

Н.Г.Морозова,
М.А.Маслов,
В.В.Мягченков,
Г.А.Серебренникова

МОДЕЛЬНЫЙ СИНТЕЗ КАТИОННОГО НЕОГЛИКОЛИПИДА

УДК 547.95:547.462.2

Разработан удобный подход к синтезу углеводсодержащих амфифилов нейтральной и катионной природы на примере получения неогликолипидов глюко-ряда. Данные соединения предназначены для направленного транспорта лекарственных средств в эукариотические клетки.

Адресная доставка генов в определенные органы, ткани или клетки-мишени является одной из важнейших проблем генной терапии [1]. Для ее решения используют «адресные маркеры», в качестве которых могут выступать некоторые биополимеры, такие как антитела к определенным антигенам, белки, узнаваемые клеточными рецепторами, а также другие вещества, позволяющие использовать механизмы лиганд-опосредованного эндоцитоза. В качестве «молекулярного адреса» для клеток печени, обладающих асиалогликопротеиновыми рецепторами, хорошие результаты показали галактозосодержащие липосомы [2, 3]. Существует и ряд других клеток с углевод-узнающими рецепторами.

Целью данной работы явился модельный синтез глюкозосодержащего амфифила, предназначенный для отработки удобной универсальной схемы получения катионных неогликолипидов с различными углеводными маркерами для адресной доставки терапевтического гена. Гидрофобным доменом служил остаток тетрадеканола, непосредственно связанный с катионной головкой, представленной четвертичным атомом азота. Глюкозильный остаток соединялся с катионной головкой через гексаметиленовый спейсер, чтобы получить достаточную подвижность для реализации адресной функции. Стратегия синтеза состояла в предварительном создании липоаминной матрицы с

последующим размещением на ней углеводного звена. Синтез целевого соединения (6) включал следующие этапы (схема 1).

– Построение липоаминной матрицы:

- сульфонирование аминогруппы.
- моноалкилирование аминогруппы.

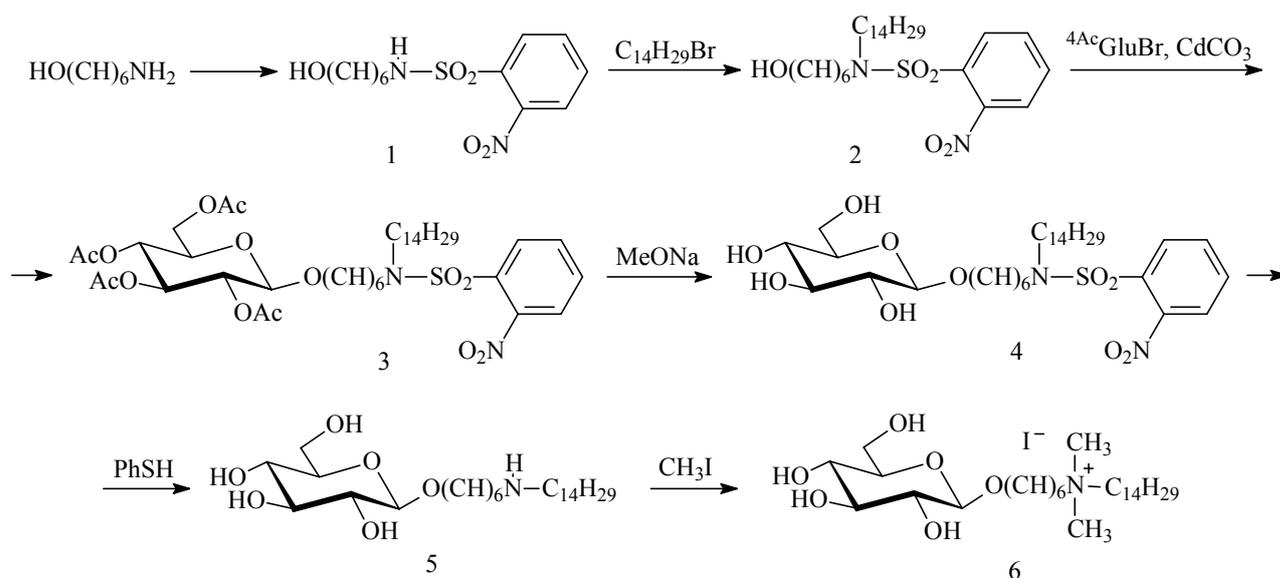
– Введение углеводного маркера в ходе реакции гликозилирования.

