



УДК 547.593.261'118.057

СИНТЕЗ ИНОЗИТСОДЕРЖАЩИХ ГЛИКОФОСФОЛИПИДОВ

© 1998 г. А. Е. Степанов[#], В. И. Швец

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова,
117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 27.03.98 г. Принята к печати 7.05.98 г.

В обзоре рассмотрены основные результаты и проблемы синтетического изучения природных инозитсодержащих гликофосфолипидов, их биологически активных фрагментов и структурных аналогов.

Ключевые слова: мио-инозит; маннофосфоинозитиды; гликозилфосфатидилинозиты; инозитсодержащие гликофингофосфолипиды; фосфорилирование; гликозилирование.

Современное состояние комплекса наук о живом в значительной степени определяется прогрессом физико-химической биологии и биоорганической химии – новых научных дисциплин, основы которых были заложены в 60-е годы академиком М.М. Шемякиным. В частности, благодаря инициативе и научной прозорливости академика М.М.Шемякина в нашей стране были развернуты широкие междисциплинарные исследования природных и синтетических биологически активных веществ, относящихся к классу липидов. За несколько прошедших десятилетий липидология сформировалась в самостоятельный, динамично развивающийся раздел физико-химической биологии, дающий значительное число новых фундаментальных и практически важных результатов.

Большая группа природных и синтетических веществ, объединяемых общим классификационным термином “фосфолипиды”, входит в сферу важнейших объектов фундаментальных исследований в биоорганической химии, молекулярной биологии и биохимии; эти соединения используются для поиска и создания новых эффективных лекарственных и диагностических препаратов; они широко применяются в медицинской промышленности и биотехнологии для получения высококачественных субстратов, биоматериалов, пищевых и косметических продуктов. В последние годы быстро возрастает интерес к изучению строения, свойств и функциональной роли новых биологически важных природных соединений – инозитсодержащих гликофосфолипидов, которые в объектах живой природы встречаются в трех структурных формах:

1) моно- и олигоманнозиды фосфатидилинозита, или маннофосфоинозитиды;

2) гликозилированные производные фосфатидилинозита – фосфатидилинозитгликаны, или гликозилфосфатидилинозиты;

3) гликозилированные производные инозитфосфоцерамидов, или гликозилинозитфосфоцерамиды.

Исследования структуры и биологических функций инозитсодержащих гликофосфолипидов, проведенные в минувшее десятилетие, выявили незаменимую роль этих природных соединений в универсальных механизмах функционирования и взаимодействия живой клетки с разнообразными факторами внешней среды. Установлено, что гликозилированные фосфатидилинозиты и инозитфосфоцерамиды в виде конъюгатов с белковыми молекулами участвуют в регуляторных процессах клетки и обеспечивают действие ранее неизвестного механизма ковалентного закрепления функционально активных белков на поверхности плазматической мембраны.

На протяжении длительного периода времени в молекулярной биологии клетки как общепризнанный рассматривался способ нековалентного взаимодействия функциональных белков с липидным бислоем биологических мембран. В большинстве случаев характер связи белков с клеточной мембраной объяснялся гидрофобными взаимодействиями неполярных боковых цепей в пептидных фрагментах белка с жирнокислотными остатками в молекулах мембранных фосфолипидов. Однако исследованиями последнего десятилетия установлена возможность образования ковалентной связи мембранных белков с липидами, в частности с инозитсодержащими гликофосфолипидами, находящимися в бислое. Показано, что ковалентный тип связи белка с фосфолипидом обеспечивает локализацию белка на поверхности плазматической

[#] Автор для переписки.

мембраны, а инозитсодержащие липиды, принимающие участие в образовании такой связи, были названы гликозилфосфатидинозитными якорями. В этих конъюгатах белки через свой С-концевой участок связаны с олигосахаридом (гликаном), соединенным с фосфатидинозитом, который находится в липидном бислое клеточной мембраны. Было обнаружено, что при действии фосфатидинозитспецифических фосфолипаз на клеточные мембраны происходит не только расщепление фосфатидинозита, но и селективное высвобождение некоторых мембранных белков. Это наблюдение указывало на существование ранее неизвестного способа присоединения белков к поверхности мембраны. Первоначально новый механизм связывания–высвобождения мембранных белков не был воспринят научным миром из-за необычности и трудности для понимания с позиции традиционных воззрений молекулярной биологии клетки. Однако последующие многочисленные эксперименты подтвердили правильность выдвинутой гипотезы, и к настоящему времени уже более сотни мембранных белков с гликозилфосфатидинозитными якорями идентифицированы в клетках многих эукариотических организмов, относящихся к млекопитающим, рыбам, насекомым, простейшим, дрожжам, слизистым грибам.

Такой способ связи с поверхностной мембраной, по-видимому, значительно повышает специфичность действия мембранных белков и позволяет клетке высвобождать их в определенный момент в ответ на внешние стимулирующие воздействия, при этом только функционально необходимый белок селективно удаляется с внешней клеточной границы без затрагивания других белков. Эта система обеспечивает клетке большую гибкость и вариабельность в протекании метаболических процессов. Для гликозилфосфатидинозитов также предполагается важная роль как вторичных передатчиков в молекулярных механизмах действия инсулина [1–11].

Таким образом, инозитсодержащие гликофосфолипиды определяют жизненно важные процессы клеточной регуляции, рецепции, пролиферации, поддержания иммунного статуса, действия гормонов, физиологической адаптации клетки к экзогенным факторам различного характера. Инозитсодержащие гликофосфолипиды способны к образованию комплексов антиген–антитело, проявляют кардиотропную активность и действуют как инсулиномиметики [6, 12]. Это дает основание рассматривать данную группу природных липидов как перспективный источник поиска и отбора новых физиологически активных соединений, необходимых для фундаментальных работ

в молекулярной биологии клетки и для конструирования эффективных медицинских препаратов.

Развитие синтетических подходов в исследованиях инозитсодержащих гликофосфолипидов и их аналогов обеспечивает возможность полномасштабного всестороннего изучения строения, свойств и биологической роли этих природных соединений. Работы по созданию путей направленного полного химического синтеза инозитсодержащих гликофосфолипидов и их структурно модифицированных аналогов были начаты вскоре после открытия этих веществ в природных объектах.

Задача создания результативного подхода к химическому синтезу инозитсодержащих гликофосфолипидов потребовала разработки нескольких взаимосвязанных направлений в химии полиолов:

– препаративного получения исходных синтонов – асимметрично замещенных соединений *мио*-инозита, производных сфингозина и дигидросфингозина в рацемической и хиральной форме с определенным числом и взаиморасположением блокированных и свободных функциональных групп (реакционных центров), которое позволяет далее обеспечить поэтапное введение отдельных структурных фрагментов с последующим выделением целевого гликофосфолипида;

– разработки новых подходов к формированию фосфорного узла в синтезируемом гликолипиде с использованием фосфорилирующих реагентов на основе соединений трехкоординационного фосфора;

– поиска эффективных методов и условий гликозилирования для регио- и стереоспецифического введения гликозильных остатков в фосфатные и другие типы лабильных производных *мио*-инозита и сфингозиновых оснований.

Указанные синтетические проблемы в значительной мере уже решены в ходе исследования путей синтеза фосфоинозитидов и инозитсодержащих гликофосфолипидов [12–16].

1. Маннофосфоинозитиды

Маннофосфоинозитиды найдены среди фосфолипидов микроорганизмов родов *Mycobacterium* и *Corynebacterium* и некоторых других близкородственных бактерий. Маннозиды фосфатидинозита являются специфическими фосфолипидами этой группы бактерий, среди которых имеются патогенные виды – возбудители массовых инфекционных заболеваний человека: туберкулеза, проказы, дифтерии и др. Особенности липидного состава, в частности присутствие маннофосфоинозитидов, обуславливают повышенную кислотоустойчивость

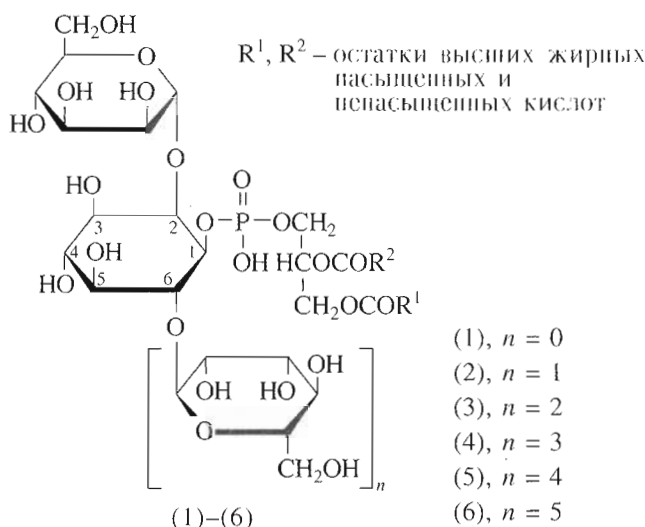


Схема 1.

указанных микроорганизмов в сравнении с другими бактериями. Маннофосфоинозитиды обладают активностью в серологических реакциях, и их антигенная активность нашла использование при диагностике туберкулеза и других опасных инфекционных заболеваний [12].

По химическому строению маннофосфоинозитиды являются α -маннозидами фосфатидилинозита, при этом во всех структурах (1)–(6) один остаток *D*-маннозы присоединен α -гликозидной связью по положению 2 циклитного кольца, а остальные углеводы в виде линейной или разветвленной олигосахаридной цепочки соединены с *мио*-инозитом в положении 6 (схема 1).

