



УДК 547.426.2.057

СИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНСОДЕРЖАЩИХ КАТИОННЫХ АМФИФИЛОВ С ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМИ ОСНОВАНИЯМИ

© 2001 г. Т. В. Константинова[#], В. Н. Клыков, Г. А. Серебренникова

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

Поступила в редакцию 11.01.2001 г. Принята к печати 21.03.2001 г.

Получен ряд катионных производных холестерина, полярные головки в которых представлены *N*-метилимидазолиевой, пиридиниевой, *N*-метилморфолиниевой, 4-*N,N*-диметиламинопиридиниевой группировками. Синтез осуществлялся взаимодействием гетероциклических оснований с 5-бромвалератом холестерина с последующей обработкой метилиодидом в случае образования третичных аминов. Кроме того, синтезирован *N*-(4-холестерилоксикарбонилбутил)пиперазин для получения рН-чувствительных липосом.

Ключевые слова: холестерин; катионные производные; трансфекция.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие проводится интенсивное изучение новых представителей класса катионных амфифилов липидной природы с целью выявления взаимосвязи структура–биологическая активность [1]. Внимание к данному классу соединений обусловлено прежде всего возможностью их использования в составе катионных липосом – посредников для доставки генетического материала в эукариотические клетки (трансфекция), а также в качестве противоопухолевых и антивирусных агентов [2, 3].

Известно, что катионные амфифилы, содержащие гидрофобный остаток холестерина, находят широкое применение для исследования механизмов слияния искусственных мембран, структурно-функционального изучения сконструированных на их основе геносом (комплекс ДНК с липосомой) и механизмов транспорта этих комплексов в эукариотические клетки [4]. Для дальнейшего развития таких исследований необходимы серии синтетических холестеринсодержащих катионных липидов, модифицированных по различным структурным доменам. Хотя синтезировано много катионных амфифилов на основе холестерина, все они содержат в качестве положительно заряженной группы остаток алифатических аминов или полиэтилениминов [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были синтезированы катионные глицеролипиды с различным набором гидрофоб-

ных компонентов и катионных группировок, представленных алифатическими и гетероциклическими основаниями [6–8].

В развитие исследований по синтезу новых типов катионных липидов мы предприняли синтез холестеринсодержащих катионных амфифилов с гетероциклическими основаниями. Выбор холестерина (**I**) в качестве липидного домена обусловлен тем, что он оказывает стабилизирующее действие на липидный бислой, не проявляет токсичности к исследуемой клетке и способствует повышению эффективности трансфекции [9]. Необходимым структурным элементом катионных амфифилов на основе холестерина, как правило, являются спейсерные группы различного типа, соединяющие катионную группировку и холестерин. Нами в качестве такой группы был выбран остаток 5-бромвалериановой кислоты, вводимый в молекулу холестерина действием ее хлорангидрида в среде безводного пиридина.

Реакцию 5-бромвалерата холестерина (**II**) с таковыми гетероциклическими основаниями, как имидазол, *N,N*-диметиламинопиридин, морфолин, пиридин, пиперазин, мы проводили в присутствии NaI в DMSO или в его смеси с хлороформом. Замена брома в условиях реакции на более реакционноспособный йод позволила уменьшить продолжительность процесса и снизить температуру реакции, что оказало влияние на выход соединений (**III**), (**VI**), (**VII**), (**IX**), который в зависимости от типа основания колебался от 62 до 86%.

Реакцию с пиридином проводили при нагревании его с бромидом (**II**) в отсутствие NaI, и выход пиридиниевого производного (**V**) достигал 91%, что обусловлено большей, чем у других гетеро-

Сокращения: Chol – холестерин; Im – имидазол.

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

метиламинопиридин, DMSO, а также пиперазин (Sigma Chemical, Германия), 5-бромвалериановая кислота (Fluka, Швейцария). ТСХ проводили на силуфолу UV-254 (Chemapol, Чехия) с обнаружением пятен параами йода или прокаливанием пластинки. Системы растворителей для ТСХ: хлористый метил-петролейный эфир, 1 : 1 (А), хлороформ-метанол, 7 : 1 (Б), хлороформ-метанол-вода, 65 : 25 : 4 (В). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 100/250 мкм (Chemapol, Чехия). Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на импульсном фурье-спектрометре "Bruker MSL-200" (200 МГц) (Германия) в дейтерохлороформе для соединений (I)–(VIII) или DMSO-*d*₆ для соединения (IX), внутренний стандарт – тетраметилсилан. Масс-спектрометрия выполнена на времяпролетном масс-спектрометре Vision 2000 (Великобритания) с лазерно-десорбционной ионизацией на матрице. ИК-спектры регистрировали на спектрофотометре "Shimadzu UR-435" (Япония), образцы готовились в виде пасты в вазелиновом масле для кристаллических и в тонкой пленке для легкоплавких веществ. Температуры плавления определяли на приборе "Voetius" (ГДР).

