



УДК 547.426.2.057

СИНТЕЗ КАТИОННЫХ ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ АЦЕТАЛЬНОГО ТИПА С АЛИФАТИЧЕСКИМИ И ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ОСНОВАНИЯМИ

© 2002 г. Т. В. Константинова[#], Н. Н. Дюбанкова,
В. Н. Клыков, М. А. Маслов, Г. А. Серебrenникова

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,
117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 21.03.2001 г. Принята к печати 19.04.2001 г.

Синтезированы катионные глицеролипиды 1,3-диоксоланового типа, содержащие азотистые основания алифатического и гетероциклического ряда. Основания присоединены к глицериновому скелету непосредственно (пиперазин) или через спейсерную группу тиоэфирной связью.

Ключевые слова: катионные глицеролипиды; амфифилы; трансфекция.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы широко проводятся исследования в области катионных амфифилов липидной и нелипидной природы, отличающихся большим разнообразием структуры [1]. К ним относятся катионные глицеролипиды, производные холестерина, полиаминов, аминокислот и пептидов, полиолов и другие амфифилы [2].

Большое внимание к этому классу соединений обусловлено возможностью их использования для доставки генетического материала в клетки различных типов (трансфекция) [3]. Среди катионных липидов наиболее изучены глицеролипиды, содержащие в качестве гидрофобных компонентов остатки высших жирных кислот, спиртов, альдегидов, а в качестве полярных групп – четвертичные азотистые основания алифатического или гетероциклического ряда (*N*-метилимидазол, пиперазин, пиридин, *N*-метилморфолин и др.), которые присоединены к глицериновому скелету непосредственно [4, 5] или через спейсерную группу [6, 7]. В настоящее время синтезировано большое количество катионных липидов, но поиск нетоксичных и эффективных агентов для трансфекции остается важной проблемой генной терапии [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы описали синтез катионных липидов 1,3-оксатиоланового и 1,3-диоксоланового

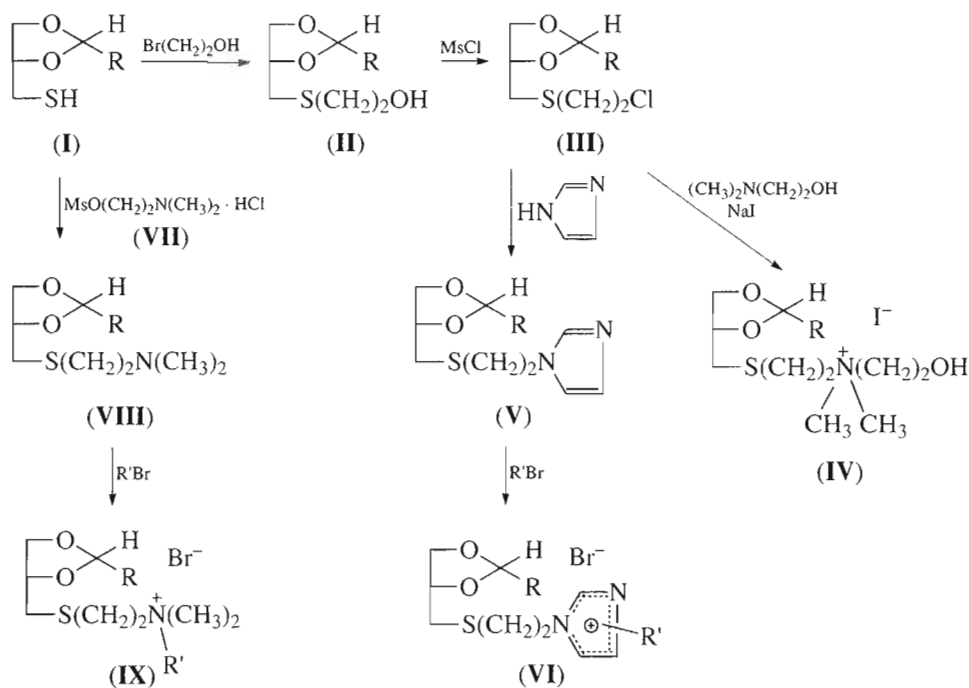
рядов, в которых четвертичная аммониевая группа присоединена к атому углерода 1-меркаптопропан-2-ола или пропан-1,2-диола либо непосредственно [8, 9], либо через спейсерную группу [7].

