



УДК 547.953.2.057:577.352.2.088.55:577.336

## СИНТЕЗ ФОТОРЕАКТИВНЫХ НЕОГЛИКОЛИПИДНЫХ ЗОНДОВ – ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕМБРАННЫХ ЛЕКТИНОВ

© 2004 г. Е. Л. Водовозова<sup>#</sup>, Г. В. Пазынина, А. Б. Тузиков,  
И. В. Гречишникова, Юл. 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 03.10.2002 г. Принята к печати 10.12.2002 г.

Разработан метод синтеза фотоаффинных неогликолипидных зондов, несущих высокоэффективную карбенгенерирующую диазоциклопентадиен-2-илкарбонильную (Dcp) метку, обладающую способностью радиоiodироваться в условиях стандартного окислительного процесса. Зонды предназначены для встраивания в липидный бислой липосом и представляют собой липофильные гликоконъюгаты на основе амфифильного агликона, построенного из диацилглицерина и полиэтиленгликольного спейсера (степень полимеризации 9–16), несущего Dcp-метку на терминальном звене. Расположение метки в агликоне обеспечивает возможность получения в одну стадию широкого набора зондов с использованием различных углеводных синтонов. Синтезированы фотоаффинные неогликоконъюгаты, содержащие олигосахариды сиалил-LewisX и трисахарид А, являющиеся специфическими для клеток ряда опухолей. Получен также зонд, несущий неактивный пентаол (остаток аминокдезоксиглюцита), предназначенный для контроля неспецифического связывания. Dcp-метка связана с остальной частью молекулы зонда лабильной в щелочных условиях сложноэфирной связью, что упрощает анализ продуктов сшивки после фотоаффинного мечения.

*Ключевые слова:* диазоциклопентадиен-2-илкарбонильная метка; лектины; липосомы; неогликоконъюгаты; радиоiodирование; фотореактивное мечение.

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что опухолевые клетки экспонируют на своей поверхности лектины – специфические углеводсвязывающие белки, которые на поверхности нормальных клеток экспрессируются, как правило, в меньшей степени [1]. Это явление было предложено использовать для направленной транспортировки носителей цитотоксических препаратов к опухолевым клеткам с помощью специфических углеводных лигандов [2–6]. Специфичность связывания при взаимодействиях углевод–лектин определяется не только структурой, но и валентностью терминальных остатков сахаров (подразумевается количество этих остатков). Углеводный лиганд сам по себе обладает весьма низким сродством к лектину ( $K_d \sim 1$  мМ). Оно резко возрастает при переходе к би- и триденатным антеннообразным структурам неогликоконъюгатов ( $K_d \sim 0.01$  мМ и  $\sim 0.1$  мкМ соответственно) [7] или к поливалентным неогликоконъюгатам на гибкой полимерной матрице [8]. Это связано с образованием углеводных кластеров, которые

обеспечивают олиго- или поливалентные (мультивалентные) взаимодействия с лектинами, аналогичные тем, которые реализуются при распознавании олигосахаридов природных гликоконъюгатов мультисубъединичными лектинами или множественными копиями молекул лектинов на поверхности клетки. Причем показано, что для эффективного взаимодействия с лектинами важна не просто плотность углеводного лиганда внутри кластера, но и организация его в мини- или макси-кластеры, поскольку молекулы лектинов на клеточной мембране определенным образом сгруппированы [9].

В качестве носителей для доставки лекарств были предложены поливалентные синтетические неогликоконъюгаты (неогликопротеины [10], гликоконъюгаты на основе полимеров [11], дендримерные неогликоконъюгаты [9]) и липосомы, несущие на поверхности специфические углеводные детерминанты (векторы) [4, 5, 12–16]. Липосомы представляют особый интерес, поскольку за счет латеральной диффузии в липидном бислое молекулы углеводного вектора могут не только концентрироваться и образовывать мультивалентный кластер в зоне контакта с единичным рецептором [12], но и “подстраиваться” при

Сокращения: Dcp – диазоциклопентадиен-2-илкарбонил; ТЕА – триэтиламин; ПЭГ – полиэтиленгликоль; Нр – *n*-нитрофенил; Tfd – 3-(трифторметил)-3-фенилдиазирин.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-6610; факс: (095) 330-6601; эл. почта: elvod@ibch.ru).

кластеризации под структурированные на поверхности клетки молекулы лектина [5].

Внутриклеточный транспорт и метаболизм лекарственных липосом, а следовательно, и эффективность действия доставленного ими препарата зависят от механизма их эндоцитоза опухолевыми клетками. Первым этапом взаимодействия векторная липосома–клетка, очевидно, является связывание со специфическим мембранным рецептором-лектином. При идентификации и выделении рецепторов метод фотоаффинного зондирования показал высокую эффективность (см., например, обзор [17]). Карбенгенерирующая диазоциклопентадиен-2-илкарбонильная (Dcp) группа была предложена для фотоаффинного мечения в экспериментах на модельной системе Нильсеном и др. [18]. Она была успешно применена нами для изучения мембранной топографии цитохрома P-450, где использовались  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -меченые фосфатидилхолины и сфингомиелины [19], а также в исследовании организации многосубъединичного мембранного фрагмента митохондриальной АТФ-синтазы с помощью масс-спектрометрии [20].

