



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวกด้วยเทคนิค
การสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งเพื่อนำพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

มิถุนายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวกด้วยเทคนิค
การสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งเพื่อนำพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

SOLID PHASE SYNTHESIS OF CATIONIC LIPIDS
FOR DNA DELIVERY INTO CELLS

ผศ.ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้พิจารณาให้ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา ทำให้งานวิจัยประสบความสำเร็จตามความมุ่งหมาย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.รมิดา วัฒนโกศาสิน และ น.ส. อังคณา กระจำง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ ขอขอบคุณ อ.ดร. เอก แสงวิเชียร ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า และ Professor Mark Bradley, University of Edinburgh, Scotland สหราชอาณาจักร ที่ได้ช่วยเหลือวัสดุวิทยาศาสตร์สำหรับการสังเคราะห์บนวิฎภาคของแข็ง

ขอขอบคุณผู้บริหาร อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ของมหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ได้ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือ ทำให้งานวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี

บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

ABSTRACT

Project Code: RMU5080039

Project Title: การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวกด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งเพื่อนำพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

Investigator: บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล

E-mail Address: boonek@ru.ac.th

Objectives: เพื่อสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก (cationic lipids) ชนิดใหม่โดยใช้เทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง นำสารที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบความสามารถในการจับ (bind) กับดิเอ็นเอ (DNA) และเพื่อทดสอบความสามารถของไขมันประจุบวกในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

Methodology: สังเคราะห์ด้วยวิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง ทดสอบประสิทธิภาพในการจับดิเอ็นเอ และการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ทดสอบ

Results: ได้สังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวนสารสังเคราะห์ 60, 180 และ 24 สาร ตามลำดับ นำสารทั้งหมดไปทดสอบประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ พบสาร 2 สาร จากกลุ่มที่ 1 มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 และ HeLa ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน จากการศึกษาประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของสารกลุ่มที่ 2 พบสาร 8 สาร ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าสารมาตรฐาน ในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ PC3 และพบสาร 7 สาร จากสารสังเคราะห์กลุ่มที่ 3 ที่มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ PC3 ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน

Discussion and Conclusion: จากการประเมินประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกของแต่ละกลุ่ม ทำให้เข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีขึ้น ไขมันประจุบวกที่มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดี สามารถใช้เป็นสารนำในการศึกษาสารระบบนำส่งในการศึกษาขั้นต่อไป

Suggestion/ Further Implication/ Implementation: ควรทำการการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารนำเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ควรใช้สารนำไปศึกษาเป็นสารนำส่งยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาต่อไป

Keywords: Solid phase synthesis, cationic lipids, cationic liposome, DNA delivery, transfection

ABSTRACT

Project Code: RMU5080039

Project Title: Solid phase synthesis of cationic lipids for DNA delivery into cells

Investigator: Boon-ek Yingyongnarongkul

E-mail Address: boonek@ru.ac.th

Objectives: To synthesize new cationic lipids by solid phase chemistry and evaluate their DNA binding and transfection efficiency

Methodology: Synthesis of cationic lipids by solid phase chemistry. Evaluation DNA binding, transfection efficiency and cytotoxicity of the synthesized compounds.

Results: Three libraries of cationic lipids having 60, 180 and 24 compounds, respectively were synthesized and transfection efficiency determined. Two compounds from library 1 exhibited higher transfection efficiency than commercially available agents against HEK293 and HeLa cells. In library 2, eight compounds were found to deliver DNA into PC3 cells more efficient than the positive control. Seven lipids from library 3 showed greater activity than commercial reagents to deliver DNA into PC3 cells.

Discussion and Conclusion: Transfection efficiency evaluation of the synthesized compounds had led to a better understanding of structure-activity relationships of cationic lipids in each library. Some cationic lipids could be used as lead compounds for further modification and for delivery system study.

Suggestion/ Further Implication/ Implementation: Further work on structure modification of lead compounds for better transfection efficiency should be conducted. Further study of lead compound as drug delivery system should be carried out.

Keywords: Solid phase synthesis, cationic lipids, cationic liposome, DNA delivery, transfection

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
Abstract (ภาษาไทย).....	II
Abstract (ภาษาอังกฤษ).....	III
Executive Summary.....	VIII
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งเพื่อนำพาดิ เอ็นเอเข้าสู่เซลล์.....	1
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	5
โครงการย่อยที่ 1 การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี aminoglycerol เป็นโครงสร้างหลัก.....	6
ผลการศึกษา.....	6
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Aa-Aj ถึง Fa-Fj.....	6
การศึกษาการจับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก.....	9
การศึกษาการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก.....	10
การศึกษาเบื้องต้น.....	10
การศึกษาสถานะที่ทำให้ไขมันประจุบวกมีประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ได้ดีเลิศ.....	11
การศึกษาอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย (helper lipid, DOPE).....	11
การศึกษาอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม.....	12
การศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอ.....	13
การศึกษาผลของ serum ต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์.....	14
การศึกษาประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆ.....	15
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....	16
การศึกษาสัญญาณวิทยาของไลโปโซม.....	17
วิธีการ.....	18
การสังเคราะห์ Wang resin 20.....	18
การสังเคราะห์ active carbonate resin 21.....	18
การสังเคราะห์ 1,2-diaminoethane-bound resin 22.....	19
การสังเคราะห์ active carbamate resin 23.....	19

	หน้า
การสังเคราะห์ aminoglycerol-bound resin 24.....	19
การสังเคราะห์ diester-bound resin 25.....	19
การสังเคราะห์ cationic lipid Aa-Aj.....	19
การศึกษาการจับกับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก.....	35
การเตรียมไลโปโซม.....	36
การเตรียมไลโปเพล็กซ์.....	36
การศึกษาการดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์.....	36
การศึกษาสัญญาณวิทยาของไลโปโซม.....	37
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....	37
สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล.....	37
โครงการย่อยที่ 2 การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนไขมันส่วนหางแบบไม่สมมาตร.....	38
ผลการศึกษา.....	38
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก I(A-C,A-C,i-j) และ II(A-C,A-C,i-j).....	38
การศึกษาการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก I(A-C,A-C,i-j) และ II(A-C,A-C,i-j).....	41
การศึกษาเบื้องต้น.....	41
การศึกษาสถานะที่ทำให้ไขมันประจุบวกมีประสิทธิภาพการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีเลิศ.....	42
การศึกษาอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย (helper lipid, DOPE).....	42
การศึกษาอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม.....	42
การศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอ.....	43
การศึกษาผลของ serum ต่อประสิทธิภาพการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์.....	44
การศึกษาประสิทธิภาพการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆ.....	45
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....	45
การศึกษาสัญญาณวิทยาของไลโปโซม.....	46
การศึกษาสัญญาณวิทยาของไลโปเพล็กซ์.....	47
วิธีการ.....	47
การสังเคราะห์ resin 26.....	47
การสังเคราะห์ resin 27.....	47
การสังเคราะห์ resin 28.....	48

	หน้า
การสังเคราะห์ resin 29.....	48
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกกลุ่มย่อย I(A-C,A-C,a-j).....	48
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกกลุ่มย่อย II(A-C,A-C,a-j).....	48
สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล.....	83
โครงการย่อยที่ 3 การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนหัวประจุบวกแบบไม่สมมาตร.....	84
ผลการศึกษา.....	84
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก A-X.....	84
การศึกษาการจับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก A-X.....	88
การศึกษาการพาดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก A-X.....	89
การศึกษาเบื้องต้น.....	89
การศึกษาอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย (DOPE).....	90
การศึกษาอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม.....	91
การศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอ.....	92
การศึกษาผลของ serum ต่อประสิทธิภาพในการพาดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์.....	93
การศึกษาประสิทธิภาพในการพาดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆ.....	94
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....	95
การศึกษาสัญญาณวิทยาของไลโปโซม.....	96
การศึกษาสัญญาณวิทยาของไลโปโซม.....	96
วิธีการ.....	97
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Library 1.....	97
การสังเคราะห์ resin 36a-b.....	97
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก A และ B.....	97
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก C และ D.....	98
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก E และ F.....	99
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก G และ H.....	101
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Library 2.....	102
การสังเคราะห์ resin 45a-d.....	102
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก I, J, K และ L.....	102
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก M, N, O และ P.....	104
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Q, R, S และ T.....	107
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก U, V, W และ X.....	109

	หน้า
สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล.....	111
เอกสารอ้างอิง.....	111
ภาคผนวก	
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ.....	113
Reprint ผลงานวิจัย และ Manuscript.....	114

EXECUTIVE SUMMARY

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวกด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง
เพื่อนำพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาในรอบ 3 ปีมีดังนี้

1. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี aminoglycerol เป็นโครงสร้างหลัก

ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี aminoglycerol เป็นโครงสร้างหลัก ด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งได้ 60 สาร การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^1H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี ไขมันประจุบวก 9 สาร สามารถจับและยับยั้งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ และไขมันประจุบวกอีก 4 สาร สามารถจับและยับยั้งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้บางส่วน จากการทดสอบประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พบว่า ไขมันประจุบวก 4 สารมีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ 60-70 % เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน EffecteneTM (ซึ่งให้ค่าประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เท่ากับ 100%) นำไขมันประจุบวกทั้ง 4 สารมาหาสถานะในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด พบว่าไขมันประจุบวก 2 ชนิดคือ **Ab** และ **Bb** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่า EffecteneTM 15 และ 20 เท่า ตามลำดับ ไขมันประจุบวก **Bb** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 และ HeLa ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน EffecteneTM, DOTAP และ DC-Chol ข้อดีสำหรับไขมันประจุบวก **Bb** คือมีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้สูงโดยไม่ต้องอาศัย co-lipid และสามารถทดลองได้ในสถานะที่มี serum

2. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนไขมันส่วนหางแบบไม่สมมาตร

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนไขมันส่วนหางแบบไม่สมมาตร ซึ่งประกอบด้วย cholesterol และ fatty acid ด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง สังเคราะห์สารได้ทั้งหมด 2 กลุ่มๆ ละ 90 ชนิด สารทั้งสองกลุ่มต่างกันตรงที่ตำแหน่งของ cholesterol และ fatty acid กล่าวคือ กลุ่มย่อยที่ 1 มี cholesterol อยู่ตรงกลางของโมเลกุล และกลุ่มย่อยที่ 2 มี cholesterol อยู่ตรงปลายของโมเลกุล การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^1H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี จากการทดสอบประสิทธิภาพของการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 เบื้องต้น พบไขมันประจุบวก 8 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพดีกว่า EffecteneTM ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งสารทั้ง 8

3 การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนหัวประจุบวกแบบไม่สมมาตร

จากการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีประจุส่วนหัวแบบไม่สมมาตรด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง สังเคราะห์สารได้ทั้งหมด 24 ชนิด การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^1H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี จากการศึกษาประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 พบว่า ไขมันประจุบวก 8 ชนิด มีประสิทธิภาพดีกว่าสารมาตรฐาน EffecteneTM นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิดไปศึกษาหาสภาวะที่ทำให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด พบว่า ไขมันประจุบวก 7 ชนิด มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ PC3 ได้ดีกว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด คือ EffecteneTM, DC-Chol และ DOTAP โดยเฉพาะไขมันประจุบวก E ซึ่งมีส่วนมีขั้วส่วนหัวแบบไม่สมมาตร ประกอบด้วยหมู่เอมีนและกัวนิดีน มีประสิทธิภาพพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าสารมาตรฐานมากกว่า 30 เท่า ไขมันประจุบวกทั้ง 7 ชนิด ยกเว้น สาร G ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบ โลโปโซมที่ 8 สารมีขนาด 300-1000 nm

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวกด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งเพื่อนำพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

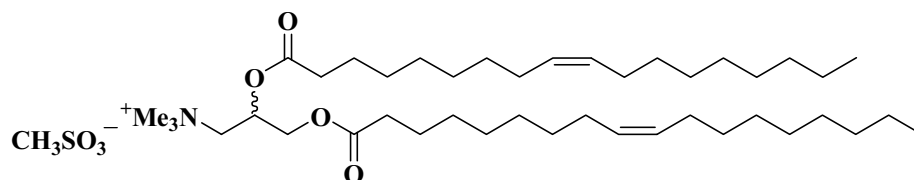
บทนำ

ในปัจจุบันมนุษย์ได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ ในการป้องกันและรักษาโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ ในที่นี้รวมถึงการพัฒนาด้วยเทคนิคใหม่ๆ ทั้งจากการสังเคราะห์ทางเคมี และการหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติ โรคภัยต่างๆ ที่เกิดขึ้นนั้นมีหลายสาเหตุ เกิดได้จากสารเคมี หรือจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ แต่สาเหตุของโรคดังกล่าวสามารถป้องกันหรือแก้ไขได้ สำหรับโรคที่เกิดจากพันธุกรรม เป็นโรคที่ป้องกันยากและการรักษาต้องแก้ที่รหัสพันธุกรรม (DNA) ด้วยวิทยาการที่ก้าวไกลการรักษาในระดับ DNA ก็มีทางเป็นไปได้ ซึ่งวิธีการรักษาระดับ DNA มีวิธีการหลักอยู่ 3 วิธี ดังนี้

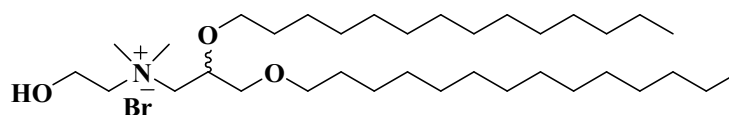
1. Antisense Therapy¹⁻⁶ เป็นวิธีการที่มีการพา oligonucleotide เข้าสู่นิวเคลียส เพื่อที่เข้าไปจับกับ DNA ที่มีความผิดปกติ DNA นี้ก็ไม่สามารถถอดรหัส เพื่อสังเคราะห์โปรตีนที่ผิดปกติได้
2. Antisense Therapy⁷⁻¹⁰ เป็นวิธีการที่มีการพา oligonucleotide เข้าสู่เซลล์ เพื่อที่เข้าไปจับกับ mRNA ที่ผิดปกติ เมื่อ mRNA เกิดการรวมตัวเป็นสายคู่ (duplex) บางส่วนกับ oligonucleotide mRNA นี้ก็ไม่สามารถผ่านขบวนการ translation ในการผลิตโปรตีนได้ และ mRNA นี้ก็จะถูกทำลายโดย nuclease ที่มีอยู่ในเซลล์
3. Gene Correction¹¹⁻¹⁴ เป็นการพาชิ้นส่วน DNA บางส่วนเข้าไปในนิวเคลียสเพื่อไปแทนที่ส่วนที่ผิดปกติ โดยเกิดผ่านขบวนการ trans-splicing ก็จะได้ DNA ที่มีความปกติกลับมา

สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่จะทำให้วิธีการรักษาโรคทางพันธุกรรม หรือ Gene Therapy (โดยผ่านขบวนการทั้งสามชนิด) จะประสบความสำเร็จได้คือ ตัวพา (vector) ซึ่งตัวพามีอยู่ 2 วิธีหลักคือ 1) viral vector^{15,16} เป็นเทคนิคการใช้ไวรัสเป็นตัวพา DNA เข้าสู่เซลล์ วิธีการนี้จะมีประสิทธิภาพสูง แต่มีปัญหาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันบกพร่อง 2) non-viral vector¹⁷ เป็นเทคนิคที่ไม่ใช้ไวรัสเป็นตัวพา DNA เข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น micro injection,¹⁸ electroporation,¹⁹ calcium phosphate,²⁰ cationic lipid²¹ และ dendrimer ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน cationic lipid เป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะประยุกต์ใช้สำหรับ gene therapy ทั้งนี้เมื่อเทียบกับ viral vector แล้ว cationic lipid สามารถพา DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่าเข้าสู่เซลล์ได้ วิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก และไม่มีผลข้างเคียง หรือเป็นพิษกับเซลล์

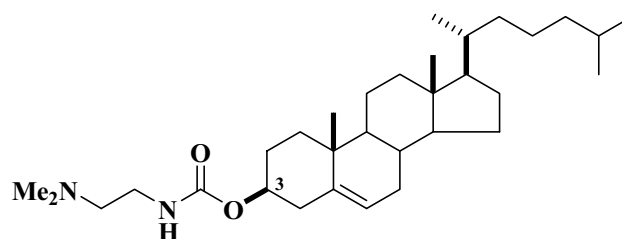
ส่วนประกอบของไขมันประจุบวกประกอบไปด้วยสามส่วนสำคัญคือ ส่วนหัวประจุบวก (cationic head) ส่วนไขมันส่วนหาง (hydrophobic tail) และ ส่วนตัวเชื่อม (linker) ส่วนหัวประจุบวกมีได้ตั้งแต่ประจุเดียวจนถึงหลายประจุ ส่วนมากส่วนหัวประกอบด้วยเอมีนชนิดต่างๆ หรือกวานิดีน (guanidine) ส่วนไขมันส่วนหาง ประกอบด้วยสองกลุ่มหลักคือ กลุ่ม long-chain fatty acid จำนวนหนึ่งหรือสองสายโซ่ และกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น cholesterol หรือ bile acid สำหรับส่วนตัวเชื่อม



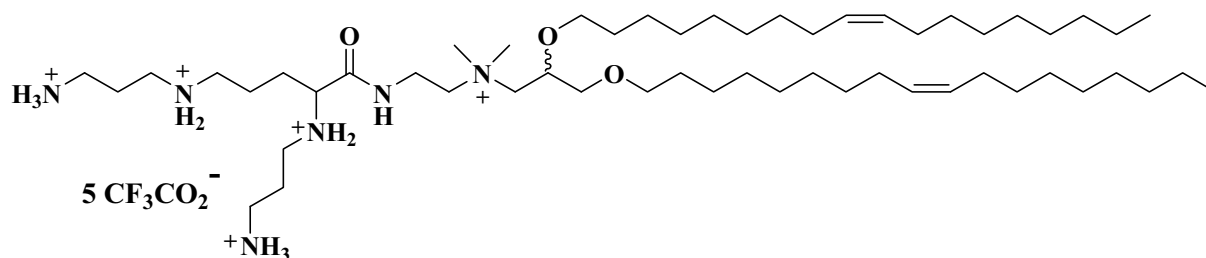
DOTAP; *N*-(1-[2,3-dioleoyloxy]propyl)-*N,N,N*-trimethyl ammonium methylsulfate (1)



DMRIE; *N*-(2,3-tetradecyloxypropyl)-*N*-hydroxyethyl-*N,N*-dimethyl-ammonium bromide (2)



DC-Chol; 3 β -[*N*-(*N,N'*-dimethylaminoethane)carbamoyl] cholesterol (3)

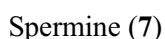
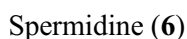


DOSPA; 2,3-dioleoyloxy-*N*-[2-(sperminecarboxamido)ethyl]-*N,N*-dimethyl-*N*-propyl-ammonium pentatrifluoroacetate (4)

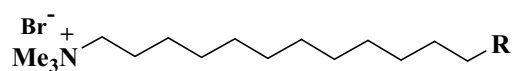
ส่วนหัวประจุบวก (cationic head)

ส่วนของประจุบวกมาจากหมู่เอมีน (primary, secondary, tertiary and quaternary amines) หรือ guanidine ส่วนของประจุบวกมีได้ตั้งแต่ 1, 2, 3 หรือ หลายประจุ แต่ที่นิยมใช้กันจะมีประจุเดียว ตัวอย่างของไขมันประจุเดียวคือ DOTAP (1),²¹ DMRIE (2),²¹ DC-Chol (3)²² และ DORI (5)^{23,24}

สำหรับไขมันประจุบวกที่มีประจุบวกมากกว่าหนึ่งหมู่ ส่วนมากจะสังเคราะห์มาจากโพลิเอมีนจากธรรมชาติ เช่น spermidine (6) และ spermine (7) ตัวอย่างของไขมันประจุบวกกลุ่มนี้ได้แก่ DOSPA (4) และ DOGS (8)²⁵



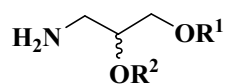
ส่วนไขมันส่วนหาง ประกอบด้วยสองกลุ่มหลักคือ กลุ่ม long-chain fatty acid จำนวนหนึ่ง หรือสองสายโซ่ และกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น cholesterol หรือ bile acid ไขมันประเภทที่มีสายกรดไขมันเพียงสายเดียวจะไม่นับเป็นที่นิยม เนื่องจากมีคุณสมบัติคล้าย surfactant ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ DTAB (9), TTAB (10) และ CTAB (11)²⁶ สำหรับไขมันประเภทที่มีการศึกษากันมากได้แก่ สารกลุ่มที่มีกรดไขมัน 2 สาย ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มที่มีความยาวของสายโซ่เท่ากัน เช่น DOTAP (1),²¹ DMRIE (2),²¹ DOSPA (4)²⁵ และ DORI (5)^{23,24} และกลุ่มที่มีสายโซ่แบบไม่สมมาตรคือมีความยาวของสายโซ่ไม่เท่ากัน เช่น ไขมันประเภท 12-15²⁷



DTAB, R = H; Dodecyltrimethylammonium bromide (9)

TTAB, R = CH₂CH₃; Tetradecyltrimethylammonium bromide (10)

CTAB, R = (CH₂)₃CH₃; Cetyltrimethylammonium bromide (11)



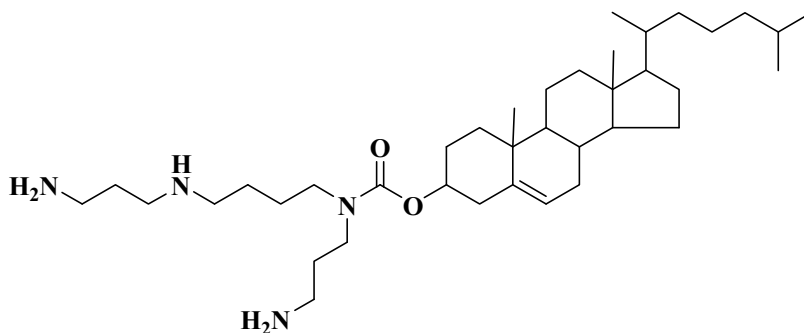
12; R¹ = C₁₂H₂₅, R² = C₁₈H₃₇

13; R¹ = C₁₂H₂₅, R² = C₁₈H₃₅

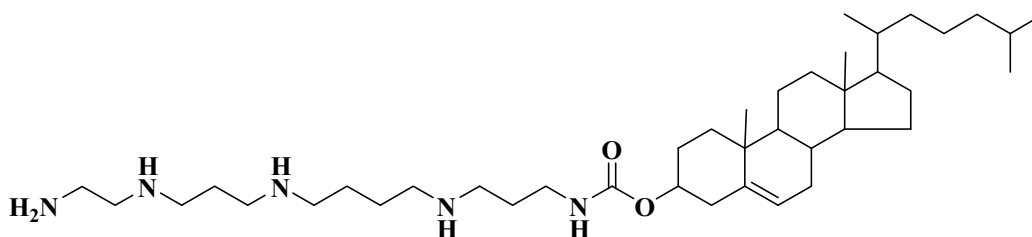
14; R¹ = C₁₂H₂₅, R² = C₁₆H₃₃

15; R¹ = C₁₄H₂₉, R² = C₁₈H₃₇

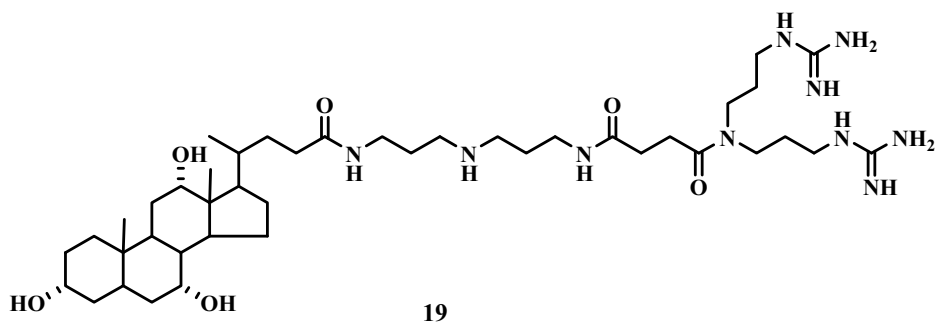
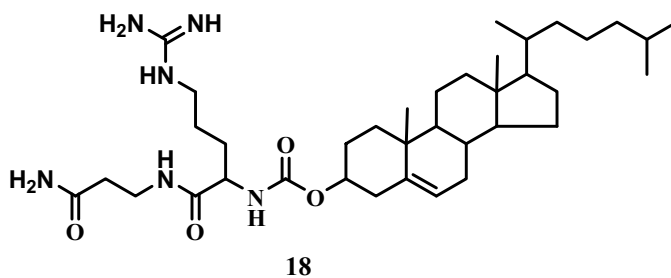
นอกจากนี้ไขมันประจุบวกที่มี cholesterol และ cholic acid และ อนุพันธ์ เป็นส่วนไขมัน ส่วนหางได้มีรายงานการสังเคราะห์เช่นกัน ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ DC-Chol (3),²² Lipid 67 (16),²⁸ CTAP (17)²⁹ 18³⁰ และ 19³¹



Lipid 67; cholesteryl-3β-oxycarbonyl-*N*⁵-spermine (16)



CTAP; *N*⁵-(cholesteryl-3β-oxycarbonyl)-*N*¹⁴-(aminoethyl)spermine (17)



เนื่องจากการพายินเข้าสู่เซลล์ประกอบด้วยหลายขั้นตอน ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพจึงทำได้ยาก ไขมันประจุบวกเป็นสารที่มีขั้วสูง ทำให้การสังเคราะห์แบบธรรมดา ต้องใช้เวลามากในการสังเคราะห์สารแต่ละตัว การสังเคราะห์โดยใช้เทคนิค การสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้สังเคราะห์ไขมันประจุบวก ที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างในเวลาอันสั้นได้ คณะผู้วิจัยจึงมีจุดประสงค์ที่จะใช้วิธีการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง มาใช้สังเคราะห์สารไขมันประจุบวก เนื่องจากการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการสังเคราะห์สาร รวมทั้งลดขั้นตอนในการทำสารให้บริสุทธิ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์สาร ไขมันประจุบวก (cationic lipids) ชนิดใหม่โดยใช้เทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง
2. เพื่อนำสารที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบความสามารถในการจับ (bind) กับดีเอ็นเอ (DNA)
3. ทดสอบความสามารถของไขมันประจุบวกในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สังเคราะห์ได้
5. เพื่อเลือกสารที่มีฤทธิ์เด่นจากข้อ 3 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
6. เพื่อประเมินศักยภาพการนำไปพัฒนาใช้ในอนาคต

โครงการย่อยที่ 1

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี aminoglycerol เป็นโครงสร้างหลัก

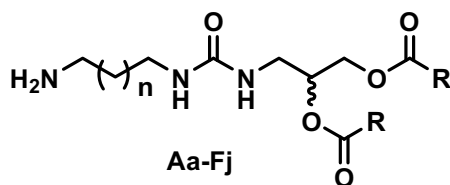
โครงการย่อยที่ 1

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี aminoglycerol เป็นโครงสร้างหลัก

ผลการศึกษา

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Aa-Aj ถึง Fa-Fj

การสังเคราะห์สารไขมันประจุบวก (cationic lipid) ด้วยเทคนิคทาง solid phase synthesis กลุ่มที่ 1 มีโครงสร้างดังรูปที่ 1 ในการสังเคราะห์สารกลุ่มที่ 1 นี้ใช้ 3-amino-1,2-propanediol เป็นโครงสร้างหลัก และทำการปรับเปลี่ยนชนิดของ diamine (A-F) และ long-chain fatty acid (a-j) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความสามารถในการนำพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

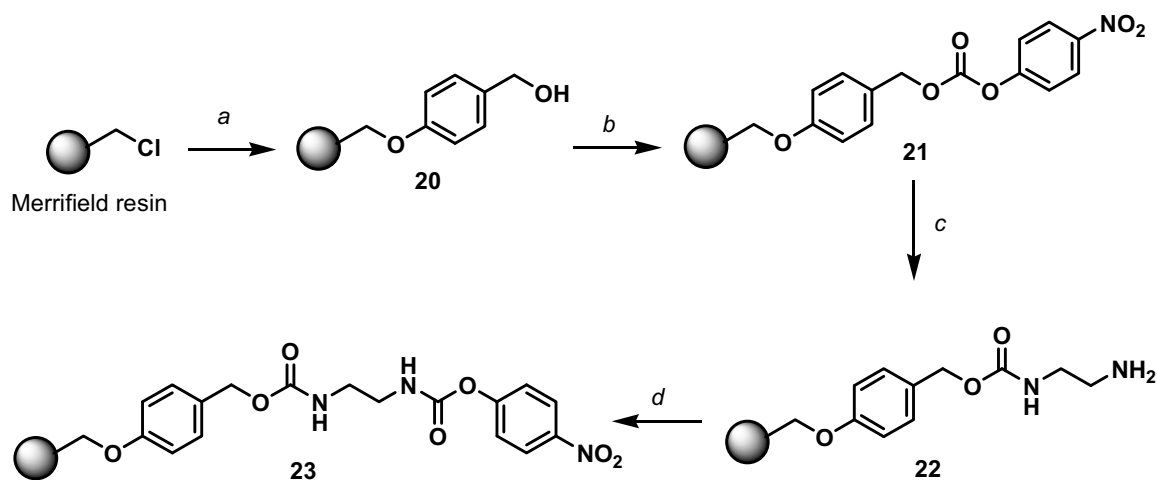


	a; R =
	b; R =
 A; n = 0	c; R =
 B; n = 1	d; R =
 C; n = 2	e; R =
 D; n = 4	f; R =
 E; n = 6	g; R =
 F; n = 7	h; R =
	i; R =
	j; R =

รูปที่ 1 โครงสร้างของไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 1

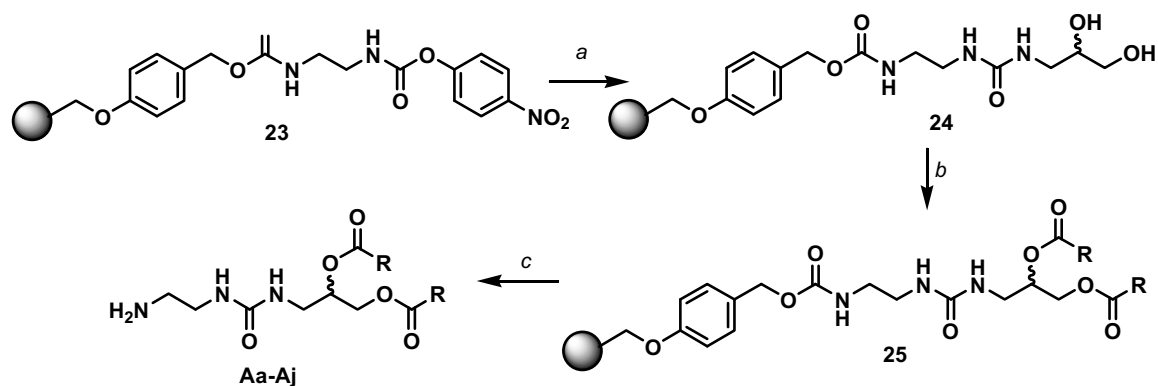
การสังเคราะห์สารกลุ่มที่ 1 ได้แสดงใน Scheme 1 และ Scheme 2 เริ่มจากการเตรียม Wang linker (20) ซึ่งเป็น linker ชนิดหนึ่งที่นิยมใช้สำหรับการสังเคราะห์ เนื่องจากสามารถนำสารอินทรีย์ที่

นำ resin **21** มาทำปฏิกิริยากับ 1,2-diaminoethane ที่มากเกินไปในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมงได้ resin **22** หลังจากการล้างตามปกติ สามารถยืนยันว่ามีหมู่เอมีนอิสระอีกด้านหนึ่งโดยการทดสอบด้วยสารทดสอบ ninhydrin³⁵ ซึ่งในที่นี้จะให้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม นำ resin **22** มาทำปฏิกิริยากับ 4-nitrophenyl chloroformate เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ด้วยสารทดสอบ ninhydrin จะให้ผลเป็นลบ นำ resin ที่ได้มาล้างตามปกติ

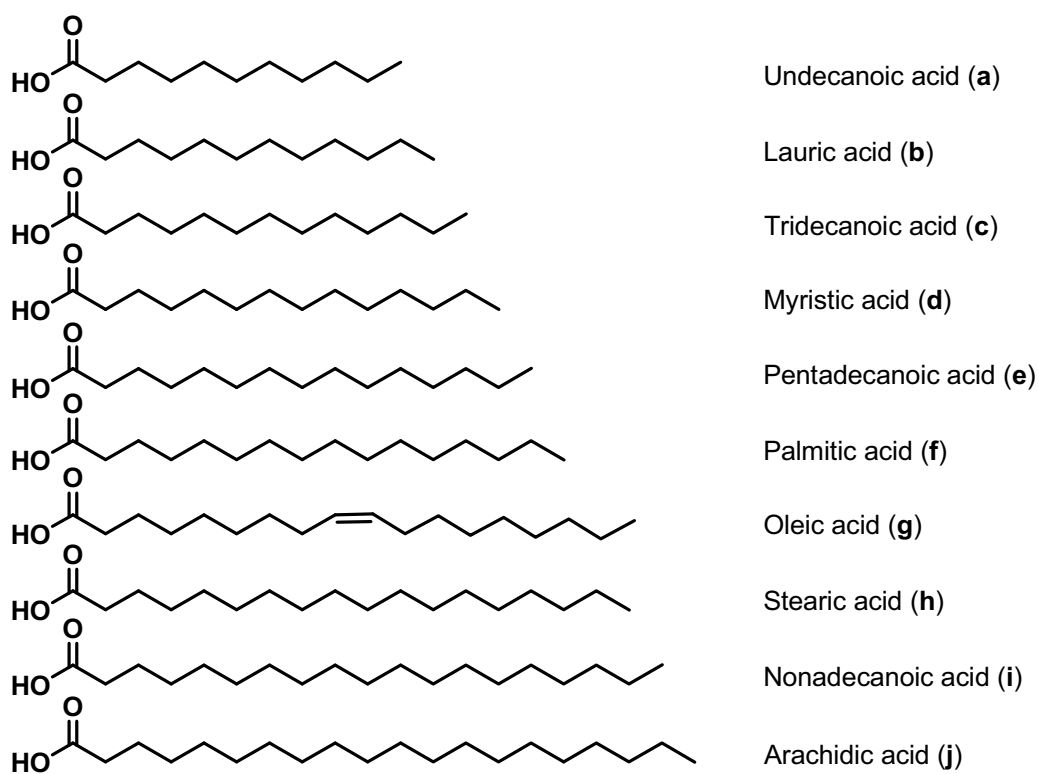


Scheme 1 Reagents and conditions: a) 4-hydroxybenzyl alcohol, K_2CO_3 , KI, DMF, 16 h.; b) 4-nitrophenyl chloroformate, pyr, CH_2Cl_2 , 6 h.; c) 1,2-diaminoethane, CH_2Cl_2 , 16 h.; d) 4-nitrophenyl chloroformate, pyr, CH_2Cl_2 , 16 h.

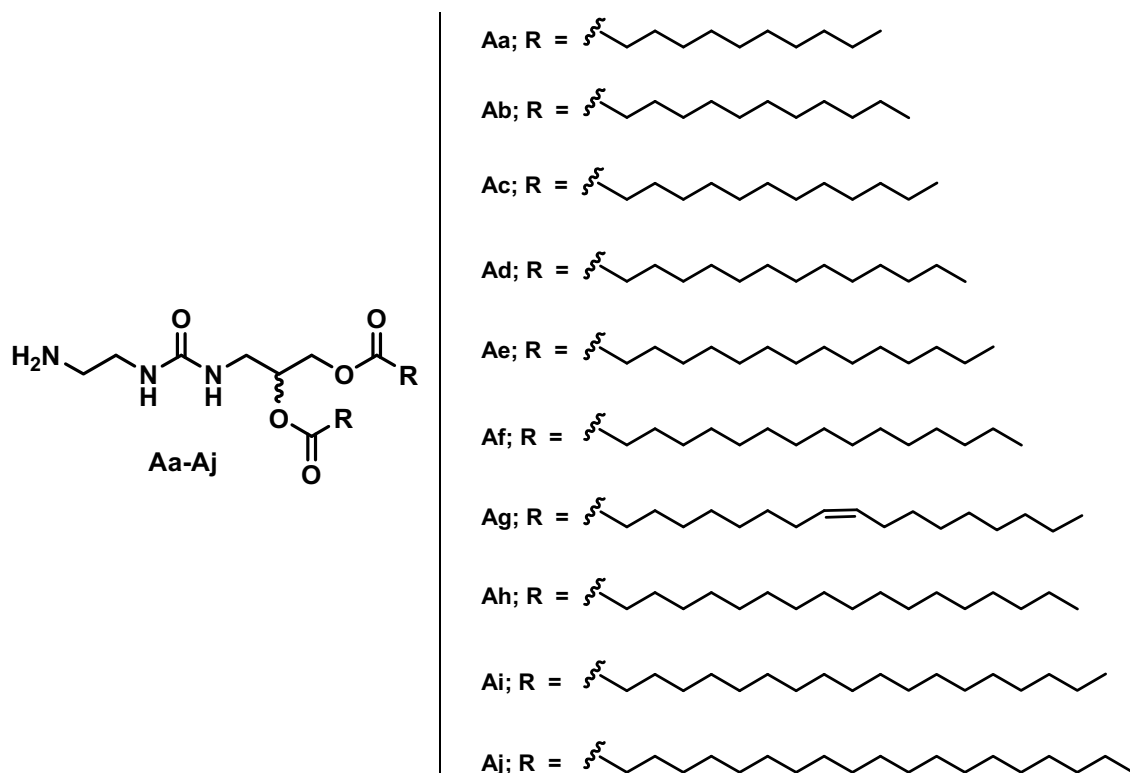
นำ resin **23** มาทำปฏิกิริยากับ 3-amino-1,2-propanediol เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยดูจากสีของสารละลายจะปรากฏเป็นสีเหลืองของ 4-nitrophenol ที่ถูกแทนที่ออกมา นำ resin **24** ที่ได้มาล้างให้สะอาด และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง แบ่ง resin **24** ออกเป็น 10 ส่วน แต่ละส่วนนำไปทำปฏิกิริยากับ long-chain fatty acid แต่ละชนิด (ดูรูปที่ 2) โดยใช้ diisopropylcarbodiimide (DIC) เป็น coupling reagent และใช้ N,N-dimethylaminopyridine (DMAP) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็น resin **25** เมื่อล้าง resin **25**



Scheme 2 *Reagents and conditions:* a) 3-amino-1,2-propanediol, CH_2Cl_2 , MeOH, 16 h.; b) Fatty acid (รูปที่ 2), DIC, CH_2Cl_2 , DMF, DMAP; c) 20% TFA/ CH_2Cl_2 , 2 h.



รูปที่ 2. Long-chain fatty acids used in Scheme 2.



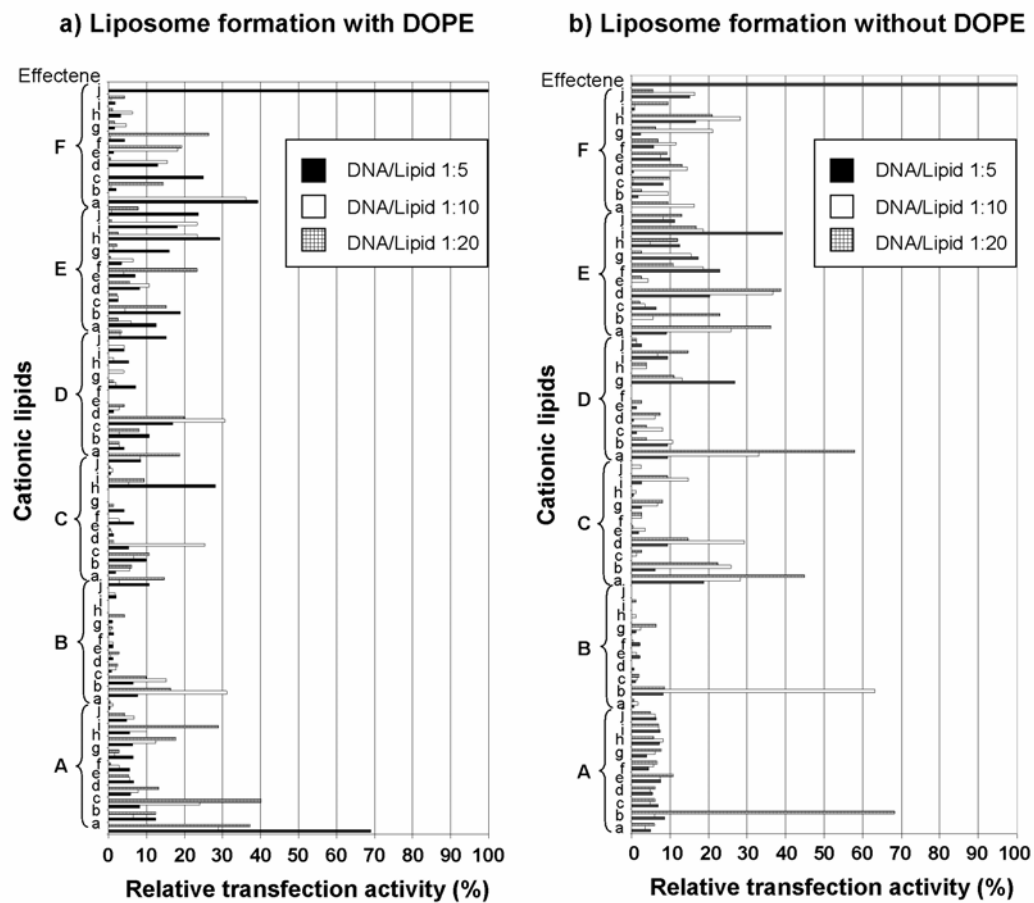
รูปที่ 3 โครงสร้างของไขมันประจุบวก Aa-Aj

การสังเคราะห์สาร **Ba-Bj** ถึง **Fa-Fj** ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์สาร **Aa-Aj** แต่ใช้ 1,3-diaminopropane (**B**), 1,4-diaminobutane (**C**), 1,6-diaminohexane (**D**), 1,8-diaminooctane (**E**) และ 1,9-diaminononane (**F**) แทน 1,2-diaminoethane (**A**) ตามลำดับ (ดูรูปที่ 1) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ปานกลางถึงสูงมาก ได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิค IR, NMR และ MS ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้ตรงตามโครงสร้างที่สังเคราะห์

การศึกษาการจับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก

ก่อนจะทำการศึกษาประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกที่สังเคราะห์ ได้ศึกษาการจับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวกก่อน เพื่อเปรียบเทียบผลของการจับตัวกับการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ในการทดลองนี้ ใช้วิธีการทางอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อดูการหน่วงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ผสมดีเอ็นเอและไขมันประจุบวกในอัตราส่วน 1:10 (I) และ 1:20 (II) โดยน้ำหนัก จากผลการทดลองพบว่า ไขมันประจุบวก 9 ชนิด คือ **Ba, Bb, Bc, Ca, Cb, Cc, Da, Db** และ **Dc** สามารถจับและยับยั้งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ และไขมันประจุบวกอีก 4 ชนิดคือ **Cd, Ce, Cf** และ **Dh** สามารถจับและยับยั้งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้บางส่วน (รูปที่ 4)

จากผลการทดลองพบว่า ไขมันประจุบวกที่สังเคราะห์ได้ มีความสามารถในการพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้น้อยกว่าสารทางการค้า ไขมันประจุบวก **Aa** ที่เตรียมเป็น ไลโปโซมโดยใช้ DOPE เป็น helper lipid มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ประมาณ 70% เมื่อเทียบกับ Effectene™ ในขณะที่ไขมันประจุบวก **Ab**, **Bb** และ **Da** ซึ่งเตรียมเป็น ไลโปโซมโดยไม่ใช้ DOPE มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ประมาณ 60-70% เมื่อเทียบกับ Effectene™ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ไขมันประจุบวก **Aa**, **Ab**, **Bb** และ **Da** มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดี จึงนำสารเหล่านี้ไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

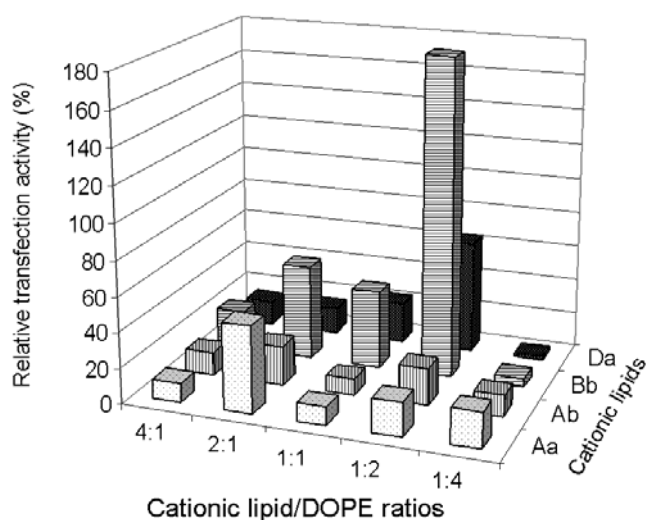


รูปที่ 5 ผลทดสอบการพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์ของไขมันประจุบวก

การศึกษาสภาวะที่ทำให้ไขมันประจุบวกมีประสิทธิภาพการพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดีเลิศ

การศึกษาอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย (helper lipid, DOPE)

จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า การพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์ของไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวกผสมกับไขมันตัวช่วย จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวกเพียงอย่างเดียว³⁶ ดังนั้น เพื่อศึกษาผลของไขมันตัวช่วยต่อประสิทธิภาพการพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์ของไขมันประจุบวก **Aa**, **Ab**, **Bb** และ **Da** จึงนำไขมันประจุบวกทั้งสี่ชนิดนี้มาเตรียมเป็นไลโปโซมโดยใช้ไขมันตัวช่วยที่อัตราส่วนต่างๆ ในการทดลองนี้ใช้อัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมเท่ากันคือ

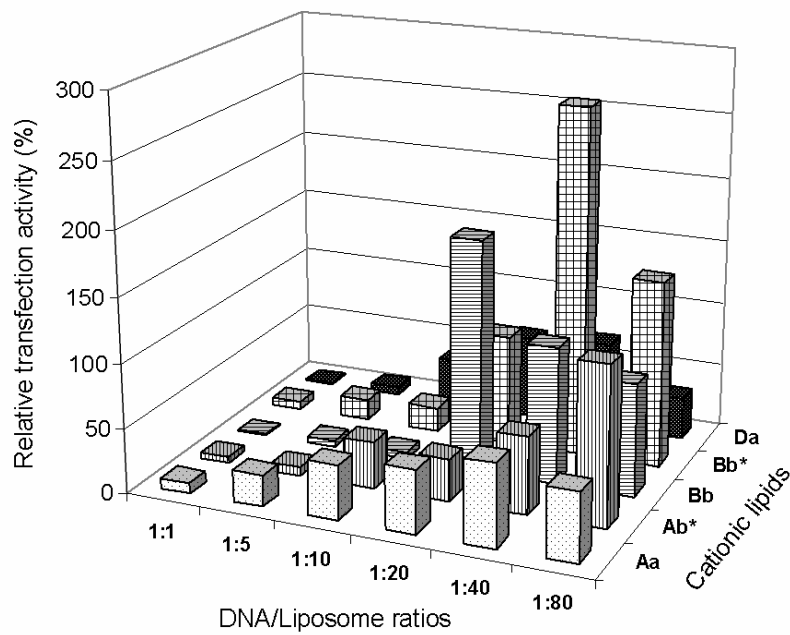


รูปที่ 6 การศึกษาผลของอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วยต่อประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

จากผลของการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย สรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไลโปโซมของไขมันประจุบวกแต่ละชนิดคือ ไลโปโซมของไขมันประจุบวก **Bb** และ **Da** เตรียมโดยใช้ไขมันประจุบวก **Bb** และ **Da** ต่อไขมันตัวช่วยในอัตราส่วน 1:2 และไลโปโซมของไขมันประจุบวก **Aa** เตรียมโดยใช้ไขมันประจุบวก **Aa** ต่อไขมันตัวช่วยในอัตราส่วน 2:1 สำหรับไขมันประจุบวก **Ab** และรวมถึงไขมันประจุบวก **Bb** นำมาเตรียมเป็นไลโปโซมโดยไม่ต้องใช้ไขมันตัวช่วย ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไลโปโซมดังกล่าวนี้ ได้นำไปใช้เพื่อศึกษาสภาวะอื่นต่อไป

การศึกษาอัตราส่วนของคีเอ็นเอต่อไลโปโซม

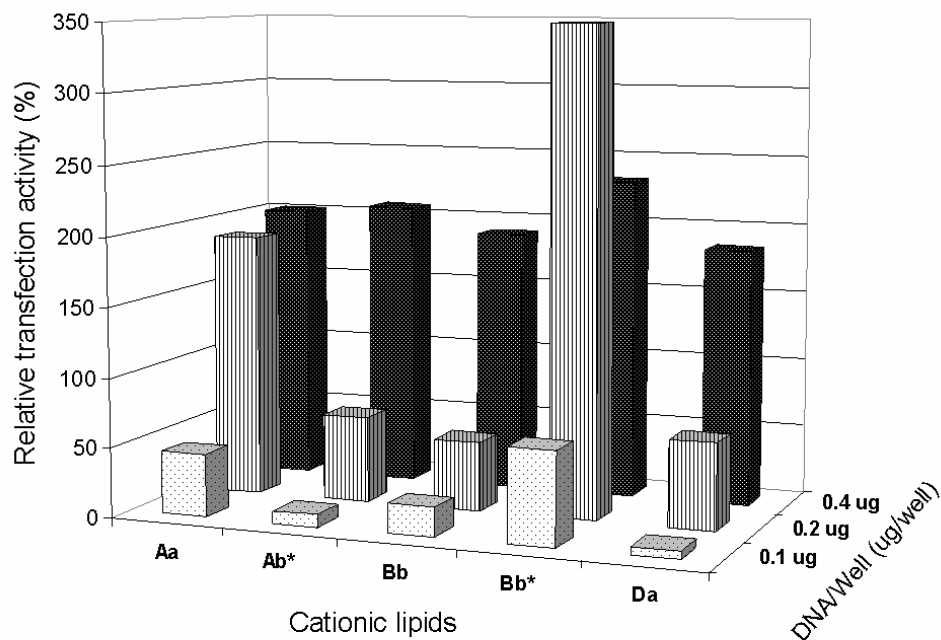
จากสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไลโปโซมของไขมันประจุบวกแต่ละชนิดข้างต้น ได้นำไลโปโซมดังกล่าวมาศึกษาผลของอัตราส่วนของคีเอ็นเอต่อไลโปโซมที่ทำให้ประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอ



รูปที่ 7 การศึกษาผลของอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์
(* คือไลโปโซมเตรียมโดยไม่ใช้ไขมันตัวช่วย)

การศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอ

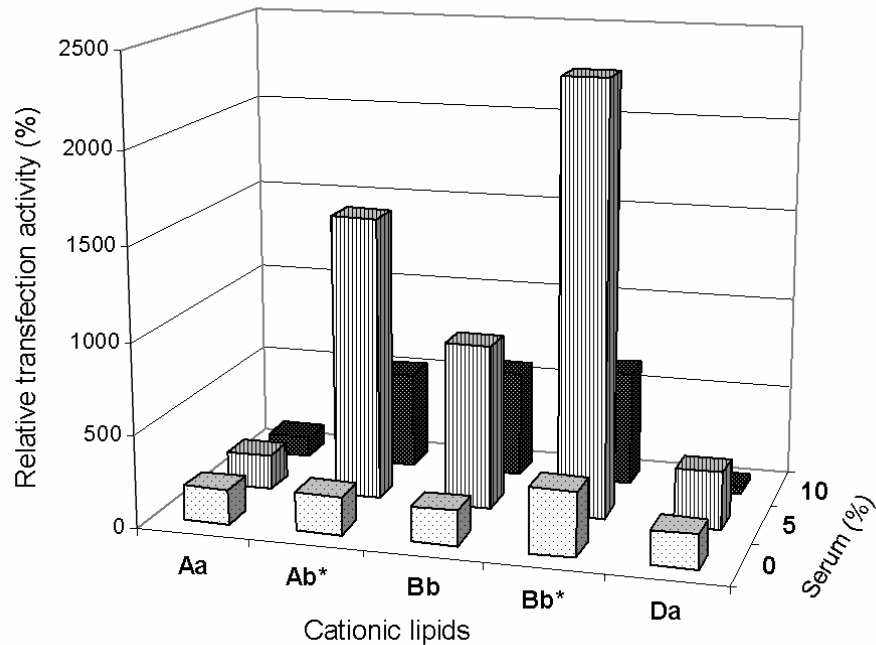
เพื่อศึกษาผลของปริมาณของดีเอ็นเอต่อประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ ได้นำสภาวะจากการทดลองในตอนต้น (รูปที่ 6 และ 7) มาใช้ โดยปรับเปลี่ยนปริมาณดีเอ็นเอจาก 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ เป็น 0.2 $\mu\text{g}/\text{well}$ และ 0.4 $\mu\text{g}/\text{well}$ และใช้ EffecteneTM เป็นสารมาตรฐานที่มีประสิทธิภาพในการพาดิ



รูปที่ 8 การศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ (*คือไลโปโซมเตรียมโดยไม่ใช้ไขมันตัวช่วย)

การศึกษาผลของ serum ต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์

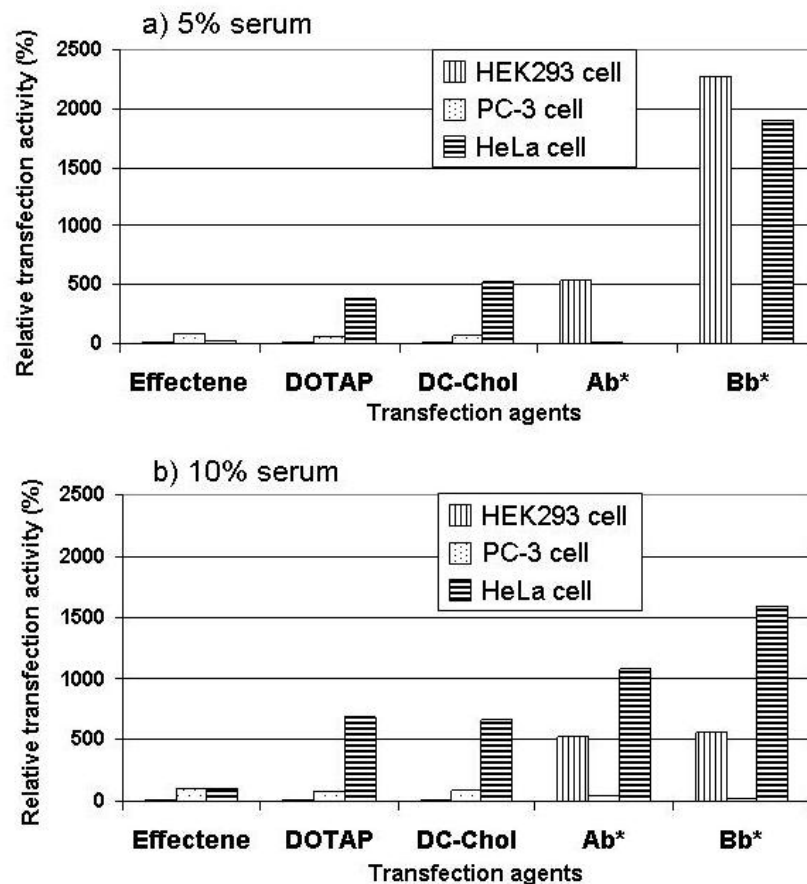
ข้อเสียของการประยุกต์ใช้ไลโปโซมในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ที่ใช้ในสัตว์ทดลองคือ การมี serum ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอลดต่ำลงมาก เพื่อศึกษาผลของปริมาณของ serum ต่อประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ ได้นำสภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองดังรูปที่ 6-8 มาศึกษา โดยมีเปอร์เซ็นต์ serum จาก 0, 5 และ 10% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 9 จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ serum จาก 0% เป็น 5% ประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ของไขมันประจุบวก **Ab***, **Bb** และ **Bb*** เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเพิ่มปริมาณ serum เป็น 10% ประสิทธิภาพของไขมันประจุบวกดังกล่าว ก็ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเช่นกัน สำหรับไขมันประจุบวก **Ab*** และ **Bb*** ซึ่งเตรียม



รูปที่ 9 การศึกษาผลของปริมาณ serum ต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ (*คือไลโปโซมเตรียมโดยไม่ใช้ไขมันตัวช่วย)

การศึกษาประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ชนิดต่างๆ

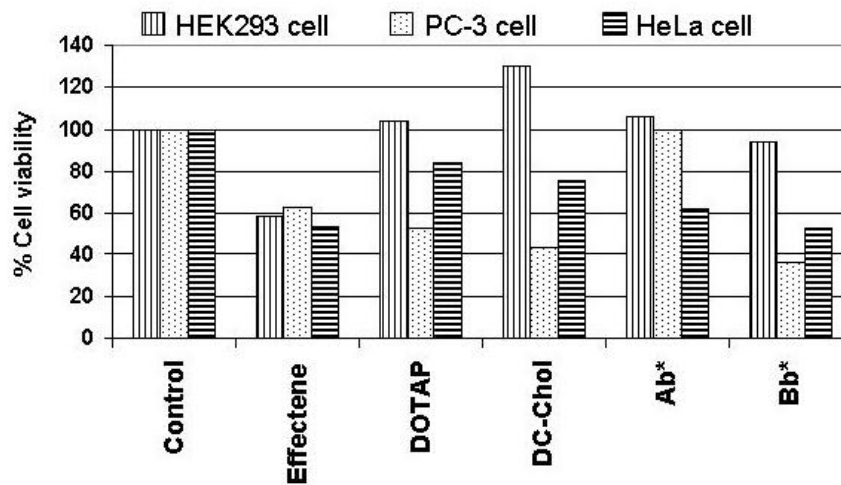
เพื่อศึกษาผลของชนิดของเซลล์ที่มีต่อประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอของไขมันประจุบวก นำไขมันประจุบวก **Ab** และ **Bb** ที่มีประสิทธิภาพดีมาทดสอบกับเซลล์ HEK293 (Human embryonic kidney), PC-3 (human prostate adenocarcinoma) และ HeLa (human cervical adenocarcinoma) ทำการทดลองนี้ใช้สภาวะที่มี serum 5 % และ 10 % และใช้สารมาตรฐานอีกสองชนิดคือ DOTAP และ DC-Chol เพื่อทำการทดลองเปรียบเทียบ จากการทดลองดังรูปที่ 10 พบว่า ไขมันประจุบวก **Ab** และ **Bb** ที่มีประสิทธิภาพดีในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ HEK293 และ HeLa ได้ดีกว่าสารมาตรฐานทั้งสามชนิด โดยเฉพาะสาร **Ab**



รูปที่ 10 การศึกษาชนิดของเซลล์ ต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ (*คือไลโปโซมเตรียมโดยไม่ใช้ไขมันตัวช่วย)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

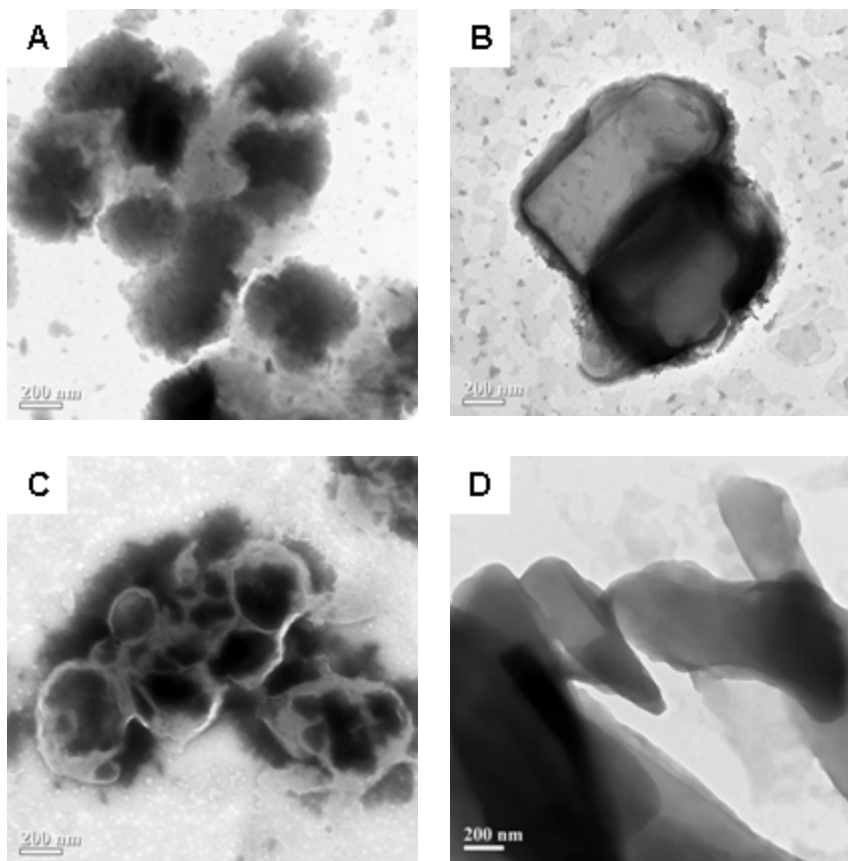
สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการศึกษาการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์คือ ประสิทธิภาพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์กับความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้นำไขมันประจุบวก **Ab** และ **Bb** ที่มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ดี มาเตรียมเป็นไลโปโซมแบบไม่ใช้ไขมันตัวช่วย และได้ทำการหาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 11 จากผลการทดลองพบว่าไขมันประจุบวกทั้งสองชนิด ไม่เป็นพิษกับเซลล์เมื่อเทียบกับ EffecteneTM ไขมันประจุบวก **Ab** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ PC-3 น้อยกว่า DOTAP และ DC-Chol ในขณะที่ ไขมันประจุบวก **Bb** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ PC-3 และ HeLa มากกว่า DOTAP และ DC-Chol



รูปที่ 11 การศึกษาความเป็นพิษกับเซลล์ (*คือไลโปโซมเตรียมโดยไม่ใช้ไขมันตัวช่วย)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปโซม

การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปโซมโดยใช้เครื่อง transmission electron microscopy (TEM) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของไลโปโซมที่มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดีกับลักษณะสัณฐานวิทยาของไลโปโซมที่มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ต่ำ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 ไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวก **Ab** (รูปที่ 12A) และไขมันประจุบวก **Bb** (รูปที่ 12C) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดี มีลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นไลโปโซมที่มีขนาด 200-400 nm ในขณะที่ไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวก **Aj** (รูปที่ 12B) และไขมันประจุบวก **Bj** (รูปที่ 12D) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ไม่ดี ลักษณะสัณฐานวิทยาไม่เป็นแบบไลโปโซม เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของไขมันประจุบวก **Ab** กับ **Aj** และ **Bb** กับ **Bj** ซึ่งมีโครงสร้างต่างกันตรงที่ ไขมันประจุบวก **Ab** และ **Bb** มีส่วนของไขมันส่วนหาง (lipophobic tail) สั้น กล่าวคือ มีจำนวนคาร์บอน 12 อะตอม ในขณะที่ ไขมันประจุบวก **Aj** และ **Bj** มีส่วนของไขมันส่วนหางที่ยาวกว่า ซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 20 อะตอม จึงอาจจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่ไขมันประจุบวกที่สังเคราะห์ได้นี้ มีเฉพาะไขมันประจุบวกที่มีไขมันส่วนหางสั้น ที่มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดี



รูปที่ 12 การศึกษาสัณฐานวิทยาด้วย transmission electron microscopy (TEM) ของไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวก **Ab** (A), **Aj** (B), **Bb** (C) และ **Bj** (D)

วิธีการ

1. การสังเคราะห์ Wang resin 20

นำ Chloromethyl polystyrene resin (Merrifield resin) (1.07 g, 1.18 mmol, 1.1 mmol/g) มาทำให้บวมด้วย CH_2Cl_2 (10 ml) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที กรองเอาตัวทำละลายออก เติมสารละลาย 4-hydroxybenzyl alcohol (0.44 g, 3.53 mmol) ในตัวทำละลาย DMF (10 ml) ลงใน resin หลังจากนั้นใส่ K_2CO_3 (0.33 g, 2.36 mmol) และ KI (0.1 g, 0.60 mmol) เขย่าของผสม 16 ชั่วโมง นำ resin มาล้างด้วย H_2O , DMF, MeOH และ CH_2Cl_2 อย่างละ 3x10 ml ตามลำดับ นำ resin ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง

2. การสังเคราะห์ active carbonate resin 21

นำ Wang resin 20 (611 mg, 0.6 mmol) มาทำให้บวมด้วย CH_2Cl_2 (5 ml) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที กรองเอาตัวทำละลายออก เติมสารละลาย 4-nitrophenyl chloroformate (320 mg, 1.59 mmol) ใน CH_2Cl_2 (5 ml) ค่อยๆหยด pyridine (0.24 ml, 3 mmol) นำของผสมมาเขย่า 6 ชั่วโมง

3. การสังเคราะห์ 1,2-diaminoethane-bound resin 22

นำ resin 21 ที่ได้มาเติม สารละลาย 1,2-diaminoethane (excess) ใน CH_2Cl_2 (5 ml) นำของผสมที่ได้มาเขย่านาน 16 ชั่วโมง นำ resin 22 ที่ได้มาล้างตามปกติ และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง ทดสอบหมู่ amino บน resin ด้วย ninhydrin test ได้สารละลายสีน้ำเงิน

4. การสังเคราะห์ active carbamate resin 23

นำ 1,2-diaminoethane-bound resin 22 มาทำให้บวมด้วย CH_2Cl_2 (2 ml) นาน 10 นาที กรองเอาตัวทำละลายออก เติมสารผสมของ 4-nitrophenyl chloroformate (3 eq) และ pyridine (20 eq) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ลงใน resin นำของผสมมาเขย่านาน 16 ชั่วโมง นำ resin มาล้างตามปกติ ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ด้วย ninhydrin test (เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จะไม่ปรากฏสารละลายสีน้ำเงิน) นำ resin 23 ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง

5. การสังเคราะห์ aminoglycerol-bound resin 24

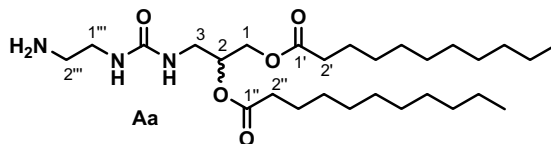
นำ resin 23 ที่ได้มาเติม สารละลาย 3-amino-1,2-propanediol (excess) ในตัวทำละลายผสม CH_2Cl_2 และ DMF (1:1, 5 ml) นำของผสมที่ได้มาเขย่านานข้ามคืน นำ resin 24 ที่ได้มาล้างตามปกติ และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง

6. การสังเคราะห์ diester-bound resin 25

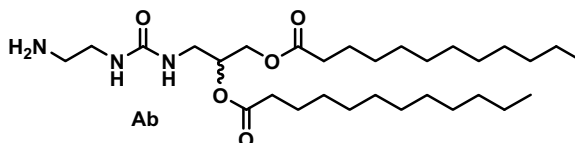
นำ resin 24 ที่ได้มาเติม สารละลายผสมของ long-chain fatty acid (ดูรูปที่ 2) (6 eq) และ DIC (6 eq) ในตัวทำละลายผสม CH_2Cl_2 และ DMF (4:1, 3 ml) นำของผสมที่ได้มาเขย่านานข้ามคืน นำ resin 25 ที่ได้มาล้างให้สะอาด และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง

7. การสังเคราะห์ cationic lipid Aa-Aj

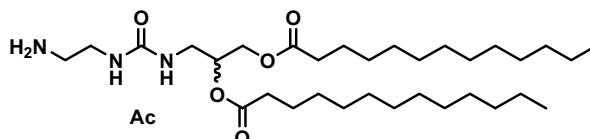
นำ resin 25 ที่ได้มาเติม สารละลาย 20% TFA ใน ตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (1.5 ml) เขย่าของผสมนาน 2 ชั่วโมง กรอง resin ออก และเก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ซ้ำด้วย CH_2Cl_2 อีกสองครั้ง รวมส่วนของสารละลายที่ได้เข้าด้วยกัน ระเหยตัวละลายออกด้วยก๊าซไนโตรเจน และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ Aa-Aj



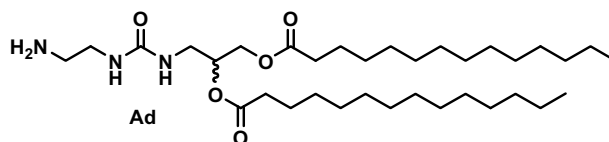
Compound Aa (59 mg from 115 mg of resin **24**): 90% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3375, 3064, 2925, 2855, 1681, 1573, 1507, 1466, 1264, 1203, 1140 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (*br t*, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (*s*, 24H, H-4'–H-9' and H-4''–H-9''), 1.40 (*br m*, 4H, H-10' and H-10''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.17 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.26 (*br s*, 2H, H-3), 3.47 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.07 (*dd*, $J = 12.1, 6.2$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-1b), 5.05 (*br s*, 1H, H-2), 7.58 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 531.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



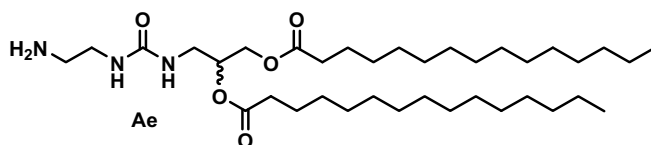
Compound Ab (61 mg from 108 mg of resin **24**): 95% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3376, 3058, 2924, 2854, 1677, 1570, 1466, 1433, 1262, 1203, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (*br t*, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (*s*, 28H, H-4'–H-10' and H-4''–H-10''), 1.38 (*br m*, 4H, H-11' and H-11''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.19 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.26 (*br s*, 2H, H-3), 3.48 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.07 (*dd*, $J = 12.1, 5.9$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-1b), 5.05 (*br s*, 1H, H-2), 7.55 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 542.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



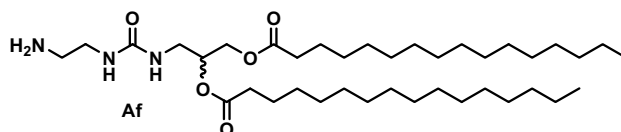
Compound Ac (49 mg from 87 mg of resin **24**): 86% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3372, 2922, 2852, 1737, 1667, 1569, 1466, 1203, 1180, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (*br t*, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (*s*, 32H, H-4'–H-11' and H-4''–H-11''), 1.45 (*br m*, 4H, H-12' and H-12''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.28 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.14 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.25 (*br s*, 2H, H-3), 3.46 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.07 (*dd*, $J = 11.9, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-1b), 5.04 (*br s*, 1H, H-2), 7.55 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 571.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



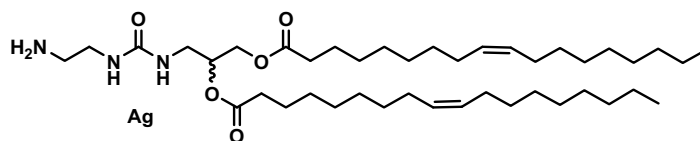
Compound Ad (51 mg from 92 mg of resin **24**): 85% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3376, 2918, 2850, 1683, 1574, 1467, 1429, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (*br t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (*s*, 36H, H-4'–H-12' and H-4''–H-12''), 1.36 (*br m*, 4H, H-13' and H-13''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.28 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.17 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.25 (*br s*, 2H, H-3), 3.47 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.08 (*dd*, $J = 12.0, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1b), 5.05 (*br s*, 1H, H-2), 7.62 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 598.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



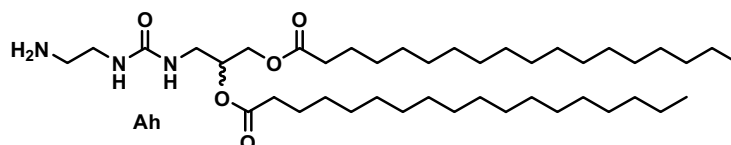
Compound Ae (47 mg from 84 mg of resin **24**): 81% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3367, 2919, 2850, 1734, 1678, 1568, 1467, 1429, 1272, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*br t*, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (*s*, 40H, H-4'–H-13' and H-4''–H-13''), 1.38 (*br m*, 4H, H-14' and H-14''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.28 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.16 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.25 (*br s*, 2H, H-3), 3.47 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.07 (*dd*, $J = 12.0, 5.9$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1b), 5.04 (*br s*, 1H, H-2), 7.53 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 626.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



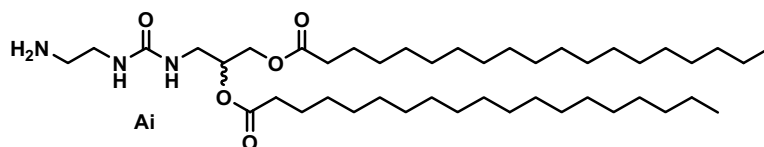
Compound Af (68 mg from 108 mg of resin **24**): 88% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3373, 2918, 2850, 1731, 1677, 1560, 1467, 1194, 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (*br t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (*s*, 44H, H-4'–H-14' and H-4''–H-14''), 1.35 (*br m*, 4H, H-15' and H-15''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.21 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.27 (*br s*, 2H, H-3), 3.49 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.08 (*dd*, $J = 12.1, 5.9$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1b), 5.06 (*br s*, 1H, H-2), 7.50 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 654.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



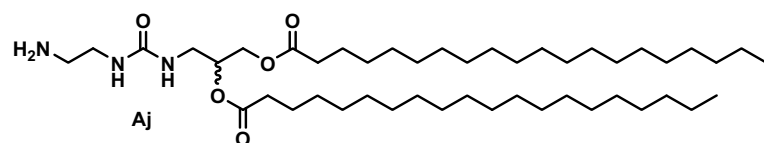
Compound Ag (36 mg from 79 mg of resin **24**): 59% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3366, 2997, 2925, 2854, 1711, 1678, 1571, 1464, 1203, 1140 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*br t*, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (*s*, (36H, H-4'–H-7', H-12'–H-16', H-4''–H-7'' and H-12''–H-16''), 1.40 (*br m*, 4H, H-17' and H-17''), 1.55 (*m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.98 (*br s*, 8H, H-8', H-11', H-8'', H-11''), 2.29 (*br t*-like, 4H, H-2' and H-2''), 3.13 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.26 (*br s*, 2H, H-3), 3.48 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.08 (*dd*, $J = 12.0, 5.9$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-1b), 5.05 (*br s*, 1H, H-2), 5.32 (*br s*, 4H, H-9', H-10', H-9'' and H-10''), 7.61 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 706.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



Compound Ah (72 mg from 98 mg of resin **24**): 94% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3376, 3054, 2925, 2853, 2677, 1679, 1569, 1422, 1265, 1203, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*br t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.23 (*s*, 52H, H-4'–H-16' and H-4''–H-16''), 1.38 (*br m*, 4H, H-17' and H-17''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.30 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.21 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.24 (*br s*, 2H, H-3), 3.49 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.09 (*dd*, $J = 12.0, 5.9$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1b), 5.07 (*br s*, 1H, H-2), 7.45 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 710.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



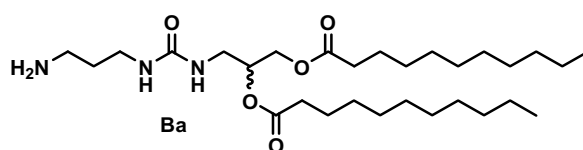
Compound Ai (79 mg from 98 mg of resin **24**): 99% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3392, 3054, 2980, 2926, 2853, 1679, 1566, 1422, 1265, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*br t*, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-19' and H-19''), 1.23 (*s*, 56H, H-4'-H-17' and H-4''-H-17''), 1.38 (*br m*, 4H, H-18' and H-18''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.31 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.24 (*br s*, 2H, H-2'''), 3.32 (*br s*, 2H, H-3), 3.50 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.10 (*dd*, $J = 12.0, 5.9$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (*br d*, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-1b), 5.08 (*br s*, 1H, H-2), 7.40 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 738.8 ($[\text{M} +]^+$, 100%).



