



УДК 547.913.3'118'122.057

СИНТЕЗ ДОЛИХИЛ- И ПОЛИПРЕНИЛСУЛЬФАТОВ

© 2001 г. С. Д. Мальцев, О. В. Сизова, Л. Л. Данилов, В. Н. Шибаетв[#]

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
119991, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 28.12.2000 г. Принята к печати 15.02.2001 г.

Взаимодействием долихоллов и полипренолов с комплексом пиридин–серный ангидрид синтезированы долихил- и полипренилсульфаты, представляющие интерес как аналоги долихил- и полипренилфосфатов.

Ключевые слова: долихол; полипренол; комплекс $Pu \cdot SO_3$; долихилсульфат; полипренилсульфат.

ВВЕДЕНИЕ

Ключевая роль долихил- и полипренилфосфатов в биосинтезе углеводных цепей полисахаридов и гликоконъюгатов в клетках прокариот и эукариот надежно установлена (см., например, обзоры [1, 2]). Помимо непосредственного участия в реакциях ферментативного гликозилирования, для долихилфосфата было продемонстрировано значительное влияние на организацию модельных фосфолипидных мембран (см. обзор [3]). Взаимодействие остатка долихола с липидами биологических мембран, возможно, лежит в основе биологической активности этих соединений. Как было показано, долихилфосфаты вызывают апоптоз в некоторых линиях клеточных культур [4, 5], а полипренилфосфаты обладают высокой противовирусной и иммуностимулирующей активностью [6]. В настоящее время неясно, связаны ли мембранотропные свойства и биологическая активность этих соединений с присутствием именно фосфатной группы или можно ожидать подобных свойств для других анионных производных долихоллов и полипренолов.

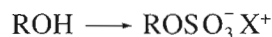
В связи с этим значительный интерес представляет исследование аналогов полипренил- и долихилфосфатов, модифицированных по анионной группе, в частности, сопоставление их свойств как субстратов или ингибиторов ферментативных реакций гликозилирования, их действия на модельные мембраны и их биологической активности. В рамках наших исследований по синтезу производных полипренил- и долихилфосфатов (см. обзоры [7, 8]) был кратко описан синтез первых аналогов такого типа – долихил-*H*-фосфоната и долихилтиофосфата [9].

Цель настоящей работы – описание синтеза аналогичных производных, содержащих сульфатную группу – долихилсульфата и полипренилсуль-

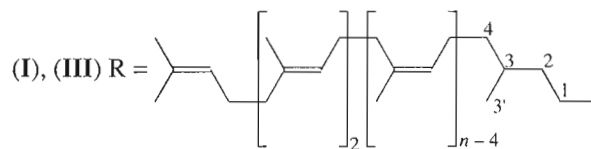
фата. Материал по синтезу долихилсульфата был представлен ранее на конференции (как часть комплексной работы) и опубликован в виде тезисов докладов [10, 11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

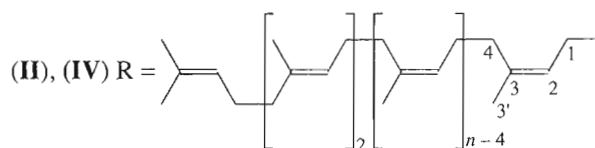
Как известно (см., например, [8]), наиболее доступными полипренолами являются растительные полипренолы, присутствующие в природных объектах в виде смеси олигомергомологов. В настоящей работе в качестве исходных веществ были использованы (\pm)-долихолы (I), полученные из полипренолов хвои ели [12] по методу [13] (соотношение олигомергомологов с $n = 15, 16, 17$ и 18 равно $1 : 4 : 3 : 2$, определено методом ВЭЖХ), и полипренолы (II) из хвои сосны (соотношение олигомергомологов с $n = 14, 15, 16$ и 17 равно $6 : 13 : 14 : 7$). Их превращение в сульфаты (III) и (IV) было осуществлено при действии $Pu \cdot SO_3$ в среде диметилформаида.



(I), (II) (III), (IV)



$n = 15-18; X = Na$



$n = 14-17; X = Et_3NH$

[#] Автор для переписки: (эл. почта: shiba@ioc.ac.ru; факс: (095) 135-53-28; тел.: (095) 137-75-70).

