



УДК 547.953.2.057:577.352.2.088.55:577.336

СИНТЕЗ НОВЫХ ФОТОРЕАКТИВНЫХ ЗОНДОВ НА ОСНОВЕ ГАНГЛИОЗИДА GM1

© 2002 г. Е. В. Цибизова[#], Е. Л. Водовозова, И. И. Михалев, Ю. Г. Молотковский

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.06.2001 г. Принята к печати 02.07.2001 г.

Описан синтез новых фотореактивных зондов, производных ганглиозида GM1, несущих карбонгенирирующую диазоциклопентадиен-2-карбонильную группировку на различном расстоянии от углеводной части молекулы.

Ключевые слова: ганглиозиды; фотореактивное мечение; диазоциклопентадиен-2-карбонильная метка; липидные производные.

ВВЕДЕНИЕ

Ганглиозиды – гликофинголипиды, несущие один или несколько остатков сиаловой кислоты, – обязательные компоненты плазматических мембран эукариот. Они особенно распространены в нервной ткани, где играют важную роль в процессах взаимодействия клеток между собой и с различными экзогенными факторами [1]. На клеточной мембране ганглиозиды располагаются преимущественно на внешней стороне бислоя, экспонируя олигосахаридные детерминанты на поверхности клетки [1, 2]. Ганглиозиды служат рецепторами различных токсинов [3–5], бактерий [6], вирусов [7, 8]. Известно также, что ганглиозиды участвуют в процессах узнавания, изменяя экспрессию белковых рецепторов [9, 10], модулируют фосфорилирование белков [11], участвуют в рецепции интерлейкинов-2 и -4 [12, 13], являются специфическими маркерами опухолевых клеток [14, 15], способны подавлять иммунитет [16, 17]. Определяющую роль в таких взаимодействиях играет полярная (олигосахаридная) часть молекулы ганглиозида, но при этом конформационные изменения претерпевают целые комплексы белковых рецепторов, находящиеся вблизи неполярной (церамидной) части молекулы внутри клеточной мембраны. Кроме того, возможен и непосредственный контакт церамидного остатка с рецептируемым белком, при котором будет иметь место фотопришивка меченого ганглиозида к белку-лиганду.

Фотореактивно меченые ганглиозиды могут служить ценным инструментом для изучения мембранных перестроек, вызванных связыванием лиганда с рецептором, в которых ганглиозид либо непосредственно связывается с рецептируемым белком, либо играет роль кофактора. Важно, что фотореактивное мечение неполярной части молекулы не нарушает структуру олигосахаридной детерминанты ганглиозида, и, таким образом, позволяет получать липофильные зонды для исследования различных липид-белковых взаимодействий в мембранах.

В то время как фосфолипидные зонды давно применяются в мембранных исследованиях, работ с использованием ганглиозидных зондов немного, что, очевидно, связано с трудностью их синтеза. Поскольку полный синтез меченых ганглиозидов очень трудоемок и нецелесообразен, предпочтительнее использовать модифицирование природных липидов, которое может проводиться как по олигосахаридной (см., например, [18]), так и по церамидной части молекулы (см., например, [19–21]). Наиболее целесообразный путь модификации второго типа – замена остатка жирной кислоты в молекуле природного ганглиозида на меченый ацильный остаток. Эта возможность появилась благодаря разработке методов удаления ацильного остатка из церамидной части молекулы щелочным гидролизом [22].

В качестве фотореактивных (фотоаффинных, фотоактивируемых) меток, образующих при облучении промежуточные соединения с высокой реакционной способностью – нитрены, карбены и бирадикалы, рекомендован ряд группировок (например, арилизидные, диазириновые, бензофеноновые). Однако ни одна из них не удовлетво-

Сокращения: Dcp – диазоциклопентадиен-2-карбонил; Np – *n*-нитрофенил; Py – пиридин; Tf₂O – ангидрид трифторметансульфокислоты.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 330-66-10; эл. почта: rafin@mail.ru).

ряет в полной мере всему набору требований, предъявляемых к таким группам.

Относительно легкий путь синтеза арилазидных производных – несомненно важное преимущество в их практическом применении. В связи с этим нитренгенерирующие фенилазидные группы наиболее часто используются для фотореактивного мечения (см., например, [23]), и их фотохимия достаточно подробно изучена. Фенилазиды можно подвергать фотолизу в достаточно мягких условиях, что снижает вероятность повреждения биомолекул ($h\nu > 300$ нм; при том, что максимум поглощения приходится на область < 300 нм), однако при этом образуются нитрены, имеющие невысокую реакционную способность, что и объясняет часто отмечаемый исследователями низкий уровень фотопрививки зондов к биомолекулам. Установлено также [24], что нитрены, генерируемые арилазидами, при фотолизе претерпевают быструю перегруппировку в долгоживущие дегидроазепины, которые реагируют прежде всего с нуклеофилами, такими, как амина- и сульфгидрильные группы.

В процессе фотолиза диазириновых производных образуются карбены, которые обладают более высокой реакционной способностью, чем нитрены [25]. К настоящему времени получен ряд диазириновых производных, среди которых наилучшими свойствами обладает 3-(трифторметил)-3-фенилдиазиринная группа [26]. Широкому применению этих соединений препятствует многоступенчатый синтез диазиринового кольца.

