



УДК 547.455.623

© 1992 г. Ю. Л. Себякин, Е. В. Казакова,
Р. П. Евстигнеева

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙТРАЛЬНЫХ И ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ГЛИКОЛИПИДОВ

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Осуществлен синтез ряда лакто- и галактолипидов, содержащих в липидной части насыщенный или ненасыщенный алифатический фрагмент, а также тетраакиламмониевую полярную группировку. Синтезированные соединения могут быть использованы для получения липосом, несущих на своей поверхности углеводные маркеры.

В настоящее время установлено, что природные гликолипиды участвуют во многих жизненно важных биологических процессах, таких, как регуляция клеточного роста, узнавание на межклеточном и молекулярном уровнях, иммунные и другие реакции [1]. Выполнение этих функций связано с высокоспецифичным и обратимым взаимодействием между гликолипидами, встроенными в наружную или внутриклеточную мембрану, и макромолекулами белков. Для моделирования подобных природных взаимодействий углеводной части гликолипидов с белками (например, лектинами) в различных биохимических исследованиях используются синтетические гликолипиды.

Амфифильные свойства гликолипидов позволяют вводить их в липидный бислой фосфолипидных липосом и тем самым имитировать углеводную поверхность клеточной мембраны. Такие модифицированные углеводсодержащие липосомы могут служить переносчиками, т. е. их можно использовать для решения задач направленного транспорта лекарственных средств или других биологически активных веществ к определенным органам или тканям [2], а положительно заряженные липосомы — для трансфекции, т. е. введения полинуклеотидов в ядро клетки [3].

В настоящей работе нами продолжены исследования в области синтеза модифицированных гликолипидов [4–6], которые могут быть встроены в липидный бислой липосомы и функционировать в качестве углеводного маркера на ее поверхности.

В основу метода была положена реакция присоединения тиаальдоз — 1-тио-*D*-лактозы и 1-тио-*D*-галактозы через сульфгидрильную группу по двойной связи производных малеиновой кислоты, аналогичная реакции присоединения по Михаэлю.

Для синтеза липидного компонента — сложных эфиров малеиновой кислоты — использовали реакцию взаимодействия моногексадецилового эфира малеиновой кислоты с различными спиртами (гексадециловым, олеиловым и диэтиламиноэтанолам) в условиях азеотропной отгонки воды с толуолом в присутствии *n*-толуолсульфокислоты [7].

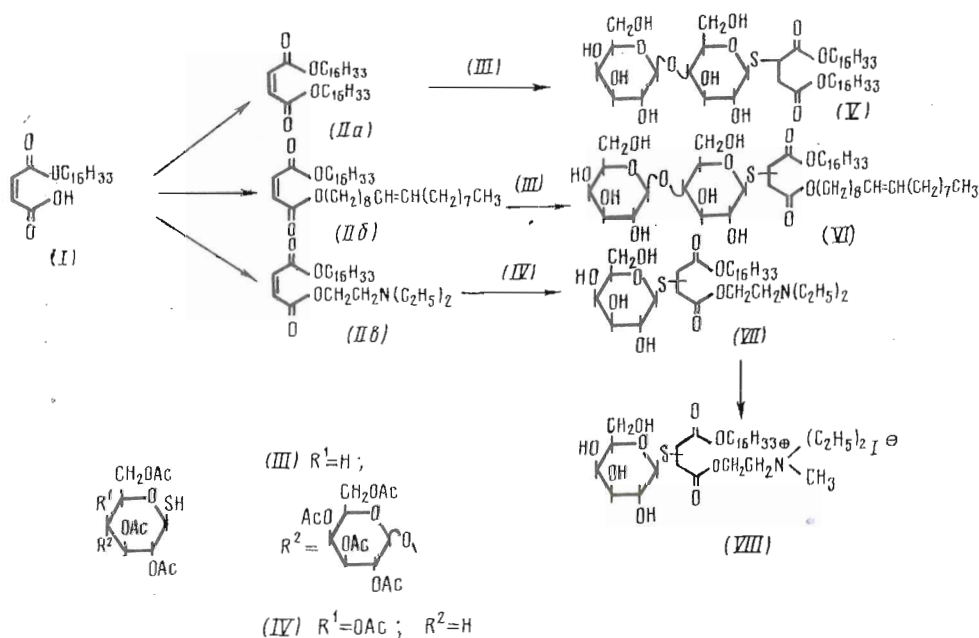
Присоединение тиолактозы и тиогалактозы по двойной связи производных малеиновой кислоты осуществляли по модифицированному методу [8] с использованием в качестве активатора реакции триэтиламина. Структура полученных соединений подтверждалась данными ПМР-