Недавно мы обнаружили, что Dcp-группа легко иодируется в окислительных условиях [21]. По своим фотохимическим характеристикам иодированная Dcp-метка не уступает иодированной карбенгенерирующей 3-(трифторметил)-3-фенилдиазиринной (Tfd) метке [22], которая на сегодня признана наиболее эффективной из известных фотоаффинных группировок [17, 23–25]. В настоящей работе представлен синтез новых фотореактивных неогликолипидных зондов – липосомных векторов, несущих Dcp-метку, которые после введения  $^{125}\text{I}$  предполагается использовать для изучения рецепторов-лектинов на поверхности опухолевых клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

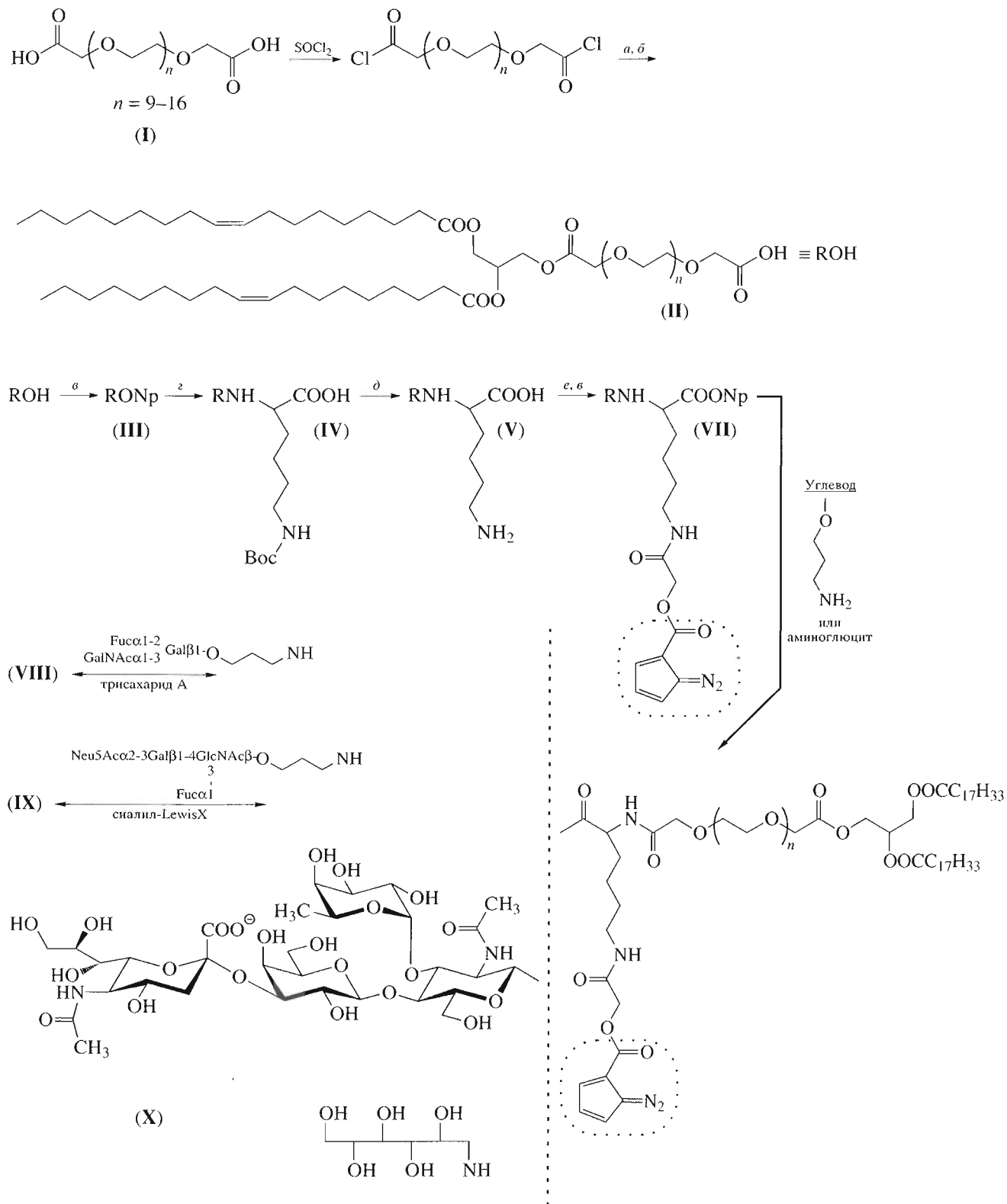
При конструировании молекулы зонда-гликоконъюгата фотореактивная метка должна располагаться в непосредственной близости от углеводной детерминанты и, в то же время, не должна нарушать ее структуру. Ранее мы разработали простой и удобный метод получения углеводных векторов для липосом, исходя из детергента луброла PX [15], основным компонентом которого является простой гептадециловый эфир полиэтиленгликоля (ПЭГ) со степенью полимеризации 7–10. После окисления терминального гидроксила луброла перманганатом в щелочной среде карбоксильную функцию активировали, переводя в *n*-нитрофениловый эфир, и им ацилировали  $\text{NH}_2$ -группу 3-аминопропилгликозидов. Для получения фотоаффинных углеводных липосомных векторов необходимо было разработать новую схему, так как гидрофильная часть таких конъюгатов более объемиста и массивна: помимо углеводной детерми-

нанты, она должна содержать Dcp-метку и соответствующий линкер. В качестве последнего мы выбрали остаток  $\epsilon$ -*N*-(оксиметилкарбонил)лизина. Кроме того, для повышения эффективности взаимодействия с рецептором на поверхности опухолевой клетки было желательным увеличить длину ПЭГ-спейсера между гидрофобным мембранным якорем и углеводным остатком, связанным с фотометкой. С учетом указанных критериев, для удерживания в мембране липосом фотоаффинные гликоконъюгаты следовало снабдить более надежным, в отличие от гептадецилового остатка луброла, диглицеридным якорем с двумя жирными ацильными цепями.