В последние годы для фотореактивного мечения часто используются бензофеноновые группы, что объясняется их несколькими очевидными преимуществами: они химически более стабильны, чем арилазиды и диазирины; активируются при 350–360 нм; после фотоактивации реагируют по неактивированным С–Н-связям даже в присутствии водных растворителей [27]. Однако эта метка очень объемна, и генерируемый ею бирадикал обладает определенной стереоселективностью. Кроме того, бензофеноновый хромофор требует для фотоактивации длительного облучения [28], что в ряде случаев нежелательно.

Для обеспечения хорошей чувствительности метода фотореактивного зондирования молекула зонда должна содержать радиоактивные нукли-

ды, обладающие высокой энергией излучения (^{125}I , ^{131}I , ^{32}P и т.д.). Но такие соединения имеют очень небольшие времена жизни, поэтому разумно вводить радиоизотоп в “холодный” зонд непосредственно перед его использованием. Для облегчения последующего анализа продуктов сшивки желательно также, чтобы радиомечению подвергалась непосредственно фотореактивная группировка. Для ряда известных фотоаффинных меток – перфторфенилазидной [29], 3-(трифторметил)-3-фенилдиазиринной [30] и бензофеноновой [31] – были разработаны методы функционализации, позволяющие вводить ^{125}I . Однако синтез зондов в этом случае значительно усложняется.

Таким образом, актуальной задачей мембранологии остается поиск новых фотореактивных группировок.

Карбенгенерирующая диазоциклопентадиен-2-карбонильная (Dcp) группа впервые была предложена для фотореактивного мечения Нильсеном и др. [32]. Эта небольшая по размеру метка имеет значительное поглощение в ближней УФ-области (λ_{max} 314 нм, ϵ 15900 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) и легко подвергается фотолизу, образуя карбен. Показано, что он обладает высокой реакционной способностью и эффективно внедряется в неактивированные С–Н-связи [33] (схема 1, детальное исследование продукта внедрения с помощью ^1H -ЯМР будет опубликовано). Исходное соединение – диазоциклопентадиен-2-карбоновая кислота (DcpOH) – легко получается трехстадийным синтезом из циклопентадиена и в отсутствие УФ-света стабильна в различных условиях: мягкие щелочные и кислые (включая надуксусную кислоту) [34], нагревание ($\leq 150^\circ\text{C}$), окислительные среды. Ранее нами были синтезированы Dcp-производные $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -меченых фосфатидилхолина и сфингомиелина [33] и с успехом применены для исследования мембранной топографии цитохрома P-450 [35]. Изучая далее свойства Dcp-группы, мы обнаружили, что она легко иодируется в окислительных условиях, причем сохраняет способность генерировать при фотоактивации высокорекреакционный карбен [36].

В настоящей работе представлен синтез новых фотореактивных зондов, производных ганглиозида GM1, несущих Dcp-группировку на различном расстоянии от углеводной части молекулы.

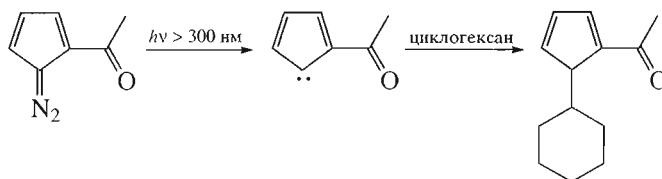


Схема 1.

