



УДК 547.455'913.3'118.07

СИНТЕЗ МОРАПРЕНИЛПИРОФОСФАТОВ  $\alpha$ -D-МАННОЗЫ,  
 $\alpha$ -D-ТАЛОЗЫ,  $\alpha$ -D-ФУКОЗЫ И МЕЧЕННЫХ ГЕКСОЗ*Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибатов В. Н.,  
Кочетков П. К.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

Морапренилпирофосфаты  $\alpha$ -D-фукозы и  $\alpha$ -D-талозы — моносахаридных аналогов соответствующего производного  $\alpha$ -D-галактозы, а также  $\alpha$ -D-маннозы,  $\alpha$ -D-[ $^{14}$ C]галактозы и  $\alpha$ -D-[ $^{14}$ C]маннозы получены взаимодействием морапренилфосфонмидазолида и фосфатов соответствующих моносахаридов.

Участие полипренилпирофосфатных производных сахаров в качестве промежуточных продуктов в биосинтезе углеводных цепей полимеров клеточных стенок бактерий [1] или гликопротеинов эукариотов [2] в настоящее время надежно установлено. Вопрос о специфичности ферментов, участвующих в биосинтезе этих соединений, остается открытым, и для его решения необходимо иметь набор веществ известного строения, соответствующих природным субстратам и их структурным аналогам.

Недавно нами разработан новый метод синтеза полипренилпирофосфатсахаров, с помощью которого осуществлен синтез морапренилпирофосфатов  $\alpha$ -D-галактозы,  $\alpha$ -D-глюкозы (и ее  $^{14}$ C-меченного производного) [3], а также некоторых олигосахаридных производных [4].

Целью данного сообщения является распространение метода на некоторые другие моносахаридные производные. Так, морапренилпирофосфатные производные  $\alpha$ -D-талозы (эпимер галактозы по C2) и  $\alpha$ -D-фукозы (6-дезоксигалактозы) представляют существенный интерес как аналоги морапренилпирофосфатгалактозы для изучения специфичности ферментов биосинтеза O-антигенов салмонелл. Возможно, их применение наряду с ранее описанной морапренилпирофосфатглюкозой позволит выяснить специфичность рамнозилтрансферазы, катализирующей перенос остатка рамнозы от dTDP-Rha на полипренилпирофосфатгалактозу (образование дисахаридного промежуточного продукта при биосинтезе O-антигена), к структуре акцептора гликозильного остатка. Морапренилпирофосфат  $\alpha$ -D-маннозы может быть полезен для изучения биосинтеза полисахаридов дрожжей [5] и, возможно, растительных полисахаридов, радиоактивные производные морапренилпирофосфатов  $\alpha$ -D-галактозы и  $\alpha$ -D-маннозы — для исследования биосинтеза углеводсодержащих биополимеров с использованием акцепторов, содержащих радиоактивную метку.

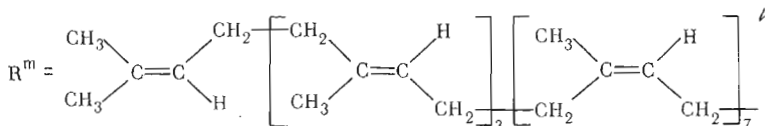
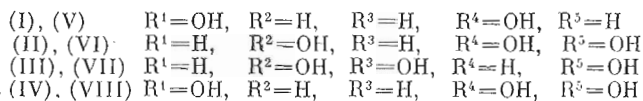
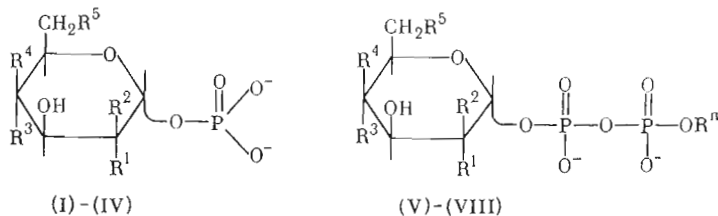
Для получения полипренилпирофосфатсахаров имидазолидным методом исходными соединениями служат фосфат соответствующего углевода и полипренилфосфат. В качестве полипренилфосфата мы использовали синтетический фосфат морапренола, способный эффективно заменять природный ундекапренилфосфат в ферментных системах салмонелл [6]. Фосфаты  $\alpha$ -D-фукозы и радиоактивных моносахаридов были синтезированы из полных ацетатов сплавлением с безводной фосфорной кислотой в условиях метода МакДональда [7] (56—60°С, 2 ч) (синтез  $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфата описан в работе [8],  $\alpha$ -D-талопиранозилфосфата — в работе [9]). После обработки 1 н. гидроокисью лития для удаления ацетильных групп и осаждения неорганического фосфата фосфаты моносахаридов были очищены анионообменной хроматографией на дауэксе 1×8 (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>) в линейном градиенте водного раствора триэтиламонийбикарбоната (ТЕАВ) (0—0,3 М). Степень очистки и индивидуальность полученных продуктов контролировали с помощью электрофореза на бумаге. Радиоактивные пре-