Исходный реагент – дикарбоксиметилированный по терминальным ОН-группам ПЭГ (**I**) (степень полимеризации 9–16, пик приходится на 11, по данным МС) переводили в дихлорангидрид реакцией с хлористым тиоилом в присутствии карбоната натрия (схема). Синтетический *rac*-1,2-диолеилглицерин вводили в реакцию с 6–10-кратным избытком дихлорангидрида в присутствии триэтиламина в хлороформе. Чтобы избежать ацильной миграции под действием свободного HCl, образующегося при закислении реакционной среды за счет частичной деградации избытка дихлорангидрида, в среде поддерживали небольшой избыток триэтиламина. После гидролиза реакционной смеси получали ПЭГ-диглицерид (**II**), который выделяли из органической фазы, сначала отделив избыток дикарбоновой ПЭГ-кислоты гель-фильтрацией на липофильном сефадексе LH-20, хроматографией на силикагеле. Выход продукта (**II**) составил ~50%; структура подтверждена МС и  $^1\text{H}$ -ЯМР.

Далее схема синтеза зондов предусматривает постепенное наращивание молекулы за счет реакций между синтоном с относительно большой молекулярной массой и низкомолекулярным соединением, по возможности вводимым с избытком. Это позволяет использовать для выделения чистых продуктов гель-фильтрацию, при которой, в отличие от адсорбционной хроматографии, потери вещества существенно меньше. Данное обстоятельство особенно важно при работе с субмикромольными количествами гликозидов и с веществами, содержащими фотоаффинную метку, склонную к необратимой адсорбции на силикагеле.

ПЭГ-кислоту (**II**) превращали в *n*-нитрофениловый эфир (**III**) обработкой *n*-нитрофенилтрифторацетатом (3–5 экв.) в пиридине с количественным выходом после гель-фильтрации и вводили в реакцию с небольшим избытком  $\epsilon$ -Woc-лизина в DMSO в присутствии TEA. После гель-фильтрации получали конъюгат (**IV**), содержащий следовые количества  $\epsilon$ -Woc-лизина. Продукт обрабатывали TFA для деблокирования аминоконъюгата и гель-фильтрацией освобождались от примеси лизина. Выход соединения (**V**) составил 85% в



Реагенты: а) *rac*-1,2-диолеонилглицерин, 0.1 экв.; б) вода; в) *n*-нитрофенилтрифторацетат, пиридин; г) ε-Вос-лизин, TEA, DMSO; д) TFA; е) *n*-нитрофениловый эфир Дср-оксиуксусной кислоты. Дср-группа выделена штриховой рамкой.

расчете на эфир (III). Конъюгат (V) вводили в реакцию с *n*-нитрофениловым эфиром Dcp-оксуксусной кислоты (1.5 экв.) и с выходом 90% получали кислоту (VI), представляющую собой липофильный агликон в структуре фотоаффинных углеводных векторов. Карбоксил синтона (VI) *n*-нитрофенилировали, как описано выше, и выделяли активированный эфир (VII) (выход 92%); его структура подтверждена <sup>1</sup>H-ЯМР. Вещество можно длительное время (месяцы) хранить в глубоком холоде (-70°C) и использовать по мере необходимости для получения субмикромольных количеств углеводных зондов ацилированием соответствующих 3-аминопропилгликозидов или родственных соединений.

Мы таким путем синтезировали фотоаффинные векторы, несущие трисахарид A (VIII) и тетрасахарид сиалил-LewisX (IX). Выбор указанных углеводных детерминант объясняется тем, что они, по нашим данным, являются специфическими для клеток ряда опухолей: аденокарциномы молочной железы мышей с высокой частотой спонтанного развития [16], карциномы легкого Льюис и метастазов этой опухоли, а также меланомы M3 (собственные предварительные данные). Аминопропилгликозиды (1.1–1.2 экв.) реагировали с эфиром (VII) в смеси хлороформ–метанол в течение нескольких минут, тогда как в DMSO целевые продукты не обнаруживались даже через сутки. Возможно, этот эффект связан с образованием в DMSO той или иной мицеллярной формы конъюгата (VII), в которой активированный карбоксил оказывается экранированным. Зонды (VIII) и (IX) были получены с выходами ~50%. В качестве контрольного зонда для определения неспецифического связывания был также синтезирован фотоаффинный конъюгат аминодезоксиглюцита (X). Следует отметить, что Dcp-группа связана с остальной частью довольно крупных молекул полученных зондов (молекулярная масса неогликоконъюгата (IX) в среднем равна 2400 Да) лабильной в щелочных условиях сложноэфирной связью, что должно упростить анализ продуктов фотоаффинного мечения.

Для детектирования и изучения продуктов сшивки фотореактивный зонд должен содержать репортерную группу, в качестве которой короткоживущая радиоактивная метка позволяет добиться наибольшей чувствительности. Универсального метода введения радиоизотопа в зонд на последней стадии его получения, что необходимо, если изотоп обладает высокой энергией излучения, не существует. Для ряда известных фотореактивных групп были разработаны методы функционализации, позволяющие вводить <sup>125</sup>I. Однако синтез зондов в этом случае значительно усложняется. Так, Бруннер и Вебер предложили вводить в Tfd-группу трибутилстаннильный остаток, который легко заменить на йод действием NaI и

окислителя, однако, чтобы получить SnBu<sub>3</sub>-производное, требуется сложный 10-стадийный синтез [23]. С этим, отчасти, связаны исследования по разработке нерадиоактивных фотореактивных зондов, несущих в качестве репортерной группы остаток, обладающий высокой аффинностью к моноклональному антителу или стрептавидину (биотин).

В немногочисленных опубликованных работах по синтезу и применению фотоаффинных гликоконъюгатов для изучения углеводсвязывающих белков использованы нерадиоактивные методы детектирования. Так, Лаук и соавт. синтезировали углеводные зонды, представляющие собой конъюгаты моносахаридов с лизиллизином, меченным нитренгенерирующей 4-азидо-2-нитрофенильной группой и несущим в качестве репортерной группы объемистый остаток дигоксина (детектирование Вестерн-блоттингом) [26, 27]. Позднее при конструировании зондов авторы применили в качестве углеводных детерминант более эффективные с точки зрения обеспечения мультивалентности конъюгаты: моносахарид маннозы или синтетический неогликопептид с тремя терминальными *N*-ацетилгалактозаминовыми остатками [28]. Был определен маннозосвязывающий белок в бычьей сыворотке, а также проведен мониторинг лектинов в человеческих сыворотках в процессе развития юношеского хронического артрита [28]. Однако авторы сами отмечают опасность артефактов при использовании дигоксина (например, специфическое связывание с ним некоторых белков животного происхождения).