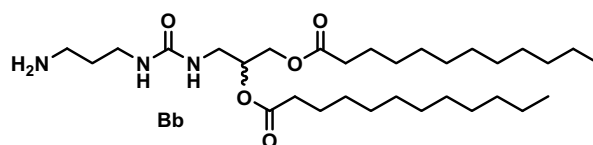
Compound Aj (82 mg from 105 mg of resin **24**): 92% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3368, 2917, 2849, 1736, 1659, 1563, 1465, 1429, 1264, 1176, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*br t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-20' and H-20''), 1.23 (*s*, 60H, H-4'-H-18' and H-4''-H-18''), 1.38 (*br m*, 4H, H-19' and H-19''), 1.55 (*br s*, 4H, H-3' and H-3''), 2.30 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.25 (*m*, 4H, H-3 and H-2'''), 3.50 (*br s*, 2H, H-1'''), 4.01 (*dd*, $J = 11.9, 5.9$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (*br d*, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-1b), 5.07 (*br s*, 1H, H-2), 7.40 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 766.9 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%).

8. การสังเคราะห์ สาร Ba-Bj และ Ca-Cj

วิธีการสังเคราะห์สาร **Ba-Bj** และ **Ca-Cj** ทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์สาร **Aa-Aj** ตามขั้นตอนที่ 3-7 ที่กล่าวมาข้างต้น ยกเว้นในขั้นตอนที่ 3 ใช้ 1,3-diaminopropane และ 1,4-diaminobutane แทน 1,2-diaminoethane ตามลำดับ

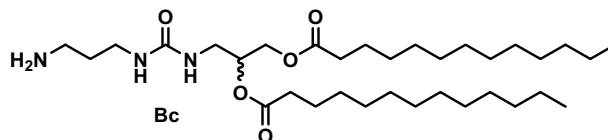


Compound Ba (28 mg from 115 mg of resin): 41% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3372, 2925, 2855, 1712, 1679, 1568, 1466, 1376, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (*s*, 24H, H-4'-H-9' and H-4''-H-9''), 1.40 (*br m*, 4H, H-10' and H-10''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.84 (*br s*, 2H, H-2'''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.04 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.27 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (*dd*, $J = 12.1, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.23 (*br d*, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.75 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 528.5 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%).

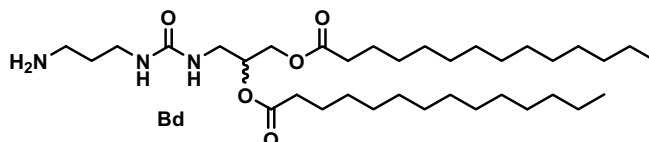


Compound Bb (31 mg from 134 mg of resin): 38% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2924, 2854, 1680, 1572, 1466, 1376, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.6$

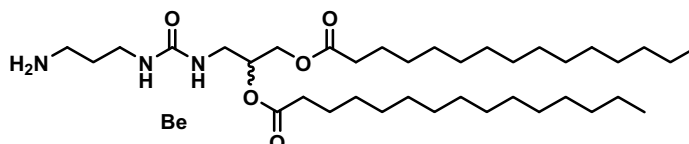
Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (*s*, 28H, H-4'-H-10' and H-4''-H-10''), 1.38 (*br m*, 4H, H-11' and H-11''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.84 (*br s*, 2H, H-2''), 2.28 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.04 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.27 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.05 (*dd*, $J = 12.1, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.73 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 556.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



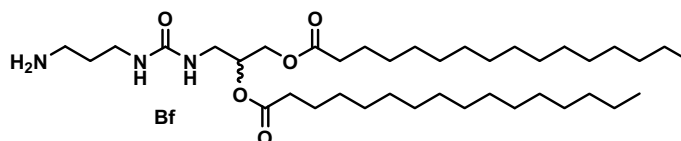
Compound Bc (29 mg from 130 mg of resin): 34% yield; IR: ν_{max} 3365, 2924, 2854, 1750, 1679, 1568, 1466, 1376, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (*s*, 32H, H-4'-H-11' and H-4''-H-11''), 1.39 (*br m*, 4H, H-12' and H-12''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.83 (*br s*, 2H, 2H, H-2'''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.05 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.27 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.06 (*dd*, $J = 12.1, 6.2$ Hz, 1H, H-1a), 4.23 (*br d*, $J = 9.6$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.73 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 584.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



Compound Bd (36 mg from 123 mg of resin): 44% yield; IR: ν_{max} 3365, 2922, 2853, 1700, 1678, 1568, 1466, 1369, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (*s*, 36H, H-4'-H-12' and H-4''-H-12''), 1.38 (*br m*, 4H, H-13' and H-13''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.84 (*br s*, 2H, H-2''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.05 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.28 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.06 (*dd*, $J = 12.1, 6.2$ Hz, 1H, H-1a), 4.23 (*br d*, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-1b), 5.02 (*br s*, 1H, H-2), 7.72 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 612.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

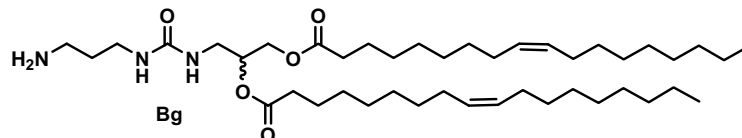


Compound Be (37 mg from 168 mg of resin): 31% yield; IR: ν_{max} 3365, 3040, 2919, 2851, 1730, 1679, 1572, 1466, 1265, 1203, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (*s*, 40H, H-4'-H-13' and H-4''-H-13''), 1.38 (*br m*, 4H, H-14' and H-14''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.81 (*br s*, 2H, H-2'''), 2.27 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.01 (*br s*, 2H, 2H, H-3'''), 3.25 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.05 (*dd*, $J = 11.9, 6.3$ Hz, 1H, H-1a), 4.18 (*br d*, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.90 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 640.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

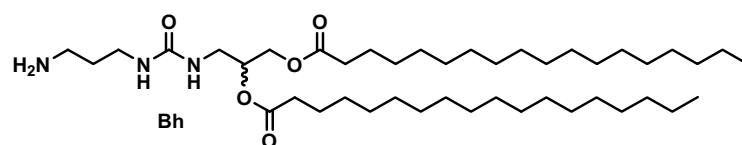


Compound Bf (35 mg from 126 mg of resin): 38% yield; IR: ν_{max} 3365, 2918, 2850, 1736, 1656, 1564, 1465, 1369, 1251, 1176, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (*s*, 44H, H-4'-H-14' and H-4''-H-14''),

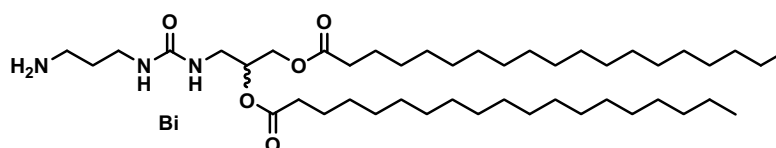
1.38 (*br m*, 4H, H-15' and H-15''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.83 (*br s*, 2H, H-2'''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.04 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.27 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.06 (*dd*, $J = 12.1, 6.2$ Hz, 1H, H-1a), 4.23 (*br d*, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1b), 5.02 (*br s*, 1H, H-2), 7.75 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 668.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



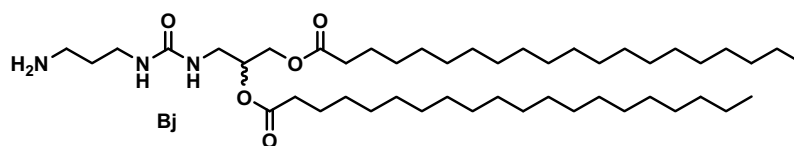
Compound Bg (30 mg from 133 mg of resin): 29% yield; IR: ν_{max} 3357, 2924, 2854, 1704, 1679, 1568, 1464, 1376, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (*s*, 28H, H-4'–H-6', H-13'–H-16', H-4''–H-6'' and H-13''–H-16''), 1.27 (*s*, 8H, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.38 (*br m*, 4H, H-17' and H-17''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.98 (*br m*, 8H, H-8', H-11', H-8'', H-11''), 2.30 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.05 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.28 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (*dd*, 1H, $J = 12.1, 6.1$ Hz, H-1a), 4.23 (*br d*, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 5.32 (*br s*, 4H, H-9', H-10', H-9'' and H-10''), 7.74 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 720.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



Compound Bh (13 mg from 127 mg of resin): 13% yield; IR: ν_{max} 3364, 2919, 2850, 1734, 1466, 1373, 1258, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.23 (*s*, 52 H, H-4'–H-16' and H-4''–H-16''), 1.36 (*br m*, 4H, H-17' and H-17''), 1.56 (*br m*, 4H, H-4' and H-4''), 1.77 (*br m*, 2H, H-2'''), 2.30 (*m*, 4H, H-3' and H-3''), 2.94 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.20 (*m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (*dd*, $J = 12.2, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.29 (*dd*, $J = 12.2, 4.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.04 (*br s*, 1H, H-2), 7.65 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 724.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

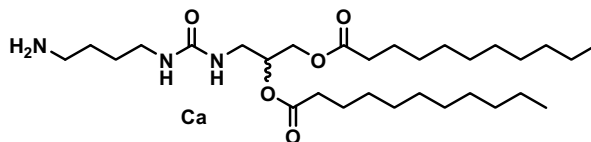


Compound Bi (34 mg from 117 mg of resin): 36% yield; IR: ν_{max} 3360, 2919, 2850, 1736, 1655, 1422, 1265 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, 6H, $J = 6.6$ Hz, H-19' and H-19''), 1.23 (*s*, 56H, H-4'–H-17' and H-4''–H-17''), 1.38 (*br m*, 4H, H-18' and H-18''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.85 (*br m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.07 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.26 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (*dd*, 1H, $J = 12.3, 6.2$ Hz, H-1a), 4.23 (*br d*, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.66 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 752.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

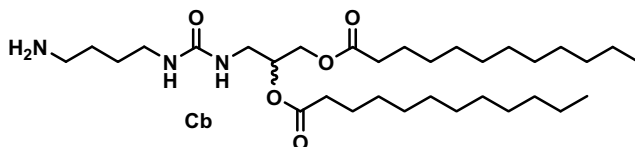


Compound Bj (39 mg from 140 mg of resin): 33% yield; IR: ν_{max} 3054, 2987, 2919, 2850, 1736, 1655, 1422, 1265 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, 6H, $J = 6.6$

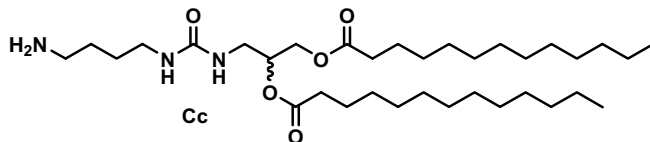
Hz, H-20' and H-20''), 1.23 (*s*, 60H, H-4'–H-18' and H-4''–H-18''), 1.38 (*br m*, 4H, H-19' and H-19''), 1.38 (*br m*, 4H, H-19' and H-19''), 1.56 (*br m*, 4H, H-3' and H-3''), 1.85 (*br s*, 2H, H-2'''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 3.06 (*br s*, 2H, H-3'''), 3.28 (*br m*, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (*dd*, $J = 12.1, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (*br d*, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-1b), 5.02 (*br s*, 1H, H-2), 7.66 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 780.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



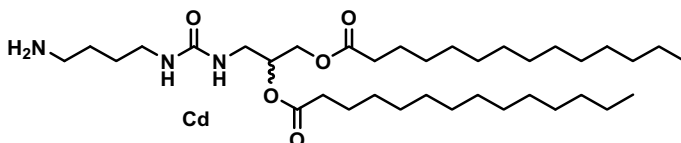
Compound Ca (28 mg from 124 mg of resin): 37% yield; IR: ν_{max} 3372, 2925, 2854, 1741, 1679, 1568, 1466, 1376, 1203, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (*s*, 24H, H-4'–H-9' and H-4''–H-9''), 1.38 (*br m*, 4H, H-10' and H-10''), 1.38 (*br m*, 4H, H-10' and H-10''), 1.58 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.07 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.28 (*br s*, 2H, H-3), 4.05 (*dd*, $J = 12.3, 6.6$ Hz, 1H, H-1a), 4.23 (*br d*, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.02 (*br s*, 1H, H-2), 7.81 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 542.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



Compound Cb (30 mg from 131 mg of resin): 36% yield; IR: ν_{max} 3357, 2924, 2854, 1738, 1678, 1568, 1466, 1196, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (*s*, 28H, H-4'–H-10' and H-4''–H-10''), 1.38 (*br m*, 4H, H-11' and H-11''), 1.55 (*m*, 8H, H-2', H-2'', H-2''' and H-3'''), 2.28 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.07 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.27 (*br s*, 2H, H-3), 4.05 (*dd*, $J = 12.2, 6.6$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.80 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 570.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

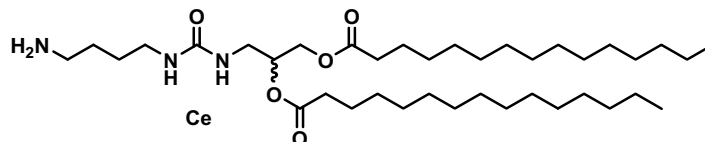


Compound Cc (33 mg from 143 mg of resin): 35% yield; IR: ν_{max} 3350, 2924, 2854, 1738, 1679, 1568, 1466, 1378, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.4$ Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (*s*, 32H, H-4'–H-11' and H-4''–H-11''), 1.38 (*br m*, 4H, H-12' and H-12''), 1.58 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.28 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.08 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.28 (*br s*, 2H, H-3), 4.05 (*dd*, $J = 12.4, 6.6$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (*br d*, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.81 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 598.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

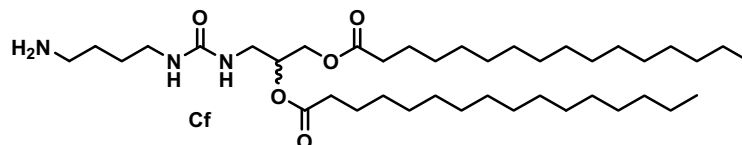


Compound Cd (27 mg from 140 mg of resin): 28% yield; IR: ν_{max} 3372, 2922, 2852, 1739, 1678, 1561, 1466, 1377, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (*s*, 36H, H-4'–H-12' and H-4''–H-12''), 1.38 (*br m*,

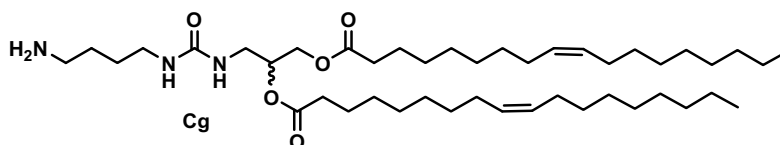
4H, H-13' and H-13''), 1.60 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.30 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.94 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.10 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.27 (*br s*, 2H, H-3), 4.06 (*dd*, $J = 12.2$, 6.6 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (*br d*, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.83 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 626.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



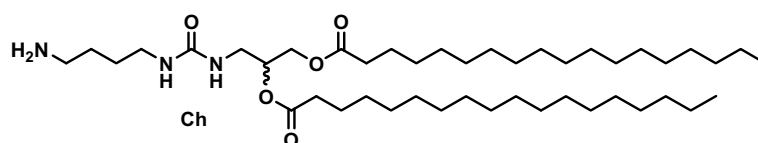
Compound Ce (33 mg from 140 mg of resin): 33% yield; IR: ν_{max} 3357, 2919, 2850, 1736, 1678, 1568, 1467, 1378, 1266, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (*s*, 40H, H-4'-H-13' and H-4''-H-13''), 1.38 (*br m*, 4H, H-14' and H-14''), 1.56 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.08 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.34 (*br s*, 2H, H-3), 4.05 (*dd*, $J = 12.1$, 6.5 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.75 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 654.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



Compound Cf (28 mg from 114 mg of resin): 33% yield; IR: ν_{max} 3365, 2919, 2850, 1738, 1678, 1564, 1467, 1378, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (*s*, 44H, H-4'-H-14' and H-4''-H-14''), 1.38 (*br m*, 4H, H-15' and H-15''), 1.58 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 *br s*, (2H, H-4'''), 3.08 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.08 (*br s*, 2H, H-3), 3.28 (*br s*, 2H, H-3), 4.05 (*dd*, $J = 12.2$, 6.5 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (*br d*, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.77 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 682.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

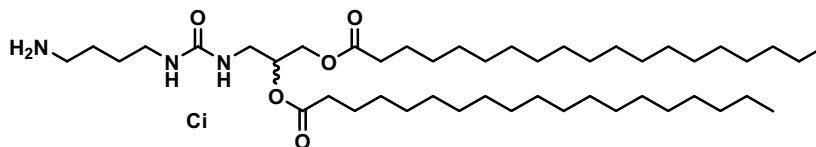


Compound Cg (31 mg from 140 mg of resin): 27% yield; IR: ν_{max} 3357, 2925, 2854, 1738, 1679, 1568, 1464, 1377, 1203, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (*t*, $J = 6.3$ Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (*s*, 28H, H-4'-H-6', H-13'-H-16', H-4''-H-6'' and H-13''-H-16''), 1.27 (*s*, 8H, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.38 (*br m*, 4H, H-17' and H-17''), 1.58 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 1.98 (*br m*, 8H, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.08 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.31 (*br s*, 2H, H-3), 4.05 (*dd*, $J = 12.1$, 7.0 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (*br d*, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 5.32 (*m*, 4H, H-8', H-9', H-8'' and H-9''), 7.83 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 734.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

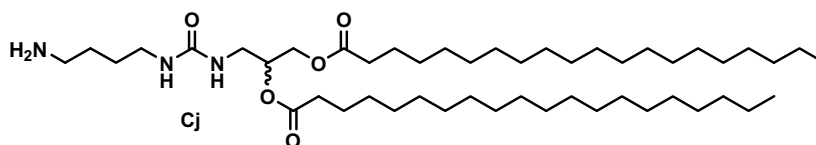


Compound Ch (37 mg from 114 mg of resin): 40% yield; IR: ν_{max} 3054, 2927, 2854, 1679, 1422, 1265, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.6$ Hz,

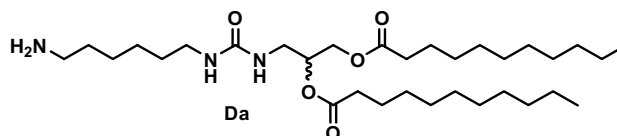
6H, H-18' and H-18''), 1.23 (*s*, 52H, H-4'-H-16' and H-4''-H-16''), 1.38 (*br m*, 4H, H-17' and H-17''), 1.55 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.30 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.98 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.13 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.30 (*br s*, 2H, H-3), 4.04 (*dd*, $J = 12.3, 6.5$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (*br d*, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.57 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 738.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



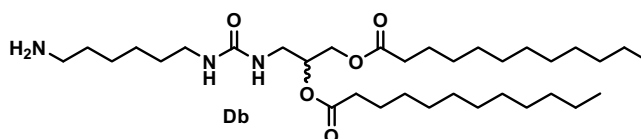
Compound Ci (48 mg from 110 mg of resin): 51% yield; IR: ν_{max} 3054, 2926, 2860, 1740, 1678, 1421, 1265, 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-19' and H-19''), 1.23 (*s*, 56H, H-4'-H-17' and H-4''-H-17''), 1.38 (*br m*, 4H, H-18' and H-18''), 1.60 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.29 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.94 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.09 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.27 (*br s*, 2H, H-3), 4.05 (*dd*, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 1H, H-1a), 4.25 (*br d*, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.71 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 766.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



Compound Cj (16 mg from 128 mg of resin): 15% yield; IR: ν_{max} 3054, 2926, 2854, 1679, 1422, 1265, 1203, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-20' and H-20''), 1.24 (*s*, 60H, H-4'-H-18' and H-4''-H-18''), 1.38 (*br m*, 4H, H-19' and H-19''), 1.58 (*m*, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.30 (*m*, 4H, H-2' and H-2''), 2.95 (*br s*, 2H, H-4'''), 3.10 (*br s*, 2H, H-1'''), 3.30 (*br s*, 2H, H-3), 4.05 (*dd*, $J = 12.3, 6.5$ Hz, 1H, H-1a), 4.23 (*br d*, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (*br s*, 1H, H-2), 7.73 (*br s*, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 794.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 58%).

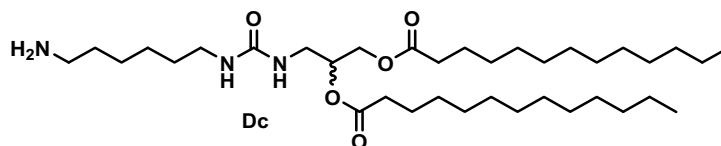


Compound Da (21.2 mg from 124.5 mg of resin): 27% yield; IR: ν_{max} 3343, 2925, 2855, 1740, 1679, 1572, 1466, 1380, 1202, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, $J = 6.6$ Hz, H-11' and H-11''), 1.23 (24H, *s*, H-4'-H-9' and H-4''-H-9''), 1.35 (4H, *br m*, H-10' and H-10''), 1.36 (2H, *br s*, H-4'''), 1.47 (2H, *br m*, H-2'''), 1.57 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.65 (2H, *br m*, H-5'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.98 (2H, *br s*, H-6'''), 3.10 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, $J = 5.5$ Hz, H-3), 4.09 (1H, *dd*, $J = 12.0, 6.1$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, $J = 12.1, 2.8$ Hz, H-1b), 5.00 (1H, *br s*, H-2), 7.65 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 570.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

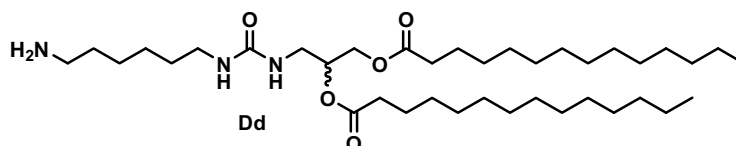


Compound Db (23.0 mg from 132.5 mg resin): 26% yield; IR: ν_{max} 3350, 2925, 2854, 1730, 1678, 1571, 1466, 1373, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, $J = 6.7$ Hz, H-12' and H-12''), 1.23 (28H, *s*, H-4'-H-10' and H-4''-H-10''), 1.35 (4H, *br m*, H-11' and H-11''), 1.36 (2H, *br s*, H-4'''), 1.47 (2H, *br m*, H-2'''), 1.57 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.65 (2H, *br m*, H-5'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.98 (2H, *br s*, H-6'''), 3.10 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, $J = 5.5$ Hz, H-3), 4.09 (1H, *dd*, $J = 12.0, 6.1$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, $J = 12.1, 2.8$ Hz, H-1b), 5.00 (1H, *br s*, H-2), 7.65 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 570.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

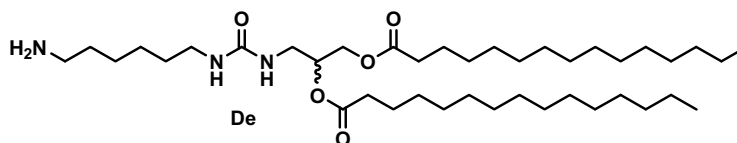
11"), 1.38 (2H, *br s*, H-4'''), 1.48 (2H, *br m*, H-2'''), 1.57 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.65 (2H, *br m*, H-5'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.98 (2H, *br s*, H-6'''), 3.10 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, $J = 5.6$ Hz, H-3), 4.09 (1H, *dd*, $J = 12.0, 6.1$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, $J = 12.0, 2.9$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.64 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 598.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



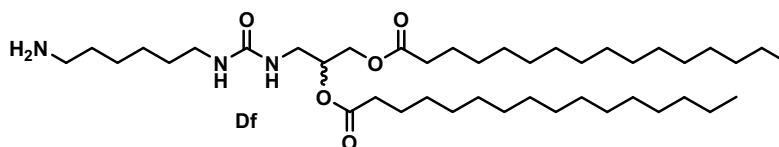
Compound Dc (20.9 mg FROM resin 124.3 mg): 24% yield; IR: ν_{max} 3357, 2924, 2854, 1730, 1679, 1572, 1466, 1378, 1251, 1202, 1141 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.7$ Hz, H-13' and H-13''), 1.23 (32H, *s*, H-4'-H-11' and H-4''-H-11''), 1.38 (4H, *br m*, H-12' and H-12''), 1.38 (2H, *br s*, H-4'''), 1.48 (2H, *br m*, H-2'''), 1.57 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.65 (2H, *br m*, H-5'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.98 (2H, *br s*, H-6'''), 3.10 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.32 (2H, *br d*, $J = 5.5$ Hz, H-3), 4.09 (1H, *dd*, $J = 12.0, 6.2$ Hz, H-1a), 4.25 (1H, *dd*, $J = 12.0, 2.8$ Hz, H-1b), 5.00 (1H, *br s*, H-2), 7.69 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 626.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



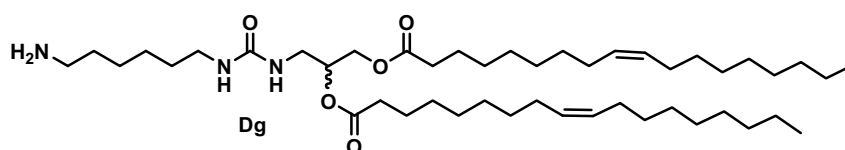
Compound Dd (28.0 mg from resin 125.9 mg): 31% yield; IR: ν_{max} 3350, 2918, 2850, 1678, 1568, 1466, 1428, 1202, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.6$ Hz, H-14' and H-14''), 1.23 (36H, *s*, H-4'-H-12' and H-4''-H-12''), 1.32 (2H, *br s*, H-4'''), 1.37 (4H, *br m*, H-13' and H-13''), 1.48 (2H, *br m*, H-2'''), 1.57 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.65 (2H, *br m*, H-5'''), 2.30 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.98 (2H, *br s*, H-6'''), 3.11 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, $J = 5.5$ Hz, 2H, H-3), 4.09 (1H, *dd*, $J = 12.1, 6.1$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, $J = 12.1, 4.1$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.63 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 654.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



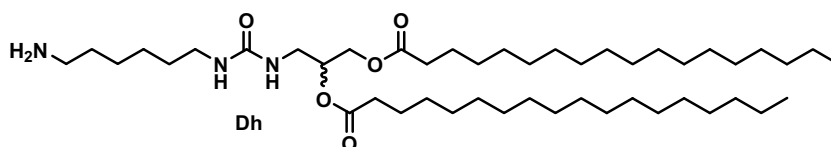
Compound De (24.4 mg from resin 125.6 mg): 25% yield; IR: ν_{max} 3357, 2918, 2850, 1732, 1678, 1564, 1467, 1266, 1202, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.7$ Hz, H-15' and H-15''), 1.23 (40H, *s*, H-4'-H-13' and H-4''-H-13''), 1.35 (4H, *br m*, H-14' and H-14''), 1.38 (2H, *br s*, H-4'''), 1.49 (2H, *br m*, H-2'''), 1.57 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.66 (2H, *br m*, H-5'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.99 (2H, *br s*, H-6'''), 3.11 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, $J = 5.6$ Hz, H-3), 4.10 (1H, *dd*, $J = 12.1, 6.1$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, $J = 12.1, 2.9$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.61 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 682.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



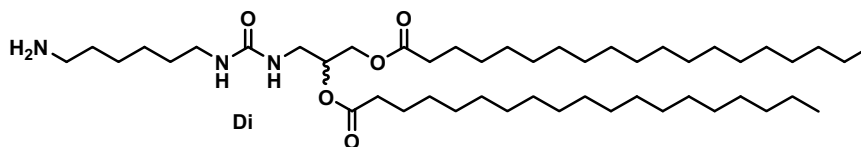
Compound Df (27.1 mg from resin 135.4 mg): 25% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2917, 2850, 1734, 1679, 1564, 1467, 1258, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, J = 6.6 Hz, H-16' and H-16''), 1.23 (44H, *s*, H-4'-H-14' and H-4''-H-14''), 1.33 (4H, *br m*, H-15' and H-15''), 1.37 (2H, *br s*, H-4'''), 1.49 (2H, *br m*, H-2'''), 1.56 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.66 (2H, *br m*, H-5'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 3.00 (2H, *br s*, H-6'''), 3.11 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.32 (2H, *br d*, J = 5.5 Hz, H-3), 4.10 (1H, *dd*, J = 12.1, 6.1 Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, J = 12.1, 2.8 Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.57 (3H, *br s*, 3H, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 710.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



Compound Dg (24.3 mg from resin 139.2 mg): 21% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2925, 2854, 1745, 1679, 1572, 1465, 1378, 1202, 1139 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, J = 6.6 Hz, H-18' and H-18''), 1.24 (28H, *s*, H-4'-H-6', H-13'-H-16', H-4''-H-6'' and H-13''-H-16''), 1.27 (8H, *s*, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.34 (4H, *br m*, H-17' and H-17''), 1.37 (2H, *br s*, H-4'''), 1.48 (2H, *br m*, H-2'''), 1.57 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.65 (2H, *br m*, H-5'''), 1.99 (8H, *br m*, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.30 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.99 (2H, *br s*, H-6'''), 3.11 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, J = 5.5 Hz, H-3), 4.10 (1H, *dd*, J = 12.1, 6.1 Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, J = 12.1, 2.8 Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 5.32 (4H, *m*, H-9', H-10', H-9'' and H-10''), 7.66 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 762.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

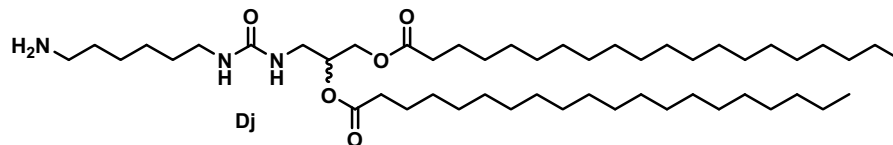


Compound Dh (27.9 mg from resin 126.3 mg): 26% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 3047, 2922, 2852, 1679, 1568, 1466, 1265, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, J = 6.9 Hz, H-18' and H-18''), 1.24 (52H, *s*, H-4'-H-16' and H-4''-H-16''), 1.34 (2H, *br s*, H-4'''), 1.38 (4H, *br m*, H-17' and H-17''), 1.49 (2H, *br m*, H-2'''), 1.58 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.69 (2H, *br m*, H-5'''), 2.30 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.99 (2H, *br s*, H-6'''), 3.10 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.32 (2H, *br d*, J = 5.2 Hz, H-3), 4.10 (1H, *dd*, J = 12.1, 5.7 Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, J = 12.1, 6.1 Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.55 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 766.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

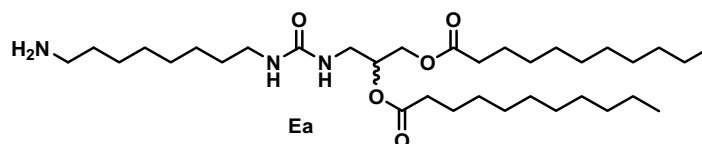


Compound Di (29.5 mg from resin 130.8 mg): 26% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3333, 3054, 2922, 2852, 1738, 1678, 1568, 1422, 1265, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, J = 6.7 Hz, H-19' and H-19''), 1.23 (56H, *s*, H-4'-H-17' and H-4''-H-17''), 1.35 (4H, *br m*, H-18' and H-18''), 1.38 (2H, *br s*, H-4'''), 1.49 (2H, *br m*, H-2'''), 1.57 (4H, *br m*, H-3' and H-3''),

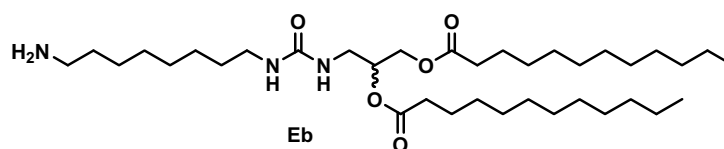
1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.66 (2H, *br m*, H-5'''), 2.30 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.99 (2H, *br s*, H-6'''), 3.11 (2H, *br t*, H-1'''), 3.32 (2H, *br d*, $J = 5.4$ Hz, H-3), 4.10 (1H, *dd*, $J = 12.1, 6.1$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *dd*, $J = 12.1, 2.8$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.58 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 794.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



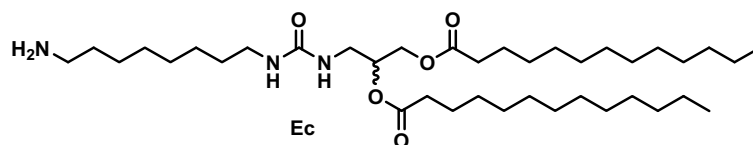
Compound Dj (27.1 mg from resin 117.8 mg): 25% yield; IR: ν_{max} 3054, 2926, 2854, 1728, 1679, 1422, 1265, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, $J = 6.4$ Hz, H-20' and H-20''), 1.25 (60H, *s*, H-4'–H-18' and H-4''–H-18''), 1.35 (2H, *br s*, H-4'''), 1.38 (4H, *br m*, H-19' and H-19''), 1.51 (2H, *br m*, H-2'''), 1.58 (4H, *br m*, H-3' and H-3''), 1.50-1.60 (overlapping, 2H, *m*, H-3'''), 1.68 (2H, *br m*, H-5'''), 2.30 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 3.01 (2H, *br s*, H-6'''), 3.12 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.32 (2H, *br d*, $J = 5.2$ Hz, H-3), 4.11 (1H, *dd*, $J = 12.1, 6.1$ Hz, H-1a), 4.25 (1H, *dd*, $J = 12.1, 6.1$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.56 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 822.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



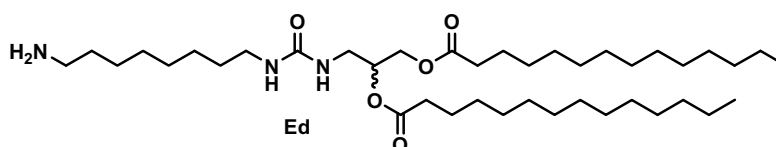
Compound Ea (17.7 mg from resin 122.4 mg): 22% yield; IR: ν_{max} 3357, 2925, 2854, 1734, 1678, 1572, 1466, 1369, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, $J = 6.4$ Hz, H-11' and H-11''), 1.23 (overlapping, 32H, *s*, H-4'–H-9', H-4''–H-9'' and H-3'''–H-6'''), 1.45 (4H, *br m*, H-10' and H-10''), 1.57 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.30 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.93 (2H, *br s*, H-8'''), 3.08 (2H, *br t*, H-1'''), 3.32 (2H, *br d*, $J = 4.8$ Hz, H-3), 4.11 (1H, *dd*, $J = 12.0, 6.1$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, $J = 9.2$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.71 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 598.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



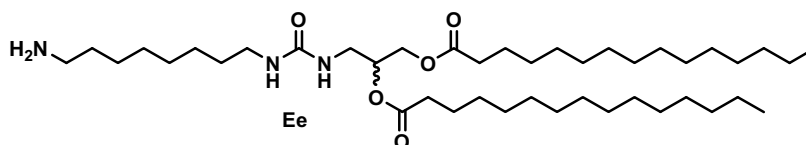
Compound Eb (16.9 mg from resin 133.6 mg): 18% yield; IR: ν_{max} 3357, 2925, 2854, 1734, 1678, 1571, 1466, 1377, 1203, 1139 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, $J = 6.4$ Hz, H-12' and H-12''), 1.23 (overlapping, 36H, *s*, H-4'–H-10', H-4''–H-10'' and H-3'''–H-6'''), 1.44 (4H, *br m*, H-11' and H-11''), 1.58 (overlapping, 8H, *m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.31 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.93 (2H, *br s*, H-8'''), 3.07 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, $J = 4.8$ Hz, H-3), 4.10 (1H, *dd*, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, $J = 9.5$ Hz, H-1b), 4.99 (*br s*, 1H, H-2), 7.80 (*br s*, 3H, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 626.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



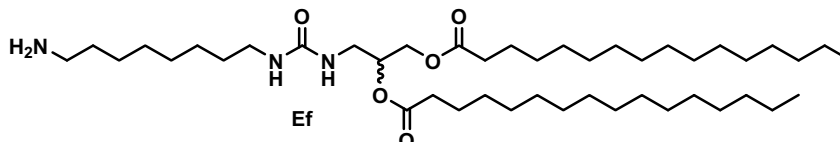
Compound Ec (17.5 mg from resin 124.1 mg): 20% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2925, 2854, 1727, 1678, 1568, 1466, 1373, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.4$ Hz, H-13' and H-13''), 1.23 (overlapping, 40H, *s*, H-4'-H-11', H-4''-H-11'' and H-3'''-H-6'''), 1.45 (4H, *br m*, H-12' and H-12''), 1.58 (overlapping, 8H, *m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.31 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.94 (2H, *br s*, H-8'''), 3.08 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.32 (2H, *br d*, $J = 4.7$ Hz, H-3), 4.11 (1H, *dd*, $J = 12.0, 5.9$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, $J = 9.3$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, 1H, H-2), 7.70 (*br s*, 3H, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 654.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



Compound Ed (21.4 mg from resin 126.0 mg): 23% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3354, 2920, 2851, 1738, 1678, 1574, 1467, 1378, 1203, 1139 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.4$ Hz, H-14' and H-14''), 1.23 (overlapping, 44H, *s*, H-4'-H-12', H-4''-H-12'' and H-3'''-H-6'''), 1.44 (4H, *br m*, H-13' and H-13''), 1.57 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.92 (2H, *br s*, H-8'''), 3.07 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, $J = 5.3$ Hz, 2H, H-3), 4.12 (1H, *dd*, $J = 12.1, 6.0$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, $J = 11.6$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.72 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 682.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

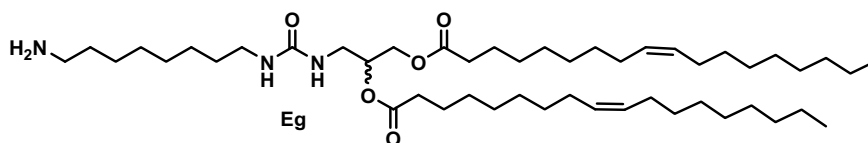


Compound Ee (18.9 mg from resin 122.8 mg): 20% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3343, 2918, 2850, 1737, 1675, 1568, 1467, 1373, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.5$ Hz, H-15' and H-15''), 1.23 (overlapping, 48H, *s*, H-4'-H-13', H-4''-H-13'' and H-3'''-H-6'''), 1.43 (4H, *br m*, H-14' and H-14''), 1.57 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.92 (2H, *br s*, H-8'''), 3.06 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br d*, $J = 5.2$ Hz, H-3), 4.10 (1H, *dd*, $J = 12.0, 6.1$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, $J = 9.5$ Hz, H-1b), 5.00 (1H, *br s*, H-2), 7.83 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 710.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

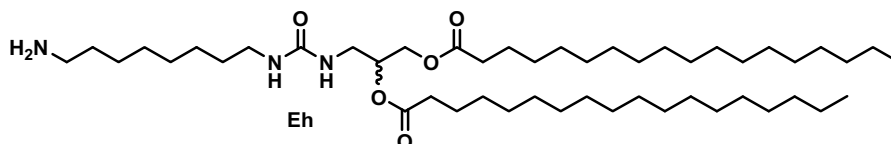


Compound Ef (25.7 mg from resin 117.5 mg): 27% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2918, 2850, 1738, 1682, 1576, 1466, 1265, 1202, 1139 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.5$ Hz, H-16' and H-16''), 1.23 (overlapping, 52H, *s*, H-4'-H-14', H-4''-H-14'' and H-3'''-H-6'''), 1.47 (4H, *br m*, H-15' and H-15''), 1.58 (overlapping, 8H, *m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.31 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.96 (2H, *br s*, H-8'''), 3.09 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.33 (2H, *br d*, $J = 5.3$ Hz, H-3), 4.12 (1H, *dd*, $J = 12.0, 5.9$ Hz, H-1a), 4.23 (1H, *br d*, $J = 9.0$ Hz,

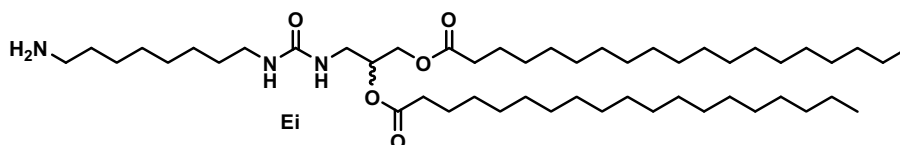
H-1b), 4.98 (1H, *br s*, H-2), 7.53 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 738.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



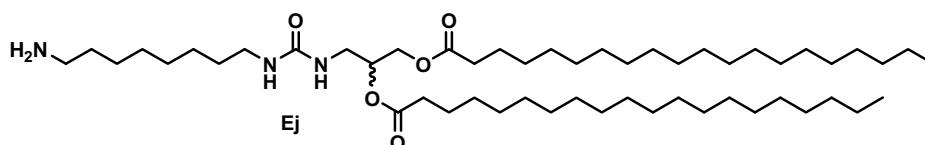
Compound Eg (20.5 mg from resin 130.8 mg): 18% yield; IR: ν_{max} 3350, 2925, 2854, 1738, 1679, 1571, 1464, 1377, 1202, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.2$ Hz, H-18' and H-18''), 1.24 (36H, *s*, H-4'-H-6', H-13'-H-16', H-4''-H-6'', H-13''-H-16'' and H-3'''-H-6'''), 1.27 (8H, *s*, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.45 (4H, *br m*, H-17' and H-17''), 1.57 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 1.98 (8H, *br m*, 8H, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.31 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.93 (2H, *br s*, H-8'''), 3.08 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.32 (2H, *br d*, $J = 4.4$ Hz, H-3), 4.41 (1H, *dd*, $J = 11.7, 5.8$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, $J = 9.5$ Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 5.33 (4H, *m*, H-8', H-9', H-8'' and H-9''), 7.74 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 790.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



Compound Eh (27.3 mg from resin 136.3 mg): 23% yield; IR: ν_{max} 3300, 3054, 2925, 2853, 1740, 1678, 1568, 1466, 1417, 1265, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 5.9$ Hz, H-18' and H-18''), 1.23 (overlapping, 60H, *s*, H-4'-H-16', H-4''-H-16'' and H-3'''-H-6'''), 1.49 (4H, *br m*, H-17' and H-17''), 1.59 (overlapping, 8H, *m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.33 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.99 (2H, *br s*, H-8'''), 3.11 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.34 (2H, *br d*, $J = 6.5$ Hz, H-3), 4.13 (1H, *dd*, $J = 12.1, 6.0$ Hz, H-1a), 4.23 (1H, *br d*, $J = 8.9$ Hz, H-1b), 4.97 (1H, *br s*, H-2), 7.40 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 794.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

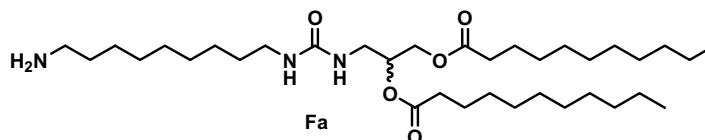


Compound Ei (24.8 mg from resin 124.6 mg): 22% yield; IR: ν_{max} 3350, 3054, 2922, 2851, 1736, 1670, 1422, 1265, 1200 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.5$ Hz, H-19' and H-19''), 1.23 (overlapping, 64H, *s*, H-4'-H-17', H-4''-H-17'' and H-3'''-H-6'''), 1.47 (4H, *br m*, H-18' and H-18''), 1.57 (overlapping, 8H, *m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.32 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.95 (2H, *br s*, H-8'''), 3.09 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.33 (2H, *br d*, $J = 5.1$ Hz, H-3), 4.12 (1H, *dd*, $J = 11.9, 5.8$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, $J = 9.1$ Hz, H-1b), 4.98 (1H, *br s*, H-2), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 822.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

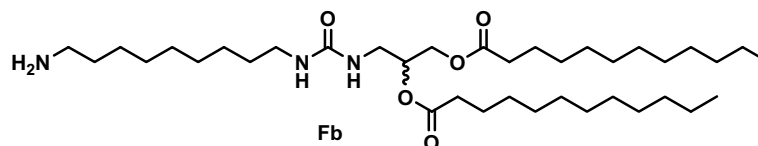


Compound Ej (23.8 mg from resin 119.1 mg): 22% yield; IR: ν_{max} 3357, 2928, 2853, 1735, 1679, 1574, 1422, 1265 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, $J = 6.5$ Hz, H-20' and H-

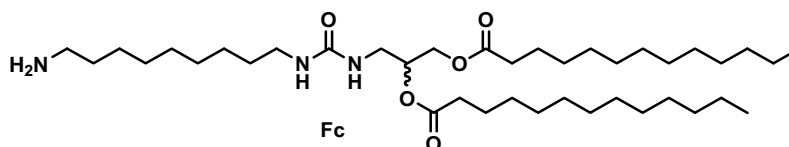
20"), 1.23 (overlapping, 68H, *s*, H-4'-H-18', H-4"-H-18" and H-3'''-H-6'''), 1.49 (4H, *br m*, H-19' and H-19''), 1.59 (overlapping, 8H, *m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.33 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.98 (2H, *br s*, H-8'''), 3.10 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.34 (2H, *br d*, $J = 5.2$ Hz, H-3), 4.13 (1H, *dd*, $J = 12.0, 5.8$ Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, $J = 9.0$ Hz, H-1b), 4.98 (1H, *br s*, H-2), 7.49 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 850.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



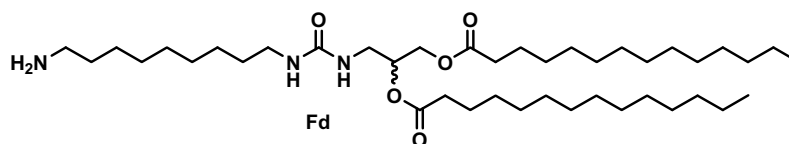
Compound Fa (38.2 mg from resin 155.0 mg): 37% yield; IR: ν_{max} 3350, 2925, 2855, 1735, 1678, 1564, 1466, 1373, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, $J = 6.5$ Hz, H-11' and H-11''), 1.23 (overlapping, 34H, *s*, H-4'-H-9', H-4"-H-9" and H-3'''-H-7'''), 1.44 (4H, *br m*, H-10' and H-10''), 1.57 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.92 (2H, *br s*, H-9'''), 3.07 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.32 (2H, *br s*, H-3), 4.07 (1H, *dd*, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-1a), 4.26 (1H, *br d*, $J = 8.5$ Hz, H-1b), 4.98 (1H, *br s*, H-2), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 612.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



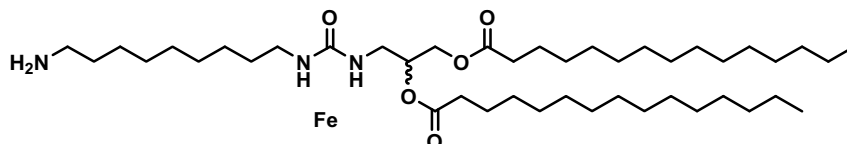
Compound Fb (35.4 mg from resin 129.3 mg): 39% yield; IR: ν_{max} 3366, 2923, 2853, 1741, 1687, 1466, 1373, 1204, 1174, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, $J = 6.3$ Hz, H-12' and H-12''), 1.23 (overlapping, 38H, *s*, H-4'-H-10', H-4"-H-10" and H-3'''-H-7'''), 1.44 (4H, *br m*, H-11' and H-11''), 1.56 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.91 (2H, *br s*, H-9'''), 3.06 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br s*, H-3), 4.01 (1H, *dd*, $J = 12.1, 6.0$ Hz, H-1a), 4.25 (1H, *br d*, $J = 9.0$ Hz, H-1b), 4.98 (1H, *br s*, H-2), 7.70 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 640.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



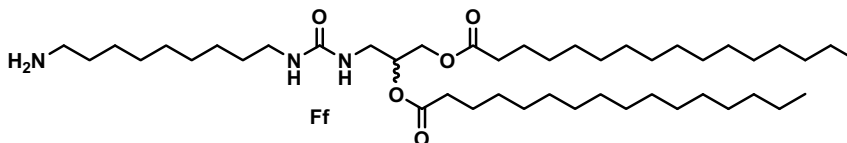
Compound Fc (38.9 mg from resin 147.4 mg): 36% yield; IR: ν_{max} 3350, 2924, 2853, 1741, 1682, 1571, 1466, 1377, 1203, 1174, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, $J = 6.6$ Hz, H-13' and H-13''), 1.23 (overlapping, 42H, *s*, H-4'-H-11', H-4"-H-11" and H-3'''-H-7'''), 1.44 (4H, *br m*, H-12' and H-12''), 1.57 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.29 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.92 (2H, *br s*, H-9'''), 3.06 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.31 (2H, *br s*, H-3), 4.06 (1H, *dd*, $J = 12.2, 6.0$ Hz, H-1a), 4.25 (1H, *br d*, $J = 9.0$ Hz, H-1b), 4.98 (1H, *br s*, H-2), 7.69 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 668.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



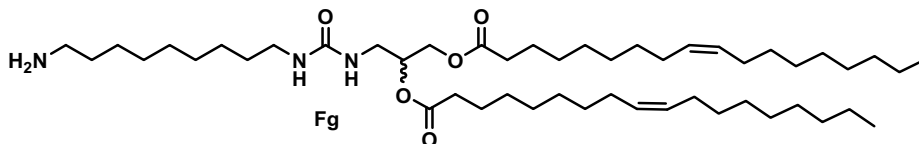
Compound Fd (30.5 mg from resin 133.1 mg): 30% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3359, 3190, 2923, 2853, 1738, 1660, 1633, 1467, 1421, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, J = 6.6 Hz, H-14' and H-14''), 1.23 (overlapping, 46H, *s*, H-4'–H-12', H-4''–H-12'' and H-3'''–H-7'''), 1.42 (4H, *br m*, H-13' and H-13''), 1.56 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.28 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.90 (2H, *br s*, H-9'''), 3.06 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.30 (2H, *br s*, H-3), 4.10 (1H, *dd*, J = 12.0, 6.0 Hz, H-1a), 4.25 (1H, *br d*, J = 8.5 Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.83 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 696.6 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (100).



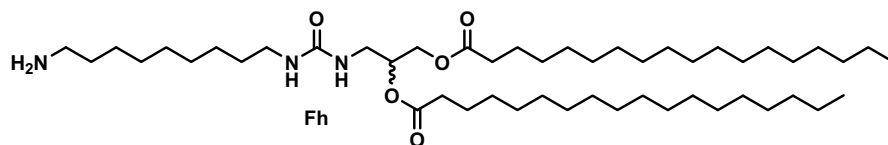
Compound Fe (40.8 mg from resin 139.5 mg): 37% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2918, 2850, 1737, 1686, 1660, 1406, 1376, 1202, 1177, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, J = 6.6 Hz, H-15' and H-15''), 1.23 (overlapping, 50H, *s*, H-4'–H-13', H-4''–H-13'' and H-3'''–H-7'''), 1.42 (4H, *br m*, H-14' and H-14''), 1.56 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.28 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.90 (2H, *br s*, H-9'''), 3.05 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.30 (2H, *br s*, H-3), 4.10 (1H, *dd*, J = 12.1, 6.0 Hz, H-1a), 4.25 (1H, *br d*, J = 8.5 Hz, H-1b), 5.00 (1H, *br s*, H-2), 7.80 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 724.8 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (100).



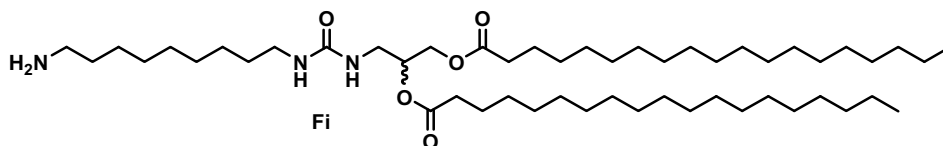
Compound Ff (37.6 mg from resin 142.4 mg): 32% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2918, 2850, 1737, 1661, 1466, 1177, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (6H, *t*, J = 6.5 Hz, H-16' and H-16''), 1.23 (overlapping, 54H, *s*, H-4'–H-14', H-4''–H-14'' and H-3'''–H-7'''), 1.43 (4H, *br m*, H-15' and H-15''), 1.56 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.28 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.91 (2H, *br s*, H-9'''), 3.06 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.30 (2H, *br s*, H-3), 4.11 (1H, *dd*, J = 12.0, 6.0 Hz, H-1a), 4.24 (1H, *br d*, J = 9.1 Hz, H-1b), 4.99 (1H, *br s*, H-2), 7.84 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 752.8 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (100).



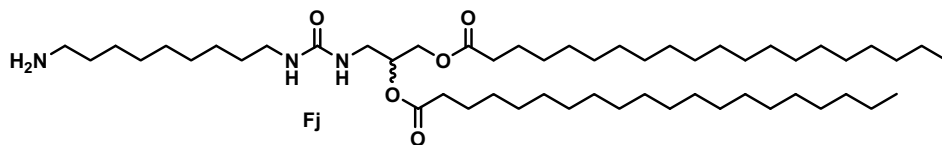
Compound Fg (36.3 mg from resin 146.6 mg): 28% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2925, 2854, 1735, 1675, 1464, 1376, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, J = 6.7 Hz, H-18' and H-18''), 1.24 (38H, *s*, H-4'–H-6', H-13'–H-16', H-4''–H-6'', H-13''–H-16'' and H-3'''–H-7'''), 1.27 (8H, *s*, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.44 (4H, *br m*, H-17' and H-17''), 1.58 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 1.99 (8H, *br m*, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.30 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.92 (2H, *br s*, H-9'''), 3.07 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.32 (2H, *br s*, H-3), 4.11 (1H, *dd*, J = 12.0, 6.0 Hz, H-1a), 4.22 (1H, *br d*, J = 9.0 Hz, H-1b), 4.98 (1H, *br s*, H-2), 5.32 (4H, *m*, H-9', H-10', H-9'' and H-10''), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 804.7 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (100).



Compound Fh (46.8 mg from resin 141.6 mg): 37% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2917, 2849, 1737, 1686, 1466, 1177, 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.84 (6H, *t*, J = 6.6 Hz, H-18' and H-18''), 1.22 (overlapping, 62H, *s*, H-4'–H-16', H-4''–H-16'' and H-3'''–H-7'''), 1.43 (4H, *br m*, H-17' and H-17''), 1.56 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.28 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.89 (2H, *br s*, H-9'''), 3.06 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.30 (2H, *br s*, H-3), 4.11 (1H, *dd*, J = 11.9, 6.0 Hz, H-1a), 4.26 (1H, *br d*, J = 9.5 Hz, H-1b), 4.98 (1H, *br s*, H-2), 7.79 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 808.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



Compound Fi (34.9 mg from resin 133.6 mg): 28% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 3054, 2924, 2851, 1736, 1686, 1466, 1422, 1265, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.86 (6H, *t*, J = 6.5 Hz, H-19' and H-19''), 1.23 (overlapping, 66H, *s*, H-4'–H-17', H-4''–H-17'' and H-3'''–H-7'''), 1.47 (4H, *br m*, H-18' and H-18''), 1.60 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.31 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.96 (2H, *br s*, H-9'''), 3.09 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.33 (2H, *br s*, H-3), 4.09 (1H, *dd*, J = 12.1, 6.0 Hz, H-1a), 4.23 (1H, *br d*, J = 8.5 Hz, H-1b), 4.97 (1H, *br s*, H-2), 7.47 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 836.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).