В развитие этих исследований мы предприняли синтез бесфосфорных катионных липидов 1,3-диоксоланового типа, у которых положительно заряженная группа, представленная азотистыми основаниями алифатического и гетероциклического ряда, присоединена к глицериновому скелету через спейсерную группу тиоэфирной связью (схема 1).

Взаимодействием 1,2-гексадецилиден-3-тиоглицерина (**I**) [9] с 2-бромэтанолом в присутствии спиртового раствора едкого натра был получен *rac*-1,2-гексадецилиден-3-(2-гидроксиэтил)тиоглицерин (**II**). Обработка последнего метансульфонилхлоридом привела не к ожидаемому метансульфонильному производному, а к *rac*-1,2-гексадецилиден-3-(2-хлорэтил)тиоглицерину (**III**).

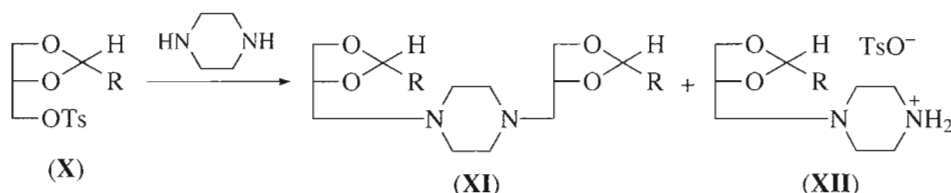
Реакцией соединения (**III**) с диметиламиноэтанолом и имидазолом в среде DMSO и в присутствии йодида натрия были получены 2-гидроксиэтилдиметил[2-(*RS*-1,2-гексадецилидендиоксипропил-3-тио)этил]аммониййодид (**IV**) и *N*-[2-(*RS*-1,2-гексадецилидендиоксипропил-3-тио)этил]имидазол (**V**) с выходами 18 и 50% соответственно. При нагревании имидазольного производного (**V**) с гексадецилбромидом в DMSO получали катионный липид (**VI**). При взаимодействии тиола (**I**) с гидроклоридом *N*-(2-метилоксиэтил)-*N,N*-диметиламина (**VII**) [7] в присутствии едкого натра в этаноле синтезировали

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 434-85-44; эл. почта: konstantinova@httos.mitht.msk.ru).



R = (CH₂)₁₄CH₃, R' = (CH₂)₁₅CH₃

Схема 1.



R = (CH₂)₁₄CH₃

Схема 2.

rac-1,2-гексадецилиден-3-(2-диметиламиноэтил)тиоглицерин (VIII). Кватернизация последнего гексадецилбромидом в DMSO приводила к гексадецилдиметил[2-(*RS*-1,2-гексадецилидендиооксипропил-3-тио)этил]аммонийбромиду (IX).

Катионные липиды (VI) и (IX), в отличие от ранее описанных глицеролипидов ацетального типа [7–9], имеют длинноцепочечный гидрофобный остаток (C_{16:0}) в полярной головке, что может оказать влияние на их эффективность в процессе трансфекции.

Амфифилы, содержащие несколько катионных групп, широко используются для доставки генетического материала [10, 11], в связи с этим нами осуществлен синтез липидов (XI) и (XII), включающих два атома азота (схема 2).

При взаимодействии 2 моль 1-тозил-2,3-гексадецилиденглицерина (X) [8] с пиперазином (1 моль) в

DMSO в присутствии йодида натрия наряду с третичным диамином, *N,N*-бис(2,3-гексадецилидендиооксипропил)пиперазином (XI), получали *N*-(2,3-гексадецилидендиооксипропил)пиперазиний-*n*-толуолсульфонат (XII), которые разделяли хроматографией. В ¹H-ЯМР-спектре соединения (XII) присутствовали сигналы протонов *n*-толуолсульфонатной группы (синглет при 2.19 м.д. метильной группы и две группы мультиплетов при 7.01 и 7.55 м.д., которые относятся к протонам арильного кольца). Протоны CH₂-группы глицеринового скелета располагаются в сильном поле (2.73 м.д.), что свидетельствует о нахождении их при третичном атоме азота. Кватернизацию соединения (XI) не проводили, поскольку известно, что третичные амины способны протонироваться при физиологических значениях pH (аммониевые ионы) [12]. Индивидуальность и

строение всех синтезированных соединений подтверждены данными ТСХ, ИК-, ^1H -ЯМР-спектров и масс-спектрометрии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали перегнанные растворители и реагенты отечественного производства: гексадецилбромид, метилиодид, имидазол, пирин, а также метилэтилкетон (Reanal), метансульфонилхлорид (Fluka), пиперазин (Sigma Chemical, Германия), 2-бромэтанол (Aldrich).