Хатанака и соавт. [29] разработали синтез фотоаффинных зондов на основе дисахаридов, в которых остаток гексозы (*D*-маннозы или *D*-глюкозы) связан с Tfd-меткой через 2-карбониламидоэтильный спейсер в положении 4. Tfd-группа связана с биотином непосредственно [30] или через ряд линкеров различной длины, построенных чередованием тартрата, сукцината и олигоэтиленгликоля [31]. На примере интегрального белка-транспортера глюкозы показано, что при зондировании углеводсвязывающих белков на поверхности интактной клетки с использованием стрептавидиновой системы детектирования, линкер между фотоаффинной меткой и биотином должен включать не менее 60–70 атомов [31]. После хемилюминесцентного детектирования меченый белок может быть выделен расщеплением остатка тартрата периодатом. Хатанака и соавт. [32] разработали еще один подход к синтезу нерадиоактивных фотоаффинных гликоконъюгатов – одностадийную реакцию биотинилированного Tfd-синтона (линкер – триэтиленгликоль) с восстанавливающим концом незащищенных углеводов. Получены зонды из *N*-ацетиллактозамина, трисахарида LewisX и тетрасахарида сиалил-LewisX.

Мы можем отметить, что предложенный нами метод получения фотоаффинных зондов – введение  $^{125}\text{I}$  в Дср-метку зонда непосредственно перед его применением – отличается сравнительно простой и доступностью. Метод уже показал высокую эффективность при изучении биологической системы: соответствующий фосфолипидный зонд был успешно применен для фотомечения интегрального белка гемагглютинаина вируса гриппа [22].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезе использовали  $\epsilon$ -Вос-лизин, триэтиламин (Sigma, США); трифторуксусный ангидрид (Fluka, Швейцария); DMSO, сухой пиридин (Merck, Германия). Сухой DMSO получали вымораживанием фирменного растворителя, хлороформ – перегонкой над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Остальные реактивы и растворители (Реахим, Россия) использовали после обычной очистки. Бискарбоксиметиловый эфир полиэтиленгликоля, степень полимеризации 9–16, выделяли из коммерческого реагента (средняя масса 600 Да; Aldrich, США) гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 (Pharmacia, Швеция) с выходом 70%. 3-Аминопропилглицозиды [33, 34], *rac*-1,2-диолеилглицерин [35], *n*-нитрофениловый эфир Дср-оксиуксусной кислоты [22] синтезировали как описано. 1-Амино-1-дезоксиглюцит получали восстановлением боргидридом натрия глюкозиламина, синтезированного из глюкозы по методике [36]. *n*-Нитрофенилтрифторацетат получали из *n*-нитрофенола и трифторуксусного ангидрида [37].

Для колоночной хроматографии применяли силикагель L (40–100 мкм; Chemapol, Чехия), для гель-фильтрации – сефадекс LH-20 в системе хлороформ–метанол, 1 : 1 (А), для ТСХ – пластинки Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия) в системах: хлороформ–этилацетат–уксусная кислота, 90 : 10 : 1 (Б); хлороформ–метанол–уксусная кислота, 90 : 20 : 1 (В); хлороформ–метанол–уксусная кислота, 90 : 10 : 1 (Г); изопропанол–этилацетат–вода, 2 : 3 : 1 (Д); обнаружение фосфорномолибденовой кислотой (а), УФ-облучением (б), парами аммиака (в), нингидрином (г), 7%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (д), резорцином (е). Упаривания проводили в вакууме при температуре не выше 40°C. Продукты реакции после очистки высушивали при 20 Па.

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

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре LKB Ultraspec II 4050 (LKB, Швеция) в метаноле, спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР (в  $\text{CDCl}_3$ , где не указано особо, приведены хим. сдвиги  $\delta$ , м. д. и КССВ в герцах) – на приборе Bruker WM-500 (США), масс-спектры (ионизация распылением в электрическом поле, ESI) – на спектрометре Finnigan MAT 9005 (США).

***rac*-1,2-Диолеил-3-[карбоксиметилен(полиоксиэтилен)]оксиацетилглицерин (II)**. Бискарбоксиметиловый эфир полиэтиленгликоля (степень полимеризации 9–16) высушивали упариванием с бензолом с последующим выдерживанием под вакуумом. К смеси дикислоты (0.6 г, ~1 ммоль) и прокаленного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.42 г, 4 ммоль) при перемешивании добавляли по каплям тионилхлорид (0.86 мл, 12 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при перемешивании и комнатной температуре до прекращения выделения газа (~4 ч), упаривали, затем дважды ресуспендировали в эфире и упаривали для удаления остатков тионилхлорида. Ресуспендировали остаток в эфире и фильтровали через кизельгур. Верхнюю фазу расслоившегося фильтрата упаривали, остаток растворяли в сухом диоксане, упаривали, после высушивания остатка под вакуумом над  $\text{NaOH}$  получали 595 мг (89%) дихлорангидрида карбоксиметил[поли(оксиэтилен)]-оксиуксусной кислоты (I) в виде бесцветного масла.