Compound Fj (40.5 mg from resin 158.6 mg): 27% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2916, 2845, 1740, 1699, 1679, 1463, 1265, 1200, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.84 (6H, *t*, J = 6.6 Hz, H-20' and H-20''), 1.21 (overlapping, 70H, *s*, H-4'–H-18', H-4''–H-18'' and H-3'''–H-7'''), 1.43 (4H, *br m*, H-19' and H-19''), 1.57 (overlapping, 8H, *br m*, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.27 (4H, *m*, H-2' and H-2''), 2.91 (2H, *br s*, H-9'''), 3.08 (2H, *br t-like*, H-1'''), 3.39 (2H, *br s*, H-3), 4.10 (1H, *dd*, J = 11.9, 5.9 Hz, H-1a), 4.26 (1H, *br d*, J = 8.5 Hz, H-1b), 5.01 (1H, *br s*, H-2), 7.74 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 864.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

การศึกษาการจับกับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก

นำไขมันประจุบวกที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดมาศึกษาการจับกับดีเอ็นเอ โดยผสมดีเอ็นเอและไขมันประจุบวกโดยอัตราส่วนต่อน้ำหนัก ที่สองอัตราส่วนคือ 1:10 และ 1:20 ที่อัตราส่วน 1:10 เตรียมโดยนำไขมันประจุบวกที่มีความเข้มข้น 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ใน PBS buffer มา 12.5 μl ใส่ลงใน Eppendorf tube และเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 37.5 μl นำดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 3 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ มาจำนวน 50 μl ผสมลงในสารละลายไขมันประจุบวกที่เตรียมไว้ข้างต้น สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอผสมกับไขมันประจุบวกในอัตราส่วน 1:20 ทำได้เช่นเดียวกับข้างต้น ยกเว้น ใช้ไขมันประจุบวก 50 μl

การเตรียมไลโปโซม

นำสารละลาย DOPE ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ที่มีความเข้มข้น 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ มาจำนวน 50 μl ใส่ลงใน Eppendorf ขนาด 1.5 mL เติมน้ำสารละลายไขมันประกอบในตัวทำละลาย ethanol ที่มีความเข้มข้น 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ มาจำนวน 50 μl เขย่าสารละลายให้เข้ากันดี ระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน และนำไประเหยภายใต้สุญญากาศอีกอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำสารที่ได้ที่มีลักษณะเป็นฟิล์มใสมาใส่ PBS buffer จำนวน 100 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง นำสารที่ได้มาปั่นด้วยเครื่อง vortex mixture แล้วนำสารที่ได้มา sonicate นาน 2x15 นาที

การเตรียมไลโปเพล็กซ์

นำไลโปโซมที่มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ปริมาณที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนต่อน้ำหนักของไลโปโซมต่อดีเอ็นเอที่ต้องการ มาผสมกับดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ จำนวน 0.4 μl ซึ่งเรียกสารผสมนี้ว่า ไลโปเพล็กซ์ ตั้งไลโปเพล็กซ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในเซลล์ที่พร้อมใช้งาน

การศึกษาการดีเอ็นเอเข้าเซลล์

เลี้ยง HEK293 เซลล์ในสารอาหาร DMEM ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ก๊าซ CO_2 5% นาน 24 ชม ถ่ายเซลล์ลงใน 96-well plate ให้มีจำนวนเซลล์แต่ละหลุมประมาณ 1×10^4 เซลล์ และเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณ 50-70% ของพื้นที่แต่ละหลุม (50-70% confluence) หลังจากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกล้างเซลล์ด้วย PBS buffer และใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มี serum ปริมาณ 100 μl หลังจากนั้นนำไลโปเพล็กซ์คือสารผสมของ ดีเอ็นเอ (pCH110-encoding β -galactosidase) และ ไลโปโซม (การเตรียมไลโปเพล็กซ์ได้กล่าวในหัวข้อข้างต้น) ใส่ลงในแต่ละหลุม ละ 10 μl แล้วบ่มเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ก๊าซ CO_2 5% นาน 48 ชม ดังนั้นแต่ละหลุมมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 1 μg เมื่อครบตามกำหนดเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS buffer และตรึงเซลล์ด้วย สารผสมของ 2% formaldehyde และ 0.05% glutaraldehyde in PBS buffer นาน 5 นาที หลังจากล้างเซลล์ เติม 100 μl ของ substrate/stain solution (1 mg/mL X-gal in stain solution; 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide และ 2 mM MgCl_2 และบ่มไว้ 2 ชม ล้างเซลล์ด้วย PBS buffer และนับจำนวนเซลล์ที่ถูกย้อมเป็นสีน้ำเงิน (หมายถึงเซลล์ที่ดีเอ็นเอถูกพาเข้าไปได้) ในการทดลองนี้ได้ใช้ EffecteneTM เป็นสารมาตรฐาน และคิดจำนวนเซลล์ที่ถูกพาเข้าเซลล์โดย EffecteneTM เป็น 100%

การศึกษาสัญญาณวิทยาของไลโปโซม

นำไลโปโซมที่เตรียมขึ้นใหม่มาศึกษาสัญญาณวิทยาโดยใช้กล้อง Transmission Electron Microscopy ด้วยเทคนิค negative stain

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของไขมันประจุบวก **Ab** และ **Bb** ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งทำการทดลองเทียบกับสารมาตรฐาน EffecteneTM, DOTAP และ DC-Chol ในการศึกษาปริมาณของสารที่ใช้เท่ากับปริมาณสารของไขมันประจุบวกที่ได้ปรับให้มีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ 3 ชนิดเซลล์คือ HEK293, PC-3 และ HeLa

สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

สังเคราะห์ไขมันประจุบวกด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็งได้ 60 สาร การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ¹H NMR และ MS สเปกโตรสโกปี ไขมันประจุบวก 9 สาร สามารถจับและยับยั้งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ และไขมันประจุบวกอีก 4 สาร สามารถจับและยับยั้งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้บางส่วน จากการทดสอบประสิทธิภาพในการพาดีนเอ็นเอเข้าเซลล์พบว่า ไขมันประจุบวก 4 สารมีประสิทธิภาพในการพาดีนเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ 60-70 % เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน EffecteneTM (ซึ่งให้ค่าประสิทธิภาพในการพาดีนเอ็นเอเข้าเซลล์เท่ากับ 100%) นำไขมันประจุบวกทั้ง 4 สารมาหาสภาวะในการพาดีนเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดีที่สุด ไขมันประจุบวก **Ab** และ **Bb** มีประสิทธิภาพในการพาดีนเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดีกว่า EffecteneTM 15 และ 20 เท่า ตามลำดับ ไขมันประจุบวก **Bb** มีประสิทธิภาพในการพาดีนเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 และ HeLa ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน EffecteneTM, DOTAP และ DC-Chol ข้อดีสำหรับไขมันประจุบวก **Bb** คือมีประสิทธิภาพในการพาดีนเอ็นเอเข้าเซลล์ได้สูงโดยไม่ต้องอาศัย co-lipid และสามารถทดลองได้ในสภาวะที่มี serum

โครงการย่อยที่ 2

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนไขมันส่วนหางแบบไม่สมมาตร

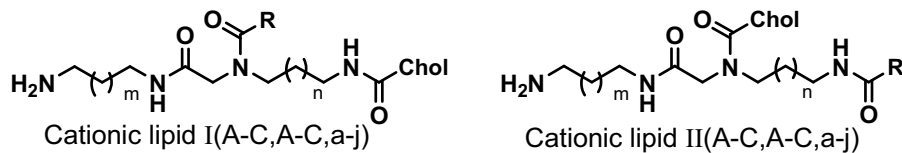
โครงการย่อยที่ 2

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนไขมันส่วนหางแบบไม่สมมาตร

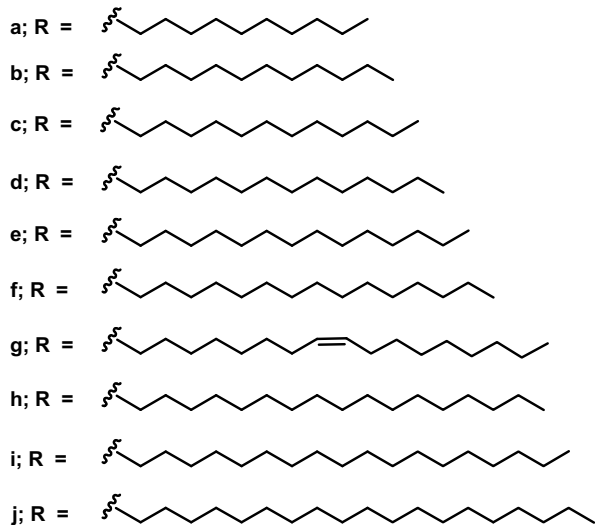
ผลการศึกษา

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก I(A-C,A-C,i-j) และ II(A-C,A-C,i-j)

จากการรายงานการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่ผ่านมาพบว่า ไขมันส่วนหางที่มีรายงานทั้งหมดประกอบ long chain fatty acid ทั้งสายเดี่ยว หรือ สายคู่ ซึ่งไขมันประจุบวกที่มีไขมันส่วนหางของ fatty acid สายคู่นี้ มีทั้งแบบสมมาตรและไม่สมมาตร ไขมันส่วนหางอีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานไว้คือ ไขมันส่วนหางที่ได้จาก cholesterol หรือ steroid ชนิดอื่น เนื่องจากยังไม่มีรายงานการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่ประกอบด้วยไขมันส่วนหางแบบผสมระหว่าง fatty acid และ steroid ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการสังเคราะห์และศึกษาประสิทธิภาพในการพาคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ ไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 2 นี้ มีสองกลุ่มย่อยคือ I(m,n,R) และ II(m,n,R) ดังรูปที่ 13

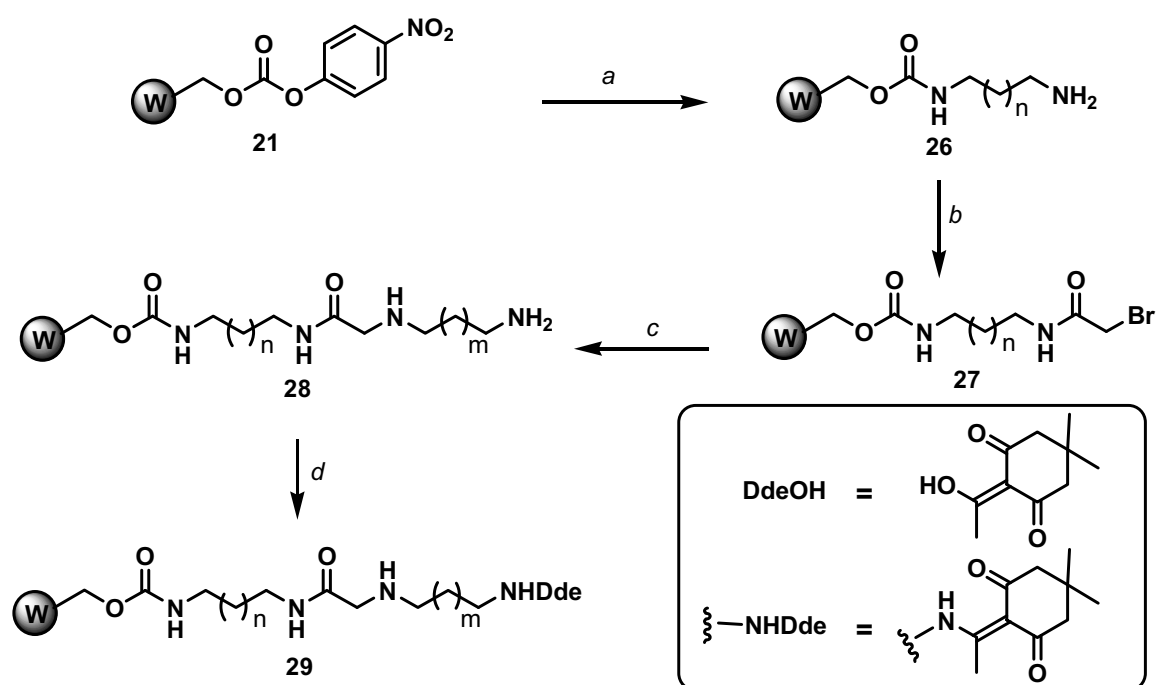


R = Fatty acids, Chol =



รูปที่ 13 โครงสร้างของไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 2

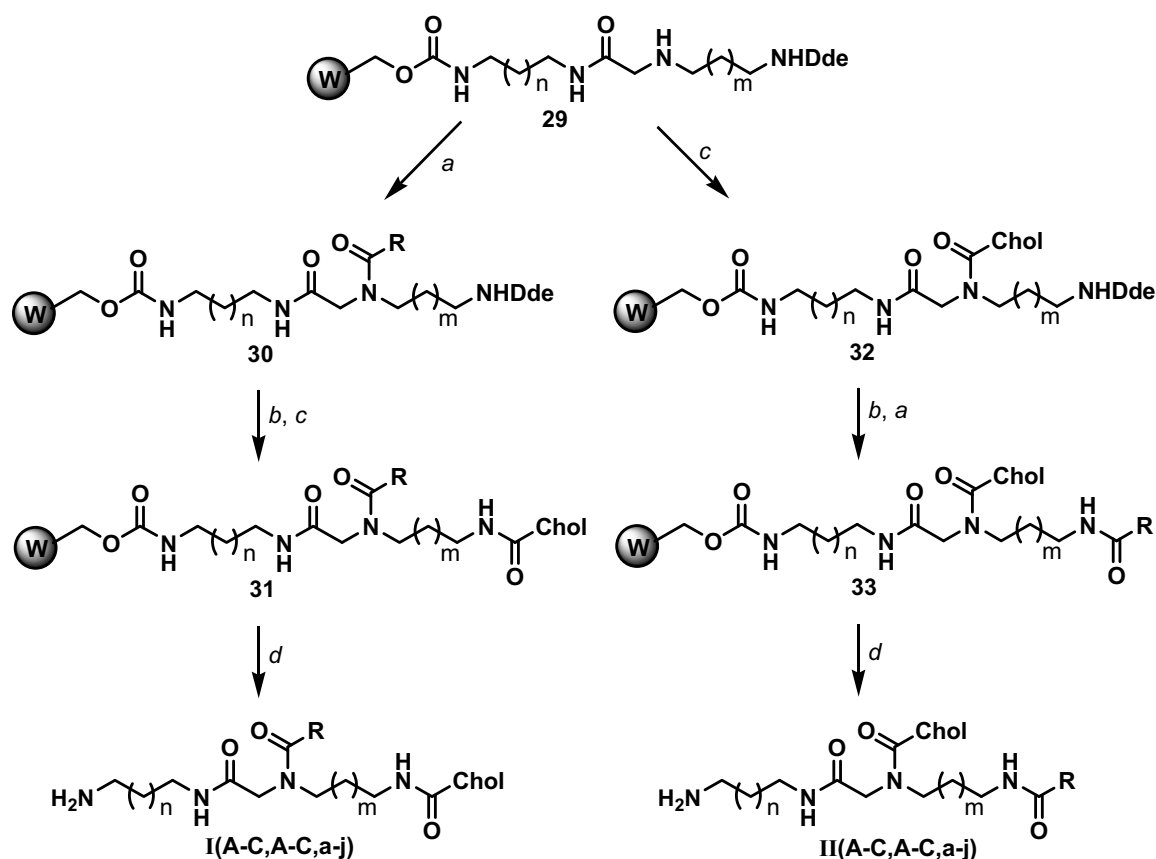
การสังเคราะห์สารกลุ่มที่ 2 ได้แสดงใน Scheme 3 และ Scheme 4 เริ่มจาก active carbonate resin (21) มาทำปฏิกิริยากับ diamine A-C ที่มากเกินไปในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมงได้ resin 26 หลังจากการล้างจน resin สะอาด สามารถยืนยันว่ามีหมู่เอมีนอิสระอีกด้านหนึ่งโดยการทดสอบด้วยสารทดสอบ ninhydrin³⁵ ซึ่งในที่นี้จะให้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม นำ resin 26 มาทำปฏิกิริยากับ bromoacetic acid โดยใช้ DIC เป็น coupling reagent เขย่าปฏิกิริยาเป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำ resin ที่ได้มาล้างตามปกติ ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ด้วยสารทดสอบ ninhydrin จะให้ผลเป็นลบ ได้ผลิตภัณฑ์ 27 นำ resin 27 มาทำปฏิกิริยากับ diamine A-C ที่มากเกินไปในตัวทำละลาย DMF เป็นเวลา 16 ชั่วโมงได้ resin 28 นำ resin 28 มาทำปฏิกิริยากับ Dde-OH เพื่อทำการป้องกันหมู่ primary amine อย่างเฉพาะเจาะจง ได้ resin 29



Scheme 3 Reagents and conditions: a) diamine, CH_2Cl_2 , 16 h.; b) bromoacetic acid, DIC, CH_2Cl_2 , 16 h.; c) diamine, DMF, 16 h.; d) Dde-OH, MeOH, CH_2Cl_2 , 16 h.

resin 29 นี้ใช้สำหรับการสังเคราะห์การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกกลุ่มย่อยทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งแสดงดัง Scheme 4 การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก I(A-C,A-C,a-j) เริ่มจากนำ resin 29 มาทำปฏิกิริยากับ fatty acid a-j โดยใช้ DIC เป็น coupling agent ได้ resin 30 เอาหมู่ป้องกัน Dde ออกด้วย 5% $\text{N}_2\text{H}_4/\text{DMF}$ และทำปฏิกิริยาต่อกับ cholesteryl chloroformate โดยใช้ pyridine เป็นเบส ทำปฏิกิริยาข้ามคืนได้ผลิตภัณฑ์ resin 31 นำ resin ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ 20% TFA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 นาน 2 ชั่วโมง หลังจากกระเหยตัวทำละลายออกจะได้ผลิตภัณฑ์ I(A-C,A-C,a-j) (ดู Scheme 4)

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก II(A-C,A-C,a-j) ทำได้เช่นเดียวกัน โดยใส่ไขมันส่วนหางที่เป็น cholesterol ก่อน fatty acid โดยการสังเคราะห์ทำได้ดังนี้ นำ resin 29 มาทำปฏิกิริยากับ cholesteryl chloroformate โดยใช้ pyridine เป็นเบส ได้ resin 32 เอาหมู่ป้องกัน Dde ออกด้วย 5% N₂H₄/DMF และทำปฏิกิริยากับ fatty acid a-j โดยใช้ DIC เป็น coupling agent ได้ resin 33 นำ resin ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ 20% TFA ในตัวทำละลาย CH₂Cl₂ นาน 2 ชั่วโมง หลังจากกระเหยตัวทำละลายออกจะได้ผลิตภัณฑ์ II(A-C,A-C,a-j) (ดู Scheme 4)



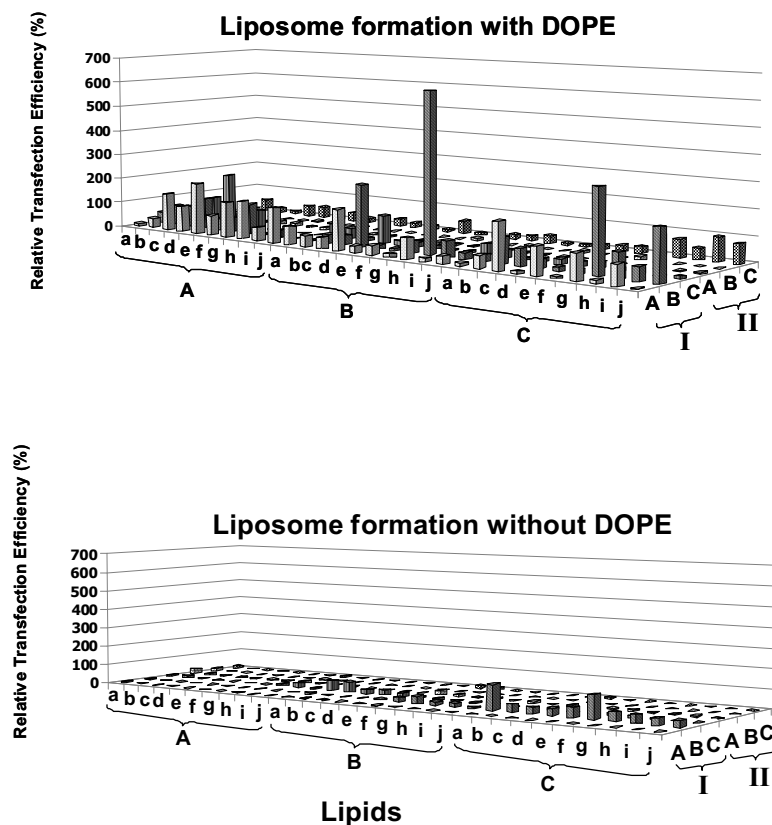
Scheme 4 Reagents and conditions: a) Fatty acid (a-j), DIC, CH₂Cl₂, 16 h.; b) 5% N₂H₄/DMF; c) Cholesteryl chloroformate, Pyridine, CH₂Cl₂; d) 20%TFA/ CH₂Cl₂, 2 h.

ไขมันประจุบวก I(A-C,A-C,a-j) ที่สังเคราะห์ได้มี 90 สาร และไขมันประจุบวก II(A-C,A-C,a-j) ที่สังเคราะห์ได้มี 90 สาร รวมไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 2 ที่สังเคราะห์ได้รวม 180 สาร สารที่สังเคราะห์ได้มีเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ปานกลางถึงสูงมาก ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิค IR, NMR และ MS ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้ตรงตามโครงสร้างที่สังเคราะห์

การศึกษาการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก I(A-C,A-C,i-j) และ II(A-C,A-C,i-j)

การศึกษาเบื้องต้น

เบื้องต้น นำไขมันประจุบวกที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด มาทดสอบการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ human embryonic kidney (HEK293) นำไขมันประจุบวกมาเตรียมเป็นไลโปโซม โดยเตรียมทั้งแบบใช้และไม่ใช้ DOPE เป็นไขมันตัวช่วย ไลโปโซมที่เตรียมโดยใช้ไขมันตัวช่วย เตรียมโดยผสมไขมันประจุบวกต่อ DOPE ในอัตราส่วน 1:2 โดยน้ำหนัก นำไลโปโซมที่เตรียมได้มาผสมกับคิเอ็นเอ (อัตราส่วนโดยน้ำหนัก) 1:20 โดยมีปริมาณคิเอ็นเอเท่ากับ 0.1 μg และใช้ EffecteneTM เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ และให้มีประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เท่ากับ 100% ผลการทดลองแสดงใน รูปที่ 14 จากการทดลองพบว่าไขมันประจุบวก 8 ชนิดคือ **IAAc, IAAe, IABd, IACc, IBbD, IBbH, IBCh และ IBCj** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่ HEK293 cell ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน effectene และพบว่าในการเตรียมไลโปโซมจากไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิดนี้ จำเป็นต้องใช้ DOPE ซึ่งเป็นไขมันตัวช่วย

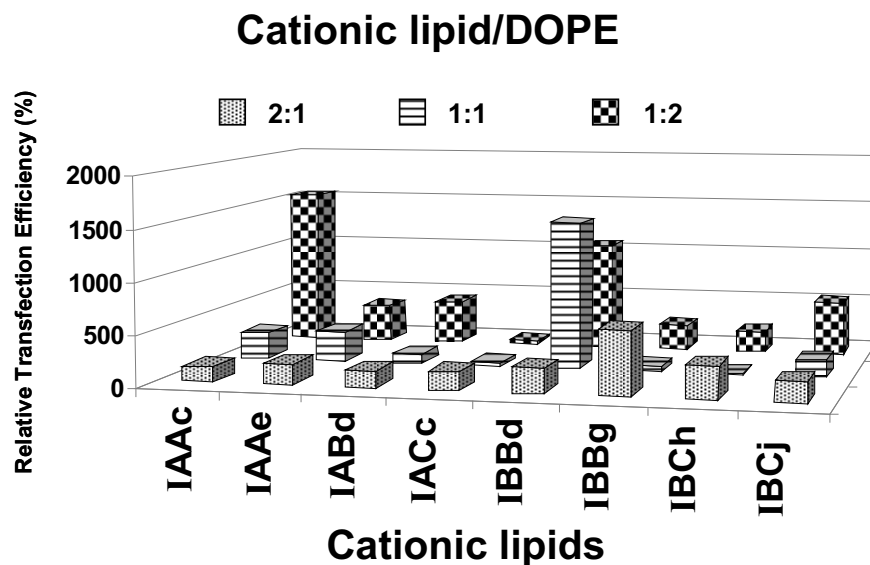


รูปที่ 14 ผลการทดสอบการพาคีเอ็นเอเข้าสู่ HEK293 cell ของไขมันประจุบวก

การศึกษาสถานะที่ทำให้ไขมันประจุบวกมีประสิทธิภาพการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีเลิศ

การศึกษาอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย (helper lipid, DOPE)

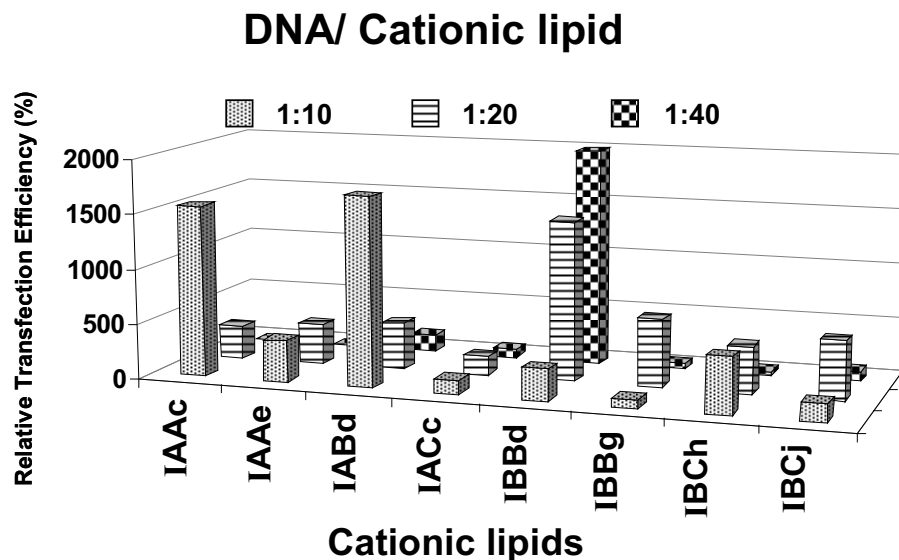
จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ไขมันประจุบวก 8 ชนิดพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีเมื่อใช้ DOPE เป็นไขมันตัวช่วย เพื่อศึกษาอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วยที่เหมาะสมของแต่ละสาร จึงนำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิดมาเตรียมไลโปโซมโดยใช้ไขมันตัวช่วยอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ ไขมันประจุบวก/DOPE 2:1, 1:1 และ 1:2 ในการทดลองนี้ใช้อัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมเท่ากับ 1:20 (โดยน้ำหนัก) และใช้ Effectene™ เป็นสารมาตรฐานเทียบ และคำนวณให้มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เท่ากับ 100% ผลการทดลองแสดงดัง **รูปที่ 15** จากผลการทดลองพบว่าไขมันประจุบวก **IAAc**, **IAAe**, **IABd** และ **IBCb** มีประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อเตรียมไลโปโซมโดยใช้อัตราส่วน ไขมันประจุบวกต่อDOPE 1:2 ในขณะที่ไขมันประจุบวก **IBBg** และ **IBCh** มีประสิทธิภาพดีเมื่อเตรียมไลโปโซมโดยใช้อัตราส่วนต่อ DOPE เท่ากับ 2:1 สำหรับไขมันประจุบวก **IBBd** ใช้ DOPE อัตราส่วน 1:1



รูปที่ 15 การศึกษาผลของอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วยต่อการพาดีเอ็นเอเข้าสู่ HEK293 cell

การศึกษาอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม

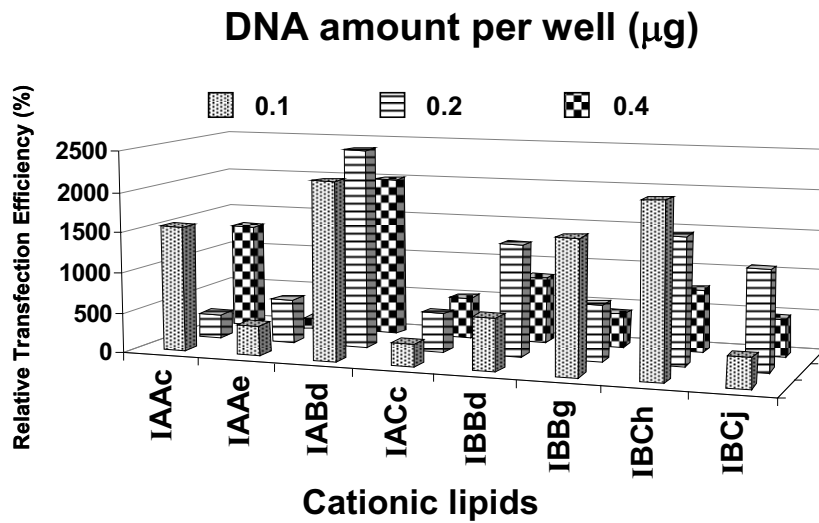
นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิด เตรียมเป็นไลโปโซม โดยใช้ไขมันตัวช่วยในอัตราส่วนที่เหมาะสม (ดังรูปที่ 15) มาศึกษาอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมที่ทำให้ประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด ในการทดลองนี้ใช้ปริมาณดีเอ็นเอคงที่ ๆ 0.1 µg/well และปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซม 1:10, 1:20 และ 1:40 ต่อน้ำหนัก และใช้ Effectene™ เป็นสารมาตรฐาน โดยคำนวณให้มีประสิทธิภาพเท่ากับ 100% ผลการทดลองแสดงดัง **รูปที่ 16** ไขมันประจุ



รูปที่ 16 การศึกษาผลของอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมต่อการพาดิเอ็นเอเข้าสู่ HEK293 cell

การศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอ

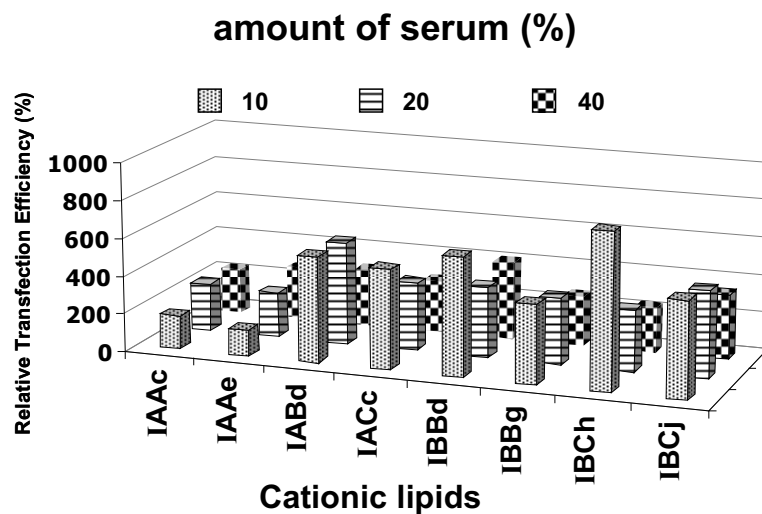
เพื่อศึกษาผลของปริมาณของดีเอ็นเอต่อประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ ได้นำสภาวะจากการทดลองในตอนต้น (รูปที่ 15 และ 16) มาใช้ โดยปรับเปลี่ยนปริมาณดีเอ็นเอจาก 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ เป็น 0.2 $\mu\text{g}/\text{well}$ และ 0.4 $\mu\text{g}/\text{well}$ และใช้ EffecteneTM เป็นสารมาตรฐานที่มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ 100% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 17 จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอและชนิดของไลโปโซม ไขมันประจุบวก **IBBg** และ **IBCh** ประสิทธิภาพของการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ลดลงเมื่อปริมาณของดีเอ็นเอมากขึ้น ไขมันประจุบวก **IAAe**, **IABd**, **IBBd** และ **IBCj** มีประสิทธิภาพของการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ดีเมื่อใช้ปริมาณของดีเอ็นเอ 0.2 $\mu\text{g}/\text{well}$ นำผลของปริมาณดีเอ็นเอที่ให้ประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าเซลล์ได้ดีของแต่ละไขมันประจุบวกไปใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 17 การศึกษาผลของอัตราส่วนของดีเอ็นเอต่อไลโปโซมต่อการพาดิเอ็นเอเข้าสู่ HEK293 cell

การศึกษาผลของ serum ต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

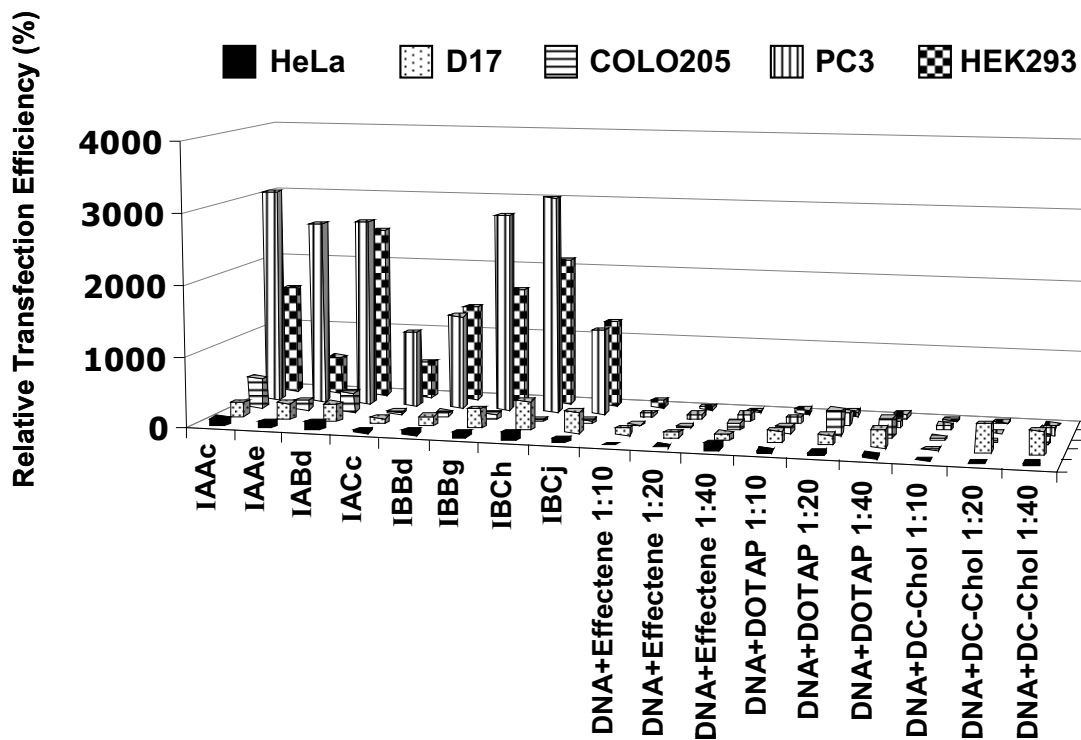
เพื่อศึกษาผลของปริมาณ serum ที่มีต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก ได้นำสภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองดังรูปที่ 15-17 มาใช้ในการศึกษา โดยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ serum จาก 10%, 20% และ 40% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 18 จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการทดลองโดยมีปริมาณ serum 10% ทำให้ประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกทุกชนิดลดลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าไขมันประจุบวกกลุ่มนี้ไม่เหมาะกับการทดลองในสภาวะที่มี serum



รูปที่ 18 การศึกษาผลของปริมาณ serum ต่อประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

การศึกษาประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆ

เพื่อศึกษาผลของชนิดเซลล์ที่มีต่อประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอของไขมันประจุบวก นำไขมันประจุบวกที่ 8 ชนิดมาทดลองประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆดังนี้ HEK293 (Human embryonic kidney), PC3 (human prostate adenocarcinoma), HeLa (human cervical adenocarcinoma), COLO205 (colorectal adenocarcinoma) และ D17 (canine osteosarcoma) การทดลองนี้ทดลองในสภาวะที่ไม่มี serum และใช้สารมาตรฐาน 3 ชนิดคือ Effectene™, DOTAP และ DC-Chol ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 19 จากการทดลองพบว่าสารส่วนมากในกลุ่มนี้สามารถพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ PC3 และ HEK293 ได้ดีกว่า การพาดิเข้าสู่ D17, COLO205 และ HeLa และดีกว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดอย่างมาก

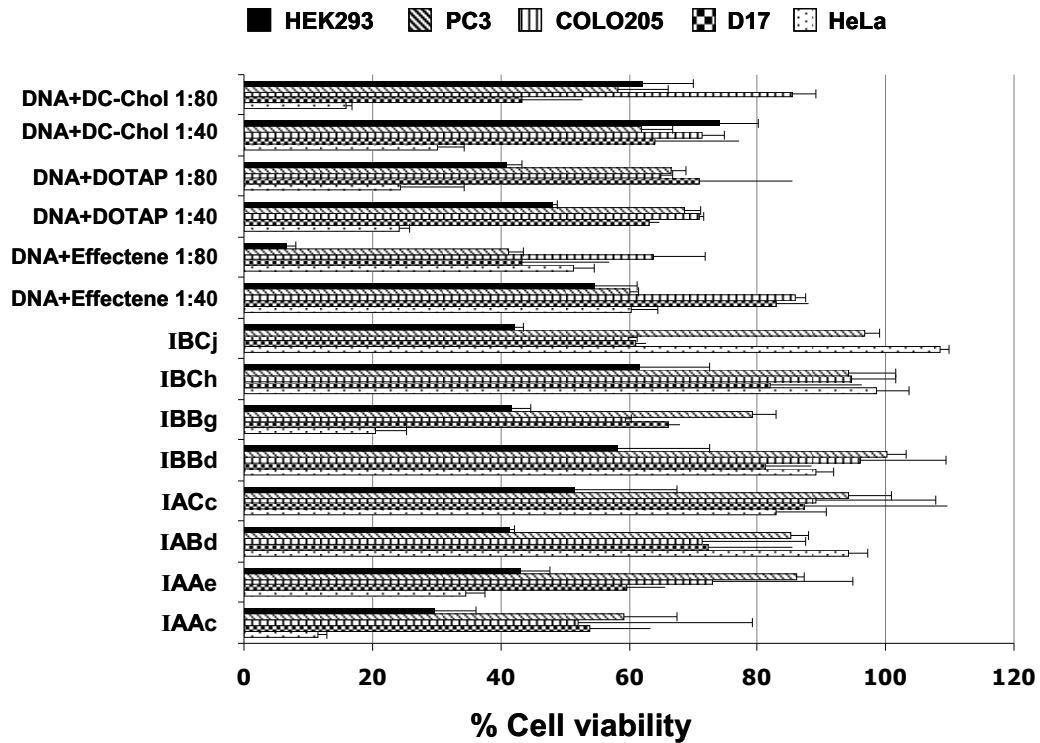


รูปที่ 19 การศึกษาผลของปริมาณ serum ต่อประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิดมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยศึกษากับเซลล์ทั้ง 5 ชนิดที่กล่าวมาในตอนต้น โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารมาตรฐานเทียบกับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 ไขมันประจุบวกส่วนมากไม่มีพิษกับเซลล์ที่ทดสอบ ยกเว้นเซลล์ HEK293 สารทดสอบที่มีประสิทธิภาพดีในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ PC3 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดนี้

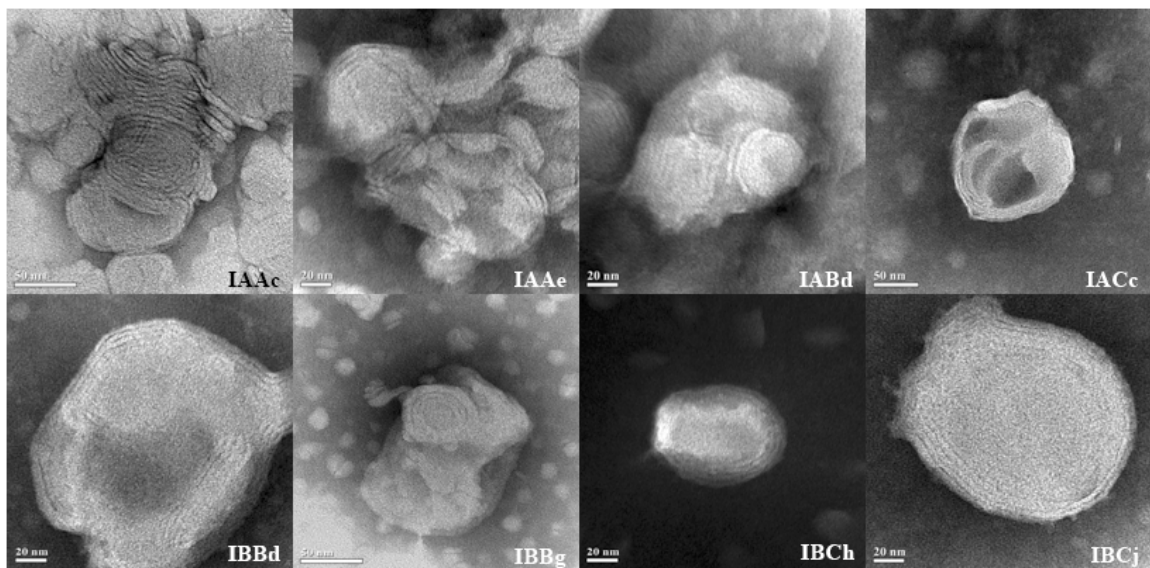
MTT assay



รูปที่ 20 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปโซม

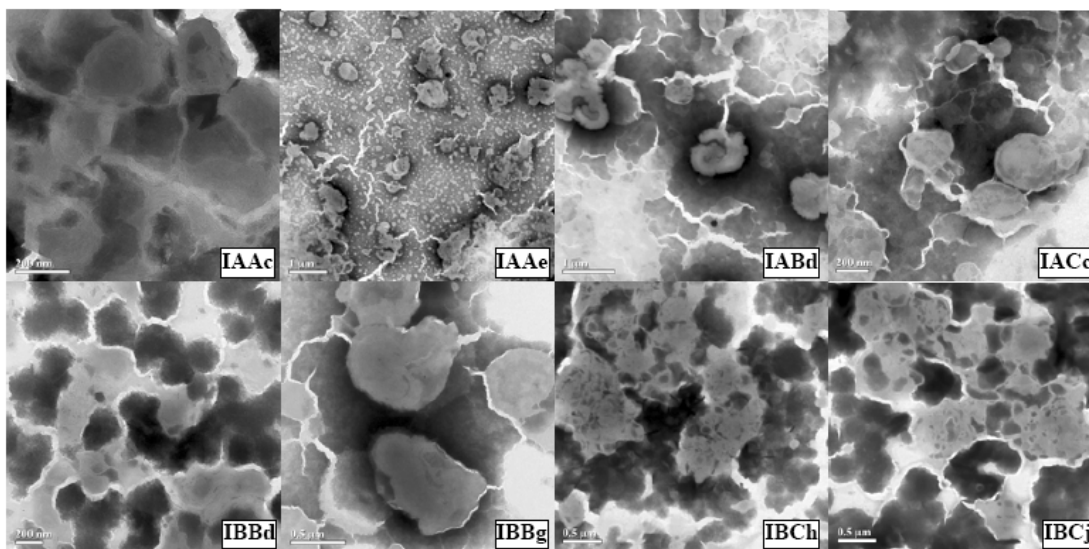
นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิดมาศึกษาสัณฐานวิทยา (รูปที่ 21) ไขมันประจุบวก **IAAc**, **IAAe** และ **IABd** เป็น unilamellar vesicles ขนาด 50-100 nm สำหรับไขมันประจุบวก **IACc**, **IBBd**, **IBBg**, **IBCh** และ **IBCj** เป็น multilamellar vesicles ขนาด 100-150 nm



รูปที่ 21 การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปโซมด้วย transmission electron microscopy (TEM)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปเฟล็กซ์

นำไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิดมาผสมกับดีเอ็นเอได้ไลโปเฟล็กซ์ นำไลโปเฟล็กซ์ที่เตรียมได้มาศึกษาสัณฐานวิทยา (รูปที่ 22) ไลโปเฟล็กซ์ที่เตรียมได้เป็น multilamellar vesicles ขนาด 300-700 nm



รูปที่ 22 การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปเฟล็กซ์ด้วย transmission electron microscopy (TEM)

วิธีการ

1. การสังเคราะห์ resin 26

นำ resin **21** (660.0 mg, 0.726 mmol, 1.1 mmol/g) มาทำให้บวมด้วย CH_2Cl_2 (10 ml) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที กรองเอาตัวทำละลายออก เติมสารละลาย diamine (excess) (ดูรูปที่ 13) ในตัวทำละลาย DMF (15 ml) ลงใน resin หลังจากนั้น เขย่าของผสม 16 ชั่วโมง นำ resin มาล้างด้วย H_2O , DMF, MeOH และ CH_2Cl_2 อย่างละ 3x10 ml ตามลำดับ นำ resin ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง

2. การสังเคราะห์ resin 27

นำ resin **26** (750.0 mg, 0.84 mmol) มาทำให้บวมด้วย CH_2Cl_2 (10 ml) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที กรองเอาตัวทำละลายออก เติมสารละลายผสมของ bromoacetic acid (455.4 mg, 3.3 mmol) และ DIC (516.6 μl , 3.3 mmol) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (10 ml) เขย่าสารผสมนาน 6 ชั่วโมง นำ resin ที่ได้มาล้างด้วย CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF และ CH_2Cl_2 อย่างละ 3x10 ml ตามลำดับ นำ resin ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง

3. การสังเคราะห์ resin 28

นำ resin 27 ที่ได้มาเติม สารละลาย diamine (excess) (ดูรูปที่ 13) ใน CH_2Cl_2 (10 ml) นำของผสมที่ได้มาเขย่านาน 16 ชั่วโมง นำ resin 28 ที่ได้มาล้างตามปกติ และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง ทดสอบหมู่ amino บน resin ด้วย ninhydrin test ได้สารละลายสีน้ำเงิน

4. การสังเคราะห์ resin 29

นำ resin 28 มาทำให้บวมด้วย CH_2Cl_2 (10 ml) นาน 10 นาที กรองเอาตัวทำละลายออก เติมสารละลายของ Dde-OH (3 eq) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (10 ml) ลงใน resin นำของผสมมาเขย่านาน 16 ชั่วโมง นำ resin มาล้างตามปกติ ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ด้วย ninhydrin test (เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จะไม่ปรากฏสารละลายสีน้ำเงิน) นำ resin 29 ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง

5. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกกลุ่มย่อย I(A-C,A-C,a-j)

นำ resin 29 ที่ได้มาแบ่งออกเป็น 10 ส่วนๆ ละประมาณ 120 mg (1 eq) นำแต่ละส่วนมาทำปฏิกิริยากับ สารละลายผสมแต่ละชนิดของ fatty acid a-j (4 eq, ดูรูปภาพที่ 13) และ DIC (4 eq) ในตัวทำละลายผสม CH_2Cl_2 และ DMF (1:1, 1.5 ml) นำของผสมที่ได้มาเขย่านานข้ามคืน นำ resin 30 ที่ได้มาล้างตามปกติ และระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง นำ resin 30 ที่ได้มาเติม สารละลาย 5% N_2H_4 ในตัวทำละลาย DMF (2 ml) นำของผสมที่ได้มาเขย่านาน 2 ชั่วโมง นำ resin ที่ได้มาล้างให้สะอาด ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำ resin ที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อกับ cholesteryl chloroformate (4 eq) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 โดยมี pyridine เป็นเบส เขย่าปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาด ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ resin 31 นำ resin 31 มาทำปฏิกิริยากับ 20% TFA/ CH_2Cl_2 นาน 2 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด เก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH_2Cl_2 เก็บส่วนสารละลายรวมกับส่วนแรก ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยก๊าซไนโตรเจน ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ I(A-C,A-C,a-j) ได้ทั้งหมด 90 สาร ตามต้องการ

6. การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกกลุ่มย่อย II(A-C,A-C,a-j)

นำ resin 29 (1 eq) ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ cholesterol chloroformate (4 eq) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 โดยมี pyridine เป็นเบส เขย่าปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาด ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนาน 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ resin 30 เติม นำ resin 30 ที่ได้มาเติม สารละลาย 5% N_2H_4 ในตัวทำละลาย DMF (2 ml) นำของผสมที่ได้มาเขย่านาน 2 ชั่วโมง นำ resin ที่ได้มาล้างให้สะอาด ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดันนานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำ resin ที่

นำสารกลุ่มที่ 2 ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด 180 สารนี้ มาพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค IR, NMR และ MS ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

Lipid **IAx_a** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 17.4 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3290, 2926, 2853, 1681, 1548, 1467, 1378, 1202, 1136, 1026 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.26 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.25, 3.32 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.36 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 769.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAx_b** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 20.8 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3291, 3070, 2931, 2852, 1680, 1555, 1467, 1379, 1202, 1135, 1023 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.26 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.28, 3.36 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.92 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.36 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 783.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAx_c** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 31.0 mg, 27%; IR: $\nu_{\max}$ 3290, 3070, 2930, 2851, 1681, 1541, 1468, 1436, 1379, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.83 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.40 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.95 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.19, 3.29 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.86 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.30 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.95 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 797.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAx_d** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 19.7 mg, 17%; IR: $\nu_{\max}$ 3291, 3077, 2925, 2852, 1681, 1551, 1467, 1378, 1247, 1202, 1135, 1023 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.25 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.27, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br*

s, NHCOCH₂N), 4.44 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.36 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 811.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAXe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 28.8 mg, 24%; IR: $\nu_{\max}$ 3284, 3077, 2926, 2852, 1681, 1552, 1467, 1378, 1202, 1135, 1026 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (35H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.97 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.21, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.87 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.40 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 825.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAXf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 26.5 mg, 22%; IR: $\nu_{\max}$ 3290, 3070, 2925, 2852, 1681, 1548, 1467, 1378, 1251, 1202, 1136, 1026 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.85 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.96 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.26, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.30 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 839.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAXg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 21.0 mg, 17%; IR: $\nu_{\max}$ 3290, 2925, 2856, 1681, 1616, 1557, 1465, 1376, 1196, 1132, 1026 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 0.99 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and CH=CH in fatty acid), 7.61 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 865.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAXh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 30.2 mg, 24%; IR: $\nu_{\max}$ 3276, 2925, 2851, 1677, 1548, 1467, 1379, 1258, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.87 (3H, *d*, *J* = 5.9 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.14, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂N CH₂CH₂CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 867.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAXi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 21.1 mg, 17%; IR: $\nu_{\max}$ 3276, 2925, 2852, 1681, 1551, 1467, 1432, 1379, 1202, 1135, 1030 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.85 (6H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.97 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.25, 3.31 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.88 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAXj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 24.2 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3291, 3077, 2926, 2852, 1681, 1555, 1467, 1436, 1379, 1247, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.27 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.06 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.94 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.38 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 895.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 38.9 mg, 35%; IR: $\nu_{\max}$ 3298, 2927, 2852, 1681, 1548, 1467, 1435, 1378, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.29, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.86 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 783.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 45.2 mg, 40%; IR: $\nu_{\max}$ 3297, 3077, 2925, 2852, 1681, 1552, 1467, 1434, 1378, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.29, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.86 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 797.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 36.6 mg, 32%; IR: $\nu_{\max}$ 3290, 2924, 2851, 1679, 1548, 1467, 1432, 1378, 1202, 1135, 1026 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.05 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.29, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.85 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 811.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 38.3 mg, 32%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 3077, 2924, 2852, 1681, 1552, 1467, 1378, 1240, 1203, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.83 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.95 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.29 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.84 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 8.01 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 43.0 mg, 36%; IR: $\nu_{\max}$ 3290, 2924, 2851, 1677, 1544, 1467, 1432, 1378, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine,

methylene, and methyl protons), 3.04 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.30, 3.37 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.94 (2H, *br s*, $\text{NH COCH}_2\text{N}$), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 39.7 mg, 33%; IR: ν_{max} 3292, 3070, 2924, 2851, 1681, 1552, 1467, 1379, 1202, 1135, 1026 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.29, 3.37 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 43.1 mg, 34%; IR: ν_{max} 3336, 2925, 2853, 1682, 1621, 1573, 1464, 1383, 1247, 1202, 1170, 1131 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 0.99 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.19 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (53H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.88 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 879.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 42.1 mg, 33%; IR: ν_{max} 3298, 3070, 2923, 2851, 1681, 1558, 1467, 1435, 1378, 1202, 1135, 1026 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.28, 3.37 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 881.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 37.7 mg, 29%; IR: ν_{max} 3297, 3070, 2923, 2851, 1681, 1548, 1467, 1378, 1258, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 0.99 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.19 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.88 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 895.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAYj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 41.2 mg, 32%; IR: ν_{max} 3284, 3054, 2924, 2852, 1681, 1548, 1467, 1422, 1265, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.19 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.88 (2H, *br s*, NHCOCH_2N),

4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 909.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAZa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 23.4 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 2927, 2853, 1681, 1541, 1467, 1432, 1378, 1202, 1136, 1012 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.01 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.33 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.92 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.66 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 811.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAZb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 24.9 mg, 21%; IR: $\nu_{\max}$ 3298, 3070, 2927, 2853, 1681, 1557, 1467, 1378, 1244, 1202, 1136, 1013 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.86 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 825.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAZc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 24.1 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3276, 2925, 2853, 1681, 1552, 1467, 1432, 1378, 1202, 1137, 1019 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.93 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.21, 3.31 (6H, *br s*, CH₂ NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.85 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.90 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 839.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAZd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 27.9 mg, 23%; IR: $\nu_{\max}$ 3324, 3084, 2926, 2853, 1680, 1642, 1557, 1467, 1379, 1240, 1202, 1170 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.11, 3.22, 3.34 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.93 (2H, *br s*, NH COCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.54 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 853.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAZe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 26.2 mg, 21%; IR: $\nu_{\max}$ 3284, 2925, 2852, 1679, 1552, 1467, 1378, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.96 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.31 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.71 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 867.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IAZf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 23.3 mg, 18%; IR: $\nu_{\max}$ 3323, 2925, 2852, 1681, 1556, 1467, 1432, 1378, 1202, 1136, 1023 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.11, 3.23, 3.34 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 881.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAZg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 40.7 mg, 31%; IR: $\nu_{\max}$ 3335, 2928, 2854, 1675, 1640, 1560, 1466, 1382, 1365, 1248, 1202, 1169 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.24 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04 (6H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$, and $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.10 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.34 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.94 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 5.32 (2H, *br s*, $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.57 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 907.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAZh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 22.4 mg, 17%; IR: $\nu_{\max}$ 3297, 2924, 2852, 1681, 1556, 1467, 1378, 1202, 1174, 1136, 1028 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.10, 3.23, 3.34 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 909.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAZi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 32.5 mg, 25%; IR: $\nu_{\max}$ 3314, 2924, 2852, 1681, 1552, 1467, 1435, 1378, 1244, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.99 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04–3.24 (6H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$, and $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.24 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.35 (6H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, and $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IAZj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 24.9 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3297, 3062, 2924, 2852, 1681, 1552, 1467, 1435, 1378, 1244, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 5.8$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.93 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.02, 3.11, 3.32 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.63 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 937.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 19.9 mg, 21%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 2928, 2853, 1679, 1553, 1467, 1435, 1378, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol),

0.84 (6H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 5.8$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 783.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 16.8 mg, 18%; IR: ν_{max} 3308, 3077, 2926, 2852, 1677, 1557, 1467, 1435, 1378, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 797.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 19.4 mg, 20%; IR: ν_{max} 3302, 3070, 2926, 2852, 1681, 1557, 1467, 1378, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.25, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.94 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 811.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 22.7 mg, 23%; IR: ν_{max} 3301, 3077, 2925, 2852, 1681, 1557, 1467, 1377, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 5.9$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.21 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 16.8 mg, 17%; IR: ν_{max} 3301, 3070, 2925, 2852, 1681, 1556, 1467, 1435, 1378, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 5.9$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 21.9 mg, 21%; IR: ν_{max} 3308, 3077, 2924, 2852, 1678, 1557, 1467, 1378, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-

3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 853.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBXg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 19.7 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3303, 3084, 2927, 2853, 1679, 1378, 1202, 1136 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (53H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 5.35 (2H, *br s*, CH=CH in fatty acid), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 879.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBXh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 16.8 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3308, 2924, 2852, 1678, 1557, 1467, 1432, 1378, 1202 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBXi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 21.9 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 2924, 2852, 1681, 1557, 1467, 1378, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.96 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.35 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 895.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBXj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 19.7 mg, 18%; IR: $\nu_{\max}$ 3308, 3084, 2924, 2852, 1681, 1557, 1467, 1378, 1202 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.58 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 909.9 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBYa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 25.3 mg, 22%; IR: $\nu_{\max}$ 3418, 2930, 2848, 1681, 1550, 1467, 1379, 1203, 1136 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.23, 3.42 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.70 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 797.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBYb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 22.2 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3339, 3092, 2927, 2852, 1681, 1622, 1573, 1467, 1382, 1246, 1203, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 811.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 15.5 mg, 13%; IR: $\nu_{\max}$ 3338, 2925, 2852, 1679, 1557, 1467, 1378, 1203, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.58 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 28.0 mg, 23%; IR: $\nu_{\max}$ 3424, 3342, 2927, 2856, 1628, 1574, 1466, 1383, 1321, 1247, 1203, 1169 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.83 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.87 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.21 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.94 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.21 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.85 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.95 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 22.4 mg, 18%; IR: $\nu_{\max}$ 3340, 3092, 2925, 2852, 1681, 1626, 1573, 1467, 1383, 1246, 1203, 1171 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 24.3 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3418, 3084, 2926, 2852, 1681, 1557, 1468, 1428, 1379, 1203, 1136, 1019 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.33, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 867.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 29.5 mg, 23%; IR: $\nu_{\max}$ 3342, 2966, 2929, 2856, 1675, 1632, 1574, 1464, 1384, 1325, 1247, 1203 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.83 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid),

0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.94 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.22 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.83 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 8.00 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 893.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 22.3 mg, 17%; IR: ν_{max} 3337, 2924, 2852, 1680, 1623, 1573, 1467, 1380, 1203, 1166, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.65 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 895.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 24.7 mg, 19%; IR: ν_{max} 3435, 2925, 2852, 1644, 1550, 1467, 1379, 1203, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 909.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 19.0 mg, 14%; IR: ν_{max} 3307, 3077, 2924, 2852, 1681, 1554, 1468, 1378, 1202, 1135, 1019 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.62 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBZa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 38.6 mg, 33%; IR: ν_{max} 3314, 3084, 2929, 2853, 1679, 1557, 1467, 1432, 1378, 1203, 1136, 1023 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBZb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 27.7 mg, 23%; IR: ν_{max} 3334, 3077, 2926, 2852, 1681, 1550, 1467, 1378, 1203 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*,

H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 839.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBZc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 29.3 mg, 24%; IR: $\nu_{\max}$ 3436, 2925, 2852, 1681, 1638, 1564, 1466, 1378, 1203 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.01 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.15, 3.32 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 853.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBZd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 41.8 mg, 34%; IR: $\nu_{\max}$ 3334, 3077, 2925, 2853, 1681, 1558, 1467, 1378, 1247, 1203, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 867.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBZe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 37.3 mg, 30%; IR: $\nu_{\max}$ 3313, 3077, 2925, 2852, 1679, 1553, 1467, 1378, 1202, 1136, 1030 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.20, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBZf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 52.6 mg, 41%; IR: $\nu_{\max}$ 3334, 3077, 2925, 2852, 1680, 1560, 1467, 1378, 1203, 1136, 1023 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 895.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBZg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 47.6 mg, 36%; IR: $\nu_{\max}$ 3336, 3092, 2929, 2854, 1680, 1618, 1574, 1465, 1383, 1248, 1203, 1170, 1131, 1030 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (59H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.35, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NH COCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32, 5.35 (3H, *br s*, H-6-Chol) and CH=CH in fatty acid), 7.58 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 921.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBZh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 28.1 mg, 21%; IR: $\nu_{\max}$ 3322, 3084, 2924, 2852, 1681, 1552, 1467, 1432, 1378, 1203, 1136, 1023 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.83 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.97 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.22 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.84 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.88 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBZi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 44.8 mg, 33%; IR: $\nu_{\max}$ 3334, 3092, 2924, 2852, 1678, 1553, 1467, 1428, 1377, 1203, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.35, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 937.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBZj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 26.7 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3333, 3070, 2924, 2852, 1680, 1553, 1467, 1432, 1378, 1203, 1137, 1028 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.11, 3.23, 3.33 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.42 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 951.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICXa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 29.1 mg, 25%; IR: $\nu_{\max}$ 3302, 3084, 2930, 2853, 1678, 1553, 1467, 1378, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.92 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.38 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 811.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICXb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 42.6 mg, 36%; IR: $\nu_{\max}$ 3332, 3084, 2931, 2868, 1679, 1558, 1467, 1428, 1379, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.19, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.75 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICXc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 42.2 mg, 35%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 3077, 2930, 2856, 1680, 1556, 1467, 1435, 1379, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid),

0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.93 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICXd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 26.0 mg, 21%; IR: ν_{max} 3300, 3077, 2926, 2852, 1678, 1557, 1467, 1378, 1202, 1136, 1015 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.94 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.87 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.92 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICXe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 42.1 mg, 34%; IR: ν_{max} 3321, 3084, 2929, 2852, 1679, 1558, 1467, 1432, 1379, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.93 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.88 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.92 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 867.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICXf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 26.6 mg, 21%; IR: ν_{max} 3302, 3070, 2925, 1679, 1557, 1467, 1432, 1378, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.92 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.88 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCO CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 881.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICXg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 27.3 mg, 21%; IR: ν_{max} 3321, 3084, 2928, 2854, 1679, 1557, 1467, 1379, 1247, 1202, 1174, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (57H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.37 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.39 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 907.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICXh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 39.0 mg, 30%; IR: ν_{max} 3339, 3092, 2928, 2852, 1679, 1558, 1467, 1435, 1379, 1203, 1137, 1019 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.20, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.96 (2H, *br*

s, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 909.9 [M + H]⁺ (100).

Lipid **ICXi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 28.3 mg, 21%; IR: $\nu_{\max}$ 3308, 2925, 2852, 1677, 1558, 1467, 1378, 1202, 1136, 836, 799, 721 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.3 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.16, 3.37 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.30 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 923.9 [M + H]⁺ (100).

Lipid **ICXj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 35.2 mg, 26%; IR: $\nu_{\max}$ 3436, 2926, 2852, 1633, 1572, 1467, 1380, 1204, 1140 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.3 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.16, 3.38 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.30 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.65 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 937.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **ICYa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130 mg) 16.1 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3300, 2930, 2868, 1681, 1563, 1467, 1428, 1378, 1202 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.17, 3.38 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.65 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 825.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **ICYb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 20.0 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 2926, 2853, 1679, 1557, 1467, 1378, 1202, 1136 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.17, 3.38 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 839.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **ICYc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 20.6 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 2928, 2852, 1681, 1563, 1467, 1378, 1202, 1136 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.17, 3.37 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 853.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **ICYd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 17.7 mg, 17%; IR: $\nu_{\max}$ 3300, 2925, 2852, 1678, 1558, 1467, 1377, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.17, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 867.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICYe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 22.1 mg, 21%; IR: $\nu_{\max}$ 3306, 2927, 2852, 1679, 1563, 1467, 1435, 1379, 1202, 1137, 1012 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.17, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 881.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICYf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 17.4 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 2926, 2852, 1679, 1563, 1467, 1378, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.18, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 895.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICYg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 17.9 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 2931, 2867, 1682, 1563, 1467, 1379, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 921.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICYh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 18.1 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3302, 2925, 2852, 1681, 1557, 1467, 1432, 1378, 1202, 1174, 1136, 1015 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.94 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.20, 3.27, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.85 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.44 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.90 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICYi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 17.7 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3302, 2925, 2852, 1681, 1558, 1467, 1428, 1378, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*,

methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 937.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICYj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 17.4 mg, 15%; IR: ν_{max} 3300, 2930, 2853, 1681, 1559, 1470, 1380, 1201, 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.38 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 951.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 20.8 mg, 20%; IR: ν_{max} 3298, 2933, 2867, 1679, 1568, 1467, 1377, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 11.5 mg, 11%; IR: ν_{max} 3380, 2925, 2853, 1678, 1564, 1466, 1376, 1262, 1201 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 867.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 16.8 mg, 16%; IR: ν_{max} 3306, 2925, 2854, 1678, 1564, 1466, 1377, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 881.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 21.4 mg, 20%; IR: ν_{max} 3306, 3070, 2931, 2867, 1678, 1568, 1467, 1432, 1377, 1202, 1135, 1011 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 895.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 11.8 mg, 11%; IR: $\nu_{\max}$ 3322, 2929, 2854, 1679, 1567, 1467, 1377, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 909.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 27.1 mg, 24%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 2931, 2867, 1681, 1567, 1467, 1428, 1377, 1202, 1136, 1008 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 12.7 mg, 11%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 2931, 2866, 1683, 1564, 1467, 1378, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (63H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 949.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 11.9 mg, 11%; IR: $\nu_{\max}$ 3385, 2925, 2853, 1678, 1466, 1373, 1201, 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 951.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 22.6 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3291, 2929, 2853, 1682, 1568, 1467, 1377, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 965.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **ICZj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 10.2 mg, 9%; IR: $\nu_{\max}$ 3380, 2925, 2853, 1677, 1564, 1466, 1369, 1201, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*,

H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.15, 3.40 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂ NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 979.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 17.8 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 3077, 2933, 2868, 1681, 1549, 1467, 1435, 1378, 1202, 1137 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.26 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.25, 3.32 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.36 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 769.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 28.1 mg, 30%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 3070, 2932, 2868, 1682, 1549, 1467, 1432, 1378, 1202, 1136, 1028 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.26 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.28, 3.36 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.92 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.36 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 783.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 24.9 mg, 26%; IR: $\nu_{\max}$ 3291, 3077, 2927, 2853, 1680, 1553, 1467, 1432, 1377, 1253, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.26 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.28, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.45 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.36 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 797.5 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 19.6 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3300, 3077, 2929, 2851, 1678, 1557, 1467, 1435, 1377, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.25 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.27, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.44 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.36 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 811.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 24.9 mg, 25%; IR: $\nu_{\max}$ 3291, 3077, 2926, 2852, 1681, 1556, 1467, 1432, 1377, 1253, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.26 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.28, 3.34 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.93 (2H, *br*

s, NHCOCH₂N), 4.46 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.36 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 825.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 18.3 mg, 18%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 3077, 2928, 2851, 1681, 1549, 1467, 1435, 1377, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.85 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.96 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.26, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.30 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 839.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 19.7 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 3062, 2932, 1682, 1549, 1467, 1428, 1377, 1247, 1202, 1135, 1026 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 0.99 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and CH=CH in fatty acid), 7.61 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 865.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 28.6 mg, 27%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 3084, 2926, 2852, 1681, 1550, 1467, 1378, 1251, 1202, 1136, 1028 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.87 (3H, *d*, *J* = 5.9 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.14, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 867.1 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 14.6 mg, 14%; IR: $\nu_{\max}$ 3302, 3077, 2927, 2852, 1682, 1548, 1467, 1378, 1252, 1202, 1136, 1029 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.85 (6H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.97 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.25, 3.31 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.88 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAXj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 24.7 mg, 23%; IR: $\nu_{\max}$ 3302, 3084, 2926, 2852, 1678, 1550, 1467, 1432, 1378, 1255, 1202, 1136 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.69 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.88 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.93 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.27 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.06 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.30, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.94 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.38 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 895.9 [M + H]⁺ (100).

Lipid IIAYa Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 18.5 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 3062, 2933, 2868, 1682, 1539, 1467, 1439, 1378, 1251, 1203, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.29, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.86 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 783.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid IIAYb Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 15.4 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3302, 3077, 2930, 2852, 1681, 1539, 1467, 1377, 1253, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.29, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.86 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 797.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid IIAYc Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 20.4 mg, 21%; IR: $\nu_{\max}$ 3296, 3070, 2926, 2853, 1678, 1541, 1467, 1377, 1255, 1202, 1134, 1023 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.05 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.29, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.85 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 811.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid IIAYd Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 20.1 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 3070, 2925, 2852, 1679, 1541, 1467, 1377, 1251, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.29, 3.38 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.94 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid IIAYe Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 18.7 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3312, 3077, 2931, 2868, 1682, 1538, 1467, 1378, 1252, 1203, 1135, 1008 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.30, 3.37 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.94 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid IIAYf Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 16.2 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3308, 2926, 2852, 1679, 1548, 1467, 1377, 1247, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H,

m, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.15, 3.29, 3.37 (6H, *br s*, CH₂NHCO CH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 853.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAYg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 14.7 mg, 14%; IR: $\nu_{\max}$ 3306, 3084, 2927, 2853, 1679, 1540, 1466, 1377, 1251, 1202, 1134, 1023 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 0.99 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.19 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (53H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.88 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and CH=CH in fatty acid), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 879.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAYh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 18.5 mg, 17%; IR: $\nu_{\max}$ 3313, 3077, 2927, 2852, 1682, 1541, 1467, 1435, 1378, 1244, 1203, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.28, 3.37 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAYi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 14.0 mg, 13%; IR: $\nu_{\max}$ 3306, 3077, 2924, 2852, 1681, 1542, 1467, 1377, 1255, 1203, 1134, 1026 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 0.99 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.19 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.88 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 895.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAYj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 20.1 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 3077, 2925, 2852, 1682, 1540, 1467, 1377, 1253, 1203, 1135, 1019 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.19 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.88 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 909.9 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAZa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 21.7 mg, 22%; IR: $\nu_{\max}$ 3306, 2928, 2853, 1678, 1627, 1542, 1466, 1376, 1247, 1202, 1135, 1026 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.01 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.33 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.92 (2H,

br s, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.66 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 811.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAZb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 25.6 mg, 26%; IR: $\nu_{\max}$ 3306, 2926, 2853, 1679, 1542, 1466, 1376, 1255, 1202, 1134, 1030 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.86 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 825.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAZc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 26.3 mg, 26%; IR: $\nu_{\max}$ 3302, 3070, 2926, 2853, 1679, 1631, 1539, 1466, 1376, 1251, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 5.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 5.8 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.95 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.31 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 839.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAZd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 21.7 mg, 21%; IR: $\nu_{\max}$ 3313, 2925, 2853, 1678, 1627, 1531, 1466, 1376, 1202, 1134, 1023 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.11, 3.22, 3.34 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.54 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 853.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAZe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 24.8 mg, 24%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 3062, 2925, 2853, 1678, 1627, 1539, 1466, 1376, 1251, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.96 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.31 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.71 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 867.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAZf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 21.5 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3306, 2925, 2852, 1679, 1635, 1542, 1466, 1376, 1255, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.03 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.11, 3.23, 3.34 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIAZg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 20.9 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3335, 2927, 2853, 1678, 1535, 1466, 1376, 1202, 1129, 1026 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.24 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04 (6H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$, and $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.10 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.34 (6H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.94 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 5.32 (2H, *br s*, $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.57 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 907.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIAZh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 26.2 mg, 24%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 3077, 2924, 2852, 1679, 1631, 1541, 1467, 1377, 1251, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.10, 3.23, 3.34 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 909.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIAZi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 22.3 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3313, 2924, 2852, 1679, 1631, 1539, 1466, 1376, 1202, 1135, 1026 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.99 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (43H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.04–3.24 (6H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$, and $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ -Chol), 3.24 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.35 (6H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, and $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIAZj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 110 mg) 24.5 mg, 22%; IR: $\nu_{\max}$ 3313, 3070, 2924, 2852, 1679, 1535, 1467, 1376, 1255, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 5.8$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.93 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.02, 3.11, 3.32 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.43 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.63 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 937.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIBXa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 198.3 mg) 65.0 mg, 46%; IR: $\nu_{\max}$ 3313, 2928, 2856, 1676, 1467, 1380, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 5.8$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 783.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIBXb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 195.2 mg) 53.0 mg, 43%; IR: $\nu_{\max}$ 3338, 2959, 2926, 1677, 1623, 1573, 1465, 1384, 1249, 1202, 1169, 1130 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ

0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.93 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 797.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 215.0 mg) 58.6 mg, 42%; IR: ν_{max} 3339, 2966, 2928, 2870, 1677, 1626, 1573, 1465, 1384, 1365, 1325, 1249, 1202, 1170, 1130 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.64 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.25, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.94 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 811.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 173.3 mg) 58.3 mg, 45%; IR: ν_{max} 3292, 2925, 2853, 1678, 1550, 1467, 1378, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 5.9$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.21 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 192.8 mg) 57.2 mg, 44%; IR: ν_{max} 3339, 2924, 1677, 1622, 1573, 1464, 1384, 1248, 1202, 1169, 1130 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 5.9$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 173 mg) 61.0 mg, 45%; IR: ν_{max} 3302, 2924, 2852, 1677, 1544, 1467, 1378, 1251, 1202, 1135, 1023 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBXg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 134.3 mg) 49.9 mg, 46%; IR: ν_{max} 3324, 2932, 1676, 1560, 1467, 1385, 1251, 1202, 1170 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (53H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

s, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 5.35 (2H, *br s*, CH=CH in fatty acid), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 879.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBXh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 200.4 mg) 47.3 mg, 34%; IR: $\nu_{\max}$ 3297, 2923, 2852, 1681, 1559, 1467, 1378, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCO CH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.9 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBXi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 189.5 mg) 75.5 mg, 49%; IR: $\nu_{\max}$ 3301, 2923, 2851, 1681, 1548, 1467, 1379, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.96 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.35 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 895.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBXj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 183.0 mg) 41.3 mg, 31%; IR: $\nu_{\max}$ 3250, 2923, 2851, 1677, 1467, 1376, 1255, 1202 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (45H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.24, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂ CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.58 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 909.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBYa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 183.4 mg) 87.9 mg, 71%; IR: $\nu_{\max}$ 3315, 2929, 2852, 1676, 1550, 1467, 1379, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.23, 3.42 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.70 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 797.5 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBYb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 176.6 mg) 85.6 mg, 67%; IR: $\nu_{\max}$ 3300, 2930, 2856, 1673, 1631, 1467, 1372, 1200, 1170 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.23, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 811.5 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IBYc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.3 mg) 64.2 mg, 67%; IR: $\nu_{\max}$ 3313, 2926, 2854, 1676, 1631, 1467, 1373, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.23, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.58 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 201.7 mg) 67.0 mg, 47%; IR: $\nu_{\max}$ 3340, 2927, 2853, 1681, 1557, 1467, 1383, 1251, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.23 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.01 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.34 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.61 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 182.5 mg) 73.7 mg, 53%; IR: $\nu_{\max}$ 3298, 2925, 2852, 1676, 1568, 1467, 1377, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 220.0 mg) 113.4 mg, 70%; IR: $\nu_{\max}$ 3340, 2924, 2853, 1674, 1631, 1467, 1379, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.33, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 867.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 143.7 mg) 81.2 mg, 74%; IR: $\nu_{\max}$ 3336, 2927, 2853, 1676, 1618, 1572, 1465, 1382, 1247, 1202, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 5.35 (2H, *br s*, $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 893.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IBYh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 220.0 mg) 92.7 mg, 53%; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2924, 2852, 1674, 1631, 1467, 1376, 1202, 1174 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.02

(3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.30, 3.40 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.65 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 895.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBYi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 170.4 mg) 81.5 mg, 62%; IR: $\nu_{\max}$ 3300, 2922, 2852, 1681, 1468, 1376, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.30, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 909.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBYj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 166.7 mg) 70.7 mg, 51%; IR: $\nu_{\max}$ 3296, 2921, 2851, 1674, 1631, 1467, 1377, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (47H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.30, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.62 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 923.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 123.7 mg) 76.0 mg, 85%; IR: $\nu_{\max}$ 3308, 3077, 2931, 2856, 1778, 1681, 1467, 1379, 1203 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 825.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 126.5 mg) 32.8 mg, 32%; IR: $\nu_{\max}$ 3306, 2925, 2854, 1677, 1627, 1465, 1377, 1202, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 839.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 178.3 mg) 47.4 mg, 32%; IR: $\nu_{\max}$ 3309, 2925, 2854, 1676, 1631, 1465, 1377, 1202, 1136 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.01 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.15, 3.32 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H,

br s, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 853.6 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 250.0 mg) 92.9 mg, 49%; IR: $\nu_{\max}$ 3303, 2927, 2853, 1676, 1631, 1541, 1467, 1378, 1202, 1137 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 867.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 118.6 mg) 40.2 mg, 39%; IR: $\nu_{\max}$ 3308, 2924, 2854, 1676, 1631, 1465, 1377, 1202, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.20, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 148.9 mg) 55.8 mg, 48%; IR: $\nu_{\max}$ 3298, 3077, 2925, 2853, 1676, 1627, 1466, 1377, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.10, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂ NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 895.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 154.4 mg) 55.3 mg, 44%; IR: $\nu_{\max}$ 3298, 3070, 2929, 2854, 1676, 1627, 1542, 1466, 1377, 1202, 1135 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (59H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.35, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32, 5.35 (3H, *br s*, H-6-Chol) and CH=CH in fatty acid), 7.58 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 921.7 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 179.7 mg) 48.6 mg, 30%; IR: $\nu_{\max}$ 3305, 2924, 2852, 1674, 1627, 1542, 1467, 1377, 1202, 1177, 1136 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 1.02 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.20, 3.30 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 923.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIBZi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 134.5 mg) 53.3 mg, 48%; IR: $\nu_{\max}$ 3308, 2924, 2852, 1674, 1631, 1544, 1467, 1377, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.35, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 937.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIBZj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 126.7 mg) 36.8 mg, 31%; IR: $\nu_{\max}$ 3308, 2924, 2852, 1674, 1627, 1467, 1377, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 1.01 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 3.00 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.35, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.95 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 951.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IICXa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 27.0 mg, 23%; IR: $\nu_{\max}$ 3291, 3077, 2928, 2853, 1681, 1540, 1467, 1378, 1253, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.1$ Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.92 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.38 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 811.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IICXb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 29.4 mg, 25%; IR: $\nu_{\max}$ 3323, 2928, 2853, 1679, 1635, 1557, 1467, 1381, 1253, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.20 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.98 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.19, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.75 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IICXc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 23.0 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3284, 2925, 2848, 1673, 1546, 1466, 1373, 1200, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.93 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.39 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IICXd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 28.9 mg, 24%; IR: $\nu_{\max}$ 3293, 3062, 2925, 2852, 1677, 1541, 1467, 1378, 1251, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid),

0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.94 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.87 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.92 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcXe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 24.4 mg, 20%; IR: ν_{max} 3298, 3084, 2925, 2852, 1676, 1542, 1467, 1378, 1255, 1201, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.93 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.88 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.92 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 867.6 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcXf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 31.1 mg, 25%; IR: ν_{max} 3276, 2924, 2852, 1677, 1542, 1466, 1377, 1247, 1201 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, H-21-Chol), 0.97 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.92 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.88 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCO CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 881.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcXg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 21.2 mg, 17%; IR: ν_{max} 3276, 2928, 2853, 1677, 1539, 1466, 1378, 1255, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (57H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.37 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.39 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 907.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcXh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 28.0 mg, 22%; IR: ν_{max} 3308, 2924, 2851, 1681, 1541, 1467, 1379, 1251, 1201, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.99 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.20, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.96 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.42 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 909.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcXi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 19.7 mg, 15%; IR: ν_{max} 3297, 3070, 2925, 2852, 1681, 1548, 1467, 1378, 1253, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.37 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.30 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.33 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **HCXj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 20.8 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3306, 3077, 2924, 2851, 1677, 1535, 1467, 1379, 1255, 1201, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.3$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (49H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.38 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.30 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.32 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.65 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 937.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **HCYa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 42.0 mg, 36%; IR: $\nu_{\max}$ 3298, 3055, 2930, 2853, 1679, 1539, 1467, 1378, 1254, 1202, 1136, 1048 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.17, 3.38 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.65 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 825.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **HCYb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 40.8 mg, 34%; IR: $\nu_{\max}$ 3307, 2928, 2853, 1679, 1555, 1466, 1379, 1254, 1202, 1135, 1048 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.17, 3.38 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 839.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **HCYc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 49.5 mg, 41%; IR: $\nu_{\max}$ 3302, 3062, 2926, 2852, 1679, 1631, 1540, 1467, 1378, 1254, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.17, 3.37 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 853.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **HCYd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 50.0 mg, 40%; IR: $\nu_{\max}$ 3297, 2926, 2852, 1677, 1558, 1466, 1379, 1254, 1202, 1135, 1048 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.17, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NH COCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 867.7 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **HCYe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 47.2 mg, 38%; IR: $\nu_{\max}$ 3297, 3055, 2924, 2852, 1681, 1623, 1540, 1467, 1378, 1263, 1201, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz,

H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.17, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 881.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcYf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 53.8 mg, 42%; IR: ν_{max} 3291, 2924, 2852, 1674, 1540, 1467, 1377, 1251, 1201 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.18, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 895.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcYg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 45.8 mg, 35%; IR: ν_{max} 3331, 2927, 2854, 1679, 1632, 1559, 1466, 1383, 1365, 1252, 1202, 1171 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 921.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcYh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 43.1 mg, 33%; IR: ν_{max} 3299, 2923, 2852, 1679, 1627, 1540, 1467, 1377, 1254 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.20, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcYi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 40.7 mg, 31%; IR: ν_{max} 3306, 3062, 2924, 2851, 1679, 1540, 1467, 1378, 1254, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.35 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 937.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **IIcYj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 34.0 mg, 25%; IR: ν_{max} 3291, 2923, 2852, 1678, 1540, 1467, 1378, 1254, 1202, 1135, 1052 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (51H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.38 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H,

br s, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 951.0 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIcZa** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 17.3 mg, 14%; IR: $\nu_{\max}$ 3298, 2931, 2854, 1681, 1623, 1540, 1466, 1378, 1253, 1202, 1135, 1049 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (12H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.13, 3.35 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 853.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIcZb** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 19.6 mg, 16%; IR: $\nu_{\max}$ 3284, 2929, 2853, 1681, 1540, 1466, 1377, 1247, 1201, 1174, 1134, 1045 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.15, 3.40 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 867.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIcZc** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 25.1 mg, 20%; IR: $\nu_{\max}$ 3297, 2928, 2853, 1681, 1541, 1467, 1377, 1253, 1202, 1134, 1050 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.88 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (16H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.15, 3.40 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 881.9 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIcZd** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 18.3 mg, 14%; IR: $\nu_{\max}$ 3323, 2928, 2854, 1682, 1633, 1559, 1466, 1383, 1358, 1252, 1202, 1170 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (18H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.15, 3.41 (6H, *br s*, CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 895.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **IIcZe** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 24.7 mg, 19%; IR: $\nu_{\max}$ 3269, 2926, 2852, 1679, 1541, 1467, 1377, 1252, 1134, 1045 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (20H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, H₃N⁺CH₂CH₂), 3.16, 3.39 (6H, *br s*, CH₂NH COCH₂NCH₂(CH₂)₄CH₂NHCO), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH₂N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH₃⁺); ESMS (+ve): *m/z* (% rel. intensity): 909.8 [M + H]⁺ (100).