Для первого полного химического синтеза мономаннофосфоинозитида (13) был разработан подход, состоявший в получении на первом этапе 2-*O*-(α -*D*-маннопиранозил)-*sn*-*мио*-инозита* (10) с полностью блокированными гидроксильными группами, за исключением гидроксила в положении 1 циклитной части молекулы [17] (схема 2). Последующая конденсация маннозида (10) с фосфатидной кислотой приводила к гликофосфолипиду (13).

Гликозилирование хирального пентазамещенного производного *мио*-инозита (7) *трет*-бутилортоацетатом *D*-маннозы (8) давало полностью защищенный маннозид (9), в котором затем пропильная защитная группа была селективно удалена в условиях мягкого кислотного гидролиза. Полученный маннозид (10) со свободной гидро-

* Для обозначения производных *мио*-инозита существует несколько номенклатурных систем, поэтому в обзоре приводятся оригинальные названия соединений по первоисточникам.

ксильной группой в положении 1 циклитного кольца конденсировали с 1,2-дипальмитоилглицерофосфатом (11) в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида, защищенный маннофосфоинозитид (12) выделяли хроматографией на силикагеле с выходом 88%. Последовательное удаление защитных групп соединения (12) приводило к целевому маннофосфоинозитиду (13), строение которого подтверждено спектральными и хроматографическими методами, а также с помощью деструктивного анализа. Впоследствии синтез маннофосфоинозитида (13) был усовершенствован: на стадии гликозилирования использовали рацемический, а не хиральный пентазамещенный *мио*-инозит, далее диастереомерную смесь маннозидов моноаллилтетрабензилового эфира *мио*-инозита разделяли хроматографически на индивидуальные диастереомеры, затем маннозид *мио*-инозита с нужной стереохимической конфигурацией в циклитной части молекулы фосфорилированием превращали в маннофосфоинозитид (13) [18]. Таким образом, путь синтеза гликофосфолипида (13) был сокращен за счет совмещения стадий гликозилирования и оптического расщепления производного *мио*-инозита.

Фосфолипидные антигены, выделенные из патогенных штаммов *Mycobacterium* и родственных микроорганизмов, во всех случаях были идентифицированы как маннозиды фосфатидилинозита. Известно, что конфигурация углеводного остатка может влиять на изменение иммунохимических свойств гликофосфолипидов. С целью получения новых инозитсодержащих гликофосфолипидов, перспективных в смысле биологически активных соединений был разработан синтез глюкозида фосфатидилинозита (21), эпимерного и структурного

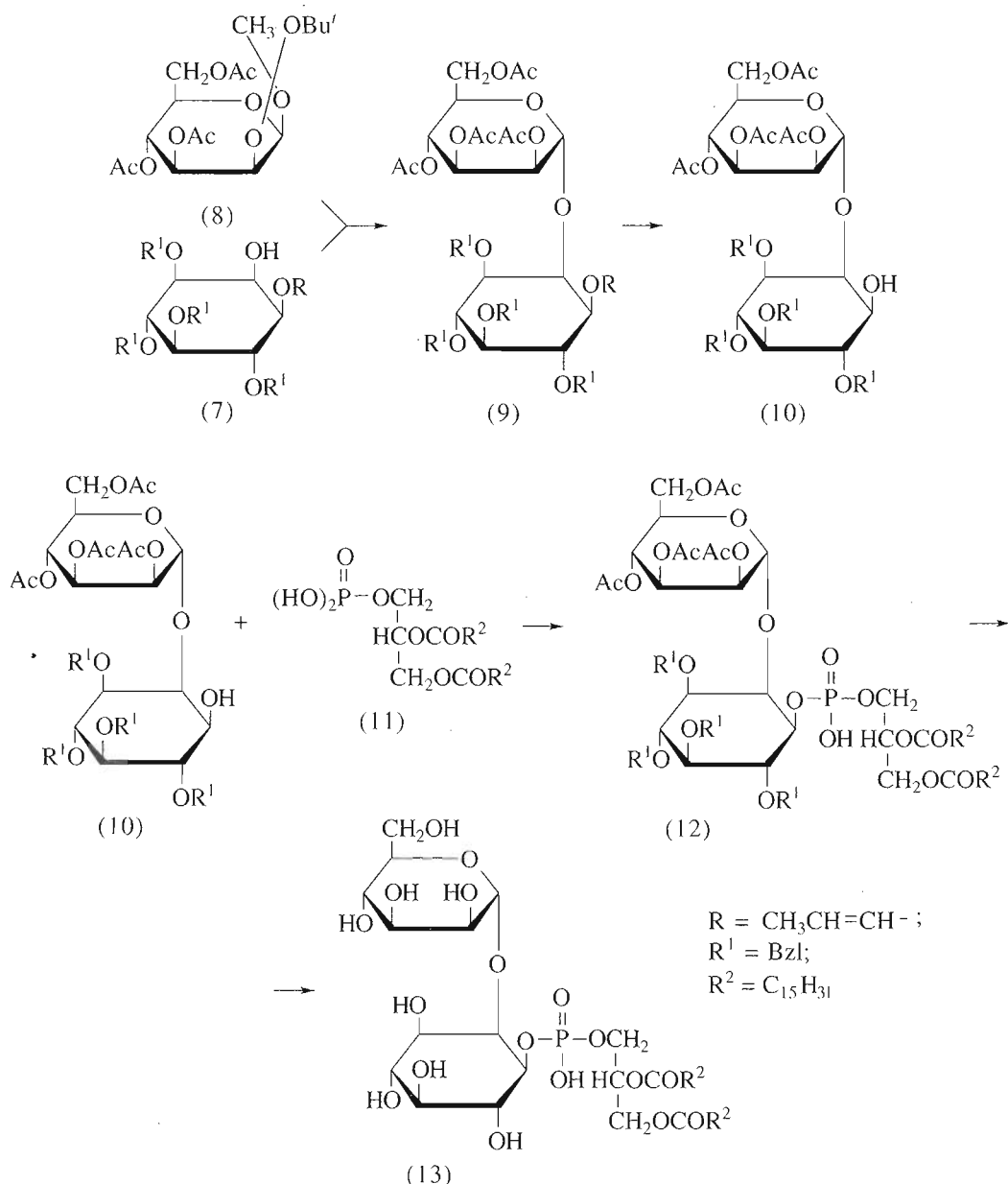


Схема 2.

аналога природного бактериального маннофосфоинозита [19] (схема 3).

Моноацильное производное diketала *мио*-инозита (14) переводили в активированную форму (15) действием триметилхлорсилана и гликозилировали с помощью тетраацетата β -D-глюкопиранозилфторида (16) в присутствии эфира трифтористого бора, в полученном защищенном глюкозиде *мио*-инозита (17) селективно удаляли леулиноильную защитную группу и выделяли соответствующий глюкозид (18) со свободной гидроксильной группой в положении 1 циклитного кольца. Синтез глюкозида (18) подтвердил эффективность выбранной тактики одновременно-

го использования двух видов сложноэфирных защитных групп – ацетильной и леулиноильной для селективного блокирования гидроксильных функций в производных *мио*-инозита. Заключительный этап синтеза состоял в конденсации глюкозида (18) с *H*-фосфонатом диацилглицерина (19), окисление продукта конденсации с помощью раствора иода в водном пиридине давало соответствующий защищенный гликофосфолипид (20), последующее деблокирование гидроксильных функций соединения (20) приводило к глюкозиду фосфатидилинозита (21). Этот подход может быть использован для получения серии эпимерных аналогов маннофосфоинозита.

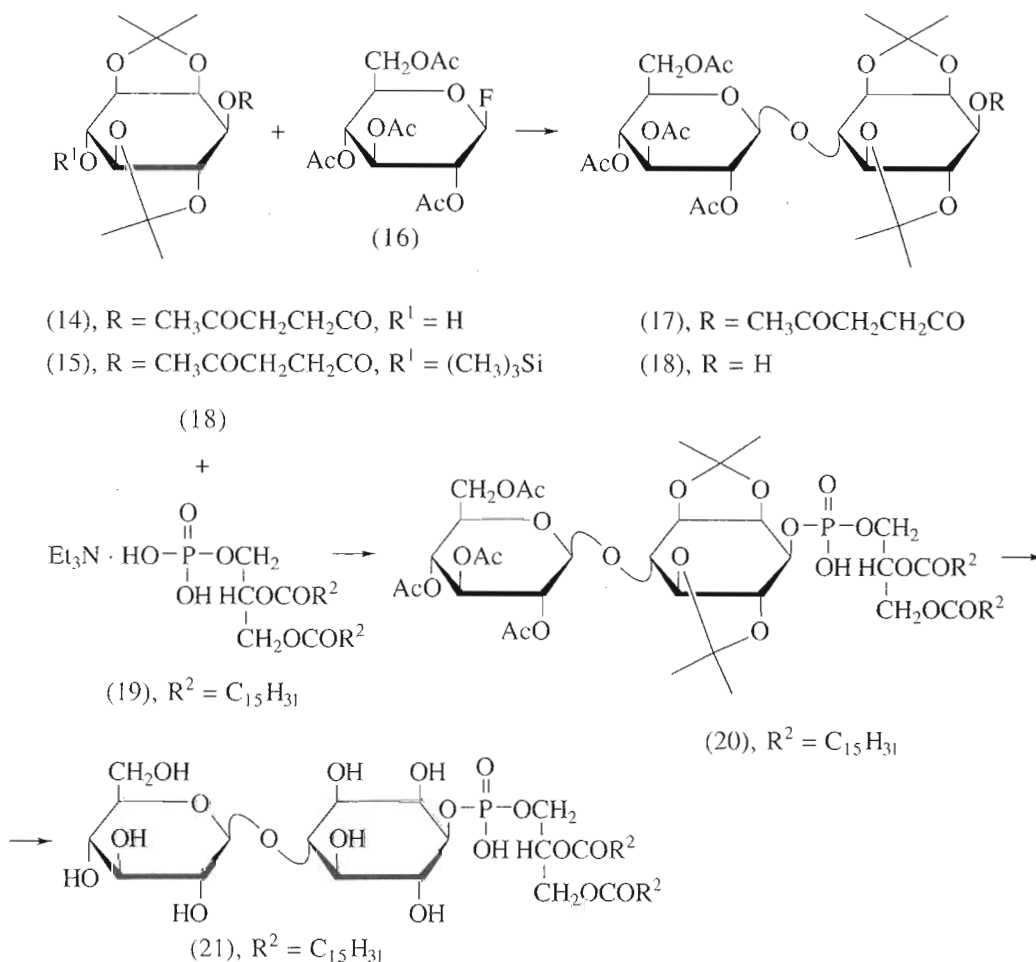


Схема 3.

