



УДК 547.458.3'913.3'118.07

**СИНТЕЗ МОРАПРЕНИЛПИРОФОСФАТОЛИГОСАХАРИДОВ —
ПРЕДПОЛАГАЕМЫХ СУБСТРАТОВ ПРИ БИОСИНТЕЗЕ
О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ САЛМОНЕЛЛ***Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шibaев В. Н.,
Кочетков Н. Е.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Олигосахариды $Rha\beta 1-3Gal$, $Man\alpha 1-4Rha\alpha 1-3Gal$ и $Rha\alpha 1-3(Glc\alpha 1-6)Gal$ превращены в соответствующие α -гликозилфосфаты, а последние — взаимодействием с морапренилфосфоимдазolidом — в морапренилпирофосфатолигосахариды, структура углеводных фрагментов которых соответствует предполагаемым структурам углеводных фрагментов в промежуточных соединениях при биосинтезе О-специфических полисахаридов салмонелл серогрупп А, В, D₁ и E₁.

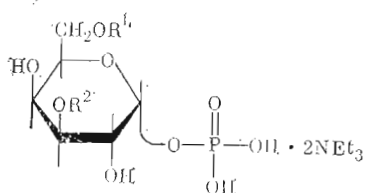
Биосинтез О-специфических полисахаридов салмонелл включает в себя сборку повторяющегося звена полисахарида на липидном акцепторе с промежуточным образованием полипренилпирофосфатолигосахаридов. Вывод о структуре углеводного фрагмента в этих соединениях может быть сделан на основании имеющихся данных о структуре углеводной цепи соответствующих О-специфических полисахаридов (см. обсуждение этого вопроса в работе [1]). Недавно нами был разработан имидазolidный метод синтеза полипренилпирофосфатсахаров [2-4] и с его помощью получен ряд углеводных производных пирофосфата морапренола — полипренола, выделенного из листьев шелковицы [5], для которого была продемонстрирована способность эффективно заменять бактериальный полипренол в реакциях биосинтеза О-специфических полисахаридов салмонелл [6, 7]. В частности, были получены морапренилпирофосфатные производные дисахарида $Rha\alpha 1-3Gal$ (I) и трисахарида $Man\beta 1-4Rha\alpha 1-3Gal$ (II). Углеводный фрагмент первого из этих соединений соответствует структуре биосинтетического дисахаридного производного из салмонелл серогрупп А, D и E и одной из двух структур, предполагаемых для салмонелл серогруппы В. Трисахарид (II) отвечает предполагаемой структуре углеводного фрагмента в трисахаридных биосинтетических производных из салмонелл серогрупп D₂ и E.

Целью настоящей работы является синтез трех новых морапренилпирофосфатных производных олигосахаридов $Rha\beta 1-3Gal$ (III), $Man\alpha 1-4Rha\alpha 1-3Gal$ (IV) и $Rha\alpha 1-3(Glc\alpha 1-6)Gal$ (V) для их последующего

Все моносахаридные остатки в пиранозной форме, остатки галактозы, маннозы и глюкозы — D-, а рамнозы — L-ряда; соответствующие символы в обозначениях остатков опущены. THF — тетрагидрофуран, DMSO — диметилсульфоксид, TEAB — бикарбонат триэтиламмония.

биохимического использования. Дисахарид (III) — это вторая возможная структура для углеводного фрагмента биосинтетического производного в салмонеллах серогруппы В, трисахарид (IV) — предполагаемая структура углеводного фрагмента в биосинтетических производных бактерий серогрупп А, D, и В (в последнем случае — одна из двух возможных структур). Возможность образования биосинтетического промежуточного соединения, углеводный фрагмент которого имеет структуру (V), была продемонстрирована в салмонеллах серогруппы E₄ [8].

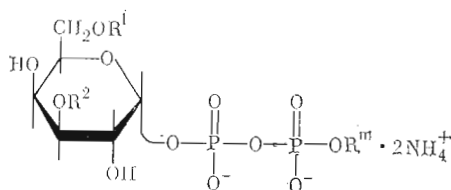
Синтез олигосахаридов (III) — (V) был описан в работе [1], а превращение трисахарида (IV) в его 1α-фосфат (VII) — в работе [9]. Аналогичный метод — фосфорилирование полных ацетатов олигосахаридов действием безводной фосфорной кислоты с последующим дезацетилированием продукта реакции гидроокисью лития и очисткой гликозилфосфата с помощью ионообменной хроматографии — был использован для получения фосфатов (VI) и (VIII) из дисахарида (III) и трисахарида (V). Даже в первом случае, когда фосфорилируемое соединение содержало кислотолабильную β-L-рамнозидную связь, реакция протекала гладко.



