

Н. Е. Щепина*, В. В. Аврорин^а, Г. А. Бадун^б, В. М. Федосеев^б,
С. Б. Льюис^в

**НОВЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА ТРУДНОДОСТУПНЫХ
СТЕРИЧЕСКИ ЗАТРУДНЁННЫХ ПИРИДИНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ,
МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ**

При изучении ион-молекулярных реакций свободных нуклеогенных фенил-катионов, генерируемых при β -распаде трития в составе меченого бензола, с полиметилзамещенными пиридинами обнаружено протекание реакции прямого фенилирования атома азота в пиридинах. Результатом реакции электрофильного присоединения является одностадийный синтез неизвестных биологически активных N-фенильных 2,6-лутидиниевых и 2,4,6-коллидиниевых солей, меченых тритием. Показано, что при реакции прямого фенилирования азота основную роль играют стерические факторы, существенно снижающие выход в случае *сим*-кол- лидина.

Ключевые слова: нуклеогенные фенил-катионы, соли N-фенил-2,6-лутидиния и 2,4,6-коллидиния, тритий, реакция прямого фенилирования пиридинового атома азота.

Открытие генной терапии создаёт новые и удивительные перспективы для медицины, позволяя осуществлять революционный подход к лечению болезней на уровне, когда они только зарождаются, а именно на клеточном уровне. Когда клеточный механизм ослаблен вследствие наличия дефектного гена, функциональный ген, включённый в соответствующий вектор, может быть доставлен прямо в поражённую клетку, ткань или орган. После интернализации ДНК переносится в ядро, где соединяется с геномом "хозяина", считывает генетический код и в финале преобразовывается в белок, необходимый для устранения клеточного дисбаланса [1–5]. Несмотря на видимую простоту, успех этой новой формы терапии во многом зависит от разработки эффективных процессов транспортировки. Вирусные переносчики являются в настоящее время наиболее эффективной системой для передачи и трансфекции инородной ДНК в живую клетку. Однако такие переносчики имеют, к сожалению, существенные побочные эффекты, такие как иммуногенность, ограниченный размер ДНК, который может быть введён в вирус, мутагенность, трудность в практическом получении и сохранении, а также в некоторых случаях и высокую токсичность [6]. Более безопасной альтернативой вирусной транспортировке является использование катионных липидов [7–9], и среди них особое место занимают пиридиниевые катионные липиды, обладающие низкой цитотоксичностью [10–13]. Исследования показали, что эффективность доставки в этом случае напрямую связана с возможностью перераспределения положительного заряда катионной

головки, что достигается при делокализации заряда внутри гетероциклического кольца. Причём наибольшую перспективность проявили метилзамещённые пиридиновые производные, а именно 2,4,6-триметилпиридиновые соли, а также их 2,4,6-трифенилпиридиновые аналоги, используемые в качестве эффективных мембранных маркеров [14, 15]. Ранее также было показано, что наличие электронодонорных метильных групп в гетероциклическом кольце пиридиновых производных существенно усиливает их антибактериальные свойства [16]. При сравнении N-алкильных и N-арильных пиридиновых солей было обнаружено, что наибольшей ароматичностью, а, следовательно, более эффективной генной доставкой обладают именно N-фенильные пиридиновые соли [17–19].