– Удаление защитных групп.

– Достройка катионной «головки» в условиях кватернизации.

Исходным соединением явился 6-аминогексанол, который на первой стадии был подвергнут *N*-сульфонированию действием 20%-ного избытка 2-нитрофенилсульфонилхлорида в присутствии триэтиламина [4]. Этот прием широко используется в химии аминов, так как обеспечивает в дальнейшем направленное получение *N*-моноалкилпроизводного. Реакция проходила в среде безводного дихлорметана в присутствии молекулярных сит 4Å при температуре 19-20 °С. Для завершения реакции, по данным ТСХ, потребовалось 40 ч. Образовавшийся продукт, легко детектируемый с помощью УФ-лампы, выделяли колоночной хроматографией с выходом 80%. Структура полученного соединения была подтверждена данными элементного анализа и ¹H-ЯМР спектра, где видны характерные для ароматики сигналы в области 7.0 - 7.5 м.д.

Алкилирование соединения (1) проводилось нами при 3-х кратном избытке тетрадецилбромидом в присутствии карбоната калия в безводном ДМФА [4]. Наибольшая полнота превращения исходного соединения (1) была достигнута через 8 ч от начала реакции. Выход продукта (2) после хроматографической очистки на колонке составил 87%.



На следующем этапе синтеза продукт алкилирования (2) подвергался гликозилированию взаимодействием с 3-х кратным избытком ацетобромглюкозы, которое осуществлялось в аппарате Сокслета в присутствии карбоната кадмия и прокаленного силикагеля в среде кипящего толуола [5]. Оптимальное время реакции составило 4.5 ч. После разделения компонентов реакционной массы колоночной хроматографией и изучения полученных фракций с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии было установлено, что наряду с целевым продуктом (3) (выход 45%) реакционная масса содержала ацетилпроизводное исходного спирта (2), о чём свидетельствуют соответствующие сигналы протонов в ^1H -ЯМР-спектре. Появление ацетильного производного агликона нередко наблюдается при гликозилировании сложных спиртов из-за двоякого расщепление промежуточного ортоэфирного карбокатиона. Кроме основного направления, в результате протонирования атома кислорода во втором положении углевода отщепляется ацетильный остаток, что, с одной стороны, делает возможным образование ацетил-производного исходного спирта. С другой же стороны, реакционная масса обогащается смесью α - и β -2-оксигликозидов, что снижает выход целевого продукта. Выход ацетата исходного спирта (2) составил 16%, следовательно, можно говорить о том же

выходе сопутствующей ему аномерной смеси 2-оксигликозидов.

Следующим этапом синтеза стало изучение альтернативных подходов к деблокированию NH_2 - и OH - групп. В первом случае сначала в присутствии метилата натрия в среде метанола деблокировались гидроксильные группы, а далее под действием тиофенола в присутствии карбоната калия в среде ДМФА удалялась нитрофенильная защита.

Во втором подходе сначала отщеплялась нитрофенильная группа, а затем ацетильные остатки, но такая последовательность оказалась менее удобной в препаративном отношении, так как промежуточный продукт нестабилен и при хранении «теряет» ацетильные группы под действием внутримолекулярного основного катализа. Таким образом, сравнительный анализ двух подходов указал на преимущество опережающего деацетилирования: дольше сохраняется в молекуле удобная УФ-детектируемая метка; промежуточные вещества более устойчивы и легче поддаются хроматографической очистке.

Для очистки продукта полного деблокирования (5) использовался силикагель с обращенной фазой. В ^1H -ЯМР спектре соединения (5) отсутствовали сигналы протонов ацетильных групп в области 2.0 - 2.2 м.д. и ароматического кольца при значениях химического сдвига 7.0 - 7.5 м.д., а также наблюдался сдвиг

сигналов протонов NCH_2 -группы в область сильного поля.