Синтез 2,6-ди-*O*-(α -*D*-маннопиранозил)-1-*O*-фосфатидил-*D*-*мио*-инозита (диманнофосфоинозита) (2) был осуществлен как с использованием традиционных методов гликозилирования [20], так и с помощью гликозилфосфитов в качестве новых доноров гликозильного остатка [21–23]. В последнем случае в качестве исходного соединения для синтеза диманнофосфоинозита использовали 1,2-*O*-циклогексиден-3,4-*O*-(тетраизопропилсилоксандиил-1,3)-*мио*-инозит, который гликозилировали различными производными 2-*O*-ацетил-3,4,6-три-*O*-бензил-*D*-маннозы – трихлорацетимидатом, фторидом, фосфитом. Гликозилирование протекало региоселективно по положению 6 циклитного кольца, стереоспецифичность образования α -гликозидной связи подтверждалась методом ЯМР. Наибольшие выходы были получены при использовании маннопиранозилфосфита; применение тетрабензилманнопиранозилфосфита приводило к образованию смеси α - и β -аномеров (1 : 1). Полученное 6-*O*- α -*D*-маннопиранозильное производное 1,2,3,4-тетразамещенного *мио*-инозита обработкой трифторуксусной кислотой пре-

вращали в соответствующий 1,2,5-триол и с помощью флэш-хроматографии выделяли индивидуальные *D*- и *L*-изомеры, далее *L*-изомер селективно фосфорилировали по положению 1 с помощью (1,2-*O*-карбонил-*sn*-глицерил)диметилфосфита, полученный фосфат региоселективно гликозилировали по положению 2 действием диметилфосфита тетрабензилманнопиранозы (гликозилирование на основе 2-*O*-ацетил-три-*O*-бензилманнопиранозильных доноров в данном случае не привело к положительному результату), циклокарбонатную группу в глицериновой части молекулы расщепляли действием этилмагнийхлорида, деблокированные гидроксильные группы глицерина ацилировали стеароилхлоридом, после удаления всех защитных групп выделяли диманнозилфосфоинозитид (2) с природной стереохимической конфигурацией молекулы.

2. Гликозилфосфатидинозиты

Вопросы выделения, биосинтеза, структурной и биологической роли гликозилфосфатидинозитов подробно отражены в ряде обзорных статей [1–11]. Химическое строение гликозилфос-

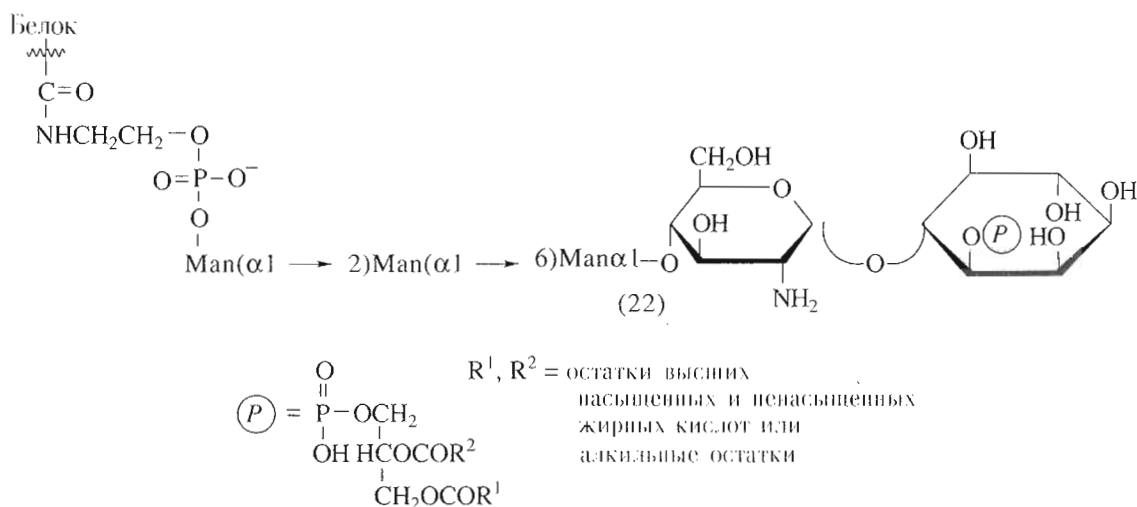


Схема 4.

фатидилинозитных якорей установлено с помощью химико-ферментативного деструктивного анализа и последующей структурной идентификации полученных фрагментов спектральными методами. Все якорные гликозилфосфатидилинозиты, независимо от источника выделения, типа и функций сопрягаемого мембранного белка, содержат в молекулярной структуре общий характеристический фрагмент (22), состоящий из фосфатидилинозита, в котором по положению 6 циклитного кольца α -гликозидной связью присоединен остаток свободного (не-*N*-ацетилированного) *D*-глюкозамина и который в свою очередь через свой четвертый гидроксил соединен с линейным триманнозидом [маннозил(α 1 \rightarrow 2)маннозил(α 1 \rightarrow 6)маннозил α 1 \rightarrow]; в положении 6 концевого углеводного остатка триманнозида локализован фосфат этаноламина, через него посредством амидной связи с С-концевой аминокислотой и происходит ковалентное присоединение белка к фосфолипидному якорю (схема 4). В зависимости от природы липид-связанного мембранного белка и вида организма, в котором продуцируется этот белок, в характеристическом фрагменте гликозилфосфатидилинозитов могут появиться дополнительные структурные элементы, например, гликановая часть может иметь точки разветвления за счет присоединения остатков *D*-маннозы, *D*-галактозы, *D*-глюкозы, *N*-ацетилнейраминовой кислоты, *N*-ацетилгалактозамина, *N*-ацетилглюкозамина. В фосфолипидной части вместо глицеринового остова возможно присутствие церамида, углеводородные цепи могут быть присоединены к глицерину как сложноэфирной, так и простой эфирной связью, либо двумя типами эфирной связи; имеются примеры выделения гликозилфосфатидилинозитов с лизо-

формой глицериновой части, где алкильный остаток присутствует лишь в положении 1 глицеринового остова [6, 7].

мио-Инозит в некоторых структурах ацилирован пальмитиновой кислотой в положение 2 или 3 цикла; в некоторых случаях циклитная часть липидного фрагмента представлена *хиро*-инозитом [24].

Синтетические исследования в ряду гликозилфосфатидилинозитов ведутся по двум связанным направлениям:

а) синтез отдельных фрагментов гликофосфолипидов, содержащих пару гексозамин-*мио*-инозит в свободной и фосфорилированной формах с целью отбора активных веществ, обладающих инсулиноподобным действием и в качестве синтетических блоков для дальнейшего построения структуры гликолипида;

б) направленный полный химический синтез гликозилфосфатидилинозитов с природной стереохимической конфигурацией молекулы липида, их структурных изомеров и модифицированных аналогов.

Направление а).

Инсулиноподобное действие некоторых структурных фрагментов гликозилфосфатидилинозитов [1, 11, 25–27] стимулировало развитие работ по синтезу гексозаминсодержащих производных *мио*-инозита. В работе [28] пентазамещенное производное *мио*-инозита (23) в хиральной форме было получено по известному методу [29] (схема 5). Исходное моногидроксильное производное *мио*-инозита превращали в *трет*-бутилдиметилсилиловый эфир, последующий гидрогенолиз приво-

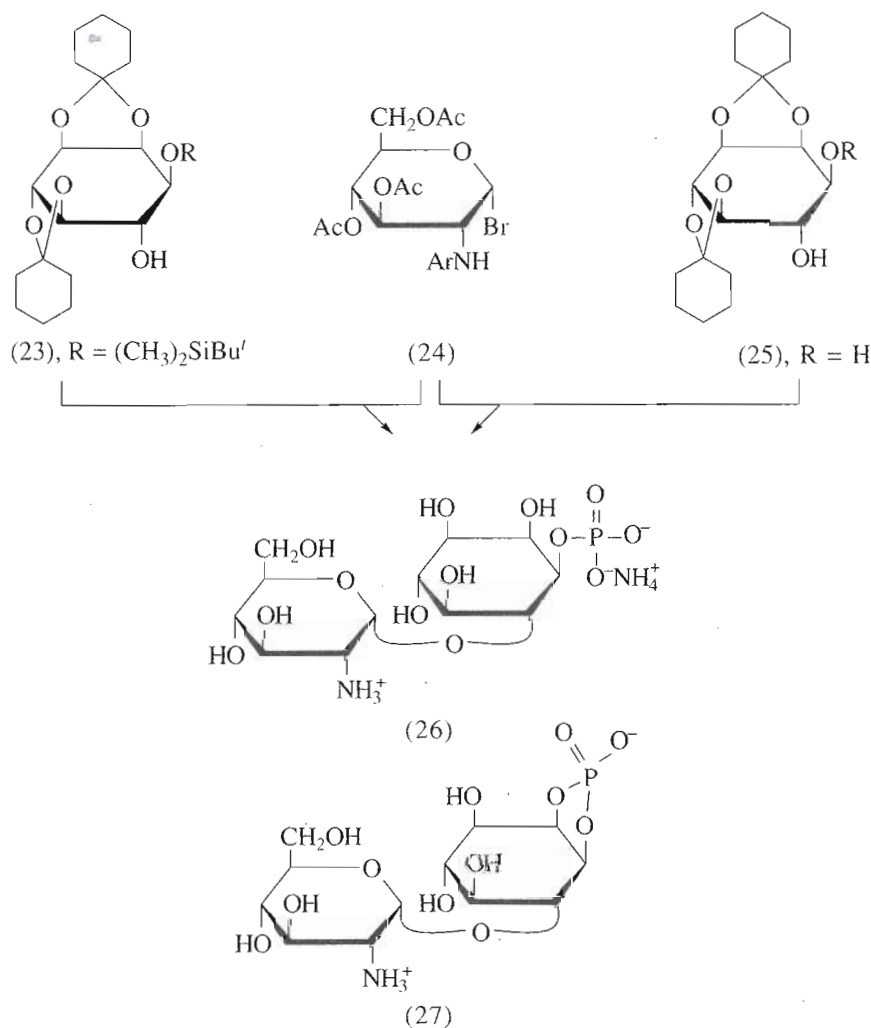


Схема 5.