Влияние сульфатирования и фосфорилирования на сигналы α -концевого звена в долихолах и полипренолах в спектрах ^{13}C -ЯМР

Атомы	Эффекты замещения*			
	(III)	долихил-фосфат	(IV)	полипренилфосфат
C1	6.3	4.0	7.3	3.5
C2	0.1	-0.2	-3.1	-1.8
C3	-0.1	0.1	4.4	1.0
C4	0	0	1.2	-0.3
C3'	-0.7	-0.3	1.5	-0.1

* Разность химических сдвигов для производных и соответствующих спиртов. Данные для спиртов и фосфатов взяты из обзора [7] с исправлением ошибочного отнесения сигнала C4 для долихола и долихилфосфата: этот сигнал имеет δ 37.4 м.д. Указанное в работе [7] значение δ 26.0 м.д. относится к сигналу атома C5.

Было найдено, что сульфатирование долихола (I) эффективно протекает при использовании приблизительно 2.5-кратного мольного избытка $\text{Pu} \cdot \text{SO}_3$, реакция завершается за 2 ч при $\sim 20^\circ\text{C}$. После обработки реакционной смеси водным триэтиламином и эфиром растворители удаляли упариванием, остаток распределяли в системе гептан-ацетонитрил, экстрагируя ацетонитрилом соли неорганических сульфатов. Сульфат долихола (III) был выделен в виде натриевой соли после ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе с выходом 83%.

Оптимальным для получения полипренилсульфата (IV) является меньший избыток $\text{Pu} \cdot \text{SO}_3$ (~ 2 моль/моль полипренола) и уменьшение продолжительности реакции до 1 ч. Образующийся продукт (IV) чрезвычайно лабилен: обнаружено, что он разлагается при слабом нагревании ($\sim 30^\circ\text{C}$) и при попытках хроматографического выделения. После ряда экспериментов нам удалось подобрать условия для его выделения и характеристики. По окончании реакции избыток комплекса $\text{Pu} \cdot \text{SO}_3$ разлагали добавлением водного триэтиламина и диоксиана. После распределения в системе гептан-ацетонитрил гептановый раствор упаривали, а остаток распределяли в системе октан-метанол, экстрагируя октановой фазой непрореагировавшие полипренолы. Целевое соединение было выделено в виде триэтиламмониевой соли с выходом 73%. Продукт хранился без видимого разложения (контроль ТСХ) в виде гептанового раствора при $+4^\circ\text{C}$ в течение нескольких месяцев.

Строение полученных сульфатов подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектров. В ИК-спектрах соединений (III) и (IV) отсутствуют полосы колебаний ОН-групп в области $3300\text{--}3650\text{ см}^{-1}$ и имеются полосы, характерные для сульфатной груп-

пы и отвечающие колебаниям связей $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ (1230 и 1140 см^{-1} для производного (III), 1265 и 1200 см^{-1} для производного (IV)), $\text{S}=\text{O}$ (1070 и 1055 см^{-1} соответственно) и $\text{C}-\text{O}-\text{S}$ (845 см^{-1}).

Спектры ^1H -ЯМР соединений (III) и (IV) в целом соответствуют спектрам долихолов и полипренолов (для (III) см., например, [7, 13]). Характерным является слабopольный сдвиг сигнала CH_2O -группы (δ 3.96 и 4.51 м.д. соответственно) по сравнению с исходными спиртами (I) и (II) (δ 3.65 и 4.05 м.д. соответственно).

Спектры ^{13}C -ЯМР сульфатов (III) и (IV) полностью совпадают со спектрами исходных спиртов [14, 15], за исключением сигналов α -концевого звена. Как видно из таблицы, в производном долихола введение сульфатной группы приводит лишь к большому слабopольному сдвигу сигнала C1, в то время как для производного полипренола (IV) наблюдаются смещения сигналов всех атомов α -концевого изопренового звена. Эффекты сульфатирования аналогичны наблюдаемым эффектам фосфорилирования, но значительно больше по абсолютной величине.

