

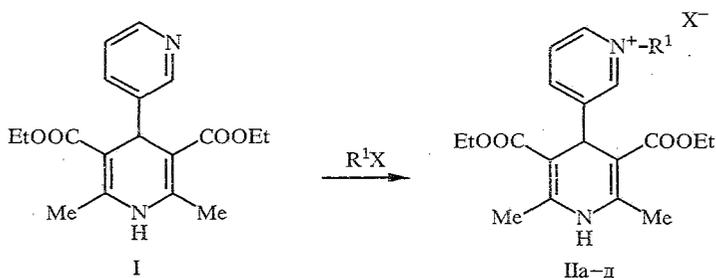
Н. В. Макарова, Ж. В. Коронова, А. В. Плотнище,  
Д. Я. Тирзите, Г. Д. Тирзит, Г. Я. Дубурс

**СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНА,  
ИМЕЮЩИХ В ПОЛОЖЕНИИ 4 N-АЛКИЛПИРИДИНИЕВЫЙ  
ЗАМЕСТИТЕЛЬ, И ИХ СРОДСТВО К ЛИПОСОМАЛЬНЫМ  
МЕМБРАНАМ**

Синтезированы два ряда производных 1,4-дигидропиридина, имеющих в положении 4 N-алкилпиридиниевый заместитель с различной длиной углеводородной цепи, и изучено их сродство к модельным мембранам (липосомам). Показано, что удлинение углеводородной цепи, локализованной у атома азота 4-пиридил-заместителя 1,4-дигидропиридинового кольца, повышает сродство соединений к модельным мембранам. Однако удлинение углеводородной цепи в 3,5-сложноэфирных группах 1,4-дигидропиридинового кольца при наличии N-гексадецилпиридиниевого заместителя в положении 4 приводит к уменьшению связывания соединений с липосомами.

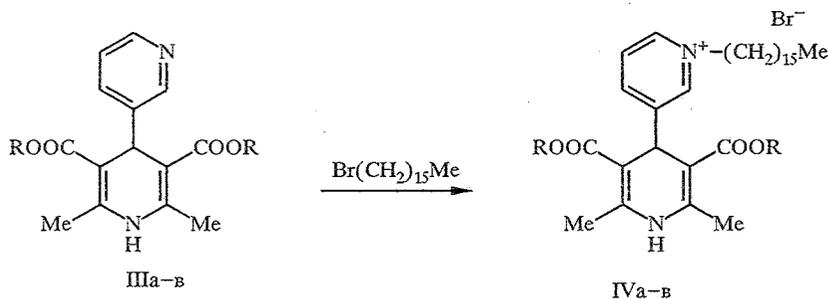
Среди широкого спектра новых фармакологически активных соединений большое внимание привлекает группа производных 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) [1—4]. Физиологическая активность соединений во многом зависит от их локализации в клетке или в клеточной мембране [5], поэтому изучение связывания соединения с мембранами позволяет определить особенности его фармакологической активности. Показано, что алкиловые и циклоалкиловые эфиры производных 4-(2-дифторметоксифенил)-1,4-ДГП, обладающие выраженным сродством к липосомальным мембранам, проявляют гипотензивную активность [6]. Известно, что антагонист кальциевых каналов — амлодипин хорошо связывается с модельными мембранами [5], однако другие производные 1,4-ДГП, имеющие положительный заряд в молекуле, систематически не изучены. Приводятся только отдельные данные [7] о сродстве к кальциевым каналам соединений 1,4-ДГП ряда, имеющих в 3,5-эфирных группах углеводородные цепи различной длины и содержащие у концевго атома углерода этих цепей кватернизированный атом азота. В этой работе показано, что как длина алкильной цепи, так и наличие положительного заряда могут определять сродство упомянутых соединений к мембранам.