и ИК-спектров, а также величинами угла оптического вращения. По данным ПМР-спектров, продукты реакции представляли собой эквимольную смесь диастереомеров (сигнал аномерного протона для соединений (V) и (VI) зарегистрирован в виде двух дублетов). После удаления защитных ацетильных группировок кипячением полученных соединений с гидразингидратом в токе инертного газа получали целевые гликолипиды (V)–(VII). Наличие изомеров положения по сукцинильному остатку для соединений (VI)–(VIII) или их ацетатов наблюдать не удалось.

Для получения положительно заряженного гликолипида (VIII) галактолипид (VII) обрабатывали иодистым метилом в среде нитрометана при комнатной температуре. Структура данного соединения подтверждена с помощью ПМР-спектра, где отмечалось появление новых сигналов протонов группы $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{N}^+\text{CH}_3 \\ \diagdown \end{array}$ в виде синглета с δ 3,4 м.д., а также смещение сигналов протонов группировок, находящихся при атоме азота $=\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$.

Включение синтезированных гликолипидов в фосфолипидные липосомы и модельные исследования по преципитации модифицированных липосом галактозосвязывающим лектином будут описаны в следующей публикации.

Синтез гликолипидов (V)–(VIII) осуществлен по схеме



Экспериментальная часть

Моногексадециловый эфир малеиновой кислоты (I) получали по методу [7]. Синтез 9-октадеценола осуществлен исходя из олеиновой кислоты [9]. 1- β -Тиолактозу и 1- β -тиогалактозу синтезировали согласно работе [10]. Растворители очищали по стандартным методикам.

Спектры ПМР регистрировали в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker WM-200 (ФРГ) с рабочей частотой 200 МГц. Внутренний стандарт — гексаметилдисилоксан. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония). Данные ДОВ получали на

спектрополяриметре Perkin—Elmer MC 241 (Англия). Температуры плавления определяли на приборе Boetius (ГДР). ТСХ осуществляли на силуфоле (ЧСФР) в системах растворителей: эфир—гексан, 1:4 (А); эфир—гексан, 1:6 (Б); эфир—гексан, 2:1 (В); эфир—гексан, 4:1 (Г); хлороформ—метанол—ацетон, 18:2:1 (Д); эфир (Е). Препаративную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 (ЧСФР). Пятна при ТСХ обнаруживали нагреванием до 350°С; вещества, содержащие двойные связи, обнаруживали опрыскиванием раствором марганцовокислого калия.

Данные элементного анализа вновь синтезированных соединений (V)—(VIII) совпадали с рассчитанными значениями.

Ди(гексадецил)малеат (IIa). Раствор 3,4 г (0,01 моль) моногексадецилового эфира малеиновой кислоты (I), 2,42 г (0,01 моль) цетилового спирта и 4,7 г (25 ммоль) *n*-толуолсульфокислоты в 20 мл бензола кипятили 8 ч с насадкой Дина-Старка, после завершения реакции (контроль по ТСХ) упаривали; остаток растворяли в 50 мл хлороформа, промывали 10% водным раствором NaHCO₃ и водой (5×20 мл), сушили Na₂SO₄ и фильтровали. Перекристаллизацией остатка из ацетона с добавлением метанола получали 4,5 г (80%) соединения (IIa), *R*_f 0,69 (А), т. пл. 47–48°С (по данным [11], т. пл. 48–51°С).

Гексадецил[(9Z)-октадеценил]малеат (IIб). По вышеописанной методике из 0,5 г (1,47 ммоль) моноэфира (I), 0,28 г (1,47 ммоль) *n*-толуолсульфокислоты и 0,39 г (1,47 ммоль) олеилового спирта получали 0,7 г (81,4%) соединения (IIб), *R*_f 0,58 (Б), т. пл. 25–26°С. ИК-спектр (в пленке, $\nu_{\max}$, см⁻¹): 2910, 2850, 1480, 1405, 1380 (CH); 3000, 1640 (C=C); 1730, 1720 (C=O); 1250, 1220, 1150 (CO); 963, 821, 713. ПМР-спектр (CDCl₃, δ , м.д.): 0,8 (т, 6H, CH₃), 1,25 (м, 52H, CH₂ цепи), 1,6 (м, 4H, CH₂CH=CH), 1,95 (м, 4H, CH₂—CH=), 4,2 (т, 4H, OCH₂), 5,37 (м, 2H, CH=CHCH₂), 6,25 (с, 2H, COCH=CHCO).

