



УДК 547.593.261'118.057

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ ПРОИЗВОДНЫХ АСИММЕТРИЧНО ЗАМЕЩЕННОГО *мио*-ИНОЗИТА XXXVIII*. СИНТЕЗ ГЛЮКОЗИДА ФОСФАТИДИЛИНОЗИТА

© 1996 г. Н. С. Шастина, Л. И. Эйнисман, А. Е. Степанов,[#] В. И. ШвецМосковская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,
117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 08.12.95 г.

Осуществлен полный синтез 1(3)-O-(*rac*-1,2-дипальмитоилглицерофосфо)-4(6)-O-β-*D*-глюкопиранозил-*sn*-*мио*-инозита. Основные этапы синтеза – гликозилирование замещенного производного *мио*-инозита в условиях гликозилфторидного метода и создание фосфорного узла целевого гликолипида с использованием *N*-фосфонатного метода.

Ключевые слова: *мио*-инозит, гликозилфосфатидилинозит, гликозилфторидный метод, фосфорилирование *N*-фосфонатами.

Участие инозитсодержащих гликофосфолипидов в важных проявлениях жизнедеятельности клетки определяет возрастающий интерес к изучению их строения, свойств и механизмов действия в биологических системах. В последние годы установлено, что инозитсодержащие липиды активно вовлечены в различные процессы на молекулярном уровне (закрепление белков на поверхности мембраны, регуляция физиологического состояния клетки) и обладают иммунохимическими свойствами [2–5].

Фосфолипидные антигены из патогенных видов микроорганизмов *Mycobacterium* идентифицированы как маннозиды фосфатидилинозита и используются в медицине для диагностики опасных инфекционных заболеваний – туберкулеза и проказы [6]. Поиск препаративных химических методов получения и структурной модификации гликозилфосфатидилинозитов составляет важную часть междисциплинарных исследований этого сложного и пока недостаточно изученного класса природных соединений, а также обеспечивает возможность выявления новых биологически активных веществ, перспективных для конструирования медицинских и диагностических препаратов и использования в фундаментальных работах. Общий подход к созданию структуры маннозидов фосфатидилинозита был разработан нами на примере синтеза мономаннофосфоинозотида [7] и позднее усовершенствован группой голландских исследователей [8]. В ходе реализации нашей программы по синтезу новых биологически активных соединений на основе *мио*-инозита возникла не-

обходимость формирования более эффективных подходов к получению углеводных производных фосфатидилинозита. С использованием недавно введенных в синтетическую практику методик образования гликозидной [9] и фосфоэфирной [10] связей мы предприняли описанный в настоящей работе полный синтез 1(3)-O-(*rac*-1,2-дипальмитоилглицерофосфо)-4(6)-O-β-*D*-глюкопиранозил-*sn*-*мио*-инозита (8) – структурного аналога микобактериального мономаннофосфоинозотида [6] и безазотистого аналога глюкозаминидного звена природных гликозилфосфатидилинозитов, выполняющих якорную функцию при закреплении белков на плазматической мембране [2].

Выбранный путь построения структуры гликозилфосфатидилинозита (8) предусматривал последовательное введение в молекулу исходного производного *мио*-инозита структурообразующих частей синтезируемого гликофосфолипида – моносахаридного звена и фосфатидильного остатка путем попеременного селективного блокирования-деблокирования функциональных групп синтетических фрагментов на соответствующих этапах синтеза (схема).

В качестве стартового соединения синтеза был использован 1(3)-O-левулиноил-2,3(1); 5,6(4)-ди-O, O-изопропилиден-*sn*-*мио*-инозит (1)*, полученный по описанному методу [1]. Обработка моногидроксильного производного *мио*-инозита (1) смесью гексаметилдисилазана и триметилхлорсилана при 20°C привела к соответствующему триметилсилиловому эфиру (2), который гликозилировали

* Сообщение XXXVII см. [1].

Автор для переписки.

* Для асимметрично замещенных производных *мио*-инозита [11] и глицерина [12] используется стереоспецифическая номенклатура.