дил к 1,2,3,4,5-замещенному *мио*-инозиту (23), который гликозилировали в условиях реакции Кенигса–Кнорра бромидом триацетил-*N*-(динитрофенил)-*D*-глюкозамина (24), смесь α - и β -аномеров полученного глюкозаминил-*мио*-инозита обрабатывали фторидом тетрабутиламмония для удаления силильной защиты гидроксила в положении 1 циклитного кольца, далее хроматографией выделяли 33% требуемого α -аномера, который фосфорилировали дифенилхлорфосфатом и после последовательного удаления защитных групп получили оптически активный псевдодисахарид (26).

В качестве альтернативного пути синтез соединения (26) был осуществлен исходя из рацемического диола (25), который также гликозилировали с помощью бромида (24). В этом случае выделение α -аномера гликозида замещенного *мио*-инозита проводилось разделением реакционной массы гликозилирования в условиях флэш-хроматографии и

с использованием в качестве хроматографического стандарта соответствующего α -глюкозида, полученного по первому варианту синтеза. Такой подход существенно сократил синтетическую последовательность за счет исключения ряда стадий (стадии бензилирования диола (25), оптического расщепления замещенного производного *мио*-инозита, силилирования–десилилирования, гидрогенолиза). Выход хирального дисахарида (26) во втором синтезе составлял 7% в расчете на исходный диол (25). Эти же авторы [30] синтезировали 1,2-*O*-циклофосфат глюкозаминил-*мио*-инозита (27) исходя из хирального 1-*O*-камфанил-2,3:4,5-ди-*O*-циклогексалиден-*D*-*мио*-инозита, который гликозилировали по Кенигсу–Кнорру с помощью бромида 2-азидо-2-дезоксидеокси-3,4,6-три-*O*-бензил-2-дезоксидеокси- α -*D*-глюкопиранозы. Полученный гликозид фосфоамидитным методом превращали в фосфит, который окисляли в фосфат мета-хлорпербензой-

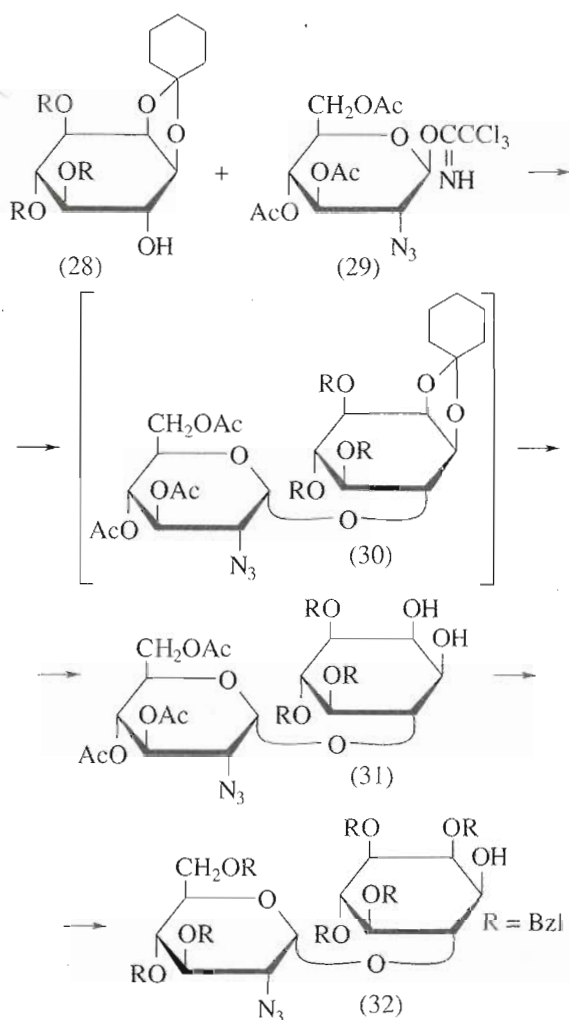


Схема 6.

ной кислотой, последующая циклизация под действием ДСС приводила к циклофосфату (27).

Синтез производного 2-азидо-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозил-*D*-*мио*-инозита (32) в качестве инсулиномиметика и синтона для полного синтеза гликозилфосфатидинозитов был предложен в работе [31] (схема 6). Трибензилмонокетальное производное *мио*-инозита (28) стереоспецифически гликозилировали действием 2-азидо-2-дезоксиглюкозилтрихлорацетимидата (29), в полученной смеси диастереомерных α -гликозидов (30) с помощью мягкого кислотного гидролиза удалили кетальную защитную группу, далее колоночной хроматографией на силикагеле провели разделение диастереомеров и выделили изомер (31), содержащий остаток замещенного *D*-*мио*-инозита. Глюкозид (31) путем последовательного *para*-метоксибензилирования, бензилирования и удаления *para*-метоксибензильной защиты превращали в целевое соединение – глюкозид (32), за-

щитные группы не удалялись. Преимущество предложенного подхода к синтезу глюкозида (32) состоит в высокой стереоспецифичности стадии гликозилирования.

В ходе поиска новых веществ с инсулиноподобным действием были синтезированы 1-фосфат 4-*O*-(2-амино-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозил)-*D*-*мио*-инозита (39) и 1-фосфат 4-*O*-(2-амино-2-дезоксид- α -*D*-галактопиранозил)-*D*-*хи*-инозита (40) [32] (схема 7).

В качестве исходных веществ синтеза использовали 1,2:4,5-ди-*O*-циклогексиден-*мио*-инозит (33) и его 3-*O*-трифторметансульфонат (34), которые расщепляли на энантиомеры через диастереомерные камфанаты [33], последующей функционализацией через ряд стадий синтезировали 3-*O*-дипенилфосфат дикетала (33) и 1,2:4,5-ди-*O*-циклогексиден-3-*O*-дипенилфосфорил-*D*-*хи*-инозит (35), (36) соответственно. В качестве доноров гликозильных остатков использовали 4-*O*-ацетил-2-азидо-2-дезоксид-3,6-ди-*O*-*трет*-бутил-диметилсилил- α -*D*-глюкопиранозилхлорид (37) и 2-азидо-2-дезоксид-3,4,6-три-*O*-*трет*-бутилдиметилсилил- α -*D*-галактопиранозилхлорид (38), которые были получены из *D*-глюкокала и *D*-галактала через стадии силилирования, азидонитрования и замещения нитрогруппы на галоген. На заключительных этапах синтеза гликозилирование производных (35) и (36) 2-азидо-2-дезоксипиранозилхлоридами (37) и (38) приводило после снятия защитных групп к целевым фосфатам (39) и (40).

В качестве модельного соединения для исследования молекулярных механизмов гормонального действия инсулина был синтезирован 1,2-циклофосфат 6-*O*-(2-аминоэтил)-*D,L*-*мио*-инозита исходя из ортоформиата *мио*-инозита, который путем последовательного блокирования-деблокирования с использованием аллильной, тозилльной, изопропилиденовой и бензильной групп превращали в целевой 1,2,6-замещенный аминоэтилциклофосфат [34].

Подробное изучение условий гликозилирования пентазамещенных производных *мио*-инозита с помощью гликозилтрихлорацетимидатного метода и последующего разделения и идентификации диастереомерных псевдо- и трисахаридов было проведено в работе [35]. Результаты этого исследования использованы для синтеза фосфатов 4-*O*- и 6-*O*-(2-амино-2-дезоксид- α -*D*-глюкопиранозил)-*D*-*мио*-инозита (41), (42) и 1,2-циклофосфата (27) (схема 8). Циклический фосфат (27) в отличие от ранее выполненного синтеза [30] был получен при обработке соединения (42) с помощью хлоргидрата 1-этил-3-(γ -диметиламинопропил)карбодиимида [36].