В масс-спектрах сульфата (III), полученных при ионизации электрораспылением (electrospray) и регистрации отрицательных ионов присутствуют сигналы, отвечающие молекулярным ионам $[\text{M}-\text{Na}]^-$ производных, содержащих 14, 15, 16, 17 и 18 изопреновых звеньев и отличающихся друг от друга на 68 единиц массы.

Таким образом, в настоящей работе разработан метод синтеза сульфатов долихолов и полипренолов, которые можно рассматривать как аналоги соответствующих фосфорилированных производных. Первые результаты биологических исследований долихилсульфата (III) [16] показывают, что это соединение не способно заменять долихилфосфат в реакциях гликозилирования, катализируемых ферментами из микросом печени крысы, и служит лишь слабым ингибитором этих реакций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР снимали на приборе Bruker WM-250 (250 МГц по ^1H ; 62.9 МГц по ^{13}C), ИК-спектры – на приборе Perkin-Elmer 577, масс-спектры – на спектрометре Finnigan-MAT TSG 7000 (США). Величины химических сдвигов приведены в шкале δ , м.д., относительно Me_4Si , константы спин-спинового взаимодействия (J) выражены в герцах. ТСХ проводили на пластинках ($5 \times 2\text{ см}$) с закрепленным слоем силикагеля (Silica Gel 60, Merck, ФРГ) в системе хлороформ-метанол-вода, $60 : 25 : 4$. Непредельные соединения обнаруживали в парах I_2 , а также обработкой 50% водным раствором H_2SO_4 с последующим прокаливанием. Диметилформаид абсолютировали перегонкой под вакуумом и хранили над молекулярными си-

тами 3 Å. Ацетонитрил абсолютировали перегонкой над P_2O_5 .

Долихилсульфат, натриевая соль (III). К 65.7 мг (~57.6 мкмоль) долихола (I) прибавляли 23.5 мг (147.6 мкмоль) комплекса $Pu \cdot SO_3$, растворяли в 0.25 мл диметилформамида и выдерживали в течение 2 ч при 20°C. Прибавляли 0.1 мл Et_3N , 0.6 мл эфира и 0.1 мл H_2O , через 2 ч растворители упаривали досуха. К остатку добавляли 12 мл гептана и экстрагировали ацетонитрилом (3 × 1 мл). Гептановый слой упаривали досуха, остаток растворяли в 60 мл смеси хлороформ–метанол–вода, 60 : 35 : 4 и наносили на колонку (1.1 × 13 см) с DEAE-целлюлозой (DE-52, OAc⁻-форма, Whatman, Англия). Колонку промывали 50 мл той же смеси и элюировали 100 мл 30 мМ раствора NaOAc в той же смеси растворителей. Фракции, содержащие целевой продукт (R_f 0.75), упаривали до 5 мл, добавляли 1 мл изопропилового спирта и 15 мл толуола и упаривали до 2 мл. Добавляли 30 мл гептана, упаривали до 4 мл, прибавляли 15 мл гептана и выдерживали 18 ч при 4°C. Раствор отделяли декантацией, растворитель упаривали досуха. Выход соединения (III) составил 60.3 мг (~83%), R_f 0.75. ИК-спектр (ν , CCl_4 , cm^{-1}): 3040 (C–H в тризамещенном олефине), 2970, 2940, 2860 ($CH_3 + CH_2$), 1450, 1380 ($CH_3 + CH_2$), 1230, 1140 (SO_2), 1070 (S=O), 965, 845 (C–O–S), 632, 585. Спектр 1H -ЯМР (CCl_4 - CD_3OD , 4 : 1): 5.41 (HC=, т, J 7.0, 1 H), 5.14 (CH=, м, 14.5 H), 4.51 (CH_2O , д, J 7.0 Гц, 2 H), 3.21 (CH_2 в Et_3NH^+ , м, 6H), 2.17–2.07 (CH_2 , м, 56 H), 1.82 (CH_3 -C=, 3H), 1.71 (CH_3 -C=, Z-звено, 37.5 H); 1.66 и 1.64 (CH_3 -C=, 2 с, 9 H, E-звено), 1.35 (CH_3 в Et_3NH^+ , м, 9 H). Спектр ^{13}C -ЯМР (CCl_4 - CD_3OD , 4 : 1): 9.6 (CH_3 - CH_2N), 17.2 ($CH_3C=$, E-звено), 18.3 ($CH_2C=$, W-звено), 24.7 ($CH_3C=$, Z-звено, + CH_3 -C3), 26.9 (CH_3 -C=, W-звено), 27.6 (CH_2 -CH=, Z-звено), 27.8 (CH_2 -CH=, E-звено), 33.4 (CH_2 -C(CH_3)=, Z-звено, + C4), 41.0 (CH_2 -C(CH_3)=, E-звено), 47.7 (CH_2N), 65.5 (C1), 121.4 (C2), 125.5 и 125.7 (HC=, E-звено), 126.3 (HC=, Z-звено), 132.3 ($CH_3C=$, W-звено), 135.5 ($CH_3C=$, E-звено), 136.0 и 136.5 ($CH_3C=$, Z-звено), 142.3 (C3).