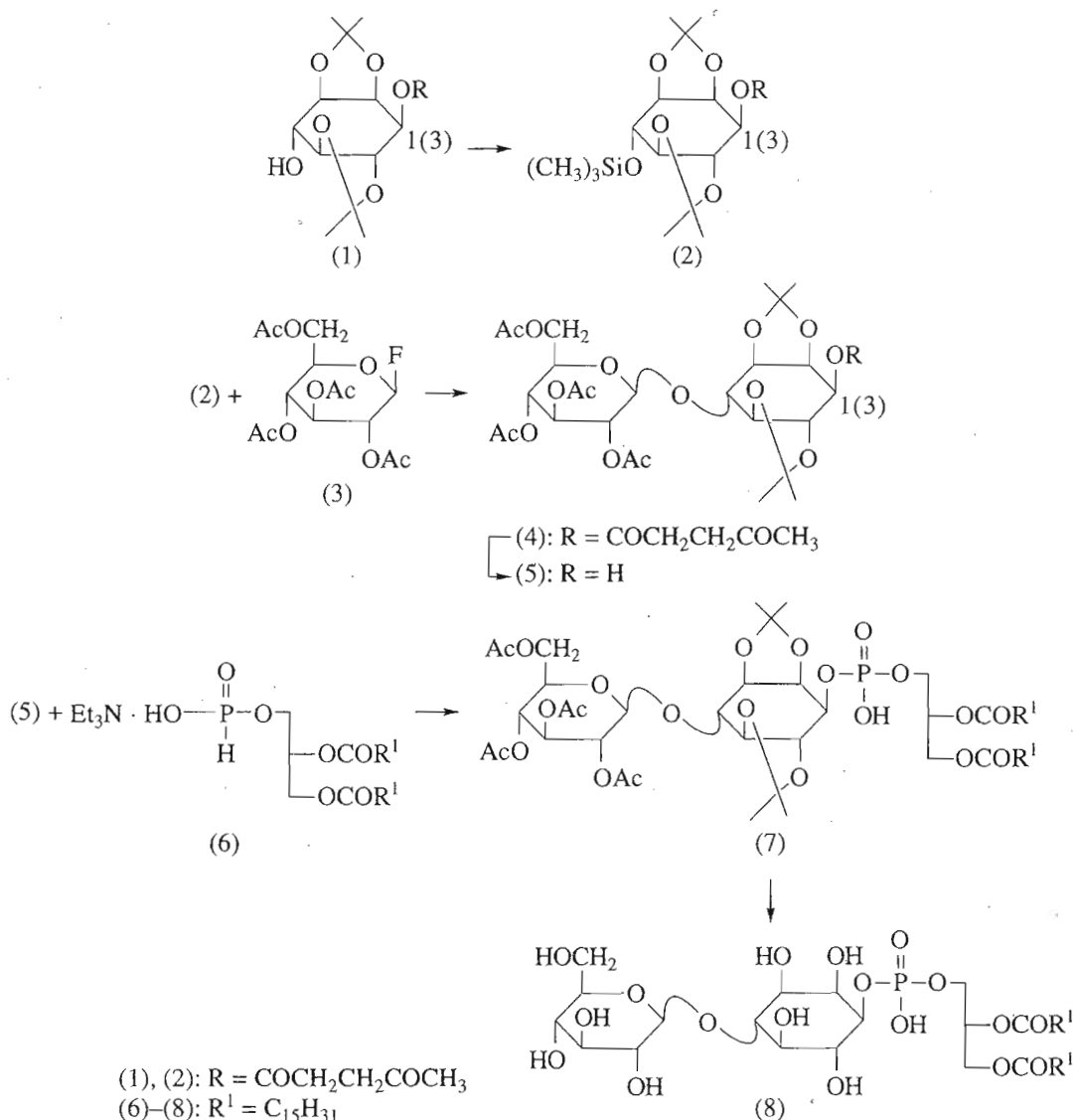


Схема.

действием 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилфторида (3) [13] в бензоле в присутствии эфирата трехфтористого бора; хроматографией на силикагеле выделяли 49% полностью защищенного глюкозида *мио*-инозита (4). Обработкой соединения (4) раствором гидразингидрата в смеси пиридин – уксусная кислота достигалось селективное удаление левулиноильной защитной группы, и моногидроксильное производное глюкозида (5) выделяли колоночной хроматографией с выходом 76%. Структура глюкозидов *мио*-инозита (4) и (5) подтверждена на основании ТСХ, элементного анализа и спектральных (ИК-, ЯМР-спектроскопия) данных: наличие в ¹H-ЯМР-спектре характеристической для 1,2-*транс*-гликозидов константы спин-спинового взаимодействия кольцевых протонов при С-1 и С-2 ($J_{1,2}$ 8–8.5 Гц), исчезновение сигналов метильных и метиленовых

протонов левулиноильного остатка (при сохранении сигналов протонов ацетильных групп в спектре глюкозида (5) в сравнении со спектром соединения (4)); характер распределения сигналов углеродных атомов углеводного остатка и циклитного кольца в ¹³C-ЯМР-спектре глюкозида (4).