5-Бромвалерат холестерина (II). К охлажденному до 0°C раствору 1.8 г (0.5 ммоль) холестерина (I) в 8 мл безводного хлороформа и 2 мл пиридина прибавляли по каплям раствор 1 г (0.5 ммоль) хлорангидрида 5-бромвалериановой кислоты в 6 мл хлороформа. Реакционную массу выдерживали 48 ч при 19–20°C, добавляли 30 мл хлороформа, промывали водой (2 × 30 мл), высушивали Na₂SO₄, упаривали. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью петролейный эфир-толуол (6 : 1). Выход 0.65 г (37%), т. пл. 78–82°C, *R*_f 0.41 (А); ИК (ν, см⁻¹): 2830, 1736, 1460, 1370, 1240, 670; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.68 (3 Н, с, CH₃), 0.86 (3 Н, д, *J* 6.8 Гц, CH₂), 0.92 (3 Н, д, *J* 6.7 Гц, CH₂), 1.02 (3 Н, с, CH₃), 1.10–1.60 (23 Н, м, Chol), 1.65–2.05 (7 Н, м, 3 Н Chol, BrCH₂CH₂CH₂), 2.28 (2 Н, м, H₂'4'), 2.30 (2 Н, т, *J* 6.8 Гц, CH₂COO), 3.40 (2 Н, т, *J* 6.7 Гц, BrCH₂), 4.55 (1 Н, м, H₃'), 5.35 (1 Н, м, H₆').

***N*-(4-Хolestериллоксикарбонилбутил)имидазол (III).** Раствор 0.20 г (0.4 ммоль) 5-бромвалерата холестерина (II), 0.12 г (2 ммоль) имидазола, 0.70 г (3 ммоль) йодида натрия в смеси 8 мл DMSO и 4 мл хлороформа нагревали 3 ч при 70–75°C. Реакционную массу охлаждали, прибавляли 30 мл хлороформа, промывали водой (2 × 30 мл), сушили Na₂SO₄, упаривали. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью хлороформ-метанол (25 : 1). Выход 0.12 г (62%), т. пл. 122–124°C, *R*_f 0.56 (Б); масс-спектр, *m/z*: 538.3 [*M*]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 3350, 2890, 1730, 1490, 1460, 1380, 1240, 1190, 1020, 790, 655; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.68 (3 Н, с, CH₃), 0.85 (3 Н, д, *J* 6.7 Гц, CH₂), 0.94 (3 Н, д, *J* 6.7 Гц, CH₂), 1.01 (3 Н, с, CH₃), 1.10–1.62 (23 Н, м, Chol), 1.68–2.03 (7 Н, м, 3 Н Chol, *NCH₂CH₂CH₂), 2.22 (4 Н, м, H₂'4', CH₂COO), 3.92 (2 Н, т, *J* 6.7 Гц, *NCH₂),

4.56 (1 Н, м, H₃'), 5.31 (1 Н, м, H₆'), 6.83 (2 Н, уш.с, CH=CH, Im), 7.02 (1 Н, уш.с, NCH=N).

***N*-(4-Хolestериллоксикарбонилбутил)-*N*-метил-имидазолийиодид (IV).** Раствор 0.097 г (0.1 ммоль) имидазольного производного (III) в 4 мл ацетона нагревали 1 ч с 0.3 мл (0.3 ммоль) метилиодида при 55–60°C, упаривали. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью хлороформ-метанол (25 : 1). Выход 0.078 г (76%), *R*_f 0.41 (Б); масс-спектр, *m/z*: 558.1 [*M*]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 3360, 2780, 1730, 1580, 1480, 1330, 1180, 1020, 840, 720, 610; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.68 (3 Н, с, CH₃), 0.86 (3 Н, д, *J* 6.7 Гц, CH₂), 0.96 (3 Н, д, *J* 6.7 Гц, CH₂), 1.01 (3 Н, с, CH₃), 1.09–1.63 (23 Н, м, Chol), 1.65–1.98 (7 Н, м, 3 Н Chol, *NCH₂CH₂CH₂), 2.28 (2 Н, уш.д, *J* 8 Гц, H₂'4'), 2.31 (2 Н, т, *J* 7.4 Гц, CH₂COO), 4.02 (3 Н, с, *NCH₃), 4.31 (2 Н, т, *J* 7.4 Гц, *NCH₂), 4.50 (1 Н, м, H₃'), 5.28 (1 Н, м, H₆'), 7.40 (2 Н, с, CH=CH, Im), 9.91 (1 Н, с, *NCH=N).