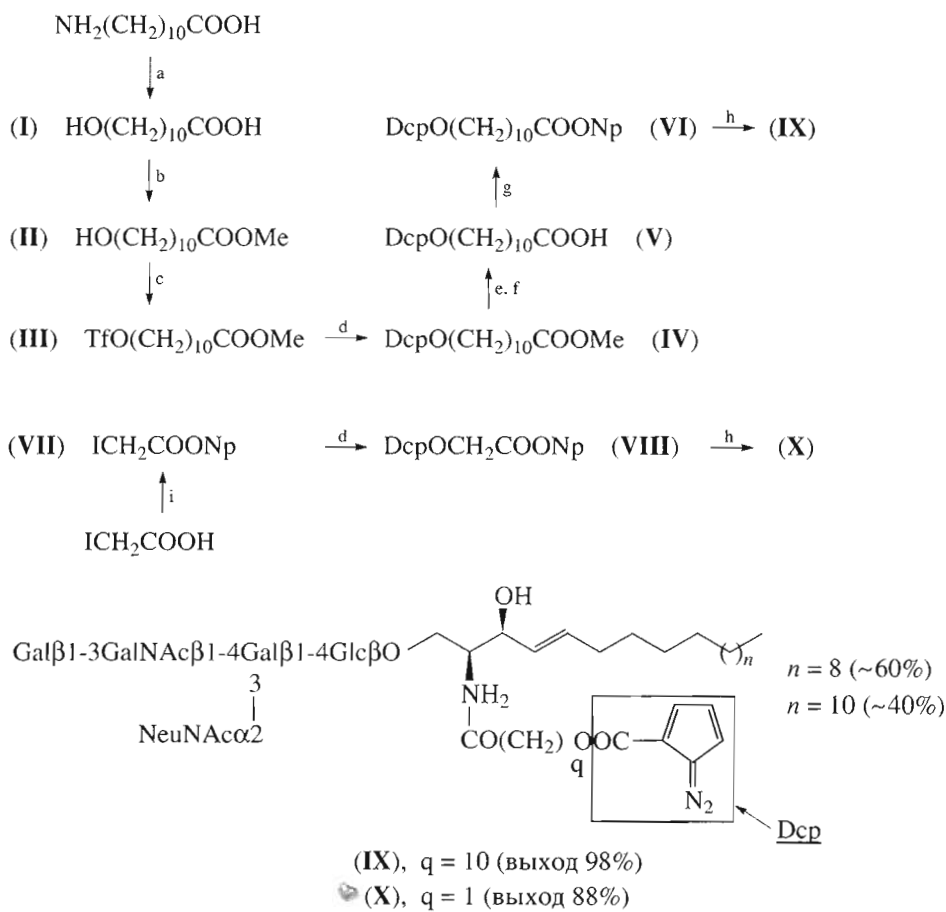


Схема 2. Реагенты: а. HNO_2 ; б. MeOH/HCl ; в. $\text{Tf}_2\text{O}/\text{Py}$; д. $\text{DcpOH}/\text{Et}_3\text{N}$; е. KOH , $\text{Pr}'\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$; ф. HCl ; г. $\text{CF}_3\text{COONp}/\text{Py}$; х. лизо-GM1/ Et_3N ; и. HONp , DCC .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Длинноцепочечный Dcp-GM1-зонд (IX)

При фотоаффинном зондировании биологической системы наличие лабильной связи между фотореактивной меткой и остальной частью молекулы зонда существенно облегчает анализ продуктов мечения. Поскольку речь идет, в первую очередь, об исследовании липид-белковых взаимодействий, подходящей является сложноэфирная связь, лабильная, в отличие от пептидной, в условиях щелочного гидролиза. Поэтому мы синтезировали алифатическую кислоту с Dcp-оксигруппой при концевом атоме углерода, являющуюся синтоном при получении различных липидных зондов для изучения центральной части липидного бислоя биологических и модельных мембран ((V), схема 2).

11-Гидроксиундекановую кислоту (I) синтезировали из доступной 11-амиоундекановой кислоты реакцией дезаминирования под действием азотистой кислоты при нагревании в воде [37]. При этом был получен набор трех продуктов, из которых (ТСХ) около половины составила унде-

циленовая кислота (R_f 0.45), очень незначительное количество – 10-гидроксиундекановая кислота (R_f 0.35) и примерно половину – целевой продукт (I) (R_f 0.2). Кислоту (I) выделяли хроматографией на силикагеле (выход 38%). В спектре ^1H -ЯМР присутствует характеристический для протонов метиленовой группы при первичном гидроксильном триплет (см. “Эксперимент. часть”); ИК-спектр также подтверждает структуру полученного вещества.

Метилловый эфир 11-гидроксиундекановой кислоты (II) получали обработкой кислоты (I) раствором HCl в метаноле с выходом 53%.

Трифлат метилового эфира 11-гидроксиундекановой кислоты (III) синтезировали, вводя в реакцию ангидрид трифторметансульфоикислоты с метиловым эфиром (II) в присутствии пиридина в хлороформе при -10°C ; производное (III) (выход 86%) использовали далее без дополнительной очистки.

Реакцию трифлата (III) с DcpOH проводили в сухом ацетоне с небольшим избытком триэтиламина; метиловый эфир 11-(Dcp-окси)ундекановой кислоты (IV) был получен с выходом 50%. Структура соединения (IV) подтверждена масс-спектрометрией и ^1H -ЯМР.

Омыление метилового эфира (IV) проводили в растворе КОН в водном изопропаноле при комнатной температуре. Скорость щелочного гидролиза сложноэфирной связи, образованной Dcp-кислотой, существенно ниже, чем для эфира алифатической кислоты. Реакцию вели 20 ч до появления следов отщепившейся DcpOH (ТСХ); после двукратной хроматографии на силикагеле и обращенной фазе 11-(Dcp-окси)ундекановую кислоту (V) получали с выходом 40%, ее превращали в *n*-нитрофениловый эфир (VI) обработкой *n*-нитрофенилтрифторацетатом в пиридине.

Длинноцепочечный ганглиозидный зонд (IX) синтезировали, вводя в реакцию лизоганглиозид GM1 (лизо-GM1) и *n*-нитрофениловый эфир (VI) в DMSO в присутствии триэтиламина. Зонд Dcp-GM1 (IX) выделяли гель-фильтрацией. Выход (98%) определяли взвешиванием, а также по УФ-поглощению Dcp-метки.

2. Короткоцепочечный Dcp-GM1-зонд (X)

Для получения зонда (X), несущего метку в непосредственной близости от полярной головки ганглиозида, схема синтеза была несколько изменена.