(VI) R¹ = H, R² = Rhaβ1-

(VII) R¹ = H, R² = Manα1-4Rhaα1-

(VIII) R¹ = Glcα1-, R² = Rhaα1-



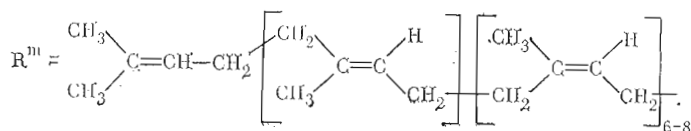
(IX) R¹ = H, R² = Rhaβ1-

(X) R¹ = H, R² = Manα1-4Rhaα1-

(XI) R¹ = Glcα1-, R² = Rhaα1-

(XII) R¹ = R² = H

(XIII) R¹ = H, R² = Rhaα1-



Аналитические данные полученных соединений соответствовали приписываемой структуре; вывод об α-конфигурации гликозилфосфатной связи сделан на основании сравнения скорости высвобождения неорганического фосфата из полученных соединений с соответствующими скоростями для α- и β-D-галактопиранозилфосфатов в стандартных условиях [9, 10].

Синтез морапсенилпирофосфатолигосахаридов (IX) — (XI) был осуществлен по слегка видоизмененной методике [4]. Мы обнаружили, что реакция морапсенилфосфонмидазолида с двукратным избытком гликозилфосфатов (VI) — (VIII) гладко протекает в присутствии триэтиламмониевых солей гликозилфосфатов (вместо три-*n*-октиламмониевых солей, как описывалось ранее [4]). С использованием триэтиламмониевых солей нами были получены также описанные ранее [4] производные (XII) (выход 70%) и (XIII) (выход 33%).

Морапсенилпирофосфатолигосахариды (IX) — (XI) были очищены с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, их структура подтверждена определением отношения морапсенил — фосфат, близкого к 1 : 2, и идентификацией олигосахаридпирофосфатов, характерных продуктов деградации при обработке морапсенилпирофосфатсахаров 40% вод-

ным фенолом (10 мин, 70° С). Как и в ранее описанных случаях [4], продукты были достаточно устойчивыми при хранении в метанольных растворах, содержащих ацетат аммония.

Экспериментальная часть

Растворы упаривали в вакууме при 30° С. Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках с силикагелем (Kieselgel, Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода, 60 : 25 : 4, обнаруживая фосфорные эфиры с помощью реактива [11] с последующим прокаливанием. Электрофорез проводили на бумаге «Filtrak FN-16» в 0,05 М ТЕАВ, рН 8,5, проявляя фосфаты реагентом [12] и определяя подвижность относительно α -D-глюкозо-1-фосфата ($E_{\text{ГЛЦР}}$). В работе использовали дауэкс 1×8 и дауэкс 50 W×8 (Serva, Швеция), DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия), сефадекс LH-2С (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). Электропроводность фракций измеряли с помощью кондуктометра СДМЗ (Radiometer, Дания). Кислотолабильный фосфат ($P_{\text{кл}}$) и константу скорости кислотного гидролиза гликозилфосфатов (k) определяли согласно методике [10]. Моносахаридный состав олигосахаридфосфатов устанавливали после кислотного гидролиза (2 н. HCl, 100° С, 2 ч) на ионообменной колонке (25×0,6 см) с дауэксом DA×4 с помощью углеводного анализатора «Technicon SC II» (0,5 М борат натрия, рН 8,5; 55° С, 60 мл/ч), используя в качестве стандарта образец трисахарида Man β 1—4Rha α 1—3Gal [13], гидролизованный в тех же условиях. Количественное определение производных морапренола проводили по методике [4].

O- β -L-Рамнопиранозил-(1→3)- α -D-галактопиранозилфосфат (VI). Полный ацетат *O*- β -L-рамнопиранозил-(1→3)- α -D-галактопиранозы (53 мг, 80 мкмоль, смесь аномеров, полученная ацетилированием дисахарида (III) [1] смесью уксусного ангидрида и пиридина) растворяли в бензоле и лиофилизовали. Остаток сплавляли с безводной фосфорной кислотой (Merck, ~100 мг) при 56—60° С в вакууме в течение 2 ч, после охлаждения растворяли в 2 мл абс. THF, выливали в 10 мл 1 М LiOH и полученный раствор оставляли на 18 ч при 20° С. Осадок фосфата лития отделяли фильтрованием и промывали 0,1 М LiOH. Объединенный фильтрат и промывки обрабатывали дауэксом 50 W×8 (Pu⁺) до реакции среды, близкой к нейтральной, смолу отфильтровывали. Раствор (40 мл) наносили на колонку (1,5×20 см) с дауэксом 1×8 (HCO₃⁻). Колонку промывали водой (40 мл) и линейным градиентом ТЕАВ (0→0,33 М, по 150 мл, 60 мл/ч). Собирали фракции (10 мл) и определяли в них кислотолабильный фосфат. Фракции 18—24 объединяли, ТЕАВ удаляли последовательной отгонкой с водой и этанолом, остаток растворяли в 0,5 мл метанола, прибавляли 2,5 мл абс. бензола и лиофилизовали, получали триэтиламмониевую соль (VI) (46,6 мкмоль, 56%), $E_{\text{ГЛЦР}}$ 0,85, k 6,8·10⁻⁴ с⁻¹, $P_{\text{кл}}$ — Gal — Rha = 1,00 : 0,94; : 1,01.