К дихлорангидриду кислоты (I) (0.59 г, ~0.89 ммоль) добавляли при перемешивании раствор *rac*-1,2-диолеилглицерина (90 мг, 0.14 ммоль) и ТЕА (0.1 мл, 0.72 ммоль) в 3 мл сухого хлороформа. Реакцию вели при перемешивании при комнатной температуре в течение 24–36 ч (контроль ТСХ, системы Б и В), периодически добавляя по 10 мкл ТЕА (всего 0.2 мл). Реакционную смесь разбавляли хлороформом (~10 мл), промывали 10 мл 0.1 н.  $\text{HCl}$  (разделение фаз центрифугированием). Водную фазу дважды экстрагировали хлороформом, объединенные органические экстракты промывали водой и упаривали. Остаток высушивали упариванием с бензолом и наносили на колонку для гель-фильтрации (1 × 100 см), уравновешенную системой А. Получали 193 мг смеси продуктов моно- и диацелирования, которую разделяли хроматографией на колонке с силикагелем, элюируя градиентом смеси метанол–уксусная кислота, 10 : 1, в хлороформе (2–10%). Выход продукта (II) 85 мг (~50%) в виде бесцветного масла, при ТСХ образующего вытянутое пятно в системе В (а),  $R_f$  ~0.6. Масс-спектр,  $m/z$ : 1149.9 [ $M + \text{H}_2\text{O} - 1$ ]<sup>+</sup> (36); 1194.1 [ $M + \text{H}_2\text{O} - 1$ ]<sup>+</sup> (69); 1238.1 [ $M + \text{H}_2\text{O} - 1$ ]<sup>+</sup> (100); 1282.0 [ $M + \text{H}_2\text{O} - 1$ ]<sup>+</sup> (92); 1326.0 [ $M + \text{H}_2\text{O} - 1$ ]<sup>+</sup> (85); 1370.3 [ $M + \text{H}_2\text{O} - 1$ ]<sup>+</sup> (75); 1414.2 [ $M + \text{H}_2\text{O} - 1$ ]<sup>+</sup> (60); 1458.1 [ $M + \text{H}_2\text{O} - 1$ ]<sup>+</sup> (42).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 1.09 (т, 6 H,  $\text{CH}_3$ ); 1.50 (м, 40 H,  $\text{CH}_2$ ); 1.80 (уш. квинтет, 4 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ); 2.23 (м, 8 H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ); 2.52 (т, 4 H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 3.83 (м, 52 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 4.31 (с, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{COO}$ -диглицерид); 4.38 (с, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{COOH}$ ); 4.48 и 4.59 (набор м, 4 H,  $\text{C}1'$  и  $\text{C}3'$ ); 5.48 (м, 1 H,  $\text{C}2'$ ); 5.54 (м, 4 H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ).

***rac*-1,2-Диолеил-3-[*n*-нитрофеноксикарбометилен(полиоксиэтилен)]оксиацетилглицерин (III)**, К кислоте (II) (85 мг, ~0.07 ммоль) добавляли раствор *n*-нитрофенилтрифторацетата (52 мг,

0.22 ммоль) в 0.2 мл сухого пиридина и перемешивали при комнатной температуре 7 ч. Из реакционной смеси гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 (колонка 0.8 × 50 см), уравновешенном системой А с добавлением 1% CH<sub>3</sub>COOH, выделяли 93 мг (~100%) продукта (III) в виде желтоватого масла, индивидуального хроматографически в системе Г (а, б, в),  $R_f$  0.75. <sup>1</sup>H-ЯМР: 0.88 (т, 6 H, CH<sub>3</sub>); 1.29 (м, 40 H, CH<sub>2</sub>); 1.61 (м, 4 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO); 2.01 (м, 8 H, CH<sub>2</sub>CH=CH); 2.31 (т, 4 H, CH<sub>2</sub>COO); 3.65 (м, 52 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 4.16 (с, 2 H, OCH<sub>2</sub>COO-диглицерид); 4.17 (с, 2 H, OCH<sub>2</sub>COONp); 4.22, 4.29 и 4.38 (набор дд, 4 H, C1' и C3'); 5.27 (уш. квинтет, 1 H, C2'); 5.35 (м, 4 H, CH=CH); 7.34 (д, 2 H, H2', H6',  $J_{2'3'} = J_{6'5'}$  9.15); 8.29 (д, 2 H, H3', H5',  $J_{3'2'} = J_{5'6'}$  9.15).

***N*<sup>α</sup>-{*rac*-1,2-Диолеоилглицеро-3-[карбометилен(полиоксиэтилен)]оксиацетил}-*N*<sup>ε</sup>-Вос-лизин (IV).** К сухому ε-Вос-лизину (20 мг, 0.08 ммоль) добавляли раствор эфира (III) (93 мг, ~0.07 ммоль) в 0.3 мл сухого DMSO и ТЕА (10 мкл, 0.07 ммоль) и перемешивали реакционную смесь 24 ч при комнатной температуре. Добавляли к смеси каплю воды и наносили на колонку для гель-фильтрации (0.8 × 50 см), уравновешенную системой А. Получали продукт (IV) (100 мг, ~100%), содержащий следы ε-Вос-лизина,  $R_f$  0.8 (вытянутое пятно в системе В; а). <sup>1</sup>H-ЯМР: 0.89 (т, 6 H, CH<sub>3</sub>); 1.13 (с, 9 H, ОС(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1.28 (м, 40 H, CH<sub>2</sub>); 1.42 (м, 4 H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> лизина); 1.66 (м, 6 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO и СНСН<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> лизина); 2.02 (м, 8 H, CH<sub>2</sub>CH=CH); 2.32 (т, 4 H, CH<sub>2</sub>COO); 3.11 (квартет, 2 H, CH<sub>2</sub>NHCO); 3.65 (м, 52 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 4.16 (с, 2 H, OCH<sub>2</sub>COO-диглицерид); 4.17 (с, 2 H, OCH<sub>2</sub>CONH); 4.23, 4.30 и 4.38 (набор дд, 4 H, C1' и C3'); 4.63 (м, 1 H, NHСН(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>); 5.27 (уш. квинтет, 1 H, C2'); 5.35 (м, 4 H, CH=CH).