Получить *n*-нитрофенилоацетат (VII) аналогично эфиру (VI) с использованием *n*-нитрофенилтрифторацетата не удалось (последний реагент по хроматографическим свойствам практически не отличался от целевого продукта). Эфир (VII) получали этерификацией иодуксусной кислоты *n*-нитрофенолом в присутствии DCC. Структура полученного соединения подтверждена ¹H-ЯМР и элементным анализом.

Реакцию DcpOH с эфиром (VII) проводили в сухом ацетоне в присутствии триэтиламина. *n*-Нитрофениловый эфир Dcp-оксиуксусной кислоты (VIII) выделяли хроматографией на колонке с силикагелем (выход 84%). Структуру вещества подтвердил масс-спектрометрический анализ и спектр ¹H-ЯМР.

Фотореактивный ганглиозид, несущий остаток Dcp-оксиацетата (X), синтезировали из лизо-GM1 и *n*-нитрофенилового эфира Dcp-оксиуксусной кислоты (VIII) аналогично длинноцепочечному ганглиозидному зонду (IX). Выход составил 88%, что несколько меньше, чем в первом случае. Очевидно, это связано с пространственными затруднениями, возникающими при реакции ацилирования NH₂-группы сфингозинового основания.

Высокие выходы зондов (IX) и (X) мы объясняем преимуществами использования DMSO в качестве растворителя для реакции лизоганглиозида с активированными эфирами (VI) и (VIII), а также применением для очистки микромолярных количеств целевого продукта гель-фильтрации

вместо адсорбционной или обращенно-фазовой хроматографии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезе использовали 11-амиоундекановую кислоту, ангидрид трифторметансульфокислоты, трифторуксусный ангидрид, триэтиламин (Fluka, Швейцария); иодуксусную кислоту и уксусную кислоту ("х.ч.", Россия); DMSO, сухой пиридин (Merck, Германия). DCC (Serva, Германия) использовали в виде раствора в четыреххлористом углеороде с концентрацией 1 М. Сухой ацетон получали перегонкой над K₂CO₃, хлороформ – перегонкой над P₂O₅. Остальные реактивы и растворители (Реахим, Россия) использовали после обычной очистки. *n*-Нитрофенилтрифторацетат получали из *n*-нитрофенола и трифторуксусного ангидрида [38]. Диазоциклопентадиен-2-карбоновая кислота (DcpOH) синтезирована как описано [34]. Лизоганглиозид получен гидролизом природного ганглиозида [21].

Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (40–63 мкм; Merck, Германия), силикагель L (40–100 мкм и 100–160 мкм; Chemapol, Чехия), для хроматографии на обращенной фазе – силикагель RP-18 (25–40 мкм; Merck, Германия), для гель-фильтрации – сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция), для ТСХ – пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄, RP-18 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах: толуол–этилацетат–уксусная кислота, 50 : 10 : 1 (А); хлороформ–метанол, 9 : 1 (Б); метанол–вода, 7 : 3 (В); метанол–вода, 9 : 1 (Г); метанол–вода, 1 : 1 (Д); метанол–вода, 6 : 4 (Е); хлороформ–метанол, 1 : 1 (Ж); изопропанол–этилацетат–вода, 2 : 3 : 1 (З); обнаружение с помощью 5% раствора фосфорномолибденовой кислоты в спирте (а), воды (б), УФ-облучения (в), паров аммиака (г), 0.2% раствора нингидрина в спирте (д), резорцина (е). Упаривания проводили в вакууме при температуре не выше 40°C. Продукты реакции после очистки высушивали при 20 Па. Температуры плавления определяли на блоке Кофлера и не исправляли.

Все операции с веществами, содержащими Dcp-группу, проводили при желтом свете.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре LKB Ultrospec II 4050 (LKB, Швеция) в этаноле, масс-спектры – на приборе МСБХ (временноретный масс-спектрометр с ионизацией продуктами деления калифорния-252 при ускоряющем напряжении +15 эВ) (г. Сумы, Украина) или Finnigan MAT 9005 (ESI). ИК-спектры снимали на спектрометре Specord 75IR Carl Zeiss (ФРГ), спектры ¹H-ЯМР регистрировали на приборе Bruker WM-500 (США).

11-Гидроксундекановая кислота (I). К раствору 11-амиоундекановой кислоты (1 г, 5 ммоль) в 4 мл воды и 1 мл уксусной кислоты (5 мл) добав-

ляли раствор NaNO_2 (483 мг, 7 ммоль) в 2 мл воды. Реакционную смесь нагревали 1 ч на кипящей водяной бане (100°C) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Подкисляли 1 н. HCl до pH 3.0, экстрагировали хлороформом (3 × 5 мл) и фильтровали через вату. Фильтрат упаривали, высушивали и хроматографировали на колонке с силикагелем L (100–160 мкм), элюируя градиентом смеси изопропанол–уксусная кислота, 10 : 1, в хлороформе (0–10%). Получали 382 мг (38%) продукта (I) в виде твердого белого вещества, R_f 0.2 (А; а, б). Кристаллизовали из воды (белые иглы): т. пл. 64–65°C (лит. [39]: 65–66°C). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 1.29 (м, 12 H, $(\text{CH}_2)_6$); 1.55 (м, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$); 1.64 (м, 2 H, HOCH_2CH_2); 2.35 (т, 2 H, CH_2COOH); 3.64 (т, 2 H, HOCH_2). ИК (ν , cm^{-1}): 3620 (ОН), 2933 и 2860 (CH_2), 1700 (C=O), 1226 и 1200 (ОН, COOH).