Гексадецил(2-диэтиламиноэтил)малеат (IIв). По методике для синтеза соединения (IIa) из 0,5 г (1,47 ммоль) моноэфира (I) и 0,19 мл (1,47 ммоль) диэтиламиноэтанола в присутствии 0,4 г *n*-толуолсульфокислоты получали 0,39 г (61%) соединения (IIв) в виде густого масла, *R*_f 0,5 (В). ПМР-спектр (CDCl₃, δ , м.д.): 0,8 (т, 3H, CH₃), 1,1 (дт, 6H, N(CH₂CH₃)₂), 1,3 (м, 26H, CH₂ цепи), 1,6 (т, 2H, OCH₂CH₂), 2,6–3,0 (м, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 3,7–4,2 (м, 6H, CH₂N; OCH₂), 6,25 (с, 2H, CH=CH).

Ди(гексадецил)-2-(β -D-тиолактозил)сукцинат (V). К раствору 1,75 г (2,68 ммоль) ацетата 1- β -тиолактозы (III) в 10 мл этанола прибавляли раствор 1,5 г (2,68 ммоль) диэфира (IIa) в 2 мл безводного хлороформа, хорошо перемешивали, затем прибавляли по каплям 1,16 мл (2,68 ммоль) триэтиламина, выдерживали 1 ч при 100°С и охлаждали реакционную смесь до 0°С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали холодным метанолом и высушивали в вакууме. Остаток хроматографировали на 50 г силикагеля, элюируя продукт смесью эфир—гексан, 4:1. Выход ацетилированного гликолизида (V) 2,2 г (67,5%), *R*_f 0,43 (Г), т. пл. 28–29°С, $[\alpha]_{579}^{20}$ –2° (с 1, хлороформ). ИК-спектр (в вазелиновом масле, $\nu_{\max}$, см⁻¹): 2900, 2880, 1470, 1385, 725 (CH); 1745, 1720 (C=O); 1220 (C—O); 1160, 1100, 1070, 1080 (углеродный скелет). ПМР-спектр (CDCl₃, δ , м.д.): 0,8 (т, 6H, CH₃), 1,25 (м, 52H, CH₂ цепи), 1,6 (м, 4H, OCH₂CH₂), 1,8–2,15 (м, 21H, 7CH₃COO), 3,0–3,9 (м, 5H, H-5, H-5', CH₂COO; SCH), 3,9–4,2 (м, 8H, H-6, H-6', OCH₂), 4,44 (д, 0,5H, J_{7,8} 7,5 Гц, H-1), 4,46 (д, 0,5H, J_{1,2} 7,5 Гц, H-1), 4,6 (д, 1H, J_{1,2} 10 Гц, H-1'), 4,75–5,4 (м, 6H, H-2, H-3, H-4, H-2', H-3', H-4').

Раствор 0,5 г (0,41 ммоль) полученного соединения и 0,368 мл гидразингидрата в 45 мл метанола кипятили 2 ч в токе азота, смесь нейтрализовали 85% муравьиной кислотой и выдерживали 1 ч при 0° С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали холодным метанолом, высушивали над P₂O₅, получали 0,247 г (67,3%) соединения (V), R_f 0,57 (Д). $[\alpha]_{579}^{20} -3^{\circ}$ (с 1, хлороформ), т. пл. 59–60° С. ИК-спектр (в вазелиновом масле, $\nu_{\max}$, см⁻¹): 3600 (ОН); 2905, 2875, 1460, 1360, 725 (СН); 1720 (С=О); 1225 (С–О); 1160, 1110, 1055, 1030 (углеводный скелет). Найдено, %: S 3,14. C₁₆H₂₆O₁₄S. Вычислено, %: S 3,57.

