



УДК 547.455.566'118

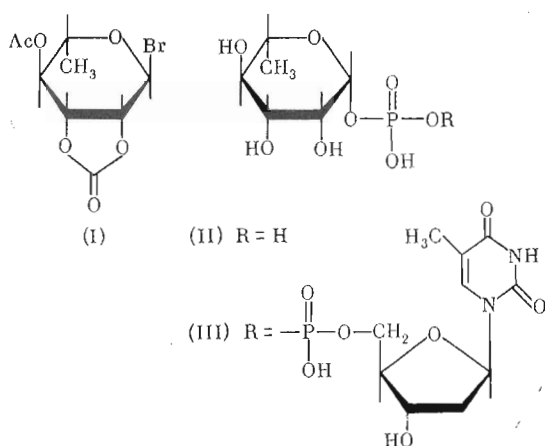
СИНТЕЗ β -L-РАМНОПИРАНОЗИЛФОСФАТА
И ТИМИДИН-5'-(β -L-РАМНОПИРАНОЗИЛ)ПИРОФОСФАТАШибасов В. Н., Уткина Н. С., Данилов Л. Л.,
Елисеева Г. И.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Взаимодействие 4-О-ацетил-2,3-О-карбонил- α -L-рамнопиранозилбромиды с дибензилфосфатом с последующим удалением защитных групп гладко приводит к β -L-рамнопиранозилфосфату. Конфигурация гликозилфосфата, помимо прочих данных, подтверждена спектром ^{13}C -ЯМР. Описана модификация синтеза тимидиндифосфат-рамнозы фосфоморфолидным методом.

Тимидин-5'-(β -L-рамнопиранозил)пирофосфат — субстрат бактериальных рамнозилтрансфераз, принимающих участие в синтезе сложных бактериальных полисахаридов, в частности О-специфических полисахаридов сальмонелл. Химический синтез этого нуклеотидсахара был впервые осуществлен лишь недавно [1], в основном вследствие трудности получения 1,2-*цис*-гликозилфосфатов, содержащих оксигруппу при С2-атоме в аксиальном положении, таких, как β -L-рамнопиранозилфосфат (II) или β -D-маннопиранозилфосфат. Для их синтеза оказался успешным подход, основанный на фосфорилировании свободного полуацетального гидроксильного в частично ацетилированных моносахаридах при действии *о*-фениленхлорфосфата [2—4], так как подходы, основанные на нуклеофильном замещении при С1-атоме, при такой стереохимии субстрата неизменно приводят к 1,2-*транс*-гликозилфосфатам вследствие эффективного соучастия С2-ацетильной группы (обзор см. [5]). Однако применимость этого метода ограничивается малой доступностью исходных кристаллических ацетатов сахаров с β -конфигурацией полуацетальной ОН-группы; если в исходном ацетате присутствует примесь α -аномера (а дело осложняется тем, что такие ацетаты достаточно быстро мутаротируют), фосфорилирование приводит к смеси аномеров гликозилфосфатов. Это затрудняет использование описанного метода при синтезе радиоактивных гликозилфосфатов, требующем работы с микроколичествами, и при распространении реакции на синтез новых гликозилфосфатов такого типа, в частности 4,6-дидезокси- β -L-ликсогоксопиранозилфосфата [6]. Поэтому представляет интерес исследование альтернативных подходов к синтезу аналогичных гликозилфосфатов с использованием нуклеофильного замещения при С1-атоме при не-соучаствующем заместителе в положении С2.

В синтезе α -D-рибофуранозилфосфата [7] и его 5-фосфата [8] были успешно применены производные рибофуранозы с 2,3-циклокарбонатной защитной группой, однако об использовании подобных производных пираноз для получения гексозилфосфатов в литературе не сообщалось. Не-

давно в нашей лаборатории был разработан удобный метод синтеза β -*L*-рамнопиранозидов [9] с использованием 4-О-ацетил-2,3-О-карбонил- α -*L*-рамнопиранозилбромид (I) в качестве гликозилирующего агента. Мы сообщаем об успешном применении этого соединения для получения гликозилфосфата (II).



