



УДК 577.07

© 1994 Ю. Б. Павлова, Е. Л. Водовозова, Юл. Г. Молотковский

СИНТЕЗ ФОТОРЕАКТИВНОГО ДИГЛИЦЕРИДА — ЛИГАНДА  
ПРОТЕИНКИНАЗЫ С*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: 1,2-диглицерид, фотореактивно меченный, протеинкиназа С.

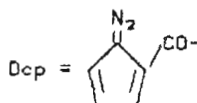
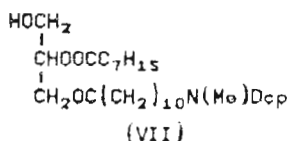
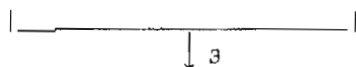
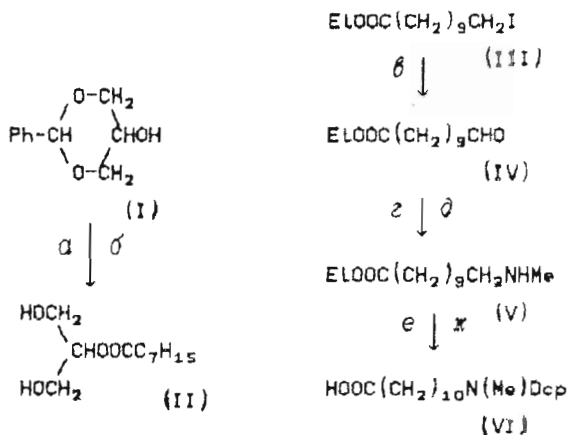
Описан синтез 1,2-диглицерида, содержащего остаток N-метил-12-(2-диазоциклопентадиенкарбониламино)додекановой кислоты и способного активировать протеинкиназу С.

Протеинкиназа С (ПКС) — важнейший компонент системы передачи сигнала от рецептора внутрь клетки. В процессе передачи вторичными передатчиками сигнала являются 1,2-диглицериды (образуются в результате расщепления фосфоинозитидов), которые при участии ионов кальция и фосфатидилсерина активируют ПКС (см. обзоры [1, 2]). ПКС представляет собой семейство ферментов [2], изучение которых начато сравнительно недавно; это интенсивно разрабатываемая область современной биологии.

Одним из направлений здесь является исследование пространственной организации молекулы ПКС и ее активного центра. Инструментами для таких работ могут служить зонды — аналоги 1,2-диглицеридов (флуоресцентные, фотореактивные и др.). Важно, чтобы эти зонды по своему строению отвечали требованиям, предъявляемым ПКС к своему лиганду, — диглицерид должен иметь 1,2-*sn*-строение; достаточную длину ацильных цепей; по-видимому, важно и отсутствие заместителей, ограничивающих подвижность функциональных групп [2]. Лютый и Ацци описали синтез предназначенных для исследования ПКС флуоресцентного и фотореактивного 1,2-диглицеридов с остатками соответственно 12-дансиламинододекановой и 12-(4-азидо-2-нитрофениламино)додекановой кислот [3].

Мы в продолжение наших работ по исследованию ПКС [4] разработали синтез фотореактивного аналога 1,2-диглицерида (см. схему), имеющего в качестве фотореактивной метки 2-диазоциклопентадиенкарбонильный (Dcp) остаток. Эта метка, легко генерирующая при УФ-облучении высокоактивный карбен, способный внедряться в неактивированную связь C—H [5], имеет преимущество перед нитренгенерирующими хромофорами (например, азидонитрофенильным, примененным в упомянутом выше диглицериде [3]), поскольку проявляет меньшую избирательность при фотопрививке к окружающим молекулам.

В качестве одного из ацильных остатков мы применили *n*-октаноильный, так



- а)  $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{COCl}$ /пиридин; б)  $\text{H}_2\text{BO}_2$ / $(\text{MeO})_3\text{B}$ ; в)  $\text{Me}_2\text{NO}$ ; г)  $\text{MeNH}_2$ ;  
 д)  $\text{NaBH}_4$ ; е)  $\text{DcpOH}$ / $\text{DCC}$ /диметиламинопиридин; ж)  $\text{OH}^-$ ;  
 з)  $\text{DCC}$ /4-пирролидинопиридин.