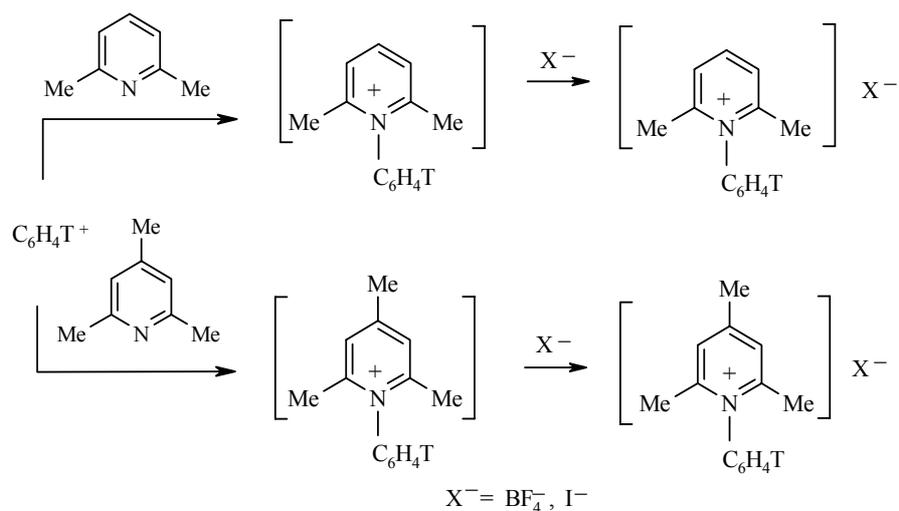
Однако синтез N-фенилзамещённых солей пиридиния представляет существенные синтетические трудности, поскольку реакция прямого фенилирования атома азота в пиридине не осуществима [20, 21]. Единственной удобной реакцией получения N-фенильных пиридиновых солей является взаимодействие соответствующих пириллиевых производных с ароматическими аминами, в данном случае с анилином [22, 23]. Необходимо отметить, что данная реакция осуществима только в случае производных коллидина [24]. Для дизамещённых пиридинов данная реакция возможна лишь при наличии фенильных заместителей в гетероциклическом кольце [25]. Изучение биологических процессов и механизмов генной терапии требует наличия тонких инструментов исследования, и с этой точки зрения метод меченых атомов является крайне перспективным [26–30]. Ранее нами была показана возможность осуществления реакции прямого фенилирования атома азота в пиридине и метилпиридинах (пиколинах) с помощью нуклеогенных фенил-катионов [31, 32].

Целью данной работы являются изучение реакции прямого фенилирования атома азота в полиметилзамещённых пиридинах – 2,6-диметил- и 2,4,6-триметилпиридинах – и разработка простого способа получения неизвестных и труднодоступных N-фенильных солей 2,6-лутидиния и 2,4,6-коллидиния, меченных тритием, для биологических и медицинских исследований.

Свободные меченные тритием фенил-катионы были генерированы при самопроизвольном β^- -распаде трития в составе двукратно меченного тритием бензола по схеме:



При взаимодействии нуклеогенных фенил-катионов с неподелённой электронной парой атома азота образуются четвертичные пиридиновые катионы, стабилизация которых соответствующим анионом приводит к получению N-фенильных лутидиновых и коллидининовых солей, меченных тритием:



Выходы полученных борофторидов представлены в таблице. Для сравнения в таблице также даны выходы ониевых солей в случае незамещённого и метилзамещённых пиридинов.

Из данных таблицы видно, что экранирование пиридинового атома азота метильными заместителями приводит к понижению радиохимического выхода четвертичных солей. Лёгкость электрофильной атаки по атому азота преимущественно зависит от двух основных факторов: нуклеофильности атома азота и степени стерических затруднений. Известно, что основность (значение pK_a) несколько увеличивается при переходе от пиридина к пиколинам и далее лутидину и коллидину [33–36], это в свою очередь могло бы приводить к увеличению выходов продуктов фенилирования атома азота. Но одновременно с этим, электронодонорные метильные заместители в молекуле пиридина стабилизируют азаареновые ионы и тем самым облегчают конкурентную реакцию электрофильного замещения в гетероциклическое кольцо [37–42].

При реакции присоединения свободных фенил-катионов к атому азота, вероятно, основную роль играют стерические факторы, что видно из сравнения выходов N-фенилпиридиния и пиколиниев, а далее лутидиниев и коллидиниев (см. таблицу). Самые низкие выходы четвертичного ониевого производного наблюдаются в случае 2,4,6-коллидина, где пространственные препятствия метильных групп 2- и 6- CH_3 сказываются наиболее сильно.

Выходы четвертичных пиридиниевых производных

| Ониевая соль | Выход, % |
|---|----------|
| Борофторид N-фенил-2,6-диметилпиридиния (2,6-лутидиния) | 29±2 |
| Борофторид N-фенил-2,4,6-триметилпиридиния (2,4,6-коллидиния) | 20±1 |
| Борофторид N-фенил-2-метилпиридиния (2-пиколиния) [32] | 35±3 |
| Борофторид N-фенил-3-метилпиридиния (3-пиколиния) [32] | 36±2 |
| Борофторид N-фенил-4-метилпиридиния (4-пиколиния) [32] | 25±2 |
| Борофторид N-фенилпиридиния [31] | 62±4 |