Lipid **II CZf** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 17.6 mg, 13%; IR: $\nu_{\max}$ 3297, 2927, 2852, 1679, 1540, 1467, 1377, 1252, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (22H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 923.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **II CZg** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 19.1 mg, 14%; IR: $\nu_{\max}$ 3290, 2930, 2854, 1681, 1540, 1466, 1378, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (14H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (63H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31, 5.39 (3H, *br s*, H-6-Chol and $\text{CH}=\text{CH}$ in fatty acid), 7.60 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 949.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **II CZh** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 24.3 mg, 18%; IR: $\nu_{\max}$ 3291, 2924, 2852, 1681, 1541, 1467, 1377, 1255, 1201, 1134, 1048 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (26H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.41 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.89 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.41 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 951.8 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **II CZi** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 16.2 mg, 12%; IR: $\nu_{\max}$ 3284, 3070, 2925, 2852, 1681, 1540, 1467, 1377, 1252, 1202, 1134, 1045 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (28H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.30 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.16, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.90 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.30 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 965.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

Lipid **II CZj** Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 130.0 mg) 24.0 mg, 17%; IR: $\nu_{\max}$ 3284, 2924, 2852, 1679, 1540, 1467, 1377, 1252, 1202, 1134, 1030 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.65 (3H, *s*, H-18-Chol), 0.84 (6H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-26, 27-Chol), 0.89 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-21-Chol), 0.98 (3H, *s*, H-19-Chol), 1.22 (30H, *s*, methylene protons of fatty acid), 0.85–2.50 (55H, *m*, methine, methylene, and methyl protons), 2.31 (2H, *br s*, $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.15, 3.40 (6H, *br s*, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.91 (2H, *br s*, NHCOCH_2N), 4.40 (1H, *br s*, H-3-Chol), 5.31 (1H, *br s*, H-6-Chol), 7.59 (3H, *br s*, NH_3^+); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity): 979.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (100).

สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

จากการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีโครงสร้างไขมันส่วนหางแบบไม่สมมาตร ด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง สังเคราะห์สารได้ทั้งหมด 180 ชนิด การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^1H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี จากการทดสอบประสิทธิภาพของการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 เบื้องต้น พบไขมันประจุบวก 8 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพดีกว่า EffecteneTM ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน การศึกษาสถานะที่ทำให้ไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิดให้มีประสิทธิภาพสูงสุด พบว่าไขมันประจุบวกมีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 และ PC3 ได้ดีกว่าสารมาตรฐานทั้งสามชนิดคือ EffecteneTM, DOTAP และ DC-Chol และไขมันประจุบวกนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จากการศึกษาลักษณะของไลโปโซมและไลโปเพล็กซ์ ที่เตรียมจากไขมันประจุบวก ทั้ง 8 ชนิด พบว่ามีลักษณะเป็น unilamellar และ multilamellar มีขนาด 50-150 และ 300-700 nm ตามลำดับ

โครงการย่อยที่ 3

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนหัวประจุบวกแบบไม่สมมาตร

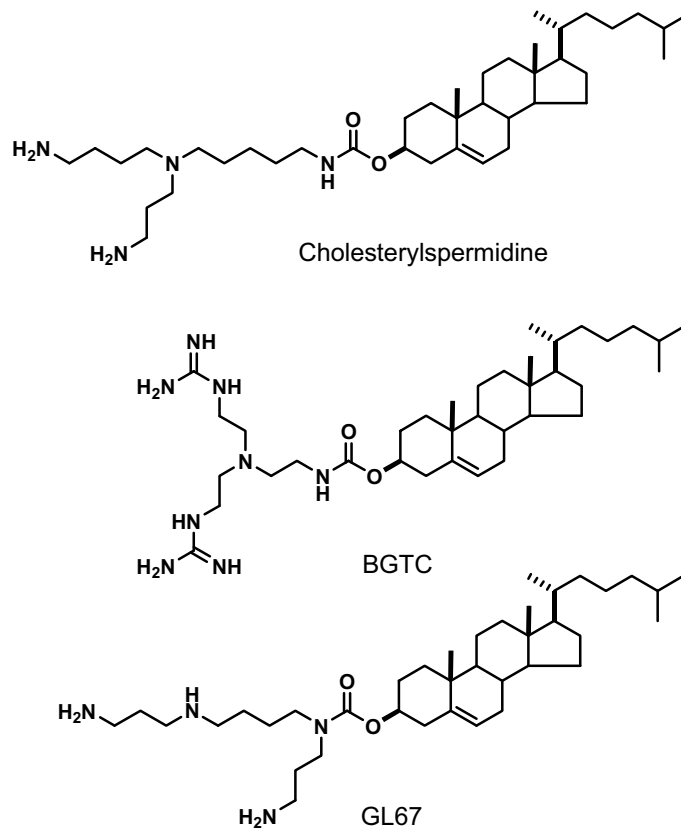
โครงการย่อยที่ 3

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีส่วนหัวประจุบวกแบบไม่สมมาตร

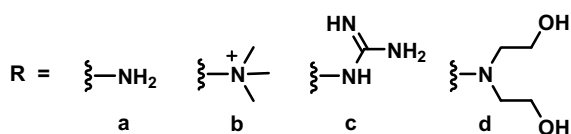
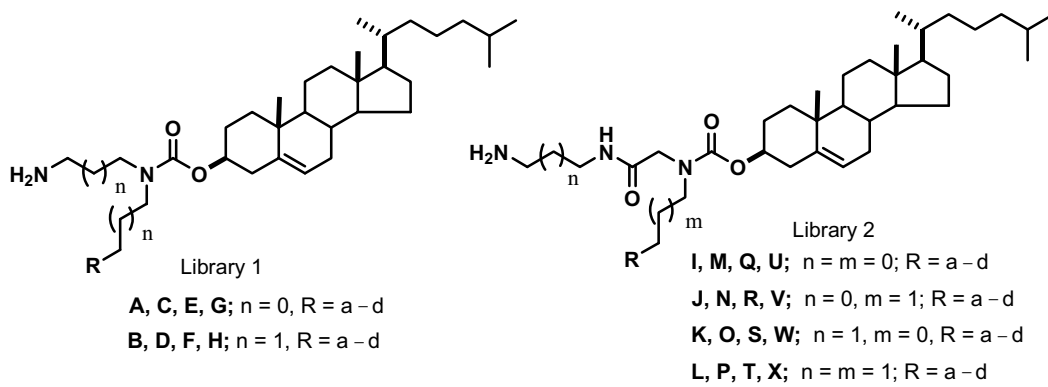
ผลการศึกษา

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก A-X

จากการรายงานการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่ผ่านมาพบว่า ไขมันประจุบวกที่มี cholesterol เป็นส่วนหางนั้น จะมีส่วนหัวประจุบวกที่มีหมู่ฟังก์ชันด้านปลายเหมือนกัน³⁷⁻³⁹ (แบบสมมาตร) ดังตัวอย่างรูปที่ 22 เนื่องจากยังไม่มีรายงานการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มี cholesterol เป็นส่วนไขมันส่วนหางที่ประกอบด้วยประจุบวกส่วนหัวแบบผสม ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการสังเคราะห์และศึกษาประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 23 โครงสร้างสารกลุ่มที่ 3 นี้ แบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อยคือ กลุ่มที่ 1 (Library 1) เป็นกลุ่มที่มีความยาวสายโซ่ส่วนหัวแบบสมมาตร และกลุ่มที่ 2 (Library 2) เป็นกลุ่มที่มีความยาวสายโซ่ส่วนหัวแบบไม่สมมาตร

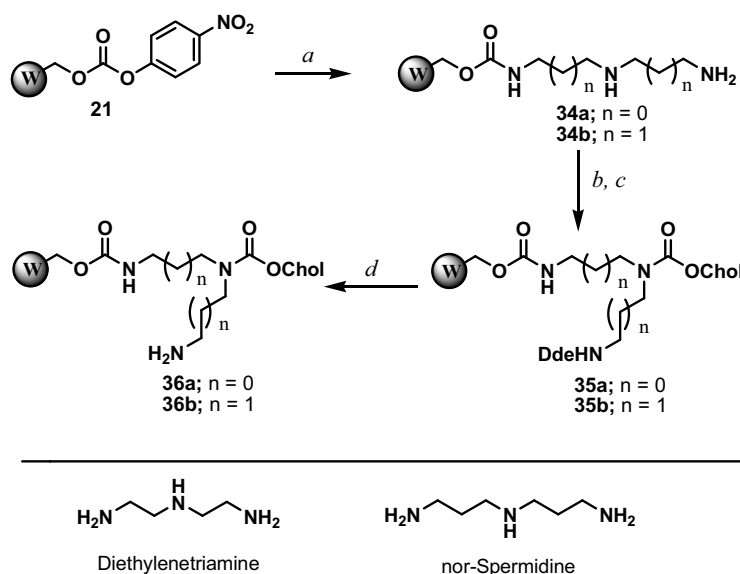


รูปที่ 23 ไขมันประจุบวกที่มีส่วนหัวประจุบวกแบบสมมาตร



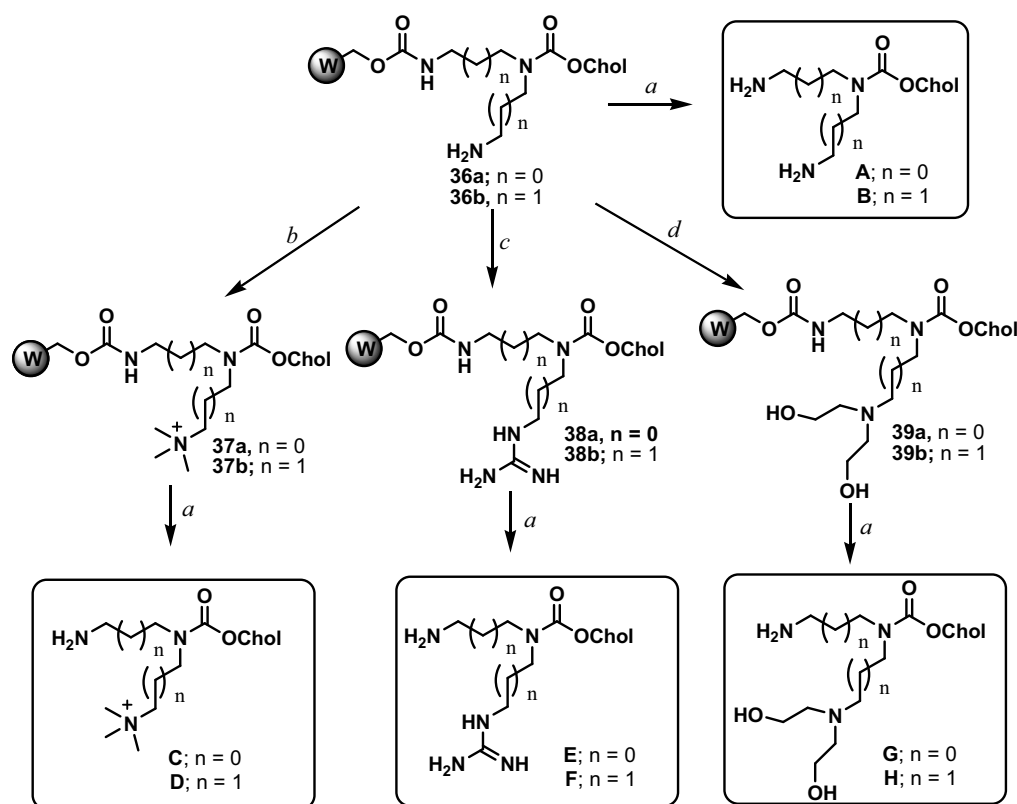
รูปที่ 24 โครงสร้างของไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 3

การสังเคราะห์สารกลุ่มที่ 3 ได้แสดงใน Scheme 5 ถึง Scheme 8 เริ่มจากการสังเคราะห์ resin **36** ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Library 1 (Scheme 5) โดยนำ active carbonate resin (**21**) มาทำปฏิกิริยากับ diethylenetriamine หรือ nor-spermidine ที่มากเกินไปในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 เป็นเวลา 16 ชั่วโมงได้ resin **34** หลังจากการล้างจน resin สะอาด สามารถยืนยันว่ามีหมู่เอมีนอิสระอีกด้านหนึ่งโดยการทดสอบด้วยสารทดสอบ ninhydrin³⁵ ซึ่งในที่นี้จะให้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม นำ resin **34** มาทำปฏิกิริยากับ Dde-OH ซึ่งเป็นหมู่ป้องกันที่เลือกทำปฏิกิริยากับ primary amine เท่านั้น ทำปฏิกิริยาข้ามกัน ล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้สะอาด และทำปฏิกิริยาต่อกับ cholesteryl chloroformate ได้ resin **35** กำจัดหมู่ป้องกัน Dde ออกด้วย $\text{N}_2\text{H}_4/\text{DMF}$ ได้ผลิตภัณฑ์ resin **36**



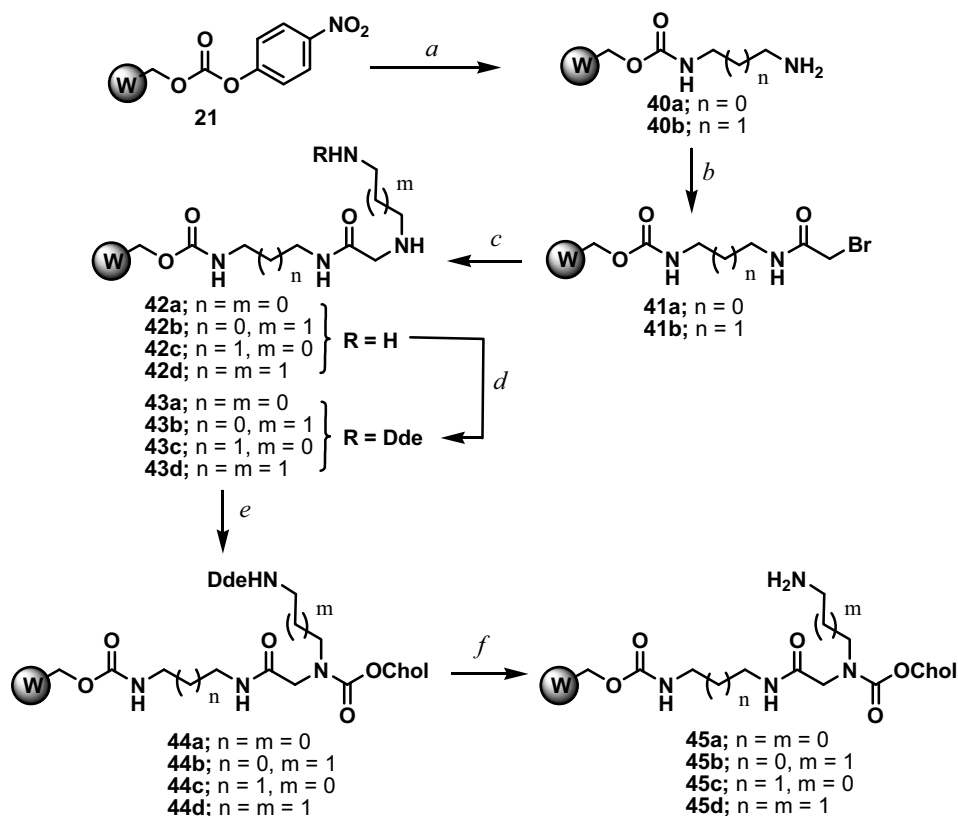
Scheme 5 Reagents and conditions: a) diethylenetriamine or nor-spermidine (excess), CH_2Cl_2 , 6 h; b) Dde-OH (excess), CH_2Cl_2 , DMF, 12 h; c) cholesteryl chloroformate (4 equiv), pyridine, CH_2Cl_2 , 12 h; d) 5% $\text{N}_2\text{H}_4/\text{DMF}$, 2×30 min.

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Library 1 แสดงใน Scheme 6 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกที่มีประจุบวกส่วนหัวแบบสมมาตรเปรียบเทียบกับแบบไม่สมมาตร จึงต้องทำการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **A** และ **B** เริ่มจากนำ resin **36** มาทำปฏิกิริยากับ 50% TFA/CH₂Cl₂ นาน 2 ช.ม. ได้ผลิตภัณฑ์ **A** และ **B** ตามต้องการ การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกชนิดประจุบวกส่วนหัวแบบไม่สมมาตร (**C-H**) โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ amine ของ resin **36** เป็นหมู่ trimethylamino, di(2-hydroxyethyl)amino และหมู่ guanidinyl การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **C** และ **D** ซึ่งมีประจุส่วนหัวเป็นหมู่ trimethylamino โดยนำ resin **36** ทำปฏิกิริยากับ methyl iodide ในตัวทำละลาย DMF โดยมี DIEA เป็นเบส หลังจากทำปฏิกิริยากับ 50% TFA ได้ไขมันประจุบวก **C** และ **D** การสังเคราะห์ไขมันประจุบวกที่มีหมู่ guanidinyl (**E** และ **F**) และหมู่ di(2-hydroxyethyl)amino (**G** และ **H**) ก็ทำได้เช่นเดียวกันโดยการนำ resin **36** มาทำปฏิกิริยากับ *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiurea และ 2-bromoethanol ตามลำดับและตามด้วยการ cleavage ด้วย 50% TFA/CH₂Cl₂



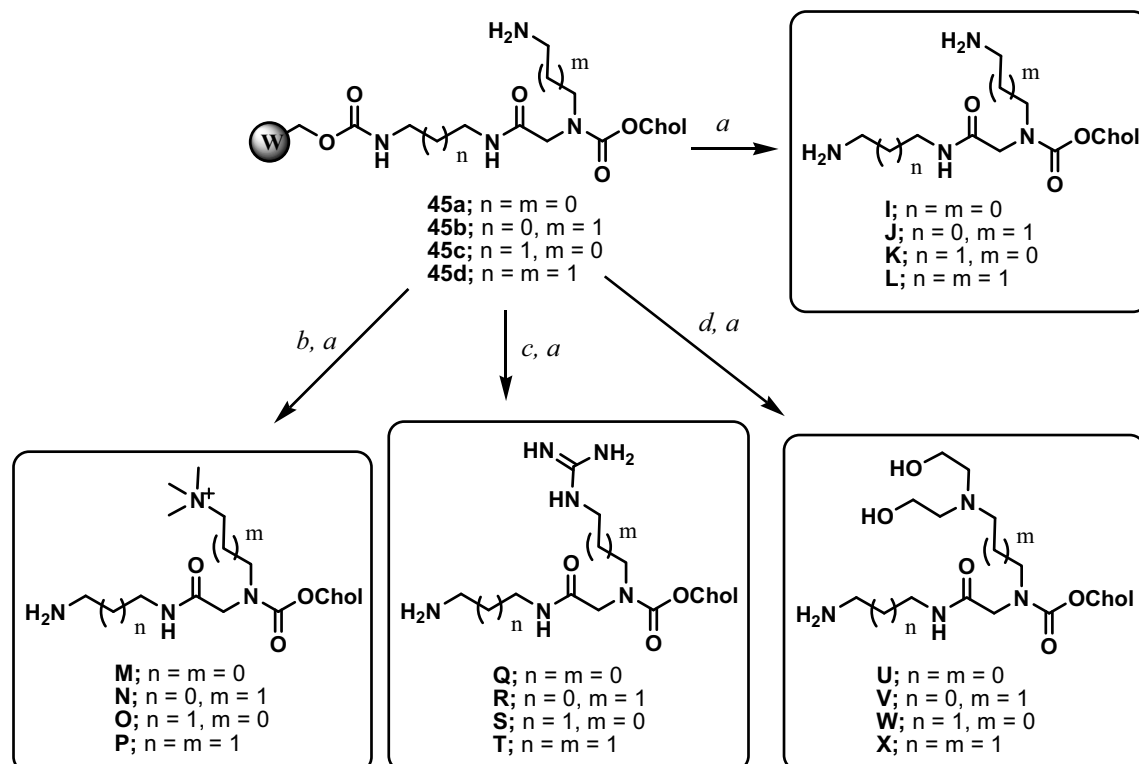
Scheme 6 Reagents and conditions. a) 50% TFA/CH₂Cl₂, 2 h; b) MeI (10 equiv), DIEA, DMF, 18 h; c) *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiurea (4 equiv), DIEA, DMF, 18 h.; d) 2-bromoethanol (8 equiv), DIEA, 18 h.

การสังเคราะห์สารกลุ่มที่ 3 Library 2 โดยที่มีประจุส่วนหัวแบบไม่สมมาตรและความยาวสายโซ่แบบไม่สมมาตร แสดงใน Scheme 7 และ 8 เริ่มจากการนำ resin **21** มาทำปฏิกิริยากับ 1,2-diamonoethane หรือ 1,3-diaminopropane ได้ resin **40** นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาต่อกับ



Scheme 7. *Reagents and conditions:* a) 1,2-diaminoethane or 1,3-diaminopropane (excess), CH₂Cl₂, 6 h.; b) bromoacetic acid (4 equiv), DIC (4 equiv), DMF, 12 h.; c) 1,2-diaminoethane or 1,3-diaminopropane (excess), DMF, 12 h.; d) Dde-OH (excess), CH₂Cl₂, DMF, 12 h.; e) cholesteryl chloroformate (4 equiv), pyridine (20 equiv), CH₂Cl₂, 12 h.; f) 5% N₂H₄/DMF, 2×30 min.

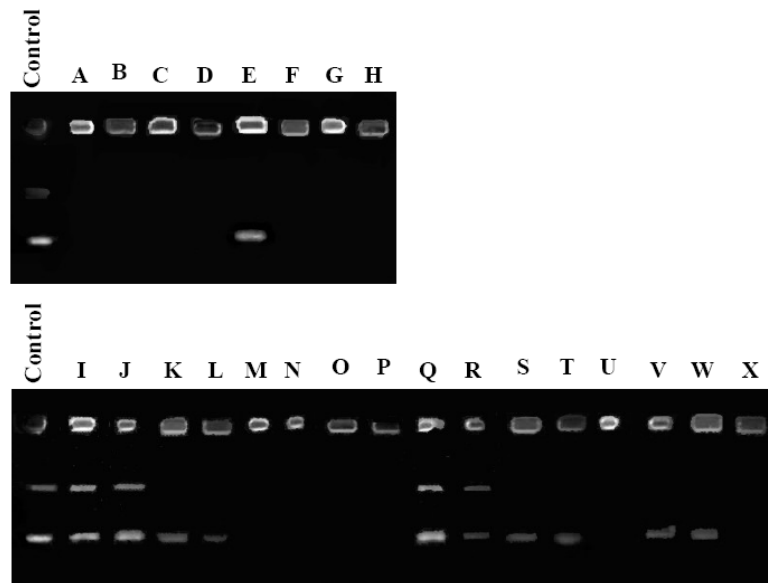
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **I-X** แสดงดัง Scheme 8 ทำได้เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **A-H** ไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 3 ที่สังเคราะห์ได้มีทั้งหมด 24 สารที่สังเคราะห์ได้มีเปอร์เซ็นต์ผลึกภัณฑ์ปานกลางถึงสูงมาก ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิค IR, NMR และ MS ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้ตรงตามโครงสร้างที่สังเคราะห์



Scheme 8. Reagents and conditions. a) 50% TFA/CH₂Cl₂, 2 h; b) MeI (10 equiv), DIEA, DMF, 18 h; c) *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiurea (4 equiv), DIEA, DMF, 18 h.; d) 2-bromoethanol (8 equiv), DIEA, 18 h.

การศึกษาการจับดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก A-X

นำไขมันประจุบวก A-X ที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการจับดีเอ็นเอ ในการทดลองนี้ใช้วิธีการทางอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อดูการหน่วงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 25 พบว่า ไขมันประจุบวกในกลุ่มแรก (A-H) ที่มีสายโซ่แบบสมมาตร สามารถหน่วงการเคลื่อนที่ที่ดีเอ็นเอได้ทุกสายยกเว้น ไขมันประจุบวก E สำหรับ ไขมันประจุบวกในกลุ่มที่สอง (I-X) ที่มีสายโซ่แบบไม่สมมาตรมีประสิทธิภาพการหน่วงดีเอ็นเอได้น้อยกว่าสารกลุ่มแรก สารในกลุ่มหลังนี้ ไขมันประจุบวก M-P หน่วงดีเอ็นเอได้ดีเมื่อส่วนหัวมีขั้วเป็นหมู่ trimethyl quaternary amine สำหรับไขมันประจุบวก I-L และ Q-T ที่มีส่วนหัวมีขั้วเป็นหมู่ amine และ guanidine, ตามลำดับ หน่วงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอได้ไม่สมบูรณ์ เป็นที่น่าสังเกตว่า ไขมันประจุบวกที่มีส่วนหัวมีขั้วเป็นหมู่ trimethyl quaternary amine (C, D และ M-P) สามารถจับกับดีเอ็นเอได้อย่างดี

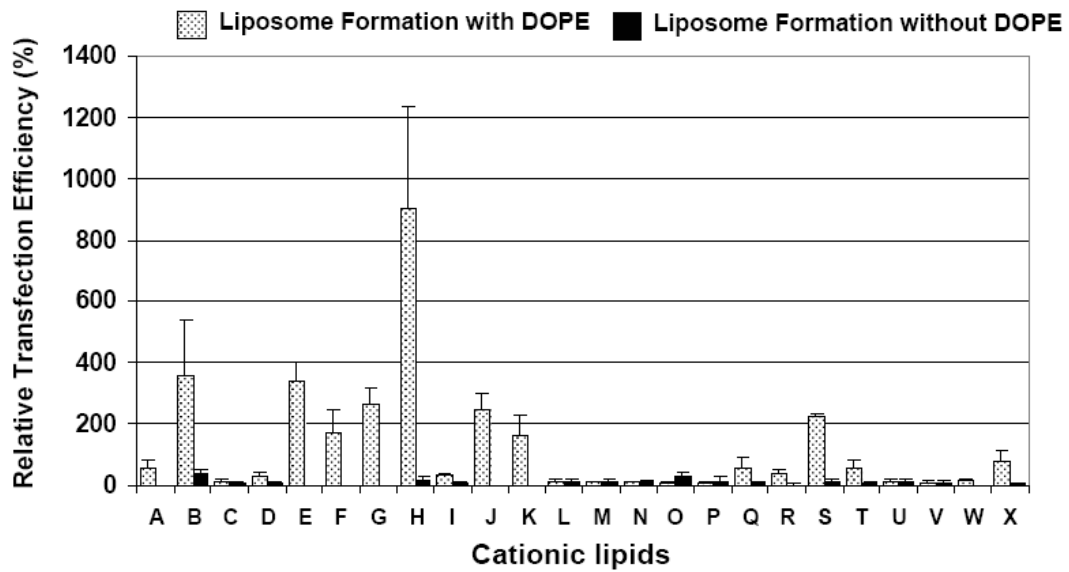


รูปที่ 25 การทดสอบการหน่วงการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของไขมันประจุบวก A-X

การศึกษาการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก A-X

การศึกษาเบื้องต้น

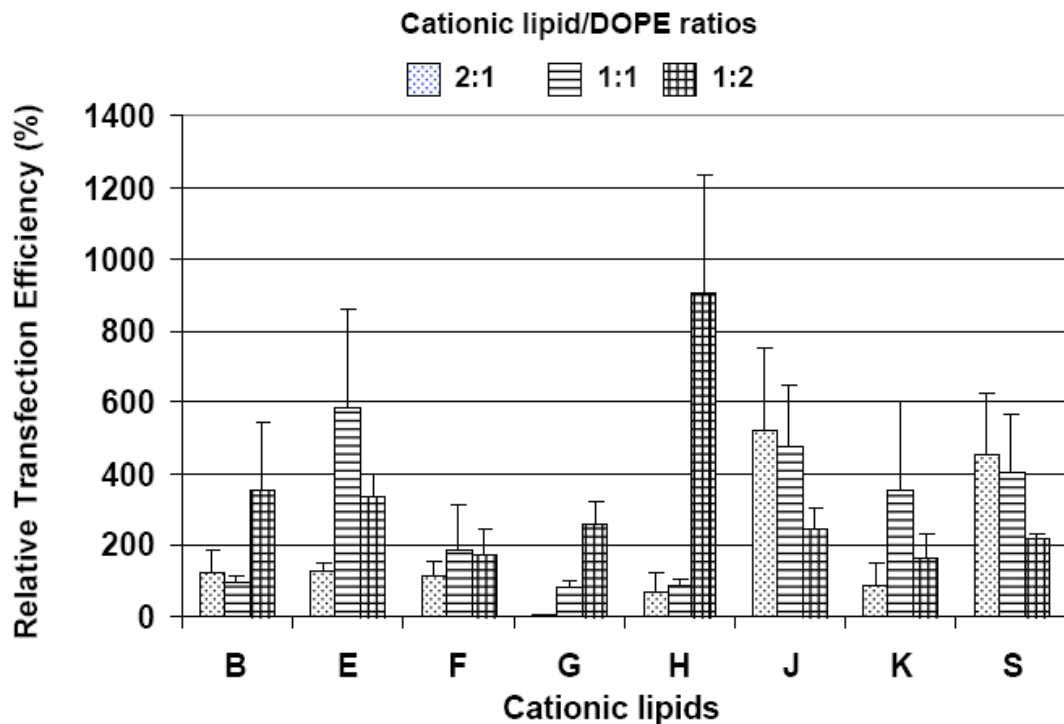
นำสารที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดมาศึกษาประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ การทดสอบนี้เตรียมไลโปโซมโดยการผสมไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย (DOPE) ในอัตราส่วน 2:1 และนำไลโปโซมที่เตรียมได้มาผสมกับดีเอ็นเอ ในอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อไลโปโซม 1:20 การศึกษาเบื้องต้นนี้ใช้เซลล์ human embryonic kidney (HEK) และ ดีเอ็นเอที่มี β -galactosidase เป็นยีนรายงานผล การทดลองนี้ใช้ Effectene™ เป็นสารมาตรฐานและคำนวณให้มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เท่ากับ 100% ผลการผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 26 จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าไขมันประจุบวก **B, E-H, J, K** และ **S** มีประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Effectene™ ซึ่งสารดังกล่าวนี้ส่วนมากเป็นไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 1 ที่มีสายโซ่แบบสมมาตร นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 สารนี้ไปศึกษาเพื่อหาสภาวะที่ทำให้มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด



รูปที่ 26 ผลการพาคีเอ็นเอของไขมันประจุบวก A-X เข้าสู่เซลล์ HEK

การศึกษาอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย (DOPE)

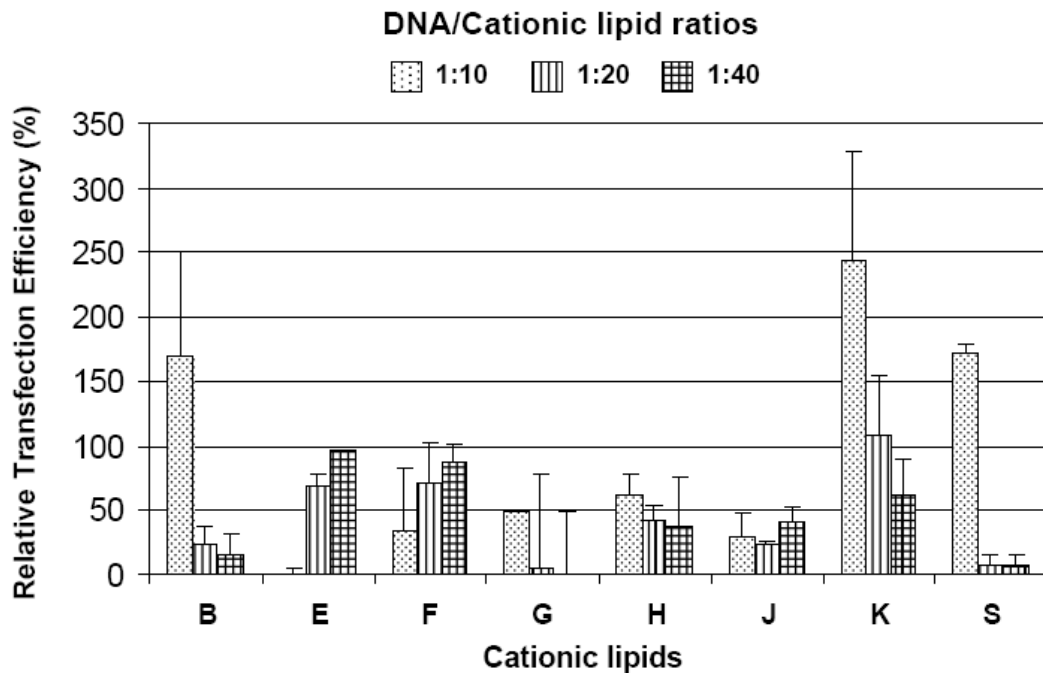
จากการศึกษาการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เบื้องต้น (รูปที่ 26) พบว่า ไขมันตัวช่วยเป็นส่วนสำคัญในการเตรียมไลโปโซมเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ เพื่อศึกษาผลของไขมันตัวช่วยต่อประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิด นำไขมันประจุบวกมาเตรียมไลโปโซม ที่มีอัตราส่วนไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย 2:1, 1:1 และ 1:2 ในการทดลองนี้ใช้อัตราส่วนคิเอ็นเอต่อไลโปโซมเท่ากันคือ 1:20 และใช้ Effectene™ เป็นสารมาตรฐานและคำนวณให้มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เท่ากับ 100% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 27 ไขมันประจุบวก H มีประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด เมื่อเตรียมไลโปโซม ที่มีอัตราส่วนไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย 1:2 ไขมันประจุบวก J และ S แสดงประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้อัตราส่วนไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย 2:1 ในขณะที่ไขมันประจุบวก E และ K แสดงประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้อัตราส่วนไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วย 1:1 นำไขมันประจุบวกที่มีอัตราส่วนไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วยที่ทำให้มีประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด ไปศึกษาสถานะอื่นต่อไป



รูปที่ 27 การศึกษาผลของอัตราส่วนไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วยต่อประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

การศึกษาอัตราส่วนของคีเอ็นเอต่อไลโปโซม

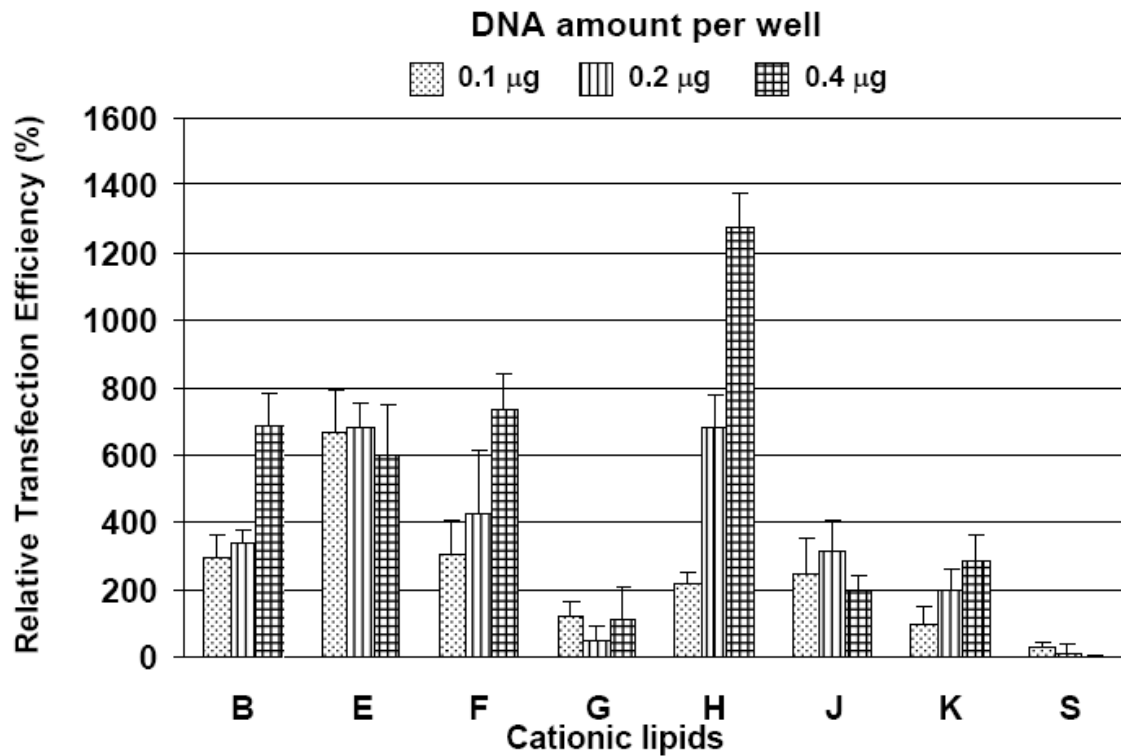
จากการศึกษาผลของอัตราส่วนของไขมันประจุบวกต่อไขมันตัวช่วยต่อประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (รูปที่ 27) พบว่า ไขมันประจุบวกแต่ละชนิดต้องการปริมาณไขมันตัวช่วยในปริมาณที่ไม่เท่ากัน จึงนำไลโปโซมที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดของไขมันประจุบวกแต่ละชนิด มาศึกษาผลของอัตราส่วนของคีเอ็นเอต่อไลโปโซมที่ทำให้ประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์สูงที่สุด ในการทดลองนี้ใช้ปริมาณคีเอ็นเอคงที่ๆ 0.1 mg/well และปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของคีเอ็นเอต่อไลโปโซมที่ 1:10, 1:20 และ 1:40 และใช้ Effectene™ เป็นสารมาตรฐานและคำนวณให้มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เท่ากับ 100% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 28 จากผลการทดลองพบว่าไขมันประจุบวก **B**, **G**, **H**, **K** และ **S** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอลดลงเมื่ออัตราส่วนคีเอ็นเอต่อไลโปโซมสูงขึ้น ในทางตรงกันข้าม ไขมันประจุบวก **E** และ **F** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอสูงขึ้นเมื่ออัตราส่วนคีเอ็นเอต่อไลโปโซมลดลง ผลที่ได้จากการทดลองนี้นำไปใช้ศึกษาต่อไป



รูปที่ 28 การศึกษาผลของอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อไลโปโซมต่อประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

การศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอ

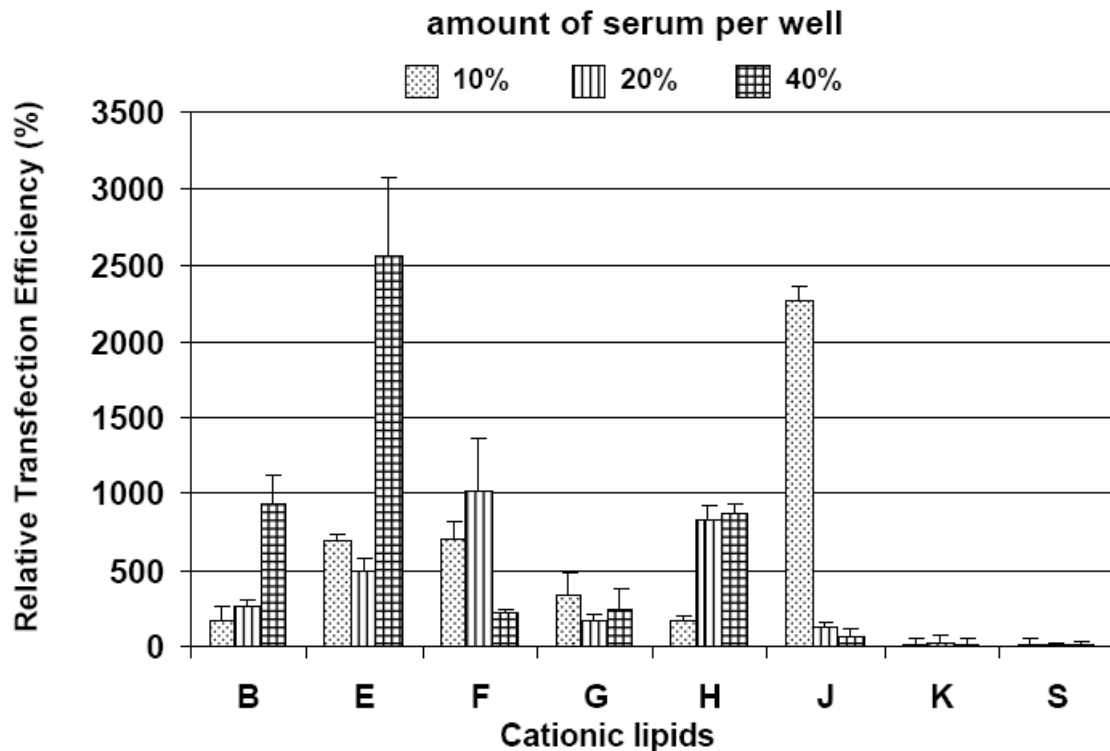
เพื่อศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอต่อประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ได้นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา (รูปที่ 27 และ 28) มาใช้โดยปรับเปลี่ยนปริมาณดีเอ็นเอจาก 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$ เป็น 0.2 $\mu\text{g}/\text{well}$ และ 0.4 $\mu\text{g}/\text{well}$ และใช้ EffecteneTM เป็นสารมาตรฐานและคำนวณให้มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เท่ากับ 100% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 29 จากผลการทดลองพบว่าไขมันประจุบวก **B**, **F**, **H** และ **K** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้สูงขึ้นเมื่อใช้ปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้น ประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของไขมันประจุบวก **E**, **G**, **J** และ **S** ไม่เปลี่ยนแปลงตามปริมาณดีเอ็นเอ จากการทดลองนี้ไขมันประจุบวก **H** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้สูงสุด



รูปที่ 29 การศึกษาผลของปริมาณดีเอ็นเอต่อประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

การศึกษาผลของ serum ต่อประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

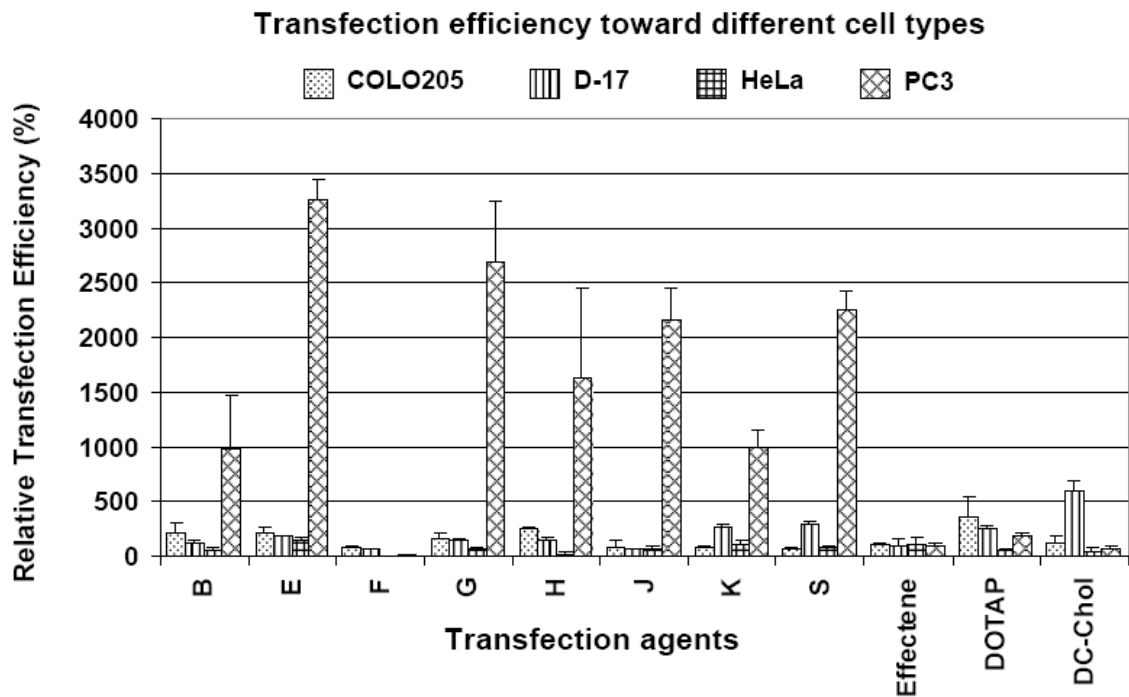
เพื่อศึกษาผลของปริมาณ serum ต่อประสิทธิภาพการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ได้นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา (รูปที่ 27 - 29) มาใช้ โดยการทดลองนี้จะใช้สภาวะที่มีปริมาณของ serum 10, 20 และ 40% และใช้ Effectene™ เป็นสารมาตรฐานและคำนวณให้มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เท่ากับ 100% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 30 ไขมันประจุบวก **B** และ **E** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อทำการทดลองในสภาวะที่มีปริมาณ serum 40% พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าสารมาตรฐาน Effectene™ ถึง 10 และ 26 เท่า ตามลำดับ ไขมันประจุบวก **J** มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อทำการทดลองในสภาวะที่มี serum 10% และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารมาตรฐาน Effectene™ ถึง 23 เท่า แต่ไขมันประจุบวก **J** มีประสิทธิภาพลดลงเมื่อทำการทดลองในสภาวะที่มี serum 20 และ 40% ไขมันประจุบวก **H** มีประสิทธิภาพในการพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้เท่ากันในสภาวะที่มี serum 20 และ 40% สำหรับไขมันประจุบวก **K** และ **S** ไม่สามารถพาคีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ในสภาวะที่มี serum



รูปที่ 30 การศึกษาผลของ serum ต่อประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์

การศึกษาประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆ

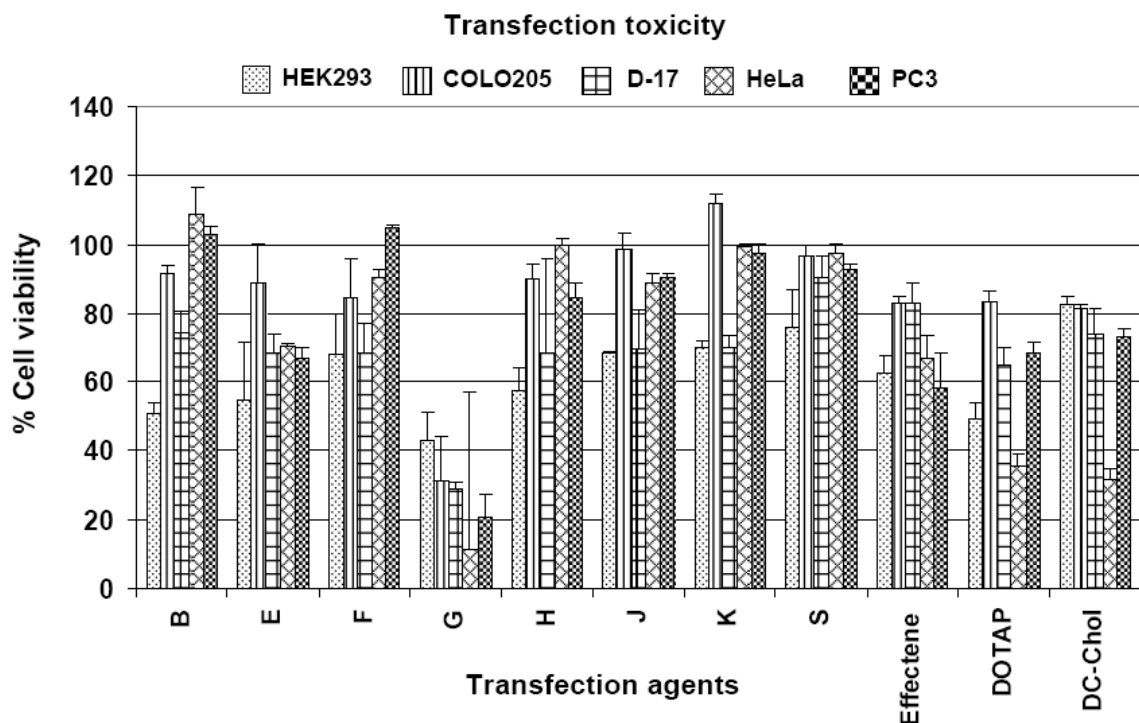
นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิด มาศึกษาประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา (รูปที่ 27 - 29) โดยการทดลองนี้จะใช้สภาวะไม่มี serum และใช้ Effectene™, DOTAP และ DC-Chol เป็นสารมาตรฐานและคำนวณให้ประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ Effectene™ เท่ากับ 100% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 31 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไขมันประจุบวกทุกชนิด ยกเว้นสาร F มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ PC3 ได้ดีกว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด โดยเฉพาะสาร E มีประสิทธิภาพการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้สูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าสารมาตรฐานถึง 32 เท่า ไขมันประจุบวกทุกชนิดไม่สามารถพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ COLO 205, D-17 และ HeLa สูงกว่า 500%



รูปที่ 31 การศึกษาประสิทธิภาพในการพาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ชนิดต่างๆ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

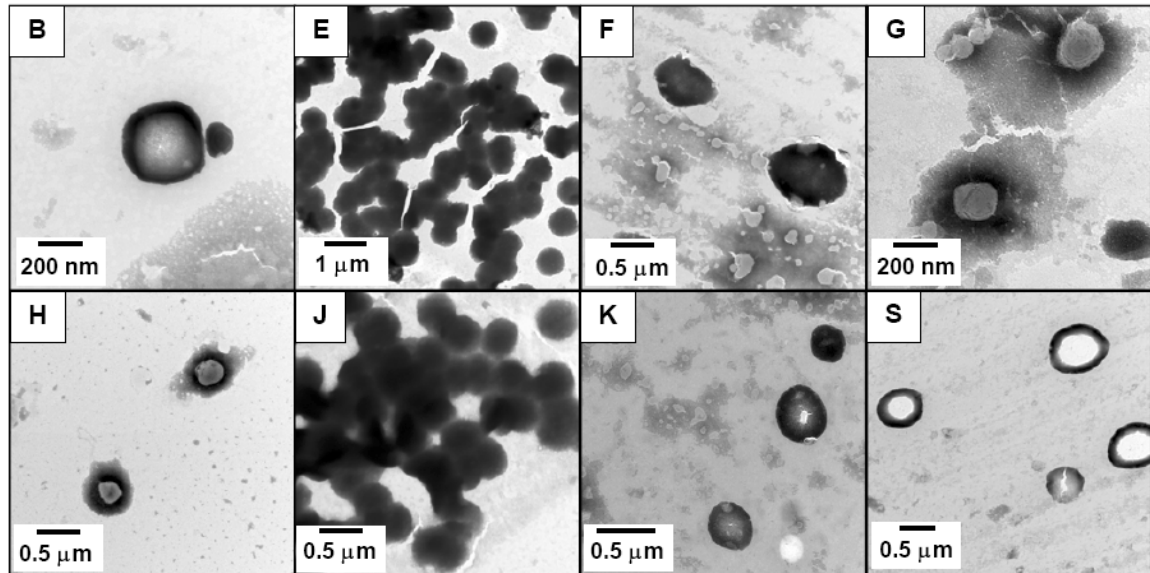
นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิด มาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธีการ MTT assay ชนิดต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 32 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไขมันประจุบวกทุกชนิด ยกเว้นสาร G ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบ



รูปที่ 32 การศึกษาความเป็นพิษกับเซลล์ชนิดต่างๆ

การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปโซม

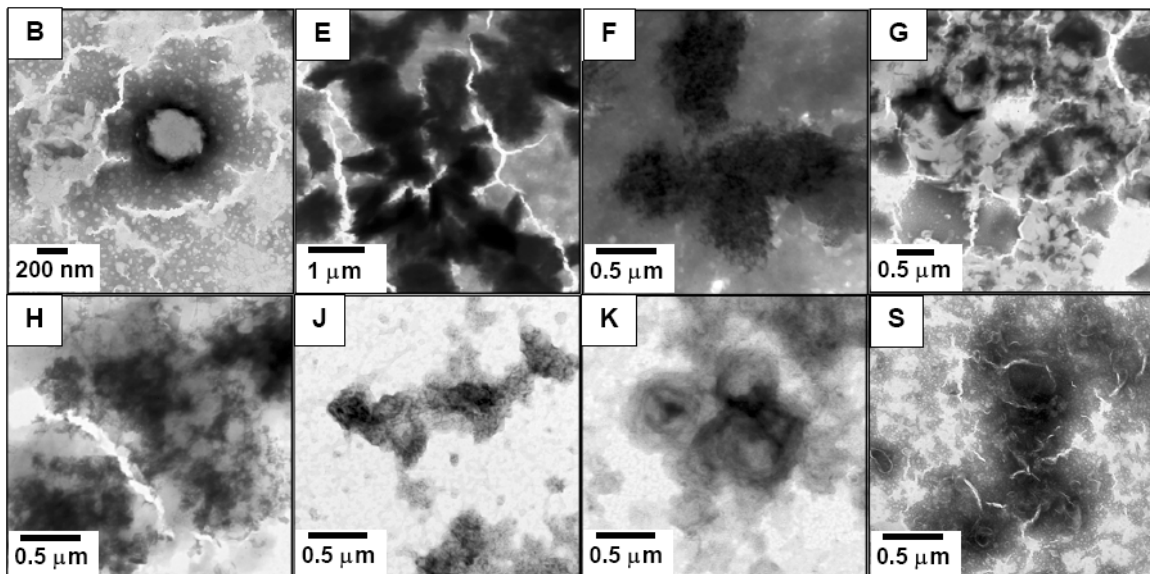
นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิด เตรียมเป็นไลโปโซมและศึกษาสัณฐานวิทยา ด้วย transmission electron microscopy ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 33 ไลโปโซมที่เตรียมได้มีขนาด 200-700 nm



รูปที่ 33 การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปโซม B, E, F, G, H, J, K และ S ด้วย transmission electron microscopy (TEM)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปเฟล็กซ์

นำไลโปโซมที่เตรียมจากไขมันประจุบวก B, E, F, G, H, J, K และ S มาผสมกับดีเอ็นเอ เตรียมเป็นไลโปเฟล็กซ์ ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 34 ไลโปเฟล็กซ์ที่เตรียมได้มีขนาด 300-1000 nm



รูปที่ 34 การศึกษาสัณฐานวิทยาของไลโปเฟล็กซ์ B, E, F, G, H, J, K และ S ด้วย transmission electron microscopy (TEM)

วิธีการ

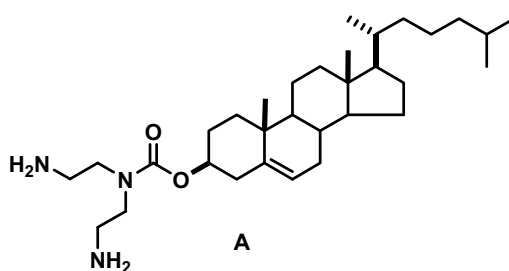
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Library 1

การสังเคราะห์ resin 36a-b

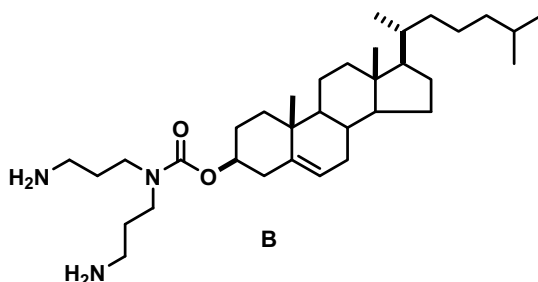
นำ active carbamate resin **21** (1 equiv, 1.1 mmol/g) มาทำปฏิกิริยากับ diethylenetriamine หรือ nor-spermidine ที่มากเกินไป ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (5 ml) เขย่า resin นาน 6 ชม. ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 อย่างละ 3 ครั้ง ๆ ละ 10 มล. นำ resin ที่ได้ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ลดความดัน 2 ชม. เติมหุ้มป้องกัน Dde-OH (6 equiv) ในตัวทำละลายผสม CH_2Cl_2 และ DMF ทำปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin ให้สะอาด ทำ resin ให้แห้งและทำปฏิกิริยากับ cholesteryl chloroformate (4 equiv) ใช้ pyridine เป็นเบส ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 นาน 12 ชม. หลังจากนั้น กรอง และล้างด้วยตัวทำละลายได้ผลิตภัณฑ์ resin **35** กำจัดหุ้มป้องกัน Dde ออกจาก resin 35 โดยทำปฏิกิริยากับ 5% N_2H_4 ในตัวทำละลาย DMF นาน 30 นาที 2 ครั้ง ล้างให้สะอาดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 อย่างละ 3 ครั้ง ๆ ละ 10 มล. ได้ผลิตภัณฑ์ resin **36**

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก A และ B

นำ resin **36a** (214.5 mg) และ **36b** (123.9 mg) มาทำปฏิกิริยากับ 50% TFA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (1.5 ml) เขย่าปฏิกิริยานาน 2 ชม. เก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH_2Cl_2 รวมส่วนสารละลายเข้าด้วยกัน ระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ได้ผลิตภัณฑ์ **A** และ **B** ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ระเหยตัวทำละลายภายใต้ลดความดันนาน 2 ชม.



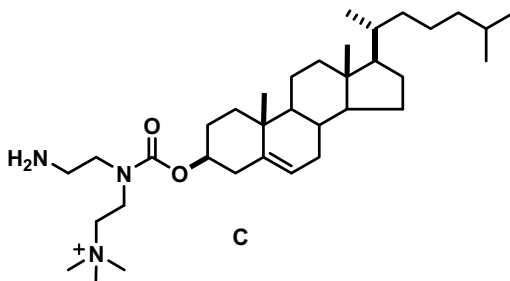
ไขมันประจุบวก A; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 214.5 mg) 45.8 mg, 38%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3436, 2918, 2849, 1773, 1682, 1541, 1507, 1463, 1381, 1202, 1021 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 9 drops of CD_3OD): δ 0.53 (s, 3H, CH_3 -18), 0.765 and 0.769 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27, overlapping signal), 0.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3 -21), 0.91 (s, 3H, CH_3 -19), 0.91-2.26 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton), 3.05 (m, 4H, $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.38 (m, 4H, $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.48 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.26 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.00-8.4 (br s, 6H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 9 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.6, 18.5, 18.9, 20.8, 22.3, 22.5, 23.7, 24.1, 27.6, 27.8, 28.0, 31.6, 31.7, 35.6, 35.8, 36.0, 36.3, 38.0, 39.3, 39.5, 42.1, 49.8, 56.0, 56.5, 76.7, 122.7, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 38.5 ($(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 46.7 ($(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 156.9 (C=O carbamoyl); MS (ES^+): m/z : 516 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%)



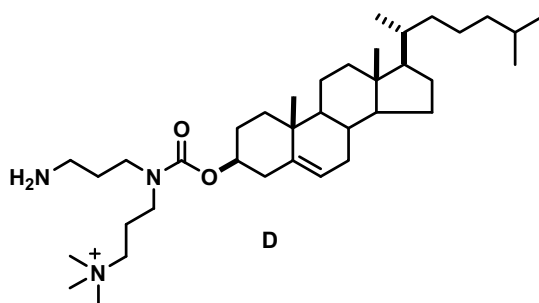
ไขมันประจุบวก B; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 123.9 mg) 52.4 mg, 70%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3355, 2918, 2845, 2280, 1675, 1600, 1509, 1468, 1429, 1202 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.811 and 0.815 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.86 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH₃-21), 0.90 (s, 3H, CH₃-19), 0.90-2.28 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton and (H₂NCH₂CH₂CH₂)₂N), 2.88 (br s, 4H, (H₂NCH₂CH₂CH₂)₂N), 3.26 (br s, 4H, (H₂NCH₂CH₂CH₂)₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.94 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.9, 24.2, 27.9, 28.1, 31.7, 35.8, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.2, 56.6, 75.8, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 25.7 and 26.4 ((H₂NCH₂CH₂CH₂)₂N), 27.2 and 38.4 ((H₂NCH₂CH₂CH₂)₂N), 44.2 and 44.6 ((H₂NCH₂CH₂CH₂)₂N), 156.5 (C=O carbamoyl); MS (ES⁺): m/z 544.7 ([M +H]⁺, 100%).

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก C และ D

นำ resin **36a** (148.3 mg) และ **36b** (148.3 mg) (1 equiv, 1.1 mmol/g) เติม methyl iodide (10 equiv, 83 และ 78 ml, ตามลำดับ) และ DIEA (10 equiv, 279 and 261 μ l, ตามลำดับ) ในตัวทำละลาย DMF (2 มล.) เขย่าปฏิกิริยานาน 18 ชม. ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาดด้วยตัวทำละลาย CH₂Cl₂, DMF, MeOH, DMF and CH₂Cl₂ อย่างละ 3 ครั้ง ๆ ละ 2 มล. นำ resin ที่ได้ทำปฏิกิริยากับ 50% TFA ในตัวทำละลาย CH₂Cl₂ (1.5 ml) เขย่าปฏิกิริยานาน 2 ชม. เก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH₂Cl₂ รวมส่วนสารละลายเข้าด้วยกัน ระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ได้ผลิตภัณฑ์ **C** และ **D** ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ระเหยตัวทำละลายภายใต้ลดความดันนาน 2 ชม.



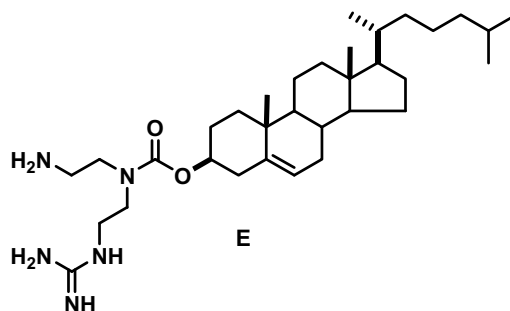
ไขมันประจุบวก C; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 148.3 mg) 48.0 mg, 53%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3436, 2932, 2840, 1681, 1469, 1426, 1202, 1132 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 6 drops of CD₃OD): δ 0.60 (s, 3H, CH₃-18), 0.788 and 0.792 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.84 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃-21), 0.94 (s, 3H, CH₃-19), 0.96-2.30 (m, 30H; protons in cholesteryl skeleton), 3.06 (s, 9H, (CH₃)₃N⁺), 3.10 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂N), 3.48-3.77 (m, 6H, CH₂CH₂NCH₂CH₂N(CH₃)₃), 4.40 (br s, 1H, H-3-



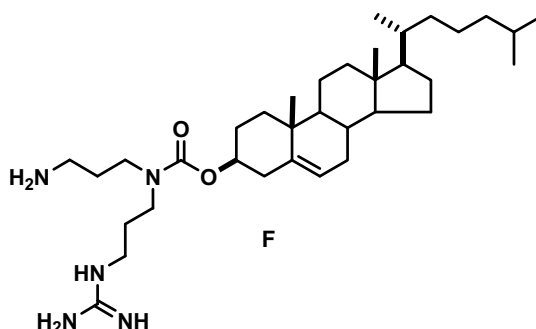
ไขมันประจุบวก D; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 139.3 mg) 57.4 mg, 64%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3436, 2931, 1677, 1468, 1423, 1379, 1202, 1130 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 6 drops of CD₃OD): δ 0.61 (s, 3H, CH₃-18), 0.797 and 0.801 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.85 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₃-21), 0.94 (s, 3H, CH₃-19), 0.94-2.28 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton, CH₂CH₂CH₂NCH₂CH₂CH₂), 2.89 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂CH₂NCH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 3.02-3.03 (br s, 9H, N(CH₃)₃⁺), 3.27 (br s, 4H, CH₂NCH₂), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.98 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 6 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 75.8, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 25.7 and 26.4 (CH₂CH₂NCH₂CH₂), 37.0 (H₂NCH₂CH₂CH₂N), 38.4 (CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃⁺), 44.3 (NCH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 44.5 (H₂NCH₂CH₂CH₂N), 53.1 (N(CH₃)₃), 156.1 (C=O carbamoyl); MS (ES⁺): m/z 587.1 ([M +H]⁺, 100%).

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก E และ F

นำ resin **36a** (148.4 mg) และ **36b** (145.3 mg) (1 equiv, 1.1 mmol/g) เติม *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methyliothiurea (4 equiv, 190 and 186 mg, ตามลำดับ) และ DIEA (10 equiv, 111 and 109 μ l, ตามลำดับ) ในตัวทำละลาย DMF (2 มล.) เขย่าปฏิกิริยานาน 18 ชม. ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาดด้วยตัวทำละลาย CH₂Cl₂, DMF, MeOH, DMF and CH₂Cl₂ อย่างละ 3 ครั้ง ๆ ละ 2 มล. นำ resin ที่ได้ทำปฏิกิริยากับ 50% TFA ในตัวทำละลาย CH₂Cl₂ (1.5 ml) เขย่าปฏิกิริยานาน 2 ชม. เก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH₂Cl₂ รวมส่วนสารละลายเข้าด้วยกัน ระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ได้ผลิตภัณฑ์ **E** และ **F** ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ระเหยตัวทำละลายภายใต้ลดความดันนาน 2 ชม.



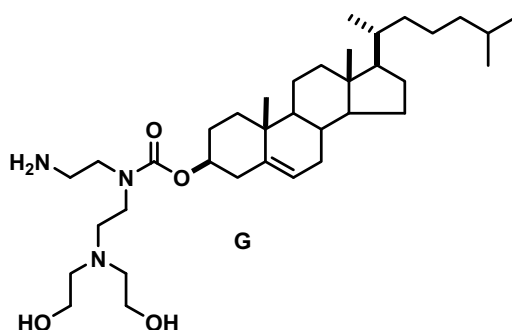
ไขมันประจุบวก E; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 148.4 mg) 42.1 mg, 46%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3355, 3182, 2934, 2278, 1779, 1674, 1509, 1468, 1432, 1376, 1203, 1138, 1018 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.821 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.87 (d, J = 5.7 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 1.00-2.30 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton), 3.07 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂N), 3.29 and 3.36 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂NCH₂CH₂), 3.51 (br s, 2H, NCH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H; H-6-Chol), 8.01 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.0, 20.9, 22.4, 22.7, 23.7, 24.2, 27.6, 27.9, 28.1, 31.7, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.0, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 76.6, 122.7, 139.3 (carbons in cholesteryl skeleton), 38.5 (CH₂CH₂NCH₂CH₂), 47.4 (CH₂NCH₂), 156.9 (C=O carbamoyl and C=N guanidine); MS (ES⁺): m/z 558.6 ([M +H]⁺, 100%).



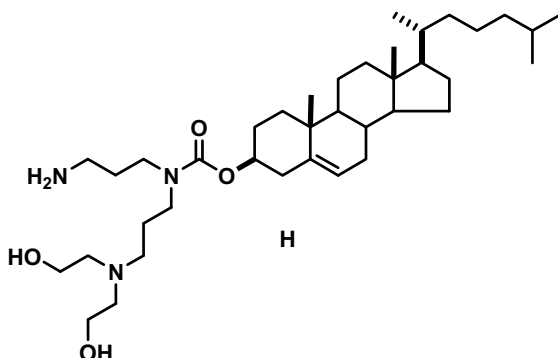
ไขมันประจุบวก F; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 145.3 mg) 52.4 mg, 56%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3350, 2918, 1673, 1509, 1465, 1429, 1203, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 6 drops of CD₃OD): δ = 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.805 and 0.809 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.86 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 1.00-2.28 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton and CH₂CH₂NCH₂CH₂), 2.87 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂N), 3.08 (br s, 2H, CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 3.19 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂N), 3.25 (br s, 2H, NCH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 4.38 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.97 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 6 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.8, 24.1, 27.9, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.5, 76.0, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 25.7 and 26.4 (CH₂CH₂NCH₂CH₂), 37.3 (H₂NCH₂CH₂CH₂N), 38.5 (NCH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 44.1 (NCH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 44.6 (H₂NCH₂CH₂CH₂N), 157.2 (C=O carbamoyl and C=N guanidine); MS (ES⁺): m/z 586.7 ([M +H]⁺, 100%).

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก G และ H

นำ resin **36a** (152.8 mg) และ **36b** (159.3 mg) (1 equiv, 1.1 mmol/g) เติม 2-bromoethanol (8 equiv, 95 and 99 μ l, ตามลำดับ) และ DIEA (8 equiv, 230 and 240 μ l, ตามลำดับ) ในตัวทำละลาย DMF (2 มล.) เขย่าปฏิกิริยานาน 18 ชม. ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 อย่างละ 3 ครั้ง ๆ ละ 2 มล. นำ resin ที่ได้ทำปฏิกิริยากับ 50% TFA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (1.5 ml) เขย่าปฏิกิริยานาน 2 ชม. เก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH_2Cl_2 รวมส่วนสารละลายเข้าด้วยกัน ระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ได้ผลิตภัณฑ์ **G** และ **H** ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ระเหยตัวทำละลายภายใต้ลดความดันนาน 2 ชม.