Метиловый эфир 11-гидроксиундекановой кислоты (II). К 50 мл метанола по каплям добавляли 5 мл хлорангидрида уксусной кислоты при интенсивном перемешивании и сразу вводили в реакцию с кислотой (I) (200 мг, 1 ммоль). Слегка перемешивали реакцию 3.5 ч при 40°C, упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем L (40–100 мкм), элюируя системой Б. После упаривания получали 115 мг (53%) эфира (II) в виде бесцветного масла, R_f 0.45 (А; а).

Метиловый эфир 11-(трифторметилсульфоци)ундекановой кислоты (III). Эфир (II) (115 мг, 0.53 ммоль) растворяли в 6 мл сухого хлороформа и 70 мкл (0.87 ммоль) сухого пиридина и добавляли по каплям к раствору ангидрида трифторметансульфокислоты (144 мкл, 0.87 ммоль) в 6 мл сухого хлороформа при охлаждении на ледяной бане с солью (–10°C). Перемешивали 2 ч в токе аргона, поддерживая температуру 0°C. Промывали реакцию смесь водой (3 × 3 мл), органическую фазу фильтровали через вату, упаривали и высушивали. Получали 159 мг (86%) эфира (III) в виде бесцветного маслообразного вещества, индивидуального хроматографически, R_f 0.8 (А; а).

Метиловый эфир 11-(Дср-окси)ундекановой кислоты (IV). К раствору ДсрОН (20 мг, 0.15 ммоль) в 1 мл сухого ацетона с 80 мкл (0.58 ммоль) триэтиламина добавляли эфир (III) (159 мг, 0.46 ммоль) в 2.6 мл сухого ацетона. Реакционную смесь перемешивали 40 мин при комнатной температуре и упаривали. Продукт хроматографировали на колонке с силикагелем 60, элюируя градиентом этилацетата в гептане (0–7%). Получали 25 мг (50%) продукта (IV) в виде желтоватого маслообразного вещества, индивидуального хроматографически, R_f 0.63 (А; а, в). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 334 [M]⁺. УФ-спектр, λ_{max} , нм (ϵ): 215 (12400), 314 (15900). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 1.29 (м, 12 H, $(\text{CH}_2)_6$); 1.38 (м, 2 H); 1.61 (м, 2 H); 1.70 (т, 2 H, CH_2COO , J 6.72 Гц); 3.66 (с, 3 H, CH_3); 4.24 (т, 2 H, ДсрОСН₂);

6.07 (дд, 1 H^{4'}, $J_{4,5}$ 4.60 Гц, $J_{4,3}$ 3.20 Гц); 6.82 (дд, 1 H^{3'}, $J_{3,4}$ 3.18 Гц, $J_{3,5}$ 1.96 Гц); 7.02 (дд, 1 H^{5'}, $J_{5,4}$ 4.64 Гц, $J_{5,3}$ 1.96 Гц).

11-(Дср-окси)ундекановая кислота (V). Эфир (IV) (25 мг, 75 мкмоль) растворяли в 16 мл изопропанола и 0.4 мл 5% КОН, ведя контроль ТСХ (А; а, в) до появления следов отщепившейся ДсрОН. Останавливали реакцию подкислением 1 н. HCl до pH 7.0. После упаривания сухой остаток растворяли в 1 мл воды, подкисляли до pH 2.0–3.0 и экстрагировали хлороформом (3 × 0.5 мл). Экстракт промывали небольшим количеством воды и фильтровали через вату. Фильтрат хроматографировали на колонке с силикагелем 60, элюируя градиентом смеси изопропанол–уксусная кислота, 10 : 1, в хлороформе (0–5%). Объединяли фракции, содержащие продукт (V) и следовые количества ДсрОН, и хроматографировали на колонке с обращенной фазой, элюируя последовательно системами В и Г. Получали 8.2 мг (34%) кислоты (V) в виде желтоватого аморфного вещества, R_f 0.44 (А; а, в). УФ-спектр идентичен спектру эфира (IV).

***n*-Нитрофениловый эфир 11-(Дср-окси)ундекановой кислоты (VI).** *n*-Нитрофенилтрифторацетат (5.8 мг, 0.024 ммоль) в 200 мкл сухого пиридина выдерживали при комнатной температуре с кислотой (V) (4 мг, 12 мкмоль), слегка помешивая 5 ч. Реакционную смесь упаривали и хроматографировали на колонке с силикагелем 60, элюируя градиентом этилацетата в толуоле (0–2%). Получали 2.7 мг (50%) продукта (VI) в виде желтоватого масла, R_f 0.78 (А; а, в, г). Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 441.6 [M]⁺. Готовили базовый раствор эфира (VI) в DMSO с концентрацией 1 мкмоль/50 мкл.