Завершающей стадией явилась отработка реакции кватернизации, которая обычно проводится в полярных растворителях (метанол, метилэтилкетон и др.) без или в присутствии или отсутствии нуклеофильных промоторов. Исходя из растворимости вторичного амина (5), нами был опробован также ДМСО. Однако, этот выбор оказался неудачным, так как при нагревании реакционная масса осмолялась,

а накопления целевого продукта не наблюдалось. В случае метилэтилкетона в качестве нуклеофильных агентов были использованы пространственно затрудненный третичный амин - диизопропилэтиламин, карбонаты калия и цезия. Наилучшие результаты были получены при использовании карбоната цезия. Реакция проводилась в метилэтилкетоне при кипении в течение 4 ч. Структура целевого катионного липида (6) была подтверждена данными масс- и ^1H -ЯМР-спектров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы перегнанные растворители, реагенты отечественного (Химмед, Реахим, Экрос) и зарубежного (Merck) производства.

Хроматографическое выделение и очистка веществ проводилась на силикагеле Kieselgel 60 (40-63 мкм, Merck) и LiChroprep[®] RP-18 (Merck).

ТСХ проводили на силуфоле (Чехия), Сорбфиле (Россия), Kieselgel 60 F₂₅₄ и HPTLC RP-18 F_{254s} (Merck). Вещества обнаруживали с помощью реактива Драгендорфа, раствора фосформолибденовой кислоты с последующим прогреванием и с помощью УФ-лампы. ^1H -ЯМР (δ , м.д.) регистрировали на импульсном Фурье-спектрометре «Bruker MSL-400» (400 МГц) в дейтерохлороформе и дейтерометаноле.

Для ТСХ применяли следующие системы:

- Бензол: этилацетат (2.5: 1) (А)
- Петролейный эфир: этилацетат (2.2:1) (Б)
- Хлороформ: метанол (20:1) (В)
- Толуол: ацетон : вода (2:10:1.5) (Г)
- Толуол: ацетон (1:3) (Д)

6-*N*-(2-Нитрофенилсульфонил)аминогексанол (1). К смеси 1.17 г (10.0 ммоль) 6-аминогексанола, 3.5 мл безв. триэтиламина и молекулярных сит 4\AA в 20 мл безв. дихлорметана и при интенсивном перемешивании и 0°C (лед) добавили 2.65 г (12.0 ммоль) 2-нитрофенилсульфонилхлорида. Реакционную массу перемешивали 40 ч при $19 - 20^\circ\text{C}$, фильтровали через Celite 545, растворитель удаляли в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью хлороформ : метанол, 100:1. Выход 2.41 г (80%), Т.пл. $77-78^\circ\text{C}$, R_f 0.38 (В). ^1H -ЯМР спектр: 1.31 - 1.80 (м, 8 H, $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}$), 3.05 - 3.19 (м, 2 H, CH_2NH), 3.6 (т, 2 H, $J = 6.4$, HOCH_2), 5.21-5.39 (м, 1 H, NH), 7.67-7.82 (м, 2 H), 7.84-7.96 (м, 1 H), 8.05-8.21 (м, 1 H, аром. протоны).

6-[*N*-(2-Нитрофенилсульфонил)-*N*-тетрадецил]аминогексанол (2). К смеси 0.5 г (1.66 ммоль) соединения (1) и 0.57 г (4.12 ммоль) карбоната калия в 10 мл безв. ДМФА при 60°C и интенсивном перемешивании прикапывали 0.91 мл (3.06 ммоль) тетрадецилбромид. Через 2.5 ч реакционную массу разбавили 30 мл воды, экстрагировали дихлорметаном (3*20 мл). Органический слой промывали водой (20 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали на ротормном испарителе. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир : этилацетат, 5:1. Выход 0.72 г (87%), R_f 0.61 (Б). ^1H -ЯМР спектр: 0.86 (т, 3 H, $J = 6.8$, $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$), 1.19-1.45 (м, 26 H, $(\text{CH}_2)_2$, $(\text{CH}_2)_{11}$), 1.47-1.62 (м, 6 H, OCH_2CH_2 , 2 NCH_2CH_2), 3.20-3.35 (м, 4 H, CH_2NCH_2), 3.62 (т, 2 H, $J = 6.5$, HOCH_2), 7.58-7.65 (м, 3 H), 7.95-8.05 (м, 1 H, аром. протоны).