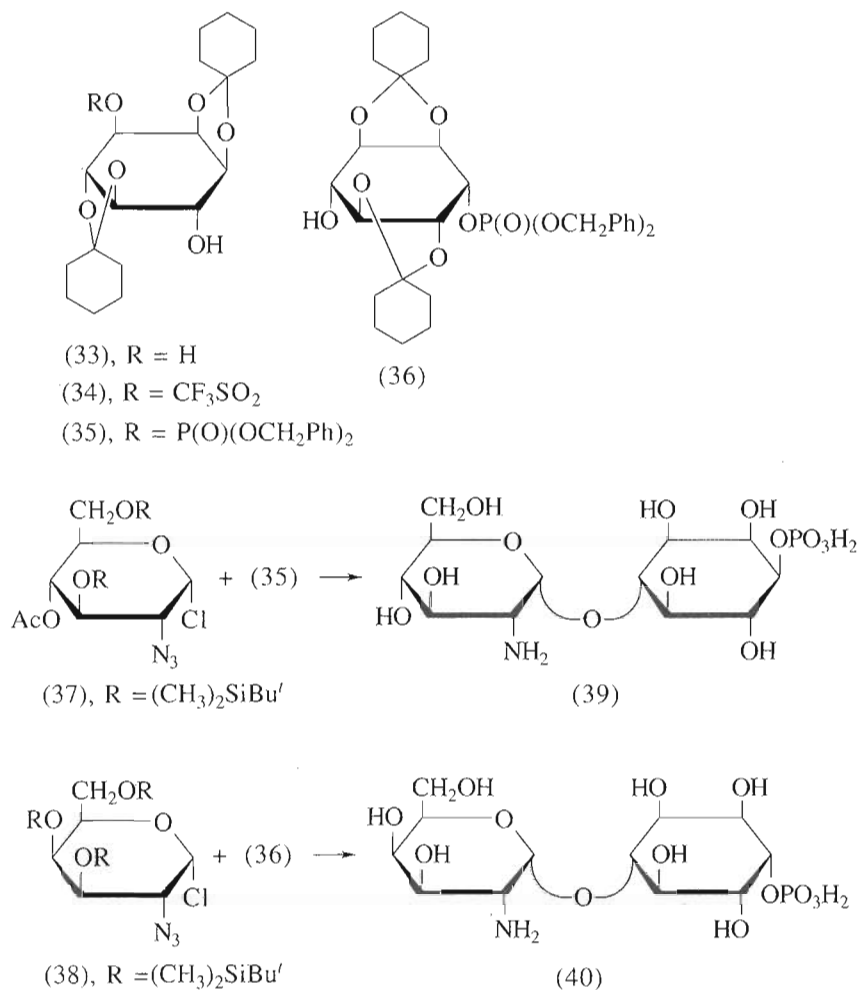


Схема 7.

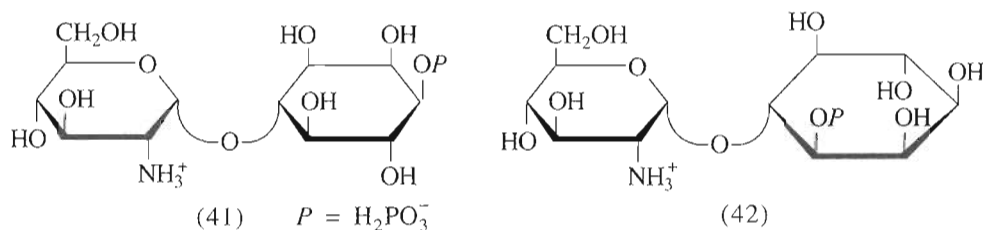


Схема 8.

В ходе поиска новых веществ, обладающих инсулиноподобным действием, разработан синтез β-аномерных аналогов природного глюкозаминида фосфатидинозита [37] (схема 9). Диизопропилденное производное *мио*-инозита (43) было получено модифицированным методом Гигга [38], ацилирование дикетала левулиновой кислотой в присутствии дициклогексилкарбодиимида привело к смеси моно- и диацилпроизводных (44), (45), разделенных хроматографией на силикагеле. Для образования β-гликозидной связи между остатком

D-глюкозамина и пентазамещенным производным *мио*-инозита (44) был применен оксазолиновый метод, ранее разработанный для синтеза олигосахаридов [39]. При гликозилировании соединения (44) использовали 2-метил-(3,4,6-три-*O*-ацетил-1,2-дидезокси-α-*D*-глюкопирано)[2,1-*d*]-2-оксазолин (46) [40] в присутствии *para*-толуолсульфокислоты при эквимольном соотношении пары оксазолин-агликон.

Гликозилирование циклитного производного (44) в условиях оксазолинового метода показало

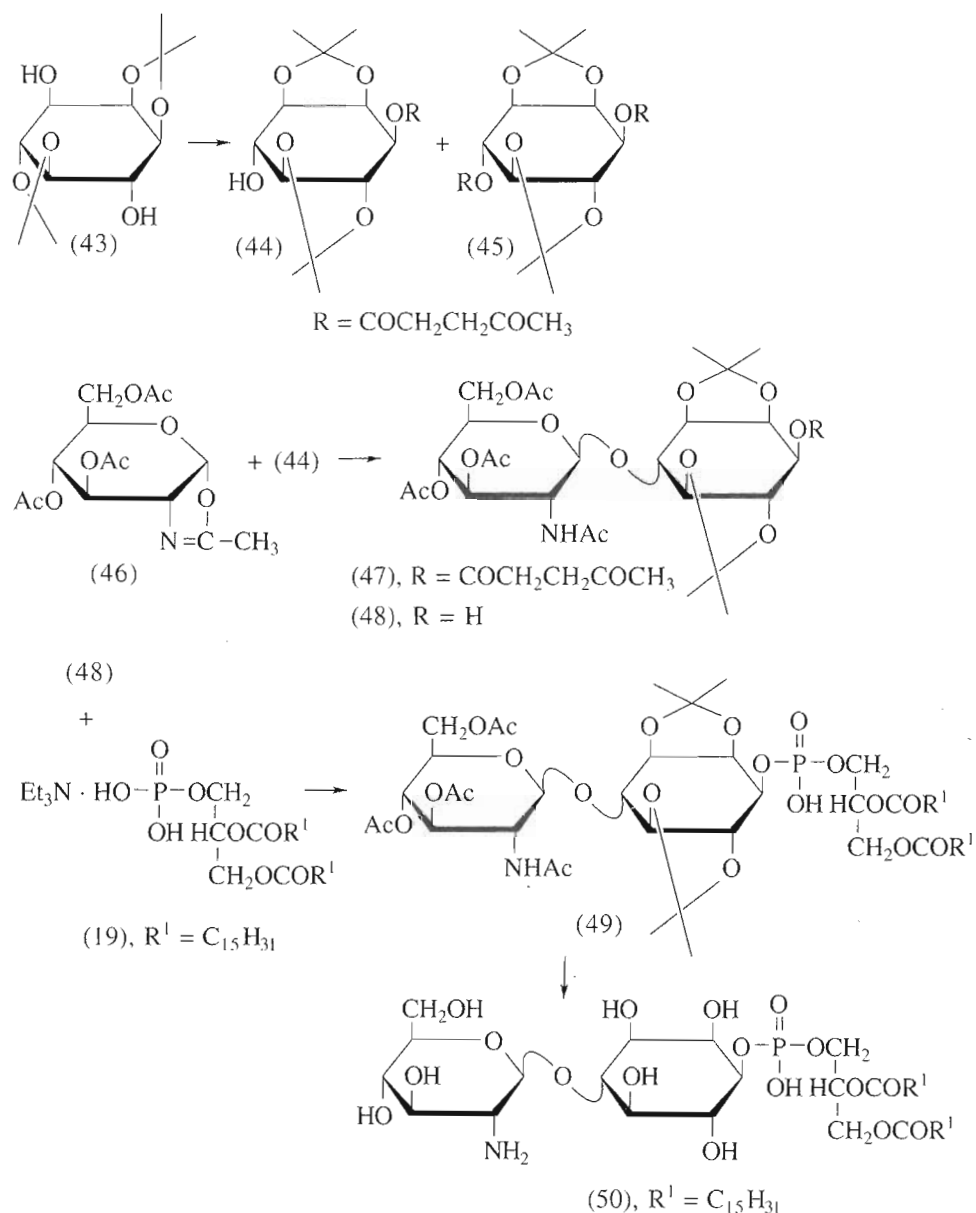


Схема 9.

высокую стереоспецифичность метода, в результате реакции был получен индивидуальный β -D-глюкозаминид (47), последующее селективное удаление в нем левулиноильной защитной группы приводило к соответствующему моногидроксильному производному (48), которое конденсировали с триэтиламмониевой солью 1,2-дипальмитоил-*rac*-глицеро-3-*H*-фосфоната (19), последующее окисление промежуточного фосфита (не выделялся) давало защищенный β -D-глюкозаминид (49). В последнем удаляли кетальные и ацетатные защитные группы и выделяли 1(3)-*O*-(*rac*-1,2-дипальмитоилглицерофосфо)-4(6)-*O*-(2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозил)-*sn*-*мио*-инозит (50).

При образовании фосфорного узла в ходе полного синтеза гликозилфосфатидилинозитов в принципе возможно использование двух альтернативных последовательностей:

1. конденсация *H*-фосфоната диглицерида с моногидроксильным производным гликозида *мио*-инозита (схема 9);

2. конденсация *H*-фосфонатного производного *мио*-инозита с диглицеридом и последующее введение углеводного звена в защищенный фосфатидилинозит (схема 10).