***N*-(4-Хolestериллоксикарбонилбутил)пиридинийбромид (V).** Смесь 0.05 г (0.1 ммоль) соединения (II) и 1.2 мл пиридина нагревали 9 ч при 60°C, упаривали. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя последовательно смесью хлороформ-метанол (15 : 1), хлороформ-метанол-вода (65 : 25 : 4). Выход 0.045 г (91%), *R*_f 0.64 (В); масс-спектр, *m/z*: 548.3 [*M*]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 3400, 2850, 2010, 1730, 1634, 1480, 1460, 1360, 1180, 1020, 760, 660; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.68 (3 Н, с, CH₃), 0.86 (3 Н, д, *J* 6.7 Гц, CH₂), 0.92 (3 Н, д, *J* 6.7 Гц, CH₂), 1.01 (3 Н, с, CH₃), 1.05–2.19 (30 Н, м, 26 Н Chol, *NCH₂CH₂CH₂), 2.29 (4 Н, м, H₂'4', CH₂COO), 4.55 (1 Н, м, H₃'), 5.02 (2 Н, т, *J* 7 Гц, *NCH₂), 5.35 (1 Н, м, H₆'), 8.1, 8.48 и 9.46 (5 Н, 3м, C₅H₅N⁺).

4-(*N,N*-Диметиламино)иодид)-*N*-(4-хolestериллоксикарбонилбутил)пиридин (VI). Смесь 0.22 г (0.4 ммоль) бромида (II), 0.135 г (0.12 ммоль) 4-*N,N*-диметиламинопиридина, 0.60 г (3 ммоль) йодида натрия растворяли в 3.5 мл DMSO и нагревали 5 ч при 70°C. К реакционной массе прибавляли 30 мл хлороформа, промывали водой (2 × 25 мл), сушили Na₂SO₄, упаривали. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью хлороформ-метанол-вода (65 : 25 : 4). Выход 0.134 г (52%), *R*_f 0.61 (В); масс-спектр, *m/z*: 591.8 [*M*]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 3400, 2900, 1730, 1640, 1570, 1460, 1374, 1250, 1190, 1020, 720, 690; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.68 (3 Н, с, CH₃), 0.86 (3 Н, д, *J* 6.8 Гц, CH₂), 0.92 (3 Н, д, *J* 6.8 Гц, CH₂), 1.01 (3 Н, с, CH₃), 1.05–2.19 (23 Н, м, Chol), 2.20–2.40 (8 Н, м, CH₂OCO, H₂'4', NCH₂CH₂CH₂), 3.25 (6 Н, с, *N(CH₃)₂), 4.42 (2 Н, т, *J* 6 Гц, *NCH₂), 4.55 (1 Н, м, H₃'), 5.35 (1 Н, м, H₆'), 6.95 (2 Н, д, *J* 7 Гц, 2 NCH=CH, Im), 8.40 (2 Н, д, *J* 6 Гц, 2 NCH=CH).

***N*-(4-Хolestериллоксикарбонилбутил)морфолин (VII).** Раствор 0.185 г (0.3 ммоль) бромида (II), 0.150 г (1.6 ммоль) морфолина, 0.60 г (3 ммоль) йодида натрия в 3 мл безводного DMSO нагревали

10 ч при 70–75°C. К реакционной массе прибавляли 30 мл хлороформа, промывали водой (2 × 30 мл), сушили Na₂SO₄, упаривали. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью хлороформ–метанол (25 : 1). Выход 0.160 г (86%), т.пл. 72–74°C, *R_f* 0.59 (B); масс-спектр, *m/z*: 556.1 [M]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 2900, 1730, 1460, 1370, 1190, 1118, 1020, 760, 660; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.68 (3 H, с, CH₃), 0.87 (3 H, д, *J* 6.8 Гц, CH₃), 0.92 (3 H, д, *J* 6.7 Гц, CH₃), 1.02 (3 H, с, CH₃), 1.06–2.18 (28 H, м, 26 H Chol, CH₂COO), 2.26–2.40 (6 H, м, H₂'⁴, NCH₂CH₂CH₂), 2.42 (2 H, м, NCH₂), 3.45 (4 H, м, 2 NCH₂CH₂O), 3.70 (4 H, м, 2 NCH₂CH₂O), 4.58 (1 H, м, H³'), 5.33 (1 H, м, H⁶').