Гексадецил[(9Z)-октадеценил]-2(3)-(β-D-тиолактозил)сукцинат (VI). К раствору 0,7 г (1,07 ммоль) ацетата 1-β-тиолактозы (III) в 10 мл этанола прибавляли раствор 0,4 г (0,67 ммоль) диэфира (IIб) в 2 мл безводного хлороформа, интенсивно перемешивали, затем к смеси прибавляли 0,29 мл триэтиламина и выдерживали 30 мин при 75° С. По окончании реакции (контроль ТСХ) растворители удаляли в вакууме, получали 0,9 г (95%) хроматографически чистого гексаацетата липида (VI) в виде густого масла, R_f 0,39 (Г), $[\alpha]_{579}^{20} +9^{\circ}$ (с 1, хлороформ). ИК-спектр (в пленке, $\nu_{\max}$, см⁻¹): 2900, 2880, 1470, 1385, 725 (СН); 3000, 1640 (С=С); 1730, 1720 (С=О); 1250 (СО); 950, 820, 700. ПМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0,8 (т, 6H, 2CH₃), 1,25 (м, 52H, CH₂ цепи), 1,6 (м, 4H, OCH₂CH₂), 1,8–2,15 (м, 25H, 7CH₃COO; CH₂CH=CHCH₂), 3,0–3,9 (м, 5H, H-5, H-5'; CH₂COO; SCH), 3,9–4,2 (м, 8H, H-6, H-6'; OCH₂), 4,44 (д, 0,5H, J_{1,2} 7,5 Гц, H-1), 4,46 (д, 0,5H, J_{1,2} 7,5 Гц, H-1), 4,6 (дд, 1H, J_{1',2'} 10 Гц, H-1'), 4,75–5,4 (м, 8H, H-2, H-3, H-4, H-2', H-3', H-4'; CH=CH).

0,8 г (0,483 ммоль) полученного соединения дезацетилювали действием 0,43 мл гидразингидрата в 52 мл метанола; получали 0,3 г (68%) соединения (VI), R_f 0,42 (Д), т. пл. 45–46° С, $[\alpha]_{546}^{20} +2^{\circ}$ (с 0,3, хлороформ). ИК-спектр (в вазелиновом масле, $\nu_{\max}$, см⁻¹): 3600 (ОН); 2905, 2875, 1460, 1360, 725 (СН), 3000, 1640 (С=С); 1730, 1720 (С=О); 1225 (С–О); 1160, 1110, 1055, 1030 (углеводный скелет). Найдено, %: S 3,20. C₄₅H₈₈O₁₄S. Вычислено, %: S 3,48.

Гексадецил(2 - диэтиламиноэтил)-2(3)-(β-D - тиогалактопиранозил)-сукцинат (VII). К раствору 2,05 г (5,63 ммоль) ацетата 1-β-тиогалактозы (IV) в 3 мл безводного хлороформа добавляли раствор 2,47 г (5,63 ммоль) диэфира малеиновой кислоты (IIв) в 15 мл этанола, перемешивали, прибавляли 0,784 мл (5,63 ммоль) диэфира малеиновой кислоты (IIв) в 15 мл этанола, перемешивали, затем прибавляли 0,784 мл (5,63 ммоль) триэтиламина и кипятили 30 мин. По окончании реакции (контроль по ТСХ) смесь упаривали досуха, растворяли в 50 мл эфира и промывали водой (8×20 мл); экстракт сушили сульфатом натрия и упаривали. Получали 3,65 г (80,8 %) ацетилированного галактолипида в виде масла, R_f 0,33 (Е), $[\alpha]_{579}^{20} -4,5^{\circ}$ (с 1, хлороформ). ПМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 0,8 (т, 3H, CH₃), 1,1 (м, 6H, N(CH₂CH₃)₂), 1,3 (с, 26H, CH₂ цепи), 1,8 (т, 2H, OCH₂CH₂), 1,8–2,15 (м, 12H, 4CH₃COO), 2,6–3,2 (м, 7H, N(CH₂CH₃)₂, CH₂COO; H-5), 3,75–4,4 (м, 9H, SCH; CH₂N; OCH₂, H-6), 4,7–4,9 (м, 1H, J_{1,2} 10 Гц, H-4), 5,0–5,45 (м, 3H, H-2, H-3, H-4).