Сравнительный анализ результатов синтеза глюкозидов (4) и (5) и данных, полученных нами в предыдущей работе по синтезу глюкозаминидного производного фосфатидинозита [1], подтверждает эффективность подхода, основанного на одновременном использовании левулиноильной и ацетильной защиты гидроксильных гликозидных полупродуктов *мио*-инозита, необходимых при получении гликофосфолипидов сложного строения.

Следующий этап работы состоял в подборе оптимального метода образования фосфорного

узла на базе глюкозида (5) и последующем переходе к структуре целевого гликофосфолипида (8). Ввиду того что гидроксигруппа в производном (5) пространственно затруднена, мы применили для фосфорилирования Н-фосфонатный метод, для которого показана высокая эффективность в подобных случаях [10, 14].

Гликозид (5) конденсировали с триэтиламмониевой солью 1,2-дипальмитоил-*rac*-глицеро-Н-фосфоната (6) в пиридине в присутствии пивалоилхлорида, после образования соответствующего глицеро-Н-фосфонатного диэфира (10–15 мин, по данным ТСХ) его без выделения окисляли раствором иода в водном пиридине и после колоночной хроматографии получали защищенный глюкозилфосфатидилинозит (7). Защитные группы в соединении (7) удаляли последовательно в два этапа без выделения частично деблокированного липида: кетальные группы снимали действием 50% уксусной кислоты, ацетаты расщепляли при обработке водно-спиртового раствора липида 10% гидразингидратом; строение синтезированного гликофосфолипида (8) подтверждено данными ТСХ, элементного анализа и ЯМР-спектроскопии.

Результаты настоящего исследования и данные предшествующей работы [1] показывают высокую эффективность сочетания новых модификаций гликозилфторидного метода гликозилирования и фосфорилирования Н-фосфонатами при синтезе инозитсодержащих гликофосфолипидов природной и модифицированной структуры.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР регистрировали на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker MSL-200 (ФРГ) с рабочей частотой 200 и 50.32 МГц на ядрах ^1H и ^{13}C . Спектры ^1H -ЯМР записывали для растворов веществ в дейтерированных растворителях (внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан). Спектры ^{13}C -ЯМР снимали для растворов веществ в дейтерированных растворителях с широкополосным подавлением спин-спинового взаимодействия ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$. Спектры ^{31}P -ЯМР получены на спектрометре Bruker HSL-250 (ФРГ) с фурье-преобразованием на частоте 101.05 МГц в дейтерированных растворителях с широкополосным гетероядерным подавлением спин-спинового взаимодействия ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ (внешний стандарт – 85% ортофосфорная кислота).

ИК-спектры снимали на спектрометре Shimadzu IR-435 (Япония) в вазелиновом масле. Температуры плавления (не исправлены) измеряли на приборе Voetius (ГДР). Элементный анализ выполняли на автоматическом анализаторе Heraeus CHNO-Rapid (ФРГ).

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 (Chemapol, Чехо-Словакия),

ТСХ – на пластинках Silufol (Чехо-Словакия) (вариант I) или на стеклянных пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) (вариант II), используя следующие системы растворителей: бензол–ацетон–изопропанол, 45 : 2 : 2 (А), бензол–метанол, 10 : 1 (Б), хлороформ–метанол–20% водный аммиак, 70 : 15 : 2 (В), хлороформ–метанол–вода, 65 : 25 : 4 (Г). Обнаружение пятен проводили прокаливанием при 250°C (вариант I) или раствором молибдата аммония в 30% серной кислоте с последующим прокаливанием при 250–300°C (вариант II).

Триэтиламин кипятили над гидридом кальция и перегоняли. Пиридин очищали кипячением и последующей перегонкой над щелочью, а затем над металлическим натрием. Бензол и толуол высушивали кипячением и перегонкой над пятиокисью фосфора и металлическим натрием.