Сокращения: THF — тетрагидрофуран, DMSO — диметилсульфоксид, ТЕАВ — бикарбонат триэтиламония.

параты были идентичны соответствующим немеченым производным.  $\alpha$ -Конфигурация *D*-фукопиранозилфосфата подтверждена спектром ПМР, в котором присутствовал сигнал аномерного протона при  $\delta$  5,91 м.д. в виде квартета с  $J_{1,2}$  3,0 и  $J_{1,P}$  7,0 Гц.

Синтез морапренилпирофосфатсахаров проводили в условиях, описанных в работе [10], т. е. превращали морапренилфосфат в морапренилфосфоимидазолид реакцией с сульфинилдиимдазолом [11] и обрабатывали избытком три-*n*-октиламмониевой соли фосфата сахара в смеси THF — DMSO, 1 : 1, и смесь разделяли анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в линейном градиенте ацетата аммония (0—0,15 М) в метаноле (типичная картина разделения описана в работе [3]). Наличие полипренилпирофосфатсахаров во фракциях элюата определяли с помощью ТСХ и хроматографии на бумаге (сопоставление с подвижностью образца морапренилпирофосфатгалактозы). При электрофоретическом исследовании морапренилпирофосфатсахара оставались на старте, так как они благодаря остатку морапренола нерастворимы в водном ТЕАВ. Радиоактивные морапренилпирофосфатсахара идентифицировали сопоставлением их с немечеными аналогами.

Структура соединений была подтверждена результатами их специфической деградации. При обработке 40% водным фенолом (10 мин, 70°С) во всех случаях образовывались гликозилпирофосфаты (что характерно для соединений с  $\alpha$ -ненасыщенным изопреновым звеном [12]), идентифицированные электрофорезом на бумаге.



Морапренилпирофосфаты  $\alpha$ -*D*-галактозы (VIII) и  $\alpha$ -*D*-фукозы (V) превращались в циклические фосфаты при обработке водным аммиаком в смеси бензол — метанол с одновременным отщеплением морапренилфосфата, что подтверждало наличие в них пирофосфатного мостика в *цис*-положении по отношению к C2-гидроксилу (ср. [12]). Морапренилпирофосфаты  $\alpha$ -*D*-галактозы (VI) и  $\alpha$ -*D*-маннозы (VII) при обработке аммиаком были устойчивы, но разлагались под действием разбавленной щелочи при нагревании с образованием неорганического фосфата и морапренилфосфата, что соответствовало *транс*-расположению пирофосфатной группы по отношению к C2-гидроксилу углеводного остатка (известно, что в аналогичных условиях у долихилпирофосфата  $\alpha$ -*D*-маннопиранозы расщепляется пирофосфатная и гликозилфосфатная связь без образования циклофосфата сахара [13]).

### Экспериментальная часть

Аналитические методы описаны в работе [3]. Растворы упаривали в вакууме при  $t \leq 30^\circ\text{C}$ . ТСХ проводили на пластинках с силикагелем G (Kieselgel 60, Merck, ФРГ) размером 6×2,5 см в системах хлороформ — метанол — вода, 60 : 25 : 4 (А), и хлороформ — метанол — 0,05 М ТЕАВ.