***N*-(4-Холестерилоксикарбонилбутил)-*N*-метилморфолинийодид (VIII).** Раствор 0.12 г (0.2 ммоль) морфолинового производного (VII) в 4 мл безводного ацетона нагревали 1 ч при 65°C с 0.3 мл (0.3 ммоль) метилиодида. К реакционной массе прибавляли 25 мл хлороформа, промывали водой (2 × 20 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали. Остаток перекристаллизовывали из 7 мл ацетона. Выход 0.088 г (63%), т.пл. 142–144°C, *R_f* 0.47 (B); масс-спектр, *m/z*: 570.5 [M]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 2900, 1730, 1460, 1370, 1250, 1190, 1020, 710, 680; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.68 (3 H, с, CH₃), 0.86 (3 H, д, *J* 6.8 Гц, CH₃), 0.94 (3 H, д, *J* 6.8 Гц, CH₃), 1.02 (3 H, с, CH₃), 1.10–1.60 (23 H, м, Chol), 1.64–2.04 (7 H, м, 3 H Chol, +NCH₂CH₂CH₂), 2.25 (2 H, м, H₂'⁴), 2.42 (2 H, т, *J* 7 Гц, CH₂COO), 3.58 (3 H, с, +NCH₃), 3.60–3.98 (6 H, м, +NCH₂, 2 +NCH₂CH₂O), 4.08 (4 H, м, 2 +NCH₂CH₂O), 4.58 (1 H, м, H³'), 5.35 (1 H, м, H⁶').

***N*-(4-Холестерилоксикарбонилбутил)пиперазин (IX).** Раствор 0.27 г (0.5 ммоль) бромида (II), 0.21 г (2.5 ммоль) пиперазина, 0.90 г (3 ммоль) йодида натрия в смеси 8 мл DMSO и 4 мл хлороформа выдерживали 3 ч при 60°C. К реакционной массе прибавляли 25 мл хлороформа, промывали водой (2 × 25 мл), сушили Na₂SO₄, упаривали. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью хлористый метилен–метанол (25 : 1). Выход 0.17 г (67%), т.пл. 128–134°C, *R_f* 0.43 (B); масс-

спектр, *m/z*: 555.4 [M]⁺; ИК (ν, см⁻¹): 3350, 2830, 1730, 1460, 1360, 1190, 1060, 680; ¹H-ЯМР-спектр, δ, м.д.: 0.68 (3 H, с, CH₃), 0.86 (3 H, д, *J* 6.8 Гц, CH₃), 0.93 (3 H, д, *J* 6.8 Гц, CH₃), 1.02 (3 H, с, CH₃), 1.09–1.60 (23 H, м, Chol), 1.62–1.98 (7 H, с, 3 H Chol, NCH₂CH₂CH₂), 2.20 (4 H, м, H₂'⁴, CH₂COO), 2.48 (2 H, м, NCH₂), 2.85 (4 H, м, 2 NCH₂CH₂NH), 3.28 (4 H, м, 2 NCH₂CH₂NH), 4.45 (1 H, м, H³'), 5.32 (1 H, м, H⁶').

Работа поддержана грантом подпрограммы “Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении”, направление 05. Генодиагностика и генотерапия (1999–2000), грантом государственной поддержки ведущих научных школ РФ № 00-15-866, грантом РФФИ № 01-03-33234, грантом по фундаментальным исследованиям в области технических наук, подраздел 3 “Лекарственные и биологически активные вещества”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller A.D. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998. V. 37. P. 1768–1785.
2. Константинова И.Д., Серебренникова Г.А. // *Успехи химии.* 1996. Т. 65. С. 581–598.
3. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. // *Изв. АН. Серия хим.* 2000. № 3. С. 485–500.
4. Singhal A., Huang L. // *Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer / Ed. J.A. Wolff.* Boston: Birknauser, 1994. P. 1–10.
5. Okayama R. // *FEBS Lett.* 1997. V. 408. P. 232–234.
6. Клыков В.Н., Серебренникова Г.А. // *Изв. АН. Серия хим.* 1998. № 8. С. 1590–1594.
7. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. // *Изв. АН. Серия хим.* 1999. № 7. С. 1381–1384.
8. Альшозэйби З.Я., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. // *Биоорганическая химия.* 2000. Т. 26. С. 703–706.
9. Тараховский Ю.С., Иванецкий Г.Р. // *Биохимия.* 1998. Т. 63. С. 723–736.
10. Hughes J.A., Aronsohn A.J., Avrutskaya A.V., Juliano R.L. // *Pharm. Res.* 1996. V. 13. P. 404–407.

The Synthesis of Cholesterol-Containing Cationic Amphiphils with Heterocyclic Bases

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

[#] Phone +7 (095) 434-8544, e-mail: konstantinova@httos.mitth.msk.ru

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

A number of cationic derivatives of cholesterol containing polar residues of *N*-methylimidazole, pyridine, *N*-methylmorpholine, and 4-*N,N*-dimethylaminopyridine were synthesized by the interaction of the corresponding heterocyclic bases with cholesterol 5-bromopentanoate followed by the treatment with methyl iodide in the case of tertiary amines. In addition, *N*-(4-cholesteryloxycarbonylbutyl)piperazine was obtained for the preparation of pH-sensitive liposomes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cholesterol cationic derivatives, transfection