ไขมันประจุบวก **G**; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 152.8 mg) 41.5 mg, 41%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3335, 2932, 2840, 2279, 1674, 1597, 1541, 1509, 1413, 1310, 1203, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD): δ 0.62 (s, 3H, CH_3 -18), 0.809 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.86 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 0.90-2.28 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton), 3.12 (br s, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.36 (br s, 4H, CH_2NCH_2), 3.54 (br s, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$), 3.88 (br s, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$), 4.37 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.12 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.8, 24.1, 27.7, 27.9, 28.1, 31.7, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.0, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.60, 56.69, 76.6, 122.9, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 38.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 46.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 55.5, 55.8, 56.1 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$), 157.0 (C=O carbamoyl); MS (ES^+): m/z 604.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).



ไขมันประจุบวก **H**; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 159.3 mg) 64.1 mg, 58%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3383, 2932, 2840, 1676, 1468, 1432, 1202, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 7 drops of CD_3OD): δ 0.61 (s, 3H, CH_3 -18), 0.80 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27),

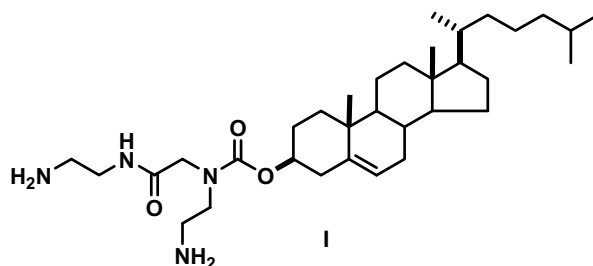
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Library 2

การสังเคราะห์ resin 45a-d

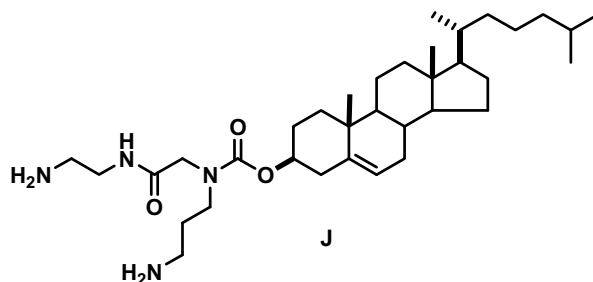
นำ active carbamate resin **21** (1 equiv, 1.1 mmol/g) มาทำปฏิกิริยากับ 1,2-diaminoethane หรือ 1,3-diaminopropane ที่มากเกินไปในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (7 มล.) เขย่าปฏิกิริยาข้ามคืน ล้าง resin **40a** และ **40b** ที่ได้ด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 , DMF และ CH_2Cl_2 3 ครั้ง ๆ ละ 5 มล. ตามลำดับ ทำ resin ให้แห้งภายใต้ลดความดัน นำ resin ที่แห้งแล้วมาทำปฏิกิริยากับ bromoacetic acid (4 equiv) โดยใช้ DIC (4 equiv) เป็น coupling agent ในตัวทำละลายผสม CH_2Cl_2 และ DMF (5 ml) ทำปฏิกิริยานาน 12 ชม. ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาดดังที่กล่าวไว้ในตอนต้น ได้ resin **41a** และ **41b** นำ resin ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ 1,2-diaminoethane หรือ 1,3-diaminopropane ที่มากเกินไปในตัวทำละลาย DMF (7 มล.) เขย่าปฏิกิริยานาน 12 ชม. ล้าง resin ที่ได้ให้สะอาดได้ผลิตภัณฑ์ resin **42a-42d** นำ resin ที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อกับ Dde-OH ตามด้วย cholesteryl chloroformate และกำจัดหมู่ป้องกัน Dde ตามลำดับ ซึ่งทำเช่นเดียวกับการสังเคราะห์ resin **36a** และ **36b** ได้ผลิตภัณฑ์ resin **45a-45d**

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก I, J, K และ L

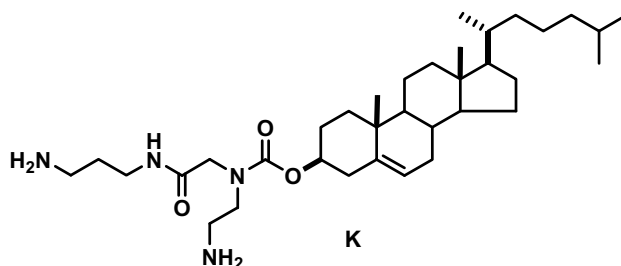
นำ resin **45a** (177.0 mg), **45b** (208.0 mg), **45c** (142.0 mg) และ **45d** (261.3 mg) มาทำปฏิกิริยากับ 50% TFA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (1.5 ml) เขย่าปฏิกิริยานาน 2 ชม. เก็บส่วนสารละลาย ล้าง resin ด้วย CH_2Cl_2 รวมส่วนสารละลายเข้าด้วยกัน ระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ได้ผลิตภัณฑ์ **I, J, K** และ **L** ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ระเหยตัวทำละลายภายใต้ลดความดันนาน 2 ชม.



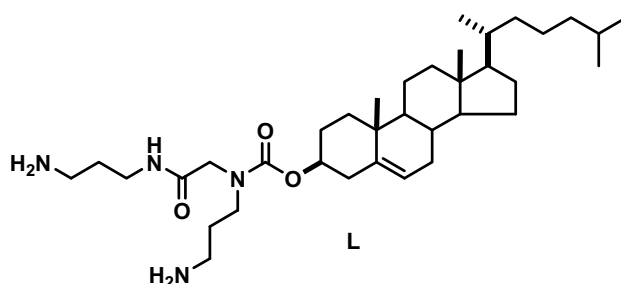
ไขมันประจุบวก I; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 177.0 mg) 46.3 mg, 42%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3346, 2918, 2279, 1675, 1597, 1509, 1413, 1310, 1203, 1124, 1015 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.60 (s, 3H, CH₃-18), 0.794 and 0.797 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.84 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH₃-21), 0.92 (s, 3H, CH₃-19), 0.92-2.27 (m, 28H, protons in cholesteryl skeleton), 3.04 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂NHCO), 3.11 (br s, 2H, NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 3.45 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂NHCOCH₂N), 3.54 (br s, 2H, NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 3.93 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.37 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.28 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.05-8.40 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.7, 27.8, 28.1, 31.7, 35.7, 36.0, 36.4, 36.7, 38.1, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 76.9, 122.7, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 36.9 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 38.1 (NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 39.1 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 47.5 (NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 51.0 (NHCOCH₂N), 156.0 (C=O carbamoyl), 173.0 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 573.2 ([M +H]⁺, 100%).



ไขมันประจุบวก J; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 208.0 mg) 69.0 mg, 51%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3428, 2918, 2834, 1674, 1462, 1376, 1202, 1130, 1018 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD): δ 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.816 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.87 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH₃-21), 0.96 (s, 3H, CH₃-19), 0.96-2.27 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 3.08 (br s, 4H, CH₂CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 3.47 (br s, 4H, CH₂NHCOCH₂NCH₂), 3.84 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.01 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.6, 122.7, 139.3 (carbons in cholesteryl skeleton), 30.0 (NHCOCH₂NCH₂CH₂), 37.0 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 38.2 (NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 39.1 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 45.8 (NHCOCH₂NCH₂CH₂), 52.2 (NHCOCH₂N), 156.0 (C=O carbamoyl), 173.0 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 587.5 ([M +H]⁺, 100%).



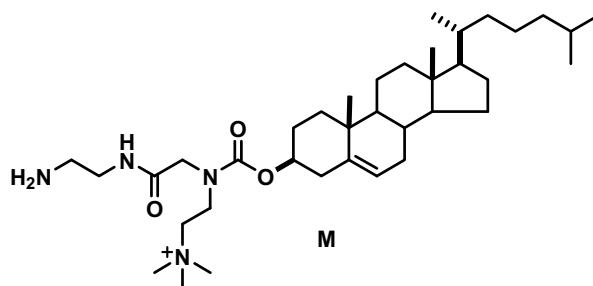
ไขมันประจุบวก K; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 142.0 mg) 37.9 mg, 42%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3338, 2918, 2851, 1676, 1594, 1535, 1460, 1202, 1130 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.81 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.87 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH₃-21), 0.97 (s, 3H, CH₃-19), 0.97-2.90 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 2.94 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.05 (br s, 2H, NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 3.29 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.58 (br s, 2H, NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 3.93 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.38 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.94 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.6, 122.7, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.7 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 38.3 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 52.4 (NHCOCH₂N), 156.5 (C=O carbamoyl), 172.5 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 587.3 ([M +H]⁺, 100%).



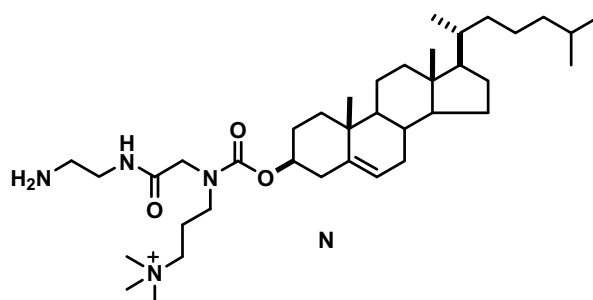
ไขมันประจุบวก L; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 261.3 mg) 70.9 mg, 41%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3299, 3064, 2935, 1682, 1541, 1468, 1379, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD): δ 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.813 (d, J = 6.4 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.86 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 0.95-2.30 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton and CH₂CH₂CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NH₂), 2.91 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.27 (br s, 4H, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂), 3.83 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.96 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.1, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 75.9, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO and CH₂NCH₂CH₂CH₂NH₂), 37.1 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 38.4 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 47.5 (CH₂NCH₂CH₂CH₂NH₂), 50.5 (NHCOCH₂N), 156.5 (C=O carbamoyl), 171.6 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 601.5 ([M +H]⁺, 100%).

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก M, N, O และ P

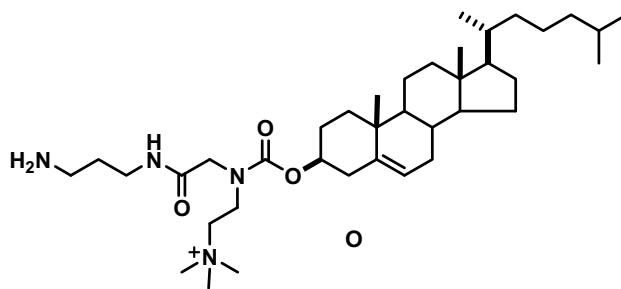
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **M-P** สามารถสังเคราะห์ได้จาก resin **45a-45d** โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **C** และ **D** จาก resin **36a** และ **36b**



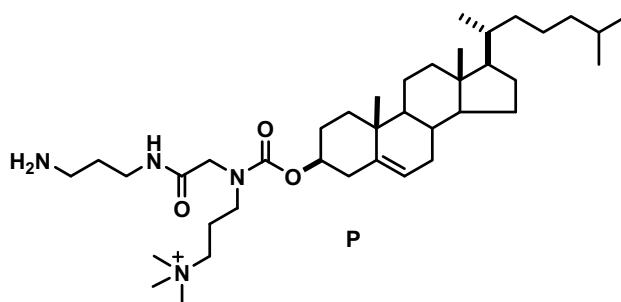
ไขมันประจุบวก **M**; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 192.0 mg) 76.1 mg, 59%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3436, 2934, 1678, 1541, 1468, 1378, 1202, 1131, 1023 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 10 drops of CD₃OD): δ 0.56 (s, 3H, CH₃-18), 0.749 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.80 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH₃-21), 0.88 (s, 3H, CH₃-19), 0.88-2.20 (m, 28H, protons in cholesteryl skeleton), 3.02-3.08 (m, 11H, H₂NCH₂CH₂ and CH₂CH₂N(CH₃)₃), 3.40 (br s, 2H, CH₂N(CH₃)₃), 3.50 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂), 3.64 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₃)₃), 3.97 (br s, 2H, NHCOCH₂), 4.36 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.21 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.90-8.10 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 10 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.6, 18.4, 18.9, 20.3, 22.2, 22.5, 23.6, 24.0, 27.7, 27.8, 28.0, 31.6, 35.6, 35.9, 36.3, 36.4, 38.2, 39.3, 39.5, 42.1, 49.8, 55.9, 56.5, 76.5, 122.7, 139.1 (carbons in cholesteryl skeleton), 36.7 (H₂NCH₂CH₂), 38.0 (CH₂N(CH₃)₃), 39.1 (H₂NCH₂CH₂), 42.8 (CH₂CH₂N(CH₃)₃), 50.4 (NHCOCH₂), 53.4 and 53.5 (CH₂CH₂N(CH₃)₃), 156.1 (C=O carbamoyl), 170.6 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 615.8 ([M +H]⁺, 100%).



ไขมันประจุบวก **N**; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 173.1 mg) 62.7 mg, 52%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3334, 3042, 2930, 2851, 2279, 1677, 1594, 1541, 1462, 1203, 1132 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 6 drops of CD₃OD): δ 0.60 (s, 3H, CH₃-18), 0.795 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.84 (d, J = 5.3 Hz, 3H, CH₃-21), 0.93 (s, 3H, CH₃-19), 0.95-2.27 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 3.03 and 3.07 (s, 11H, H₂NCH₂CH₂NHCO and N(CH₃)₃, partially overlapping signal), 3.17 (br s, 2H, CH₂N(CH₃)₃), 3.44 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂NHCO and NCH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 3.91 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.38 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.28 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.02 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 6 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 27.9, 28.1, 31.7, 35.6, 36.0, 36.4, 36.7, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 76.6, 122.7, 139.1 (carbons in cholesteryl skeleton), 30.0 (CH₂CH₂N(CH₃)₃), 37.0 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 38.2 (CH₂N(CH₃)₃), 39.2 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 45.5 (NCH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 52.3 (NHCOCH₂N), 53.3 (N(CH₃)₃), 156.1 (C=O carbamoyl), 170.6 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 630.8 ([M +H]⁺, 100%).



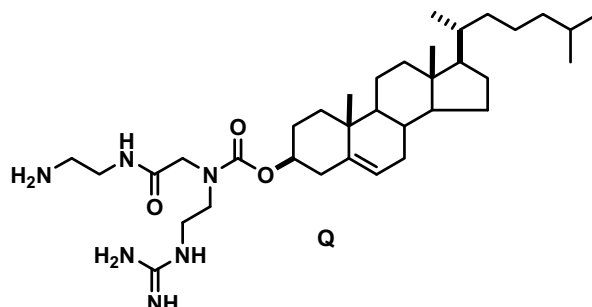
ไขมันประจุบวก O; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 177.8 mg) 48.4 mg, 39%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3333, 2918, 2840, 1678, 1538, 1509, 1456, 1202, 1121 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD): δ 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.809 (d, J = 5.8 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.86 (d, J = 4.8 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 0.95-2.80 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 2.83 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 2.93, 3.04 and 3.10 (br s, 9H, N(CH₃)₃), 3.27 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₃)₃), 3.58 (br s, 2H, CH₂NHCO), 3.70 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₃)₃), 4.01 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 7.99 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.5, 122.7, 139.3 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 38.3 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO and NCH₂CH₂N(CH₃)₃), 52.4 (NHCOCH₂N), 53.3 and 53.5 (N(CH₃)₃), 156.1 (C=O carbamoyl), 170.6 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 629.6 ([M +H]⁺, 100%).



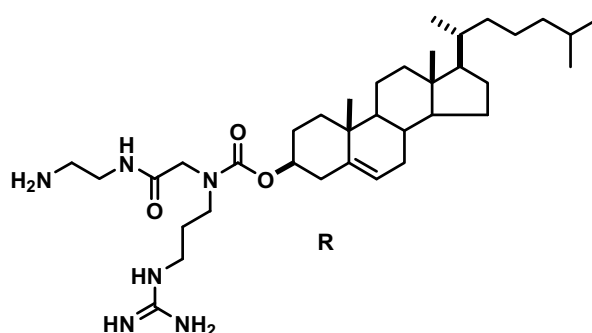
ไขมันประจุบวก P; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 186.1 mg) 61.8 mg, 47%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3313, 3042, 2934, 2274, 1678, 1541, 1468, 1202, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.61 (s, 3H, CH₃-18), 0.80 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.85 (d, J = 6.1 Hz, 3H, CH₃-21), 0.94 (s, 3H, CH₃-19), 0.98-2.30 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton, H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 2.90 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 3.02, 3.07 and 3.10 (s, 9H, N(CH₃)₃, partially overlapping), 3.83 (br s, 4H, CH₂NHCO and CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 3.90 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.96 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.9, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 75.9, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 (H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 37.1 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 38.3 (CH₂N(CH₃)₃), 38.4 (H₂NCH₂CH₂), 47.5 (CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 50.9 (NHCOCH₂N), 53.2 (N(CH₃)₃), 156.4 (C=O carbamoyl), 171.5 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 644.6 ([M +H]⁺, 100%).

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Q, R, S และ T

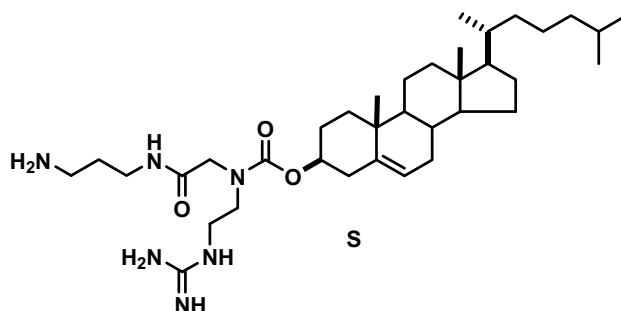
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก Q-T สามารถสังเคราะห์ได้จาก resin **45a-45d** โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก E และ F จาก resin **36a** และ **36b**



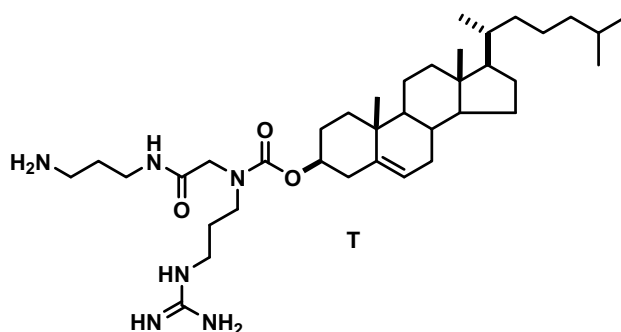
ไขมันประจุบวก Q; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 159.5 mg) 50.5 mg, 47%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3347, 2920, 2850, 2279, 1672, 1597, 1509, 1465, 1311, 1203, 1132 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.60 (s, 3H, CH₃-18), 0.796 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.84 (d, J = 5.8 Hz, 3H, CH₃-21), 0.92 (s, 3H, CH₃-19), 0.93-2.28 (m, 28H, protons in cholesteryl skeleton), 3.02 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂), 3.30, 3.35 and 3.43 (br s, 6H, H₂NCH₂CH₂NHCOCH₂NHC(NH)NH₂), 3.93 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.35 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.27 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.05 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 28.1, 31.7, 35.7, 36.0, 36.4, 36.7, 38.1, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 76.9, 123.6, 139.3 (carbons in cholesteryl skeleton), 36.9 (H₂NCH₂CH₂), 38.5 (H₂NCH₂CH₂), 47.5 (CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 51.0 (CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 156.5 (C=O carbamoyl and C=N guanidine, overlapping), 173.0 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 615.4 ([$M+H$]⁺, 100%).



ไขมันประจุบวก R; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 173.4 mg) 51.4 mg, 43%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3327, 3070, 2918, 2834, 1674, 1574, 1467, 1432, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.82 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.87 (d, J = 4.4 Hz, 3H, CH₃-21), 0.98 (s, 3H, CH₃-19), 0.98-2.29 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 3.08 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂), 3.20 and 3.30 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂NHCO and CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 3.47 (br s, 2H, CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 3.84 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.40 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.04 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.2, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.6, 122.7, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 30.0 (CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 37.0 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 38.2



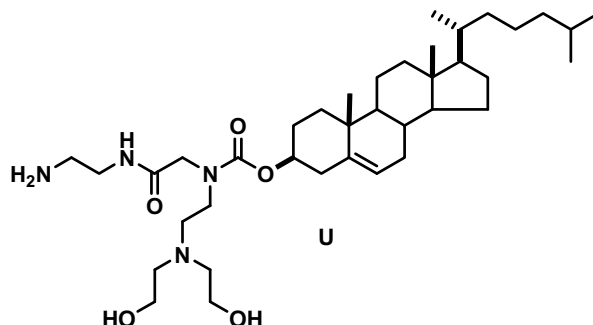
ไขมันประจุบวก S; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 161.7 mg) 36.3 mg, 33%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3327, 2918, 1673, 1535, 1462, 1202, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD): δ 0.61 (s, 3H, CH₃-18), 0.805 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.85 (d, J = 5.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 0.95-2.80 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and H₂NCH₂CH₂CH₂), 2.92 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂), 3.26 and 3.33 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 3.48 (br s, 2H, CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 3.92 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.37 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.28 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.99 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.1, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.5, 76.2, 122.8, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.8 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 38.2 (H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 52.5 (NHCOCH₂N), 156.1 (C=O carbamoyl and C=N guanidine, overlapping), 170.5 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 629.5 ([M +H]⁺, 100%).



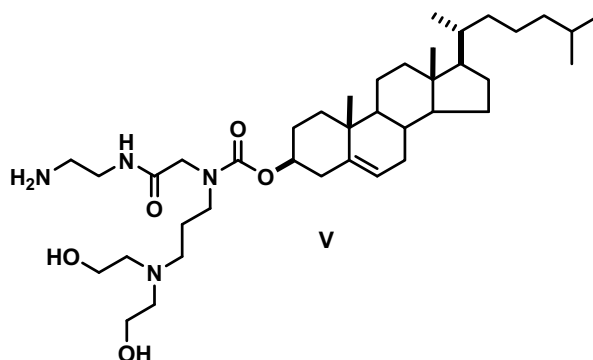
ไขมันประจุบวก T; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 170.3 mg) 62.1 mg, 52%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3320, 2933, 1678, 1543, 1468, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.82 (d, J = 6.4 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.86 (d, J = 5.9 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 0.95-2.30 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton, H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 2.92 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.22 (br s, 2H, CH₂NHC(NH)NH₂), 3.28 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 3.83 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.91 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.1, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 75.9, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 (H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 37.1 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 38.3 (CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 38.4 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 47.5 (CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 50.5 (NHCOCH₂N), 156.5 (C=O carbamoyl and C=N guanidine, overlapping), 171.6 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 643.3 ([M +H]⁺, 100%).

การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก U, V, W และ X

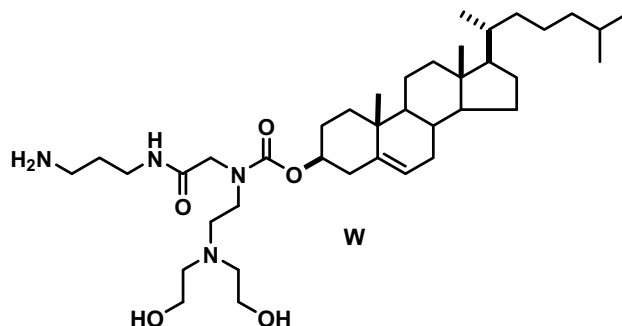
การสังเคราะห์ไขมันประจุบวก U-X สามารถสังเคราะห์ได้จาก resin **45a-45d** โดยใช้วิธีการสังเคราะห์เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ไขมันประจุบวก **G** และ **H** จาก resin **36a** และ **36b**



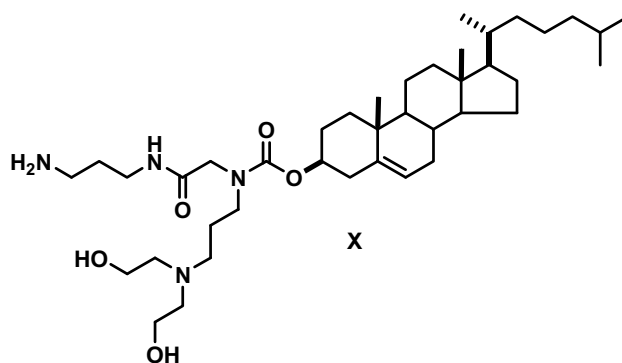
ไขมันประจุบวก U; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 185.7 mg) 71.8 mg, 53%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3334, 2933, 2279, 1678, 1541, 1509, 1432, 1203, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.818 and 0.821 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.86 (d, J = 6.1 Hz, 3H, CH₃-21), 0.93 (s, 3H, CH₃-19), 0.93-2.32 (m, 28H, protons in cholesteryl skeleton), 3.10 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂), 3.37 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.51 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂ and CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.70 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.87 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.99 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.31 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.89 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.0, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.7, 27.9, 28.1, 31.7, 35.8, 36.1, 36.4, 36.8, 38.1, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.6, 122.4, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 37.2 (H₂NCH₂CH₂), 38.1 (CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 39.2 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 47.5 (CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 50.5 (NHCOCH₂N), 55.3, 55.5 and 55.8 (N(CH₂CH₂OH)₂), 156.2 (C=O carbamoyl), 173.1 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 661.5 ([M +H]⁺, 100%).



ไขมันประจุบวก V; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 199.3 mg) 61.6 mg, 42%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3315, 2934, 2840, 2274, 1677, 1541, 1467, 1429, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.60 (s, 3H, CH₃-18), 0.792 (d, J = 5.6 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.85 (d, J = 5.3 Hz, 3H, CH₃-21), 0.94 (s, 3H, CH₃-19), 0.97-2.26 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.05 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂), 3.27 (m, 10H, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.44 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.84 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.38 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.28 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.02 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.1, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.1, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl



ไขมันประจุบวก **W**; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 177.0 mg) 41.9 mg, 32%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3389, 3081, 2933, 1677, 1467, 1202, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.809 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.86 (d, J = 5.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.96 (s, 3H, CH₃-19), 0.96-2.28 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and H₂NCH₂CH₂CH₂), 2.91 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.29 and 3.36 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.50 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.75 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.85 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.92 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.97 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.89 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.1, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.5, 76.2, 122.8, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.8 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 38.2 (H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 52.5 (NHCOCH₂N), 55.1 and 55.3 (N(CH₂CH₂OH)₂), 156.1 (C=O carbamoyl), 170.5 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 675.5 ([M +H]⁺, 100%).



ไขมันประจุบวก **X**; Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 192.6 mg) 65.1 mg, 44%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3308, 3070, 2934, 1678, 1467, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.820 and 0.824 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.86 (d, J = 6.1 Hz, 3H, CH₃-21), 0.93 (s, 3H, CH₃-19), 0.93-2.30 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton, H₂NCH₂CH₂CH₂ and NCH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 2.93 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.10 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.29 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.57 (br s, 4H, CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.87 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.99 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.31 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.80 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.8, 18.6, 19.2, 21.0, 22.4,

สรุปผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

จากการสังเคราะห์ไขมันประจุบวกกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีประจุส่วนหัวแบบไม่สมมาตรด้วยเทคนิคการสังเคราะห์บนวัฏภาคของแข็ง สังเคราะห์สารได้ทั้งหมด 24 ชนิด การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทาง IR ^1H NMR และ MS สเปกโทรสโกปี จากการศึกษาประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293 พบว่า ไขมันประจุบวก 8 ชนิด มีประสิทธิภาพดีกว่าสารมาตรฐาน EffecteneTM นำไขมันประจุบวกทั้ง 8 ชนิดไปศึกษาหาสถานะที่ทำให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด พบว่าไขมันประจุบวก 7 ชนิด มีประสิทธิภาพในการพาดิเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ PC3 ได้ดีกว่าสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด คือ EffecteneTM, DC-Chol และ DOTAP ไขมันประจุบวกทั้ง 7 ชนิด ยกเว้น สาร G ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบ ไลโปโซมที่ 8 สารมีขนาด 300-1000 nm

เอกสารอ้างอิง

1. Intody, Z.; Perkins, B.D.; Wilson, J.H.; Wensel, T.G. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 4283-4290.
2. Faria, M.; Wood, C.D.; Perrouault, L.; Nelson, J.S.; Winter, A.; White, M.R.H.; Hélène, C.; Giovannangeli, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 3862-3867.
3. Taylor, R.W.; Chinnery, P.F.; Turnbull, D.M.; Lightowers, R.N. *Nat. Genet.* **1997**, 15, 212-215.
4. Wang, G.; Xu, X.; Pace, B.; Dean, D.A.; Glazer, P.M.; Chan, P.; Goodman, S.R.; Shokolenko, I. *Nucleic Acids Res.* **1999**, 28, 2806-2813.
5. Xu, X.; Glazer, P.M.; Wang, G. *Gene* **2000**, 242, 219-228.
6. Bates, P.J.; Kahlon, J.B.; Thomas, S.D.; Trent, J.O.; Miller, D.M. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 26369-26377.
7. Bennett, C.F. *Biochem. Phar.* **1998**, 55, 9-19.
8. Hélène, C.; Toulmé, J.J. *Biochim. Biophys Acta* **1990**, 1049, 99-125.
9. Khuri, F.R.; Kurie, J.M. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 1607-1610.
10. Crooke, S.T. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1998**, 8, 7-8.
11. Cole-strauss, A.; Yoon, K.; Xiang, Y.; Byrne, B.C.; Rice, M.C.; Gryn, J.; Holloman, W.K.; Kmiec, E.B. *Science* **1996**, 273, 1386-1389.
12. Staley, J.P.; Guthrie, C. *Cell* **1998**, 92, 315-326.
13. Liu, X.; Jiang, Q.; Mansfield, S.G.; Puttaraju, M.; Zhang, Y.; Zhou, W.; Cohn, J.A.; Garcia-Blanco, M.A.; Mitchell, L.G.; Engelhardt, J.F. *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 47-52.
14. Chao, H.; Mansfield, S.G.; Bartel, R.C.; Hiriyanna, S.; Mitcheck, L.G. Garcia-Blanco, M.A.; Walsh, C.E. *Nat. Med.* **2003**, 9, 1015-1019.
15. Amado, R.G.; Chen, I.S.Y. *Biomedicine* **1999**, 285, 674-676.
16. Somia, N.; Verma, I.M. *Nat. Rev. Genet.* **2000**, 1, 91-99.
17. Felgner, P.L. *Adv. Drug. Delivery. Rev.* **1990**, 5, 163-187.

18. Harland, R.; Weintraub, H. *J. Cell Biol.* **1985**, 101, 1094-1099.
19. Heiser, W.C. *Methods Mol. Biol.* **2000**, 130, 117-134.
20. Schenborn, E.T.; Goiffon, V. *Methods Mol. Biol.* **2000**, 130, 135-145.
21. Miller, A.D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1768-1785.
22. Gao, X.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179, 280-285.
23. Felgner, J.H.; Kumar, R.; Sridhar, C.N.; Wheeler, C.J.; Tsai, Y.J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Fengler, P.L. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2550-2561.
24. Balasubramaniam, R.P.; Bennett, M.J.; Aberle, A.M.; Malone, J.G.; Nantz, M.H.; Malone, R.W. *Gene Ther.* **1996**, 3, 163-172.
25. Behr, J.P.; Demeneix, B.; Loeffler, J.P.; Perez-Mutul, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 6982-6986.
26. Pinnaduwa, P.; Schmitt, L.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 985, 33-37.
27. Heyes, J.A.; Niculescu-Duvaz, D.; Cooper, R.G.; Springer, C.J. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 99-114.
28. Lee, E.R.; Marshall, J.; Siegel, C.S.; Jiang, C.; Yew, N.S.; Nichols, M.R.; Nietupski, J.B.; Ziegler, R.J.; Lane, M.B.; Wang, K.X.; Wan, N.C.; Scheule, R.K.; Harris, D.J.; Smith, A.E.; Cheng, S.H. *Human Gene Ther.* **1996**, 7, 1701-1717.
29. Cooper, R.G.; Etheridge, C.J.; Stewart, L.; Marshall, J.; Rudginsky, S.; Cheng, S.H.; Miller, A.D. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 137-151.
30. Yingyongnarongkul, B.; Howarth, M.; Elliott, T.; Bradley, M. *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 753-760.
31. Yingyongnarongkul B, Howarth M, Elliott T, Bradley M. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 463-473.
32. Renault, J.; Lebranchu, M.; Lecat, A.; Uriac, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6655-6658.
33. Jonsson, D. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4793-4796.
34. Yingyongnarongkul, B.; Apiratikul, N.; Aroonreak, N.; Suksamrarn, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5870-5873.
35. Kaiser, E.; Colescot, R.; Bossinge, C.; Cook, P. *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-596.
36. Hui, S.W.; Langner, M.; Zhao, Y.L.; Ross, P.; Hurley, E.; Chan, K. *Biophys. J.* **1996**, 71, 590-599; Mok, K.W.; Cullis, P.R. *Biophys. J.* **1997**, 73, 2534-2545.
37. Moradpour, D.; Schauer, J. I.; Zurawski, V. R.; Wands, J. R.; Boutin, R. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 221, 82.
38. Vigneron, J. P.; Oudrhiri, N.; Fauquet, L.; Vergely, L.; Bradley, J. C.; Basseville, M.; Lehn, P.; Lehn, J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9682.
39. Lee, E. R.; Marshall, J.; Siegel, C. S.; Jiang, C.; Yew, N. S.; Nichols, M. R.; Nietupski, J. B.; Ziegler, R. J.; Lane, M. B.; Wang, K. X.; Wan N. C.; Scheule, R. K.; Harris, D. J.; Smith, A. E.; Chen, S. H. *Hum. Gene Ther.* **1996**, 7, 1701.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Yingyongnarongkul B., Radchatawedchakoon W., Krajarng A., Watanapokasin R., Suksamrarn A. High transfection efficiency and low toxicity cationic lipids with aminoglycerol-diamine conjugate. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 176-188. (Impact factor (2009) = 3.075)
2. Radchatawedchakoon, W.; Watanapokasin, R.; Krajarng, A.; Yingyongnarongkul, B. Solid phase synthesis of novel asymmetric hydrophilic head cholesterol-based cationic lipids with potential DNA delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 330-342. (Impact factor (2009) = 3.075)
3. Radchatawedchakoon, W.; Krajarng, A.; Niyomtham, N.; Watanapokasin R.; Yingyongnarongkul, B. High Transfection Efficiency of Novel Cationic Lipids with Asymmetric Acyl-Cholesteryl Hydrophobic Tails. *Chem. Eur. J.* **2010**, revised. (Impact factor (2009) = 5.454)



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

High transfection efficiency and low toxicity cationic lipids with aminoglycerol–diamine conjugate

Boon-ek Yingyongnarongkul^{a,*}, Widchaya Radchatawedchakoon^a, Aungkana Krajarng^b,
Ramida Watanapokasin^b, Apichart Suksamrarn^a

^a Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Bangkok 10240, Thailand

^b Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Wadhana, Bangkok 10110, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2008

Revised 5 November 2008

Accepted 5 November 2008

Available online 8 November 2008

Keywords:

Cationic lipids

Urea linkage

Combinatorial chemistry

DNA delivery

Non-viral vector

Solid phase synthesis

ABSTRACT

The solid phase synthesis of a library of aminoglycerol–diamine conjugate-based transfection agents having urea linkage between diverse length of diamines and various lengths of hydrophobic tails is described. These compounds were characterized and structure–activity relationships were determined for DNA binding and transfection ability when formulated as cationic liposomes. Cationic lipids with short spacer length and short hydrophobic tails bound to DNA and delivered DNA into HEK293 cells more efficient than those with longer ones. Transfection efficiency of some of the cationic liposomes was superior to that of the commercial transfection agents, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol. The lipids **6Ab** and **6Bb** did not require the helper lipid DOPE to produce high-efficiency transfection of human cells while displaying minimal cytotoxicity. This suggests that these newly described aminoglycerol-based lipids should be very promising in liposome-mediated gene delivery and illustrate the potential of solid phase synthesis method for non-viral vector discovery.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gene therapy represents an important advance in the alternative treatment of a variety of diseases of both genetic and acquired origin. One fundamental gene therapy technology is a gene delivery system. The delivery of genetic information into cells has a number of major applications, not only as an ideal method to treat diseases but also as an essential tool in many areas of molecular biology. The most efficient method for delivery of DNA into cells is the use of viral vectors.¹ However, there are growing concerns about both the short- and the long-term risks of viral vectors, the key problems being the immune response they provoke, which can even be lethal,² the limitation on the size of the DNA that can be introduced, and the difficulty of large-scale virus production. There have hence been great efforts to develop a range of non-viral vectors for gene therapy applications.³ A broad range of non-viral delivery systems have been described to date, including microinjection,⁴ electroporation,⁵ and chemical-based systems such as calcium phosphate,⁶ DEAE-dextran⁷ and cationic lipid-mediated transfection.⁸ Of all the non-viral vectors, cationic lipids have been shown to be the most promising method for in vivo applications, based on a combination of efficiency, stability and lack of toxicity.

* Corresponding author. Tel.: +66 2 3190931; fax: +66 2 3191900.

E-mail addresses: boonek@ru.ac.th, gmbonek@hotmail.com (B. Yingyongnarongkul).

Since Felgner and co-workers reported the application of cationic lipids in DNA delivery into living cells,⁹ numerous cationic lipids have been synthesized.^{10–15} Some of these have been used in gene therapy clinical trials,^{11,12} while many others have established cationic lipids as the most common method for the transfection of cell lines in the laboratory. As shown in Figure 1, most of the cationic lipids are monocationic (e.g., *N*-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTMA),⁹ *N*-(1-(2,3-dimyristyloxy)propyl)-*N,N*-dimethyl-(2-hydroxyethyl)ammonium bromide (DMRIE),⁸ *N*-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-*N,N*-dimethyl-(2-hydroxyethyl)ammonium bromide (DORIE),¹⁶ *N*-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulphate (DOTAP),⁸ KL-1-14¹⁷ and carbamate-linked lipid¹⁸) and polycationic heads (e.g., 2,3-dioleoyloxy-*N*-(2-(spermincarboxamido)ethyl)-*N,N*-dimethyl-1-propylammonium pentatrifluoroacetate (DOSPA)) which contain aminoglycerol as a core structure. The monocationic head of the above-mentioned compounds usually derived from the amino group while the diols are the attachment point of the hydrophobic tail via ether,^{8,9,16} ester⁸ and carbamate bond.¹⁸ The requirement for high transfection efficiency of these lipids depends on the combination of cationic head, degree of hydrophobicity of the tails and the bond that links the hydrophobic tails. Co-lipid, for example, dioleoyl- α -phosphatidylethanolamine (DOPE), is also play an important role in the liposome formation for high activity.^{16,19}

There are a number of reports on the synthesis of aminoglycerol-based cationic lipids having the variation of alkyl chain length with symmetric and asymmetric tails.^{16,20} To our knowledge,

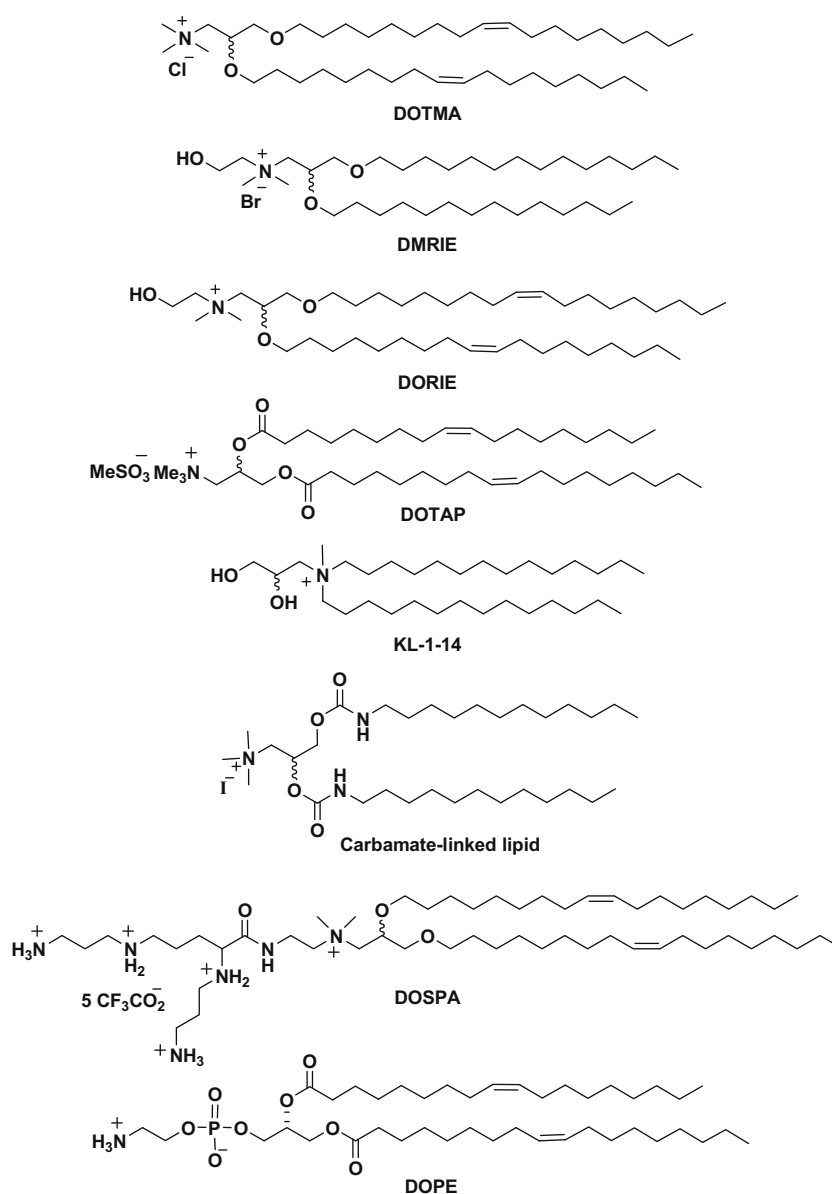


Figure 1. Structures of some of aminoglycerol-based cationic lipids and co-lipid, Dioleoyl-1- α -phosphatidylethanolamine (DOPE).

aminoglycerol-based cationic lipids having various lengths of spacer head have not been studied for transfection efficiency. Here, we designed and synthesized the monocationic lipids with various spacer lengths and various hydrophobic tails and studied for their structure–transfection activity relationships (SARs) (Fig. 2). The hydrophilic head was connected to the hydrophobic tail by the urea linkage. Since delivery of DNA into mammalian cells involves numerous steps,²¹ it has been very difficult to generate SAR for transfection. In order to synthesize a wide variety of cationic lipids,

we used solid phase synthesis technique that has been successfully synthesized these classes of compounds.^{13–15}

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of cationic lipids

The synthetic route for aminoglycerol–diamine conjugate cationic lipids is shown in Scheme 1. Starting from the active carbonate **1**,²² various diamines (Fig. 3) were added to obtain the resin **2**. This allows free amine to link to aminoglycerol as a building block for hydrophobic tails to obtain monocationic head after cleavage at the final step. Thus, the resin **2A–F** was treated with 4-nitrophenylchloroformate in the presence of pyridine to give the active urethane resin **3A–F**. To this resin the leaving group, 4-nitrophenol, was replaced with aminoglycerol to provide the resin **4A–F** having urea linkage. To drive the reaction to completion, 1 M aminoglycerol in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1) was used. The diol groups of the resin **4A–F** were coupled with various fatty acids

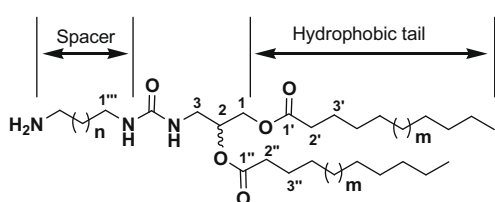
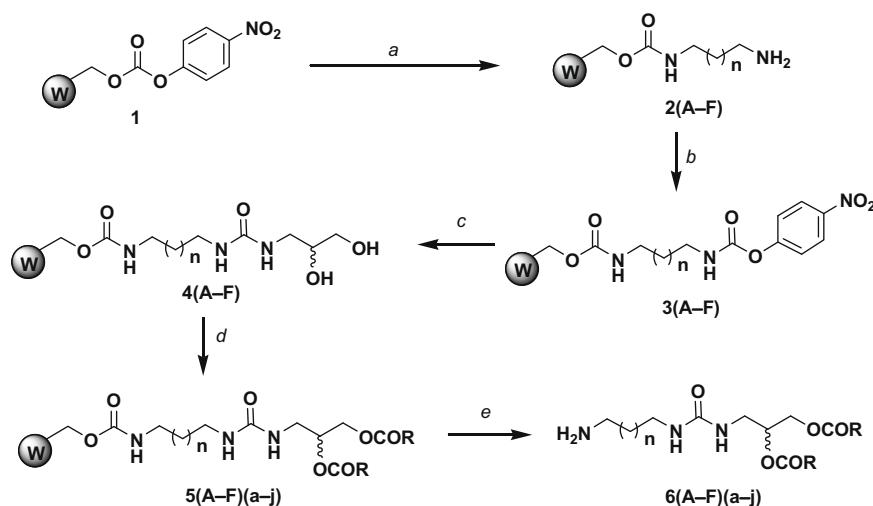


Figure 2. The common structure of monocationic lipids in this work.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) diamines (see Fig. 3), DMF, 12 h; (b) 4-nitrophenyl chloroformate, pyridine, CH_2Cl_2 , 16 h; (c) ($\pm$)-3-amino-1,2-propanediol, CH_2Cl_2 /MeOH (9:1), 12 h; (d) fatty acid (see Fig. 3), DIC, DMAP, CH_2Cl_2 , DMF, 12 h; (e) 20% TFA/ CH_2Cl_2 , 2 h.

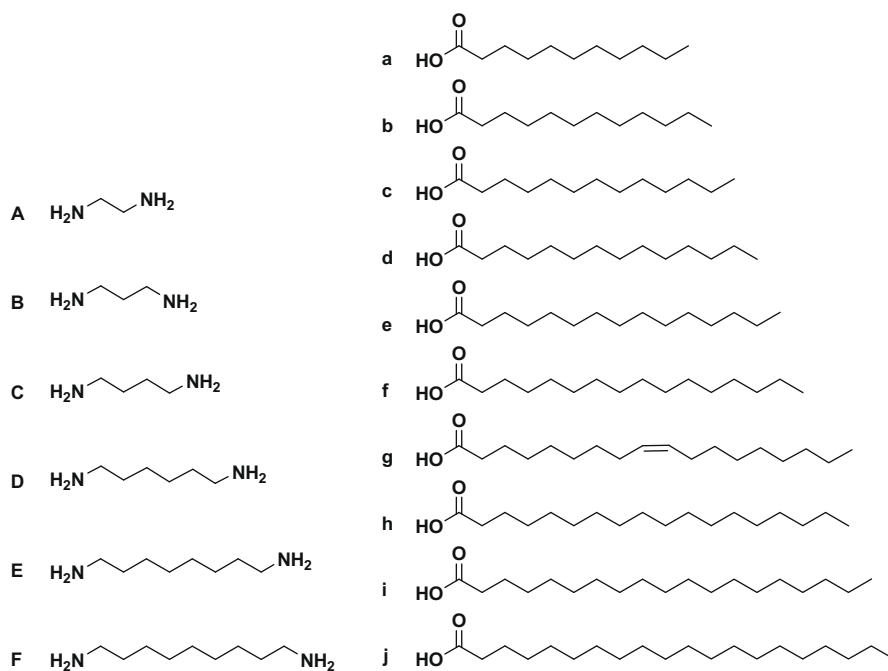


Figure 3. Diamines and long chain fatty acids used in Scheme 1.

using diisopropylcarbodiimide (DIC) as a coupling reagent and DMAP as a catalyst to generate the corresponding diesters **5(A-F)(a-j)**. Treatment of the resin **5(A-F)(a-j)** with 20% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in CH_2Cl_2 for 2 h gave rise to the desired products **6(A-F)(a-j)** in moderate to high yield (based on the original loading of Merrifield resin, 1.1 mmol/g) and high purity. Their structures were established by IR and ^1H NMR data and the observed molecular weights were in good agreement with the calculated values for all compounds.

2.2. DNA binding affinity

The relative DNA binding affinities of cationic lipids were evaluated to determine whether transfection activities correlated with DNA binding. Gel retardation assay was used to evaluate binding affinities. To perform this assay, cationic lipids were mixed with plasmid DNA at weight ratios of 1:10 (I) and 1:20 (II) (DNA/sample,

w/w) and the lipoplexes were loaded onto an agarose gel. The result is shown in Figure 4. At both of the DNA/cationic lipid ratios of 1:10 and 1:20, nine compounds, **6Ba**, **6Bb**, **6Bc**, **6Ca**, **6Cb**, **6Cc**, **6Da**, **6Db** and **6Dc**, interacted sufficiently with DNA to retard migration through the gel matrix and four cationic lipids, **6Cd**, **6Ce**, **6Cf** and **6Dh**, partially bound with DNA. The results indicated that the chain length of the hydrophobic tail required for DNA binding were 11–13 carbons, with the spacer not exceeding 6 carbons. The cationic lipids **6Ea–6Fj** which contained 8 and 9 carbons spacer with any hydrophobic tail did not bind with DNA.

2.3. Transfection activity

To study structure–activity relationship, all the synthesized cationic lipids, both bound and not bound to DNA, were tested for DNA delivery to mammalian cell lines using β -galactosidase as a reporter gene. Figure 5 displays data generated from an assay

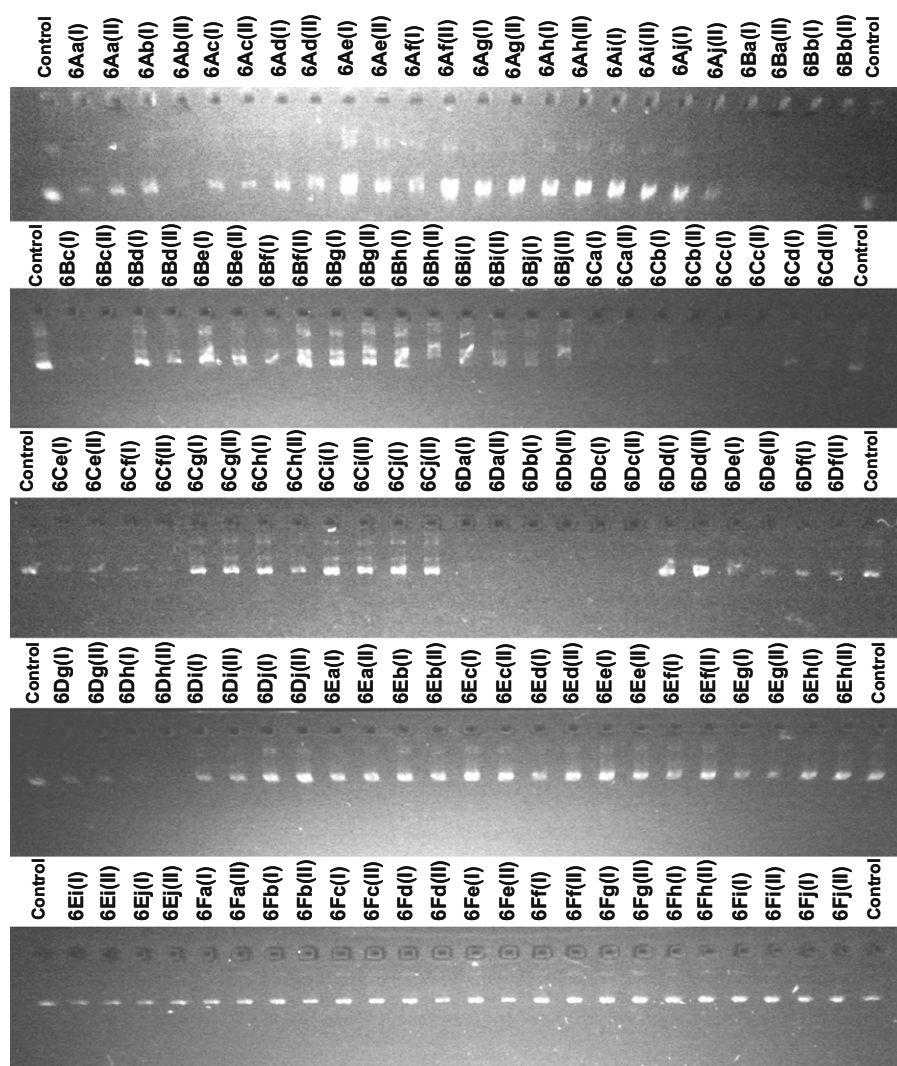


Figure 4. Gel retardation assay of DNA/cationic lipids complexes at a weight ratio of 1:10 (I) and 1:20 (II). Lanes marked “Control” contained DNA alone and was used as a control. The presence of a lower band indicated that the DNA has migrated and has not been bound by the transfection compound.

employing plasmid DNA (0.1 µg/well) at DNA/liposome ratios of 1:5, 1:10 and 1:20 (w/w). The liposome formation in the preliminary transfection activity screening was with and without DOPE. In the case of liposome formation with DOPE, cationic lipid/DOPE ratio was 2:1 (w/w). The majority of the lipids screened did not mediate transfection efficiency above 50% relative to the commercial reagent, EffecteneTM. The results have demonstrated that most of the cationic lipids with undecanoyl (C11) and lauroyl (C12) hydrophobic tails exhibited higher transfection efficiency than the longer tails. Cationic lipids with spacer length between cationic head and hydrophobic tail of 2–4 carbons showed high relative transfection activity than that of 8 and 9 carbons. Liposome formation with DOPE of compounds **6Aa** exhibited higher transfection activity than liposome without DOPE (Fig. 5). However, liposomes of the lipids **6Ab**, **6Bb** and **6Da** did not require DOPE for transfection activity. The cationic lipids **6Aa**, **6Ab**, **6Bb** and **6Da** which exhibited moderate transfection efficiency were then used for further optimization.

2.4. Transfection optimization

2.4.1. Effect of cationic lipid/DOPE ratios

The formulation of cationic liposome (cationic lipid and co-lipid ratios) have a crucial effect on the transfection efficiency.²³ Many

studies on cells in culture clearly demonstrated that liposomes were composed of an equimolar mixture of co-lipid DOPE and cationic lipids mediated higher levels of transfection than those without DOPE or those with different helper lipids.²⁴ It has been suggested that DOPE play a role in facilitating the disassembly of the lipid-based DNA formulations after their internalization, and the escape of DNA from the endocytotic vesicle.²⁵ To evaluate the effect of DOPE on gene delivery, cationic lipids were formulated into cationic liposomes with different amounts of DOPE. In order to find out the most effective formulation, transfection with identical DNA/liposome weight ratio of 1:20 was used. Their ability to deliver a plasmid encoding β-galactosidase into human embryo kidney (HEK293) cells was studied (Fig. 6). All the selected lipids were not effective in any lipid/DOPE ratio, except the lipid **6Bb**, which was found to be most effective at a lipid/DOPE weight ratio of 1:2. The lipid **6Ab** was found to be effective transfection agent when the liposome was formed without DOPE (see Figs. 5 and 6). The lipid **6Da** exhibited similar transfection result when the liposome was formed without DOPE (Fig. 5) and with DOPE at a weight ratio (lipid/DOPE) of 1:2 (Fig. 6). In the case of lipid **6Aa**, the effective formulation for high transfection efficiency was lipid/DOPE ratio of 2:1. In conclusion, the optimal liposome formulation of each lipid, which was used for the next optimization, was as followed.

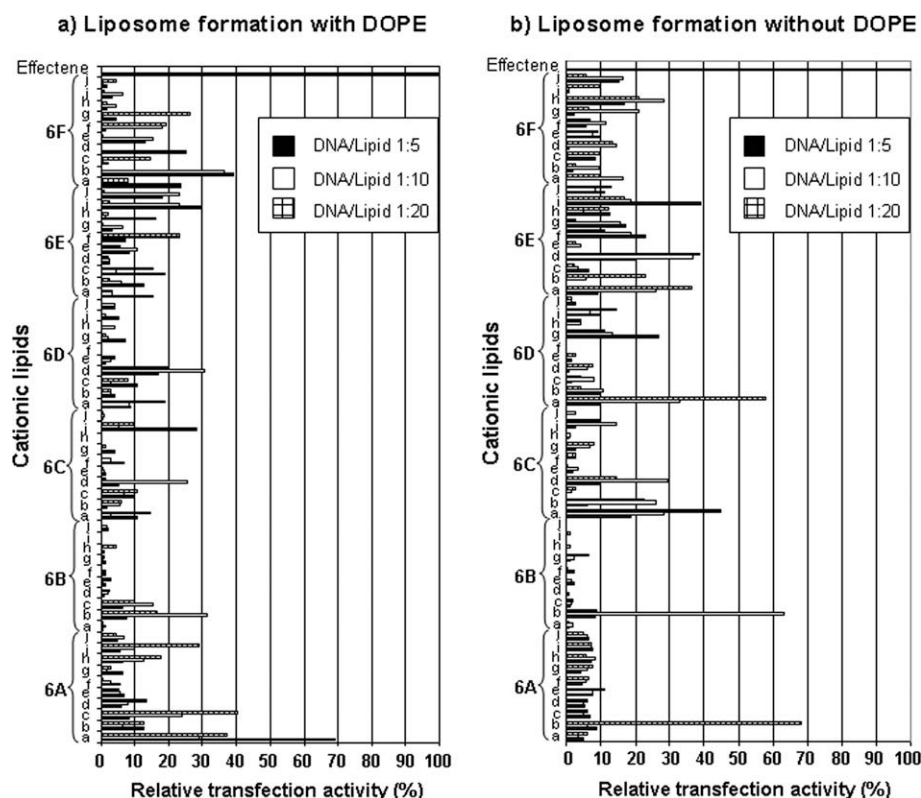


Figure 5. Transfection efficiencies of cationic lipids employing pCH110-encoding β -galactosidase (0.1 μ g/well). The liposome formation was both (a) with DOPE and (b) without DOPE. The lipoplexes were used at DNA/lipids w/w ratios of 1:5, 1:10 and 1:20. The transfection efficiencies of the lipids were compared to that of commercially available reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency.

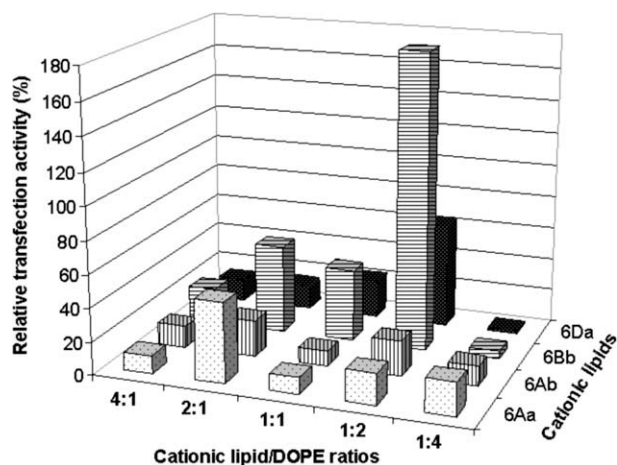


Figure 6. In vitro transfection efficiency of the lipids **6Aa**, **6Ab**, **6Ba** and **6Da** in HEK293 cells across the cationic lipid/DOPE weight ratios 4:1 to 1:4. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

Liposome which was composed of the lipid **6Bb** and **6Da** were prepared at lipid/DOPE ratios of 1:2 whereas the ratio of the lipid **6Aa** was 2:1. Liposome of the lipid **6Ab**, as well as the lipid **6Bb**, was formed without helper lipid.

2.4.2. Effect of DNA/liposome ratios

After optimizing the lipid/DOPE ratio for selected lipids, all of them were tested by using the identical amount of DNA (0.1 μ g/well) and varying the amount of lipid using the respective optimized lipid/DOPE ratio (Fig. 6). Thus, optimal positive/negative

charge ratio of the cationic liposome to plasmid DNA for in vitro transfection was determined. Six DNA/cationic liposome ratios of 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 and 1:80 (w/w) were prepared. The transfection efficiency of tested lipids was shown as % relative to that of the positive control, Effectene™, which was calculated as 100%. Transfection efficiency was found to increase at higher DNA/lipid ratio (Fig. 7). The lipid **6Bb** exhibited highest efficiency (270%) at DNA/lipid ratio of 1:40 without using DOPE as a co-lipid. However, liposome with lipid **6Bb**/DOPE at the weight ratio of 1:2 showed high activity (180%) at DNA/lipid ratio of 1:20. Interestingly, transfection efficiency of liposome with the lipid **6Bb** alone was superior to that contained DOPE, since most of the aminoglycerol-based lipid require helper lipid for high transfection efficiency.^{16,19} The lipids **6Aa** and **6Da** exhibited high transfection efficiency at the DNA/lipid ratio of 1:40 whereas the lipid **6Ab** showed high activity at the DNA/lipid ratio of 1:80. The optimal DNA/lipid ratio for each lipoplex formulation was used for the next experiment.

2.4.3. Effect of variation of the amount of DNA

To see whether variation in the amount of the DNA affected the transfection efficiency of aminoglycerol-based cationic lipids, transfection experiments were performed using the optimal cationic liposome formulation (Fig. 6) and optimal lipoplex formation (Fig. 7) conditions. The amount of DNA was varied from 0.1, 0.2 and 0.4 μ g/well. In all cases of tested lipids, transfection efficiencies increase at higher DNA amounts (Fig. 8). In the case of the lipid **6Bb**, liposome formation without DOPE showed much higher transfection efficiency than that with DOPE. This lipid exhibited 3.5-fold higher transfection efficiency than that of Effectene™. The lipids **6Ab** and **6Da** gave similar results. Thus, a 4-fold increase in transfection efficiency was observed when the amount of DNA was increased from 0.1 to 0.2 μ g/well and from 0.2 to 0.4 μ g/well.

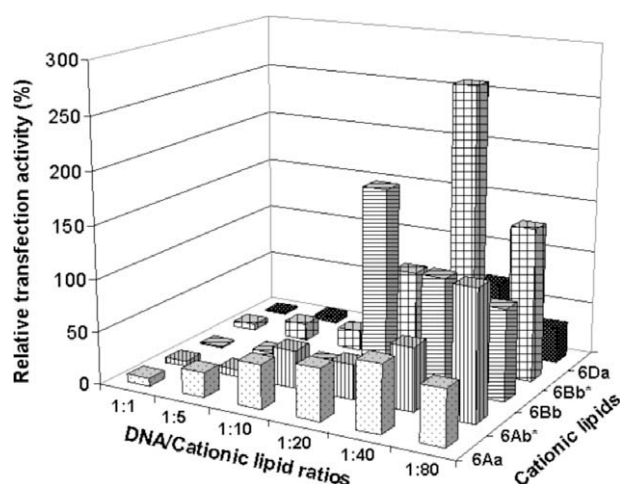


Figure 7. In vitro transfection efficiency of the lipids **6Aa**, **6Ab**, **6Ba** and **6Da** in HEK293 cells across the DNA/lipid weight ratios 1:1 to 1:80. The optimal liposome formations of each lipid from Figure 6 were used as described in the text. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown). The cationic lipid marked * displays the liposome formation without co-lipid, DOPE.

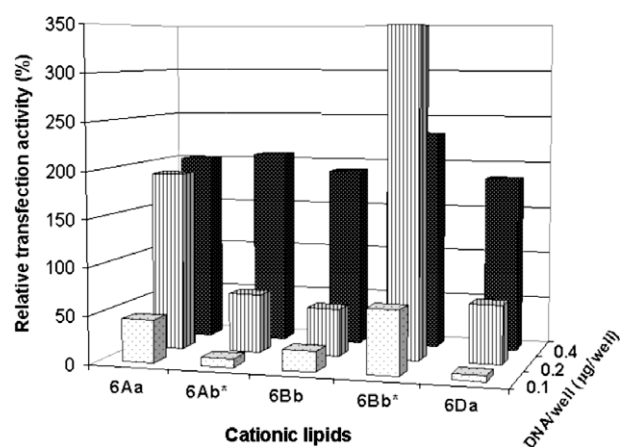


Figure 8. Effect of DNA amount for gene delivery. The optimal liposome formation (Fig. 6) and DNA/liposome complex (Fig. 7) of each lipid were used to mix with various amount of DNA from 0.1 to 0.4 µg. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown). The cationic lipid marked * displays the liposome formation without co-lipid, DOPE.

Similarly, in the case of the lipid **6Aa**, the relative transfection activity increased from 50% to 200% when the amount of DNA was increased from 0.1 to 0.2 µg/well. However, by using DNA 0.4 µg/well, there was little improvement in the transfection efficiency.

2.4.4. Effect of serum

One of the major drawbacks of cationic lipids for their in vivo use is the inhibition of the transfection efficiency of cationic liposomes in the presence of serum. Most of cationic lipids which exhibited high transfection activity in the absence of serum lost their efficiency when transfected in the presence of serum.²⁶ In order to investigate the effect of serum on gene transfection efficiencies of these cationic lipids, transfection experiments were therefore performed in the presence of 5% and 10% serum with the optimal condition of each lipid (optimal results from Figs. 6–8) and the results are shown in Figure 9. All lipids exhibited their

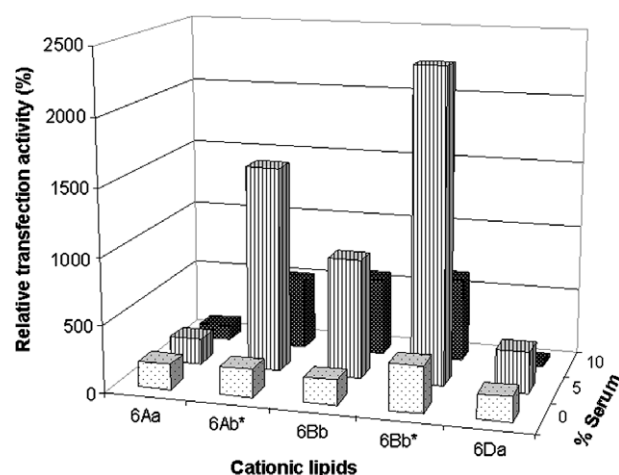


Figure 9. Effect of serum for transfection efficiency. The optimal liposome formation (Fig. 6), DNA/liposome complex (Fig. 7) and amount of DNA per well (Fig. 8) of each lipid were used to transfer gene to HEK293 cell at various amount of serum. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown). The cationic lipid marked * displays the liposome formation without co-lipid, DOPE.

transfection activity and the activity reached its maximum when 5% serum was present. Transfection efficiency was significantly decreased when the cells were tested in the presence of 10% serum. The lipids **6Bb** and **6Ab** showed approximately 20- and 15-fold higher transfection efficiency than EffecteneTM under the 5% serum-containing condition.

2.4.5. Transfection efficiency towards different cell lines

To evaluate the transfection efficiency of the lipids **6Bb** and **6Ab** towards the mammalian cell lines, HEK293, PC-3 and HeLa cells, the optimum conditions for high transfection efficiency of the lipids **6Bb** and **6Ab** were used (optimal results from Figs. 6–8). Transfection experiment was performed under the 5% and 10% serum-containing condition since these lipids exhibited high transfection efficiency (Fig. 9). Three commercially available agents, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol, were tested under identical condition. As could be seen from Figure 10, transfection efficiency of two selected lipids, **6Ab** and **6Bb**, were higher than those of the commercially available agents against HEK293 and HeLa cell lines. However, lipids **6Ab** and **6Bb** could not transfer DNA into PC-3 cell.

2.5. Transfection toxicity

Two mostly concerned criteria for gene delivery carriers are transfection efficiency and their cytotoxicity. To assess the relationship between cytotoxicity and gene expression efficiency, the toxicity of the cationic lipids **6Ab** and **6Bb** on HEK293, PC-3 and HeLa cell lines using the optimal condition (From Figs. 6–8) were determined by measuring changes in cell metabolic activity (MTT assay). The results were shown as % cell viability as compared to the control cells in the presence of DNA (Fig. 11). Transfection efficiency and toxicity of cationic lipids have been found to depend on the cell lines. All the lipid-based transfection agents, DOTAP, DC-Chol, **6Ab** and **6Bb**, were not toxic to HEK293 cell and cell viability for the mentioned transfection agents was all above 90%. While the cytotoxicity of non-liposomal transfection agent, EffecteneTM was relatively higher, the cell viability in HEK293, PC-3 and HeLa cells was only more than 50%. Lipids **6Ab** and **6Bb** exhibited higher transfection efficiency on HeLa cells but cell viability was only 50–60%. All the tested compounds including the commercially available agents were not efficient to deliver DNA into PC-3 cells.

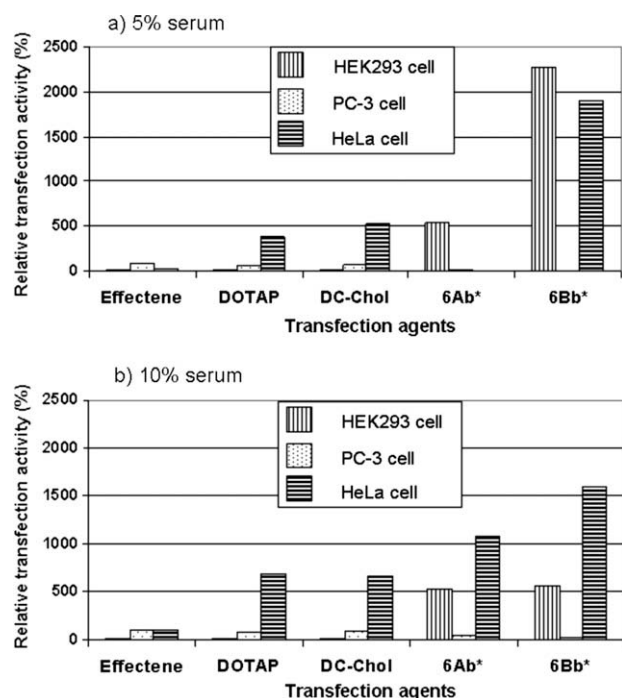


Figure 10. In vitro transfection efficiencies of lipids **6Ab** and **6Bb** on HEK293, PC-3 and HeLa cells in the presence of (a) 5% serum and (b) 10% serum. Cationic liposomes were prepared without co-lipid. The optimal weight ratios of DNA/liposome of lipids **6Ab** and **6Bb** were 1:80 and 1:40, respectively. Transfection efficiencies of the lipids were compared to those of the commercial reagents, Effectene™, DOTAP and DC-Chol. Transfection efficiency of Effectene™ against PC-3 cell was calculated as 100%. The cationic lipid marked * displays the liposome formation without co-lipid, DOPE.