{6-[*N*-(2-Нитрофенилсульфонил)-*N*-тетрадецил]аминогексил}-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозид (3). Смесь 0.34 г (0.7 ммоль) соединения (2) и 0.6 г (3.5 ммоль) прокаленного карбоната кадмия поместили в 30 мл безв. толуола и нагревали до кипения в аппарате Сокслета. После 2-3-х кратного обращения паров (через прокаленный гранулированный силикагель) равными порциями прикапывали раствор 1.41 г (3.42

ммоль) ацетобромглюкозы в 15 мл безв. толуола в течение 30 мин. Через 4.5 ч реакционную массу фильтровали, упаривали на роторном испарителе. Остаток хроматографировали на колонке, элюируя смесью петролейный эфир - этилацетат, 5:1 с постепенным увеличением полярности до 3.5:1. Выход 0.27 г (45%), $[\alpha]_D^{20} -7$ (с 1, CHCl_3), R_f 0,55 (А). ^1H -ЯМР спектр: 0.85 (т, 3 H, $J = 6.7$, $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$), 1.16-1.28 (м, 26 H, $(\text{CH}_2)_{11}$, $(\text{CH}_2)_2$), 1.42-1.53 (м, 6 H, OCH_2CH_2 , 2 NCH_2CH_2), 1.98 (с, 3 H), 2.00 (с, 3 H), 2.02 (с, 3 H), 2.07 (с, 3 H, 4 OCOCH_3), 3.16-3.29 (м, 4 H, CH_2NCH_2), 3.43 (дт, 1 H, $J = 6.7$, 9.8, OCHH_a), 3.66 (ддд, 1 H, $J = 2.7$, 4.9, 9.3, H-5 Glc), 3.81 (дт, 1 H, $J = 6.2$, 9.8, OCHH_b), 4.10 (дд, 1 H, $J = 2.7$, 12.4, H_a -6 Glc), 4.25 (дд, 1 H, $J = 4.9$, 12.4, H_b -6 Glc), 4.46 (д, 1 H, $J = 8.0$, H-1 Glc), 4.95 (дд, 1 H, $J = 8.0$, 9.3, H-2 Glc), 5.06 (т, 1 H, $J = 9.3$, H-3 Glc), 5.18 (т, 1 H, $J = 9.3$, H-4 Glc), 7.55 - 7.70 (м, 3 H), 7.95-8.05 (м, 1 H, аром. протоны).

6-[N-(2-Нитрофенилсульфонил)-N-тетрадецил]аминогексил- β -D-глюкопиранозид (4). К раствору 0.47 г (0.57 ммоль) соединения (3) в 4 мл метанола, добавили 1 мл 1 N раствора метилата натрия в метаноле. Через 0.5 ч реакционную массу нейтрализовали катионообменной смолой *Amberlit IR-120*, фильтровали и упаривали на роторном испарителе. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя смесью толуол - ацетон, 1:1. Выход 0.24 г (63.6%). $[\alpha]_D^{20} -1.3$ (с 1, CHCl_3), R_f 0.5 (Д). ^1H -ЯМР спектр: 0.85 (т, 3 H, $J = 6.7$, $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$), 1.16-1.38 (м, 26 H, $(\text{CH}_2)_{11}$, $(\text{CH}_2)_2$), 1.42-1.52 (м, 6 H, OCH_2CH_2 , 2 NCH_2CH_2), 3.20-3.40 (м, 9 H, CH_2NCH_2 , H-2, 3, 4, 5 Glc, OCHH_a), 3.47-3.75 (м, 3 H, H_{ab} -6 Glc, OCHH_b), 4.30 (д, 1 H, $J = 7.4$, H-1 Glc), 7.55-7.70 (м, 3 H), 7.95-8.05 (м, 1 H, аром. протоны).