Обработка бромида (I) триэтиламмониевой солью дибензилфосфата при комнатной температуре в бензоле привела к быстрому образованию фосфорилированного продукта, который гидрогенолизом над палладиевым катализатором и удалением ацильных защитных групп действием водно-метанольной щелочи переводили в фосфат (II). После очистки ионообменной хроматографией фосфат (II) выделен в виде триэтиламмониевой соли с выходом 71%. Продукт охарактеризован данными оптического вращения и спектром ПМР, близкими к описанным в литературе [2,3], а также идентифицирован как β -аномер с помощью микрометода, основанного на измерении скорости кислотного гидролиза в стандартных условиях, предложенного нами недавно [10]. Исследование с помощью этого метода ряда фракций, полученных при ионообменной хроматографии, не дало указаний на присутствие α -аномера. Спектр ^{13}C -ЯМР выделенного фосфата однозначно подтверждает приписываемую ему структуру: положение сигналов атомов C3 и C5 практически совпадает с положением сигналов в спектре метил- β -*L*-рамнопиранозидов и отличается от таковых для α -аномера [9]. Сопоставление со спектрами α - и β -*D*-маннопиранозилфосфатов [11] на основании положения сигнала атома C3 также позволяет сделать вывод о β -конфигурации фосфата (II).

Для превращения гликозилфосфатов в нуклеозиддифосфатсахара известен целый ряд методов (обзор см. [12]); в большинстве из них существенное значение имеет удаление следов влаги, что затрудняет синтез, особенно в микромасштабе. Недавно в патентной литературе был описан способ получения нуклеозиддифосфатсахаров взаимодействием нуклеозид-5'-фосфоморфолидов с солями гликозилфосфатов в водном метаноле в присутствии кислых катализаторов [13]. Хотя ранее был проведен успешный синтез пирозинфосфата (III) из фосфата (II) с помощью фосфоморфолидного метода в диметилсульфоксиде и дифенилпирозинфосфатного метода [4], в настоящей работе мы исследовали применение для этой цели метода [13], обратив особое внимание на возможность проведения реакции в микромасштабе. При использовании 4-морфолин-*N,N'*-карбоксамидиновой соли тимидин-5'-фосфоморфолида и избытка кальциевой соли фосфата (II) в смеси метанол — н. соляная кислота пирозинфосфат (III) является главным продуктом реакции; после очистки препаративным электрофорезом и хроматографией на бумаге или ионообменной хроматогра-

фией на DEAE-целлюлозе он был выделен с выходом 35–40%. Сравнимые результаты дает проведение реакции в смеси *трет*-бутиловый спирт — 1н. соляная кислота. Описанный в данной работе вариант пирофосфатного синтеза особенно удобен для получения радиоактивных нуклеотидсахаров с высокой удельной активностью, так как сводит к минимуму операции, которые необходимо проводить с радиоактивным субстратом. Свойства полученного пирофосфата (III) полностью соответствовали свойствам ранее описанного соединения [1].

Экспериментальная часть

Упаривание всех растворов проводили в вакууме при температуре не выше 40° С. Аналитическую хроматографию и электрофорез на бумаге проводили с использованием бумаги Filtrak FN-11 (ГДР), для препаративных разделений применяли Whatman 3ММ (Англия). Зоны нуклеотидов на бумаге обнаруживали под УФ-лампой («Хроматоскоп»), фосфаты сахаров — после опрыскивания реагентом Хайнса-Ишервуда (пропись Д45а в книге [14]) и выдерживания на свету. Системы растворителей для хроматографии на бумаге: А — этанол — 1 М ацетат аммония, рН 7,5 (5:2); Б — этанол — 1 М ацетат аммония, рН 4,0 (5:2). Электрофорез на бумаге проводили в приборе ПВЭФ-1 при градиенте напряжения 10 В/см в 0,05 М триэтиламмонийбикарбонате, рН 7,5. Оптическое вращение измеряли на автоматическом поляриметре «Perkin-Elmer 141» (Швейцария). Спектры ПМР получены на приборе «Tesla BS-497» (ЧССР) с рабочей частотой 100 МГц, спектры ¹³С-ЯМР — на приборе «Bruker WP-60» (ФРГ) с рабочей частотой 15,08 МГц.