ТСХ проводили на силуфоле UV-254 (Chemapol, Чехия) с обнаружением пятен параами йода или прокаливанием. Системы растворителей для ТСХ: толуол – спирт, 5 : 1 (А), толуол-петролейный эфир, 2 : 1 (Б), хлороформ – метанол – вода, 65 : 25 : 4 (В), хлороформ-петролейный эфир, 3 : 1 (Г). Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L 100/160 мкм (Chemapol, Чехия). Температуры плавления определяли на приборе Voetius (Германия). Спектры ^1H -ЯМР регистрировали на импульсном фурье-спектрометре Bruker MSL-200 (200 МГц) (Германия): для соединений (II)–(V), (VIII) и (XI) в дейтерохлороформе, для (VII) в тетрадейтерометаноле, для (IX) в смеси дейтерохлороформ–тетрадейтерометанол, 1 : 1, для (XII) в смеси дейтерохлороформ–DMSO- d_6 , 1 : 1. Масс-спектры сняты на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ (г. Сумы, Украина) с ионизацией осколками деления ^{252}Cf . Ускоряющее напряжение ± 5 или ± 20 кВ. ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UR-435 (Япония). Образцы готовили в виде пасты в вазелиновом масле для кристаллических и в тонкой пленке для легкоплавких веществ.

rac-1,2-Гексадецилиден-3-(2-гидроксиэтил)тиоглицерин (II). Смесь 0.4 г (1.24 ммоль) *rac*-3-тио-2-гексадецилиденглицерина (I) и 0.471 г (3.77 ммоль) 2-бромэтанол в 30 мл 1 н. спиртового раствора NaOH перемешивали 4 ч при 20°C. Затем отфильтровывали NaBr, к фильтрату добавляли 50 мл хлороформа. Органический слой промывали водой (5 × 50 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали. Остаток перекристаллизовывали из ацетонитрила. Выход 0.383 г (81%), т. пл. 44–45°C, R_f 0.40 (А); масс-спектр, m/z : 373.4 [M] $^+$; ИК (ν , cm^{-1}): 3400, 1420, 1160, 1130, 1100, 1050; ^1H -ЯМР-спектр, δ , м.д.: 0.87 (3H, т, J 6.1 Гц, $\text{CH}_3\text{—CH}_2$), 1.25 (26H, уш.с, $(\text{CH}_2)_{13}$), 1.60 (2H, м, OCHCH_2), 2.57–2.85 (4H, м, $\text{CH}_2\text{—S—CH}_2$), 3.58 (0.5H, дд) и 3.71 (0.5H, дд, J 6 и 8 Гц), 3.94 (0.5H, дд) и 4.16 (0.5H, дд, J 6.5 и 8 Гц, CH_2OC), 4.21 (1H, м, CH_2CHCH_2), 4.74 (2H, м, CH_2OH), 4.87 (0.5H, т) и 5.05 (0.5H, т, J 4.5 Гц, OCHO , диастереомеры).

rac-1,2-Гексадецилиден-3-(2-хлорэтил)тиоглицерин (III). К раствору 0.177 г (0.47 ммоль) соеди-

нения (II) в смеси 3 мл хлороформа и 1 мл триэтиламина добавляли 0.1 мл (1.29 ммоль) метансульфонилхлорида и выдерживали 20 ч при 20°C. Осадок отфильтровывали, к фильтрату добавляли 20 мл хлороформа, промывали водой (2 × 10 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали. Остаток хроматографировали, элюируя целевое вещество смесью толуол–петролейный эфир (2 : 1). Выход 0.158 г (85%), т. пл. 22–23°C, R_f 0.59 (Б); масс-спектр, m/z : 392.3 [M] $^+$, ИК (ν , cm^{-1}): 1420, 1290, 1220, 1160, 1130, 1100, 1040; ^1H -ЯМР-спектр, δ , м.д.: 0.85 (3H, т, J 6.1 Гц, $\text{CH}_3\text{—CH}_2$), 1.26 (26H, уш.с, $(\text{CH}_2)_{13}$), 1.62 (2H, м, OCHCH_2), 2.56–3.05 (4H, м, $\text{CH}_2\text{—S—CH}_2$), 3.57 (0.5H, дд) и 3.72 (0.5H, дд, J 5.5 и 8.5 Гц), 3.93 (0.5H, дд) и 4.15 (0.5H, дд, J 6.5 и 8.5 Гц, CH_2OC), 4.20 (1H, м, CH_2CHCH_2), 4.86 (0.5H, т) и 4.98 (0.5H, т, J 4.5 Гц, OCHO , диастереомеры).