6-N-Тетрадециламиногексил- β -D-глюкопиранозид (5). К раствору 0.2 г (0.3 ммоль) соединения (4) в 10 мл безводн. ДМФА добавили 0.33 мл (3.2 ммоль) тиофенола и при перемешивании и 19-20°C добавили 0.415 г (3.0 ммоль) карбоната калия. Через 2 ч реакционную массу фильтровали, упаривали на роторном испарителе. Остаток хроматографировали на колонке с обращенным силикагелем *Lichroprep*[®] RP-18, элюируя смесью метанол - аммиак, 5:1. Выход 0.08 г (58%), $[\alpha]_D^{20} -10.5$ (с 1, CHCl_3 - CH_3OH , 1:1), R_f 0.5 (Г). ^1H -ЯМР спектр: 0.85 (т, 3 H, $J = 6.7$, $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$), 1.08-1.31 (м, 26 H, $(\text{CH}_2)_{11}$, $(\text{CH}_2)_2$), 1.39-1.51 (м, 6 H, 2 NCH_2CH_2 , OCH_2CH_2), 2.42-2.55 (м, 4 H, CH_2NHCH_2), 3.12-3.16 (м, 2 H, H-2, 4 Glc), 3.29-3.32 (м, 2 H, H-3, 5 Glc), 3.41 (дт, 1 H, $J = 6.5$, 12.4, OCHH_a), 3.64 (дд, 1 H, $J = 4.4$, 12.1, H_a -6 Glc), 3.69 (дд, 1 H, $J = 2.5$, 12.1, H_b -6 Glc), 3.73-3.8 (м, 1 H, OCHH_b), 4.15 (д, 1 H, $J = 7.8$, H-1 Glc).

N, N-Диметил-N-тетрадецил-N-[6-(β -D-глюкопиранозил)гексил]аммониййодид (6). К раствору 0.010 г (0.02 ммоль) соединения (5) и 0.012 г (0.037 ммоль) карбоната цезия в 1.5 мл метилэтилкетона при перемешивании и температуре 70°C прикапывали 0.04 мл (6.4 ммоль) CH_3I . Через 4 ч реакционную массу фильтровали, упаривали на роторном испарителе, сушили на вакуумном насосе. Выход 0.013 г. (86%), $[\alpha]_D^{20} -3.7$ (с 1, CH_3OH), R_f 0.8 (Г). Масс-спектр, m/z : 504.4 $[\text{M}^+]$. ^1H -ЯМР спектр: 0.85 (т, 3 H, $J = 6.7$, $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$), 1.08-1.34 (м, 26 H, $(\text{CH}_2)_{11}$, $(\text{CH}_2)_2$), 1.46-1.52 (м, 2 H, OCH_2CH_2), 1.7-1.78 (м, 4 H, 2 NCH_2CH_2), 3.02-3.26 (м, 4 H, CH_2NCH_2), 3.31 (с, 6 H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.33-3.55 (м, 12 H, H-2, 3, 4, 5, 6 Glc, OCH_2CH_2 , 4 OH), 4.29 (д, 1 H, $J = 6.9$, H-1 Glc).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 04-03-32452а), а также гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых (МК-4570.2006.3).

ЛИТЕРАТУРА:

1. G.Y. Wu, C.H. Wu eds. Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands. Marcel Dekker Inc. – 1991.
2. T. Ren, G.S. Zhang, D. Liu. //Tetrahedron Lett. – 2001. – Vol. 42. – P. 1007-1015.
3. C. Jacopin, H. Hofland, D. Scherman, J. Herscovici. //Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2001 – V.11. – P. 419-422.
4. T. Nagasaki, T. Taniguchi, S. Tamagaki. //Bioconjugate. Chem. – 2003. – Vol.14. – P. 513-516.
5. А.М.Толкач, С.Г. Полоник, Н.И. Уварова. А.С. 1428755 СССР//Б.И. 1988, №37.