Вторая последовательность реализована при синтезе β -D-глюкозаминида фосфатидилинозита (58) [37], строение которого отличается обрат-

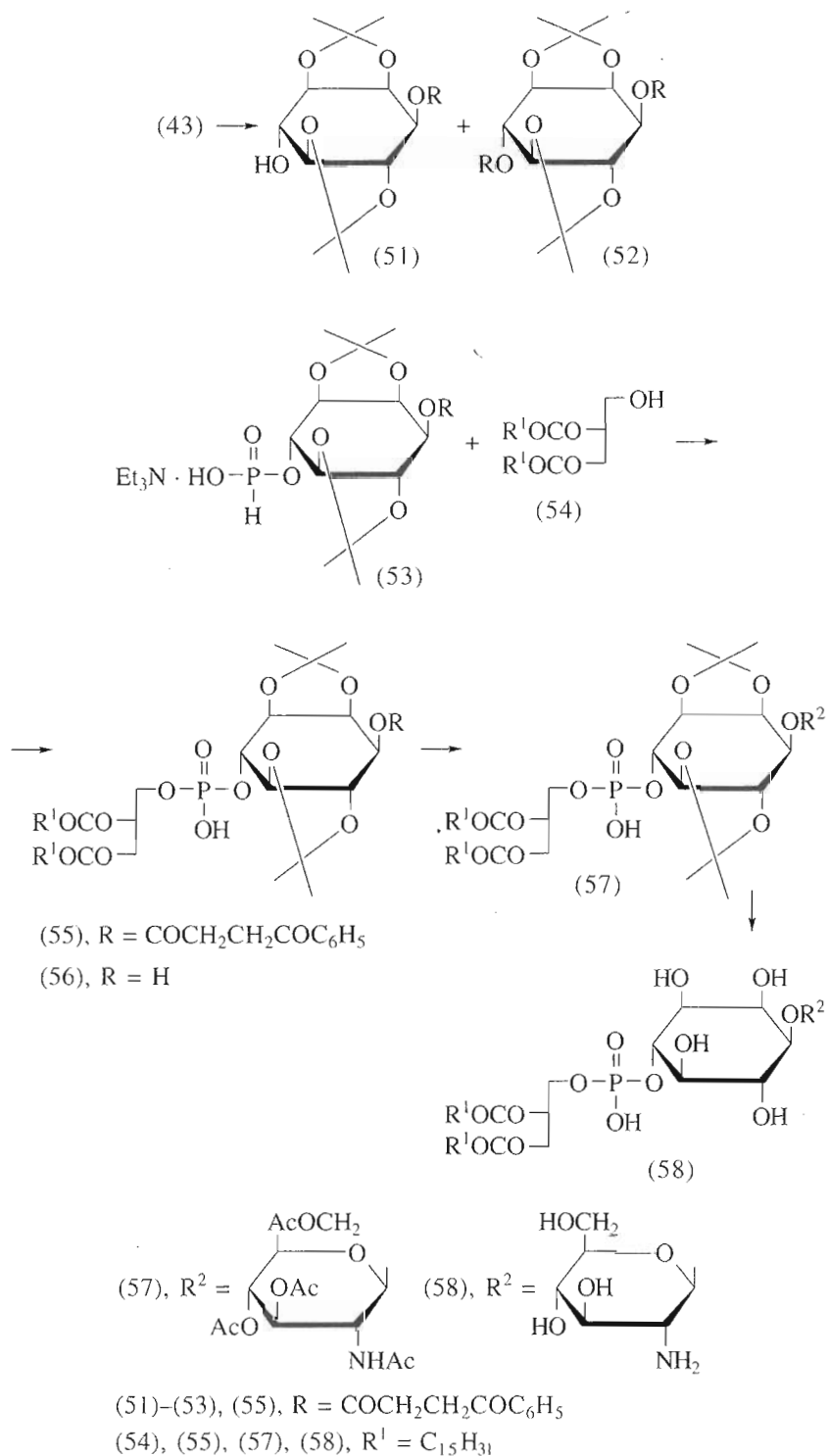
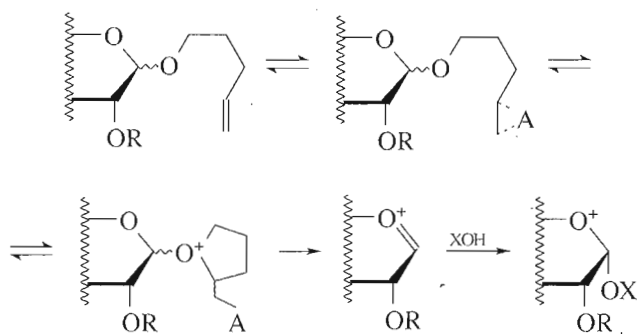


Схема 10.

ным порядком локализации остатков глюкозамина и фосфатидной кислоты относительно циклитного кольца в сравнении со структурой глюкозаминида (50) (схема 10). Пентазамещенный миоинозит (51) синтезировали ацилированием дике-

тяля (43) β-бензоилпропионовой кислотой в присутствии ДСС, хроматографией отделили нужный изомер (51), который обрабатывали триимидазолилфосфитом, полученный *H*-фосфонат (53) конденсировали с диглицеридом (54) в присут-



A – активатор (галюид)
 R – защитная группа при C2
 X – агликон

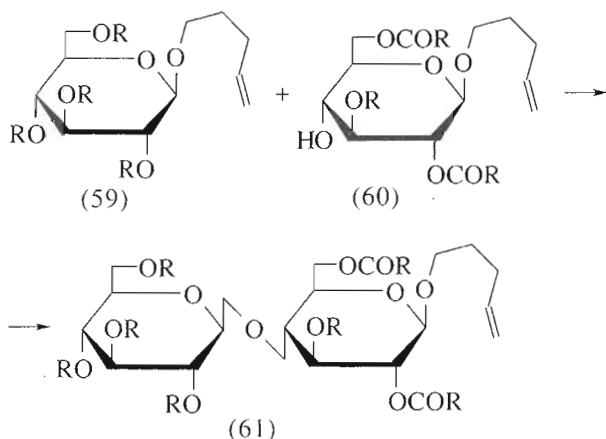


Схема 11.

вии пивалоилхлорида, продукт конденсации без выделения окисляли раствором иода в водном пиридине и получили защищенный фосфатидилинозит (55); селективное расщепление β -бензоилпропионового эфира давало производное (56) со свободной гидроксигруппой в положении 1, гликозилирование которого оксазолином (46) приводило после удаления блокирующих групп к 1(3)-*O*-(2-амино-2-дезоксид- β -*D*-глюкопиранозил)-4(6)-*O*-(*rac*)-1,2-дипальмитоил-глицерофосфо)-*sn*-*мио*-инозиту (58).

Ряд подобных и иных подходов к получению глюкозаминидов и гликозидов *мио*-инозита, модельных дисахаридов и их фосфорилированных производных в ходе поиска соединений инсулиноподобного действия был исследован в работах [41–49].

Направление б).

Полный химический синтез гликозилфосфатидилинозитов, повторяющих строение природных мембранных липидных якорей представляет собой сложную задачу многоэтапного стереонаправленного получения моно- и олигосахаридных

фрагментов и их соединения в конечную молекулярную структуру гликофосфолипида. В последние годы усилиями нескольких исследовательских групп достигнут впечатляющий прогресс в разработке синтетических подходов к получению основных структурообразующих олигосахаридных цепей гликозилфосфатидилинозитов, результатом этих работ стало осуществление первых полных синтезов веществ со строением мембранных липидных якорных структур [15, 16, 46, 50–54].

Как было упомянуто выше (см. схему 4), все гликофосфолипидные якорные структуры содержат общую базовую пентасахаридную единицу, включающую триманнозид, глюкозамин и *мио*-инозит; в более сложных случаях в триманнозиде имеются точки ветвления, к которым присоединены другие линейные или разветвленные олигосахаридные цепи. Таким образом, задача синтеза гликозилфосфатидилинозитов сводится к получению промежуточных олигосахаридов (в том числе фосфорилированных) определенной стереохимической конфигурации и последующему их сочетанию в пентасахаридную или более сложную структуру гликофосфолипида. При этом решающее значение имеет выбор метода гликозилирования, позволяющего проводить последовательное наращивание линейной или разветвленной олигосахаридной цепи в стереоконтролируемых условиях и с использованием рациональной тактики региоселективного блокирования–деблокирования гидроксильных групп в промежуточных производных моносахаридов и *мио*-инозита.

Блоковая стратегия формирования олигосахаридных фрагментов была успешно разработана в цикле исследований Фрейзер-Рейда в ходе создания подходов к полному химическому синтезу гликозилфосфатидилинозитных якорей [53, 55–64] (схема 11). При синтезе олигосахаридов, моносахарид с активированным аномерным центром (59) служит донором гликозила, акцептором выступает второй моносахарид (60), в котором аномерный центр и все гидроксильные функции заблокированы, за исключением единственного гидроксила, подлежащего гликозилированию (схема 11). Полученный дисахарид (61) может подвергаться дальнейшему гликозилированию, выступая в зависимости от выбранного синтетического плана донором либо акцептором гликозидного остатка в следующем цикле гликозилирования.

В этих работах был предложен новый оригинальный метод синтеза олигосахаридов, состоящий в использовании одной и той же группировки (*n*-пентенильной) для функционализации аномерных центров как в гликозильном доноре, так и в акцепторе гликозила. На многочисленных примерах была продемонстрирована высокая эффективность применения *n*-пентенилгликозидов

как гликозилирующих агентов в олигосахаридном синтезе, что обусловлено рядом положительных свойств *n*-пентенилгликозидов: легкой активацией аномерного центра гликозида в мягких условиях; устойчивостью в ходе многостадийного синтеза в условиях частого введения-удаления защитных групп различного типа; прямым использованием для сочетания необходимого числа углеводных остатков; возможностью влиять на соотношение аномеров в результате гликозилирования путем подбора растворителя, активаторов гликозилирования и других факторов; возможностью быстрой замены пентенильной группы на галоид с целью использования для гликозилирования по Кенигсу-Кнорру; возможностью резкого ослабления или усиления гликозилирующей способности *n*-пентенилгликозидов путем введения защитных групп различной химической природы для блокирования гидроксила при С2. Указанные факторы обусловили эффективное использование *n*-пентенилгликозидов при синтезе олигосахаридных блоков с последующим их сочетанием в структуры гликофосфатидинозитов. Для образования фосфодиэфирного узла гликофосфолипида в этих синтезах применяли фосфорилирование на основе соединений трехкоординационного фосфора.

В работах японской группы для последовательного наращивания олигосахаридной цепочки в полных синтезах гликозилфосфатидинозитов удачно применены тиогликозидный и гликозилфторидный методы; фосфодиэфирные связи формировали путем использования *N*-фосфонатов диацилглицерина и фосфиттриэфирного метода [42, 50, 51, 65, 66].