***n*-Нитрофениловый эфир иодуксусной кислоты (VII).** Раствор *n*-нитрофенола (46 мг, 0.36 ммоль) в 3 мл сухого хлороформа и DCC (80 мг, 0.4 ммоль) охлаждали на ледяной бане до 0°C и добавляли при перемешивании к раствору иодуксусной кислоты (56 мг, 0.3 ммоль) в 3 мл сухого хлороформа. Выдерживали 1 ч при 0°C и оставляли на ночь при комнатной температуре. Раствор фильтровали через вату, упаривали, и сухой остаток, содержащий продукт (VII) и дициклогексилмочевину, растворяли в толуоле и снова фильтровали. Фильтрат хроматографировали на колонке с силикагелем 60, элюируя толуолом с 0.5% уксусной кислоты. Получали 51 мг (55%) продукта (VII), индивидуального хроматографически, R_f 0.8 (А; в, г). Кристаллизовали из этанола (белые кристаллы моноклинной формы): т. пл. 80°C. Элементный анализ, %: найдено С 31.24, Н 2.00, N 4.42, I 41.00; $\text{C}_8\text{H}_6\text{INO}_4$. Вычислено: С 31.29, Н 1.97, N 4.56, I 41.33. ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 3.95 (с, 2 H, ICH_2CO); 7.33 (д, 2 H, H², H⁶, $J_{2,3} = J_{6,5}$ 9.17 Гц); 8.30 (д, 2 H, H³, H⁵, $J_{3,2} = J_{5,6}$ 9.17 Гц).

***n*-Нитрофениловый эфир Дср-оксиуксусной кислоты (VIII).** Раствор ДсрОН (13.8 мг, 0.1 ммоль) в 1 мл сухого ацетона и 28 мкл (200 мкмоль) триэтиламина 2–3 мин перемешивали на магнитной мешалке и добавляли к нему эфир (VII) (31.5 мг, 0.1 ммоль) в 1 мл сухого ацетона. Раствор перемешивали в течение ночи. После упаривания сухой остаток нанесли на колонку с обращенной фазой, элюируя последовательно системами Д и Е. Получали 25 мг (80%) хроматографически индивидуального вещества (VIII), R_f 0.67 (А; в, г). Готовили раствор эфира (VIII) в DMSO с концентрацией 0.38 мкмоль/50 мкл. Масс-спектр (^{252}Cf), m/z : 315.7 $[M]^+$. $^1\text{H-ЯМР}$ (CDCl_3 , δ , м. д.): 5.04 (с, 2 Н, OCH_2COO); 6.14 (дд, 1 Н 4 , $J_{4'5'}$ 4.58 Гц, $J_{4'3'}$ 3.30 Гц); 6.97 (дд, 1 Н $3'$, $J_{3'4'}$ 3.10 Гц, $J_{3'5'}$ 2.14 Гц); 7.12 (дд, 1 Н $5'$, $J_{5'4'}$ 4.58 Гц, $J_{5'3'}$ 1.98 Гц); 7.36 (д, 2 Н, Н $2'$, Н $6'$, $J_{2'3'}$ = $J_{6'5'}$ 9.15 Гц); 8.30 (д, 2 Н, Н $3'$, Н $5'$, $J_{3'2'}$ = $J_{5'6'}$ 9.15 Гц).

11-(Дср-окси)ундеканол GM1 (IX). Триэтиламин (1 мкл, 7 мкмоль) и раствор эфира (VI) (530 мкг, 1.2 мкмоль) в 50 мкл DMSO добавляли к лизо-GM1 (1 мг, ~1 мкмоль) в 50 мкл DMSO. Выдерживали реакционную смесь 16 ч при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли каплю воды, 0.1 мл системы Е и наносили на колонку с сефадексом LH-20 (0.5 × 20 см), уравновешенную системой Е. Получали продукт (IX) (выход 98%, на основании УФ-поглощения), R_f 0.25, $R_{f\text{неч}}$ 0.07 (Д; а, в, д, е). $^1\text{H-ЯМР}$ (CD_3OD , δ , м. д.): 1.08 (т, 1 Н 3 , CH_3 , J 7.10 Гц); 1.45–1.55 (м, ~36 Н); 1.91 (м, 2 Н, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2.11 (дд~т, 1 Н 3_a NeuAc, α , J 12.10 Гц); 2.20 и 2.18 (2 с, 2 × 3Н, 2NAc); 2.36 (т, 2 Н, CH_2CO , J 7.52 Гц); 2.92 (дд, 1 Н 3_e NeuAc, α , 2J 12.20 Гц, 3J 4.42 Гц); 4.05 (м, 1 Н 2); 4.63, 4.55 и 4.49 (3 дд, 3 × Н1 гексапираноз, β , J 7.61 Гц, 8.03 Гц и 7.81 Гц); 5.64 (дд, 1 Н 4 при (E)C=C, $J_{4'5'}$ 15.21 Гц, $J_{4'3'}$ 7.78 Гц); 5.87 (дт, 1 Н 5 при (E)C=C, $J_{5'4'}$ 15.34 Гц, $J_{5'6'}$ 7.72 Гц); 6.26 (уш. дд, 1 Н $4'$, $J_{4'5'}$ 4.37 Гц, $J_{4'3'}$ 3.46 Гц); 6.97 (уш. т (дд), 1 Н $3'$, $J_{3'4'}$ 3.40 Гц, $J_{3'5'}$ 1.80 Гц); 7.35 (уш. дд, 1 Н $5'$, $J_{5'4'}$ 4.58 Гц, $J_{5'3'}$ 1.83 Гц). Масс-спектр (ESI), m/z : 1582.875 $[M_1 + H]^+$, 1604.869 $[M_1 + Na]^+$, 1620.837 $[M_1 + K]^+$; $\text{C}_{72}\text{H}_{119}\text{N}_5\text{O}_{33}$ $[M_1]^+$ соответствует 1581.7885 ($[M_1 + H]^+$ соответствует 1582.7963); 1610.912 $[M_2 + H]^+$, 1632.893 $[M_2 + Na]^+$, 1648.866 $[M_2 + K]^+$; $\text{C}_{74}\text{H}_{123}\text{N}_5\text{O}_{33}$ $[M_2]^+$ = $[M_1]^+$ + 2CH $_2$ соответствует 1609.8198 ($[M_2 + H]^+$ соответствует 1610.8276). УФ-спектр идентичен спектру эфира (VI).