как 1,2-*sn*-диоктаноилглицерин является весьма активным активатором ПКС (см., например, [6]). Вторым ацильным остатком — носителем фотореактивной группы — был 11-метиламиноундеканоильный, соответствующий эфир (V) получали (см. схему) из эфира 11-иодундекановой кислоты (III) реакцией с метиламином и последующим боргидридным восстановлением основания Шиффа. Этот путь дает возможность введения в ацильный остаток радиоактивной метки — либо через  $(^{14}\text{C})$ -метиламин, либо путем использования бортригида для восстановления Шиффова основания. Ацилирование аминоэфира (V) 2-диазочиклопентадиеновой кислотой и удаление этильной группы приводили к фотореактивной кислоте (VII).

Другое промежуточное вещество, 2-октаноилглицерин (II), получали из 1,3-бензилиденглицерина (I) октаноилированием с последующим удалением бензилиденовой защиты действием борной кислоты и триметилбората в условиях, сводящих к минимуму 2→1-ацильную миграцию [7]. Данные  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии (см. «Экспериментальную часть») показали, однако, что полученное вещество представляло собой смесь 2-моноглицерида (II) и его 1-изомера в соотношении ~3:2. В спектре полученного вещества сигналы глицериновых протонов 2-изомера (II) представлены дублетом от групп  $\text{CH}_2\text{OH}$  и квинтетом от  $\text{CHON}$  в слабом поле; 1-изомер дает мультиплет

от группы  $\text{C}\ddot{\text{N}}\text{OH}$  в более сильном поле и четыре дублета дублетов от протонов  $\text{C}\ddot{\text{H}}_2\text{OH}$  и  $\text{C}\ddot{\text{H}}_2\text{OCO}$  (ср. [8]).

Образование в значительном количестве 1-глицерида, несомненно, обусловлено тем, что короткий ацильный остаток (октаноил) в большей степени склонен к ацильной миграции по сравнению с длинными (пальмитоил, стеароил и т. п.) [9]. Хроматографическое разделение изомеров не имело успеха прежде всего потому, что изомеризация, по данным ТСХ, происходила также в ходе хроматографии. Поэтому моноглицерид (II), без отделения примеси изомера, ацилировали фотореактивной кислотой (VI); образовавшуюся смесь продуктов удалось разделить колоночной хроматографией на силикагеле.

В результате мы получили фотореактивный 1,2-диглицерид (VII), строение которого было подтверждено данными УФ-, ИК- и масс-спектров. Судя по данным ТСХ и тому, что диглицерид (VII) полностью тритилируется в мягких условиях — под действием трифенилхлорметана в пиридине при комнатной температуре, что характерно только для первичной гидроксигруппы, — это вещество не имеет заметной примеси 1,3-диглицерида.

Предварительные эксперименты показали, что диглицерид (VII) является удовлетворительным активатором протеинкиназы С.

### Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Beckman Acta MVI (Англия) в этаноле, ИК-спектры — на спектрофотометре UR II (Carl Zeiss, ГДР), спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР — на приборе Bruker WM 500 (ФРГ), масс-спектры (ионизация электронным ударом) — на приборе Varian MAT 445 (США). Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (63—200 мкм) и нейтральную окись алюминия (III ст. акт.; Reanal, Венгрия), для ТСХ — готовые пластинки с силикагелем 60  $F_{254}$  (Merck, ФРГ), а также пластинки Silufol UV<sub>254</sub> (Kavalier, ЧСФР). Обнаружение при ТСХ осуществляли фосфорномолибденовой кислотой (А), специфическим реагентом на сложноэфирные группы [10] (Б), УФ-облучением (В), 2,4-динитрофенилгидразином (Г), а также парами иода (Д).

Использовали дициклогексилкарбодиимид (DCC), 4-пирролидинопиридин, триметилборат и 4-диметиламинопиридин (Fluka, Швейцария), остальные реактивы — отечественного производства. Растворители очищали по обычным методикам. Все операции с веществами, имеющими Dcp-группу, проводили при желтом свете ( $\lambda < 500$  нм); колоночная хроматография этих соединений длилась не более 4 ч. Растворы выпаривали в вакууме при температуре не выше 40° С.

