2075.
7. Juliana R. L., Hsu M. J., Regen S. L. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 812. № 1. P. 42–48.
8. Bonté F., Hsu M. J., Papp A., Wu K., Regen S. L., Juliana R. L. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 900. № 1. P. 1–9.
9. Regen S. L., Yamaguchi K., Samuel N. K. P., Singh M. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 20. P. 6354–6355.
10. Weber B. A., Dodrer N., Regen S. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 14. P. 4419–4421.
11. Sadownik A., Stefely I., Regen S. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 108. № 24. P. 7789–7791.
12. Shibata A., Yamashita S., Ito Y., Yamashita T. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 854. № 1. P. 147–150.
13. Neumann R., Ringsdorf H. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 3. P. 487–490.
14. Neumann R., Ringsdorf H., Patton E. W., O'Brien D. F. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 898. № 3. P. 338–348.

15. *Hakomori S.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1981. V. 50. P. 733-764.
16. *Roseman S.* // *Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology* / Eds Weissmann G., Claiborne R. N. Y.: Hospitale Practice, 1975. P. 55-64.
17. *Neufeld E. F., Ashuell G.* // *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* / Ed. Lennar W. J. N. Y.: Plenum Publ. Corp., 1980. P. 241-266.
18. *Carrea-Freire M. C., Freire E., Barenholz Y., Biltonen R. L., Thompson T. E.* // *Biochemistry*. 1979. V. 18. № 3. P. 442-445.
19. *Bertoli E., Masserini M., Sonnino S., Ghidoni R., Gestaro B., Tettamanti G.* // *Biochim. et biophys. acta*. 1981. V. 647. № 2. P. 196-202.
20. *Maggio B., Ariga T., Sturtevant J. M., Yu R. K.* // *Biochim. et biophys. acta*. 1985. V. 818. № 1. P. 1-12.
21. *Любешкин А. В., Себакин Ю. Л., Евстигнеева Р. П.* // *Биоорг. химия*. 1991. Т. 17. № 5. С. 710-713.
22. *Samuel N. K. P., Singh M., Yamaguchi K., Regen S. L.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1985. V. 107. № 1. P. 42-47.
23. *Физер Л., Физер М.* Реагенты для органического синтеза. Т. 2 / М.: Мир, 1970. С. 312-313.

Поступила в редакцию
13.XI.1991

A. V. LYUBESHKIN, Yu. L. SEBYAKIN, R. P. EVSTIGNEEVA

SYNTHESIS OF GLYCOLIPIDS CARRYING SULFHYDRYL GROUPS IN THE AGLICONE MOIETY

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

We have synthesized glycolipids containing sulfhydryl groups at the terminal part of the hydrocarbon chain. The compounds prepared can be used to model receptor interactions in reversible polymerized phospholipid liposomes.