1(3)-О-Левулиноил-2,3(1);5,6(4)-ди-О,О-изопропилиден-*sn*-*мио*-инозит (1) получен ранее описанным методом [1], 1,2-дипальмитоил-*rac*-глицеро-Н-фосфонат (6) синтезировали из 1,2-дипальмитоил-*rac*-глицерина [14], 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиранозилфторид (3) – так, как описано ранее [13].

1(3)-О-Левулиноил-2,3(1);5,6(4)-ди-О,О-изопропилиден-4(6)-О-триметилсиллил-*sn*-*мио*-инозит (2). К раствору 0.43 г (1.20 ммоль) соединения (1) в пиридине (5 мл) прибавляли 2 мл (9.48 ммоль) гексаметилдисилана и 1 мл (7.88 ммоль) триметилхлорсилана. Реакционную массу перемешивали 1 ч при 20°C, отфильтровывали осадок, к упаренному фильтрату добавляли теплый гексан (20 мл), осадок отделяли, из фильтрата упариванием получали 0.50 г (97%) соединения (2), R_f 0.40 (I, А), т. пл. 118–120°C (гексан). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1750 (C=O в COOR), 1740 (C=O в γ -кетоефирах), 1260 (Si–CH₃), 1240 (C–O в COO), 1160, 1090 (C–O в C–O–C). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl₃), δ , м. д.: 0.19 (с, 9H, 3CH₃Si), 1.29, 1.38, 1.55, 1.62 (4с, 12H, 2CMe₂), 2.18 (с, 3H, CH₃CO), 2.66 (т, 2H, CH₂COOR), 2.73 (т, 2H, CH₂COCH₃), 3.32 (дд, 1H, H-5), 3.91–4.08 (м, 3H, H-3, H-4, H-6), 4.24 (дд, 1H, H-2), 5.23 (дд, 1H, H-1). Найдено, %: C 55.44; H 7.31; Si 6.26. C₂₀H₃₄O₈Si. Вычислено, %: C 55.78; H 7.96; Si 6.52.

1(3)-О-Левулиноил-2,3(1);5,6(4)-ди-О,О-изопропилиден-4(6)-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиранозил)-*sn*-*мио*-инозит (4). К раствору 0.44 г (1.02 ммоль) соединения (2) и 0.35 г (1.00 ммоль) ацетатфторглюкозы (3) в бензоле (3 мл) при перемешивании при 20°C в течение 15 мин по каплям прибавляли раствор 30 мкл (0.24 ммоль) эфирата трехфтористого бора в бензоле (6 мл). Реакционную массу перемешивали еще 1 ч, прибавляли 60 мкл (0.43 ммоль) триэтиламина и 50 мл хлороформа, промывали водой, сушили сульфатом натрия, упаривали, остаток хроматографировали на силикагеле, элюируя смесью хлороформ–метанол

(100 : 2) соединение (4). Выход 0.34 г (49%), R_f 0.37 (I, B), т. пл. 235–237°C (этанол). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1750 (C=O в COOR), 1740 (C=O в γ -кето-эфирах), 1260 (C–O в COO), 1160, 1090 (C–O в C–O–C). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м. д.: 1.32, 1.40, 1.53, 1.62 (4с, 12Н, 2 CMe_2), 2.01–2.11 (4с, 12Н, 4 CH_2CO), 2.17 (с, 3Н, CH_3CO), 2.67 (т, 2Н, CH_2COOR), 2.73 (т, 2Н, CH_2COCH_3), 3.34 (дд, 1Н, Н-5), 3.68 (дд, 1Н, Н-5'), 3.95–4.21 (м, 5Н, Н-3, Н-4, Н-6, Н-6'), 4.43 (дд, 1Н, Н-2), 4.84 (д, 1Н, Н-1', $J_{1,2}$ 8.5 Гц), 5.01–5.23 (м, 4Н, Н-1, Н-2', Н-3', Н-4'). ^{13}C -ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м. д.: 20.51, 25.76, 26.82, 27.62, 27.98, 29.77, 37.91 (5 CH_3 , ацетил, 4 CH_3 , изопропил, 2 CH_2 , леулиноил), 61.97, 68.42, 71.22, 71.93, 72.62, 76.37, 76.58, 77.99, 77.19, 77.64, 79.14 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), 101.06 (C-1'), 110.54, 112.53 (2 CMe_2), 169.29, 170.29, 170.49, 171.59 (6C=O). Найдено, %: С 54.12; Н 6.46. $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_{17}$. Вычислено, %: С 54.06; Н 6.44.