1,3-Бензилиденглицерин [7], 2-диазоциклопентадиенкарбоновую кислоту [11], этиловый эфир 11-иодундекановой кислоты [12] и сухой триметиламиноксид [13] получали как описано ранее, октаноилхлорид — кипячением *n*-октановой кислоты с избытком хлористого тионила и последующей перегонкой в вакууме, т. кип. 78—80° С/20 кПа.

**2-Октаноилглицерин (II).** К раствору 5,3 г (ммоль) 1,3-бензилиденглицерина в 15 мл сухого хлороформа и 5 мл сухого пиридина при 0—5° С добавляли за 15 мин 4,7 г (ммоль) октаноилхлорида и оставляли на 18 ч при 20° С. Смесь разбавляли эфиром, промывали 0,2 н. HCl, охлажденной до 0° С, водой и 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , хроматографией на окиси алюминия в градиенте гексан — эфир выделяли 3 г (33%) маслообразного 1,3-бензилиден-2-октаноилглицерина (I), индивидуального хроматографически (ТСХ в системе гексан — эфир, 3:1, обнаружители Б — Д;  $R_f$  0,56). Масс-спектр,  $m/z$ : 306 ( $[M]^+$ ), 229 ( $[M - \text{Ph}]^+$ ), 162 ( $[M - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{COOH}]^+$ ). ИК (с KBr),  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 1740 с (сл. эфир).

К раствору 300 мг (0,98 ммоль) соединения (I) в 1,5 мл триметилбората добавляли 190 мг тонкорастертой сухой борной кислоты и нагревали с перемешиванием до полного растворения последней (~ 15 мин; температура до 100° С), затем отгоняли растворитель и выдерживали смесь 20 мин при 100° С. Охлаж-

денную смесь разбавляли эфиром, промывали водой; хроматографией на силикагеле в градиентной системе гексан — этилацетат выделяли 120 мг (56%) смеси диглицерида (II) и его 1-изомера (соотношение 6 : 4; данные спектра <sup>1</sup>H-ЯМР), индивидуальной хроматографически, *R<sub>f</sub>* 0,25 в системе эфир — гексан, 6 : 1 (обнаружители *B*, *D*). <sup>1</sup>H-ЯМР (C<sup>2</sup>HCl<sub>3</sub>), δ, м. д.: 0,88 (т, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,27—1,44 (шир. м, 10H, протоны алифатич. цепи), 2,36 (т, 2H, COCH<sub>2</sub>); сигналы глицерида (II): 3,84 (д, 1-H, 3-H, <sup>3</sup>J 4,4 Гц), 4,93 (квинтет, 2-H, <sup>3</sup>J 4,4 Гц); сигналы 1-октаноилглицерина: два дд от CH<sub>2</sub>OH — 3,64 (<sup>2</sup>J 11,2, <sup>3</sup>J 6,0 Гц) и 3,75 (<sup>2</sup>J 11,2, <sup>3</sup>J 4,3 Гц), мультиплет от CHOH, имеющий вид несимметричного квинтета, и два дублета дублетов от CH<sub>2</sub>OOC — 4,20 (<sup>2</sup>J 10,0, <sup>3</sup>J 5,7 Гц) и 4,27 (<sup>2</sup>J 10,0, <sup>3</sup>J 4,2 Гц). ИК (пленка), ν, см<sup>-1</sup>: 3200—3600 (OH), 1730 (сл. эфир).

*10-Этоксикарбонилдеканаль (IV)*. К раствору 1 г (13 ммоль) сухого триметиламиноксида в 8 мл хлороформа и 4 мл диметилформамида (растворяли при 70° С) при 20° С в атмосфере сухого аргона прибавляли по каплям при перемешивании раствор 1,1 г (3,2 ммоль) этил-11-иодундеканоата (III). Смесь выдерживали 50 мин при 70° С, контролируя ход реакции ТСХ в системе гексан — этилацетат, 6 : 1 (обнаружители *A*, *B*, *Г*); затем смесь разбавляли 15 мл гексана, промывали 5% HCl, трижды водой, дважды 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (по 10 мл), остаток из экстракта хроматографировали на силикагеле в градиентной системе гексан — этилацетат, получали 0,28 г (37%) альдегидоэфира (IV) в виде бесцветного масла (*R<sub>f</sub>* 0,5 в указанной системе), неустойчивого в обычных условиях (легко окисляется и образует олигомеры), которое хранили под аргоном при —50° С. 2,4-Динитрофенилгидразон, желтые кристаллы, т. пл. 62—63° С (из метанола), масс-спектр, *m/z*: 408 ([M]<sup>+</sup>), 363 ([M — OEt]<sup>+</sup>).