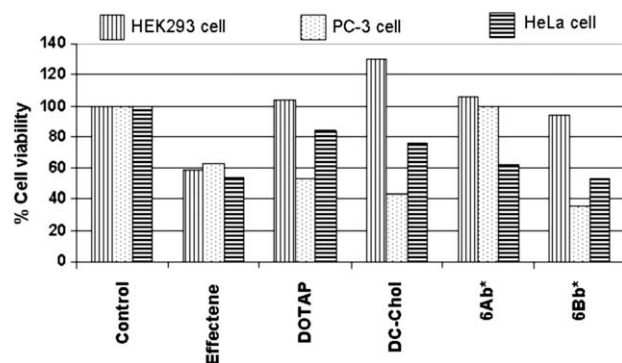


Figure 11. Effect of transfection compounds on cell metabolic activity. Liposomes of cationic lipid without DOPE were formed and added to DNA to form lipoplex. The total amounts per well of lipoplex of the lipids **6Ab** and **6Bb** as well as the commercially available agents, Effectene™, DOTAP and DC-Chol were 16 µg, 8 µg, 4 µg, 8 µg and 8 µg, respectively, which were added to HEK293, PC-3 and HeLa cells and incubated for 24 h. Cell metabolic activity was determined by an MTT assay.

This may result from the high toxicity of the transfection agent tested.

In conclusion we have demonstrated that combinatorial synthesis has allowed the discovery of highly efficient transfection agents with acceptable cytotoxicity. The transfection results suggest that aminoglycerol-based cationic lipid exhibited high transfection efficiency when the spacer head and length of hydrophobic tails are short (see Fig. 2). The lipids **6Ab** and **6Bb** effectively delivered DNA into HEK293 and HeLa cells even though the liposome was formed without the helper lipid, and this resulted in higher transfection activity than that of the commercially available transfection

agents. The balance of hydrophilicity and hydrophobicity might play an important role for cationic lipid-based transfection agent to form liposome. Hence, the size of the liposome prepared from the effective lipids **6Ab** and **6Bb** were about 500 nm whereas lipids having longer hydrophobic tail, for example, **6Aj** and **6Bj**, did not form liposome, as observed under transmission electron microscopy (data not shown). We hope that the strategy illustrated here is useful for the development of cationic lipid-based gene delivery.

3. Experimental

3.1. General

IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum GX60237 spectrophotometer. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 spectrometer using a residual solvent signal as internal standard. Mass spectra were measured on a Finnigan LC-Q instrument. Starting materials and reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification.

3.2. General procedures for the preparation of compounds **6** (A–F)(a–j)

3.2.1. Synthesis of the resins **2**(A–F)

A solution of the individual 1 M diamine **A–F** (see Fig. 3) in CH₂Cl₂/DMF was added to the active carbonate resin **1**²¹ (1.07 g) and the mixture was shaken for 12 h. The resin was successively washed with DMF (3 × 15 mL) and CH₂Cl₂ (3 × 15 mL) and dried to give the resin **2**(A–F).

3.2.2. Synthesis of the active carbamate resins **3**(A–F)

To the individual dried resins **2**(A–F) was added a solution of 4-nitrophenylchloroformate (0.95 g, 4.71 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) and pyridine (2 mL, 24.8 mmol) was added dropwise to the mixture. The suspension was shaken at room temperature for 16 h or until negative Kaiser test.²⁷ The reaction mixture was filtered and the resin was successively washed with DMF (3 × 15 mL) and CH₂Cl₂ (3 × 15 mL) and dried to give the desired resins **3**(A–F).

3.2.3. Synthesis of the resins **4**(A–F)

The individual resins **3**(A–F) (550 mg) was pre-swollen in CH₂Cl₂ (5 mL) for 30 min and filtered. To this resin was added a solution of 1 M 3-amino-1,2-propanediol (250 mg) in CH₂Cl₂/DMF (5 mL) and the suspension was agitated at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered and the resin was washed with DMF (3 × 15 mL) and CH₂Cl₂ (3 × 15 mL) and dried to give the resins **4**(A–F).

3.2.4. Synthesis of the resins **5**(A–F)(a–j)

The individual resins **4**(A–F) was divided into 10 equal parts and each part was treated with a solution of the long chain fatty acids **a–j** (6 equiv) (see Fig. 3), DIC (6 equiv) and DMAP (cat. amount) in CH₂Cl₂/DMF (5 mL). The reaction mixture was shaken at room temperature for 12 h. The reaction mixture was filtered and the resin was successively washed with DMF (3 × 15 mL) and CH₂Cl₂ (3 × 15 mL) and dried to give the desired resins **5**(A–F)(a–j).

3.2.5. Cleavage of aminoglycerol-based cationic lipids bound resins **5**(A–F)(a–j)

A suspension of the individual resins **5**(A–F)(a–j) in CH₂Cl₂ (1.2 mL) was treated with neat TFA (0.3 mL) and gently agitated at room temperature for 2 h. The reaction mixture was filtered and the filtrate was collected. The resin was washed with CH₂Cl₂ (2 × 1 mL) and the combined filtrate was evaporated under stream

of nitrogen gas and further dried under vacuum for 2 h to dryness to obtain the desired products **6(A–F)(a–j)**.

Compound 6Aa (59 mg from 115 mg of resin **4A**): 90% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3375, 3064, 2925, 2855, 1681, 1573, 1507, 1466, 1264, 1203, 1140 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (br t, J = 6.5 Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (s, 24H, H-4'-H-9' and H-4''-H-9''), 1.40 (br m, 4H, H-10' and H-10''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.17 (br s, 2H, H-2'''), 3.26 (br s, 2H, H-3), 3.47 (br s, 2H, H-1'''), 4.07 (dd, J = 12.1, 6.2 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.8 Hz, 1H, H-1b), 5.05 (br s, 1H, H-2), 7.58 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 514 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ab (61 mg from 108 mg of resin **4A**): 95% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3376, 3058, 2924, 2854, 1677, 1570, 1466, 1433, 1262, 1203, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (br t, J = 6.5 Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (s, 28H, H-4'-H-10' and H-4''-H-10''), 1.38 (br m, 4H, H-11' and H-11''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.19 (br s, 2H, H-2'''), 3.26 (br s, 2H, H-3), 3.48 (br s, 2H, H-1'''), 4.07 (dd, J = 12.1, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.9 Hz, 1H, H-1b), 5.05 (br s, 1H, H-2), 7.55 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 542 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ac (49 mg from 87 mg of resin **4A**): 86% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3372, 2922, 2852, 1737, 1667, 1569, 1466, 1203, 1180, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (br t, J = 6.5 Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (s, 32H, H-4'-H-11' and H-4''-H-11''), 1.45 (br m, 4H, H-12' and H-12''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.14 (br s, 2H, H-2'''), 3.25 (br s, 2H, H-3), 3.46 (br s, 2H, H-1'''), 4.07 (dd, J = 11.9, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.8 Hz, 1H, H-1b), 5.04 (br s, 1H, H-2), 7.55 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 570 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ad (51 mg from 92 mg of resin **4A**): 85% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3376, 2918, 2850, 1683, 1574, 1467, 1429, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (br t, J = 6.6 Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (s, 36H, H-4'-H-12' and H-4''-H-12''), 1.36 (br m, 4H, H-13' and H-13''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.17 (br s, 2H, H-2'''), 3.25 (br s, 2H, H-3), 3.47 (br s, 2H, H-1'''), 4.08 (dd, J = 12.0, 6.1 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.7 Hz, 1H, H-1b), 5.05 (br s, 1H, H-2), 7.62 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 598 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ae (47 mg from 84 mg of resin **4A**): 81% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3367, 2919, 2850, 1734, 1678, 1568, 1467, 1429, 1272, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (br t, J = 6.5 Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (s, 40H, H-4'-H-13' and H-4''-H-13''), 1.38 (br m, 4H, H-14' and H-14''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.16 (br s, 2H, H-2'''), 3.25 (br s, 2H, H-3), 3.47 (br s, 2H, H-1'''), 4.07 (dd, J = 12.0, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.7 Hz, 1H, H-1b), 5.04 (br s, 1H, H-2), 7.53 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 626 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Af (68 mg from 108 mg of resin **4A**): 88% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3373, 2918, 2850, 1731, 1677, 1560, 1467, 1194, 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (br t, J = 6.6 Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (s, 44H, H-4'-H-14' and H-4''-H-14''), 1.35 (br m, 4H, H-15' and H-15''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.21 (br s, 2H, H-2'''), 3.27 (br s, 2H, H-3), 3.49 (br s, 2H, H-1'''), 4.08 (dd, J = 12.1, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.7 Hz, 1H, H-1b), 5.06 (br s, 1H, H-2), 7.50 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 654 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ag (36 mg from 79 mg of resin **4A**): 59% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3366, 2997, 2925, 2854, 1711, 1678, 1571, 1464, 1203, 1140 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (br t, J = 6.5 Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (s, 36H, H-4'-H-7', H-12'-H-16', H-4''-H-7'' and H-12''-H-16''), 1.40 (br m, 4H, H-17' and H-17''), 1.55 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.98 (br s, 8H, H-8', H-11', H-8'', H-11''), 2.29 (br t-like, 4H, H-2' and H-2''), 3.13 (br s, 2H, H-2'''), 3.26 (br s, 2H, H-3), 3.48 (br s, 2H, H-1'''), 4.08 (dd, J = 12.0, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.8 Hz, 1H, H-1b), 5.05 (br s, 1H, H-2), 5.32 (br

s, 4H, H-9', H-10', H-9'' and H-10''), 7.61 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 706 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ah (72 mg from 98 mg of resin **4A**): 94% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3376, 3054, 2925, 2853, 2677, 1679, 1569, 1422, 1265, 1203, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (br t, J = 6.6 Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.23 (s, 52H, H-4'-H-16' and H-4''-H-16''), 1.38 (br m, 4H, H-17' and H-17''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.21 (br s, 2H, H-2'''), 3.24 (br s, 2H, H-3), 3.49 (br s, 2H, H-1'''), 4.09 (dd, J = 12.0, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.7 Hz, 1H, H-1b), 5.07 (br s, 1H, H-2), 7.45 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 710 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ai (79 mg from 98 mg of resin **4A**): 99% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3392, 3054, 2980, 2926, 2853, 1679, 1566, 1422, 1265, 1202, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (br t, J = 6.5 Hz, 6H, H-19' and H-19''), 1.23 (s, 56H, H-4'-H-17' and H-4''-H-17''), 1.38 (br m, 4H, H-18' and H-18''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.31 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.24 (br s, 2H, H-2'''), 3.32 (br s, 2H, H-3), 3.50 (br s, 2H, H-1'''), 4.10 (dd, J = 12.0, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, J = 9.8 Hz, 1H, H-1b), 5.08 (br s, 1H, H-2), 7.40 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 738 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Aj (82 mg from 105 mg of resin **4A**): 92% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3368, 2917, 2849, 1736, 1659, 1563, 1465, 1429, 1264, 1176, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (br t, J = 6.6 Hz, 6H, H-20' and H-20''), 1.23 (s, 60H, H-4'-H-18' and H-4''-H-18''), 1.38 (br m, 4H, H-19' and H-19''), 1.55 (br s, 4H, H-3' and H-3''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.25 (m, 4H, H-3 and H-2'''), 3.50 (br s, 2H, H-1'''), 4.01 (dd, J = 11.9, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, J = 9.9 Hz, 1H, H-1b), 5.07 (br s, 1H, H-2), 7.40 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 766 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ba (28 mg from 115 mg of resin **4B**): 41% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3372, 2925, 2855, 1712, 1679, 1568, 1466, 1376, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (s, 24H, H-4'-H-9' and H-4''-H-9''), 1.40 (br m, 4H, H-10' and H-10''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.84 (br s, 2H, H-2'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.04 (br s, 2H, H-3'''), 3.27 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (dd, J = 12.1, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, J = 9.9 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.75 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 528 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Bb (31 mg from 134 mg of resin **4B**): 38% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2924, 2854, 1680, 1572, 1466, 1376, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (s, 28H, H-4'-H-10' and H-4''-H-10''), 1.38 (br m, 4H, H-11' and H-11''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.84 (br s, 2H, H-2'''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.04 (br s, 2H, H-3'''), 3.27 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.05 (dd, J = 12.1, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 9.7 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.73 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 556 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Bc (29 mg from 130 mg of resin **4B**): 34% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2924, 2854, 1750, 1679, 1568, 1466, 1376, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (s, 32H, H-4'-H-11' and H-4''-H-11''), 1.39 (br m, 4H, H-12' and H-12''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.83 (br s, 2H, H-2'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.05 (br s, 2H, H-3'''), 3.27 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.06 (dd, J = 12.1, 6.2 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, J = 9.6 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.73 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 584 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Bd (36 mg from 123 mg of resin **4B**): 44% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2922, 2853, 1700, 1678, 1568, 1466, 1369, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (s, 36H, H-4'-H-12' and H-4''-H-12''), 1.38 (br m, 4H, H-13' and H-13''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.84 (br s, 2H, H-2'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.05 (br s, 2H, H-3'''), 3.28 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.06 (dd, J = 12.1, 6.2 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, J = 9.5 Hz, 1H, H-1b), 5.02 (br s, 1H, H-2), 7.72 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 612 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Be (37 mg from 168 mg of resin **4A**): 31% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 3040, 2919, 2851, 1730, 1679, 1572, 1466, 1265, 1203, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (s, 40H, H-4'-H-13' and H-4''-H-13''), 1.38 (br m, 4H, H-14' and H-14''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.81 (br s, 2H, H-2'''), 2.27 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.01 (br s, 2H, 2H, H-3'''), 3.25 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.05 (dd, J = 11.9, 6.3 Hz, 1H, H-1a), 4.18 (br d, J = 10.0 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.90 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 640 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Bf (35 mg from 126 mg of resin **4B**): 38% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2918, 2850, 1736, 1656, 1564, 1465, 1369, 1251, 1176, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (s, 44H, H-4'-H-14' and H-4''-H-14''), 1.38 (br m, 4H, H-15' and H-15''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.83 (br s, 2H, H-2'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.04 (br s, 2H, H-3'''), 3.27 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.06 (dd, J = 12.1, 6.2 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, J = 9.7 Hz, 1H, H-1b), 5.02 (br s, 1H, H-2), 7.75 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 668 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Bg (30 mg from 133 mg of resin **4B**): 29% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2924, 2854, 1704, 1679, 1568, 1464, 1376, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, J = 6.5 Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (s, 28H, H-4'-H-6', H-13'-H-16', H-4''-H-6'' and H-13''-H-16''), 1.27 (s, 8H, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.38 (br m, 4H, H-17' and H-17''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.98 (br m, 8H, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.05 (br s, 2H, H-3'''), 3.28 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (dd, 1H, J = 12.1, 6.1 Hz, H-1a), 4.23 (br d, 1H, J = 9.7 Hz, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 5.32 (br s, 4H, H-9', H-10', H-9'' and H-10''), 7.74 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 720 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Bh (13 mg from 127 mg of resin **4B**): 13% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3364, 2919, 2850, 1734, 1466, 1373, 1258, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.23 (s, 52H, H-4'-H-16' and H-4''-H-16''), 1.36 (br m, 4H, H-17' and H-17''), 1.56 (br m, 4H, H-4' and H-4''), 1.77 (br m, 2H, H-2'''), 2.30 (m, 4H, H-3' and H-3''), 2.94 (br s, 2H, H-3'''), 3.20 (m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (dd, J = 12.2, 6.1 Hz, 1H, H-1a), 4.29 (dd, J = 12.2, 4.1 Hz, 1H, H-1b), 5.04 (br s, 1H, H-2), 7.65 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 724 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Bi (34 mg from 117 mg of resin **4B**): 36% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3360, 2919, 2850, 1736, 1655, 1422, 1265 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, 6H, J = 6.6 Hz, H-19' and H-19''), 1.23 (s, 56H, H-4'-H-17' and H-4''-H-17''), 1.38 (br m, 4H, H-18' and H-18''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.85 (br m, 4H, H-2' and H-2''), 3.07 (br s, 2H, H-3'''), 3.26 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (dd, 1H, J = 12.3, 6.2 Hz, H-1a), 4.23 (br d, 1H, J = 9.7 Hz, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.66 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 752 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Bj (39 mg from 140 mg of resin **4B**): 33% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3054, 2987, 2919, 2850, 1736, 1655, 1422, 1265 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, 6H, J = 6.6 Hz, H-20' and H-20''), 1.23 (s, 60H, H-4'-H-18' and H-4''-H-18''), 1.38 (br m, 4H, H-19' and H-19''), 1.38 (br m, 4H, H-19' and H-19''), 1.56 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.85 (br s, 2H, H-2'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.06 (br s, 2H, H-3'''), 3.28 (br m, 4H, H-3 and H-1'''), 4.07 (dd, J = 12.1, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, J = 9.8 Hz, 1H, H-1b), 5.02 (br s, 1H, H-2), 7.66 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 780 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ca (28 mg from 124 mg of resin **4C**): 37% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3372, 2925, 2854, 1741, 1679, 1568, 1466, 1376, 1203, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (s, 24H, H-4'-H-9' and H-4''-H-9''), 1.38 (br m, 4H, H-10' and H-10''), 1.38 (br m, 4H, H-10' and H-10''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (br s, 2H, H-4'''), 3.07 (br s, 2H, H-1'''), 3.28 (br s, 2H, H-3), 4.05 (dd, J = 12.3, 6.6 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, J = 12.1 Hz,

1H, H-1b), 5.02 (br s, 1H, H-2), 7.81 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 542 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Cb (30 mg from 131 mg of resin **4C**): 36% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2924, 2854, 1738, 1678, 1568, 1466, 1196, 1136 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (s, 28H, H-4'-H-10' and H-4''-H-10''), 1.38 (br m, 4H, H-11' and H-11''), 1.55 (m, 8H, H-2', H-2'', H-2''' and H-3'''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (br s, 2H, H-4'''), 3.07 (br s, 2H, H-1'''), 3.27 (br s, 2H, H-3), 4.05 (dd, J = 12.2, 6.6 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 12.1 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.80 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 570 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Cc (33 mg from 143 mg of resin **4C**): 35% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2924, 2854, 1738, 1679, 1568, 1466, 1378, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.4 Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (s, 32H, H-4'-H-11' and H-4''-H-11''), 1.38 (br m, 4H, H-12' and H-12''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (br s, 2H, H-4'''), 3.08 (br s, 2H, H-1'''), 3.28 (br s, 2H, H-3), 4.05 (dd, J = 12.4, 6.6 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, J = 12.1 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.81 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 598 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Cd (27 mg from 140 mg of resin **4C**): 28% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3372, 2922, 2852, 1739, 1678, 1561, 1466, 1377, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (s, 36H, H-4'-H-12' and H-4''-H-12''), 1.38 (br m, 4H, H-13' and H-13''), 1.60 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.94 (br s, 2H, H-4'''), 3.10 (br s, 2H, H-1'''), 3.27 (br s, 2H, H-3), 4.06 (dd, J = 12.2, 6.6 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, J = 12.1 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.83 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 626 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ce (33 mg from 140 mg of resin **4C**): 33% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2919, 2850, 1736, 1678, 1568, 1467, 1378, 1266, 1202, 1135 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (s, 40H, H-4'-H-13' and H-4''-H-13''), 1.38 (br m, 4H, H-14' and H-14''), 1.56 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 (br s, 2H, H-4'''), 3.08 (br s, 2H, H-1'''), 3.34 (br s, 2H, H-3), 4.05 (dd, J = 12.1, 6.5 Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, J = 12.1 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.75 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 654 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Cf (28 mg from 114 mg of resin **4C**): 33% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2919, 2850, 1738, 1678, 1564, 1467, 1378, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (s, 44H, H-4'-H-14' and H-4''-H-14''), 1.38 (br m, 4H, H-15' and H-15''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 (br s, 2H, H-4'''), 3.08 (br s, 2H, H-1'''), 3.08 (br s, 2H, H-3), 3.28 (br s, 2H, H-3), 4.05 (dd, J = 12.2, 6.5 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, J = 12.1 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.77 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 682 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Cg (31 mg from 140 mg of resin **4C**): 27% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2925, 2854, 1738, 1679, 1568, 1464, 1377, 1203, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, J = 6.3 Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (s, 28H, H-4'-H-6', H-13'-H-16', H-4''-H-6'' and H-13''-H-16''), 1.27 (s, 8H, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.38 (br m, 4H, H-17' and H-17''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 1.98 (br m, 8H, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 (br s, 2H, H-4'''), 3.08 (br s, 2H, H-1'''), 3.31 (br s, 2H, H-3), 4.05 (dd, J = 12.1, 7.0 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, J = 9.2 Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 5.32 (m, 4H, H-8', H-9', H-8'' and H-9''), 7.83 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 734 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ch (37 mg from 114 mg of resin **4C**): 40% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3054, 2927, 2854, 1679, 1422, 1265, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, J = 6.6 Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.23 (s, 52H, H-4'-H-16' and H-4''-H-16''), 1.38 (br m, 4H, H-17' and H-17''), 1.55 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.30

(m, 4H, H-2' and H-2''), 2.98 (br s, 2H, H-4'''), 3.13 (br s, 2H, H-1'''), 3.30 (br s, 2H, H-3), 4.04 (dd, $J = 12.3, 6.5$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.57 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 738 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ci (48 mg from 110 mg of resin **4C**): 51% yield; IR: ν_{max} 3054, 2926, 2860, 1740, 1678, 1421, 1265, 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-19' and H-19''), 1.23 (s, 56H, H-4'-H-17' and H-4''-H-17''), 1.38 (br m, 4H, H-18' and H-18''), 1.60 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.94 (br s, 2H, H-4'''), 3.09 (br s, 2H, H-1'''), 3.27 (br s, 2H, H-3), 4.05 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 1H, H-1a), 4.25 (br d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.71 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 766 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Cj (16 mg from 128 mg of resin **4A**): 15% yield; IR: ν_{max} 3054, 2926, 2854, 1679, 1422, 1265, 1203, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-20' and H-20''), 1.24 (s, 60H, H-4'-H-18' and H-4''-H-18''), 1.38 (br m, 4H, H-19' and H-19''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-3'''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.95 (br s, 2H, H-4'''), 3.10 (br s, 2H, H-1'''), 3.30 (br s, 2H, H-3), 4.05 (dd, $J = 12.3, 6.5$ Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, $J = 12.1$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.73 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 794 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 58%).

Compound 6Da (21 mg from 125 mg of resin **4D**): 27% yield; IR: ν_{max} 3343, 2925, 2855, 1740, 1679, 1572, 1466, 1380, 1202, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (s, 24H, H-4'-H-9' and H-4''-H-9''), 1.35 (br m, 4H, H-10' and H-10''), 1.36 (br s, 2H, H-4'''), 1.47 (br m, 2H, H-2'''), 1.57 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.65 (br m, 2H, H-5'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.98 (br s, 2H, H-6'''), 3.10 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br d, $J = 5.5$ Hz, 2H, H-3), 4.09 (dd, $J = 12.0, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (dd, $J = 12.1, 2.8$ Hz, 1H, H-1b), 5.00 (br s, 1H, H-2), 7.65 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 570 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Db (23 mg from 133 mg of resin **4D**): 26% yield; IR: ν_{max} 3350, 2925, 2854, 1730, 1678, 1571, 1466, 1373, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (s, 28H, H-4'-H-10' and H-4''-H-10''), 1.35 (br m, 4H, H-11' and H-11''), 1.38 (br s, 2H, H-4'''), 1.48 (br m, 2H, H-2'''), 1.57 (br m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.65 (m, 2H, H-5'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.98 (br s, 2H, H-6'''), 3.10 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br d, $J = 5.6$ Hz, 2H, H-3), 4.09 (dd, $J = 12.0, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (dd, $J = 12.0, 2.9$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.64 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 598 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Dc (21 mg from 124 mg of resin **4D**): 24% yield; IR: ν_{max} 3357, 2924, 2854, 1730, 1679, 1572, 1466, 1378, 1251, 1202, 1141 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (s, 32H, H-4'-H-11' and H-4''-H-11''), 1.38 (m, 4H, H-12' and H-12''), 1.38 (br s, 2H, H-4'''), 1.48 (m, 2H, H-2'''), 1.57 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.65 (m, 2H, H-5'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.98 (br s, 2H, H-6'''), 3.10 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br d, $J = 5.5$ Hz, 2H, H-3), 4.09 (dd, $J = 12.0, 6.2$ Hz, 1H, H-1a), 4.25 (dd, $J = 12.0, 2.8$ Hz, 1H, H-1b), 5.00 (br s, 1H, H-2), 7.69 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 626 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Dd (28 mg from 126 mg of resin **4D**): 31% yield; IR: ν_{max} 3350, 2918, 2850, 1678, 1568, 1466, 1428, 1202, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (s, 36H, H-4'-H-12' and H-4''-H-12''), 1.32 (br s, 2H, H-4'''), 1.37 (m, 4H, H-13' and H-13''), 1.48 (m, 2H, H-2'''), 1.57 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.65 (m, 2H, H-5'''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.98 (br s, 2H, H-6'''), 3.11 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br d, 2H, $J = 5.5$ Hz, 2H, H-3), 4.09 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (dd, $J = 12.1, 4.1$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.63 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 654 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6De (24 mg from 126 mg of resin **4D**): 25% yield; IR: ν_{max} 3357, 2918, 2850, 1732, 1678, 1564, 1467, 1266, 1202, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (s, 40H, H-4'-H-13' and H-4''-H-13''), 1.35 (m, 4H, H-14' and H-14''), 1.38 (br s, 2H, H-4'''), 1.49 (m, 2H, H-2'''), 1.57 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.66 (m, 2H, H-5'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.99 (br s, 2H, H-6'''), 3.11 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br d, $J = 5.6$ Hz, 2H, H-3), 4.10 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (dd, $J = 12.1, 2.9$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.61 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 682 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Df (27 mg from 135 mg of resin **4D**): 25% yield; IR: ν_{max} 3357, 2917, 2850, 1734, 1679, 1564, 1467, 1258, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (s, 44H, H-4'-H-14' and H-4''-H-14''), 1.33 (m, 4H, H-15' and H-15''), 1.37 (br s, 2H, H-4'''), 1.49 (m, 2H, H-2'''), 1.56 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.66 (m, 2H, H-5'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.00 (br s, 2H, H-6'''), 3.11 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br d, $J = 5.5$ Hz, 2H, H-3), 4.10 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (dd, $J = 12.1, 2.8$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.57 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 710 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Dg (24 mg from 139 mg of resin **4D**): 21% yield; IR: ν_{max} 3365, 2925, 2854, 1745, 1679, 1572, 1465, 1378, 1202, 1139 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (s, 28H, H-4'-H-6' and H-13'-H-16', H-4''-H-6'' and H-13''-H-16''), 1.27 (s, 8H, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.34 (m, 4H, H-17' and H-17''), 1.37 (br s, 2H, H-4'''), 1.48 (m, 2H, H-2'''), 1.57 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.65 (m, 2H, H-5'''), 1.99 (m, 8H, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.99 (br s, 2H, H-6'''), 3.11 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br d, $J = 5.5$ Hz, 2H, H-3), 4.10 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (dd, $J = 12.1, 2.8$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 5.32 (m, 4H, H-9', H-10', H-9'' and H-10''), 7.66 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 762 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Dh (28 mg from 126 mg of resin **4D**): 26% yield; IR: ν_{max} 3357, 3047, 2922, 2852, 1679, 1568, 1466, 1265, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (s, 52H, H-4'-H-16' and H-4''-H-16''), 1.34 (br s, 2H, H-4'''), 1.38 (m, 4H, H-17' and H-17''), 1.49 (m, 2H, H-2'''), 1.58 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.69 (m, 2H, H-5'''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.99 (br s, 2H, H-6'''), 3.10 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br d, $J = 5.2$ Hz, 2H, H-3), 4.10 (dd, $J = 12.1, 5.7$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.55 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 766 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Di (30 mg from 131 mg of resin **4D**): 26% yield; IR: ν_{max} 3333, 3054, 2922, 2852, 1738, 1678, 1568, 1422, 1265, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H, H-19' and H-19''), 1.23 (s, 56H, H-4'-H-17' and H-4''-H-17''), 1.35 (m, 4H, H-18' and H-18''), 1.38 (br s, 2H, H-4'''), 1.49 (m, 2H, H-2'''), 1.57 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.66 (m, 2H, H-5'''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.99 (br s, 2H, H-6'''), 3.11 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br d, $J = 5.4$ Hz, 2H, H-3), 4.10 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (dd, $J = 12.1, 2.8$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.58 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 794 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Dj (27 mg from 118 mg of resin **4D**): 25% yield; IR: ν_{max} 3054, 2926, 2854, 1728, 1679, 1422, 1265, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, $J = 6.4$ Hz, 6H, H-20' and H-20''), 1.25 (s, 60H, H-4'-H-18' and H-4''-H-18''), 1.35 (br s, 2H, H-4'''), 1.38 (m, 4H, H-19' and H-19''), 1.51 (m, 2H, H-2'''), 1.58 (m, 4H, H-3' and H-3''), 1.50–1.60 (m, 2H, H-3'''), 1.68 (m, 2H, H-5'''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 3.01 (br s, 2H, H-6'''), 3.12 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br d, $J = 5.2$ Hz, 2H, H-3), 4.11 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H, H-1a), 4.25 (dd, $J = 12.1, 6.1$ Hz, 1H, H-1b),

4.99 (br s, 1H, H-2), 7.56 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 822 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Ea (18 mg from 122 mg of resin **4E**): 22% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2925, 2854, 1734, 1678, 1572, 1466, 1369, 1202, 1137 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (s, 32H, H-4'-H-9', H-4''-H-9'' and H-3'''-H-6'''), 1.45 (m, 4H, H-10' and H-10''), 1.57 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 (br s, 2H, H-8'''), 3.08 (br t, 2H, H-1'''), 3.32 (br d, *J* = 4.8 Hz, 2H, H-3), 4.11 (dd, *J* = 12.0, 6.1 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.71 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 598 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Eb (17 mg from 134 mg of resin **4E**): 86% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2925, 2854, 1734, 1678, 1571, 1466, 1377, 1203, 1139 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (s, 36H, H-4'-H-10', H-4''-H-10'' and H-3'''-H-6'''), 1.44 (br m, 4H, H-11' and H-11''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.31 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 (br s, 2H, H-8'''), 3.07 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br d, *J* = 4.8 Hz, 2H, H-3), 4.10 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.80 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 626 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Ec (18 mg from 124 mg of resin **4E**): 20% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2925, 2854, 1727, 1678, 1568, 1466, 1373, 1202, 1137 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (s, 40H, H-4'-H-11', H-4''-H-11'' and H-3'''-H-6'''), 1.45 (m, 4H, H-12' and H-12''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.31 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.94 (br s, 2H, H-8'''), 3.08 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H-3), 4.11 (dd, *J* = 12.0, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.70 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 654 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Ed (21 mg from 126 mg of resin **4E**): 23% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3354, 2920, 2851, 1738, 1678, 1574, 1467, 1378, 1203, 1139 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (s, 44H, H-4'-H-12', H-4''-H-12'' and H-3'''-H-6'''), 1.44 (m, 4H, H-13' and H-13''), 1.57 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (br s, 2H, H-8'''), 3.07 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H-3), 4.12 (dd, *J* = 12.1, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, *J* = 11.6 Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.72 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 682 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Ee (19 mg from 123 mg of resin **4E**): 20% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3343, 2918, 2850, 1737, 1675, 1568, 1467, 1373, 1202, 1137 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (s, 48H, H-4'-H-13', H-4''-H-13'' and H-3'''-H-6'''), 1.43 (m, 4H, H-14' and H-14''), 1.57 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (br s, 2H, H-8'''), 3.06 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H-3), 4.10 (dd, *J* = 12.0, 6.1 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-1b), 5.00 (br s, 1H, H-2), 7.83 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 710 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Ef (26 mg from 118 mg of resin **4E**): 27% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2918, 2850, 1738, 1682, 1576, 1466, 1265, 1202, 1139 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (s, 52H, H-4'-H-14', H-4''-H-14'' and H-3'''-H-6'''), 1.47 (m, 4H, H-15' and H-15''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.31 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.96 (br s, 2H, H-8'''), 3.09 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.33 (br d, *J* = 5.3 Hz, 2H, H-3), 4.12 (dd, *J* = 12.0, 5.9 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-1b), 4.98 (br s, 1H, H-2), 7.53 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 738 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Eg (21 mg from 131 mg of resin **4E**): 18% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2925, 2854, 1738, 1679, 1571, 1464, 1377, 1202, 1138 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 6.2 Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.24 (s, 36H, H-4'-H-6', H-13'-H-16', H-4''-H-

6'', H-13''-H-16'' and H-3'''-H-6'''), 1.27 (s, 8H, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.45 (m, 4H, H-17' and H-17''), 1.57 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 1.98 (m, 8H, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.31 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.93 (br s, 2H, H-8'''), 3.08 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br d, *J* = 4.4 Hz, 2H, H-3), 4.41 (dd, *J* = 11.7, 5.8 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 5.33 (m, 4H, H-8', H-9', H-8'' and H-9''), 7.74 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 790 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Eh (27 mg from 136 mg of resin **4E**): 23% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3300, 3054, 2925, 2853, 1740, 1678, 1568, 1466, 1417, 1265, 1202, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 5.9 Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.23 (s, 60H, H-4'-H-16', H-4''-H-16'' and H-3'''-H-6'''), 1.49 (m, 4H, H-17' and H-17''), 1.59 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.33 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.99 (br s, 2H, H-8'''), 3.11 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.34 (br d, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-3), 4.13 (dd, *J* = 12.1, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-1b), 4.97 (br s, 1H, H-2), 7.40 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 794 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Ei (25 mg from 125 mg of resin **4E**): 22% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 3054, 2922, 2851, 1736, 1670, 1422, 1265, 1200 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, H-19' and H-19''), 1.23 (s, 64H, H-4'-H-17', H-4''-H-17'' and H-3'''-H-6'''), 1.47 (m, 4H, H-18' and H-18''), 1.57 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.32 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.95 (br s, 2H, H-8'''), 3.09 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.33 (br d, *J* = 5.1 Hz, 2H, H-3), 4.12 (dd, *J* = 11.9, 5.8 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-1b), 4.98 (br s, 1H, H-2), 7.60 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 822 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Ej (24 mg from 119 mg of resin **4E**): 22% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3357, 2928, 2853, 1735, 1679, 1574, 1422, 1265 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, H-20' and H-20''), 1.23 (s, 68H, H-4'-H-18', H-4''-H-18'' and H-3'''-H-6'''), 1.49 (m, 4H, H-19' and H-19''), 1.59 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-7'''), 2.33 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.98 (br s, 2H, H-8'''), 3.10 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.34 (br d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H-3), 4.13 (dd, *J* = 12.0, 5.8 Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-1b), 4.98 (br s, 1H, H-2), 7.49 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 850 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Fa (38 mg from 155 mg of resin **4F**): 37% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2925, 2855, 1735, 1678, 1564, 1466, 1373, 1202, 1137 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, H-11' and H-11''), 1.23 (s, 34H, H-4'-H-9', H-4''-H-9'' and H-3'''-H-7'''), 1.44 (m, 4H, H-10' and H-10''), 1.57 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (br s, 2H, H-9'''), 3.07 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br s, 2H, H-3), 4.07 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.26 (br d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-1b), 4.98 (br s, 1H, H-2), 7.60 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 612 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Fb (35 mg from 129 mg of resin **4F**): 39% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3366, 2923, 2853, 1741, 1687, 1466, 1373, 1204, 1174, 1129 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H, H-12' and H-12''), 1.23 (s, 38H, H-4'-H-10', H-4''-H-10'' and H-3'''-H-7'''), 1.44 (m, 4H, H-11' and H-11''), 1.56 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.91 (br s, 2H, H-9'''), 3.06 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br s, 2H, H-3), 4.01 (dd, *J* = 12.1, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.25 (br d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-1b), 4.98 (br s, 1H, H-2), 7.70 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 640 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Fc (39 mg from 147 mg of resin **4F**): 36% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2924, 2853, 1741, 1682, 1571, 1466, 1377, 1203, 1174, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.85 (t, *J* = 6.6 Hz, 6H, H-13' and H-13''), 1.23 (s, 42H, H-4'-H-11', H-4''-H-11'' and H-3'''-H-7'''), 1.44 (m, 4H, H-12' and H-12''), 1.57 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.29 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (br s, 2H, H-9'''), 3.06 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.31 (br s, 2H, H-3), 4.06 (dd, *J* = 12.2, 6.0 Hz, 1H, H-1a), 4.25 (br d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-1b), 4.98 (br s, 1H, H-2), 7.69 (br s, 3H, NH₃⁺); MS (ES): *m/z*: 668 ([M+H]⁺, 100%).

Compound 6Fd (31 mg from 133 mg of resin **4F**): 30% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3359, 3190, 2923, 2853, 1738, 1660, 1633, 1467, 1421, 1202, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-14' and H-14''), 1.23 (s, 46H, H-4'-H-12', H-4''-H-12'' and H-3'''-H-7'''), 1.42 (m, 4H, H-13' and H-13''), 1.56 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.90 (br s, 2H, H-9'''), 3.06 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.30 (br s, 2H, H-3), 4.10 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.25 (br d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.83 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 696 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Fe (41 mg from 140 mg of resin **4F**): 37% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2918, 2850, 1737, 1686, 1660, 1406, 1376, 1202, 1177, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-15' and H-15''), 1.23 (s, 50H, H-4'-H-13', H-4''-H-13'' and H-3'''-H-7'''), 1.42 (m, 4H, H-14' and H-14''), 1.56 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.90 (br s, 2H, H-9'''), 3.05 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.30 (br s, 2H, H-3), 4.10 (dd, $J = 12.1, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.25 (br d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1b), 5.00 (br s, 1H, H-2), 7.80 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 724 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Ff (38 mg from 142 mg of resin **4F**): 32% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2918, 2850, 1737, 1661, 1466, 1177, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.85 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-16' and H-16''), 1.23 (s, 54H, H-4'-H-14', H-4''-H-14'' and H-3'''-H-7'''), 1.43 (m, 4H, H-15' and H-15''), 1.56 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.91 (br s, 2H, H-9'''), 3.06 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.30 (br s, 2H, H-3), 4.11 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.24 (br d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-1b), 4.99 (br s, 1H, H-2), 7.84 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 752 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Fg (36 mg from 147 mg of resin **4F**): 28% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 2925, 2854, 1735, 1675, 1464, 1376, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, 6H, $J = 6.7$ Hz, H-18' and H-18''), 1.24 (s, 38H, H-4'-H-16', H-13'-H-16', H-4''-H-16'' and H-13''-H-16'' and H-3'''-H-7'''), 1.27 (s, 8H, H-7', H-12', H-7'' and H-12''), 1.44 (m, 4H, H-17' and H-17''), 1.58 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 1.99 (m, 8H, H-8', H-11', H-8'' and H-11''), 2.30 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.92 (br s, 2H, H-9'''), 3.07 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.32 (br s, 2H, H-3), 4.11 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.22 (br d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-1b), 4.98 (br s, 1H, H-2), 5.32 (m, 4H, H-9', H-10', H-9'' and H-10''), 7.60 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 804 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Fh (47 mg from 142 mg of resin **4F**): 37% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2917, 2849, 1737, 1686, 1466, 1177, 1126 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-18' and H-18''), 1.22 (s, 62H, H-4'-H-16', H-4''-H-16'' and H-3'''-H-7'''), 1.43 (m, 4H, H-17' and H-17''), 1.56 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.28 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.89 (br s, 2H, H-9'''), 3.06 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.30 (br s, 2H, H-3), 4.11 (dd, $J = 11.9, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.26 (br d, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-1b), 4.98 (br s, 1H, H-2), 7.79 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 808 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Fi (35 mg from 134 mg of resin **4F**): 28% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3350, 3054, 2924, 2851, 1736, 1686, 1466, 1422, 1265, 1203, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.86 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H, H-19' and H-19''), 1.23 (s, 66H, H-4'-H-17', H-4''-H-17'' and H-3'''-H-7'''), 1.47 (m, 4H, H-18' and H-18''), 1.60 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.31 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.96 (br s, 2H, H-9'''), 3.09 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.33 (br s, 2H, H-3), 4.09 (dd, $J = 12.1, 6.0$ Hz, 1H, H-1a), 4.23 (br d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1b), 4.97 (br s, 1H, H-2), 7.47 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 836 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Compound 6Fj (41 mg from 159 mg of resin **4F**): 27% yield; IR: $\nu_{\max}$ 3365, 2916, 2845, 1740, 1699, 1679, 1463, 1265, 1200, 1137 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H, H-20' and H-20''), 1.21 (s, 70H, H-4'-H-18', H-4''-H-18'' and H-3'''-H-7'''), 1.43 (m, 4H, H-19' and H-19''), 1.57 (m, 8H, H-3', H-3'', H-2''' and H-8'''), 2.27 (m, 4H, H-2' and H-2''), 2.91 (br s, 2H, H-9'''), 3.08 (br t-like, 2H, H-1'''), 3.39 (br s, 2H, H-3), 4.10 (dd, $J = 11.9, 5.9$ Hz, 1H, H-1a),

4.26 (br d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1b), 5.01 (br s, 1H, H-2), 7.74 (br s, 3H, NH_3^+); MS (ES): m/z : 864 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.6. DNA binding affinity

DNA binding affinities of all samples were measured at two DNA/sample ratios (w/w), 1:10 and 1:20, by electrophoresis. DNA/sample complexes were formed at a ratio of 1:10 (w/w) by transferring of 12.5 μL (30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) of sample into an Eppendorf tube. Each sample was further diluted with 37.5 μL of acetate buffer (20 mM, pH 7.4). To this solution, an aqueous solution of plasmid DNA (50 μL , 3 $\mu\text{g}/25$ mL) was added to each sample, and the solutions were successively mixed. The DNA/sample complex 1:20 (w/w) was prepared as above except that the 50 μL of stock sample (30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was used without dilution. DNA complexes were incubated at room temperature for 30 min. Bromophenol blue-free gel loading buffer (100 μL , 13.3% w/v sucrose in water) was added to 100 μL of this complex. The solution was inverted to mix and each sample (10 μL) was loaded onto a 1% agarose gel (0.5 $\times$ TBE buffer). The gel was run at 200 V, 400 mA for 2 h. DNA bands were viewed under UV light by ethidium bromide staining.

3.2.7. Liposome preparation

To a solution of DOPE (50 μL , 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in chloroform) in a 1.5 mL Eppendorf was added a solution of cationic lipid (50 μL , 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in ethanol) and shaken. The organic solvents were evaporated under a stream of nitrogen gas and further dried under high vacuum (>2 h). The resulting thin film was hydrated with 100 μL of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at room temperature for 1 h. The mixture was vortexed for 1 min and sonicated (2×15 min) with 1 h rests between sonications in a bath-type sonicator, producing small unilamellar vesicles.²⁸ The liposomes were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h prior to use.

3.2.8. Transfection procedure

HEK293 (human embryonic kidney cell), PC-3 (human prostate adenocarcinoma) and HeLa (human cervical adenocarcinoma) were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 mg/mL) and L-glutamine (4 mM) at 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 . For transfection, the cells were seeded up to 1×10^4 cells/well in a 96-well plate, to give 50–70% confluence to be used on the next day. The growth medium was removed and the cells were washed with PBS and replaced with 100 μL of fresh serum-free DMEM. DNA (pCH110-encoding β -galactosidase)/cationic liposome complexes (lipoplexes) were prepared as follows. An appropriate volume of each cationic liposome (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was added to the plasmid DNA (0.4 μL , 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and the complex was incubated at room temperature for 30 min before being diluted with phosphate-buffered saline to make a final DNA concentration of 0.1 mg/10 mL. The lipoplexes (10 μL) were then added to the cells and left to incubate at 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 . The cells were then washed with PBS and fresh growth medium was added and further incubated for 48 h. For EffecteneTM transfection, the method was carried out according to the manufacturer's instruction and the same ratios of plasmid DNA:EffecteneTM were used.

After transfection, the cells were washed once with Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) containing 0.1 g/L calcium and magnesium and then fixed with 100 μL fixative (2% formaldehyde, 0.05% glutaraldehyde in D-PBS) for 5 min at room temperature. The cells were washed and 100 μL of substrate/stain solution (1 mg/mL X-gal in stain solution; 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl_2) incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. The cells were washed with D-PBS and the blue cells were then counted under inverted microscope.

Acknowledgments

This work was supported by the Commission on Higher Education, Ministry of Education, the Thailand Research Fund (TRF) and the Research Team Strengthening Grant of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC). WR acknowledges the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for studentship. We are indebted to Professor Mark Bradley, University of Edinburgh, UK for providing polymer support and equipment for solid phase synthesis. We are grateful to Dr. Ek Saengvichien for providing gel electrophoresis apparatus.

References and notes

- Amado, R. G.; Chen, I. S. Y. *Biomedicine* **1999**, *285*, 674.
- Somia, N.; Verma, I. M. *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 91.
- Felgner, P. L. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1990**, *5*, 163.
- Harland, R.; Weintraub, H. *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 1094.
- Heiser, W. C. *Methods Mol. Biol.* **2000**, *130*, 117.
- Schenborn, E. T.; Goiffon, V. *Methods Mol. Biol.* **2000**, *130*, 135.
- Pagano, J. S. *Prog. Med. Virol.* **1970**, *12*, 1.
- Miller, A. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1768.
- Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 7413.
- Obika, S.; Yu, W.; Shimoyama, A.; Uneda, T.; Miyashita, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 245.
- Nabel, G. J.; Nabel, E. G.; Yang, Z. Y.; Fox, B. A.; Plautz, G. E.; Gao, X.; Huang, L.; Shu, S.; Gordon, D.; Chang, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 11307.
- Caplen, N. J.; Alton, E. W.; Middleton, P. G.; Dorin, J. R.; Stevenson, B. J.; Gao, X.; Durham, S. R.; Jeffery, P. K.; Hodson, M. E.; Coutelle, C.; Huang, L.; Porteous, D. J.; Williamson, R.; Geddes, D. M. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 39.
- Huang, C.-Y.; Uno, T.; Murphy, J. E.; Lee, S.; Hamer, J. D.; Escobedo, J. A.; Cohen, F. E.; Radhakrishnan, R.; Dwarki, V.; Zuckermann, R. N. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 345.
- Yingyongnarongkul, B.; Howarth, M.; Elliott, T.; Bradley, M. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 463.
- Yingyongnarongkul, B.; Howarth, M.; Elliott, T.; Bradley, M. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 753.
- Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P. L. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2550.
- Lensen, K.; Jantschkeff, P.; von Kiedrowski, G.; Massing, U. *Chem. Bio. Chem.* **2002**, *3*, 852.
- Liu, D.; Qiao, W.; Li, Z.; Cui, X.; Li, K.; Yu, L.; Yan, K.; Zhu, L.; Cheng, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 995.
- Simberg, D.; Danino, D.; Talmon, Y.; Minsky, A.; Ferrari, M. E.; Wheeler, C. J.; Barenholz, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47453.
- (a) Balasubramaniam, R. P.; Bennett, M. J.; Aberle, A. M.; Malone, J. G.; Nantz, M. H.; Malone, R. W. *Gene Ther.* **1996**, *3*, 163; (b) Byk, G.; Dubertret, C.; Escriou, V.; Frederic, M.; Jaslin, G.; Rangara, R.; Pitard, B.; Crouzet, J.; Wils, P.; Schwartz, B.; Scherman, D. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 224; (c) Heyes, J. A.; Niculescu-Duvaz, D.; Cooper, R. G.; Springer, C. J. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 99.
- Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18997.
- Yingyongnarongkul, B.; Apiratikul, N.; Aroonrerk, N.; Suksamrarn, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5870.
- Pedroso de Lima, M. C.; Simoes, S.; Pires, P.; Faneca, H.; Duzgunes, N. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 277.
- (a) Hui, S. W.; Langner, M.; Zhao, Y. L.; Hurley, E.; Chan, K. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 590; (b) Mok, K. W. C.; Cullis, P. R. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2534.
- (a) Harvie, P.; Wong, F. M. P.; Bally, M. B. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1040; (b) Simoes, S.; Slepishkin, V.; Gasper, R.; Pedroso de Lima, M. C.; Duzgunes, N. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 1798.
- Ghosh, K. Y.; Visweswariah, S. S.; Bhattacharya, S. *FEBS Lett.* **2000**, *473*, 341.
- Kaiser, E.; Colescot, R.; Bossinge, C.; Cook, P. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- (a) Gershon, H.; Ghirlando, R.; Guttman, S. B.; Minsky, A. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7143; (b) Xu, Y.; Szoka, F. C. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Solid phase synthesis of novel asymmetric hydrophilic head cholesterol-based cationic lipids with potential DNA delivery

Widchaya Radchatawedchakoon^a, Ramida Watanapokasin^b, Aungkana Krajarng^b,
Boon-ek Yingyongnarongkul^{a,*}

^a Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Bangkok 10240, Thailand

^b Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Wadhana, Bangkok 10110, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2009

Revised 27 October 2009

Accepted 27 October 2009

Available online 31 October 2009

Keywords:

Cationic lipids

Cholesterol-based

Liposomes

Transfection

DNA delivery

Non-viral vector

Solid phase synthesis

ABSTRACT

Twenty-four asymmetric divalent head group cholesterol-based cationic lipids were designed and synthesized by parallel solid phase chemistry. These asymmetric head groups composed of amino functionality together with trimethylamino, di(2-hydroxyethyl)amino or guanidiny groups. Spacers between cationic heads and linker were both equal and unequal in length. These lipids were subjected to evaluation for DNA binding affinities by gel retardation assay and were screened for their transfection efficiency on HEK293 cells. Cationic lipids with equal chain length exhibited high transfection efficiency when polar part contained asymmetric polar heads. In contrast, lipids with unequal chain length exhibited high transfection efficiency when polar part contained symmetric heads. According to the optimal formulation, seven lipids exhibited higher transfection efficiency than the commercially available transfection agents, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol, to deliver DNA into PC3 human prostate adenocarcinoma cells. 3β-[N-(N'-Guanidiny)-2'-aminoethyl)-N-(2-aminoethyl)carbamoyl] cholesterol (**5**) bearing amino and guanidiny polar heads exhibited highest transfection efficiency with minimal toxicity. The morphology of active liposomes was observed by transmission electron microscopy (TEM) and size of liposomes were around 200–700 nm.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gene therapy is an approach to treat genetic disorders, AIDS and other acquired genetic defects. This method is the replacement of a defective gene with a normal one. Various techniques involving viral and non-viral vectors have been developed to insert genetic material into recipient cells.¹ Much effort has been devoted to the development of non-viral delivery due to the disadvantages of viruses used for gene delivery which include generation of immune responses.² Consequently, non-viral vector was chosen for DNA delivery. Non-viral vectors can be classified into two major categories: physical methods (e.g., microinjection,³ hydrodynamic,⁴ particle bombardment,⁵ electroporation,⁶ ultrasound⁷ and encapsulated microsphere⁸) and chemical methods (e.g., DEAE-dextran,⁹ calcium phosphate,¹⁰ cationic lipid,¹¹ cationic polymer¹² and cationic dendrimer¹³). Of all the non-viral chemical vectors, cationic lipid is the chemical transfection agent for delivery of nucleic acids using liposomes which hold great promise as a safe and non-immunogenic approach to gene delivery.¹⁴

* Corresponding author. Tel.: +66 2 3190931; fax: +66 2 3108404.

E-mail addresses: boonek@ru.ac.th, gmbonek@hotmail.com (B. Yingyongnarongkul).

Cationic lipids form liposomes when formulated in water under optimal conditions.¹⁵ The surface of these liposomes is positively charged and is attracted electrostatically to the phosphate backbone of DNA, as well as to the negatively charged surface of the cell membrane. Lipoplexes, which are also known as liposome–DNA complex, play a central role in current approaches to gene delivery, serving as potent transfection vectors.¹⁶ The mechanism of DNA intake is not exactly known but is believed to be related to endocytosis.¹⁷ To achieve DNA delivery, lipoplex complexes need to bind the cell surface, across the membrane, release DNA into the cytoplasm, and finally transport the DNA into the nucleus.¹⁸ Most cationic liposomes have a common neutral phospholipid in addition to the cationic lipid component. The phospholipid is needed for stabilizing most type of cationic lipids in a lipid bilayer and may provide the cell penetration function of cationic liposomes.¹⁹ In this report the neutral phospholipid, dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE), was used as a helper lipid.

Since the key invention of cationic liposome in DNA delivery,¹¹ several cationic lipids having various cationic headgroups, linkers and hydrophobic tails were reported. Cholesterol-based cationic lipids²⁰ are among the most promising agents that are potentially and safely delivery gene into cells. Cholesterol was often used as a lipid anchor because of its lipid bilayer stabilizing activity²¹ and minimal

toxicity to the treated cells.²⁰ Cholesterol-based cationic lipids with variation of headgroups, mono-, di-, and polyvalent, have been synthesized and tested for their transfection efficiency.^{20,22–24} Cholesteryl spermidine,²² BGTC²³ and Lipid 67²⁴ are samples of cholesterol-based cationic lipids bearing symmetric terminal polar groups (Fig. 1). To our knowledge, cholesterol-based lipid with unsymmetric terminal cationic heads has not been reported. We report here the synthesis of asymmetric hydrophilic head cholesterol-based cationic lipids and transfection efficiency evaluation. To study structure–transfection activity relationship, cationic lipids with symmetric polar head were synthesized and compared the transfection activity of those asymmetric lipids (Fig. 2).

2. Results and discussion

2.1. Synthesis

The synthesis of symmetric and asymmetric terminal hydrophilic head lipids (1–2 and 3–8, respectively) having symmetry

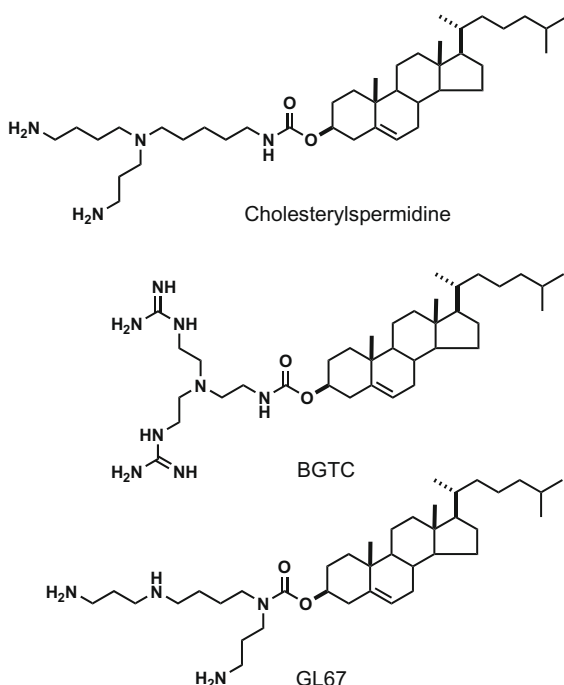


Figure 1. Structures of symmetrical edge-head cholesterol-based cationic lipids.

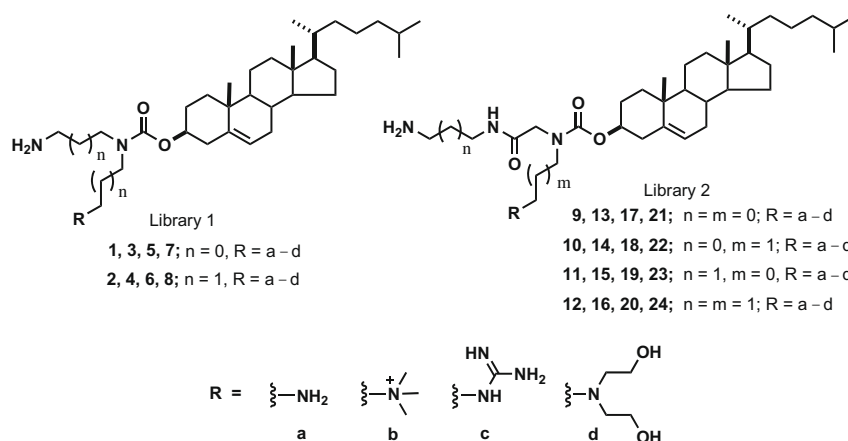
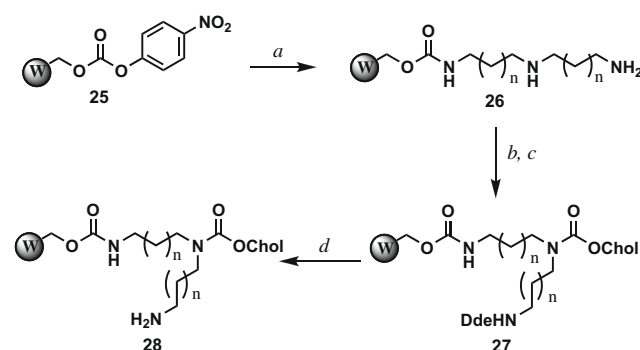


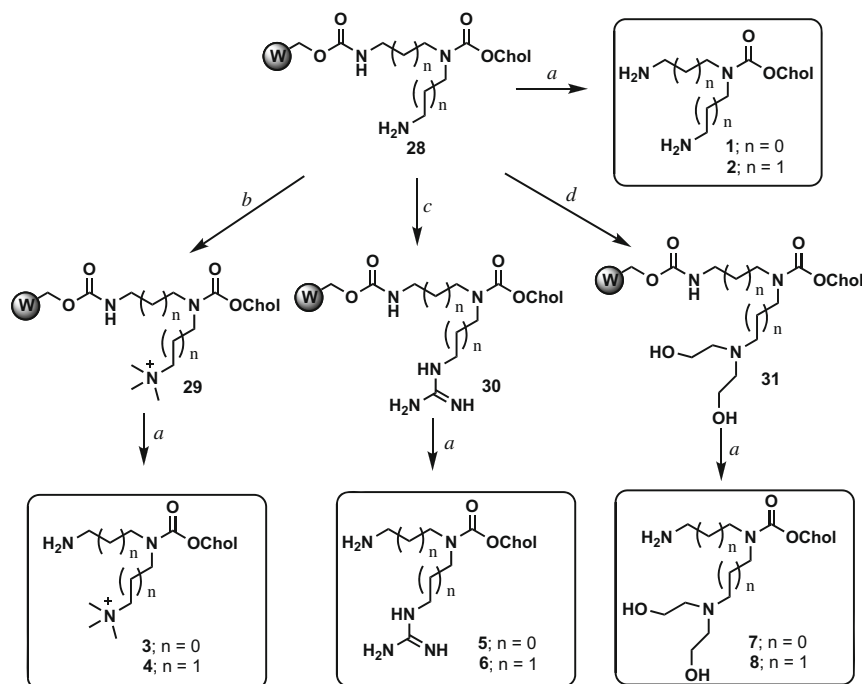
Figure 2. Structures of new asymmetrical polar head cholesterol-based cationic lipids.



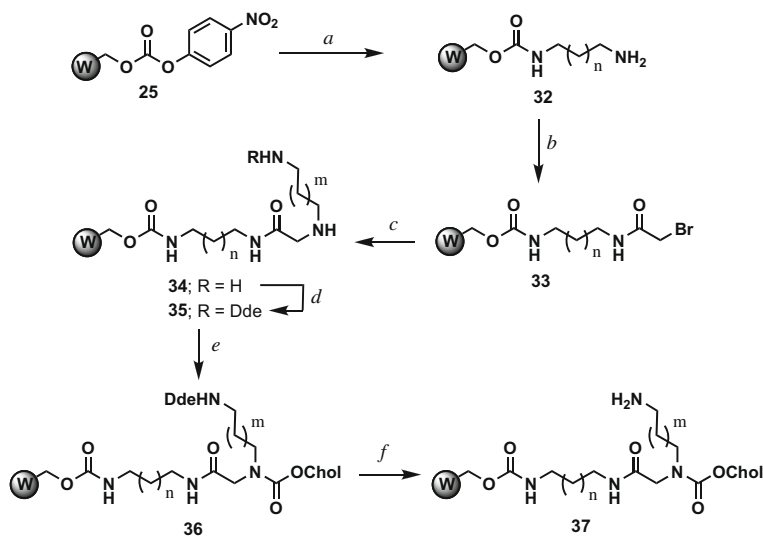
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) diethylenetriamine or bis(3-aminopropyl)amine (excess), CH_2Cl_2 , 6 h; (b) Dde-OH (excess), CH_2Cl_2 , DMF, 12 h; (c) cholesteryl chloroformate (4 equiv), pyridine, CH_2Cl_2 , 12 h; (d) 5% $\text{N}_2\text{H}_4/\text{DMF}$, 2×30 min.

spacer length (library 1, Fig. 2) was carried out as shown in Schemes 1 and 2. The key template **28** used for the synthesis of cationic lipids library 1 was synthesized as outlined in Scheme 1. The active carbonate resin **25**²⁵ was reacted with polyamine, diethylenetriamine or nor-spermidine, to afford the resin **26**. The primary amine was selectively protected with Dde-OH²⁶ and the secondary amine was capped with cholesteryl chloroformate to generate the resin **27**. The key intermediate **28** was obtained after treatment of the resin **27** with 5% N_2H_4 in DMF. Treatment of the resin **28** with 50% TFA in CH_2Cl_2 gave the lipids **1** and **2**. The free primary amine on the resin **28** allowed different designs for the cationic head. Numbers of cationic heads, trimethyl quaternary amine,^{11,20a} guanidinium^{23,27} and amine having hydroxyethyl group^{28,29} have been synthesized and evaluated for their transfection efficiency. Some of them exhibited remarkably high transfection efficiencies. Reaction of the resin **28** with methyl iodide in the presence of DIEA base for 18 h generated the resin **29**, which was treated with 50% TFA in CH_2Cl_2 to obtain the desired lipids **3** and **4**. The synthesis of the lipids **5** and **6** was accomplished by treatment of the resin **28** with *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiurea²⁷ for 18 h followed by cleavage with 50% TFA in CH_2Cl_2 . The lipids **7** and **8** were also synthesized by reaction of the resin **28** with 2-bromoethanol for 18 h followed by cleavage with TFA.

To investigate the effect of the chain length between cationic head and linker on the transfection efficiency, cationic lipids library 2 was synthesized (Fig. 2) as shown in Schemes 3 and 4. The resin **32**, which was prepared by reacting the active carbonate **25** with appropriate diamine, was coupled with bromoacetic acid



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) 50% TFA/CH₂Cl₂, 2 h; (b) MeI (10 equiv), DIEA, DMF, 18 h; (c) *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiourea (4 equiv), DIEA, DMF, 18 h; (d) 2-bromoethanol (8 equiv), DIEA, 18 h.

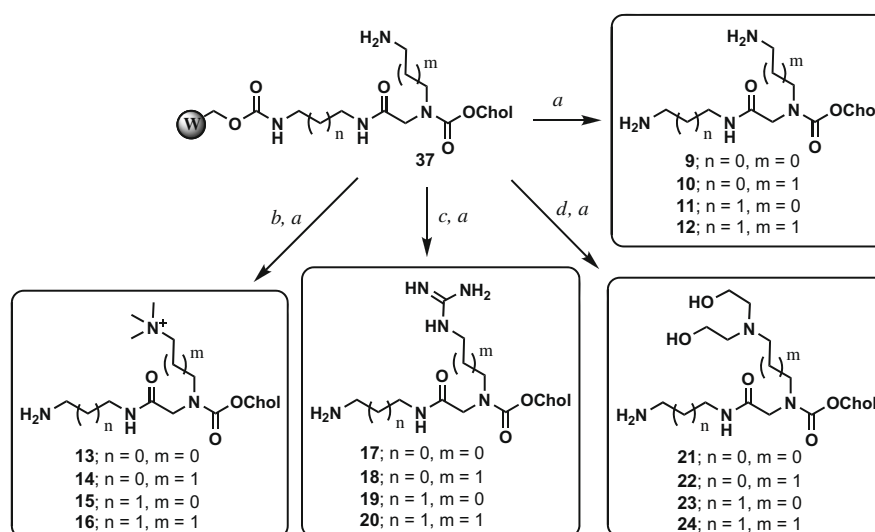


Scheme 3. Reagents and conditions: (a) 1,2-diaminoethane or 1,3-diaminopropane (excess), CH₂Cl₂, 6 h; (b) bromoacetic acid (4 equiv), DIC (4 equiv), DMF, 12 h; (c) 1,2-diaminoethane or 1,3-diaminopropane (excess), DMF, 12 h; (d) Dde-OH (excess), CH₂Cl₂, DMF, 12 h; (e) cholesteryl chloroformate (4 equiv), pyridine (20 equiv), CH₂Cl₂, 12 h; (f) 5% N₂H₄/DMF, 2 × 30 min.

to obtain the resin **33**, which was then reacted with different diamine to generate the resin **34**. The primary amine of the resin **34** was selectively protected with Dde-OH allowing the remaining amine to couple to the cholesterol tail. Thus, the resin **35** was reacted with cholesteryl chloroformate to provide the resin **36**. The Dde group was removed with 5% N₂H₄ in DMF to give the scaffold **37**. Cationic lipids **9–12** were obtained after TFA treatment (Scheme 4). The lipids **13–24** which contain various polar heads were prepared in the same manner as described for library 1. All synthesized lipids **1–24** were obtained in 32–70% yields (based on original loading of Merrifield resin and as TFA salts). Structure elucidation of these lipids was achieved by spectroscopic means (¹H and ¹³C NMR, IR and mass spectra).

2.2. DNA binding affinity

The relative DNA binding affinities of cationic lipids were evaluated to determine whether transfection activities correlated with DNA binding. The DNA binding affinities were determined by gel retardation assay. Cationic lipids were mixed with plasmid DNA, known as lipoplex, at weight ratios of 1:20 (DNA/sample, w/w) and the lipoplexes were loaded on agarose gel (Fig. 3). The result indicated that most of lipids from library 1 interacted sufficiently with DNA to retard migration through the gel matrix except the lipid **5**. Lipids with equal chain length (library 1) were able to bind to DNA more sufficient than the lipids with unequal chain length (library 2) at the DNA/lipid weight ratio of 1:20. For library 2, the



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) 50% TFA/ CH_2Cl_2 , 2 h; (b) MeI (10 equiv), DIEA, DMF, 18 h; (c) *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiourea (4 equiv), DIEA, DMF, 18 h; (d) 2-bromoethanol (8 equiv), DIEA, 18 h.

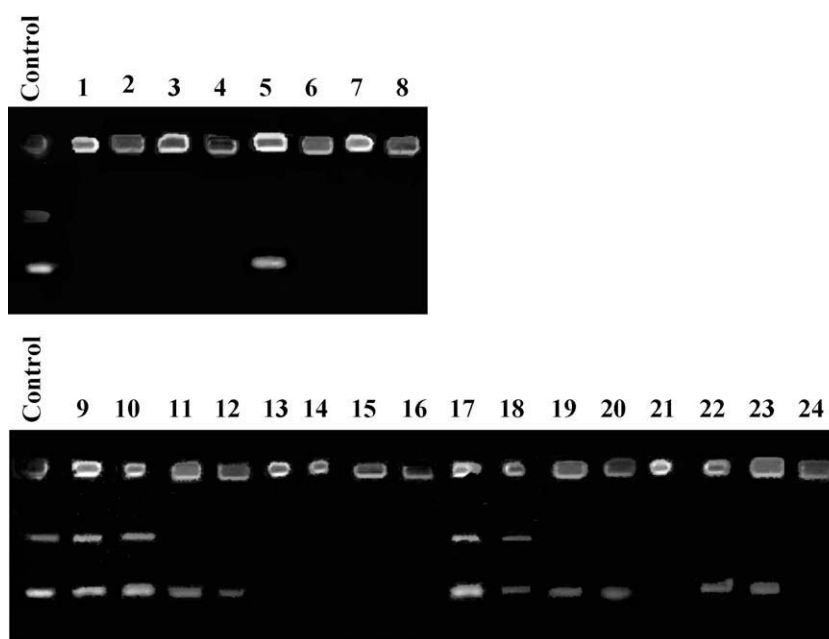


Figure 3. Gel retardation assay of DNA/cationic lipids complexes at a weight ratio of 1:20. Lanes marked 'Control' contained DNA alone and was used as a control. The presence of a lower band indicated that DNA has migrated and has not been bound by the transfection compound.

lipids **13–16** bearing trimethyl quaternary amine bound sufficiently with DNA whereas the lipids with the amino (**9–12**) and guanidinyll (**17–20**) head groups did not fully bind to DNA. It should be noted that the lipids **3–4** and **13–16** which possess permanent charge bound strongly to DNA to retard migration.

2.3. Transfection activity

2.3.1. Transfection screening

All the synthesized cationic lipids were tested for DNA delivery to HEK293 (Human embryonic kidney cell lines) using β -galactosidase as a reporter gene. Figure 4 shows the transfection screening results using plasmid DNA (0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$) at DNA/liposome ratio 1:20 (w/w). The liposome formation in the preliminary transfection

activity screening was with and without DOPE. In the case of liposome formation with DOPE, cationic lipid/DOPE ratio was 2:1 (w/w). The results indicated that eight lipids, **2**, **5–8**, **10–11** and **19**, exhibited relative transfection efficiency over 100% as compared to EffecteneTM transfection (100%). Most the lipids in library 1 bearing unsymmetrical polar head and symmetrical chain length exhibited high transfection efficiency. In contrast, cationic lipid library 2 (**10** and **11**) with symmetric polar head and unsymmetric chain length showed higher transfection activity than EffecteneTM. From the screening result, eight lipids which exhibited higher transfection efficiency than the positive control were subjected to further optimization. To find out the optimized transfection efficiency of these lipids, the lipids/DOPE ratios, DNA/lipids ratios, and DNA per well were studied.

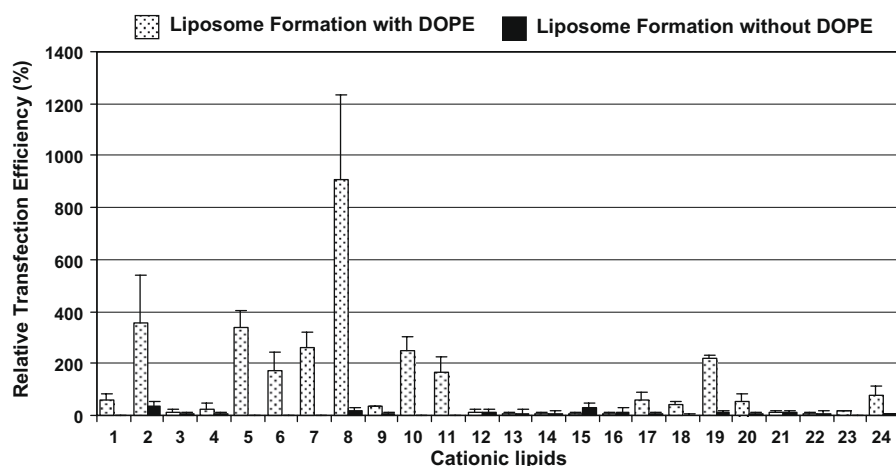


Figure 4. Transfection screening activity of synthesized cationic lipids employing pCH110-encoding β -galactosidase (0.1 μ g/well). The liposome formation was both with DOPE and without DOPE. The lipoplexes were used at DNA/lipids (w/w) ratios of 1:20. The transfection efficiencies of the lipids were compared to that of commercially available reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

2.3.2. Optimization of cationic lipid/DOPE ratios

Helper lipid, DOPE, has been known to increase the transfection efficiency of cationic liposome to transfer and release DNA into the cytoplasm.³⁰ In order to find out the most effective formulations, transfections with equal DNA/lipid weight ratio (1:20) and varying the weight ratio of lipids (2, 5–8, 10–11 and 19)/DOPE were performed (Fig. 5). The optimized lipid/DOPE ratio was found to vary for each lipid. Among the compound tested, at a lipid/DOPE ratio of 1:2, the lipid 8 was found to be the most effective compound to deliver DNA into the HEK293 cells (900%). The transfection efficiency of the lipid 8 decreased dramatically when the weight ratio of lipid/DOPE decreased. The lipids 10 and 19 showed the maximum efficiency at a lipid/DOPE ratio of 2:1 whereas the lipids 5 and 11 exhibited the highest efficiency at a lipid/DOPE ratio of 1:1. The optimal formulation of each lipid was used for the next experiment.