В работе [67] был осуществлен синтез тетрагалактозида, входящего в качестве боковой олигосахаридной цепочки в базовую структуру гликозилфосфатидинозитного якоря поверхностного гликопротеина из *Trypanosoma brucei*. В этом синтезе в качестве доноров галактозильных остатков использовали тиогликозиды и гликозилсульфоксиды. Разработанные методологии полного синтеза гликозилфосфатидинозитов и их базовых структурных фрагментов позволили во многих случаях провести достоверное установление строения вновь выделенных мембранных липидных якорей.

3. Гликолиинозитфосфоцерамиды

В природных источниках наряду с инозитсодержащими гликофосфолипидами, липидная часть которых представлена глицерофосфатом, обнаружены также и липиды инозита, включающие остатки церамидов, т.е. длинноцепочечных аминок спиртов – сфингозина, дигидросфингозина, фито- и дегидрофитосфингозина – ацилированных по аминогруппе остатком жирной кислоты. Гликолиинозитфосфоцерамиды были найдены в растениях, дрожжах, плеснях и бактериях [68–72]

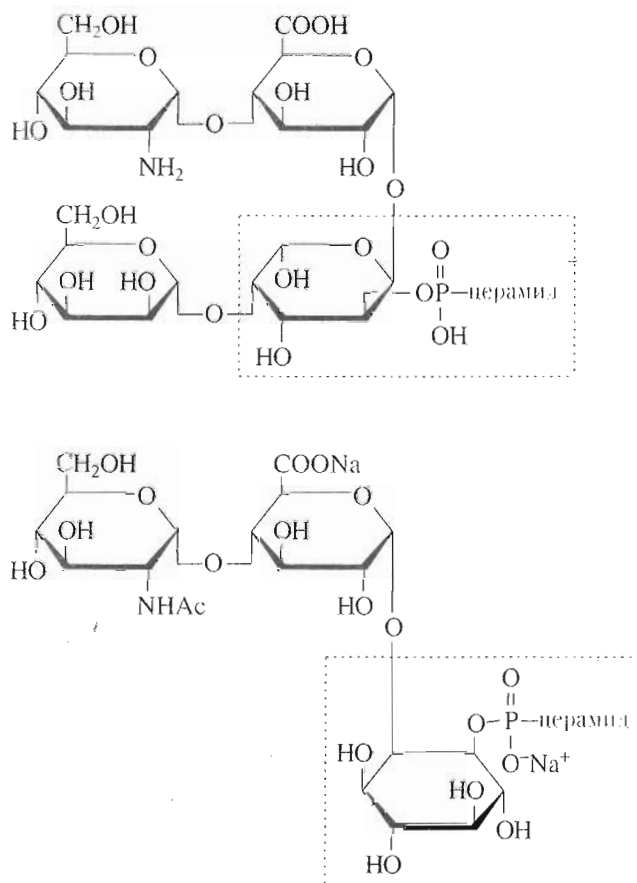


Схема 12.

(на схеме 12 в качестве примера приведены структуры некоторых природных гликолиинозитфосфоцерамидов). Строение гликолиинозитфосфоцерамидов установлено с помощью химико-ферментативных и спектральных методов [74]; эти гликофосфолипиды, как и в случае гликозилфосфатидинозитов, имеют характерный общий структурный фрагмент – инозитфосфоцерамид (выделен пунктиром на схеме 12).

Гликолиинозитфосфоцерамиды до настоящего времени наименее изучены в сравнении с другими инозитсодержащими фосфолипидами; весьма мало сведений имеется об их биосинтезе и биологических функциях. Для этих веществ показана активность в серологических реакциях и проявление защитных свойств при некротических поражениях у растений. Синтетические работы в ряду гликолиинозитфосфоцерамидов только начинают развиваться и базируются на соединении методологических подходов химии *мио*-инозита, сфингозиновых оснований и углеводов [74–77]. Примером поисковой работы в этом направлении может служить разработка полного синтеза маннозилинозитфосфоцерамида (69)-(схема 13), где

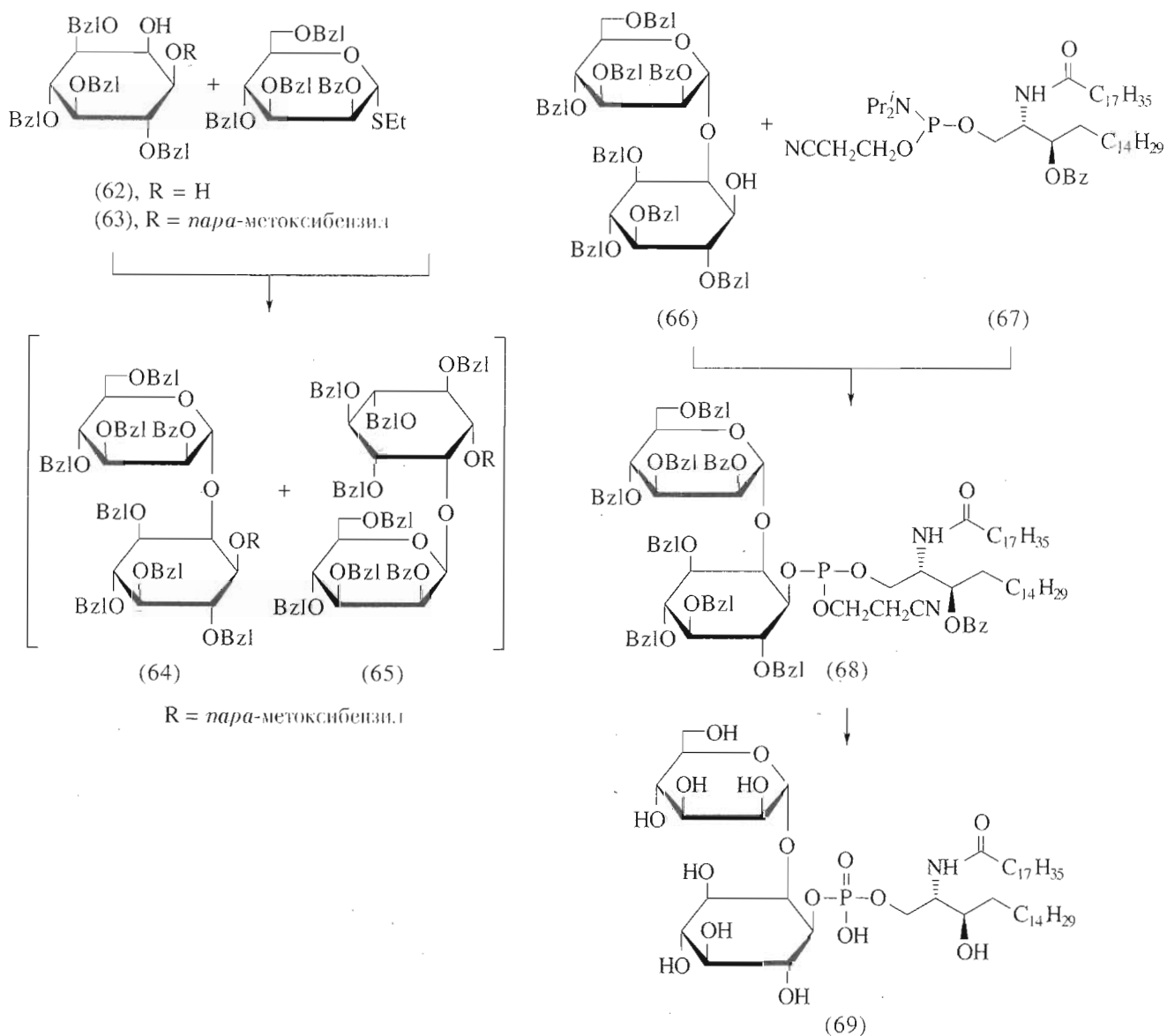


Схема 13.

основные этапы включали получение оптически активного защищенного α -D-маннопиранозил-мио-инозита со свободной гидроксигруппой в положении 1 циклитной части молекулы, конденсацию его с амидофосфитом *D*-эритро-3-О-бензоилцерамида, окисление фосфита в фосфат и выделение целевого гликофосфолипида [74, 75, 77].

Для получения хирального маннозида мио-инозита (66) было проведено оптическое расщепление рацемического 1,4,5,6-тетрабензил-мио-инозита через образование и разделение диастереомерных 3-О- и 1-О-(-)-*l*-ментоксиацетатов дробной кристаллизацией. Диастереомер с необходимой стереохимической конфигурацией инозитной части молекулы гидролизовали и выделяли хираль-

ный 3,4,5,6-тетра-О-бензил-D-мио-инозит (62), который далее превращали в 1-О-*n*-метоксибензильное производное (63), последнее гликозилировали с помощью этилтиоманнопиранозида, в полученной смеси α - и β -аномеров (64, 65) селективно удаляли *n*-метоксибензильную группу и последующей хроматографией выделяли α -маннозид (66), который конденсировали с фосфоамидитом (67), промежуточное фосфиттриэфирное производное (68) окисляли в соответствующий фосфат и после удаления всех защитных групп выделяли целевой фитогликолипид (69) природного строения.