A, расп/мин

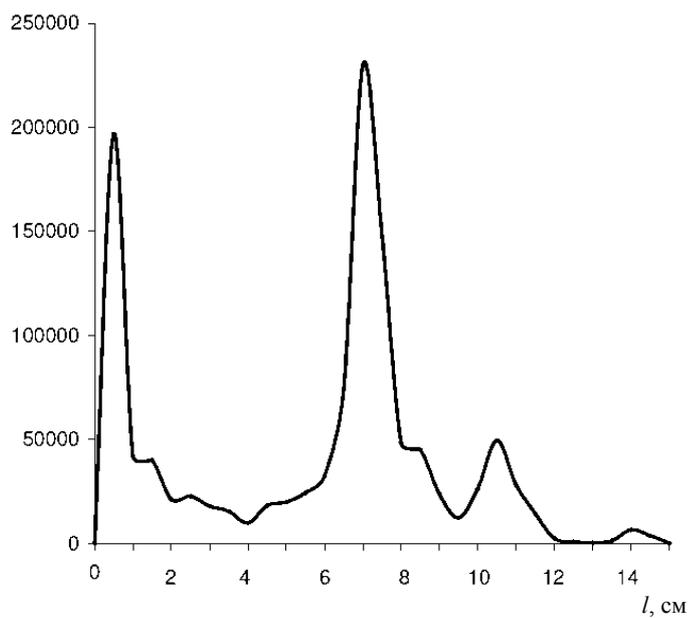


Рис. 1. Распределение радиоактивности на пластинке при хроматографическом анализе меченых продуктов, образующихся в радиохимическом синтезе в системе 2,4-лутидин/ $C_6H_4T_2/KI$

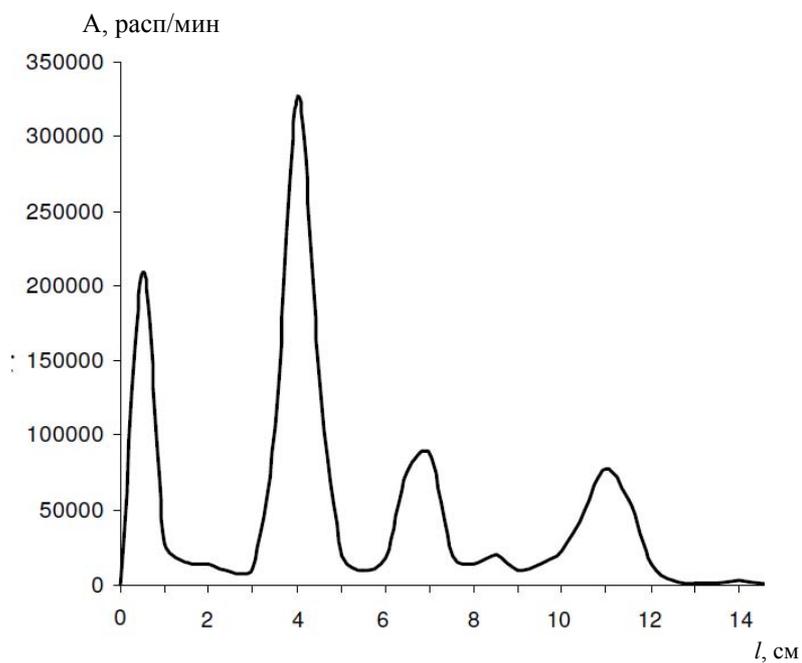


Рис. 2. Распределение радиоактивности на пластинке при хроматографическом анализе меченых продуктов, образующихся в радиохимическом синтезе в системе 2,4,6-коллидин/ $C_6H_4T_2/KBF_4$

Таким образом, в результате изучения ион-молекулярных реакций

нуклеогенных фенил-катионов с полиметилзамещёнными пиридинами обнаружена реакция прямого фенилирования атома азота. В результате реакции осуществлён одностадийный синтез неизвестных ранее N-фенильных 2,6-лутидиниевых и 2,4,6-коллидиниевых солей, меченных тритием, которые являются важными объектами для детального изучения механизмов антибактериального действия и процессов транспортировки в генной терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве субстратов при ядерно-химическом синтезе использованы коммерчески доступные 2,6-лутидин и 2,4,6-коллидин. Неактивный иодид N-фенил-4,6-дифенил-2-пикколиния, выбранный в качестве свидетеля и носителя, синтезирован по известным в литературе методикам [22–25] из соответствующих пириллиевых солей, т. пл. 243–244 °С (т. пл. 243–245 °С [43]).