2.3.3. Optimization of DNA/amount of cationic lipids ratios

By using the respective optimized lipid/DOPE ratio for each lipid, all the selected lipids were tested at the equal amount of DNA (0.1 μ g/well) and varying the amount of lipid. Three DNA/cationic lipid ratios, 1:10, 1:20 and 1:40 (w/w), were prepared and evaluated for transfection efficiency and the result is shown in Fig-

ure 6. The transfection efficiency of the lipids 2, 7, 8, 11 and 19 was found to decrease at lower DNA/lipid ratio. In contrast, the lipids 5 and 6 exhibited highest transfection efficiency when lower DNA/lipid ratio was used. The optimal DNA/cationic lipid ratio for each lipoplex formation was used for further optimization.

2.3.4. Optimization of the amount of DNA

To see whether variation in the amount of DNA affected the transfection efficiency of these lipids, the experiments were performed using the optimal lipid/DOPE (Fig. 5) and DNA/lipid (Fig. 6) ratios. The amounts of DNA used in the experiment were 0.1, 0.2 and 0.4 μ g/well. The lipids 2, 6, 8 and 11 exhibited higher transfection efficiency when the amount of DNA increased (Fig. 7). The results have indicated that these lipids are more efficient at high DNA concentration. At the highest amount of DNA (0.4 μ g/well), the lipid 8 exhibited the highest transfection activity.

2.3.5. The effect of serum

One of the major drawbacks of cationic lipids for their in vivo use is the inhibition of the transfection efficiency of cationic liposomes in the presence of serum. Most of cationic lipids which

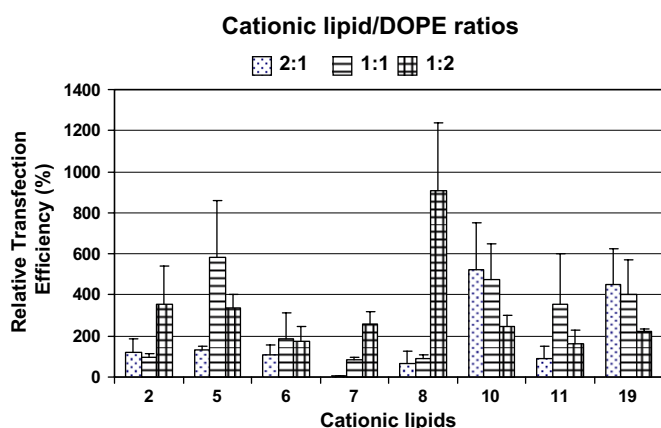


Figure 5. In vitro transfection efficiency of the selected lipids in HEK293 cells across the cationic lipid/DOPE weight ratio of 2:1, 1:1 and 1:2. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

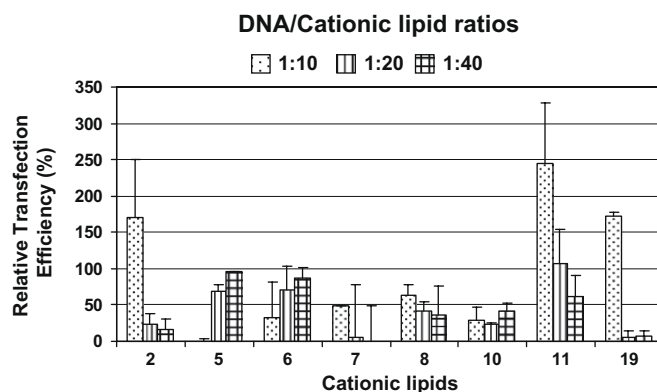


Figure 6. In vitro transfection efficiency of the selected lipids in HEK293 cells across the DNA/cationic lipid weight ratios of 1:10, 1:20 and 1:40 (w/w). The optimal liposome formation of each lipid from Figure 5 was used as described in the text. Transfection efficiency of the selected lipids was compared to that of the commercial reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

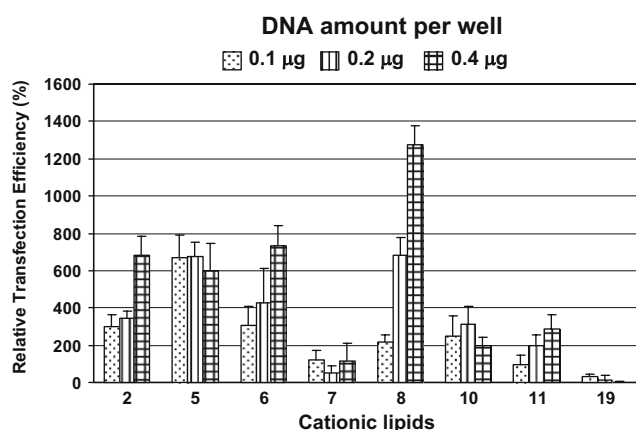


Figure 7. Effect of DNA amount for gene delivery. The optimal liposome formation (Fig. 5) and DNA/lipids complex (Fig. 6) of each lipid were used to mix with various amount of DNA from 0.1 to 0.4 µg. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency.

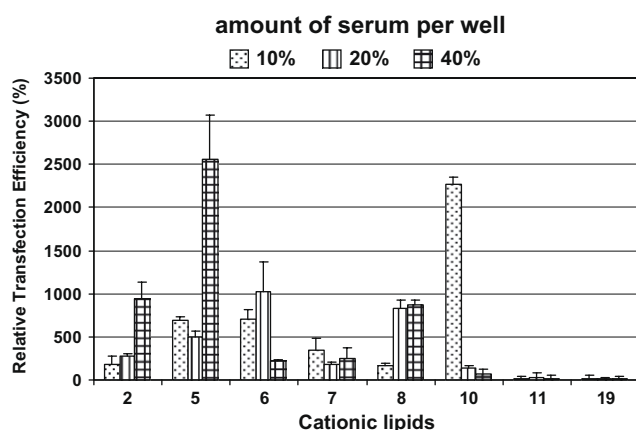


Figure 8. Effect of serum for transfection efficiency. The optimal liposome formation (Fig. 5), DNA/cationic lipid (Fig. 6) and amount of DNA per well (Fig. 7) of each lipid were used to transfer gene to HEK293 cell at various amount of serum. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency.

exhibited high transfection activity in the absence of serum lost their efficiency when transfected in the presence of serum.^{20b,c} The selected lipids with the optimal condition of each lipid from Figures 5–7 were tested for the effect of serum on gene transfection efficiency. These experiments were carried out in the presence of 10%, 20% and 40% serum. The results are shown in Figure 8. The lipids 2 and 5 exhibited highest transfection efficiency (1000% and 2600%, respectively) when the experiment was performed under 40% serum. Transfection efficiency of the lipid 10 reached its maximum when 10% serum was present. Transfection efficiency of this lipid was significantly decreased when the cells were tested in the presence of 20% and 40% serum. At 20% and 40% serum, the lipid 8 showed similar activity to transfer DNA into cells. The lipids 11 and 19 could not deliver DNA into cells when the experiment was carried out under serum containing condition.

2.3.6. Transfection efficiency toward different cell lines

It is well-known that transfection agents have ability to specifically deliver DNA into different cell types. To evaluate the transfection efficiency of these lipids toward the different mammalian cell lines, COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cells, the experiments were performed using optimum conditions of each lipid (Figs. 5–7). These four cells were chosen as representing cancers of importance to human health. Three commercially available transfection agents, Effectene™, DOTAP and DC-Chol, were tested under identical conditions for comparison. The experiment was carried out under serum-free condition. The transfection results are shown in Figure 9. All of lipids, except 6, exhibited higher transfection efficiency to deliver DNA into PC3 cells than Effectene™, DOTAP and DC-Chol. Lipid 5 exhibited highest activity having relative transfection efficiency of 3200%. All the compounds tested could not reach their transfection efficiency of 500% against COLO 205, D-17 and HeLa cells. The results indicated that transfection efficiency of these newly synthesized lipids was cell dependent.

2.3.7. Transfection toxicity

Cytotoxicity of synthesized cationic lipids is very important for gene delivery. To assess the relationship between cytotoxicity and transfection efficiency, the toxicity of synthesized lipids on HEK293, COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cell lines using optimal condition (Figs. 5–7) were determined by measuring changes in cell metabolic activity (MTT assay). The results were shown as % cell viability as compared to the control cells in the presence of

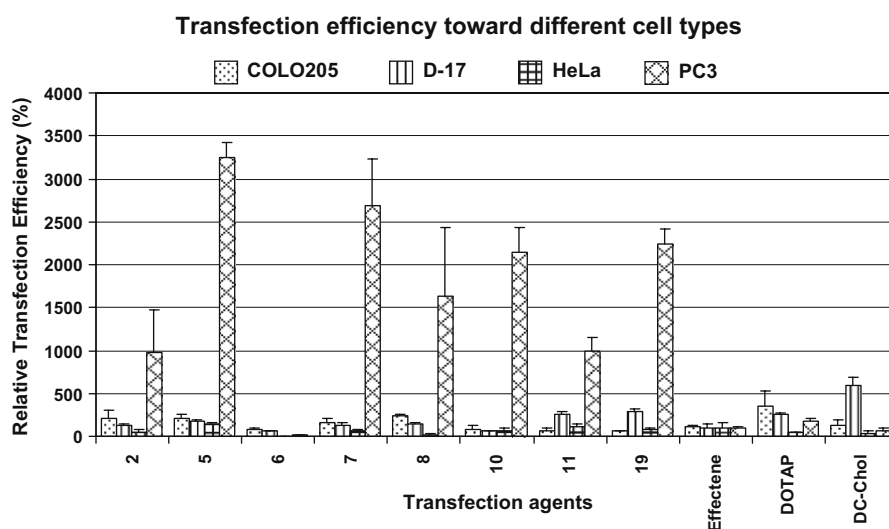


Figure 9. Transfection efficiency of selected lipids toward COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cell using optimum conditions from Figures 5–7. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, Effectene™, DOTAP and DC-Chol. Transfection efficiency of Effectene™ for each cell line was calculated as 100%.

DNA (Fig. 10). Most of the lipids including the commercially available agents showed no cytotoxicity to all cell types. The lipid 7 was toxic to the cells tested and cell viability was lower than 50%. This result was contrast to the previous experiment which the lipid 7 exhibited relative transfection efficiency of 2700% against PC3 cells.

2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

The morphology of the prepared liposome from the synthesized cationic lipids, which were used to study transfection optimization, was observed under transmission electron microscopy (TEM) after negative staining. The liposome of each lipid was prepared at its optimal lipid/DOPE ratio. The morphology of liposomes was shown in Figure 11. The diameter of the aggregates spanned from 200 to 700 nm. Most of the aggregates showed vesicle-like organizations. Morphology of liposomes/DNA complexes (lipoplexes) was also visualized under transmission electron microscopy as shown in

Figure 12. Most of the lipoplexes were found to be large spherical aggregates which the sizes are within the range 300–1000 nm. In this study, sizes of lipoplexes prepared from these lipids are unlikely to play important role in modulating for transfection efficiency.

In summary, cholesterol-based cationic lipids have been of interest to many researchers for its use in gene delivery applications. Cholesterol-based cationic lipids can be easily synthesized with different polar head to enhance transfection efficiency. Toward this end, we have synthesized asymmetric divalent polar head groups cholesterol-based cationic lipids bearing amino group together with either trimethylamino, di(2-hydroxyethyl)amino or guanidinyll functionality. Based on the results reported here, new cationic lipids required neutral lipid, DOPE, to enhance transfection efficiency. It was found that cationic lipids library 1, which possessed equal spacer length, exhibited high transfection efficiency when bearing the asymmetric polar heads. However, when the unequal spacer length was introduced into cationic lipid library 2 the

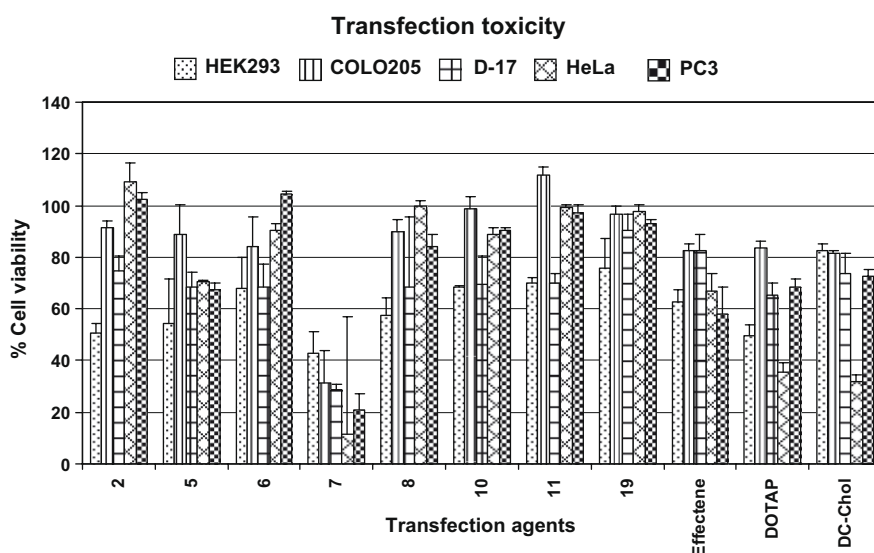


Figure 10. Effect of transfection synthesized lipids on cell metabolic activity. Liposomes of cationic lipid with helper lipid, DOPE, were formed and added to DNA to form lipoplexes. These complexes were added to HEK293, COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cell. Cell metabolic activity was determined by a MTT assay.

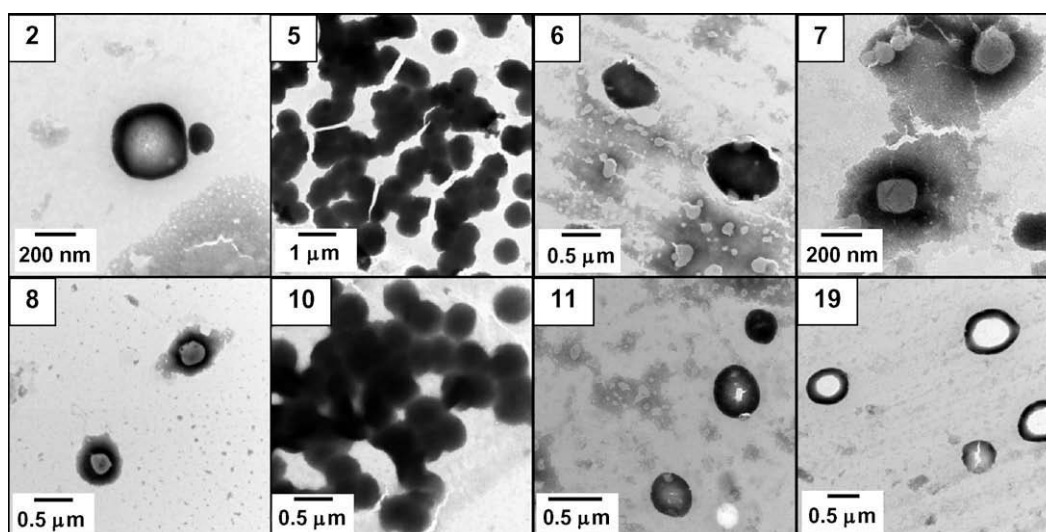


Figure 11. Transmission electron microscopic images of cationic liposomes 2, 5–8, 10, 11 and 19.

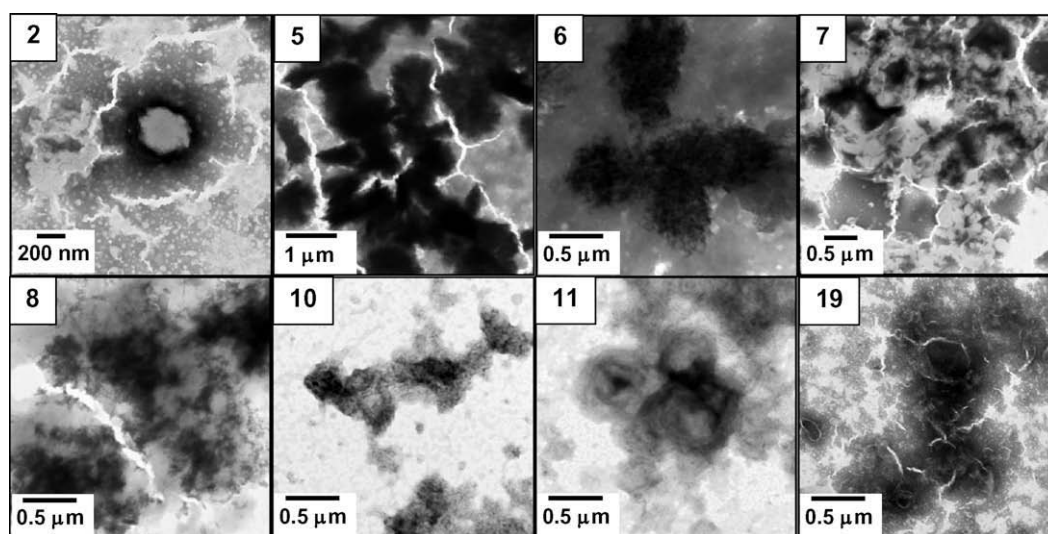


Figure 12. Transmission electron microscopic images of lipoplexes prepared from optimized liposomes (2, 5–8, 10, 11 and 19)/DNA complexes.

transfection efficiency decreased. The optimal formulation (DOPE/lipid ratio, DNA/lipid ratio, amount of lipid) of each lipid for highest transfection efficiency was dependent on each compound. Seven cationic lipids exhibited greater transfection efficiency than commercially available transfection agents, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol, against PC3 (human prostate adenocarcinoma) cells. We have found that cationic lipid containing amino and guanidiny polar headgroup with equal chain length (lipid 5) is the most efficient one. The guanidiny group might contribute to high transfection efficiency. It has been known that guanidiny group possesses several interesting features especially the high pK_a nature of guanidiny group.³¹ This makes it remain protonated at a broad range of pH and transfection efficiency should be insensitive to variations of pH during in vitro transfection. The optimal conditions for lipid 5 to exhibit highest transfection efficiency against PC3 cells included lipid/DOPE at weight ratio of 1:1, DNA/liposome ratio of 1:40 and the amount of DNA 0.1 μ g/well. Most importantly, this lipid was compatible for high serum condition make it promising non-viral transfection vector for further in vivo study.

3. Experimental

3.1. General

NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 spectrometer operating at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C . All coupling constants (J values) were measured in hertz. ES mass spectra were recorded with a Finnigan LCQ mass spectrometer. Infra-red spectra were recorded on a Perkin–Elmer Spectrum GX60237. The size and morphology of the cationic liposomes were recorded on JEM-2100, JEOL electron microscope. Starting materials and reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification.

3.2. Solid phase synthesis of transfection agent

3.2.1. Synthesis of lipids library 1

To the active carbonate resin **25**²⁵ (1 equiv, 1.1 mmol/g) was added an excess of diethylenetriamine or bis(3-aminopropyl)amine in CH_2Cl_2 (10 mL). The suspension was shaken for 6 h. The resin was filtered and washed successively with CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 (3×10 mL each). The resulting resin **26** was dried under vacuum for 2 h and gave a positive ninhydrin

test.³² The solution of Dde-OH (excess) in CH_2Cl_2 /DMF was added to the resin **26**. The reaction was shaken for 12 h. The resulting resin was filtered and washed successively with CH_2Cl_2 , MeOH, DMF, MeOH and CH_2Cl_2 (3×10 mL each) to afford the negative ninhydrin test resin. After that, the resin was dried under vacuum for 2 h and reacted with cholesteryl chloroformate (4 equiv) in CH_2Cl_2 using pyridine (2 mL) as a base for 12 h. The resulting resin was filtered and washed successively with CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 (3×10 mL each) to give the desired resin **27**. The Dde-protecting group was removed with 5% N_2H_4 in DMF for 2×30 min to give free amino resin **28**. The resin **28** gave a positive ninhydrin test. The resin was washed successively with CH_2Cl_2 and MeOH (3×10 mL each) before cleavage at the last step. The dried resin **28** was treated with 50% TFA/ CH_2Cl_2 for 2 h. The resin was filtered and the solution was collected. The solvents were removed under a stream of nitrogen and evaporated under reduced pressure to give the desired product **1** and **2**.

3.2.1.1. 3β -[N,N-(2,2'-Diaminoethyl)carbamoyl]cholesterol

(1). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 214.5 mg) 45.8 mg, 38%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3436, 2918, 2849, 1773, 1682, 1541, 1507, 1463, 1381, 1202, 1021 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 9 drops of CD_3OD): δ 0.53 (s, 3H, CH_3 -18), 0.765 and 0.769 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27, overlapping signal), 0.80 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.91 (s, 3H, CH_3 -19), 0.91–2.26 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton), 3.05 (m, 4H, $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.38 (m, 4H, $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.48 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.26 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.00–8.4 (br s, 6H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 9 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.6, 18.5, 18.9, 20.8, 22.3, 22.5, 23.7, 24.1, 27.6, 27.8, 28.0, 31.6, 31.7, 35.6, 35.8, 36.0, 36.3, 38.0, 39.3, 39.5, 42.1, 49.8, 56.0, 56.5, 76.7, 122.7, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 38.5 ($(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 46.7 ($(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 156.9 (C=O carbamoyl); MS (ES⁺): m/z : 516 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.1.2. 3β -[N,N-(3,3'-Diaminopropyl)carbamoyl]cholesterol

(2). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 123.9 mg) 52.4 mg, 70%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3355, 2918, 2845, 2280, 1675, 1600, 1509, 1468, 1429, 1202 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD): δ 0.62 (s, 3H, CH_3 -18), 0.811 and 0.815 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27, overlapping signal), 0.86 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.90 (s, 3H, CH_3 -19), 0.90–2.28 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton and $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 2.88 (br s, 4H, $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.26 (br s, 4H, $(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s,

1H, H-6-Chol), 7.94 (br s, 6H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.9, 24.2, 27.9, 28.1, 31.7, 35.8, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.2, 56.6, 75.8, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 25.7 and 26.4 ($(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 27.2 and 38.4 ($(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 44.2 and 44.6 ($(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$), 156.5 ($\text{C}=\text{O}$ carbamoyl); MS (ES^+): m/z 544.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.2. Synthesis of lipids 3 and 4

To the free amino resin **28** (1 equiv, 148.3 and 139.3 mg, 1.1 mmol/g) was added methyl iodide (10 equiv, 83 and 78 μL) and DIEA (10 equiv, 279 and 261 μL) in DMF (2 mL). The suspension was shaken for 18 h. The resin was washed successively with CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 (3×2 mL each) to afford resin **29**. The resin **29** was cleaved in the same manner of the synthesis of lipids **1** and **2** to give lipids **3** and **4**.

3.2.2.1. 3β -[N -((N,N,N' -Trimethyl)-2'-aminoethyl)- N -(2-aminoethyl)carbamoyl]cholesterol (3). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 148.3 mg) 48.0 mg, 53%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3436, 2932, 2840, 1681, 1469, 1426, 1202, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 6 drops of CD_3OD): δ 0.60 (s, 3H, CH_3 -18), 0.788 and 0.792 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27, overlapping signal), 0.84 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.94 (s, 3H, CH_3 -19), 0.96–2.30 (m, 30H; protons in cholesteryl skeleton), 3.06 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$), 3.10 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.48–3.77 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 4.40 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.00–8.30 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 6 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.6, 18.5, 19.0, 20.9, 22.3, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 28.0, 31.8, 35.6, 36.0, 36.4, 36.7, 39.3, 39.5, 42.1, 49.9, 56.0, 56.5, 76.6, 122.8, 139.1 (carbons in cholesteryl skeleton), 38.1 and 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 45.0 and 46.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 53.6 and 53.7 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 155.7 ($\text{C}=\text{O}$ carbamoyl); MS (ES^+): m/z 559.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.2.2. 3β -[N -((N,N,N' -Trimethyl)-3'-aminopropyl)- N -(3-aminopropyl)carbamoyl]cholesterol (4). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 139.3 mg) 57.4 mg, 64%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3436, 2931, 1677, 1468, 1423, 1379, 1202, 1130 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 6 drops of CD_3OD): δ 0.61 (s, 3H, CH_3 -18), 0.797 and 0.801 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27, overlapping signal), 0.85 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.94 (s, 3H, CH_3 -19), 0.94–2.28 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.89 (br s, 4H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.02–3.03 (br s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$), 3.27 (br s, 4H, CH_2NCH_2), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.98 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 6 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 75.8, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 25.7 and 26.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 37.0 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$), 44.3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 44.5 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 53.1 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 156.1 ($\text{C}=\text{O}$ carbamoyl); MS (ES^+): m/z 587.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.3. Synthesis of lipids 5 and 6

The resin **28** (1 equiv, 148.4 and 145.3 mg, 1.1 mmol/g) was added a solution of N,N' -bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiourea (4 equiv, 190 and 186 mg) and DIEA (4 equiv, 111 and 109 μL) in DMF (2 mL). The suspension was shaken for 18 h to give resin **30**. The resin was successively washed with CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 (3×2 mL each). The resin **30** was cleaved in the same manner for the lipids **1**–**2**.

3.2.3.1. 3β -[N -((N' -Guanidinyl)-2'-aminoethyl)- N -(2-aminoethyl)carbamoyl]cholesterol (5). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 148.4 mg) 42.1 mg, 46%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3355, 3182, 2934, 2278, 1779,

1674, 1509, 1468, 1432, 1376, 1203, 1138, 1018 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 3 drops of CD_3OD): δ 0.63 (s, 3H, CH_3 -18), 0.821 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.87 (d, J = 5.7 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 1.00–2.30 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton), 3.07 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.29 and 3.36 (br s, 4H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.51 (br s, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H; H-6-Chol), 8.01 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 3 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.0, 20.9, 22.4, 22.7, 23.7, 24.2, 27.6, 27.9, 28.1, 31.7, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.0, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 76.6, 122.7, 139.3 (carbons in cholesteryl skeleton), 38.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 47.4 (CH_2NCH_2), 156.9 ($\text{C}=\text{O}$ carbamoyl and $\text{C}=\text{N}$ guanidine); MS (ES^+): m/z 558.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.3.2. 3β -[N -((N' -Guanidinyl)-3'-aminopropyl)- N -(3-aminopropyl)carbamoyl]cholesterol (6). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 145.3 mg) 52.4 mg, 56%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3350, 2918, 1673, 1509, 1465, 1429, 1203, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 6 drops of CD_3OD): δ 0.62 (s, 3H, CH_3 -18), 0.805 and 0.809 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27, overlapping signal), 0.86 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 1.00–2.28 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 2.87 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.08 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 3.19 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.25 (br s, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 4.38 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.97 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 6 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.8, 24.1, 27.9, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.5, 76.0, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 25.7 and 26.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 37.3 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 38.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 44.1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 44.6 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 157.2 ($\text{C}=\text{O}$ carbamoyl and $\text{C}=\text{N}$ guanidine); MS (ES^+): m/z 586.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.4. Synthesis of lipids 7 and 8

The resin **28** (1 equiv, 152.8 and 159.3 mg, 1.1 mmol/g) was added 2-bromoethanol (8 equiv, 95 and 99 μL) and DIEA (8 equiv, 230 and 240 μL) in DMF (2 mL) and the suspension was shaken for 18 h. The resulting resin **31** was successively washed with CH_2Cl_2 , DMF, MeOH, DMF and CH_2Cl_2 (3×2 mL each). The resin **31** was cleaved in the same manner of the lipids **1** and **2** to give lipids **7** and **8**.

3.2.4.1. 3β -[N -((N,N' -Di(2''-hydroxyethyl)-2'-aminoethyl)- N -(2-aminoethyl)carbamoyl]cholesterol (7). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 152.8 mg) 41.5 mg, 41%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3335, 2932, 2840, 2279, 1674, 1597, 1541, 1509, 1413, 1310, 1203, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD): δ 0.62 (s, 3H, CH_3 -18), 0.809 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.86 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 0.90–2.28 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton), 3.12 (br s, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.36 (br s, 4H, CH_2NCH_2), 3.54 (br s, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$), 3.88 (br s, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$), 4.37 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.12 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.8, 24.1, 27.7, 27.9, 28.1, 31.7, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.0, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.60, 56.69, 76.6, 122.9, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 38.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 46.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 55.5, 55.8, 56.1 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$), 157.0 ($\text{C}=\text{O}$ carbamoyl); MS (ES^+): m/z 604.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.4.2. 3β -[N -((N,N' -Di(2''-hydroxyethyl)-3'-aminopropyl)- N -(3-aminopropyl)carbamoyl]cholesterol (8). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 159.3 mg) 64.1 mg, 58%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3383, 2932, 2840, 1676, 1468, 1432, 1202, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 7 drops of CD_3OD): δ 0.61 (s, 3H, CH_3 -18), 0.80 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26

and CH₃-27), 0.85 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 0.95–2.28 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton and CH₂CH₂N-CH₂CH₂), 2.88 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂CH₂NCH₂CH₂CH₂N), 3.26 (br s, 8H, CH₂NCH₂CH₂CH₂N (CH₂CH₂OH)₂), 3.84 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 4.37 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.92 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 7 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.8, 24.2, 27.9, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 50.0, 56.1, 56.6, 75.9, 122.6, 139.5 (carbons in cholesteryl skeleton), 25.7 (H₂NCH₂CH₂CH₂N), 26.4 (CH₂CH₂CH₂N (CH₂CH₂OH)₂), 37.1 (H₂NCH₂CH₂CH₂N), 38.3 (CH₂CH₂CH₂N (CH₂CH₂OH)₂), 44.3 (CH₂CH₂CH₂N (CH₂CH₂OH)₂), 44.5 (H₂NCH₂CH₂CH₂N), 55.2, 55.3, 55.4 (N(CH₂CH₂OH)₂), 156.3 (C=O carbamoyl); MS (ES⁺): *m/z* 632.8 ([*M*+H]⁺, 100%).

3.2.5. Synthesis of lipids library 2

Active carbonate resin **25** (1 equiv) was added excess 1,2-diaminoethane or 1,3-diaminopropane in CH₂Cl₂. The suspension was shaken overnight. The resulting resin was washed with CH₂Cl₂, DMF and CH₂Cl₂ (three times each) to provide the corresponding resin **32**. Amino resin **32** (1 equiv, 1.1 mmol/g) was reacted with a solution of bromoacetic acid (4 equiv) and DIC in DMF (10 mL). The suspension was then shaken for 12 h. The resulting resin was filtered and washed successively with DMF, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂, DMF and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL each) to give the desired resin **33**. The excess of 1,2-diaminoethane or 1,3-diaminopropane in DMF was reacted with the resin **33** for 12 h to give the desired resin **34** after successively washed with DMF, CH₂Cl₂, MeOH, DMF and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL each). The resin **34** was dried under vacuum for 2 h. The resin **34** was reacted with Dde-OH (excess) in CH₂Cl₂ for 12 h. The resin was filtered and washed successively with CH₂Cl₂ and MeOH (3 × 10 mL each) and dried under reduced pressure to give the desired resin **35**. A solution of cholesteryl chloroformate (4 equiv) in CH₂Cl₂ was added to the resin **35** and pyridine (2 mL) added in the reaction mixture. The suspension was shaken overnight. The resulting resin was filtered and washed successively with MeOH and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL each) to afford the desired resin **36**. The Dde protecting groups was removed by treating resin **36** with 5% N₂H₄ in DMF (2 × 30 min). The resin was washed successively with DMF, CH₂Cl₂, MeOH, DMF and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL each) to give the resin **37**.

Resin **37** was treated with 50% TFA in CH₂Cl₂ for 2 h to give symmetric polar head lipids **9–12**. The asymmetric cationic head lipids **13–16**, **17–20** and **21–24** were prepared from resin **37** using the same manner as the synthesis of lipids **3–4**, **5–6** and **7–8**, respectively.

3.2.5.1. 3β-[N-(2'-Aminoethyl)-N-(N-glycine(N-(2-aminoethyl)amide))carbamoyl]cholesterol (9). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 177.0 mg) 46.3 mg, 42%; IR (CH₂Cl₂): *v*_{max} 3346, 2918, 2279, 1675, 1597, 1509, 1413, 1310, 1203, 1124, 1015 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.60 (s, 3H, CH₃-18), 0.794 and 0.797 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.84 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃-21), 0.92 (s, 3H, CH₃-19), 0.92–2.27 (m, 28H, protons in cholesteryl skeleton), 3.04 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂NHCO), 3.11 (br s, 2H, NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 3.45 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂NHCOCH₂N), 3.54 (br s, 2H, NHC-OCH₂NCH₂CH₂NH₂), 3.93 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.37 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.28 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.05–8.40 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.7, 27.8, 28.1, 31.7, 35.7, 36.0, 36.4, 36.7, 38.1, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 76.9, 122.7, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 36.9 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 38.1 (NHC-OCH₂NCH₂CH₂NH₂), 39.1 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 47.5 (NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 51.0 (NHCOCH₂N), 156.0 (C=O carbamoyl), 173.0 (C=O amide); MS (ES⁺): *m/z* 573.2 ([*M*+H]⁺, 100%).

3.2.5.2. 3β-[N-(3'-Aminopropyl)-N-(N-glycine(N-(2-aminoethyl)amide))carbamoyl]cholesterol (10). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 208.0 mg) 69.0 mg, 51%; IR (CH₂Cl₂): *v*_{max} 3428, 2918, 2834, 1674, 1462, 1376, 1202, 1130, 1018 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD): δ 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.816 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.87 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃-21), 0.96 (s, 3H, CH₃-19), 0.96–2.27 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 3.08 (br s, 4H, CH₂CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 3.47 (br s, 4H, CH₂NHCOCH₂NCH₂), 3.84 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.01 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.6, 122.7, 139.3 (carbons in cholesteryl skeleton), 30.0 (NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 37.0 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 38.2 (NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 39.1 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 45.8 (NHCOCH₂NCH₂CH₂), 52.2 (NHCOCH₂N), 156.0 (C=O carbamoyl), 173.0 (C=O amide); MS (ES⁺): *m/z* 587.5 ([*M*+H]⁺, 100%).

3.2.5.3. 3β-[N-(2'-Aminoethyl)-N-(N-glycine(N-(3-aminopropyl)amide))carbamoyl]cholesterol (11). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 142.0 mg) 37.9 mg, 42%; IR (CH₂Cl₂): *v*_{max} 3338, 2918, 2851, 1676, 1594, 1535, 1460, 1202, 1130 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.81 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.87 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, CH₃-21), 0.97 (s, 3H, CH₃-19), 0.97–2.90 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 2.94 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.05 (br s, 2H, NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 3.29 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 3.58 (br s, 2H, NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 3.93 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.38 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.94 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 3 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.6, 122.7, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.7 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 38.3 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂NH₂), 52.4 (NHCOCH₂N), 156.5 (C=O carbamoyl), 172.5 (C=O amide); MS (ES⁺): *m/z* 587.3 ([*M*+H]⁺, 100%).

3.2.5.4. 3β-[N-(3'-Aminopropyl)-N-(N-glycine(N-(3-aminopropyl)amide))carbamoyl]cholesterol (12). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 261.3 mg) 70.9 mg, 41%; IR (CH₂Cl₂): *v*_{max} 3299, 3064, 2935, 1682, 1541, 1468, 1379, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD): δ 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.813 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.86 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 0.95–2.30 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton and CH₂CH₂CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 2.91 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NH₂), 3.27 (br s, 4H, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂), 3.83 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.96 (br s, 6H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.1, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 75.9, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO and CH₂NCH₂CH₂CH₂NH₂), 37.1 (H₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 38.4 (H₂NCH₂CH₂CH₂CH₂NHCO), 47.5 (CH₂NCH₂CH₂CH₂NH₂), 50.5 (NHCOCH₂N), 156.5 (C=O carbamoyl), 171.6 (C=O amide); MS (ES⁺): *m/z* 601.5 ([*M*+H]⁺, 100%).

3.2.5.5. 3β-[N-(N,N,N-Trimethyl)-2'-aminoethyl)-N-(N-glycine(N-(2-aminoethyl)amide))carbamoyl] cholesterol (13). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 192.0 mg) 76.1 mg, 59%; IR (CH₂Cl₂): *v*_{max} 3436, 2934, 1678, 1541, 1468, 1378, 1202, 1131, 1023 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 10 drops of CD₃OD): δ 0.56 (s, 3H, CH₃-18), 0.749 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.80 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃-21), 0.88 (s, 3H, CH₃-19), 0.88–2.20 (m, 28H, protons in cholesteryl skeleton), 3.02–3.08 (m, 11H, H₂NCH₂CH₂

and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$, 3.40 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.50 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.64 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.97 (br s, 2H, NHCOCH_2), 4.36 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.21 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.90–8.10 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 10 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.6, 18.4, 18.9, 20.3, 22.2, 22.5, 23.6, 24.0, 27.7, 27.8, 28.0, 31.6, 35.6, 35.9, 36.3, 36.4, 38.2, 39.3, 39.5, 42.1, 49.8, 55.9, 56.5, 76.5, 122.7, 139.1 (carbons in cholesteryl skeleton), 36.7 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 38.0 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 39.1 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 42.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 50.4 (NHCOCH_2), 53.4 and 53.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 156.1 (C=O carbamoyl), 170.6 (C=O amide); MS (ES^+): m/z 615.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.5.6. 3β -[N -((N,N,N -Trimethyl)-3'-aminopropyl)- N -(N -glycine(N -(2-aminoethyl)amide))carbamoyl] cholesterol (14). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 173.1 mg) 62.7 mg, 52%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3334, 3042, 2930, 2851, 2279, 1677, 1594, 1541, 1462, 1203, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 6 drops of CD_3OD): δ 0.60 (s, 3H, CH_3 -18), 0.795 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.84 (d, J = 5.3 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.93 (s, 3H, CH_3 -19), 0.95–2.27 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.03 and 3.07 (s, 11H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ and $\text{N}(\text{CH}_3)_3$, partially overlapping signal), 3.17 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.44 (br s, 4H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ and $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.91 (br s, 2H, NHCOCH_2N), 4.38 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.28 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.02 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 6 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 27.9, 28.1, 31.7, 35.6, 36.0, 36.4, 36.7, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 76.6, 122.7, 139.1 (carbons in cholesteryl skeleton), 30.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 37.0 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 38.2 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 39.2 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 45.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 52.3 (NHCOCH_2N), 53.3 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 156.1 (C=O carbamoyl), 170.6 (C=O amide); MS (ES^+): m/z 630.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.5.7. 3β -[N -((N,N,N -Trimethyl)-2'-aminoethyl)- N -(N -glycine(N -(3-aminopropyl)amide))carbamoyl] cholesterol (15). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 177.8 mg) 48.4 mg, 39%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3333, 2918, 2840, 1678, 1538, 1509, 1456, 1202, 1121 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 3 drops of CD_3OD): δ 0.62 (s, 3H, CH_3 -18), 0.809 (d, J = 5.8 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.86 (d, J = 4.8 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 0.95–2.80 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.83 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.93, 3.04 and 3.10 (br s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.27 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.58 (br s, 2H, CH_2NHCO), 3.70 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 4.01 (br s, 2H, NHCOCH_2N), 7.99 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 3 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.5, 122.7, 139.3 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 38.3 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ and $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 52.4 (NHCOCH_2N), 53.3 and 53.5 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 156.1 (C=O carbamoyl), 170.6 (C=O amide); MS (ES^+): m/z 629.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.5.8. 3β -[N -((N,N,N -Trimethyl)-3'-aminopropyl)- N -(N -glycine(N -(3-aminopropyl)amide))carbamoyl] cholesterol (16). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 186.1 mg) 61.8 mg, 47%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3313, 3042, 2934, 2274, 1678, 1541, 1468, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD): δ 0.61 (s, 3H, CH_3 -18), 0.80 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.85 (d, J = 6.1 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.94 (s, 3H, CH_3 -19), 0.98–2.30 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 2.90 (br s, 4H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.02, 3.07 and 3.10 (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$, partially overlapping), 3.83 (br s, 4H, CH_2NHCO and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.90 (br s, 2H, NHCOCH_2N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.96 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.9, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4,

39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 75.9, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 37.1 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 38.3 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 38.4 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 47.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 50.9 (NHCOCH_2N), 53.2 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 156.4 (C=O carbamoyl), 171.5 (C=O amide); MS (ES^+): m/z 644.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.5.9. 3β -[N -((N' -Guanidiny-2'-aminoethyl)- N -(N -glycine(N -(2-aminoethyl)amide))carbamoyl]cholesterol (17). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 159.5 mg) 50.5 mg, 47%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3347, 2920, 2850, 2279, 1672, 1597, 1509, 1465, 1311, 1203, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD): δ 0.60 (s, 3H, CH_3 -18), 0.796 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.84 (d, J = 5.8 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.92 (s, 3H, CH_3 -19), 0.93–2.28 (m, 28H, protons in cholesteryl skeleton), 3.02 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.30, 3.35 and 3.43 (br s, 6H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NHCCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 3.93 (br s, 2H, NHCOCH_2N), 4.35 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.27 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.05 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 5 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.0, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 28.1, 31.7, 35.7, 36.0, 36.4, 36.7, 38.1, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.0, 56.5, 76.9, 123.6, 139.3 (carbons in cholesteryl skeleton), 36.9 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 38.5 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 47.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 51.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 156.5 (C=O carbamoyl and C=N guanidine, overlapping), 173.0 (C=O amide); MS (ES^+): m/z 615.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.5.10. 3β -[N -((N' -Guanidiny-3'-aminopropyl)- N -(N -glycine(N -(2-aminoethyl)amide)) carbamoyl]cholesterol (18). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 173.4 mg) 51.4 mg, 43%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3327, 3070, 2918, 2834, 1674, 1574, 1467, 1432, 1202, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 3 drops of CD_3OD): δ 0.63 (s, 3H, CH_3 -18), 0.82 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.87 (d, J = 4.4 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.98 (s, 3H, CH_3 -19), 0.98–2.29 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 3.08 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.20 and 3.30 (br s, 4H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 3.47 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 3.84 (br s, 2H, NHCOCH_2N), 4.40 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.29 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.04 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 3 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.2, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.6, 122.7, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 30.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 37.0 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 38.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 39.1 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 46.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 52.5 (NHCOCH_2N), 156.5 (C=O carbamoyl and C=N guanidine, overlapping), 173.0 (C=O amide); MS (ES^+): m/z 629.4 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.5.11. 3β -[N -((N' -Guanidiny-2'-aminoethyl)- N -(N -glycine(N -(3-aminopropyl)amide)) carbamoyl]cholesterol (19). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 161.7 mg) 36.3 mg, 33%; IR (CH_2Cl_2): ν_{max} 3327, 2918, 1673, 1535, 1462, 1202, 1133 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + 4 drops of CD_3OD): δ 0.61 (s, 3H, CH_3 -18), 0.805 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH_3 -26 and CH_3 -27), 0.85 (d, J = 5.0 Hz, 3H, CH_3 -21), 0.95 (s, 3H, CH_3 -19), 0.95–2.80 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.92 (br s, 2H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 3.26 and 3.33 (br s, 4H, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 3.48 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 3.92 (br s, 2H, NHCOCH_2N), 4.37 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.28 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.99 (br s, 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (CDCl_3 + 4 drops of CD_3OD , 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.1, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.5, 76.2, 122.8, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.8 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 38.2 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$), 52.5 (NHCOCH_2N), 156.1 (C=O carbamoyl and C=N guanidine, overlapping), 170.5 (C=O amide); MS (ES^+): m/z 629.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

3.2.5.12. 3 β -[N-(N'-Guanidiny-3'-aminopropyl)-N-(N-glycine (N-(3-aminopropyl)amide))carbamoyl]cholesterol (20). Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 170.3 mg) 62.1 mg, 52%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3320, 2933, 1678, 1543, 1468, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.82 (d, J = 6.4 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.86 (d, J = 5.9 Hz, 3H, CH₃-21), 0.95 (s, 3H, CH₃-19), 0.95–2.30 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton, H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 2.92 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.22 (br s, 2H, CH₂NHC(NH)NH₂), 3.28 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 3.83 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.91 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.9, 28.1, 31.8, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.3, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 75.9, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 (H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 37.1 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 38.3 (CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 38.4 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 47.5 (CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 50.5 (NHCOCH₂N), 156.5 (C=O carbamoyl and C=N guanidine, overlapping), 171.6 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 643.3 ([M+H]⁺, 100%).

3.2.5.13. 3 β -[N-(N',N'-Di(2''-hydroxyethyl)-2'-aminoethyl)-N-(N-glycine(N-(2-aminoethyl)amide))carbamoyl] cholesterol (21).

Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 185.7 mg) 71.8 mg, 53%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3334, 2933, 2279, 1678, 1541, 1509, 1432, 1203, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.818 and 0.821 (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.86 (d, J = 6.1 Hz, 3H, CH₃-21), 0.93 (s, 3H, CH₃-19), 0.93–2.32 (m, 28H, protons in cholesteryl skeleton), 3.10 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂), 3.37 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.51 (br s, 4H, H₂NCH₂CH₂ and CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.70 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.87 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.99 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.31 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.89 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.0, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.2, 27.7, 27.9, 28.1, 31.7, 35.8, 36.1, 36.4, 36.8, 38.1, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.6, 122.4, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 37.2 (H₂NCH₂CH₂), 38.1 (CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 39.2 (H₂NCH₂CH₂NHCO), 47.5 (CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 50.5 (NHCOCH₂N), 55.3, 55.5 and 55.8 (N(CH₂CH₂OH)₂), 156.2 (C=O carbamoyl), 173.1 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 661.5 ([M+H]⁺, 100%).

3.2.5.14. 3 β -[N-(N',N'-Di(2''-hydroxyethyl)-3'-aminopropyl)-N-(N-glycine(N-(2-aminoethyl)amide))carbamoyl] cholesterol (22).

Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 199.3 mg) 61.6 mg, 42%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3315, 2934, 2840, 2274, 1677, 1541, 1467, 1429, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.60 (s, 3H, CH₃-18), 0.792 (d, J = 5.6 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.85 (d, J = 5.3 Hz, 3H, CH₃-21), 0.94 (s, 3H, CH₃-19), 0.97–2.26 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.05 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂), 3.27 (m, 10H, CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.44 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.84 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.38 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.28 (br s, 1H, H-6-Chol), 8.02 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.5, 19.1, 20.9, 22.4, 22.6, 23.7, 24.1, 27.8, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.6, 76.1, 122.6, 139.4 (carbons in cholesteryl skeleton), 29.9 (CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 37.0 (H₂NC H₂CH₂), 38.2 (CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 39.1 (H₂NCH₂CH₂), 46.0 (CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 52.5 (NHCOCH₂N), 55.4 and 55.6 (N(CH₂CH₂OH)₂), 156.0 (C=O carbamoyl), 171.5 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 675.7 ([M+H]⁺, 100%).

3.2.5.15. 3 β -[N-(N',N'-Di(2''-hydroxyethyl)-2'-aminoethyl)-N-(N-glycine(N-(3-aminopropyl)amide))carbamoyl] cholesterol (23).

Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 177.0 mg) 41.9 mg, 32%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3389, 3081, 2933, 1677, 1467, 1202, 1133 cm⁻¹; ¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD): δ 0.62 (s, 3H, CH₃-18), 0.809 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27), 0.86 (d, J = 5.0 Hz, 3H, CH₃-21), 0.96 (s, 3H, CH₃-19), 0.96–2.28 (m, 30H, protons in cholesteryl skeleton and H₂NCH₂CH₂CH₂), 2.91 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.29 and 3.36 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.50 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.75 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.85 (br s, 2H, CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.92 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.97 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.30 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.89 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 5 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.7, 18.6, 19.1, 20.9, 22.4, 22.7, 23.8, 24.1, 27.9, 28.0, 28.1, 31.7, 35.7, 36.1, 36.4, 36.8, 38.2, 39.4, 39.6, 42.2, 49.9, 56.1, 56.5, 76.2, 122.8, 139.2 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.8 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 38.2 (H₂NCH₂CH₂CH₂ and CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 52.5 (NHCOCH₂N), 55.1 and 55.3 (N(CH₂CH₂OH)₂), 156.1 (C=O carbamoyl), 170.5 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 675.5 ([M+H]⁺, 100%).

3.2.5.16. 3 β -[N-(N',N'-Di(2''-hydroxyethyl)-3'-aminopropyl)-N-(N-glycine(N-(3-aminopropyl)amide))carbamoyl]cholesterol (24).

Yield: (resin: 1.1 mmol/g, 192.6 mg) 65.1 mg, 44%; IR (CH₂Cl₂): $\nu_{\max}$ 3308, 3070, 2934, 1678, 1467, 1202, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD): δ 0.63 (s, 3H, CH₃-18), 0.820 and 0.824 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH₃-26 and CH₃-27, overlapping signal), 0.86 (d, J = 6.1 Hz, 3H, CH₃-21), 0.93 (s, 3H, CH₃-19), 0.93–2.30 (m, 32H, protons in cholesteryl skeleton, H₂NCH₂CH₂CH₂ and NCH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 2.93 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.10 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.29 (br s, 2H, H₂NCH₂CH₂CH₂), 3.57 (br s, 4H, CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂OH)₂), 3.87 (br s, 4H, N(CH₂CH₂OH)₂), 3.99 (br s, 2H, NHCOCH₂N), 4.39 (br s, 1H, H-3-Chol), 5.31 (br s, 1H, H-6-Chol), 7.80 (br s, 3H, NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃ + 4 drops of CD₃OD, 100 MHz): 11.8, 18.6, 19.2, 21.0, 22.4, 22.7, 23.9, 24.2, 27.9, 28.1, 31.8, 35.8, 36.1, 36.5, 36.8, 38.3, 39.4, 39.7, 42.2, 49.9, 56.2, 56.6, 76.0, 122.6, 139.5 (carbons in cholesteryl skeleton), 26.9 (H₂NCH₂CH₂CH₂ and NCH₂CH₂CH₂ N(CH₂CH₂OH)₂), 37.3 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 38.3 (CH₂CH₂CH₂ N(CH₂CH₂OH)₂), 38.4 (H₂NCH₂CH₂CH₂), 50.5 (NHCOCH₂N), 55.4 (N(CH₂CH₂OH)₂), 156.5 (C=O carbamoyl), 171.5 (C=O amide); MS (ES⁺): m/z 689.7 ([M+H]⁺, 100%).

3.2.6. DNA binding affinities

The DNA binding ability of synthesized lipids was performed by gel retardation assay. The DNA/sample complexes 1/20 (w/w) were prepared by transferring 2.4 μ L (10 μ g/ μ L) of sample to an Eppendorf tube. Each sample was further diluted with 3 μ L of PBS (phosphate-buffered saline) buffer. An aqueous solution of plasmid DNA (4 μ L, 0.3 μ g/ μ L) was added to each sample and the solutions were successively mixed by inverting several times. The DNA complexes were incubated at 25 °C for 30 min. Bromophenol blue-free gel-loading buffer (3 μ L, 2 $\times$ 40% w/v sucrose in water) was added to the complexes. The solutions were mixed by inverting each tube and each sample (10 μ L) was loaded onto a 1.0% agarose gel (0.5 $\times$ TBE buffer). The gel was run at 135 V for 5 min and 50 V for 2 h at 400 mA. DNA bands were visualized by ethidium bromide staining.

3.2.7. Liposome preparation

Dioleoyl- α -phosphatidylethanolamine (DOPE) (Sigma) (1 μ L, 50 μ g/ μ L in CH₂Cl₂) and cationic lipid (2 μ L, 50 μ g/ μ L in abs. ethanol) were mixed (weight ratio 1:2). The organic solvents were evaporated under a stream of nitrogen and further dried under high vacuum (>2 h). The resulting thin film was hydrated with phosphate-buffer saline (PBS, pH 7.4, 100 μ L) at room temperature for 1 h. The mixture was vortexed for one minute and sonicated (2 $\times$ 15 min) with 1 h rest between sonications using a bath-type sonicator. The liposomes were stored at 4 °C for 24 h prior to use. The liposome without DOPE was prepared as the same manner for DOPE-contained liposome excepted DOPE was not incubated.

3.2.8. Transfection procedure

Human embryonic kidney cells (HEK293), colorectal adenocarcinoma (COLO 205), canine osteosarcoma (D-17), human cervical adenocarcinoma (HeLa) and human prostate adenocarcinoma (PC3) were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 mg/mL) and L-glutamine (4 mM) at 37 °C, 5% CO₂. For transfection, the cells were seeded up to 1×10^4 cells/well in a 96-well plate, to give 50–70% confluence to be used on the next day. The growth medium was removed and the cells were washed with PBS and replaced with 100 µL of fresh serum-free DMEM medium. DNA (pCH110-encoding β -galactosidase)/cationic liposome complexes (lipoplexes) were prepared as follows. An appropriate volume of each cationic liposome (1 µg/µL) was added to the plasmid DNA (0.4 µL, 0.5 µg/µL) and the complex was incubated at room temperature for 30 min before being diluted with phosphate-buffered saline to make a final DNA concentration of 0.1 mg/mL. The lipoplexes (10 µL) were then added to the cells and left to be incubated at 37 °C, 5% CO₂. The cells were then washed with PBS and fresh growth medium was added and further incubated for 48 h. For Effectene™ transfection, the method was carried out according to the manufacturer's instruction and the same ratios of plasmid DNA:Effectene™ were used. After transfection, the β -galactosidase activity per well was estimated by adding 100 µL of substrate solution (4 mg/mL of o-nitrophenyl-galactopyranoside (ONPG),³³ 0.2 M sodium phosphate (pH 7.3) and 2 mM magnesium chloride) to the lysate in a 96-well plate. Absorbance of the product *ortho*-nitrophenol at 405 nm was converted to % relative transfection by compared with positive control, Effectene™.

3.2.9. Transfection cytotoxicity

Cytotoxicities of the lipids **4**, **7**, **8**, **9**, **10**, **12**, **13** and **25** were assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay as described previously.³⁴ The experiment was performed in 96-well plates. The amount of cationic liposome and commercially available transfection agents, Effectene™, DOTAP and DC-Chol, per well was used the same as that used in the transfection experiments. After 24 h. incubation, the medium was removed and replaced with a phenol red-free medium (90 µL). MTT (3 mg/mL) was added (10 µL/well) to the cells, followed by MTT solubilization solution (Sigma) (100 µL) to dissolve the resulting crystals, and the absorbance was measured at 520 nm on a microplate reader. The change in metabolic activity was calculated as A_{520} with compound/ A_{520} without compound.

3.2.10. Electron microscopy

The liposomes or their lipoplexes solution (10–20 µL) was dropped on the formvar grid and left it stands at room temperature for 1 min. The water was removed by touching the edge of the droplet to the edge of a filter paper, leaving the thin aqueous film on the grid. 1% Potassium phosphotungstate (PTA) (10 µL) was applied to the grid and left it stands for 1 min. The extra solution was similarly removed by touching to the edge of a filter paper. The negative stain liposomes were allowed to dry at room temperature for 1 night by placing onto a filter paper in a covered Petri dish. The

samples were observed under transmission electron microscope operated at 200 kV.

Acknowledgments

This work was supported by the Commission on Higher Education, Ministry of Education and The Thailand Research Fund (TRF) (RMU5080039). Partial support from the Strategic Basic Research Grant of TRF is gratefully acknowledged. W.R. acknowledges the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for scholarship. We are grateful to Dr. Ek Saengvichien for providing gel electrophoresis apparatus.

References and notes

- Singh, M.; Parikh, V.; Sharma, A. *Drugs Future* **1997**, *22*, 995.
- Mountain, A. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 119.
- Zhang, Y.; Yu, L.-C. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 506.
- Lui, D.; Knapp, J. E. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2001**, *3*, 192.
- Uchida, M.; Li, X. W.; Mertens, P.; Alpar, H. O. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 754.
- Knutson, J. C.; Yee, D. *Anal. Biochem.* **1987**, *164*, 44.
- Newman, C. M.; Lawrie, A.; Briskin, A. F.; Cumberland, D. C. *Echocardiography* **2001**, *18*, 339.
- Wang, D.; Robinson, D. R.; Kwon, G. S.; Samuel, J. J. *Controlled Release* **1999**, *57*, 9.
- Rigby, P. G. *Nature* **1969**, *221*, 968.
- Schenborn, E. T.; Goiffon, V. *Methods Mol. Biol.* **2000**, *130*, 135.
- Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 7413.
- Lynn, D. M.; Anderson, D. G.; Putnam, D.; Langer, R. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8155.
- Tang, M. X.; Redemann, C. T.; Szoka, F. C., Jr. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 703.
- Templeton, N. S. *Bioscience Rep.* **2002**, *22*, 283.
- Ghosh, Y. K.; Indi, S. S.; Bhattacharya, S. J. *Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10257.
- Caracciolo, G.; Caminiti, R. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *400*, 314.
- Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18997.
- Xu, Y.; Szoka, F. C. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616.
- Farhood, H.; Serbina, N.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 289.
- (a) Kearns, M. D.; Donkor, A.-M.; Savva, M. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 128; (b) Ghosh, Y. K.; Visweswariah, S. S.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 378; (c) Bajaj, A.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1537.
- Yeagle, P. L. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *822*, 267.
- Moradpour, D.; Schauer, J. I.; Zurawski, V. R.; Wands, J. R.; Boutin, R. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *221*, 82.
- Vigneron, J. P.; Oudrhiri, N.; Fauquet, L.; Vergely, L.; Bradley, J. C.; Basseville, M.; Lehn, P.; Lehn, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 9682.
- Lee, E. R.; Marshall, J.; Siegel, C. S.; Jiang, C.; Yew, N. S.; Nichols, M. R.; Nietupski, J. B.; Ziegler, R. J.; Lane, M. B.; Wang, K. X.; Wan, N. C.; Scheule, R. K.; Harris, D. J.; Smith, A. E.; Chen, S. H. *Hum. Gene Ther.* **1996**, *7*, 1701.
- Yingyongnarongkul, B.; Apiratikul, N.; Aroonrerk, N.; Suksamrarn, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5870.
- Nash, I. A.; Bycroft, B. W.; Chan, W. C. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2625.
- Yingyongnarongkul, B.; Howarth, M.; Elliott, T.; Bradley, M. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 463.
- Banerjee, R.; Das, P. K.; Srilakshmi, G. V.; Chaudhuri, A. J. *Med. Chem.* **1999**, *42*, 4292.
- Bennett, M. J.; Malone, R. W.; Nantz, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2207.
- Hui, S. W.; Langner, M.; Zhao, Y.-L.; Ross, P.; Hurley, E.; Chan, K. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 590.
- Wirth, T. H.; Davidson, N. J. *Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4325.
- Kaiser, E.; Colescot, R. L.; Bossing, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- Karmali, P. P.; Majeti, B. K.; Sreedhar, B.; Chaudhuri, A. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 159.
- Yingyongnarongkul, B.; Radchatawedchakoon, W.; Krajarng, A.; Watanapokasin, R.; Suksamrarn, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 176.

High Transfection Efficiency of Novel Cationic Lipids with Asymmetric Acyl-Cholesteryl Hydrophobic Tails

Widchaya Radchatawedchakoon^[a], Aungkana Krajarng^[b], Nattisa Niyomtham^[a], Ramida Watanapokasin^[b], Boon-ek Yingyongnarongkul^{[a],*}

^[a]*Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand*

^[b]*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Wadhana, Bangkok 10110, Thailand*

*Corresponding author. Tel.: +66 2 3190931; fax: +66 2 3191900

E-mail address: boonek@ru.ac.th, gmboonek@hotmail.com (B. Yingyongnarongkul)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.2010xxxxx>.

Abstract

The ability of non-viral gene delivery system to overcome extracellular and intracellular barriers is a critical issue for the future clinical applications of gene therapy. In recent years much effort has been focused on the development of a variety of DNA carriers, and cationic liposomes have become the most common non-viral gene delivery system. One hundred and eighty novel cationic lipids with asymmetric acyl-cholesteryl hydrophobic tails were synthesized by parallel solid phase chemistry. The liposomes were prepared and gel retardation assay was used to study the binding efficiency between the prepared liposome and the DNA. Transfection efficiencies of the lipids were evaluated against various mammalian cells, HEK293, HeLa, D17, COLO 205 and PC3 cells. The lipids with acyl portion at the terminal part of the polyamine backbone exhibited high transfection efficiency than those with the acyl portion at the internal part of the backbone. These compounds also showed higher transfection efficiency and low cytotoxicity as compared with the commercially available agents, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol. The morphologies of liposomes and lipoplexes were observed under transmission electron microscopy (TEM).

Keywords: Cationic lipid; Liposome; Non-viral vector; DNA delivery; Asymmetric hydrophobic tail; Solid phase synthesis

Introduction

Over the past two decades, the progressive of gene delivery has been interested by many researchers. This approach is a new hope for treating of both genetic and acquired disease that offers promise for tomorrow's medicine.^[1] In this process, the corrected exogenous genes or portions of a gene are introduced into target cells. The major challenge of the use of gene therapy is to deliver the desired gene efficiently with the least toxicity and low immunogenicity. Viral vectors are the most efficient carrier to deliver DNA into cells.^[1] Due to the toxicity, strong immunogenicity, and limitation to carry small DNA of this type of vectors, various researchers are trying to develop different kinds of non-viral vectors^[2-6] for efficient gene delivery. Among these methods, cationic lipids have shown to be the most promise for in vivo applications, based on a combination of efficiency, stability and lack of toxicity. Since the first application of cationic lipids in DNA delivery,^[7] numerous cationic lipids have been synthesized.^[4]

While there are no absolute features for the structure of cationic lipids, cationic lipids are composed of three main parts, a cationic head, a hydrophobic tail and a linker that join hydrophilic head and hydrophobic tail. The polar head group is generally one or more cationic head consisting of guanidinium^[8-10] or an amine^[11-13] (primary, secondary, tertiary or quaternary). Linker represents any chemical part between hydrophilic head and hydrophobic tail; it is usually a biodegradable chemical bond^[8-13] (ester, amide or carbamoyl) or a nondegradable ether bond.^[14,15] Hydrophobic tail represents the nonpolar hydrocarbon which can be grouped into two categories, hydrocarbon and steroid. Most of the synthesized lipids contained double-chain hydrocarbon both saturated and unsaturated chains.^[7,13,16] Cholesterol is the most frequently used as a steroidal tail, some of which bearing two cholesterol tails (Figure 1).^[17,18] Cationic lipids with cholic acid and analogues as a hydrophobic tail have also been reported.^[9]

In the present work, a library of 180 cationic lipids bearing the combination of various hydrocarbon chains and cholesterol as a hydrophobic tail were synthesized and evaluated for their transfection efficiency (Figure 2). Combinatorial solid phase synthesis was used to synthesize these lipids since this allows highly efficient production and purification of diverse libraries of compounds in the search of new therapeutic agents^[19] as well as cationic lipids.^[9,10,16] The synthesized lipids were evaluated for their transfection efficiency onto different cells including human embryonic kidney cells (HEK293), colorectal adenocarcinoma (COLO 205), canine osteosarcoma (D-17), human cervical adenocarcinoma (HeLa) and human prostate adenocarcinoma (PC3).

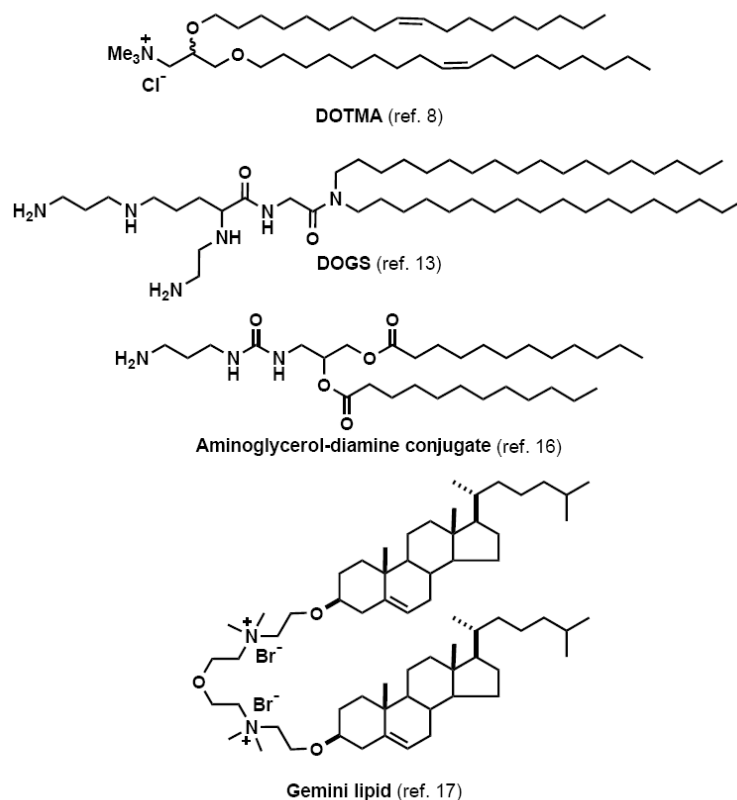


Figure 1. Cationic lipids with symmetric hydrophobic tails.

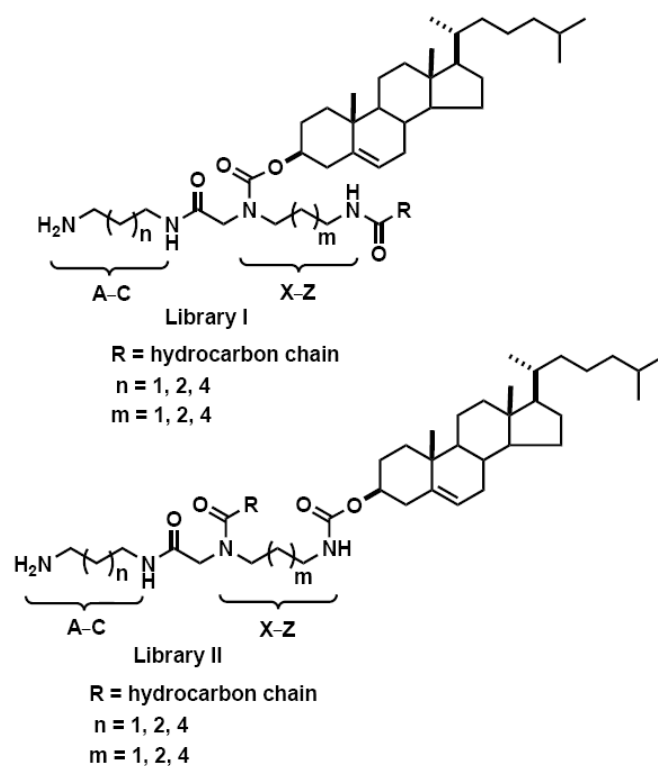
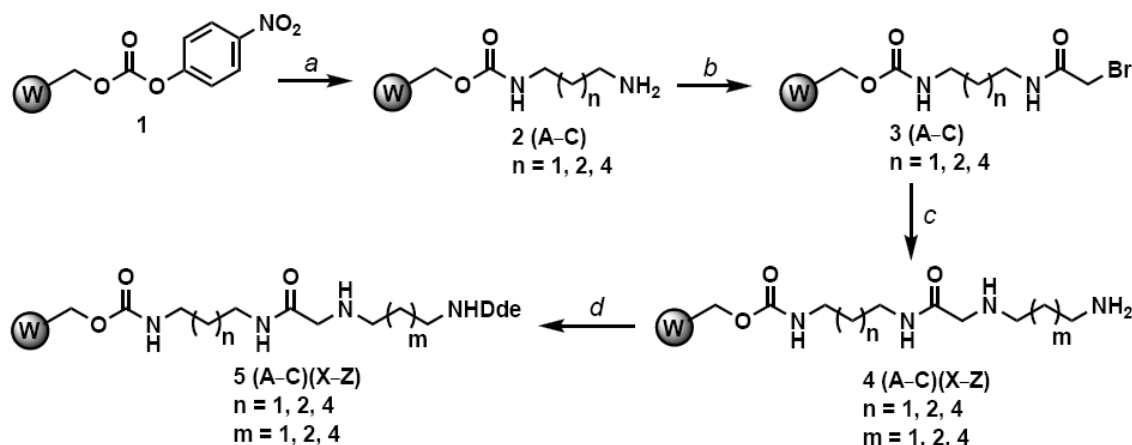


Figure 2. The structures of novel cationic lipids with asymmetric cholesterol-fatty acid tails.