В последние годы достигнут существенный прогресс в понимании структурно-функциональной роли инозитсодержащих гликофосфолипи-

дов в важнейших процессах, регулирующих состояние организма на клеточном уровне. Необходимо дальнейшие фундаментальные работы для понимания механизмов действия гликозилфосфатидилинозитных якорей в составе липид-белковых конъюгатов, открытыми остаются вопросы локализации и подвижности якорных белков в отдельных областях плазматической мембраны, передачи внешних сигналов через мембрану и т.д. Несомненно, что в ходе дальнейших исследований по молекулярной биологии клетки будут найдены новые функционально-активные инозитсодержащие гликофосфолипиды и их конъюгаты с другими типами биологически активных веществ. Синтетический подход будет и далее существенно способствовать решению сложных проблем всестороннего изучения этой биологически важной группы природных гликофосфолипидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Low M.G., Saliel A.R. // Science. 1988. V. 339. P. 268–275.
2. Low M.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 988. P. 427–454.
3. Gross G.A.M. // Ann. Rev. Cell Biol. 1990. V. 6. P. 1–39.
4. McConville M.J. // Cell Biol. Int. Rep. 1991. V. 15. P. 779–798.
5. Turco S.J., Descoteaux A. // Ann. Rev. Microbiol. 1992. V. 46. P. 65–94.
6. McConville M.J., Ferguson M.A.J. // Biochem. J. 1993. V. 294. P. 305–324.
7. Englund P.T. // Ann. Rev. Biochem. 1993. V. 62. P. 121–138.
8. Stevens V.L. // Biochem. J. 1995. V. 310. P. 361–370.
9. Kovacs P. // Progr. Mol. Subcell Biol. 1996. V. 17. P. 105–118.
10. Robinson P.J. // Adv. Exp. Med. Biol. 1997. V. 419. P. 365–370.
11. Field M.C. // Glycobiology. 1997. V. 7(2). P. 161–168.
12. Степанов А.Е., Швец В.И. // Успехи биологической химии. 1979. Т. 20. С. 152–168.
13. Швец В.И., Степанов А.Е., Крылова В.П., Гулак П.В. // мио-Инозит и фосфоинозитиды. М.: Наука, 1987. 248 с.
14. Степанов А.Е., Швец В.И. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 737–744.
15. Potter B.V.L., Lampe D. // Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1995. V. 34. P. 1983–2072.
16. Gigg R., Gigg J. // Glycopept. Relat. Compd. Editors: Large D.G., Warren C.D. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997. P. 327–392.
17. Степанов А.Е., Швец В.И., Евстигнеева Р.П. // Журн. общ. хим. 1977. Т. 47. С. 1653–1656.
18. 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.
19. Шастина Н.С., Эйнисман Л.И., Степанов А.Е., Швец В.И. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 446–450.
20. Elie C.J.J., Verduyn R., Dreef C.E., van der Marel G.A., van Boom J.H. // J. Carb. Chem. 1992. V. 11. P. 715.
21. Watanabe Y., Nakamoto C., Ozaki S. // Synlett. 1993. N2. P. 115–116.
22. Watanabe Y., Nakamoto C., Yamamoto T., Ozaki S. // Tetrahedron. 1994. V. 50. P. 6523–6536.
23. Watanabe Y., Yamamoto T., Okazaki T. // Tetrahedron. 1997. V. 53. P. 903–918.
24. Mato J.N., Kelly K.L., Abler A., Jarett L., Corkey B.E., Cashel J.A., Zopf D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. V. 146. P. 764–770.
25. Saliel A.R., Fox J.A., Sherline P., Cuatrecasas P. // Science. 1986. V. 233. P. 967–972.
26. Saliel A.R., Sorbara-Cazan L.R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. V. 149. P. 1084–1092.
27. Kilgour E. // Cellular Signalling. 1993. V. 5. P. 97–105.
28. Plourde R., d'Alarcao M. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. P. 2693–2696.
29. Vacca J.P., de Solms S.J., Huff J.R. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 3478–3479.
30. Plourde R., d'Alarcao M., Saliel A.R. // J. Org. Chem. 1992. V. 57. P. 2606–2610.
31. Verduin R., Elie C.J.J., Dreef C.E., van der Marel G.A., van Boom J.H. // Recl. Trav. Chim. Pays-Bas. 1990. V. 109. P. 591–593.
32. Berlin W.K., Zhang W.-S., Shen T.Y. // Tetrahedron. 1991. V. 47. P. 1–20.
33. Vacca J.P., de Solms S.J., Huff J.R., Billington D.C., Baker R., Kulagowski J.J., Mawer I.M. // Tetrahedron. 1989. V. 45. P. 5679–5702.
34. Cobb J.E., Johnson M.R. // Tetrahedron. 1991. V. 47. P. 21–30.
35. Zapata A., Martin-Lomas M. // Carbohydr. Res. 1992. V. 234. P. 93–106.
36. Zapata A., Leon Y., Mato J.M., Varela-Nieto I., Penades S., Martin-Lomas M. // Carbohydr. Res. 1994. V. 264. P. 21–31.
37. Шастина Н.С., Эйнисман Л.И., Каширичева И.И., Степанов А.Е., Швец В.И. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 641–650.
38. Gigg J., Gigg R., Payne S., Conant R. // Carbohydr. Res. 1985. V. 142. P. 132–134.
39. Zurabyan S.E., Antonenko T.S., Khorlin A.Ya. // Carbohydr. Res. 1970. V. 15. P. 21–27.
40. Бовин Н.В., Зурабян С.Э., Хорлин А.Я. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1981. №12. С. 2806–2808.
41. Kennington A.S., Shen T.Y., Romero G. // Anal. Biochem. 1989. V. 181. P. 1–5.
42. Murakata C., Ogawa T. // Carbohydr. Res. 1992. V. 234. P. 75–91.
43. Cottaz S., Brimacombe J.S., Ferguson M.A.J. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1993. (23). P. 2945–2951.
44. Cottaz S., Brimacombe J.S., Ferguson M.A.J. // Carbohydr. Res. 1995. V. 270. P. 85–91.
45. Cottaz S., Brimacombe J.S., Ferguson M.A.J. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1995. (13). P. 1673–1678.
46. Butikofer P., Boschung M., Menon A.K. // Anal. Biochem. 1995. V. 229. P. 125–132.

47. *Silva M.M., Cleophax J., Benicio A.A., Almeida M.V., Delaumeny J.M., Machado A.S., Gero S.D.* // *Synlett*. 1996. (8). P. 764–766.
48. *Crossman A.Jr., Brimacombe J.S., Ferguson M.A.J.* // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. 1997. (18). P. 2769–2774.
49. *Garegg P.J., Konradsson P., Oscarson S., Ruda K.* // *Tetrahedron*. 1997. V. 53. P. 17727–17734.
50. *Murakata C., Ogawa T.* // *Tetrahedron Lett.* 1991. V. 32. P. 671–674.
51. *Murakata C., Ogawa T.* // *Carbohydr. Res.* 1992. V. 235. P. 95–114.
52. *Mayer T.G., Kratzer B., Schmidt R.R.* // *Angew. Chem.* 1994. V. 106. P. 2289–2293.
53. *Campbell A.S., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 10387–10388.
54. *Bridges A.J.* // *Org. Chem.* 1996. V. 9. P. 215–223.
55. *Mootoo D.R., Konradsson P., Udodong U.E., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1988. V. 110. P. 5583–5584.
56. *Fraser-Reid B., Konradsson P., Mootoo D.R., Udodong U.E.* // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1988. P. 823–835.
57. *Mootoo D.R., Date V., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1988. V. 110. P. 2662–2663.
58. *Mootoo D.R., Fraser-Reid B.* // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 2363–2366.
59. *Mootoo D.R., Konradsson P., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 8540–8542.
60. *Ratcliffe A.J., Konradsson P., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 5565–5567.
61. *Merritt J.B., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 8334–8336.
62. *Udodong U.E., Madsen R., Roberts C., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 7886–7887.
63. *Roberts C., Madsen R., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 1546–1553.
64. *Madsen R., Udodong U.E., Roberts C., Mootoo D.R., Konradsson P., Fraser-Reid B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 1554–1565.
65. *Murakata C., Ogawa T.* // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 30. P. 2439–2442.
66. *Murakata C., Ogawa T.* // *Tetrahedron Lett.* 1991. V. 32. P. 101–104.
67. *Khair N., Martin-Lomas M.* // *J. Org. Chem.* 1995. V. 60. P. 7017–7021.
68. *Weels G.B., Lester R.L.* // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 10200–10203.
69. *Laine R.A.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1986. V. 42. P. 129–135.
70. *Singh B.N., Costello C.E., Beach D.N., Holz G.G.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 157. P. 1239–1246.
71. *L'homme O., Bruneteau M., Costello C.E., Mas P., Molot P.-M., Dell A., Teller P.R., Michel G.* // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 191. P. 203–209.
72. *Puoti A., Desponds A., Conzelmann A.* // *J. Cell. Biol.* 1991. V. 113. P. 515
73. *Hetherington A.M., Drobak B.K.* // *Prog. Lipid Res.* 1992. V. 31. P. 53–63.
74. *Frantova A.Yu., Stepanov A.E., Bushnev A.S., Zvonkova E.N., Shvets V.I.* // *Tetrahedron Lett.* 1992. V. 33. P. 3539–3542.
75. *Замятина А.Ю., Степанов А.Е., Бушнев А.С., Звонкова Е.Н., Швец В.И.* // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. С. 347–353.
76. *Mayer T.G., Kratzer B., Schmidt R.R.* // *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1994. V. 33. P. 2177.
77. *Zamyatina A.Y., Shvets V.I.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1995. V. 76. P. 225–240.

Synthesis of Inositol Containing Glycophospholipids

A. E. Stepanov[#] and V. I. Shvets

*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Department of Biotechnology,
prospekt Vernadskogo, 86, Moscow, 117571 Russia*

The results and problems of synthetic studies of natural inositol containing glycophospholipids as well as their biologically active fragments and structural analogs are reviewed.

Key words: myo-inositol; mannophosphoinositides; glycosylphosphatidylinositols; inositol containing glycosphingophospholipids; phosphorylation, glycosylation

[#] To whom correspondence should be addressed.