С целью выяснения влияния длины углеводородной цепи в заместителях с различной локализацией на способность соединений, имеющих положительный заряд в молекуле, связываться с липосомальными мембранами были синтезированы два ряда производных 1,4-ДГП — IIa—д и IVa—в:



IIa R<sup>1</sup> = Me, X = I; б R<sup>1</sup> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, X = I; в R<sup>1</sup> = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, X = Br;

г R<sup>1</sup> = C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>, X = Br; д R<sup>1</sup> = C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>, X = Br



IVa R = Me, б R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, в R = C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>

Соединения IIa—д и IVa—в синтезировали из соответствующих 4-(3-пиридил)производных 1,4-ДГП — I и IIIa—в — при кипячении исходных соединений с соответствующим алкилгалогенидом в растворе ацетона. При этом для ряда соединений IIa—в наблюдалось увеличение времени реакции с удлинением углеводородной цепи алкилгалогенида.

О сродстве 1,4-ДГП к липосомальным мембранам судили по интенсивности тушения флуоресценции антрацена. Неполарный зонд антрацен взаимодействует с мембраной в области сложноэфирных связей жирных кислот с глицерином, т. е. вблизи границы гидрофобной и полярной частей глицерофосфолипидов. Согласно литературным данным [8—10], именно в этом месте локализуются соединения 1,4-дигидропиридинового ряда. Механизм тушения флуоресценции характеризуется наличием связи между тушением и концентрацией связанного с мембранами соединения (тушителя) [11]:

$$(F_0 - F) / F = K_q \cdot r / N, \quad (1)$$

где  $F_0$  и  $F$  — интенсивность флуоресценции зонда в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно;  $K_q$  — эффективная константа тушения;  $r$  — концентрация связанного с мембранами тушителя;  $N$  — число мест его связывания в мембране.

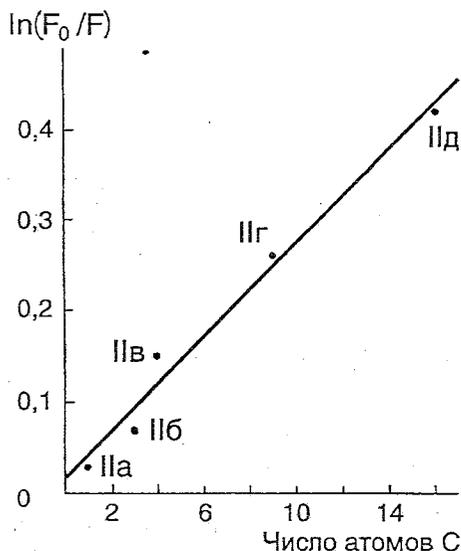
Если соединение поглощает свет в области флуоресценции связанного с мембранами зонда, флуоресценция последнего может быть потушена в результате безызлучательного (индуктивно-резонансного или синглет-синглетного) переноса энергии (в молекуле донора происходит переход  $S_1 \rightarrow S_0$ , а в молекуле акцептора  $S_0 \rightarrow S_1$ ). Процесс безызлучательного переноса упрощенно описывается диполь-дипольным взаимодействием между донором и акцептором [12].

Метод оценки сродства веществ к мембранам состоит в следующем: к липосомам, содержащим флуоресцентный зонд антрацен, добавляют производное 1,4-ДГП и измеряют интенсивность флуоресценции антрацена в отсутствие ( $F_0$ ) и присутствии ( $F$ ) тушителя. Мерой сродства 1,4-ДГП к

Таблица 1

Влияние алкильного заместителя (R) в положениях 3 и 5 1,4-дигидропиридинового кольца на сродство соединений к липосомальным мембранам

Соединение	R	$\ln (F_0/F)$	Соединение	R	$\ln (F_0/F)$
IVa	CH <sub>3</sub>	0,37	IVб	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,30
IIд	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,42	IVв	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	0,10



Связывание соединений IIa—д с липосомальными мембранами

мембранам в этом случае может служить величина  $\ln(F_0/F)$ , пропорциональная концентрации связанного с мембранами тушителя ( $r$ ) [16],

$$r \sim A \cdot \ln(F_0/F) \quad (2).$$

В качестве модели мембран были выбраны липосомы из яичного фосфатидилхолина.