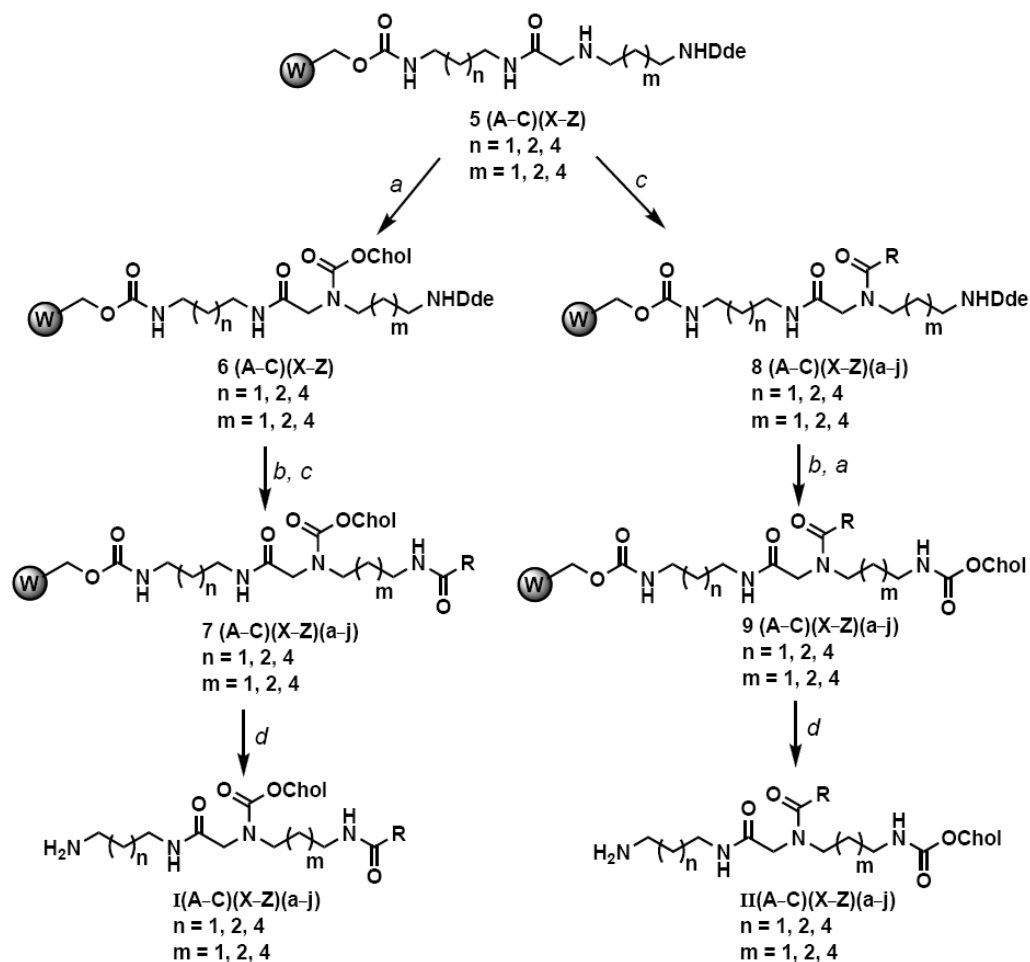
Results and Discussion

Synthesis

The key scaffold-bound resin **5(A-C)(X-Z)** was prepared from active carbonate resin **1**^[16,20] following the synthetic pathway shown in Scheme 1. Thus, the resin **1** was reacted with diamines (**A-C**, Figure 3) to generate the resin **2(A-C)** which was further coupled with bromoacetic acid using diisopropylcarbodiimide (DIC) as a coupling agent to furnish the resin **3(A-C)**. The completion of reaction was monitored by Kaiser test.^[21] The bromo group on the resin **3** was replaced by diamines (**X-Z**) to obtain the resin **4(A-C)(X-Z)**. To allow the different kind of hydrophobic tail attached to the scaffold resin, selective protection and deprotection of different amino group was needed. Dde protecting group was chosen since it selectively reacted with primary amine and was removed using mild condition.^[22] Thus, the resin **4(A-C)(X-Z)** was treated with Dde-OH to generate the key resin **5(A-C)(X-Z)**. Having the key scaffold resin **5(A-C)(X-Z)** in hand, the cationic lipids with asymmetric tails were ready to be synthesized. The secondary amine of the resin **5(A-C)(X-Z)** was reacted with cholesteryl chloroformate to give the resin **6(A-C)(X-Z)**. The Dde protecting group was removed by treatment with 5% N_2H_4 in DMF and the free primary amine was subsequently capped with a wide range of fatty acids (**a-j**) using DIC as a coupling agent in order to generate the corresponding resin **7(A-C)(X-Z)(a-j)**. The final compounds (**I(A-C)(X-Z)(a-j)**) were obtained by treating the resin **7(A-C)(X-Z)(a-j)** with 50%TFA in CH_2Cl_2 . The cationic lipids library II were also synthesized by the scaffold resin **5(A-C)(X-Z)** (Scheme 2). Thus, the fatty acids (**a-j**) were coupled to the free secondary amine to give the resin **8(A-C)(X-Z)(a-j)**. The Dde protecting group was removed and the free primary amine was attached to the cholesterol tail. The final compounds (**II(A-C)(X-Z)(a-j)**) were obtained by treating the resin **9(A-C)(X-Z)(a-j)** with 50%TFA in CH_2Cl_2 . All synthesized cationic lipids were obtained in moderate to good yields. The structures of these lipids were established by spectroscopic means.



Scheme 1. *Reagents and conditions.* a) diamines **A-C** (excess) (see Figure 3), CH_2Cl_2 , 6 h; b) bromoacetic acid (4 equiv), DIC (4 equiv), DMF/ CH_2Cl_2 , 12 h; c) diamines **X-Z** (excess) (see Figure 3), CH_2Cl_2 , 12 h; d) Dde-OH (excess), DMF/ CH_2Cl_2 , 12 h.



Scheme 2. *Reagents and conditions.* a) Cholesteryl chloroformate (4 equiv), pyridine (20 equiv), CH₂Cl₂, 12 h.; b) 5% N₂H₄/DMF, 2×30 min; c) Fatty acid (4 equiv, see Figure 3), DIC (4 equiv), CH₂Cl₂, 12 h.; d) 20% TFA/CH₂Cl₂, 2 h.

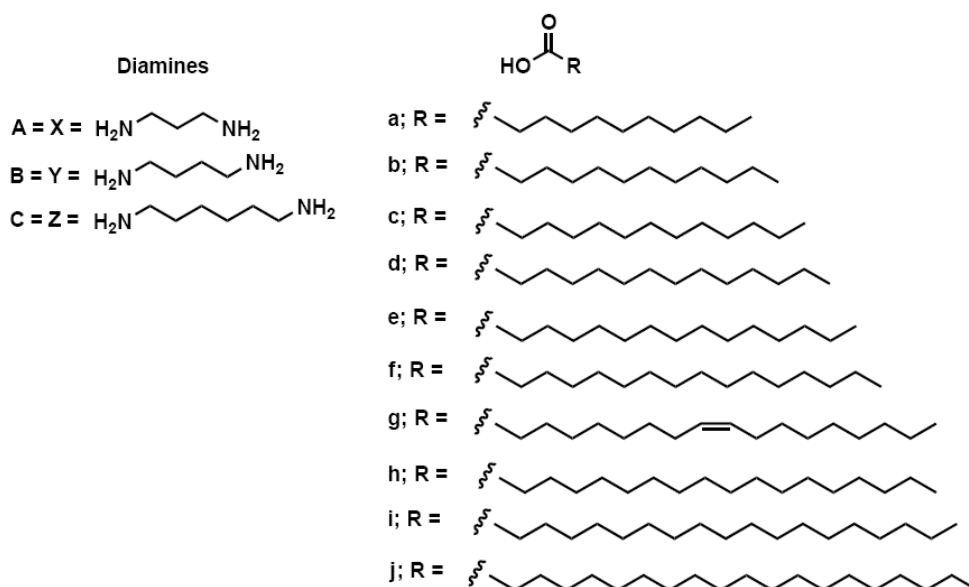


Figure 3. The structures of diamines and fatty acids used in Scheme 2.

DNA Binding Affinity

Gel retardation assay was performed to characterize the electrostatic binding interactions between the plasmid DNA and liposome.^[16] Cationic liposomes were mixed with plasmid DNA, known as lipoplex, at weight ratios of 1:20 (DNA/sample) and the lipoplexes were loaded on agarose gel (Figure 4). The results indicated that most of lipids from library I, which acyl tail located at the terminal part of the polyamine backbone, interacted sufficiently with DNA to retard migration through the gel matrix. The spacers between cationic head and linker (amines A–C) and the length between the acyl and cholesteryl tails (amines X–Z, Figure 2) exerted influence for cationic lipids on binding with DNA. Thus, most of the lipids with three and six carbons spacer cationic head (A and C) with any length of spacer (X–Z) did not seem to bind to DNA to retard migration. Lipids with four carbons spacer head (B) and three and four carbons spacer between tails were able to retard plasmid DNA from the well whereas lipids with six carbons spacer between tails partially bound to DNA. It was interesting to note that lipids library II containing terminal cholesterol tail did not bind to DNA.

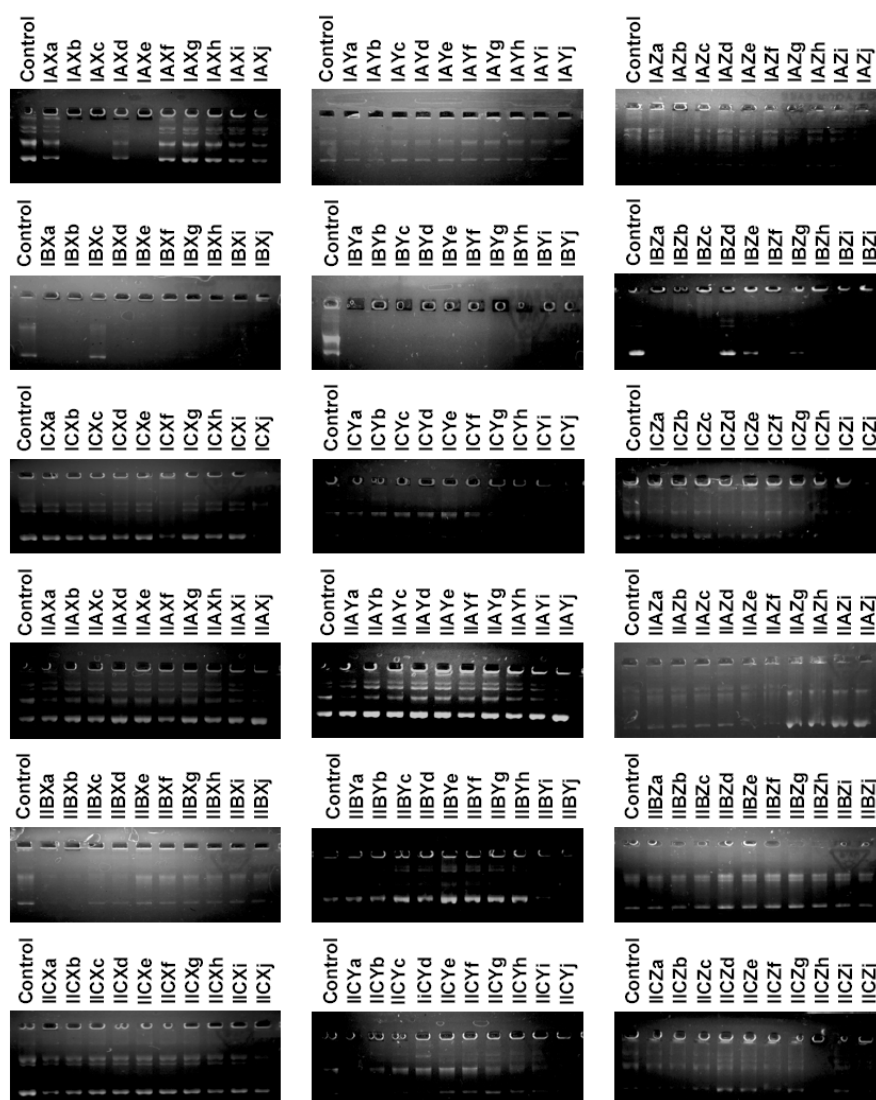


Figure 4. Gel retardation assay of DNA/cationic lipids complexes at a weight ratio of 1:20. Lanes marked “Control” contained DNA alone and was used as a control. The presence of a lower band indicated that DNA has migrated and has not been bound by the transfection compound.

Transfection Biology

Transfection Screening

All the synthesized cationic lipids were tested for transfection efficiency against HEK293 (Human embryonic kidney cell lines) using β -galactosidase as a reporter gene. The liposome formation both with and without DOPE was used in the preliminary transfection screening. The lipoplexes were prepared at DNA/liposome ratio (or N/P ratio) of 1:20 (w/w) using plasmid DNA at 0.1 μ g/well. In the case of liposome formation with DOPE, cationic lipid/DOPE ratio was 2:1 (w/w). The results shown in Figure 5 indicated that eight lipids in library I, **IAXc**, **IAXe**, **IAYd**, **IAZc**, **IBYd**, **IBYg**, **IBZh**, and **IBZj**, exhibited relative transfection efficiency over 100% as compared with EffecteneTM transfection (100%). Only the lipids in library I bearing acyl tail at the terminal part of the polyamine scaffold and liposome formation with the helper lipid, DOPE, exhibited high transfection efficiency. The result was in agreement with binding assay, since most of the lipids which exhibited higher transfection efficiency than EffecteneTM completely bound to DNA, except the lipids **IAYd** and **IAZc**. From the screening results, the lipids which exhibited higher transfection efficiency than that of the positive control were subjected to further optimization.

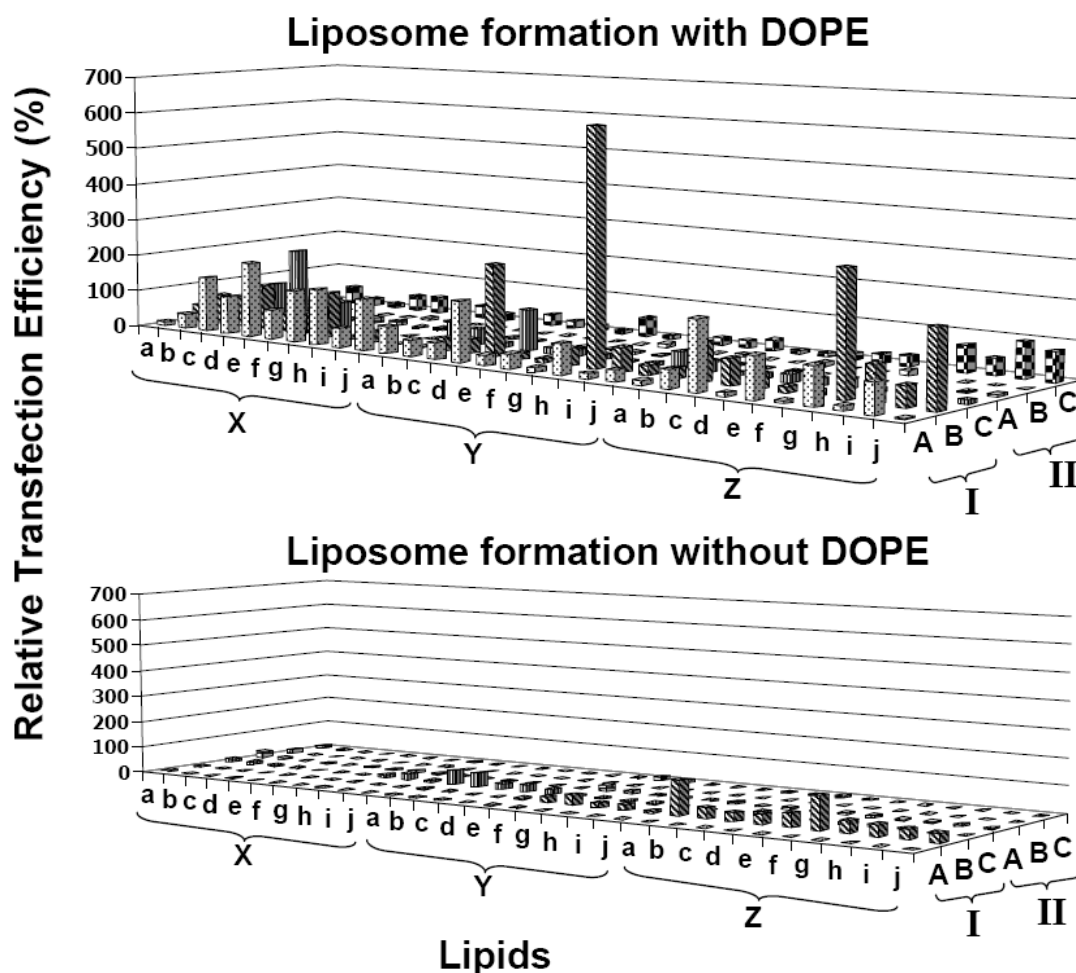


Figure 5. Transfection screening activity of synthesized cationic lipids employing pCH110-encoding β -galactosidase (0.1 μ g/well). The liposome formation was both with and without DOPE. The lipoplexes was used at DNA/lipids (w/w) ratios of 1:20. The transfection efficiencies of the lipids were compared to that of commercially available reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

Transfection optimization

To find out the optimal formulation of these lipids for highest transfection efficiency, the lipids/DOPE ratios, DNA/lipids ratios, and the amount of DNA per well were studied. The helper lipid such as DOPE has been known to increase transfection efficiency in lipid mediated gene transfer applications.^[23] To evaluate optimal liposome formulation, three lipids/DOPE weight ratios of 2:1, 1:1 and 1:2 were prepared. Each formulation was mixed with DNA to produce N/P weight ratio of 1:20 using 0.1 µg of DNA per well. The results shown in Figure 6 indicated that helper lipid has significant effect on lipids **IAXc** and **IBYd** to exhibit high transfection efficiency. The optimization lipid/DOPE ratios for **IAXc** and **IBYd** are 1:2 and 1:1, respectively. The transfection efficiency of lipid **IBYd** slightly reduced when the ratio of lipid/DOPE ratio decreased. However, the activity of this lipid was almost lost when liposome was prepared at high lipid/DOPE ratio.

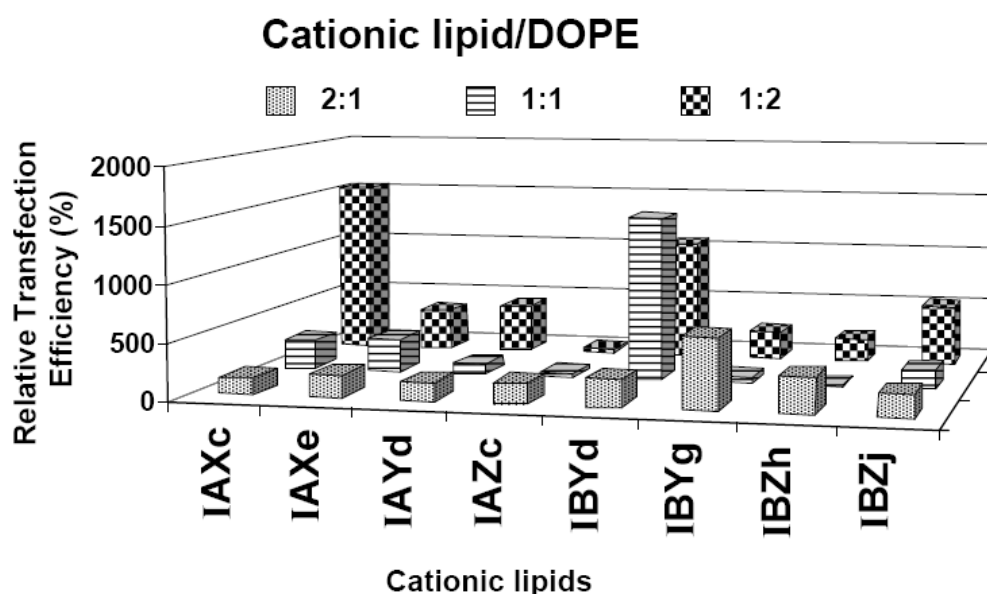


Figure 6. Transfection efficiency of the selected lipids against HEK293 cells across the cationic lipid/DOPE weight ratio of 2:1, 1:1 and 1:2. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

Transfection efficiency of cationic liposome was also depends on N/P ratio.^[16,18,24] To find out the optimal ratio of each lipid, transfection experiments were performed against HEK293 cells using optimal lipid/DOPE ratio of each compound as shown in Figure 6. The optimal N/P ratios are shown in Figure 7. Formulations based on **IAXc**, **IAYd** and **IBYd** were found to be more effective as compared to **IAXe**, **IAZc**, **IBYg**, **IBZh** and **IBZj**. At N/P ratio of 1:40, the liposome **IBYd** exhibited relative transfection efficiency approximately 20 times higher than EffecteneTM. Transfection efficiency of this lipid decreased when N/P ratio increased. In contrast to the lipid **IBYd**, formulations based on **IAXc** and **IAYd** exhibited high transfection efficiency at high N/P ratio. The liposomes **IAXe**, **IAZc**, **IBYg** and **IBZj** showed the highest transfection efficiency at the N/P ratio of 1:20.

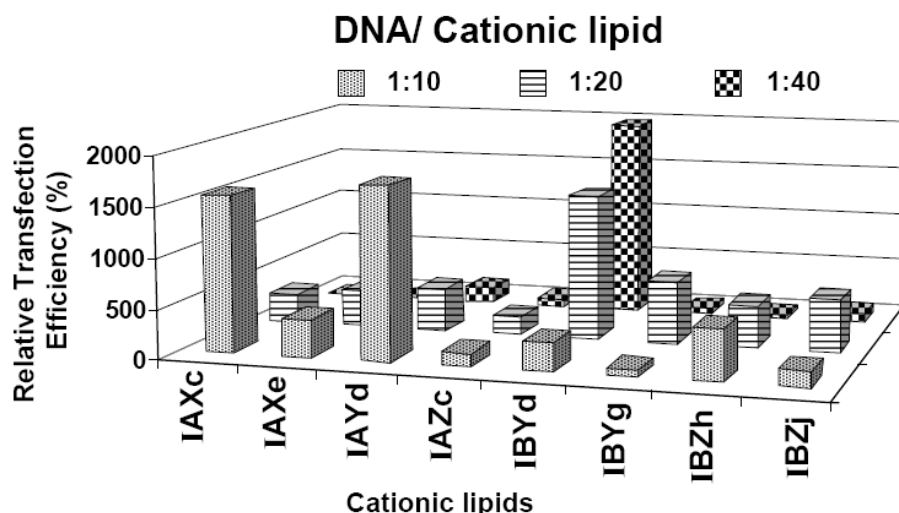


Figure 7. Transfection efficiency of the selected lipids against HEK293 cells across the DNA/cationic lipid weight ratios of 1:10, 1:20 and 1:40 (w/w). The optimal liposome formation of each lipid from Figure 6 was used as described in the text. Transfection efficiency of the selected lipids was compared to that of the commercial reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

To see whether variation in the amount of DNA affected the transfection efficiency of these lipids, the experiments were performed using the optimal lipid/DOPE (Figure 6) and DNA/lipid (Figure 7) ratios. The amounts of DNA used in this experiment varied from 0.1, 0.2 and 0.4 µg per well. The transfection efficiency of each lipid is shown in Figure 8. The amount of DNA used for the formulation based on the lipid **IAYd** has no effect for transfection efficiency. In contrast, the efficiency of the lipids **IBYg** and **IBZh** decreased when the amount of DNA increased. The optimal amount of DNA for the lipids **IBYd** and **IBZj** to reach high efficiency was 0.2 µg per well.

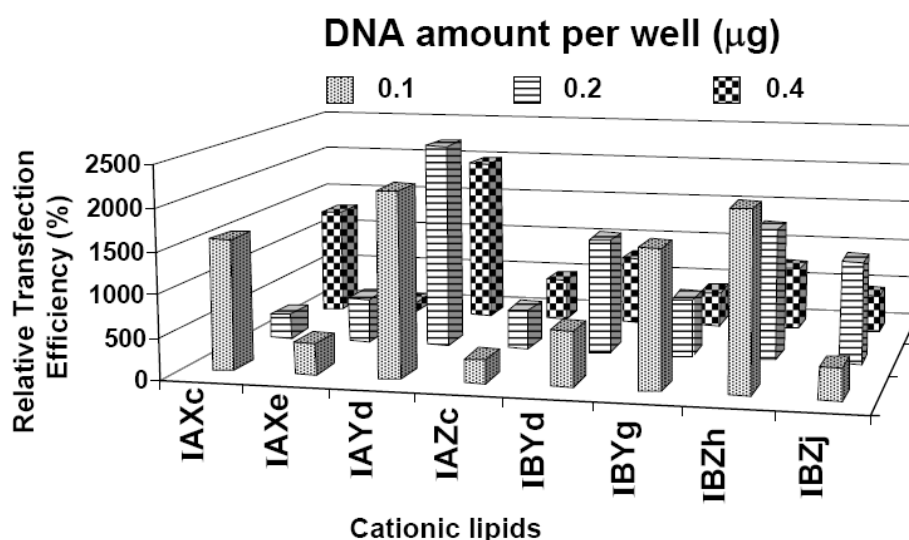


Figure 8. Effect of DNA amount for gene delivery. The optimal liposome formation (Figure 6) and DNA/lipids complex (Figure 7) of each lipid were used to mix with various amount of DNA from 0.1 to 0.4 µg. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, Effectene™, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

One of the major drawbacks of cationic lipids for their *in vivo* use is the inhibition of the transfection efficiency of cationic liposomes in the presence of serum. Most of cationic lipids which exhibited high transfection activity in the absence of serum lost their efficiency when transfected in the presence of serum.^[15,17] The effect of serum on transfection activity of these lipids is shown in Figure 9. The result indicated that formulation based on the lipids **IAXc**, **IAYd**, **IBYg**, **IBZh** and **IBZj** dramatically reduced their transfection efficiency when the experiment performed in the presence of 10% serum. Further increase in the percentage of serum (20 and 40%) has no effect on transfection activity of these lipids. Transfection efficiency of the liposomes **IAZc** and **IBYd** was not reduced when the experiment was carried out in 10% serum.

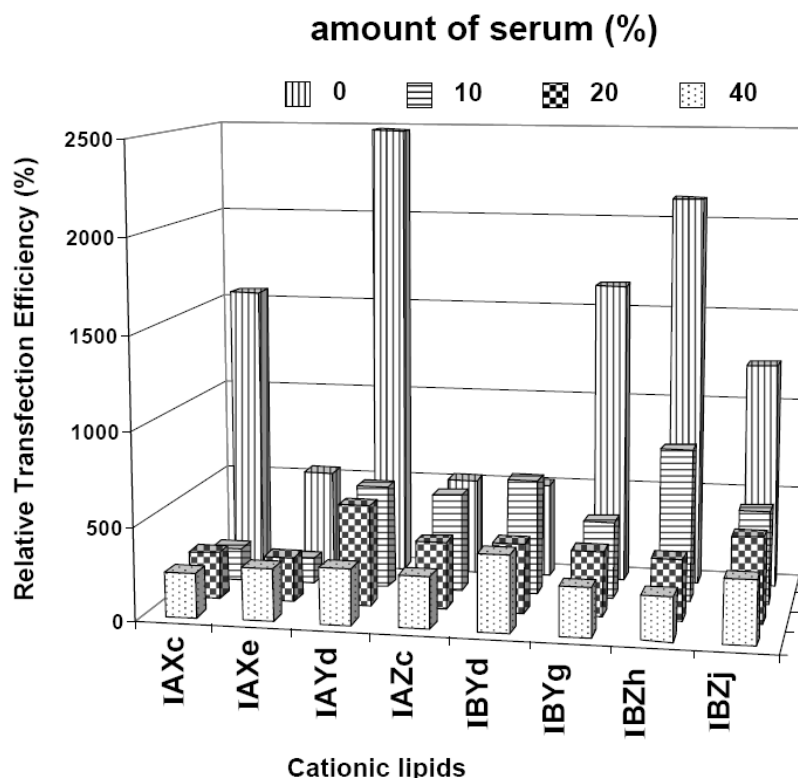


Figure 9. Effect of serum for transfection efficiency. The optimal liposome formation (Figure 6), DNA/cationic lipid (Figure 7) and amount of DNA per well (Figure 8) of each lipid were used to transfer gene to HEK293 cell at various amount of serum. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

Transfection efficiency toward different cell lines

It is well known that transfection agents have the ability to specifically deliver DNA into different cell types. To evaluate the transfection efficiency of these lipids toward the different mammalian cell lines, HEK293, COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cells, the experiments were performed using optimum condition under serum-free condition. The transfection efficiency of these compounds was compared with the commercially available transfection agents, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol. The transfection efficiencies of different liposome formulations and commercially available agents against HEK293, COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cells is shown in Figure 10. It was clearly shown that the synthesized lipids exhibited higher transfection efficiency than that of the commercial agents against PC3 and HEK293 cells. Formulation based on the lipids **IAXc**, **IAXe**, **IAYd**, **IBYg** and **IBZh** were found to be over 25-fold more efficient to deliver DNA into PC3 cells than the commercially available

agents. The least active formulations, **IAZc**, **IBYd** and **IBZj** were 10- to 13-fold higher transfection efficiency against PC3 cells than EffecteneTM.

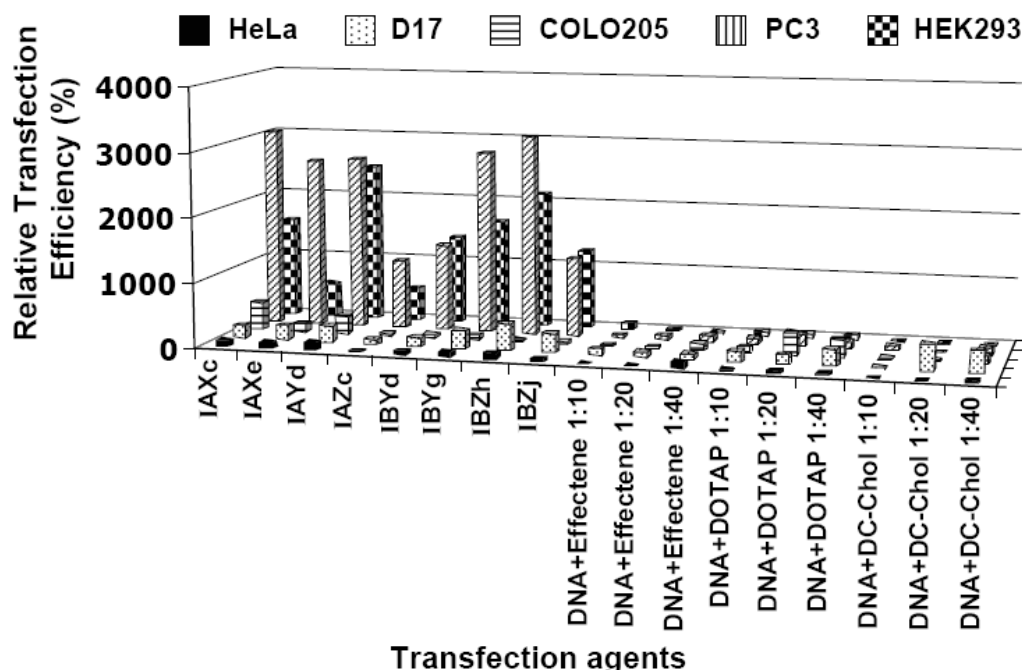


Figure 10. Transfection efficiency of selected lipids toward COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cell using optimum conditions from Figures 6-8. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol. Transfection efficiency of EffecteneTM for each cell line was calculated as 100%.

Transfection toxicity

Cytotoxicity of synthesized cationic lipids is very important for gene delivery. To assess the relationship between cytotoxicity and transfection efficiency, the toxicity of the synthesized lipids on HEK293, COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cell lines using optimal conditions (Figures 6–8) were determined by measuring changes in cell metabolic activity (MTT assay). The % cell viability of the synthesized lipids and the commercial agents as compared to the control cells in the presence of DNA is shown in Figure 11. Most of the tested lipids which exhibited high transfection efficiency were found to be nontoxic to PC3 cells having cell viability over 80%. Less than 60% cell viability was observed with the lipid **IAXc** against all tested cells. The result was in contrast to our finding that the formulation based on the lipid **IAXc** exhibited exceptionally high transfection efficiency of 3000% against PC3 cells. All the tested lipids showed cell viability less than 70% against HEK293 cells. These results were also in contrast to the high transfection efficiency of these lipids. All the mentioned commercial agents were slightly more toxic than the tested lipids in the MTT assay. It is thus concluded that most of the tested lipids can produce high levels of transfection without inducing significant cell death, although there is a reduction in metabolic activity.

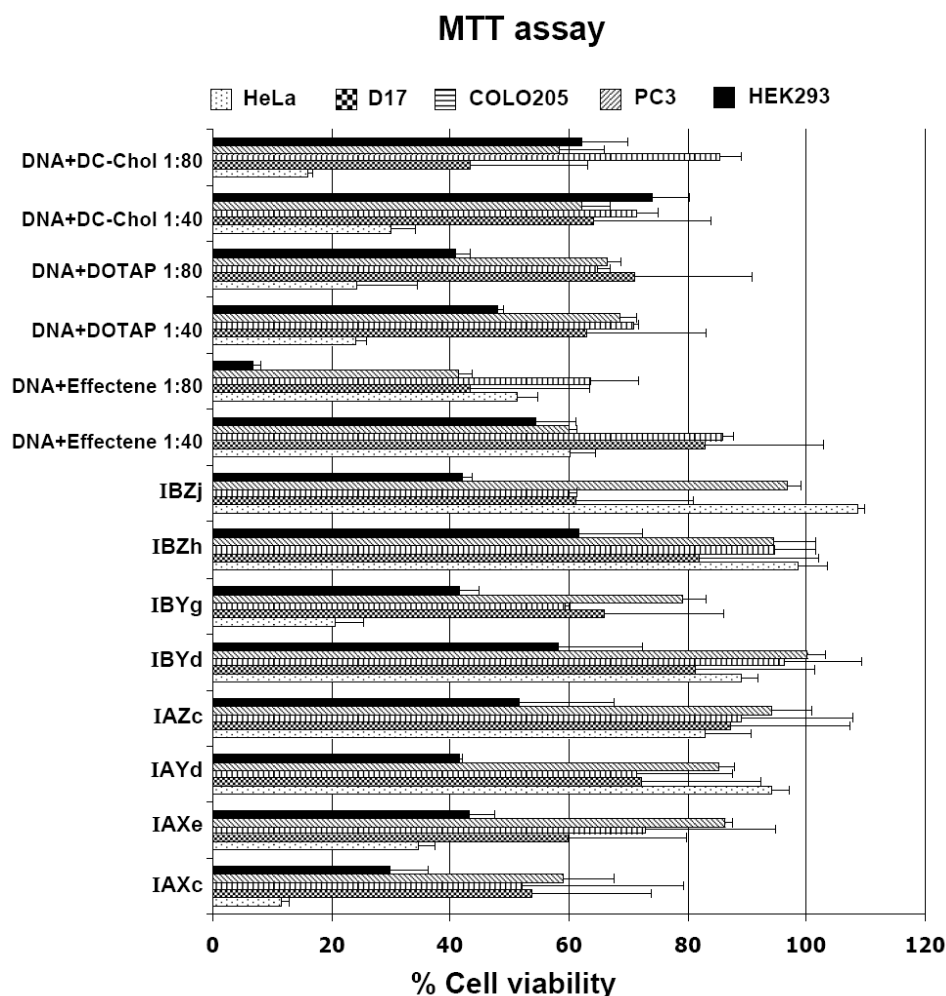


Figure 11. Effect of transfection synthesized lipids on cell metabolic activity. Liposomes of cationic lipid with helper lipid, DOPE, were formed and added to DNA to form lipoplexes. These complexes were added to HEK293, COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cell. Cell metabolic activity was determined by a MTT assay.

Transmission electron microscopy (TEM)

Characterization of the morphologies of the liposomes and lipoplexes from the synthesized cationic lipids, which were used to study transfection optimization, was observed under transmission electron microscopy (TEM) after negative staining. The result gives a better understanding of the molecular assembly of DNA and liposome. Thus, it should help to establish correlations with their biological activity. The liposome of each lipid was prepared at its optimal lipid/DOPE ratio. The morphology of liposome is shown in Figure 12. The morphologies of the liposome based on the formulation of the lipids **IAXc**, **IAXe** and **IAYd** were found to be intermediated-sized unilamellar vesicles (IUVs) having diameter of 50–100 nm. Multilamellar vesicles (MLVs) were observed from the liposomes **IAZc**, **IBYd**, **IBYg**, **IBZh** and **IBZj** with diameter range 100–150 nm. Morphology of liposomes/DNA complexes (lipoplexes) was also visualized under transmission electron microscopy as shown in Figure 13. Most of the lipoplexes were found to be large spherical aggregates which the sizes are within the range 300–700 nm. In this study, the sizes of the lipoplexes prepared from these lipids are unlikely to play important role in modulating for transfection efficiency.

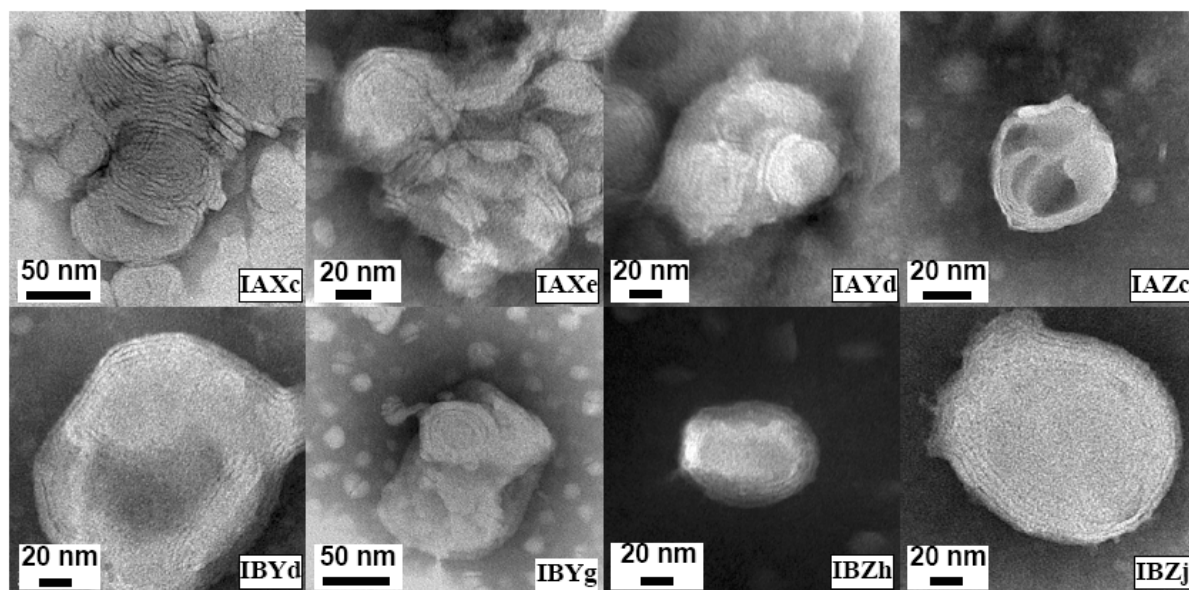


Figure 12. Transmission electron microscopic images of cationic liposomes **IAXc**, **IAXe**, **IAYd**, **IAZc**, **IBYd**, **IBYg**, **IBZh**, and **IBZj**.

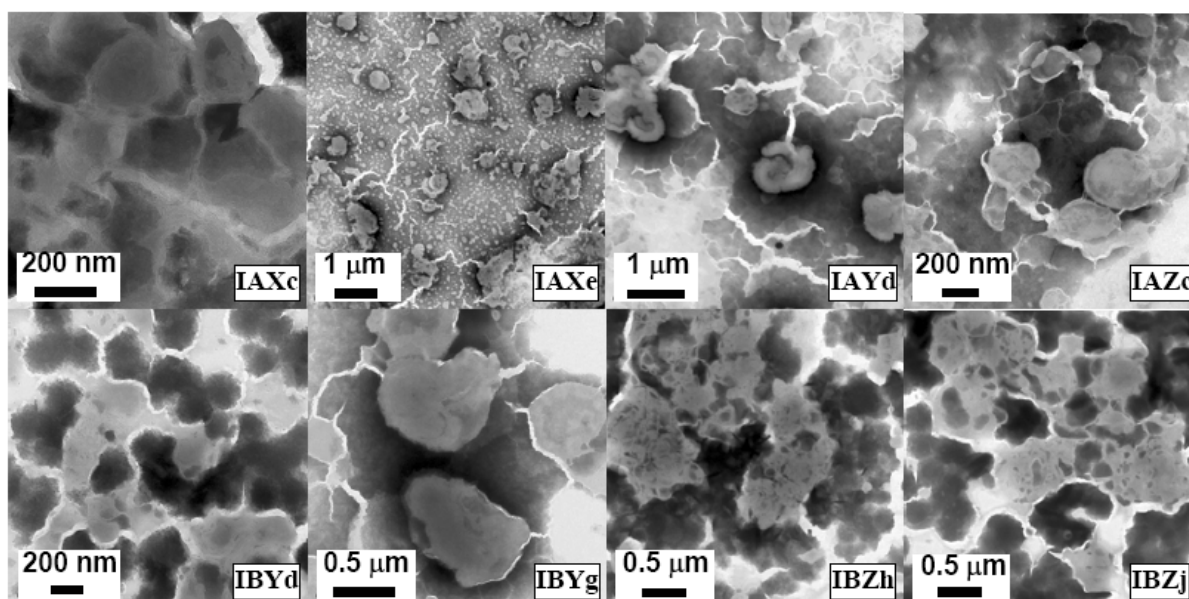


Figure 13. Transmission electron microscopic images of lipoplexes prepared from optimized liposomes (**IAXc**, **IAXe**, **IAYd**, **IAZc**, **IBYd**, **IBYg**, **IBZh**, and **IBZj**)/DNA complexes.

Conclusions

Cationic lipids with various hydrophilic heads and hydrophobic tails have been of interest to many scientists for their use in gene delivery applications. They can be synthesized by solid phase as well as conventional syntheses to obtain new analogues with high efficiency and minimal toxicity. Toward this end, we have demonstrated here the solid phase synthesis of novel cationic lipids having asymmetric cholesteryl-acyl hydrophobic tails. The lipids with acyl portion at the terminal part of the polyamine backbone exhibited higher transfection efficiency than those with the acyl portion at the internal part of the backbone. These compounds also exhibited higher transfection efficiency and lower cytotoxicity as compared

with the commercially available agents, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol. The generation of compounds with transfection abilities greater than those of widely used commercial agents suggests that this class of compound has significant potential for overcoming gene transfer difficulties in vitro and possibly in vivo.

Experimental Section

General information.

NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 spectrometer operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C. All coupling constants (*J* values) were measured in Hz. ES and HR-ESI-MS were recorded on a Finnigan LC-Q mass spectrometer and a Micromass Instrument type QTOF2 spectrometer, respectively. Infra-red spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum GX60237. The size and morphology of the cationic liposomes and lipoplexes were recorded on JEM-2100, JEOL electron microscope. Starting materials and reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purification.

Synthesis

Solid phase synthesis of key scaffold resin 5(A-C)(X-Z) (Scheme 1)

Active carbonate resin **1**^[20] (1 equiv) was added an excess 1,3-diaminopropane (**A**) or 1,4-diaminobutane (**B**) or 1,6-diaminohexane (**C**) in CH₂Cl₂. The suspension was shaken overnight. The resulting resin was washed with CH₂Cl₂, DMF and CH₂Cl₂ (3×10 mL, each) to provide the corresponding resin **2(A-C)**. Amino resin **2(A-C)** (1 equiv, 1.1 mmol g⁻¹) was reacted with a solution of bromoacetic acid (4 equiv) and DIC in DMF (10 mL). The suspension was then shaken for 12 h. The resulting resin was filtered and washed successively with DMF, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂, DMF and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL, each) to give the desired resin **3(A-C)**. The excess of 1,3-diaminopropane (**X**) or 1,4-diaminobutane (**Y**) or 1,6-diaminohexane (**Z**) in DMF was reacted with the resin **3(A-C)** for 12 h to give the desired resin **4(A-C)(X-Z)** after successively washed with DMF, CH₂Cl₂, MeOH, DMF and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL, each). The resin **4(A-C)(X-Z)** was dried under vacuum for 2 h. The resin **4(A-C)(X-Z)** was reacted with Dde-OH (excess) in CH₂Cl₂ for 12 h. The resin was filtered and washed successively with CH₂Cl₂ and MeOH (3 × 10 mL, each). The resulting resin was dried under reduced pressure to give the desired resin **5(A-C)(X-Z)**.

Synthesis of lipids library I (Scheme 2)

Cholesteryl chloroformate (4 equiv) was dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL) and the resulting solution was added to each Dde-protected amino resin **5(A-C)(X-Z)**. Pyridine (2 mL) was gently added to the mixture and the suspensions were shaken overnight. The resins were filtered and washed successively with CH₂Cl₂, MeOH, and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL, each) to give the resins **6(A-C)(X-Z)**. Dde deprotection was carried out using 5% N₂H₄ in DMF (~10 mL) for two cycles of 30 minutes. The resulting resins were filtered and washed successively with CH₂Cl₂, DMF, MeOH, DMF, and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL, each) to give the amino resins. The amino resins gave a positive ninhydrin test and were dried under vacuum before using in the next step. Each of the amino resins was splitted to 10 portions. Each portion of resin was added a solution of various long chain fatty acids (**a-j**) (4 equiv) (see Figure 3), DIC (4 equiv), in CH₂Cl₂/DMF (4:1). The suspensions were shaken overnight. The resins were washed with CH₂Cl₂, MeOH, DMF, MeOH and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL, each) to give the resins **7(A-C)(X-Z)(a-j)**. The resulted resins **7(A-C)(X-Z)(a-j)** were dried under vacuum before cleaving. A solution of 20% TFA/CH₂Cl₂ (1.5 mL) was added to each of the resins **7(A-C)(X-Z)(a-j)** and the suspensions were shaken for 2 h. The resins were filtered and the solutions were collected. The

solvents were removed under a stream of nitrogen and evaporated under reduced pressure to afford the desired products **I(A–C)(X–Z)(a–j)**.

Synthesis of lipids library II (Scheme 2)

Each of the resins **5(A–C)(X–Z)** was splitted to 10 portions. Each portion of the resins was added a solution of various long chain fatty acids (**a–j**) (4 equiv) (see Figure 3), DIC (4 equiv) in CH₂Cl₂/DMF (4:1). The suspensions were shaken overnight. The resins were washed with CH₂Cl₂, MeOH, DMF, MeOH, and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL, each) to give the resins **8(A–C)(X–Z)(a–j)**. Dde deprotection was carried out using 5% N₂H₄ in DMF (~10 mL) for two cycles of 30 minutes. The resulting resins were filtered and washed successively with CH₂Cl₂, DMF, MeOH, and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL, each) to give the free amino resins. The free amino resins gave a positive ninhydrin test and were dried under vacuum. Cholesteryl chloroformate (4 equiv) was dissolved in CH₂Cl₂, (1.5 mL) and the resulting solution was added to each of the resins **8(A–C)(X–Z)(a–j)**. Pyridine (0.5 mL) was gently added to the mixture. The suspensions were shaken overnight. The resins were filtered and washed successively with CH₂Cl₂, MeOH, and CH₂Cl₂ (3 × 10 mL, each). A solution of 20% TFA/CH₂Cl₂ (1.5 mL) was added to each of the resins **9(A–C)(X–Z)(a–j)** and the suspensions were shaken for 2 h. The resins were filtered and the solutions were collected. The solvents were removed under a stream of nitrogen and evaporated under reduced pressure to afford the desired products **II(A–C)(X–Z)(a–j)**.

Lipid IAXc Yield: (resin: 1.1 mmolg⁻¹, 130 mg) 31.0 mg, 27%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.95 (br s, 3H; NH₃⁺), 5.31 (br s, 1H; H-6-Chol), 4.30 (br s, 1H; H-3-Chol), 3.86 (br s, 2H; NHCOCH₂N), 3.19 and 3.29 (partially overlapping, br s, 6H; CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 2.95 (br s, 2H; ⁺H₃NCH₂CH₂), 0.85–2.40 (m, 43H; methyl, methylene and methine protons), 1.22 (s, 16H; methylene protons of long chain fatty acid), 0.97 (s, 3H; H-19-Chol), 0.88 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H; H-21-Chol), 0.83 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H; H-26, 27-Chol), 0.64 ppm (s, 3H; H-18-Chol); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.5, 161.1, 139.4, 122.7, 76.0, 56.6, 56.2, 52.4, 49.9, 42.2, 39.7, 39.4, 39.0, 38.4, 37.2, 36.9, 36.5, 36.4, 36.1, 35.8, 31.9, 29.7, 29.3, 28.2, 28.0, 27.9, 24.2, 23.9, 22.7, 22.6, 22.5, 21.0, 19.2, 18.7, 14.1, 11.8 ppm; IR: ν bar = 3290, 3070, 2930, 2851, 1681, 1541, 1468, 1379, 1202, 1136 cm⁻¹; HRMS: *m/z*: calcd for C₄₉H₈₉N₄O₄⁺: 797.6878; found: 797.7023.

Lipid IAXe Yield: (resin: 1.1 mmolg⁻¹, 130 mg) 28.8 mg, 24%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.40 (br s, 3H; NH₃⁺), 5.31 (br s, 1H; H-6-Chol), 4.40 (br s, 1H; H-3-Chol), 3.87 (br s, 2H; NHCOCH₂N), 3.21 and 3.30 (partially overlapping, br s, 6H; CH₂NHCOCH₂NCH₂CH₂CH₂NHCO), 2.97 (br s, 2H; ⁺H₃NCH₂CH₂), 0.85–2.50 (m, 35H; methyl, methylene and methane protons), 1.22 (s, 28H; methylene protons of long chain fatty acid), 0.97 (s, 3H; H-19-Chol), 0.88 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H; H-21-Chol), 0.84 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H; H-26, 27-Chol), 0.64 ppm (s, 3H; H-18-Chol); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 172.5, 160.8, 139.4, 122.8, 76.6, 56.6, 56.2, 50.0, 42.3, 39.7, 39.5, 39.1, 38.9, 38.5, 38.4, 36.5, 36.4, 36.2, 35.8, 31.9, 31.8, 29.7, 29.3, 28.2, 28.1, 28.0, 24.2, 23.9, 22.8, 22.6, 22.5, 21.0, 19.2, 18.7, 14.1, 11.8 ppm; IR: ν bar = 3284, 3077, 2926, 2852, 1681, 1552, 1467, 1378, 1202, 1135, 1026 cm⁻¹; HRMS: *m/z*: calcd for C₅₁H₉₃N₄O₄⁺: 825.7191; found: 825.7294.

Lipid IAYd Yield: (resin: 1.1 mmolg⁻¹, 130 mg) 38.3 mg, 32%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.01 (br s, 3H; NH₃⁺), 5.31 (br s, 1H; H-6-Chol), 4.40 (br s, 1H; H-3-Chol), 3.84 (br s, 2H; NHCOCH₂N), 3.16 and 3.29 (partially overlapping, br s, 6H; CH₂NHCOCH₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NHCO), 2.95 (br s, 2H; ⁺H₃NCH₂CH₂), 0.85–2.50 (m, 45H; methyl, methylene and methine protons), 1.22 (s, 18H; methylene protons of long chain fatty acid), 0.97 (s, 3H; H-19-Chol), 0.88 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H; H-21-Chol), 0.83 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H;

H-26, 27-Chol), 0.64 ppm (s, 3H; H-18-Chol); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 174.3, 171.3, 161.3, 139.5, 122.7, 76.6, 56.6, 56.2, 52.4, 49.9, 42.2, 39.7, 39.4, 39.0, 38.4, 37.2, 36.9, 36.5, 36.4, 36.1, 35.8, 31.9, 29.7, 29.3, 28.2, 28.0, 27.9, 24.2, 23.9, 22.7, 22.6, 22.5, 21.0, 19.2, 18.6, 14.0, 11.8 ppm; IR: ν_{bar} = 3307, 3077, 2924, 2852, 1681, 1552, 1467, 1378, 1240, 1203, 1135 cm^{-1} ; HRMS: m/z : calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{93}\text{N}_4\text{O}_4^+$: 825.7191; found: 825.7411.

Lipid IAZc Yield: (resin: 1.1 mmol g^{-1} , 130 mg) 24.1 mg, 20%; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.90 (br s, 3H; NH_3^+), 5.32 (br s, 1H; H-6-Chol), 4.42 (br s, 1H; H-3-Chol), 3.85 (br s, 2H; NHCOCH_2N), 3.21 and 3.31 (partially overlapping, br s, 6H; $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.93 (br s, 2H; $^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 0.85–2.50 (m, 47H; methyl, methylene and methine protons), 1.22 (s, 18H; methylene protons of long chain fatty acid), 0.97 (s, 3H; H-19-Chol), 0.88 (d, J = 6.1 Hz, 3H; H-21-Chol), 0.84 (d, J = 6.6 Hz, 6H; H-26,27-Chol), 0.65 ppm (s, 3H; H-18-Chol); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 174.8, 160.7, 139.5, 122.8, 76.6, 56.7, 56.2, 52.4, 50.0, 42.3, 39.7, 39.5, 39.1, 38.9, 38.5, 36.5, 36.4, 36.2, 35.8, 31.9, 31.8, 29.7, 29.3, 28.2, 28.1, 28.0, 24.2, 23.8, 22.7, 22.6, 22.5, 21.0, 19.3, 18.7, 14.0, 11.8 ppm; IR: ν_{bar} = 3276, 2925, 2853, 1681, 1552, 1467, 1432, 1378, 1202, 1137, 1019 cm^{-1} ; HRMS: m/z : calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{95}\text{N}_4\text{O}_4^+$: 839.7347; found: 839.7473.

Lipid IBYd Yield: (resin: 1.1 mmol g^{-1} , 130 mg) 28.0 mg, 23%; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.95 (br s, 3H; NH_3^+), 5.31 (br s, 1H; H-6-Chol), 4.41 (br s, 1H; H-3-Chol), 3.85 (br s, 2H; NHCOCH_2N), 3.21 (overlapping, br s, 6H; $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.94 (br s, 2H; $^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 0.85–2.50 (m, 47H; methyl, methylene and methine protons), 1.21 (s, 18H; methylene protons of long chain fatty acid), 0.97 (s, 3H; H-19-Chol), 0.87 (d, J = 6.2 Hz, 3H; H-21-Chol), 0.83 (d, J = 6.5 Hz, 6H; H-26,27-Chol), 0.64 ppm (s, 3H; H-18-Chol); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 174.8, 160.7, 139.5, 122.6, 75.7, 56.6, 52.7, 51.6, 49.9, 42.2, 39.6, 39.4, 39.0, 38.5, 38.4, 36.6, 36.5, 36.1, 35.7, 31.8, 31.7, 29.7, 29.3, 28.2, 28.1, 27.9, 24.2, 23.8, 22.7, 22.6, 22.5, 21.0, 19.2, 18.6, 14.0, 11.8 ppm; IR: ν_{bar} = 3424, 3342, 2927, 2856, 1682, 1574, 1466, 1383, 1321, 1247, 1203, 1169, 1131 cm^{-1} ; HRMS: m/z : calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{95}\text{N}_4\text{O}_4^+$: 839.7347; found: 839.7827.

Lipid IBYg Yield: (resin: 1.1 mmol g^{-1} , 130 mg) 29.5 mg, 23%; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.00 (br s, 3H; NH_3^+), 5.31 and 5.39 (br s, 3H; H-6-Chol and $-\text{CH}=\text{CH}-$ in fatty acid), 4.43 (br s, 1H; H-3-Chol), 3.83 (br s, 2H; NHCOCH_2N), 3.22 (overlapping, br s, 6H; $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.94 (br s, 2H; $^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 0.85–2.50 (m, 55H; methyl, methylene and methine protons), 1.23 (s, 14H; methylene protons of long chain fatty acid), 0.97 (s, 3H; H-19-Chol), 0.88 (d, J = 6.2 Hz, 3H; H-21-Chol), 0.83 (d, J = 6.5 Hz, 6H; H-26,27-Chol), 0.64 ppm (s, 3H; H-18-Chol); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 174.8, 160.7, 139.5, 129.9, 129.6, 122.6, 75.7, 56.6, 52.4, 51.6, 49.9, 42.3, 39.7, 39.4, 39.1, 38.9, 38.5, 38.4, 36.5, 36.1, 35.7, 31.8, 29.7, 29.2, 28.1, 28.0, 27.9, 24.2, 23.8, 22.7, 22.6, 22.5, 21.0, 19.3, 18.6, 14.0, 11.8 ppm; IR: ν_{bar} = 3342, 2966, 2929, 2856, 1675, 1632, 1574, 1464, 1384, 1325, 1247, 1203 cm^{-1} ; HRMS: m/z : calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{101}\text{N}_4\text{O}_4^+$: 893.7347; found: 893.8056.

Lipid IBZh Yield: (resin: 1.1 mmol g^{-1} , 130 mg) 28.1 mg, 21%; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.88 (br s, 3H; NH_3^+), 5.32 (br s, 3H; H-6-Chol), 4.43 (br s, 1H; H-3-Chol), 3.84 (br s, 2H; NHCOCH_2N), 3.22 (overlapping, br s, 6H; $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.97 (br s, 2H; $^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 0.85–2.50 (m, 51H; methyl, methylene and methine protons), 1.22 (s, 26H; methylene protons of long chain fatty acid), 0.98 (s, 3H; H-19-Chol), 0.88 (d, J = 6.4 Hz, 3H; H-21-Chol), 0.83 (d, J = 6.6 Hz, 6H; H-26,27-Chol), 0.65 ppm (s, 3H; H-18-Chol); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 174.6, 160.6, 139.4, 122.7, 75.9, 56.6, 56.1, 52.8, 49.9, 42.2, 39.6, 39.4, 39.1, 38.9, 38.5, 38.4, 36.4, 36.1, 35.7, 31.8, 31.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 28.1, 28.0, 27.9, 24.2, 23.8, 22.7, 22.6, 22.5, 20.9, 19.2, 18.6, 14.0, 11.7 ppm; IR: ν_{bar} = 3322, 3084, 2924, 2852, 1681, 1552, 1467, 1432, 1378, 1203, 1136, 1023 cm^{-1} ; HRMS: m/z : calcd for $\text{C}_{57}\text{H}_{105}\text{N}_4\text{O}_4^+$: 909.8130; found: 909.8722.

Lipid IBZj Yield: (resin: 1.1 mmol g^{-1} , 130 mg) 26.7 mg, 20%; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.42 (br s, 3H; NH_3^+), 5.34 (br s, 3H; H-6-Chol), 4.43 (br s, 1H; H-3-Chol), 3.90 (br s, 2H; NHCOCH_2N), 3.11, 3.23 and 3.33 (partially overlapping, br s, 6H; $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2.99 (br s, 2H; $^+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2$), 0.85–2.50 (m, 51H; methyl, methylene and methine protons), 1.22 (s, 18H; methylene protons of long chain fatty acid), 0.98 (s, 3H; H-19-Chol), 0.89 (d, J = 6.3 Hz, 3H; H-21-Chol), 0.84 (d, J = 6.5 Hz, 6H; H-26,27-Chol), 0.65 ppm (s, 3H; H-18-Chol); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 176.7, 170.6, 160.7, 138.4, 122.7, 76.6, 56.6, 56.1, 50.3, 50.0, 42.2, 39.8, 39.6, 39.5, 39.1, 38.6, 38.3, 36.5, 36.1, 35.7, 31.8, 31.8, 29.7, 29.3, 28.2, 27.9, 24.2, 23.8, 22.7, 22.6, 22.5, 21.0, 19.2, 18.6, 14.0, 11.8 ppm; IR: ν bar = 3333, 3070, 2924, 2852, 1680, 1553, 1467, 1432, 1378, 1203, 1137, 1028 cm^{-1} ; HRMS: m/z : calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{111}\text{N}_4\text{O}_4^+$: 951.8599; found: 951.9085.

DNA binding affinities

The DNA binding ability of synthesized lipids was performed by gel retardation assay. The DNA/sample complexes 1/20 (w/w) were prepared by transferring $2.4 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) of sample to an Eppendorf tube. Each sample was further diluted with $3 \mu\text{L}$ of PBS (phosphate buffered saline) buffer. An aqueous solution of plasmid DNA ($4 \mu\text{L}$, $0.3 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) was added to each sample and the solutions were successively mixed by inverting several times. The DNA complexes were incubated at 25°C for 30 minutes. Bromophenol blue-free gel-loading buffer ($3 \mu\text{L}$, 2×40% w/v sucrose in water) was added to the complexes. The solutions were mixed by inverting each tube and each sample ($10 \mu\text{L}$) was loaded onto a 1.0% agarose gel (0.5×TBE buffer). The gel was run at 135V for 5 min and 50V for 2 h at 400 mA. DNA bands were visualized by ethidium bromide staining.

Liposome preparation

Dioleoyl-L- α -phosphatidylethanolamine (DOPE) (Sigma) ($1 \mu\text{L}$, $50 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ in CH_2Cl_2) and cationic lipid ($2 \mu\text{L}$, $50 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ in abs. ethanol) were mixed (weight ratio 1:2). The organic solvents were evaporated under a stream of nitrogen and further dried under high vacuum ($> 2\text{h}$). The resulting thin film was hydrated with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4, $100 \mu\text{L}$) at room temperature for 1 h. The mixture was vortexed for one minute and sonicated (2×15 minutes) with 1 h rest between sonications using a bath-type sonicator. The liposomes were stored at 4°C for 24 h prior to use. The liposome without DOPE was prepared as the same manner for DOPE-contained liposome excepted DOPE was not incubated.

Transfection procedure:

Human embryonic kidney cells (HEK293), colorectal adenocarcinoma (COLO 205), canine osteosarcoma (D-17), human cervical adenocarcinoma (HeLa) and human prostate adenocarcinoma (PC3) were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin ($100 \text{ units mL}^{-1}$), streptomycin (100 mg mL^{-1}) and l-glutamine (4 mM) at 37°C , 5% CO_2 . For transfection, the cells were seeded up to 1×10^4 cells/well in a 96-well plate, to give 50-70% confluence to be used on the next day. The growth medium was removed and the cells were washed with PBS and replaced with $100 \mu\text{L}$ of fresh serum-free DMEM medium. DNA (pCH110-encoding β -galactosidase)/cationic liposome complexes (lipoplexes) were prepared as follows. An appropriate volume of each cationic liposome ($1 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) was added to the plasmid DNA ($0.4 \mu\text{L}$, $0.5 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) and the complex was incubated at room temperature for 30 min before being diluted with phosphate-buffered saline to make a final DNA concentration of 0.1 mg/mL . The lipoplexes ($10 \mu\text{L}$) were then added to the cells and left to be incubated at 37°C , 5% CO_2 . The cells were then washed with PBS and fresh growth medium was added and further incubated for 48 h. For EffecteneTM transfection, the method

was carried out according to the manufacturer's instruction and the same ratios of plasmid DNA:EffecteneTM were used. After transfection, the β -galactosidase activity per well was estimated by adding 100 μ L of substrate solution (4 mgmL⁻¹ of o-nitrophenyl-galactopyranoside (ONPG),^[25] 0.2 M sodium phosphate (pH 7.3) and 2 mM magnesium chloride) to the lysate in a 96-well plate. Absorbance of the product otho-nitrophenol at 405 nm was converted to % relative transfection by compared with positive control, EffecteneTM.

Transfection cytotoxicity

Cytotoxicities of the lipids **IAXc**, **IAXe**, **IAYd**, **IAZc**, **IBYd**, **IBYg**, **IBZh** and **IBZj** were assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay as described previously.^[16] The experiment was performed in 96-well plates. The amount of cationic liposome and commercially available transfection agents, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol, per well was used the same as that used in the transfection experiments. After 24 h. incubation, the medium was removed and replaced with a phenol red-free medium (90 μ L). MTT (3 mgmL⁻¹) was added (10 μ L/well) to the cells, followed by MTT solubilization solution (Sigma) (100 μ L) to dissolve the resulting crystals, and the absorbance was measured at 520 nm on a microplate reader. The change in metabolic activity was calculated as A_{520} with compound/ A_{520} without compound.

Electron microscopy

The liposomes or their lipoplexes solution (10–20 μ L) was dropped on the formvar grid and left it stands at room temperature for 1 min. The water was removed by touching the edge of the droplet to the edge of a filter paper, leaving the thin aqueous film on the grid. 1% Potassium phosphotungstate (PTA) (10 μ L) was applied to the grid and left it stands for 1 min. The extra solution was similarly removed by touching to the edge of a filter paper. The negative stain liposomes were allowed to dry at room temperature for 1 night by placing onto a filter paper in a covered Petri dish. The samples were observed under transmission electron microscope operated at 200 kV.

Acknowledgments

This work was supported by the Commission on Higher Education, Ministry of Education and The Thailand Research Fund (TRF) (RMU5080039). Partial support from the Strategic Basic Research Grant of TRF is gratefully acknowledged. W.R. would like to thank Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for scholarship. We are grateful to Dr. Ek Saengvichien for providing gel electrophoresis apparatus.

References

- [1] R. G. Amado, I. S. Y. Chen, *Biomedicine* **1999**, 285, 674–676.
- [2] P. G. Rigby, *Nature* **1969**, 221, 968–969.
- [3] F. L. Graham, A. J. van der Eb, *Virology*. **1973**, 54, 536–539.
- [4] S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, Z. Li, *J. Control. Release* **2004**, 100, 165–180.
- [5] D. M. Lynn, D. G. Anderson, D. Putnam, R. Langer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8155–8156.
- [6] M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Jr. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 703–714.

- [7] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413–7417.
- [8] J.-P. Vigneron, N. Oudrhiri, L. Fauquet, L. Vergely, J. C. Bradley, M. Basseville, P. Lehn, J. M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9682–9686.
- [9] B. Yingyongnarongkul, M. Howarth, T. Elliott, M. Bradley, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 463–473.
- [10] B. Yingyongnarongkul, M. Howarth, T. Elliott, M. Bradley, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 753–760.
- [11] X. Gao, L. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 280–285.
- [12] R. G. Cooper, C. J. Etheridge, L. Stewart, J. Marshall, S. Rudginsky, S. H. Cheng, A. D. Miller, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 137–151.
- [13] J. P. Berh, B. Demeneix, J. P. Loeffler, J. P. Mutul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6982–6986.
- [14] S. Bhattacharya, P. V. Dillep, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 508–519.
- [15] Y. K. Ghosh, S. S. Visweswariah, S. Bhattacharya, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 378–384.
- [16] B. Yingyongnarongkul, W. Radchatawedchakoon, A. Krajarng, R. Watanapokasin, A. Suksamrarn, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 176–188.
- [17] A. Bajaj, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1537–1546.
- [18] A. Bajaj, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2533–2540.
- [19] R. E. Dolle, B. L. Bourdonnec, A. J. Goodman, G. A. Morales, J. M. Salvino, W. Zhang, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 855–902.
- [20] B. Yingyongnarongkul, N. Apiratikul, N. Aroonrerk, A. Suksamrarn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5870–5873.
- [21] E. Kaiser, R. L. Colescot, C. D. Bossinge, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [22] I. A. Nash, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2625–2628.
- [23] J. H. Felgner, R. Kumar, C. N. Sridhar, C. J. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin, P. L. Felgner, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2550–2561.
- [24] W. Radchatawedchakoon, R. Watanapokasin, A. Krajarng, B. Yingyongnarongkul, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 330–342.
- [25] P. P. Karmali, B. K. Majeti, B. Sreedhar, A. Chaudhuri, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 159–171.

Legends

Figure 1. Cationic lipids with symmetric hydrophobic tails.

Figure 2. The structures of novel cationic lipids with asymmetric cholesterol-fatty acid tails.

Figure 3. The structures of diamines and fatty acids used in Scheme 2.

Figure 4. Gel retardation assay of DNA/cationic lipids complexes at a weight ratio of 1:20. Lanes marked “Control” contained DNA alone and was used as a control. The presence of a lower band indicated that DNA has migrated and has not been bound by the transfection compound.

Figure 5. Transfection screening activity of synthesized cationic lipids employing pCH110-encoding β -galactosidase (0.1 μ g/well). The liposome formation was both with and without DOPE. The lipoplexes was used at DNA/lipids (w/w) ratios of 1:20. The transfection efficiencies of the lipids were compared to that of commercially available reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

Figure 6. Transfection efficiency of the selected lipids against HEK293 cells across the cationic lipid/DOPE weight ratio of 2:1, 1:1 and 1:2. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

Figure 7. Transfection efficiency of the selected lipids against HEK293 cells across the DNA/cationic lipid weight ratios of 1:10, 1:20 and 1:40 (w/w). The optimal liposome formation of each lipid from Figure 6 was used as described in the text. Transfection efficiency of the selected lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency (data not shown).

Figure 8. Effect of DNA amount for gene delivery. The optimal liposome formation (Figure6) and DNA/lipids complex (Figure7) of each lipid were used to mix with various amount of DNA from 0.1 to 0.4 μ g. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency.

Figure 9. Effect of serum for transfection efficiency. The optimal liposome formation (Figure6), DNA/cationic lipid (Figure7) and amount of DNA per well (Figure8) of each lipid were used to transfer gene to HEK293 cell at various amount of serum. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, which calculated as 100% transfection efficiency.

Figure 10. Transfection efficiency of selected lipids toward COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cell using optimum conditions from Figures 6-8. Transfection efficiency of the lipids was compared to that of the commercial reagent, EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol. Transfection efficiency of EffecteneTM for each cell line was calculated as 100%.

Figure 11. Effect of transfection synthesized lipids on cell metabolic activity. Liposomes of cationic lipid with helper lipid, DOPE, were formed and added to DNA to form lipoplexes. These complexes were added to HEK293, COLO 205, D-17, HeLa and PC3 cell. Cell metabolic activity was determined by a MTT assay.

Figure 12. Transmission electron microscopic images of cationic liposomes IAXc, IAXe, IAYd, IAZc, IBYd, IBYg, IBZh, and IBZj.

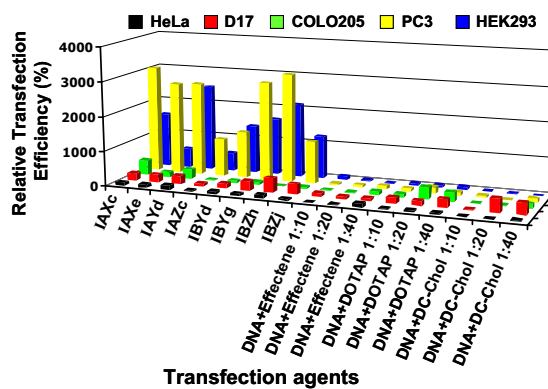
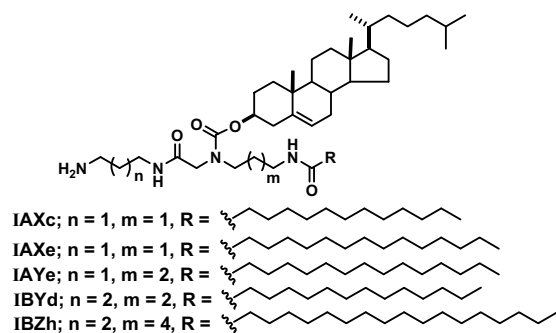
Figure 13. Transmission electron microscopic images of lipoplexes prepared from optimized liposomes (**IAXc**, **IAXe**, **IAYd**, **IAZc**, **IBYd**, **IBYg**, **IBZh**, and **IBZj**)/DNA complexes.

Scheme 1. *Reagents and conditions.* a) diamines **A–C** (excess) (see Figure 3), CH₂Cl₂, 6 h; b) bromoacetic acid (4 equiv), DIC (4 equiv), DMF/CH₂Cl₂, 12 h; c) diamines **X–Z** (excess) (see Figure 3), CH₂Cl₂, 12 h; d) Dde-OH (excess), DMF/CH₂Cl₂, 12 h.

Scheme 2. *Reagents and conditions.* a) Cholesteryl chloroformate (4 equiv), pyridine (20 equiv), CH₂Cl₂, 12 h.; b) 5% N₂H₄/DMF, 2×30 min; c) Fatty acid (4 equiv, see Figure 3), DIC (4 equiv), CH₂Cl₂, 12 h.; d) 20% TFA/CH₂Cl₂, 2 h.

High Transfection Efficiency of Novel Cationic Lipids with Asymmetric Acyl-Cholesteryl Hydrophobic Tails

Widchaya Radchatawedchakoon, Aungkana Krajarng, Nattisa Niyomtham, Ramida Watanapokasin and Boon-ek Yingyongnarongkul



Cationic lipids with asymmetric acyl-cholesteryl hydrophobic tails were synthesized by solid phase chemistry. The transfection efficiency of these cationic lipids when formulated as liposome was investigated. Some of them exhibited higher transfection efficiency than the commercially available gene delivery reagent EffecteneTM, DOTAP and DC-Chol.