Раствор 0,23 г (0,286 ммоль) полученного соединения в 3 мл метанола обрабатывали 14 мкл (0,286 ммоль) гидразингидрата. Продукты реакции разделяли ТСХ на пластинках (200×200 мм) с силикагелем в системе хлороформ – метанол – ацетон (18:2:1) с обнаружением зон иодом. Получали 0,12 г (75%) соединения (VII), R_f 0,39 (Д), т. пл. 195–200° С, $[\alpha]_{579}^{20} -6,7^{\circ}$ (с 0,67, хлороформ – метанол, 2:1). ИК-спектр (в вазели-

новом масле, $\nu_{\max}$, см^{-1}), 3380 (ОН); 2930, 2850 (СН); 1730 (С=О), 1470 (СН); 1160, 1110, 1070, 1080 (углеводный скелет). ПМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 0,88 (т, 3Н, CH_3), 1,15 (м, 6Н, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1,4 (с, 26Н, CH_2 цепи), 1,65 (м, 2Н, OCH_2CH_2), 2,1 (м, 4Н, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3,1 (с, 2Н, CH_2N), 3,3 (м, 4Н, OCH_2), 3,45 (м, 1Н, Н-5), 4,1 (м, 2Н, Н-6), 4,6–5,45 (м, 4Н, Н-1, Н-2, Н-3, Н-4).

Иодид гексадецил(2 - метилдизтиламмониоэтил)-2(3)-(β-D-тио-галактопиранозил)сукцината (VIII). Раствор 0,180 г (0,317 ммоль) соединения (VII) в 20 мл нитрометана и 0,02 мл (0,317 ммоль) иодистого метила выдерживали 2 ч в темноте при комнатной температуре. После завершения реакции (контроль по ТСХ) упаривали растворитель, получали 0,18 г (99%) соединения (VIII), R_f 0,16 (Д), $[\alpha]_{579}^{20} -6^\circ$ (с 1, хлороформ-метанол, 2:1). ИК-спектр (в пленке, $\nu_{\max}$, см^{-1}): 3380 (ОН); 2930, 2850 (СН); 1720 (С=О); 1470 (СН); 1090 (С-О). ПМР-спектр ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 1:1, δ , м.д.): 0,5 (т, 3Н, CH_3), 0,8 (с, 26Н, CH_2 цепи), 0,9 (м, 6Н, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1,2 (т, 2Н, OCH_2CH_2), 1,75 (м, 6Н, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, NCH_2), 2,85 (м, 6Н, OCH_2), 3,2 (м, 1Н, Н-3); 3,4 (с, 3Н, NCH_3), 3,5 (м, 1Н, SCH), 3,75 (м, 2Н, Н-6), 4,2–5,1 (м, 4Н, Н-1, Н-2, Н-3, Н-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berger E. G., Buddecke E., Kamerling J. P., Kohata A., Paulson J. C., Vliegthart J. F. G. // *Experientia*. 1982. V. 38. № 10. P. 1129–1258.
2. Hoekstra D., Düzgünes N. // *Subcell. Biol.* 1989. V. 14. P. 229–278.
3. Felgner P. L., Ringold G. M. // *Nature*. 1989. V. 337. № 6205. P. 387–388.
4. Русанова Е. Е., Волкова Л. В., Евстигнеева Р. П. // *Биоорганическая химия*. 1984. Т. 10. № 7. С. 957–962.
5. Себякин Ю. Л., Ким Е. Н., Абилова Д. В., Евстигнеева Р. П. // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. № 5. С. 684–685.
6. Любешкин А. В., Ким Е. Н., Себякин Ю. Л., Евстигнеева Р. П. // *Журн. орган. химии*. 1990. Т. 26. № 6. С. 1537–1540.
7. Fuhrhop J.-H., Tank H. // *Chem. and Phys. Lipids*. 1987. V. 43. № 2. P. 193–213.
8. Fuhrhop J.-H., David H.-H., Mathieu J., Liman U., Winter H.-J., Bochema E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 8. P. 1785–1791.
9. Noller C. R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1934. V. 56. № 7. P. 1563.
10. Horton D., Wolffrom M. L. // *J. Org. Chem.* 1962. V. 27. № 5. P. 1794–1800.
11. Neumann R., Ringsdorf H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 3. P. 487–490.

Поступила в редакцию
3.III.1992

Yu. L. SEBYAKIN, E. V. KAZAKOVA, R. P. EVSTIGNEEVA

SYNTHESIS OF MODIFIED ELECTRONEUTRAL AND POSITIVELY CHARGED GLYCOLIPIDS

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

A number of lacto- and galactolipids with saturated or unsaturated lipid chains and a positively charged terminal tetraalkyl ammonium group have been prepared. These compounds can be used to construct liposomes with surface carbohydrate markers.