(рН 8,5), 10:10:3 (Б), обнаруживая фосфорные эфиры с помощью реактива [14] с последующим прокаливанием, а непредельные соединения — с помощью 1% перманганата калия в 2% водном растворе карбоната натрия. Электрофорез проводили на бумаге «Filtrak FN-16» в 0,05 М ТЕАВ, обнаруживая фосфаты реагентом [15] и определяя подвижность сахаров относительно  $\alpha$ -D-глюкопиранозилфосфата ( $E_{Glc\ 1P}$ ). БХ осуществляли на бумаге «Filtrak FN-11» в системе этанол — 1 М ацетат аммония (рН 7,5), 5:2 (В), определяя подвижность соединений относительно  $\alpha$ -D-глюкопиранозилфосфата ( $R_{Glc\ 1P}$ ). Спектр ПМР снимали на приборе BS 497 (Tesla, ЧССР) с рабочей частотой 100 МГц в D<sub>2</sub>O при 35°С. Электропроводность растворов измеряли с помощью кондуктометра CDM3 (Radiometer, Дания). Морапренилпирофосфатсахара хранили в виде метанольного раствора, содержащего ацетат аммония.

*Три-*n*-октиламмониевые соли фосфатов сахаров* получали пропусканием водных растворов соответствующих фосфатов через охлажденную до 10°С колонку с дауэксом 50W×8 (H<sup>+</sup>, Serwa, ФРГ), обработкой элюата спиртовым раствором три-*n*-октиламина (2 экв.) и последующим высушиванием (отгонка спирта и лиофилизация из бензола).

*$\alpha$ -D-Фукопиранозилфосфат (I).* Полный ацетат D-фукопиранозы (325 мг, 1 ммоль), полученный ацетилизацией D-фукозы (Merck, ФРГ) смесью уксусного ангидрида и пиридина, растворяли в 2 мл абс. бензола и лиофилизовали. К остатку прибавляли 300 мг безводной кристаллической фосфорной кислоты (Merck, ФРГ) и нагревали 1,5 ч при 56—60°С в вакууме. После охлаждения прибавляли 30 мл холодного 1 н. раствора LiOH и выдерживали 18 ч при 20°С. Осадок фосфата лития отделяли фильтрованием и промывали 0,1 н. LiOH. Прозрачную жидкость обрабатывали избытком дауэкса 50W×8 (Py<sup>+</sup>) до слабощелочной реакции, разбавляли водой (до 100 мл) и наносили на колонку (1,5×25 см) с дауэксом 1×8 (Serva, ФРГ). Элюцию проводили градиентом (0—0,3 М) ТЕАВ (по 150 мл) со скоростью 60 мл/ч, собирая фракции по 10 мл. Контроль за разделением осуществляли, определяя во фракциях кислотолабильный ( $P_{кл}$ ) и неорганический ( $P_{общ}$ ) фосфат, и электрофоретически. Фракции, содержащие требуемое соединение, объединяли и удаляли ТЕАВ последовательной отгонкой воды и этанола. Выход соединения (I) (триэтиламмониевая соль) 370 мкмоль (37%),  $R_f$  0,75 (Б),  $E_{Glc\ 1P}$  1,05,  $P_{кл} : P_{общ}$  1 : 1. Спектр ПМР ( $\delta$ , м.д.): 5,91 (1-Н, к,  $J_{1,2}$  3,0 Гц,  $J_{1,P}$  7,0 Гц), 5,23 (HDO), 4,70 (к,  $J$  7,0 Гц, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 4,50—4,00 (м, 2-Н, 3-Н, 4-Н), 3,68 (к,  $J$  7,2 Гц, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 1,72 (д,  $J$  7,0 Гц, —C—CH<sub>3</sub>).

*$\alpha$ -D-[<sup>14</sup>C]Маннопиранозилфосфат (III).* Пентаацетат D-[<sup>14</sup>C]маннопиранозы (13 мкмоль, получен разбавлением препарата фирмы UVVVR (ЧССР) нерадиоактивной D-маннозой до уд. акт. 20 Ки/моль и ацетилизацией смесью уксусного ангидрида и пиридина) после лиофилизации из 1 мл абс. бензола сплавляли с 25 мг кристаллической фосфорной кислоты и обрабатывали, как описано в предыдущем опыте, контролируя элюцию определением во фракциях радиоактивности и кислотолабильного фосфата. Выход соединения (III) 7,9 мкмоль (61%),  $E_{Glc\ 1P}$  1,00,  $P_{кл} : P_{общ}$  0,98 : 1.