2-Гидроксиэтилдиметил[2-(*RS*-1,2-гексадецилидендиоксипропил-3-тио)этил]аммониййодид (IV). Смесь 0.160 г (0.4 ммоль) хлорида (III), 0.660 (4.4 ммоль) йодида натрия и 1.82 г (20 ммоль) диметиламиноэтанола в 7 мл DMSO нагревали 5 ч при 60–70°C. К охлажденной реакционной массе добавляли 20 мл хлороформа, промывали водой (4 × 10 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали. Остаток хроматографировали, элюируя целевое вещество смесью хлороформ–четырёххлористый углерод–метанол (2 : 2 : 0.5). Выход 0.043 г (18%), R_f 0.6 (В); масс-спектр, m/z : 446.5 [M] $^+$; ^1H -ЯМР-спектр, δ , м.д.: 0.86 (3H, т, J 6.1 Гц, $\text{CH}_3\text{—CH}_2$), 1.26 (26H, уш.с, $(\text{CH}_2)_{13}$), 1.60 (2H, м, OCHCH_2), 2.72–3.22 (4H, м, $\text{CH}_2\text{—S—CH}_2$), 3.40 (6H, с, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.53–4.04 (6H, м, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{N}^+\text{CH}_2$), 4.14 (2H, м, CH_2OC), 4.24 (1H, м, OCHO), 4.85 (0.5H, т) и 5.0 (0.5H, т, J 4.5 Гц, OCHO , диастереомеры).

***N*-[2-(*RS*-1,2-Гексадецилидендиоксипропил-3-тио)этил]имидазол (V).** Смесь 0.098 г (0.25 ммоль) соединения (III), 0.055 г (0.8 ммоль) имидазола и 0.3 г йодида натрия в 4.5 мл DMSO нагревали 2 ч при 100°C. К охлажденной реакционной массе приливали 40 мл хлороформа, промывали водой (2 × 20 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали. Остаток после удаления растворителя хроматографировали, вещество элюировали смесью хлороформ–петролейный эфир (3 : 1). Выход 0.054 г (50%), т. пл. 39–41°C, R_f 0.8 (В); масс-спектр, m/z : 424.9 [M] $^+$; ИК (ν , cm^{-1}): 3400, 1720, 1640, 1470, 1380, 1290, 1235, 1130, 1080, 1040; ^1H -ЯМР-спектр, δ , м.д.: 0.86 (3H, т, J 6.1 Гц, $\text{CH}_3\text{—CH}_2$), 1.26 (26H, уш.с, $(\text{CH}_2)_{13}$), 1.60 (2H, м, OCHCH_2), 2.56–2.98 (4H, м, $\text{CH}_2\text{—S—CH}_2$), 3.54–4.29 (5H, м, CHO , CH_2OC , CH_2N), 4.78 (0.5H, т) и 4.97 (0.5H, т, J 4.5 Гц, OCHO , диастереомеры), 6.94 (1H, м) и 7.02 (1H, м, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.55 (1H, уш.с, NCH).