(Дср-окси)ацетил GM1 (X). Ганглиозид (X) синтезировали аналогично зонду (IX) из лизо-GM1 (~1 мкмоль) и *n*-нитрофенилового эфира Дср-оксиуксусной кислоты (VIII) (380 мкг, 1.2 мкмоль). Получали продукт (X) (выход 88%, на основании УФ-поглощения), R_f 0.15 (Д; а, в, д, е). $^1\text{H-ЯМР}$ (CD_3OD , δ , м. д.): 1.09 (т, 1 Н 3 , CH_3 , J 7.10 Гц); 1.45–1.57 (м, ~22 Н); 2.20 (уш. с, 2 × 3 Н, 2 NAc); 2.85 (с, 2 Н, $\text{COCH}_2\text{ODср}$); 2.92 (дд, 1 Н 3_e NeuAc, α , 2J 12.20 Гц, 3J 4.40 Гц); 4.03 (м, 1 Н 2); 4.63, 4.59 и

4.50 (3 дд, 3 × 1 Н гексапираноз, β , J 7.60 Гц, 8.02 Гц и 8.02 Гц); 5.65 (дд, 1 Н 4 при (E)C=C, $J_{4'5'}$ 15.20 Гц, $J_{4'3'}$ 7.72 Гц); 5.89 (дт, 1 Н 5 при (E)C=C, $J_{5'4'}$ 15.32 Гц, $J_{5'6'}$ 7.70 Гц); 6.29 (уш. т (дд), 1 Н $4'$, $J_{4'5'}$ 4.30 Гц, $J_{4'3'}$ 3.30 Гц); 7.09 (уш. т, 1 Н $3'$); 7.40 (уш. дд, 1 Н $5'$, $J_{5'4'}$ 4.60 Гц, $J_{5'3'}$ 1.80 Гц). Масс-спектр (ESI), m/z : 1456.740 $[M_1 + H]^+$, 1478.714 $[M_1 + Na]^+$, 1494.701 $[M_1 + K]^+$; $\text{C}_{63}\text{H}_{101}\text{N}_5\text{O}_{33}$ $[M_1]^+$ соответствует 1455.6477 ($[M_1 + H]^+$ соответствует 1456.6555); 1484.723 $[M_2 + H]^+$, 1506.740 $[M_2 + Na]^+$, 1522.722 $[M_2 + K]^+$; $\text{C}_{65}\text{H}_{105}\text{N}_5\text{O}_{33}$ $[M_2]^+$ = $[M_1]^+$ + 2CH $_2$ соответствует 1483.6790 ($[M_2 + H]^+$ соответствует 1484.6868). УФ-спектр идентичен спектру эфира (VI).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.Б. Тузикову (ИБХ РАН) за помощь в интерпретации спектров $^1\text{H-ЯМР}$ и д-ру Бу Эку (Аграрный университет, Уппсала) за масс-спектры высокого разрешения. $^1\text{H-ЯМР}$ -спектры сняты при частичной поддержке Миннауки Российской Федерации (грант № 96-03-08) и РФФИ (№ 00-04-55024). Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 00-04-48922).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wiegandt H. // *Gangliosides*. New Comprehensive Biochemistry / Eds Neuberger A., van Deenen L.L.M. Amsterdam: Elsevier, 1985. V. 10. P. 199–260.
2. Sonnino S., Acquotti D., Riboni L., Giuliani A., Kirschner G., Tettamanti G. // *Chem. Phys. Lipids*. 1986. V. 42. P. 3–26.
3. Lencer W.L., Hirst T.R., Holmes R.K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1450. P. 177–190.
4. Callapi E., Masserini M., Schiavo G., Montecucco C., Tettamanti G. // *FEBS Lett*. 1992. V. 309. P. 107–110.
5. Fischman P.H., Pacuszka T., Orlandi P.A. // *Adv. Lipid Res*. 1993. V. 25. P. 165–187.
6. Karlsson K.-A. // *Annu. Rev. Biochem*. 1989. V. 58. P. 309–350.
7. Suzuki Y., Matsunaga M., Matsumoto M. // *J. Biol. Chem*. 1985. V. 260. P. 1362–1365.
8. Suzuki Y., Suzuki T., Matsunaga M., Matsumoto M. // *J. Biochem*. 1985. V. 97. P. 1189–1199.
9. Saggioro D., Sorio C., Calderazzo L., Panozzo M., Berton G., Chieco-Bianchi L. // *J. Biol. Chem*. 1993. V. 268. P. 1368–1375.
10. Yates A.J., Rampersaud A. // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1998. V. 845. P. 57–71.
11. Chan K.F. // *J. Biol. Chem*. 1989. V. 264. P. 18632–18637.
12. Chu J.W., Sharom F.J. // *Cell Immunol*. 1991. V. 132. P. 319–338.
13. Chen X.P., Ding X., Daynes R.A. // *Cytokine*. 2000. V. 12. P. 972–985.
14. Fredman P. // *Prog. Brain Res*. 1994. V. 101. P. 225–240.