вали ацетонитрилом (1 × 1 мл и 4 × 0.4 мл). Суммарные ацетонитрильные фазы экстрагировали гептаном (1 × 2 мл); объединенный гептановый экстракт упаривали досуха в вакууме масляного насоса без обогрева колбы. Остаток растворяли в 4.4 мл октана и экстрагировали продукт метанолом (1 × 5 мл, 1 × 1 мл и 1 × 2 мл). Суммарный метанольный раствор экстрагировали октаном (2 × 2 мл) и объединяли с основной октановой фазой; суммарную октановую фазу экстрагировали метанолом (5 × 2 мл) и метанольные слои объединяли с основной метанольной фракцией. Суммарный метанольный раствор упаривали в вакууме масляного насоса без обогрева колбы и высушивали в течение 30 мин; получили соединение (IV) с выходом 127.6 мг (~73%), R_f 0.75. ИК-спектр (CCl_4), cm^{-1} : 3040 (C–H в тризамещенном олефине), 2960, 2930, 2860 ($CH_3 + CH_2$), 2730, 2520 (R_3NH^+), 1662 (C=C в тризамещенном олефине), 1450, 1380 ($CH_3 + CH_2$), 1265, 1200 (SO_2), 1055 (S=O), 965, 845 (C–O–S), 632, 585. Спектр 1H -ЯМР (CCl_4 - CD_3OD , 4 : 1): 5.41 (HC=, т, J 7.0, 1 H), 5.14 (CH=, м, 14.5 H), 4.51 (CH_2O , д, J 7.0 Гц, 2 H), 3.21 (CH_2 в Et_3NH^+ , м, 6H), 2.17–2.07 (CH_2 , м, 56 H), 1.82 (CH_3 -C=, 3H), 1.71 (CH_3 -C=, Z-звено, 37.5 H); 1.66 и 1.64 (CH_3 -C=, 2 с, 9 H, E-звено), 1.35 (CH_3 в Et_3NH^+ , м, 9 H). Спектр ^{13}C -ЯМР (CCl_4 - CD_3OD , 4 : 1): 9.6 (CH_3 - CH_2N), 17.2 ($CH_3C=$, E-звено), 18.3 ($CH_2C=$, W-звено), 24.7 ($CH_3C=$, Z-звено, + CH_3 -C3), 26.9 (CH_3 -C=, W-звено), 27.6 (CH_2 -CH=, Z-звено), 27.8 (CH_2 -CH=, E-звено), 33.4 (CH_2 -C(CH_3)=, Z-звено, + C4), 41.0 (CH_2 -C(CH_3)=, E-звено), 47.7 (CH_2N), 65.5 (C1), 121.4 (C2), 125.5 и 125.7 (HC=, E-звено), 126.3 (HC=, Z-звено), 132.3 ($CH_3C=$, W-звено), 135.5 ($CH_3C=$, E-звено), 136.0 и 136.5 ($CH_3C=$, Z-звено), 142.3 (C3).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны д.х.н. В.В. Веселовскому (ИОХ РАН) за предоставление препаратов долихолов и полипренолов и их анализ с помощью ВЭЖХ, д.х.н. А.С. Шашкову (ИОХ РАН) за съемку спектров ЯМР и д-ру Б. Волюцкой (Университет Лувена, Бельгия) за съемку масс-спектра соединения (III).

Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ (проект № 00-03-32799а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bugg T.D.H., Braudish P.E. // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 119. P. 255–262.
2. Krag S.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 243. P. 1–5.
3. Chojnacki T., Dallner G. // Biochem. J. 1988. V. 251. P. 1–9.

Полипренилсульфат, триэтиламониевая соль (IV). К 149.4 мг (~139 мкмоль) полипренола (II) прибавляли 48.5 мг (305 мкмоль) комплекса $Pu \cdot SO_3$ и 0.4 мл диметилформамида. Через 1 ч при 20°C к раствору прибавляли смесь 2 мл диоксана, 110 мкл триэтиламина и 60 мкл воды. Через 1 ч при 20°C растворители удаляли в вакууме масляного насоса без обогрева колбы. Остаток растворяли в 1 мл гептана, и раствор упаривали досуха в аналогичных условиях. Остаток растворяли в 5.3 мл гептана, прибавляли 3 мкл триэтиламина и экстрагиро-

4. Yasugi E., Yokoyama Y., Seyaura Y., Kano K., Hayashi Y., Oshima M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 216. P. 848–853.
5. Dohi T., Yasugi E., Oshima M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 224. P. 87–91.
6. Danilov L.L., Maltsev S.D., Deeva A.V., Narovlyanski A.N., Sanin A.V., Pronin A.V., Ozherelkov S.A. // *Arch. Immunol. Therap. Exp.* 1996. V. 44. P. 395–400.
7. Danilov L.L., Shibaev V.N. // *Studies in Natural Products Chemistry* / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam; Oxford; New York; Tokyo: Elsevier, 1991. V. 8. P. 63–114.
8. Shibaev V.N., Danilov L.L. // *Glycopeptides and Related Compounds* / Eds D.C. Large, C.D. Warren. New York; Basel; Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1997. P. 427–504.
9. Данилов Л.Л., Мальцев С.Д., Шибяев В.Н. // *Биоорганическая химия*. 1991. Т. 17. С. 1292–1293.
10. Данилов Л.Л., Мальцев С.Д., Сизова О.В., Шибяев В.Н. // *Лесохимия и органический синтез*. III Всероссийское совещание. Тез. докл. Сыктывкар: Коми научный центр УрО РАН, 1998. С. 111.
11. Maltsev S.D., Sizova O.V., Danilov L.L., Shibaev V.N., Jankowski W.J., Chojnacki T. // *Abstr. 10th European Carbohydr. Symp.* Galway: National University of Ireland, 1999. P. 395.
12. Iyata K., Mizuno M., Tanaka Y., Kageyu A. // *Phytochemistry*. 1984. V. 23. P. 783–786.
13. Веселовский В.В. // *Изв. АН. Сер. хим.* 1999. № 5. С. 1909–1911.
14. Bohlmann F., Zeisberg R., Klein E. // *Organic Magn. Res.* 1975. V. 7. P. 426–432.
15. Шаишков А.С., Григорьева Н.Я., Аврутов И.М., Семеновский А.В., Одинокоев В.Н., Игнатиюк В.К., Толстиков Г.А. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1979. № 2. С. 388–391.
16. Sizova O.V., Maltsev S.D., Shibaev V.N., Jankowski W.J., Chojnacki T. // *Acta Biochim. Polon.* 1998. V. 45. P. 1021–1030.

Synthesis of Dolichyl and Polyprenyl Sulfates

S. D. Maltsev, O. V. Sizova, L. L. Danilov, and V. N. Shibaev[#]

[#] Phone: +7 (095) 137-7570, fax: +7 (095) 135-5328, e-mail: shiba@ioc.ac.ru

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 119991 Russia

Dolichyl and polyprenyl sulfates were synthesized as analogues of dolichyl and polyprenyl phosphates by the interaction of dolichols and polyprenols with the pyridine–sulfuric anhydride complex. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: dolichol, dolichyl sulfate, polyprenol, polyprenyl sulfate, Py · SO₃ complex