β-L-Рамнопиранозилфосфат (II). К раствору 200 мг (0,72 ммоль) дибензилфосфорной кислоты [15] в 5 мл сухого бензола прибавили 0,1 мл триэтиламина и затем 200 мг (0,68 ммоль) 4-О-ацетил-2,3-О-карбонил-*α-L*-рамнопиранозилбромида [9]. Оставили на 1 ч при 20° С, вывавший осадок отфильтровали, фильтрат упарили. Остаток растворили в 5 мл метанола и подвергли гидрогенезу над 5%-ным Pd/C. Через 30 мин катализатор отфильтровали, к фильтрату прибавили 15 мл 1 н. раствора гидроокиси лития и оставили на ночь. Осадок фосфата лития отфильтровали, промыли 0,01 н. раствором гидроокиси лития, фильтрат и промывные воды нейтрализовали добавлением катионита дауэкс-50W×8 (пиридиниевая форма). Ионообменник отфильтровали, раствор нанесли на колонку (1,3×18 см) с анионитом дауэкс AG 1×8 (НСО₃⁻). Колонку промыли 100 мл воды и элюировали раствором триэтиламмонийбикарбоната (ТЭАБ), рН 7,5 (линейный градиент от 0 до 0,3 М, по 200 мл), во фракциях определяли кислотолабильный фосфат и скорость отщепления неорганического фосфата в стандартных условиях [10]. Из фракций, смываемых 0,17–0,20 М ТЭАБ после упаривания раствора и удаления избытка ТЭАБ отгонкой воды от остатка, получили триэтиламмониевую соль *β-L*-рамнопиранозилфосфата (II). Выход 0,48 ммоль (71%), $[M]_D^{+57^\circ}$ (0,2 М, вода) (ср. [2, 3]), константа скорости гидролиза в условиях, описанных в работе [10], $2,8 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, $E_{\text{гидролиз}}$ 1,6. Данные спектра ПМР (D₂O, внутренний стандарт — диоксан), δ, м.д.: 4,94 дд (H1, $J_{1,P}$ 8 Гц, $J_{1,2} \sim 1$ Гц); 1,24 д (CH₂, $J_{5,6}$ 5,5 Гц) (ср. [3]). Спектр ¹³С-ЯМР (D₂O, внутренний стандарт — метанол), δ, м.д.: 18,0 (С6); 72,4 д (С2, $J_{C2,P}$ 5,9 Гц); 73,0 (С4); 73,7 (С5); 73,9 (С3); 96,4 д (С1, $J_{C1,P}$ 3,2 Гц).

Для получения кальциевой соли раствор триэтиламмониевой соли перемешали в течение 30 мин с катионитом дауэкс-50W×8 (Ca⁺²), ионообменник отфильтровали, фильтрат упарили, остаток высушили отгонкой со спиртом.

Тимидин-5'-(β-L-рамнопиранозил)пирофосфат (III). А. К раствору 3,6 мкмоль 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли тимидин-5'-фосфоморфолида [16] в 30 мкл метанола прибавили 16 мкмоль

кальциевой соли фосфата (II) и 15 мкл 1 н.водной HCl (до pH ~3), через 1 ч добавили еще 5 мкл 1 н. HCl и 10 мкл метанола. Через 3 ч добавили при встряхивании 90 мкл пропанола-2 и 2 мл эфира, выпавший осадок отделили центрифугированием и растворили в воде. Пирофосфат (III) выделили препаративным электрофорезом на бумаге (зона с $E_{\text{выкрат}} 1,0$) с последующей бумажной хроматографией в системе А ($R_f 0,50$) или Б ($R_f 0,40$). Выход 1,25 мкмоль (35%).