1(3),2;4(6),5-ди-О,О-Изопропилиден-6(4)-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиранозил)-*sn*-мио-инозит (5). К раствору 0.21 г (0.33 ммоль) соединения (4) в пиридине (3.3 мл) при перемешивании при 20°C добавляли раствор 0.17 г (3.3 ммоль) гидразингидрата в смеси пиридин–уксусная кислота, 3 : 2 (3.3 мл), охлаждали водой со льдом, через 10 мин к реакционной смеси прибавляли 0.33 мл (3.3 ммоль) пентан-2,4-диона и перемешивали 5 мин. Реакционную массу разбавляли смесью хлороформа и воды, 1 : 1 (100 мл), органический слой отделяли и промывали 10% водным раствором бикарбоната натрия (30 мл) и водой (30 мл), сушили сульфатом магния, удаляли растворители. Вещество (5) очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали смесью хлороформ–метанол (100 : 2). Выход 0.15 г (76%), R_f 0.31 (I, B), т. пл. 228–230°C (этанол). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 3500 (ОН), 1750 (C=O в COOR), 1260 (C–O в COO), 1170, 1060 (CO в C–O–C, C–O–H). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м. д.: 1.32, 1.40, 1.50, 1.55 (4с, 12Н, 2 CMe_2), 2.02–2.09 (4с, 12Н, 4 CH_2CO), 2.42 (д, 1Н, ОН), 3.28 (дд, 1Н, Н-5), 3.69 (дд, 1Н, Н-5'), 3.82–4.03 (м, 5Н, Н-1, Н-3, Н-4, Н-6'), 4.19 (дд, 1Н, Н-6), 4.42 (т, 1Н, Н-2), 4.82 (д, 1Н, Н-1', $J_{1,2}$ 8 Гц), 5.02–5.21 (м, 3Н, Н-2', Н-3', Н-4'). Найдено, %: С 52.80; Н 6.44. $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{15}$. Вычислено, %: С 52.91; Н 6.49.

1(3)-О-(*rac*-1,2-Дипальмитоилглицерофосфо)-2,3(1);5,6(4)-ди-О,О-изопропилиден-4(6)-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиранозил)-*sn*-мио-инозит (7). 0.15 г (0.20 ммоль) 1,2-диацил-*rac*-глицеро-Н-фосфоната (6) и 0.18 г (0.31 ммоль) соединения (5) упаривали с безводным пиридином (3 \times 2 мл), растворяли в том же растворителе (2 мл), при перемешивании при 20°C добавляли 0.06 мл (0.50 ммоль) пивалоилхлорида. Через 10 мин до-

бавляли раствор 0.10 г (0.40 ммоль) йода в смеси пиридин–вода, 98 : 2 (2 мл), перемешивали 5 мин. Реакционную массу разбавляли хлороформом (30 мл), промывали 5% водным раствором бисульфита калия (2 \times 20 мл), водную фазу промывали хлороформом (2 \times 20 мл). Объединенный хлороформный раствор упаривали, следы пиридина удаляли упариванием с толуолом, соединение (7) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью хлороформ–метанол (5 \rightarrow 10% метанола). Выход 0.15 г (60%), R_f 0.43 (II, B), т. пл. 217–220°C (осаждение из ацетона). ИК-спектр (ν , см^{-1}): 1740 (C=O в COOR), 1280, 1190–1080 (C–O в C–O–C, P–O–C). ^{13}C -ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м. д.: 14.02, 20.49, 20.65, 22.60, 24.83, 26.73, 27.13, 27.56, 29.14, 29.30, 29.65, 31.83, 34.03, 34.19 (2 CH_3 и 28 CH_2 пальмитоила, 4 CH_3 ацетила, 4 CH_3 изопропила), 61.97, 62.99, 63.75, 68.20, 70.31, 71.09, 71.82, 72.55, 76.30, 76.60, 76.93, 77.14, 77.56, 80.58 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-1'', C-2'', C-3''), 101.30 (C-1'), 110.52, 112.17 (2 CMe_2), 169.32, 170.29, 170.51, 173.25, 173.56 (6C=O). ^{31}P -ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м. д.: –1.61. Найдено, %: С 59.69; Н 8.26; Р 2.88. $\text{C}_{61}\text{H}_{105}\text{O}_{22}\text{P}$. Вычислено, %: С 59.98; Н 8.67; Р 2.54.