15. Shurin G.V., Shurin M.R., Bykovskaia S., Shogan J., Lotze M.T., Barksdale E.M. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 363–369.
16. Bergelson L.D. // *Clin. Invest.* 1993. V. 71. P. 590–594.
17. Dyatlovitskaya E.V., Bergelson L.D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1987. V. 907. P. 125–143.
18. Shapiro R.E., Specht C.D., Collins B.E., Woods A.S., Cotter R.J., Schpaar R.L. // *J. Biol. Chemistry.* 1997. V. 272. P. 30380–30386.
19. Meier E.M., Schummer D., Sandhoff K. // *Chem. Phys. Lipids.* 1990. V. 55. P. 103–113.
20. Molotkovsky J.G., Mikhalyov I.I., Imbs A.D., Bergelson L.D. // *Chem. Phys. Lipids.* 1991. V. 58. P. 199–212.
21. Sonnino S., Chigorno V., Acquotti D., Pitto M., Kirschner G., Tettamanti G. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 77–84.
22. Neuenhofer S., Schwarzmann G., Egge H., Sandhoff K. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. P. 525–532.
23. Водовозова Е.Л., Молотковский Ю.Г., Бергelson Л.Д. // *Биоорганическая химия.* 1984. Т. 10. С. 1688–1694.
24. Fleming S.A. // *Tetrahedron.* 1995. V. 51. P. 12479–12520.
25. Hatanaka Y., Nakayama H., Kanaoka Y. // *Rev. Heteroat. Chem.* 1969. V. 14. P. 213–243.
26. Brunner J. // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. P. 483.
27. Dorman G., Prestwich G.D. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 5661–5673.
28. Peter J.A., Beck-Sickinger W.G., Beck-Sickinger A.G. // *J. Pept. Res.* 1997. V. 49. P. 373–383.
29. Cai S.X., Glenn D.J., Keana J.F.W. // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 1299–1305.
30. Weber T., Brunner J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 3084–3095.
31. Wilson C.J., Husein S.S., Stimson E.R., Dangott L.J., Miller K.W., Maggio J.E. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 4542–4551.
32. Nielsen P.E., Hansen J.B., Thomsen T., Buchardt O. // *Experientia.* 1983. V. 39. P. 1063–1072.
33. Карюхина М.О., Молотковский Ю.Г., Бергelson Л.Д. // *Биоорганическая химия.* 1988. Т. 14. С. 1256–1261.
34. Martin J.S., Bloch D.R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1971. V. 93. P. 451–459.
35. Uvarov V.Y., Sotnichenko A.I., Vodovozova E.L., Molotkovsky J.G., Kolesanova E.F., Lyulkin Y.A., Stier A., Krueger V., Archakov A.I. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 222. P. 483–489.
36. Водовозова Е.Л., Цибизова Е.В., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. С. 316–318.
37. Бюлер К., Пирсон Д. *Органические синтезы: Пер. с англ. М.: Мир, 1973. Т. 1. С. 201.*
38. Sakakibara S., Inukai N. // *Bull. Chem. Soc. Japan.* 1964. V. 37. P. 1231–1232.
39. Buckingham J., Donaghy S.M. // *Dictionary of Organic Compounds.* New York: Chapman and Hall, 1982. V. 3. P. 3262.

Synthesis of New Photoaffine Probes on the Basis of Ganglioside GM1

E. V. Tsibizova[#], E. L. Vodovozova, I. I. Mikhalev, and Yul. G. Molotkovsky

[#] Phone: +7 (095) 330-6610; e-mail: parfin@mail.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia*

New photoaffine probes, photoreactive derivatives of ganglioside GM1 bearing a carbene-generating diazocyclopentadien-2-ylcarbonyl group at various distances from the carbohydrate moiety in their molecules, were synthesized. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: diazocyclopentadien-2-ylcarbonyl label, gangliosides, lipid derivatives, photoaffinity labeling