*Этиловый эфир 11-метиламиноундекановой кислоты (V)*. К раствору 0,14 г (0,6 ммоль) альдегидоэфира (IV) в 5 мл метанола при перемешивании добавляли 1 мл 30%-ного раствора метиламина в метаноле и через несколько секунд 0,14 г (3,7 ммоль) боргидрида натрия. Смесь перемешивали до прекращения выделения газа (~ 30 мин) и упаривали. К остатку добавляли 10 мл эфира, промывали водой (4×10 мл), высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, упаривали и высушивали 1 ч при 10 Па. Получали 106 мг (69%) маслообразного аминоэфира (V), индивидуального при ТСХ, *R<sub>f</sub>* 0,5 в системе хлороформ — метанол — CH<sub>3</sub>COOH — вода, 65 : 35 : 1 : 1 (обнаружители *A*, *B* и нингидрин); масс-спектр, *m/z*: 242 ([M — H]<sup>+</sup>), 227 ([M — H — CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 214 ([M — H — CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>). ИК (пленка), ν, см<sup>-1</sup>: 3200—3600 (NH), 1740 (сл. эфир).

*11-[N-(2-Диазоциклопентадиенилкарбонил)-N-метил]аминоундекановая кислота (VI)*. К раствору 25 мг (0,1 ммоль) эфира (V), 15 мг (0,1 ммоль) 2-диазоциклопентадиенкарбоновой кислоты и 15 мг 4-диметиламинопиридина в 0,8 мл сухого хлороформа добавляли в атмосфере сухого аргона 50 мкл 20% раствора DCC в CCl<sub>4</sub> и через 18 ч добавляли еще 2 раза по 50 мкл раствора DCC с интервалом 6 ч, выдерживали 20 ч и упаривали. Остаток перемешивали 10 мин с 15 мл гексана, фильтровали, из фильтрата хроматографией на силикагеле в градиентной системе гексан — эфир (контроль — ТСХ в системе гексан — эфир — CH<sub>3</sub>COOH, 30 : 30 : 1, обнаружители *A*, *B*, *D*) выделяли 30 мг (70%) маслообразного этилового эфира Дср-кислоты, *R<sub>f</sub>* 0,5. Масс-спектр, *m/z*: 361 ([M]<sup>+</sup>), 333 ([M — N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>). УФ (этанол), λ<sub>макс</sub>, нм (lg ε): 205 (4,13), 231 (4,08), 313 (4,20). ИК (в вазелиновом масле), ν, см<sup>-1</sup>: 2108 (=N<sub>2</sub>), 1730 (сл. эфир), 1605 (амид I).

К раствору 11 мг эфира Дср-кислоты в 10 мл изопропанола добавляли 5 мг 2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-крезола (антиоксидант) и 0,35 мл 5% KOH, выдерживали 5 ч в темноте и упаривали. К остатку добавляли 2 мл воды, подкисляли 5% HCl до pH 3, экстрагировали хлороформом (2×5 мл). Экстракт промывали водой (5 мл), высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали, из остатка хроматографией на силикагеле (элюирование системой гексан — этилацетат — CH<sub>3</sub>COOH, 50 : 15 : 1) выделяли

7 мг кислоты (VI) в виде слабо-желтого аморфного вещества, индивидуального хроматографически,  $R_f$  0,4 в той же системе (обнаружители А, В). УФ-спектр повторяет спектр этилового эфира Дср-кислоты.