Б. Реакцию проводили аналогично, исходя из 7,2 мкмоль 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли тимидин-5'-фосфоморфолида и 32 мкмоль кальциевой соли фосфата (II) в 50 мкл метанола и 25 мкл 1 н. HCl. Продукт выделяли ионообменной хроматографией на колонке (0,5×10 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (Whatman, Cl⁻), колонку промыли 20 мл 0,003 н. HCl, затем 25 мл 0,003 н. HCl, содержащей 0,01 M NH₄Cl, продукт элюировали 0,003 н. HCl, содержащей 0,03 M NH₄Cl. Фракции нейтрализовали водным раствором аммиака до pH 7, концентрировали, пирофосфат (III) отделяли от солей на колонке с сефадексом G-10. Выход аммониевой соли (III) 2,6 мкмоль (36%).

В. К суспензии 1,2 мкмоль 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксамидиниевой соли тимидин-5'-фосфоморфолида в 40 мкл *tert*-бутанола прибавили 5 мкмоль кальциевой соли фосфата (II) и 10 мкл 0,25 н. водной HCl. Через 3 ч добавили 0,1 мл пропанола-2 и 2 мл эфира и после обработки согласно методике А получили 0,4 мкмоль пирофосфата (III) (33%).

Препараты, полученные в опытах А, Б и В, идентичны ранее полученному пирофосфату (III) [1] по данным хроматографии и электрофореза на бумаге, УФ-спектру и отношению нуклеозид — общий фосфат — кислотолабильный фосфат.

Авторы глубоко благодарны Н. Ф. Балану за предоставление исходной 1,4-ди-О-ацетил-2,3-О-карбонил- α -L-рамнопиранозы и А. С. Шашкову за съемку спектра ¹³C-ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шibaев В. Н., Елисева Г. И., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Мищенко С. С., Кочетков Н. К. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2584–2587.
2. Prihar H. S., Behrman E. J. (1973) Biochemistry, 12, 997–1002.
3. Шibaев В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Кочетков Н. К. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1852–1855.
4. Warren C. D., Liu T. Y., Herscovicz A., Jeanloz R. W. (1975) J. Biol. Chem., 250, 8069–8078.
5. Кусов Ю. Ю., Шibaев В. Н. (1972) Успехи биол. химии, 12, 182–219.
6. Шibaев В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Кочетков Н. К. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 887–891.
7. Tener G. M., Wright R. S., Khorana H. G. (1957) J. Amer. Chem. Soc., 79, 441–443.
8. Tener G. M., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 1999–2004.
9. Бактловский Л. В., Балан Н. Ф., Шашков А. С., Кочетков Н. К. (1980) Биоорганическая химия, 6, 464–467.
10. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шibaев В. Н. (1980) Биоорганическая химия, 6, 780–782.
11. O'Connor J. V., Nunez H. A., Barker R. (1979) Biochemistry, 18, 500–507.
12. Kochetkov N. K., Shibaev V. N. (1973) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 28, 307–399.
13. Bergmeyer H. U., Haid E., Nelboeck-Hoehstter M., Weimann G. (1975) пат. ФРГ № 2016049, РЖХИМ (1976) 12 О 157.
14. Хайс И. М., Мацек К. (1962) Хроматография на бумаге, Изд-во иностр. лит., М.
15. Cramer F., Weimann G. (1961) Chem. Ber., 94, 996–998.
16. Moffatt J. G., Khorana H. G. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 649–658.

Поступила в редакцию
6.III.1980

SYNTHESIS OF β -L-RHAMNOPYRANOSYL PHOSPHATE AND THYMIDINE 5'-(β -L-RHAMNOPYRANOSYL)-PYROPHOSPHATE

SHIBAIEV V. N., UTKINA N. S., DANILOV L. L., ELISEEVA G. I.
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Treatment of 4-O-acetyl-2,3-O-carbonyl- α -L-rhamnopyranosyl bromide with dibenzyl phosphate followed by deprotection afforded β -L-rhamnopyranosyl phosphate. Anomeric configuration of the glycosyl phosphate was confirmed by ¹³C NMR, in addition to some other methods. A modified procedure for the synthesis of thymidine diphosphate rhamnose from thymidine 5'-phosphomorpholidate was described.