***N'*-[2-(*RS*-1,2-Гексадецилидендиоксипропил-3-тио)этил]-*N'*-гексадецилимидазолинийбромид (VI).** Раствор 0.043 г (0.1 ммоль) имидазольного производного (V) и 0.114 г (0.37 ммоль) гексадецилбромид в 3.5 мл DMSO нагревали 3 ч при 100°C. К реакционной массе приливали 30 мл хлороформа, промывали водой (2 × 30 мл), сушили Na₂SO₄. Остаток после удаления растворителя хроматографировали, элюируя вещество смесью хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4). Выход 0.044 г (61%), *R_f* 0.7 (B); масс-спектр, *m/z*: 649.1 [*M*]⁺; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.86 (6H, т, *J* 6.1 Гц, 2 CH₃), 1.26 (52H, уш.с, 2 (CH₂)₁₃), 1.61–1.83 (4H, м, ОСНСН₂, NCH₂СН₂), 2.75–3.19 (4H, м, СН₂–S–СН₂), 3.54–3.94 (2H, м, СН₂О), 4.05 (3H, с, N⁺СН₃), 4.11–4.29 (3H, м, СНО, СН₂N⁺), 4.80 (0.5H, т) и 4.98 (0.5H, т, *J* 4.5 Гц, ОСНО, диастереомеры), 7.15 (1H, м) и 7.20 (1H, м, СН=СН), 10.1 (1H, уш.с, NСН).

***rac*-1,2-Гексадецилиден-3-(2-диметиламиноэтил)тиоглицерин (VIII).** Смесью 0.6 г (3 ммоль) гидрохлорида *N*-(2-мезилоксиэтил)-*N,N*-диметиламина (VII) [7] и 0.35 г (1 ммоль) тиола (I) в 20 мл 0.5 н. спиртового раствора едкого натра перемешивали 1 ч при 25°C. Затем отфильтровывали осадок, промывали его спиртом, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 40 мл толуола и промывали водой (2 × 20 мл), сушили Na₂SO₄, упаривали. Выход 0.387 г (90%), *R_f* 0.77 (Г); масс-спектр, *m/z*: 402.9 [*M* + 1]⁺; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.85 (3H, т, *J* 6.1 Гц, СН₃–СН₂), 1.26 (26H, уш.с, (СН₂)₁₃), 1.60 (2H, м, ОСНСН₂), 2.22 (6H, с, N(СН₃)₂), 2.51 (2H, м, NСН₂), 2.54–2.85 (4H, м, СН₂–S–СН₂), 3.58 (0.5H, дд) и 3.72 (0.5H, дд, *J* 5.0 и 8.0 Гц), 3.92 (0.5H, дд) и 4.14 (0.5H, дд, *J* 6.5 и 8.0 Гц, СН₂О), 4.19 (1H, м, СНО), 4.86 (0.5H, т) и 4.97 (0.5H, т, *J* 4.5 Гц, ОСНО, диастереомеры).

Гексадецилдиметил[2-(*RS*-1,2-гексадецилидендиоксипропил-3-тио)этил]аммонийбромид (IX). Смесью 0.30 г (0.7 ммоль) соединения (VIII) и 0.523 г (1.7 ммоль) гексадецилбромид в 3.5 мл DMSO перемешивали 2 ч при 90°C. Охлажденную реакционную смесь растворяли в 30 мл хлороформа, промывали водой (3 × 20 мл), сушили Na₂SO₄, упаривали. Остаток хроматографировали, элюируя целевое вещество смесью хлороформ–метанол (1 : 2). Выход 0.323 г (61%), *R_f* 0.63 (B); масс-спектр, *m/z*: 626.8 [*M*]⁺; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.87 (6H, т, *J* 6.1 Гц, 2 CH₃), 1.24 (52H, уш.с, 2 (СН₂)₁₃), 1.58–1.79 (4H, м, ОСНСН₂, NCH₂СН₂), 2.72–3.07 (4H, м, СН₂–S–СН₂), 3.15 (6H, с, N⁺(СН₃)₂), 3.33–4.23 (7H, м, СН₂–N⁺–СН₂, СН₂О, СНО), 4.61 (0.5H, т) и 5.02 (0.5H, т, *J* 4.5 Гц, ОСНО, диастереомеры).