***N*<sup>α</sup>-{*rac*-1,2-Диолеоилглицеро-3-[карбометилен(полиоксиэтилен)]оксиацетил}лизин (V).** К сухому продукту (IV) (100 мг, ~0.07 ммоль), содержащему примесь ε-Вос-лизина, добавляли по каплям при 0°C 1 мл TFA и выдерживали 30 мин при той же температуре. Упаривали реакционную смесь 2 раза с толуолом, остаток наносили на колонку для гель-фильтрации (0.8 × 50 см), уравновешенную системой А. Получали 81 мг (~85%) соединения (V) в виде бесцветного масла, индивидуального хроматографически,  $R_f$  0.13 (В; а, г).

***N*<sup>α</sup>-{*rac*-1,2-Диолеоилглицеро-3-[карбометилен(полиоксиэтилен)]оксиацетил}-*N*<sup>ε</sup>-(Dcp-оксиацетил)лизин (VI).** К раствору конъюгата (V) (81 мг, ~0.06 ммоль) в 0.2 мл сухого DMSO добавляли *n*-нитрофениловый эфир Dcp-оксиуксусной кислоты (28 мг, 0.09 ммоль) в смеси 50 мкл DMSO и ТЕА (12 мкл, 0.09 ммоль). Выдерживали реакционную смесь 4 ч при комнатной температуре, затем добавляли каплю воды и подвергали гель-фильтрации как описано для соединения (V). Получали 82 мг (90%) продукта (VI) в виде желтовато-

го аморфного вещества,  $R_f$  0.55 (В; а, б, в). <sup>1</sup>H-ЯМР: 0.89 (т, 6 H, CH<sub>3</sub>); 1.28 (м, 40 H, CH<sub>2</sub>); 1.44 (м, 4 H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> лизина); 1.66 (м, 6 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO и СНСН<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> лизина); 2.02 (м, 8 H, CH<sub>2</sub>CH=CH); 2.32 (т, 4 H, CH<sub>2</sub>COO); 3.33 (квартет, 2 H, CH<sub>2</sub>NHCO); 3.65 (м, 52 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 4.17 (с, 4 H, OCH<sub>2</sub>COO-диглицерид и OCH<sub>2</sub>CONH); 4.22, 4.30 и 4.38 (набор дд, 4 H, C1' и C3'); 4.62 (м, 1 H, NHСН(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>); 4.73 (с, 2 H, NHCOСН<sub>2</sub>ODcp); 5.28 (уш. квинтет, 1 H, C2'); 5.36 (м, 4 H, CH=CH); 6.13 (дд, 1 H, H4'<sub>Dcp</sub>,  $J_{4'5'}$  4.64,  $J_{4'3'}$  3.17); 6.91 (дд, 1 H, H3'<sub>Dcp</sub>,  $J_{3'4'}$  3.18,  $J_{3'5'}$  1.96); 7.11 (дд, 1 H, H5'<sub>Dcp</sub>,  $J_{5'4'}$  4.64,  $J_{5'3'}$  1.96). УФ-спектр,  $\lambda_{max}$ , нм (ε): 312 (15900).

***n*-Нитрофениловый эфир *N*<sup>α</sup>-{*rac*-1,2-диолеоилглицеро-3-[карбометилен(полиоксиэтилен)]оксиацетил}-*N*<sup>ε</sup>-(Dcp-оксиацетил)лизина (VII).** К кислоте (VI) (82 мг, ~54 мкмоль) добавляли раствор *n*-нитрофенилтрифторацетата (58 мг, 0.25 ммоль) в 0.23 мл сухого пиридина и перемешивали при комнатной температуре 16 ч. Реакционную смесь наносили на колонку для гель-фильтрации (0.8 × 50 см), уравновешенную системой А с добавлением 1% уксусной кислоты, выделяли 82 мг (~92%) продукта (VII) в виде желтоватого аморфного вещества,  $R_f$  0.8 (Г; а, б, в). <sup>1</sup>H-ЯМР: 0.89 (т, 6 H, CH<sub>3</sub>); 1.28 (м, 40 H, CH<sub>2</sub>); 1.66 (м, 6 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO и СНСН<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> лизина); 2.02 (м, 8 H, CH<sub>2</sub>CH=CH); 2.32 (т, 4 H, CH<sub>2</sub>COO); 3.37 (м, 2 H, CH<sub>2</sub>NHCO); 3.65 (м, 52 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 4.17 (с, 4 H, OCH<sub>2</sub>COO-диглицерид и OCH<sub>2</sub>CONH); 4.22, 4.30 и 4.38 (набор дд, 4 H, C1' и C3'); 4.74 (с, 2 H, NHCOСН<sub>2</sub>ODcp); 4.79 (м, 1 H, NHСН(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>); 5.28 (м, 1 H, C2'); 5.36 (м, 4 H, CH=CH); 6.12 (м, 1 H, H4'<sub>Dcp</sub>); 6.92 (м, 1 H, H3'<sub>Dcp</sub>); 7.11 (дд, 1 H, H5'<sub>Dcp</sub>,  $J_{5'4'}$  4.58,  $J_{5'3'}$  1.52); 7.32 (д, 2 H, H2''<sub>Np</sub>, H6''<sub>Np</sub>,  $J_{2'3''}$  =  $J_{6'5''}$  8.85); 8.27 (д, 2 H, H3''<sub>Np</sub>, H5''<sub>Np</sub>,  $J_{3'2''}$  =  $J_{5'6''}$  8.85).