Двухкратно меченный тритием бензол. Источник нуклеогенных фенил-катионов – двухкратно тритированный бензол – получают из *n*-дибромбензола и газообразного трития в результате реакции каталитического замещения галогена на тритий [32]. Объёмная удельная активность полученного раствора в гексане составляет 4 кюри/см³, массовая концентрация бензола в растворе $7.1 \cdot 10^{-2}$ ммоль/см³, удельная активность 56.3 Ки/ммоль, что соответствует кратности метки практически равной 2, химическая чистота полученного бензола не менее 99%.

Ядерно-химический синтез (общая схема). Ион-молекулярные реакции осуществляют в запаянных ампулах, содержащих тритированный бензол (источник фенил-катионов) и субстраты – 2,6-диметилпиридин и 2,4,6-триметилпиридин в мольном соотношении ~1:1000 (1 мкл гексанового раствора C₆H₄T₂ и 6.4 мкл 2,6-лутидина или 7.3 мкл 2,4,6-коллидина), которые наносят на кристаллы стабилизирующей соли (тетрафторбората калия или иодида калия). Ампулы с реакционной смесью выдерживают для накопления продуктов реакции в количествах, достаточных для их надёжного определения (не менее 1 мес), непрореагировавший бензол отгоняют, а затем проводят хроматографическое выделение и идентификацию методом препаративной хроматографии (хроматография на стеклянных пластинках Reverse Phase C18 silica gel, Fluorescent Indicator, ацетонитрил) синтезированных N-фенилзамещённых лутидиниевых и коллидиниевых производных, меченных тритием. Участки адсорбционного слоя хроматограммы по 0.5 см длиной счищают в диоксанный сцинтиллятор, и проводят измерение их радиоактивности с помощью жидкостного сцинтилляционного счётчика Rack-beta (США).

Типичные радиохроматограммы приведены на рис. 1 и 2.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант 07-03-00881.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gene Therapy. Therapeutic Mechanisms and Strategies*; N. S. Templeton, D. D. Lasic (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2000.
2. N. R. Lemoine, D. N. Cooper, in: *Human Molecular Genetics*, D. N. Cooper, S. E. Humphries, T. Strachan (Eds.); BIOS Sci. Publ., Oxford, UK, 1996.