Перенос энергии с молекулы донора на молекулу акцептора возможен при условии, когда максимум абсорбции акцептора приходится на максимум флуоресценции донора. При этом, чтобы сравнение  $\ln(F_0/F)$  разных веществ было корректным, необходимо сходство их спектров абсорбции между собой и максимальное перекрывание спектров исследуемых соединений со спектром флуоресценции антрацена.

Таблица 2

Характеристики синтезированных соединений

Соединение	$T_{пл}, ^\circ C$	УФ спектр (в этаноле), $\lambda_{max}, nm$ (lg $\epsilon$ ).	Брутто-формула	Найлено, % Вычислено, %			Выход, %
				C	H	N	
IIa	195...196	228 (4,44), 269 (3,87), 360 (3,62)	$C_{19}H_{25}N_2O_4I$	<u>48.1</u> 48,3	<u>5.2</u> 5,3	<u>5.8</u> 5,9	90
IIб	201...203	230 (4,48), 268 (3,91), 360 (3,69)	$C_{21}H_{29}N_2O_4I$	<u>50.2</u> 50,4	<u>5.8</u> 5,8	<u>5.8</u> 6,0	76
IIв	243...245	233 (4,39), 269 (3,88), 362 (3,66)	$C_{22}H_{31}N_2O_4Br$	<u>56.5</u> 56,6	<u>6.7</u> 6,7	<u>6.0</u> 5,8	60
IIг	142...143	232 (4,38), 268 (3,89), 364 (3,67)	$C_{27}H_{41}N_2O_4Br$	<u>60.1</u> 60,3	<u>7.6</u> 7,7	<u>5.0</u> 5,2	88
IIд	135...136	233 (4,42), 269 (3,90), 362 (3,68)	$C_{34}H_{55}N_2O_4Br$	<u>64.0</u> 64,2	<u>8.7</u> 8,7	<u>4.2</u> 4,4	63
IVa	171...173	231 (4,42), 266 (3,89), 363 (3,67)	$C_{32}H_{51}N_2O_4Br$	<u>63.1</u> 63,3	<u>8.6</u> 8,5	<u>4.5</u> 4,6	75
IVб	125...127	232 (4,41), 268 (3,89), 360 (3,67)	$C_{38}H_{63}N_2O_4Br$	<u>65.8</u> 66,1	<u>9.5</u> 9,2	<u>3.9</u> 4,1	53
IVв	133...135	233 (4,46), 268 (3,95), 362 (3,75)	$C_{58}H_{103}N_2O_4Br$	<u>71.3</u> 71,6	<u>10.6</u> 10,7	<u>2.6</u> 2,9	89

## Спектры ПМР соединений Па—г

Соединение	Химические сдвиги, $\delta$ (м. д.), и константы спин-спинового взаимодействия, $J$ (Гц)								
	4-Рy				N-H, ш. с	4-H, с	2,6-CH <sub>3</sub> , с	3,5-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N-R <sup>1</sup>
	6-H, д, $J_{65} = 6$	2-H, с	4-H, д, $J_{45} = 8$	5-H, д, д, $J_{54} = 8,$ $J_{56} = 6$					
Па	8,99	8,74	8,39	7,83	7,55	5,10	2,55	4,13 (кв, $J = 7$ ), 1,30 (т, $J = 7$ )	4,68 (с)
Пб	9,27	8,59	8,35	7,94	7,96	5,06	2,52	4,05 (кв, $J = 7$ ), 1,20 (т, $J = 7$ )	4,76 (т, $J = 7$ ), 2,25...1,88 (м), 1,02 (т, $J = 7$ )
Пв	9,35	8,80	8,58	8,32	7,89	5,09	2,53	4,06 (кв, $J = 7$ ), 1,21 (т, $J = 7$ )	4,80 (т, $J = 7$ ), 2,10...1,18 (м), 0,97 (т, $J = 7$ )
Пг	9,00	8,36	8,33	7,90	8,33	5,09	2,50	4,07 (кв, $J = 7$ ), 1,99 (т, $J = 7$ )	4,72 (т, $J = 7$ ), 1,99...1,13 (м), 0,87 (т, $J = 7$ )