1(3)-О-(*rac*-1,2-Дипальмитоилглицерофосфо)-4(6)-О- β -D-глюкопиранозил-*sn*-мио-инозит (8). 0.10 г (0.08 ммоль) соединения (7) кипятили 30 мин с 50% водной уксусной кислотой (10 мл), упаривали, остаток растворяли в 9 мл смеси абсолютный спирт–вода (8 : 1), добавляли 1 мл 10% водного раствора гидразингидрата (0.10 г, 2 ммоль), перемешивали 2 ч при 40°C, подкисляли уксусной кислотой до pH 4, упаривали. Вещество (8) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя системой хлороформ–метанол (10 : 1 \rightarrow 1 : 1). Выход гликозилфосфатидилинозита (8) 0.06 г (70%), R_f 0.21 (II, Г), т. пл. >250°C (осаждение из ацетона). ^1H -ЯМР-спектр ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м. д.: 1.11–1.16 (т, 6Н, 2 CH_3), 1.46–1.64 (м, 56Н, 28 CH_2 пальмитоила), 1.96 (м, 8Н, 8 ОН), 3.01–3.97 (м, 16Н, 11СН инозита и глюкозы, 5Н глицерина), 4.85 (с, 1Н, Н-1'), 5.22 (м, 1Н, СН инозита). ^{31}P -ЯМР-спектр ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м. д.: 1.94. Найдено, %: С 57.58; Н 8.98; Р 3.41. $\text{C}_{47}\text{H}_{89}\text{O}_{18}\text{P}$. Вычислено, %: С 58.00; Н 9.22; Р 3.18.

Выражаем признательность Российскому фонду фундаментальных исследований (грант № 94-03-09044) за поддержку данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шастина Н.С., Эйнисман Л.И., Каширичева И.И., Степанов А.Е., Швец В.И. // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 641–650.

2. Ferguson M.A.J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1991. V. 1. P. 522.
3. Low M.G., Saltiel A.R. // *Science*. 1988. V. 239. P. 268–275.
4. Швец В.И., Степанов А.Е., Крылова В.Н., Гулак П.В. // *мио-Инозит и фосфоинозитиды*. М.: Наука, 1987.
5. Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. // *Физиологически активные липиды*. М.: Наука, 1991. 136 с.
6. Степанов А.Е., Швец В.И. // *Успехи биол. химии*. 1979. Т. 20. С. 152–168.
7. Степанов А.Е., Швец В.И., Евстигнеева Р.П. // *Журн. общ. химии*. 1977. Т. 47. С. 1653–1656.
8. Elie C.J.J., Dreef C.E., Verduyn R., Van der Marel G.A., Van Boom J.H. // *Tetrahedron*. 1989. V. 45. P. 3477–3486.
9. Murakata C., Ogawa T. // *Carbohydr. Res.* 1992. V. 235. P. 95–114.
10. Нифантьев Э.Е., Грачев М.К. // *Успехи химии*. 1994. Т. 63. Вып. 7. С. 602–637.
11. Klyashchitskii B.A., Shvets V.I., Preobrazhenskii N.A. // *Chem. Phys. Lipids*. 1969. V. 3. P. 394–400.
12. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) // *Eur. J. Biochem.* 1967. V. 2. P. 127.
13. Возный Я.В., Каличева И.С., Галоян А.А. // *Биоорг. химия*. 1981. Т. 7. С. 406–409.
14. Lindh I., Stawinski J. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. P. 1338–1342.

Asymmetrically Substituted *myo*-Inositols. XXXVIII.¹ Synthesis of Phosphatidylinositol Glucoside

N. S. Shastina, L. I. Einisman, A. E. Stepanov,² and V. I. Shvets

Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

Abstract—The total synthesis of 1(3)-*O*-(*rac*-1,2-dipalmitoylglycerophospho)-4(6)-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-*sn*-*myo*-inositol was performed. The major stages of the synthetic route are glycosylation of the substituted *myo*-inositol derivative by the glycosyl fluoride method and creation of the phosphorus moiety of the target glycolipid by means of the H-phosphonate technique.

Key words: *myo*-inositol, glycosylphosphatidylinositol, glycosyl fluoride method, phosphorylation by H-phosphonates.

¹ For part XXXVII see [1].

² To whom correspondence should be addressed.