3. K. R. Smith, *Arch. Med. Res.*, **34**, 247 (2003).
4. K. R. Smith, *J. Biotechnol.*, **99**, 1 (2002).
5. T. Friedmann, *Nat. Med.*, **2**, 144 (1996).
6. A. Mountain, *Trends Biotechnol.*, **18**, 119 (2000).
7. X. Guo, F. C. Szoka, *Acc. Chem. Res.*, **36**, 335 (2003).
8. M. A. Ilies, W. A. Seitz, A. T. Balaban, *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 2441 (2002).
9. M. A. Ilies, A. T. Balaban, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **11**, 1729 (2001).
10. I. Van der Woude, A. Wagenaar, A. A. Meekel, M. B. ter Beest, M. H. Ruiters, J. B. Engberts, D. Hoekstra, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **94**, 1160 (1997).
11. A. A. P. Meekel, A. Wagenaar, J. Smisterova, J. E. Kroeze, P. Haadsma, B. Bosgraaf, M. C. A. Stuart, A. Brisson, M. H. J. Ruiters, D. Hoekstra, J. B. F. N. Engberts, *Eur. J. Org. Chem.*, 665 (2000).
12. A. Roosjen, J. Smisterova, C. Driessen, J. T. Anders, A. Wagenaar, D. Hoekstra, R. Hulst, J. B. F. N. Engberts, *Eur. J. Org. Chem.*, 1271 (2002).
13. M. A. Ilies, W. A. Seitz, M. T. Caproiu, M. Wentz, R. E. Garfield, A. T. Balaban, *Eur. J. Org. Chem.*, 2645 (2003).
14. V. Menchise, G. De Simone, V. Alterio, A. Di Fiore, C. Pedone, A. Scozzafava, C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, **48**, 5721 (2005).
15. M. A. Ilies, B. H. Johnson, F. Makori, A. Miller, W. A. Seitz, E. B. Thompson, A. T. Balaban, *Arch. Biochem. Biophys.*, **435**, 217 (2005).
16. H. Kourai, H. Takechi, T. Horie, K. Takeichi, I. Shibasaki, *Bokin Bobai*, **13**, No. 6, 245 (1985).
17. A. T. Balaban, A. Dinculescu, J. Elguero, R. Faure, *Magn. Reson. Chem.*, **23**, 553 (1985).
18. S. R. Salman, A. H. Hassan, M. A. R. Khyat, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 2271 (1988).
19. A. T. Balaban, W. A. Seitz, A. C. Illies, E. B. Thompson, R. E. Garfield, B. H. Johnson, A. L. Miller, M. J. Wentz, US Pat. 2005196863; <http://www.freepatentsonline.com/7456197.pdf>
20. K. H. Pausacker, *Aust. J. Chem.*, **11**, 200 (1958).
21. F. Brody, P. R. Ruby, in: *Pyridine and Its Derivatives*, E. Klingsberg (Ed.), Intersci., New York, 1960, vol. 114, Pt. 1, p. 289.
22. K. Dimroth, *Angew. Chem.*, **72**, 331 (1960).
23. C. Toma, A. T. Balaban, *Tetrahedron, Suppl.*, **22**, No. 7, 9 (1966).
24. A. Camerman, L. H. Jensen, A. T. Balaban, *Acta Crystallogr.*, **B25**, 2623 (1969).
25. Э. А. Звездина, М. П. Жданова, И. И. Нечаюк, И. А. Барчан, Ю. Н. Симкина, Т. А. Бучная, *Хим.-фарм. журн.*, **20**, 1328 (1986).
26. B. W. Fox, *Int. J. Radiat. Biol.*, **13**, 504 (1968).
27. R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier Inc., 2004.
28. M. Saljoughian, *Synthesis*, **13**, 1781 (2002).
29. Г. В. Сидоров, Н. Ф. Мясоедов, *Успехи химии*, **13**, 398 (1999).
30. В. П. Шевченко, И. Ю. Нечаев, Н. Ф. Мясоедов, *Меченные тритием липофильные соединения*, Наука, Москва, 2003.
31. Н. Е. Щепина, В. Д. Нефедов, М. А. Торопова, В. В. Аврорин, Д. С. Гембицкий, *Радиохимия*, **41**, 523 (1999).
32. Н. Е. Щепина, В. В. Аврорин, Г. А. Бадун, В. М. Федосеев, С. Е. Уханов, С. Б. Льюис, *Радиохимия*, **49**, 551 (2007).
33. Дж. Джоуль, К. Милз, *Химия гетероциклических соединений*, под ред. М. А. Юровской, Мир, Москва, 2004, 728 с.
34. I-Jen Chen, A. D. MacKerell Jr., *Theor. Chem. Acc.*, **103**, 483 (2000).

35. M. Makowski, R. Sadowski, D. Augustin-Nowacka, L. Chmurzynski, *J. Phys.*

- Chem., A*, **105**, 6743 (2001).
36. A. Augustin-Nowacka, M. Makowski, L. Chmurzynski, *J. Chem. Thermodyn.*, **34**, 391 (2002).
37. A. R. Katritzky, C. D. Johnson, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **6**, 608 (1957).
38. A. R. Katritzky, B. J. Ridgewell, *J. Chem. Soc.*, 3753 (1963).
39. R. A. Abromovitch, J. G. Saha, *Adv. Heterocycl. Chem.*, **6**, 229 (1966).
40. C. D. Johnson, A. R. Katritzky, B. J. Ridgewell, M. Viney, *J. Chem. Soc. (B)*, 1204 (1967).
41. A. R. Katritzky, R. Taylor, *Adv. Heterocycl. Chem.*, **47**, 1 (1990).
42. A. R. Katritzky, W. O. Fan, *Heterocycles*, **34**, 2179 (1992).
43. L. G. S. Brooker, D. S. Daniel, R. C. Taber, US Pat. 3639127;
<http://www.freepatentsonline.com/3639127.pdf>

Естественнаучный институт
Пермского государственного университета,
Пермь 614990, Россия
e-mail: neshcherina@mail.ru

Поступило 30.11.2009

^aСанкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург 199034, Россия
e-mail: radiochem@yandex.ru

^bМосковский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Москва 119991, Россия
e-mail: badun@radio.chem.msu.ru

^cУниверситет Дж. Мэдисона, Харрисонбург, США
(James Madison University, Harrisonburg, VA, USA)
e-mail: lewissb@jmu.edu