Таблица 4

## Спектры ПМР соединений Пд, IVa—в

Соединение	Химические сдвиги, $\delta$ (м. д.), и константы спин-спинового взаимодействия, $J$ (Гц)										
	4-Рy				N-H, ш. с	4-H, с	N-C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>			2,6-CH <sub>3</sub> , с	R
	6-H, д, $J_{65} = 6$	2-H, с	4-H, д, $J_{45} = 8$	5-H, д, д, $J_{54} = 8,$ $J_{56} = 6$			N-CH <sub>2</sub> , т, $J = 7$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> , м	CH <sub>3</sub> , т, $J = 7$		
IVa	9,22	8,89	8,30	7,88	8,52	5,06	4,77	2,14...1,25	0,87	2,54	3,62 (6H, с)
Пд	9,26	8,72	8,33	7,90	8,69	5,06	4,75	2,00...1,21	0,86	2,52	4,05 (4H, кв, $J = 7$ ), 1,22 (6H, т)
IVб	9,25	8,77	8,34	7,90	8,63	5,08	4,75	1,99...1,20	0,82	2,50	4,00 (4H, т, $J = 7$ ), 2,0...1,2 (14H, м)
Пв	9,15	8,66	8,32	7,87	8,61	5,05	4,75	2,0...1,05	0,87	2,51	3,99 (4H, т, $J = 7$ ), 2,0...1,05 (48H, м), 0,87 (6H, т, $J = 7$ )

Все изученные соединения имеют максимум длинноволнового поглощения в районе 360...364 нм (табл. 2), поэтому полученные результаты сравнимы между собой. Зависимость сродства соединений к липидным мембранам от структуры заместителя в молекуле 1,4-ДГП показана в табл. 1 и на рис. 1.

С увеличением алкильной цепи у кватернизированного азота пиридила, являющегося заместителем в положении 4 1,4-ДГП кольца, сродство соединений к липосомальным мембранам возрастало (см. рис. 1). Так, соединение Пд обладает наибольшим сродством к липосомам. Принимая это во внимание и сохраняя неизменным заместитель в положении 4, мы увеличивали длину углеводородных цепей в положении 3 и 5 1,4-ДГП кольца. Однако в результате удлинения алкильной цепи по этим положениям (соединения IVб, IVв) связь с липосомами (см. табл. 1) уменьшалась.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ПМР записаны на спектрометре Bruker WH-90/DS (90 МГц) в CDCl<sub>3</sub> с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. УФ спектры сняты на спектрофотометре Hitachi 557 UV-vis. Основные характеристики полученных соединений приведены в таблицах 2—4.

Метод определения сродства 1,4-ДГП к модельным фосфолипидным мембранам описан в [6]. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi 850. Ошибка метода не превышает 5%.

Йодид 1-метил-3-(2',6'-диметил-3',5'-диэтоксикарбонил-1',4'-дигидропиридил-4')пиридиния (IIIa). Растворяют при нагревании 1 г (0,003 моль) 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-4-(3-пиридил)-1,4-дигидропиридина (I) в 20 мл ацетона и добавляют 1,3 мл (2,2 г, 0,015 моль) йодистого метила (в два-три приема с интервалом в 20 мин). Реакционную смесь кипятят в течение 1 ч. После охлаждения отфильтровывают выпавший осадок и перекристаллизовывают из ацетона. Получают 1,3 г желтого кристаллического вещества.