***N,N'*-Бис(*RS*-2,3-гексадецилидендиоксипропил)пиперазин (XI) и *N*-(*RS*-2,3-гексадецилиденди-**

оксипропил)пиперазиний-*n*-толуолсульфонат (XII). Раствор 0.3 г (0.64 ммоль) 1-тозил-2,3-изопропилглицерина (X) [8] и 0.028 г (0.32 ммоль) пиперазина в 9 мл DMSO нагревали 4 ч при 90°C в присутствии 1 г йодида натрия. Охлажденную реакционную смесь растворяли в 30 мл хлороформа, промывали водой (4 × 20 мл), сушили Na₂SO₄, упаривали. Остаток хроматографировали, элюируя вещество последовательно смесью дихлорметан–метанол (50 : 1) и (25 : 1). Получали смесь пиперазиновых производных (XI) и (XII). Выход соединения (XI) 0.068 г (30%), т. пл. 76–80°C, *R_f* 0.66 (B); масс-спектр, *m/z*: 687.5 [*M*]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 2940, 1070, 1040; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.86 (6H, т, *J* 6.1 Гц, 2 CH₃), 1.25 (52H, м, 2 (СН₂)₁₃), 1.64 (4H, м, 2 ОСНСН₂), 2.74 (4H, м, 2 СН₂N), 3.03 (8H, м, 2 NCH₂СН₂N), 3.33–3.96 (4H, м, 2 СН₂О), 4.19–4.39 (4H, м, 2 СНО), 4.86 (1H, т) и 4.92 (1H, т, *J* 4.5 Гц, 2 ОСНО, диастереомеры).

Выход соединения (XII) 0.058 г (30%), т. пл. 46–48°C, *R_f* 0.52 (B); масс-спектр, *m/z*: 421.3 [*M*]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 3030, 2940, 1670; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.71 (3H, т, *J* 6.1 Гц, СН₃), 1.25 (26H, уш.с, (СН₂)₁₃), 1.43 (2H, м, ОСНСН₂), 2.19 (3H, с, С₆H₄СН₃), 2.37 (2H, м, СН₂N), 2.61 (4H, м) и 3.05 (4H, м, 2 NCH₂СН₂N⁺), 3.28–3.75 (2H, м, СН₂О), 3.96 (1H, м, СНО), 4.86 (0.5H, т) и 4.92 (0.5H, т, *J* 4.5 Гц, ОСНО, диастереомеры), 7.01 (2H, м) и 7.55 (2H, м, SO₃С₆H₄СН₃).

Работа поддержана грантом подпрограммы “Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении”, направление 05. Генодиагностика и генотерапия (1999–2000), грантом по фундаментальным исследованиям в области технических наук, подраздел 3 “Лекарственные и биологически активные вещества”, грантом программы “Фундаментальные исследования в области технических наук”, раздел “Химические технологии” (2001–2002 гг.), грантом РФФИ государственной поддержки ведущих научных школ РФ № 00-15-97866, грантом РФФИ № 01-03-33234.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Константинова И.Д., Серебренникова Г.А. // Успехи химии. 1996. Т. 65. С. 581–598.
2. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. // Изв. АН. Серия хим. 2000. № 3. С. 485–500.
3. Miller A.D. // Angew. Chem. Int. Ed. 1998. V. 37. P. 1768–1785.
4. Константинова И.Д., Ушакова И.П., Серебренникова Г.А. // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. С. 845–849.
5. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. // Изв. АН. Серия хим. 1999. № 7. С. 1381–1384.

6. Константинова И.Д., Завгородний С.Г., Мирошников А.И., Ушакова И.П., Серебренникова Г.А. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 66–69.
7. Клыков В.Н., Серебренникова Г.А. // Изв. АН. Серия хим. 1998. № 8. С. 1590–1592.
8. Клыков В.Н., Романюк О.А., Серебренникова Г.А. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 281–283.
9. Клыков В.Н., Илларионов П.А., Серебренникова Г.А. // Изв. АН. Серия хим. 1996. № 12. С. 2347–2349.
10. Lewis J.G., Lin K.Y., Kothavale A., Flangan W.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 3176–3181.
11. Budker V., Hagstran J.E., Lapin O., Eifrig D., Fritz J.A. // Biotechniques. 1997. V. 23. P. 62–69.
12. Hughes J.A., Aronsohn A.J., Avrutskaya A.V., Juliano R.L. // Pharm. Res. 1996. V. 13. P. 404–407.

The Synthesis of Cationic Glycerolipid Acetals Containing Aliphatic and Heterocyclic Bases

T. V. Konstantinova[#], N. N. Dyubankova, V. N. Klykov,
M. A. Maslov, and G. A. Serebrennikova

[#]Phone: +7 (095) 434-8544; e-mail: konstantinova@htos.mihht.msk.ru

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

1,3-Dioxolane series cationic lipids containing residues of aliphatic or heterocyclic nitrogenous bases were synthesized. The bases were attached to the glycerol backbone either directly (piperazine) or via a spacer group through a thioether bond. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: amphiphils, cationic glycerolipids, transfection