*Морапренилпирофосфат  $\alpha$ -D-фукопиранозы (V).* Морапренилфосфат (7,0 мкмоль), полученный в виде метанольного элюата после ионообменной хроматографии по методике [6], обессоливали на колонке (1×25 см) с сефадексом LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), контролируя процесс по изменению электропроводности элюата, упаривали досуха, растворяли в 2 мл абс. бензола, лиофилизовали и превращали в имидазолид как описано в работах [3, 10]. Полученный морапренилфосфоимидазолид растворяли в смеси 0,2 мл абс. THF — абс. DMSO (1 : 1) и прибавляли к раствору 14 мкмоль три-*n*-октиламмониевой соли  $\alpha$ -D-фукопиранозилфосфата (I) в 0,2 мл той же смеси растворителей. Через 18 ч при 20°С реакционную смесь разбавляли 30 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и наносили на колонку (0,8×10 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (OAc<sup>-</sup>, Whatman, Англия), уравновешенную той же смесью растворителей. Колонку промывали 30 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и 30 мл метанола.

Элюцию проводили линейным градиентом (0—0,15 M) ацетата аммония в метаноле (по 100 мл, 40 мл/ч), собирая фракции объемом 4,5 мл. Выход соединения (V) 3,14 мкмоль (45%),  $R_f$  0,25 (A),  $R_{Glc 1P}$  1,72 (B),  $E_{Glc 1P}$  0,00,  $P_{кл}$ : морапренол 2,2:1.

*Морапренилпирофосфат  $\alpha$ -D-галопиранозы (VI)* получали аналогично соединению (V) из 5,5 мкмоль морапренилфосфата и 12 мкмоль три-*n*-октиламмониевой соли  $\alpha$ -D-галопиранозилфосфата (II) [9] в 0,3 мл смеси абс. THF — абс. DMSO (1:1). После ионообменной хроматографии (см. выше) в градиенте ацетата аммония (по 75 мл, 36 мл/ч) получили 2,7 мкмоль (49%) соединения (VI),  $R_f$  0,20 (A),  $E_{Glc 1P}$  0,00,  $P_{кл}$ : морапренол 1,85:1.

*Морапренилпирофосфат  $\alpha$ -D-маннопиранозы (VII)* получали аналогично предыдущему опыту из 7 мкмоль морапренилфосфата и 17 мкмоль три-*n*-октиламмониевой соли  $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфата (II') (общий объем реакционной смеси 0,4 мл). Требуемое соединение выделяли ионообменной хроматографией как описано выше (градиент по 75 мл) в количестве 8,27 мкмоль (58%),  $R_f$  0,20 (A),  $E_{Glc 1P}$  0,00,  $P_{кл}$ : морапренол 1,75:1 (вычислено 2:1) [ $^{14}C$ ] Маннозный аналог соединения (VII) был получен по той же методике из 1,8 мкмоль триэтиламмониевой соли [ $^{14}C$ ] (III) (20 Ки/моль) и 1 мкмоль морапренилфосфата с выходом 14,5% (0,145 мкмоль),  $R_f$  0,20 (A),  $R_{Glc 1P}$  1,70 (B),  $E_{Glc 1P}$  0,00.

*Морапренилпирофосфат  $\alpha$ -D-[ $^{14}C$ ]галактопиранозы (VIII)* получали аналогично предыдущим опытам из 1,56 мкмоль  $\alpha$ -D-[ $^{14}C$ ]галактопиранозилфосфата (препарат фирмы «Amersham» разбавляли дикалиевой солью немеченого  $\alpha$ -D-галактопиранозилфосфата (Sigma) до уд. акт. 8,5 Ки/моль и переводили в три-*n*-октиламмониевую соль) и 2 мкмоль морапренилфосфата. Выход 0,4 мкмоль (25%),  $R_f$  0,18 (A),  $R_{Glc 1P}$  1,64 (B),  $E_{Glc 1P}$  0,00.