*гас-1-[11-[N-(2-Диазоциклопентадиенилкарбонил)-N-метил]аминоундеканоил]-2-октаноилглицерин (VII)*. К раствору 8 мг (23 мкмоль) кислоты (VI), 20 мг (0,1 ммоль) 2-октаноилглицерина (II) и 35 мг 4-пирролидинопиридина в 4 мл сухого хлороформа в атмосфере сухого аргона прибавляли 80 мкл 20% раствора ДСС в  $CCl_4$ . Через 12 ч добавляли еще 60 мкл раствора ДСС, выдерживали 12 ч и упаривали. Остаток, по данным ТСХ в системе гексан — этилацетат —  $CH_3COOH$ , 20 : 10 : 0,3 (обнаружители А, Б, В), не содержал кислоты (VI); присутствовало несколько Дср-соединений (характерное тушение флуоресценции силикагеля  $F_{254}$ ), из которых наиболее полярное (и обильное) имело  $R_f$  0,33 (целевой продукт), еще два Дср-вещества, присутствовавших в заметных количествах, — предположительно изомер положения диглицерида (VII) и дидиклогексилуреид Дср-кислоты (VI). Диглицерид (VII) выделяли колоночной хроматографией в градиентной системе гексан — этилацетат в виде слабо-желтого аморфного вещества, выход 9 мг (65%). Масс-спектр,  $m/z$ : 533 ( $[M]^+$ ), 505 ( $[M - N_2]^+$ ). УФ (этанол),  $\lambda_{max}$ , нм ( $lg \epsilon$ ): 205 (4,32), плечо 231 (4,10), 313 (4,20). ИК (в  $CCl_4$ ),  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ : 3200—3600 (ОН), 2108 ( $=N_2$ ), 1735 (сл. эфир), 1610 (амид I).

Раствор 0,2 мг диглицерида (VII) в 0,2 мл толуола обрабатывали в атмосфере аргона 10 мкл пиридина и 5 мг трифенилхлорметана (12 ч при 20° С). Продукт реакции (по данным ТСХ в системе толуол — эфир —  $CH_3COOH$ , 50 : 30 : 1, обнаружители А, В, а также 50%  $H_2SO_4$  — реагент на трифенилметильные соединения, образующие характерные желтые пятна) не содержал исходного диглицерида; присутствовали трифенилметанол ( $R_f$  0,9) и трифенилметильное производное диглицерида с  $R_f$  0,75.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nishizuka Y.//Trends Biochem. Sci. 1984. V. 9. № 4. P. 163—166.
2. Bell R. M., Burns D. J.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 8. P. 4661—4664.
3. Luthy R., Azzi A.//Eur. J. Biochem. 1987. V. 162. № 2. P. 387—391.
4. Severin S. E., Tovmasyan E. K., Shvets V. I., Molotkovsky J. G., Bergelson L. D.//FEBS Lett. 1988. V. 232. № 2. P. 286—288.
5. Карюхина М. О., Молотковский Ю. Г., Бергельсон Л. Д.//Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1256—1261.
6. Kikkawa U., Nishizuka Y.//Annu. Rev. Cell. Biol. 1986. V. 2. P. 149—178.
7. Mattson F. H., Volpenhein R. A.//J. Lipid Res. 1962. V. 3. № 3. P. 281—296.
8. Lok C. M.//Chem. Phys. Lipids. 1978. V. 22. № 4. P. 323—337.
9. Sardarevich B.//J. Amer. Oil Chem. Soc. 1967. V. 44. № 7. P. 381—393.
10. Tate M. E., Bishop C. T.//Can. J. Chem. 1962. V. 40. № 6. P. 1043—1048.
11. Martin J. C., Bloch D. R.//J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. № 2. P. 451—459.
12. Бергельсон Л. Д., Вавер В. А., Ковтун В. Ю., Сенявина Л. Б., Шемякин М. М.//Журн. общ. химии. 1962. Т. 32. № 6. С. 1802—1809.
13. Franzen V., Otto S.//Chem. Ber. 1961. V. 94. № 4. S. 1360—1363.

Поступила в редакцию  
20. IX. 1993

*Yu. B. Pavlova, E. L. Vodovozova, Jul. G. Molotkovsky*

**SYNTHESIS OF THE PHOTOAFFINE DIGLYCERIDE, A LIGAND OF  
PROTEIN KINASE C**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Synthesis of a ligand of protein kinase C, 1,2-diglyceride bearing a residue of N-methyl-12-(diazocyclopentadienecarbonylamino)dodecanoic acid is described.