**Фотоаффинный гликоконъюгат с трисахаридом А (VIII).** К сухому 3-аминопропилгликозиду Fucα1-2(GalNAcα1-3)Galβ (1 мг, 1.7 мкмоль) добавляли раствор активированного эфира (VII) (2.5 мг, ~1.5 мкмоль) в 100 мкл смеси хлороформ-метанол, 1 : 1, и перемешивали смесь 30 мин при комнатной температуре. Добавляли к смеси 1 мкл ТЕА, 5 мкл воды и наносили на колонку для гель-фильтрации (0.5 × 20 см), уравновешенную системой А. Получали продукт (VIII) в виде желтоватого аморфного вещества, при ТСХ образующего набор из семи пятен с  $R_f$  в интервале 0.3–0.6 (Д; а, б, д, е). Выход 49% (по данным УФ-поглощения). УФ-спектр идентичен спектру конъюгата (VI). Масс-спектр,  $m/z$ : 2050.223 [ $M + H$ ]<sup>+</sup> (38; для  $n = 10$  C<sub>100</sub>H<sub>172</sub>N<sub>6</sub>O<sub>37</sub> [ $M + H$ ]<sup>+</sup> = 2050.196); 2094.254 [ $M + H$ ]<sup>+</sup> (77; для  $n = 11$  C<sub>102</sub>H<sub>176</sub>N<sub>6</sub>O<sub>38</sub> [ $M + H$ ]<sup>+</sup> = 2094.222); 2138.252 [ $M + H$ ]<sup>+</sup> (97; для  $n = 12$



$C_{104}H_{180}N_6O_{39} [M + H]^+ = 2138.248$ ;  $2182.266 [M + H]^+$  (100; для  $n = 13$   $C_{106}H_{184}N_6O_{40} [M + H]^+ = 2182.274$ ).

**Фотоаффинный гликоконъюгат с сиалил-LewisX (IX)** синтезировали аналогично неогликоконъюгату (VIII) из 3-аминопропилгликозида  $Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-4(Fuc\alpha 1-3)GlcNAc\beta$  (1 мг, 1.1 мкмоль) и активированного эфира (VII) (1.6 мг, ~1 мкмоль). Получали продукт (IX) (выход 45%, на основании УФ-поглощения),  $R_f$  в интервале 0.2–0.6 (Д; а, б, д, е). УФ-спектр идентичен спектру конъюгата (VI). Масс-спектр,  $m/z$ :  $2252.908 [M + H]^+$  (47; для  $n = 8$   $C_{108}H_{181}N_7O_{43} [M + H]^+ = 2253.241$ );  $2297.538 [M + H]^+$  (24; для  $n = 9$   $C_{109}H_{185}N_7O_{44} [M + H]^+ = 2297.267$ );  $2342.145 [M + H]^+$  (23; для  $n = 10$   $C_{111}H_{189}N_7O_{45} [M + H]^+ = 2341.293$ );  $2385.597 [M + H]^+$  (100; для  $n = 11$   $C_{113}H_{193}N_7O_{46} [M + H]^+ = 2385.319$ );  $2430.688 [M + H]^+$  (24; для  $n = 12$   $C_{115}H_{197}N_7O_{47} [M + H]^+ = 2429.346$ );  $2474.110 [M + H]^+$  (34; для  $n = 13$   $C_{117}H_{201}N_7O_{48} [M + H]^+ = 2473.372$ ).

**Фотоаффинный гликоконъюгат с глюкоцитом (X)** синтезировали аналогично неогликоконъюгату (VIII) из 1-амино-1-дезоксиглюцита (0.5 мг, 2.9 мкмоль) и активированного эфира (VII) (1.6 мг, ~1 мкмоль). Получали продукт (IX) (выход 80%, на основании УФ-поглощения),  $R_f$  в интервале 0.4–0.7 (Д; а, б, д, е). УФ-спектр идентичен спектру конъюгата (VI). Масс-спектр,  $m/z$ :  $1556.860 [M + H]^+$  (26; для  $n = 8$   $C_{79}H_{137}N_5O_{25} [M + H]^+ = 1556.978$ );  $1600.853 [M + H]^+$  (63; для  $n = 9$   $C_{81}H_{141}N_5O_{26} [M + H]^+ = 1601.004$ );  $1644.899 [M + H]^+$  (68; для  $n = 10$   $C_{83}H_{145}N_5O_{27} [M + H]^+ = 1645.033$ );  $1688.911 [M + H]^+$  (90; для  $n = 11$   $C_{85}H_{149}N_5O_{28} [M + H]^+ = 1689.056$ );  $1732.929 [M + H]^+$  (100; для  $n = 12$   $C_{87}H_{153}N_5O_{29} [M + H]^+ = 1733.083$ );  $1776.955 [M + H]^+$  (83; для  $n = 13$   $C_{89}H_{157}N_5O_{30} [M + H]^+ = 1777.109$ ).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 00-04-48922 и 03-04-48396) и МНТЦ (проект № 1781).  $^1H$ -ЯМР-спектры сняты при частичной поддержке Миннауки Российской Федерации (грант № 96-03-08) и РФФИ (гранты № 00-04-55024 и 00-15-97877). Авторы выражают благодарность проф. Леннарту Б.-А. Юхансону (Университет г. Умео, Швеция) за помощь в съемке масс-спектров высокого разрешения, а также проф. Н.В. Бовину за ценные замечания при составлении рукописи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gabius H.-J.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 1988. V. 27. P. 1267–1276.
2. *Monsigny M., Roche A.-C., Midoux P.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988. V. 551. P. 399–414.
3. *Shen T.Y.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1987. V. 507. P. 272–280.