Йодид 1-пропил-3-(2',6'-диметил-3',5'-диэтоксикарбонил-1',4'-дигидропиридил-4')пиридиния (IIIб). Растворяют при нагревании 1 г (0,003 моль) 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-4-(3-пиридил)-1,4-дигидропиридина (I) в 20 мл ацетона и добавляют 1,47 мл (2,6 г, 0,015 моль) йодистого пропила. Реакционную смесь кипятят 8 ч. После охлаждения отфильтровывают выпавший осадок и перекристаллизовывают из ацетона. Получают 1,2 г желтого кристаллического вещества.

Бромиды 1-бутил- или 1-нонил-3-(2',6'-диметил-3',5'-диэтоксикарбонил-1',4'-дигидропиридил-4')пиридиния (IIIв, IIIг). Растворяют 1 г (0,003 моль) 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-4-(3-пиридил)-1,4-дигидропиридина (I) в 50 мл ацетона, добавляют 0,045 моль бромистого бутила или бромистого нонила. Реакционную смесь кипятят в течение 40...48 ч. После охлаждения отфильтровывают выпавший осадок и перекристаллизовывают из ацетона. Получают 0,9 г соединения IIIв и 1,4 г соединения IIIг.

Бромиды 1-гексадецил-3-(2',6'-диметил-3',5'-диалкоксикарбонил-1',4'-дигидропиридил-4')пиридиния (IVа—в, Пд). Растворяют при нагревании 0,003 моль соответствующего эфира 2,6-диметил-4-(3-пиридил)-1,4-дигидропиридин-3,5-дикарбоновой кислоты (IIIа—в) в 10...20 мл ацетона или смеси ацетона с хлороформом (1 : 1), добавляют 1,8 мл (1,8 г, 0,006 моль) гексадецилбромида и кипятят реакционную смесь в течение 45...50 ч. После охлаждения до -15 °С отфильтровывают выпавший осадок и промывают на фильтре горячим гексаном. Продукт перекристаллизовывают из ацетона. Получают 1,2 г соединения Пд, 1,5 г соединения IVа, 1,0 г соединения IVб и 1,3 г соединения IVв.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Triggle D. J. // J. Cardiovascular Pharmacol. — 1991. — Vol. 18. — P. S1.
2. Kine K., Sano T. // Cancer Res. — 1990. — Vol. 50. — P. 310.
3. Ivanov E., Ponomarev T., Merkusev G., Dubur G., Bisenieks E., Dauvarte A., Pilscik E. // Radiobiol. Radiother. — 1990. — Vol. 31. — P. 69.

4. *Poikans J., Tirzitis G., Bisenieks E., Uldriks J., Gurevich V., Mikhailova I., Duburs G.* // *Eur. J. Med. Chem.* — 1994. — Vol. 29. — P. 325.
5. *Mason R. P.* // *Biochem. Pharmacol.* — 1993. — Vol. 45. — P. 2173.
6. *Макарова Н. В., Белевич Г. В., Бисениекс Э. А., Веверис М. М., Дубур Г. Я.* // *Хим.-фарм. журн.* — 1988. — № 7. — С. 810.
7. *Baindur N., Rutledge A., Triggle D.* // *J. Med. Chem.* — 1993. — Vol. 36. — P. 3743.
8. *Mason R. P., Gonye G. E., Chester D. W., Herbette L. G.* // *Biophys. J.* — 1989. — Vol. 55. — P. 769.
9. *Mason R. P., Rhodes D. G., Herbette L. G.* // *J. Med. Chem.* — 1991. — Vol. 34. — P. 869.
10. *Bauerle H. D., Seelig J.* // *Biochemistry.* — 1991. — Vol. 30. — P. 7203.
11. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.* — М.: Наука, 1980. — 320 с.
12. *Лакович Дж.* *Основы флуоресцентной спектроскопии.* — М.: Мир, 1986. — 496 с.

*Латвийский институт органического  
синтеза, Рига LV-1006*

*Поступило в редакцию 06.06.95*