*Фенольную деградацию морапренилпирофосфатсахаров* проводили, как указано в работе [3], идентифицируя пирофосфаты моносахаридов электрофоретически по их подвижности относительно  $\alpha$ -D-глюкопиранозилфосфата ( $E_{Glc 1P}$  0,78 из соединения (VIII), 0,80 из (VI) и (VII) и 0,82 из (V)).

*Деградацию морапренилфосфатсахаров аммиаком* осуществляли как указано в работе [3]. После инкубации и упаривания смесей до объема 0,1 мл проводили экстракцию хлороформом (3×50 мкл). При этом происходил распад соединений (V) и (VIII) до морапренилфосфата (ТСХ, A) и циклофосфатов (водный слой,  $E_{Glc 1P}$  0,63 из (VIII) и 0,70 из (V)). Соединения (VI) и (VII) в аналогичных условиях были устойчивы.

*Деградация морапренилпирофосфатсахаров щелочью.* Соединения (VI) и (VII) (по 0,3 мкмоль) после ионообменной хроматографии обессоливали распределением между водой и бензолом, бензольный слой упаривали, остаток растворяли в 0,3 мл бензола и прибавляли 0,05 мл 0,2 н. водного NaOH и 0,05 мл метанола (для получения гомогенного раствора). Смесь нагревали 5 мин при 100°С, по охлаждении экстрагировали хлороформом (3×0,1 мл). В хлороформной фазе идентифицировали морапренилфосфат ( $R_f$  0,48, A), в водной фазе — неорганический фосфат ( $E_{Glc 1P}$  1,25).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шибаяев В. Н. Успехи биол. химии, 1976, т. 17, с. 187—246.
2. Struk D. K., Lennarz W. J. In: The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans / Ed. Lennarz W. J. New York and London: Plenum Press, 1980, p. 35—83.
3. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 88, № 2, p. 203—211.
4. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибаяев В. Н., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1718—1722.
5. Шабалин Ю. А., Вагабов В. М., Кулаев И. С. Докл. АН СССР, 1979, т. 249, № 1, с. 243—246.
6. Вергулова Г. И., Глухоед Н. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И., Шашков А. С., Шибаяев В. И. Биоорган. химия. 1977, т. 3, № 11, с. 1484—1492.
7. MacDonald D. L. Methods Enzymol., 1966, v. 8, p. 121—125.
8. Perchemlides P., Osawa T., Davidson E. A., Iscanloz R. W. Carbohydr. Res., 1967, v. 3, № 4, p. 463—477.

9. Шибает В. Н., Елисева Г. И., Краевская М. А., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 376—380.
10. Шибает В. Н., Данилов Л. Л., Чекуличиков В. Н., Кузов Ю. Ю., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 308—309.
11. Staab H. A., Wendel K. Justus Liebigs Ann. Chem., 1966, B. 694, S. 86—90.
12. Garcia R. C., Recondo E., Dankert M. Eur. J. Biochem., 1974, v. 43, № 1, p. 93—105.
13. Warren C. D., Jeanloz R. W. Biochemistry, 1975, v. 14, № 2, p. 412—419.
14. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129—141.
15. Hanes C. S., Isherwood F. A. Nature (London), 1949, v. 164, № 4183, p. 1107—1109.

Поступила в редакцию  
8.VII.1981

## SYNTHESIS OF MORAPRENYLPYROPHOSPHATES OF $\alpha$ -D-MANNOSE, $\alpha$ -D-TALOSE, $\alpha$ -D-FUCOSE AND LABELED HEXOSES

DANILOV L. L., MAL'TSEV S. D., SHIBAEV V. N., KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Moraprenylpyrophosphates of  $\alpha$ -D-fucose,  $\alpha$ -D-talose (monosaccharide analogs of  $\alpha$ -D-galactose),  $\alpha$ -D-mannose,  $\alpha$ -D-[ $^{14}$ C]galactose and  $\alpha$ -D-[ $^{14}$ C]mannose were prepared by reaction of moraprenyl phosphoimidazolidate with corresponding monosaccharide phosphates.