4. *Vodovozova E.L., Gayenko G.P., Razinkov V.I., Korchagina E.Y., Bovin N.V., Molotkovsky J.G.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. V. 44. P. 543–553.
5. *Yamazaki N., Kojima S., Bovin N.V., Andre S., Gabius S., Gabius H.-J.* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000. V. 43. P. 225–244.
6. *Barchi J.J.* // *Curr. Pharm. Design.* 2000. V. 6. P. 485–501.
7. *Monsigny M., Roche A.-C., Midoux P.* // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1994. V. 14. P. 1–24.
8. *Бовин Н.В.* // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 643–663.
9. *Andre S., Ortego P.J.C., Perez M.A., Roy R., Gabius H.-J.* // *Glycobiology.* 1999. V. 9. P. 1253–1261.
10. *Andre S., Unverzagt C., Kojima S., Dong X., Fink C., Kayser K., Gabius H.-J.* // *Bioconjugate Chem.* 1997. V. 8. P. 845–855.
11. *Monsigny M., Midoux P., Mayer R., Roche A.-C.* // *Bio-sci. Rep.* 1999. V. 19. P. 125–132.
12. *DeFrees S.A., Phillips L., Guo L., Zalipsky S.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 6101–6104.
13. *Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г., Сыркин А.Б.* // *Бюлл. экспер. биол. мед.* 1997. Т. 123. С. 439–441.
14. *Moiseeva E.V., Vodovozova E.L., Mikhalyov I.I., Molotkovsky J.G.* // *Mouse Genome.* 1997. V. 95. P. 895–897.
15. *Водовозова Е.Л., Хайдуков С.В., Гаенко Г.П., Бондарчук Т.И., Михалев И.И., Гречишникова И.В., Молотковский Ю.Г.* // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. С. 760–767.
16. *Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G.* // *Eur. J. Cancer.* 2000. V. 36. P. 942–949.
17. *Fleming S.A.* // *Tetrahedron.* 1995. V. 51. P. 12479–12520.
18. *Nielsen P.E., Hansen J.B., Thomsen T., Burhardt O.* // *Experientia.* 1983. V. 39. P. 1063–1072.
19. *Uvarov V.Y., Sotnichenko A.I., Vodovozova E.L., Molotkovsky J.G., Kolesanov E.F., Lyulkin Y.A., Stier A., Krueger V., Archakov A.I.* // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 222. P. 483–489.
20. *Зайцева Л.Г., Овчинникова Т.В., Водовозова Е.Л., Молотковский Ю.Г., Поляков Н.Б., Титов М.И., Есипов С.Е., Гринкевич В.А.* // *Биоорганическая химия.* 2002. Т. 28. С. 411–425.
21. *Водовозова Е.Л., Цибилова Е.В., Молотковский Ю.Г.* // *Биоорганическая химия.* 1998. V. 24. P. 316–318.
22. *Vodovozova E.L., Tsibizova E.V., Molotkovsky J.G.* // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 2001. № 18. P. 2221–2228.
23. *Weber T., Brunner J.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 3084–3095.
24. *Weber P.J.A., Becksicking A.G.* // *J. Peptide Res.* 1997. V. 49. P. 375–383.
25. *Tate J.J., Persinger J., Bartholomew B.* // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 1421–1426.
26. *Lauc G., Floegel M., Diehl-Seifert B., Schroder H.C., Muller W.E.G.* // *Glycoconjugate J.* 1994. V. 11. P. 541–549.
27. *Lauc G., Barisic K., Zanic T., Floegel M.* // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1995. V. 33. P. 933–937.
28. *Lauc G., Lee R.T., Dunic J., Lee Y.C.* // *Glycobiology.* 2000. V. 10. P. 357–364.
29. *Hatanaka Y., Hashimoto M., Kurihara H., Nakayama H., Kanaoka Y.* // *J. Org. Chem.* 1994. V. 59. P. 383–387.

30. Hatanaka Y., Hashimoto M., Kanaoka Y. // *Bioorg. Med. Chem.* 1994. V. 2. P. 1367–1373.
31. Hashimoto M., Yang J., Holman G.D. // *Chembiochem.* 2001. V. 2. P. 52–59.
32. Hatanaka Y., Kempin U., Jong-Jip P. // *J. Org. Chem.* 2000. V. 65. P. 5639–5643.
33. Корчагина Е.Ю., Бовин Н.В. // *Биоорганич. химия.* 1992. Т. 18. С. 283–298.
34. Nifant'ev N.E., Tsvetkov Y.E., Shashkov A.S., Kononov L.O., Menshov V.M., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // *J. Carbohydr. Chem.* 1996. V. 15. P. 939–953.
35. Молотковский Ю.Г., Никулина Л.Ф., Бергельсон Л.Д. // *Химия природ. соед.* 1969. № 4. С. 210–214.
36. Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Derevitskaja V.A., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* 1986. V. 146. P. C1–C5.
37. Sakakibara S., Inukai N. // *Bull. Chem. Soc. Japan.* 1964. V. 37. P. 1231–1232.

## The Synthesis of Photoaffinity Neoglycolipid Probes as Tools for Studying Membrane Lectins

E. L. Vodovozova<sup>#</sup>, G. V. Pazynina, A. B. Tuzikov,  
I. V. Grechishnikova, and Jul. G. Molotkovsky

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 330-6610; fax: +7 (095) 330-6601; e-mail: elvod@ibch.ru

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

A method for the synthesis of photoaffinity neoglycolipid probes with a highly efficient carbene-generating diazocyclopentadien-2-ylcarbonyl (Dcp) label, which can be radioiodinated under standard oxidation conditions, was developed. The probes are intended for incorporation into the lipid bilayer. They are lipophilic glycoconjugates on the basis of an amphiphilic aglycone built up from a diacylglycerol and a polyethylene glycol spacer (with a polymerization degree of 9–16) bearing the Dcp label at the terminal unit. The location of the label in the aglycone provides the possibility of one-step preparation of a wide range of probes using various carbohydrate synthons. We have synthesized photoaffinity neoglycoconjugates containing the oligosaccharides: sialyl LewisX tetrasaccharide and A trisaccharide, which is specific to some tumor cells. A probe containing an inactive pentaol (aminodeoxyglucitol) was also synthesized to detect nonspecific binding. The Dcp label is bound to the probe molecule by ester bond; its lability under alkaline conditions facilitates the analysis of cross-linked products after photoaffinity labeling. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* diazocyclopentadien-2-ylcarbonyl label, lectins, liposomes, neoglycoconjugates, radioiodination, photoaffinity labeling