O- α -L-Рамнопиранозил-(1→3)-*O*-[α -D-глюкопиранозил-(1→6)]- α -D-галактопиранозилфосфат (VIII) получали аналогично соединению (VI) из 26 мг (24 мкмоль) соединения (V). Выход триэтиламмониевой соли (VIII) 23 мкмоль (90%), $E_{\text{ГЛЦР}}$ 0,72, k 5,4·10⁻⁴ с⁻¹, $P_{\text{кл}}$ — Rha — Gal — Glc = = 1 : 1 : 1,2 : 0,95.

*P*¹-Морапренил-*P*²-[*O*- β -L-рамнопиранозил-(1→3)- α -D-галактопиранозил]пирофосфат (IX). Морапренилфосфат (11 мкмоль), полученный в виде метанольного элюата после выделения на DEAE-целлюлозе согласно методике [5], обессоливали на колонке (1×25 см) с сефадексом LH 20, уравновешенным смесью хлороформа и метанола (2 : 1), элюируя этой же системой растворителей. Процесс контролировали ТСХ и по изменению электропроводности элюата. Обессоленный фосфат морапренола упаривали досуха, растворяли в абс. бензоле и лиофилизовали. Активацию проводили раствором сульфинилдимидазола [14] в абс. THF (30 мкмоль) согласно

методике [2]. Раствор морапренилфосфоимидазолида в смеси абс. THF — абс. DMSO (1 : 1; 0,2 мл) добавляли к раствору триэтиламмониевой соли фосфата дисахарида (VI) (21,5 мкмоль) в той же смеси растворителей (0,2 мл) и выдерживали 18 ч при 20° С. Реакционную смесь разбавляли смесью хлороформа и метанола (2 : 1; 30 мл) и наносили на колонку (1×8 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (OAc⁻), уравновешенной той же смесью растворителей. Колонку промывали смесью хлороформа и метанола (2 : 1; 30 мл), метанолом (30 мл) и элюировали линейным градиентом ацетата аммония в метаноле (0→0,125 М, pH 7,0, по 95 мл, 36 мл/ч), собирая фракции элюата объемом 5 мл и определяя в них $P_{кл}$. Фракции 13—17 содержали соединение (IX) (2,8 мкмоль, 26%), R_f 0,10, морапренол — $P_{кл}=1 : 1,9$.

P^1 -Морапренил- P^2 -[O- α -D-маннопиранозил-(1→4)- α -L-рамнопиранозил-(1→3)- α -D-галактопиранозил]пирофосфат (X) получали аналогично соединению (IX) из 2,7 мкмоль триэтиламмониевой соли фосфата трисахарида (VII) [9] и 1,35 мкмоль морапренилфосфата в 0,2 мл смеси абс. THF — абс. DMSO (1 : 1). Реакционную смесь разделяли ионообменной хроматографией (0→0,125 М ацетат аммония в метаноле, по 75 мл, 36 мл/ч, фракции по 5 мл). Из фракций 11—16 получили соединение (X) (0,57 мкмоль, 21%), R_f 0,05, морапренол — $P_{кл}=1 : 2$.

P^1 -Морапренил- P^2 -{O- α -L-рамнопиранозил-(1→3)-O-[α -D-глюкопиранозил-(1→6)]- α -D-галактопиранозил}пирофосфат (XI) получали аналогично соединению (IX) из 12 мкмоль триэтиламмониевой соли фосфата трисахарида (VIII) и 6 мкмоль морапренилфосфата в 0,2 мл смеси абс. THF — абс. DMSO (1 : 1). Реакционную смесь разделяли ионообменной хроматографией (0→0,125 М ацетат аммония в метаноле, по 100 мл, 36 мл/ч, фракции по 5 мл). Из фракций 17—21 получили соединение (XI) (1,5 мкмоль, 25%), R_f 0,05, морапренол — $P_{кл}=1 : 2,04$.

Фенольная дегградация морапренилпирофосфатсахаров. Аликвоту элюата после ионообменной хроматографии, содержащую соединение (IX) — (XI) (5—10 мкг $P_{кл}$), разбавляли бензолом (2 мл) и экстрагировали водой (5×0,3 мл). К органическому слою прибавляли 80% водный фенол (50 мкл), концентрировали, прибавляли 50 мкл воды и нагревали 10 мин при 70° С. По охлаждении водный слой отделяли, экстрагировали четыреххлористым углеродом и анализировали электрофоретически. E_{G1C1P} для образующихся гликозилпирофосфатов составила 0,78 (из IX и X) и 0,70 (из XI).

Авторы глубоко благодарны В. И. Торгову за предоставление исходных олигосахаридов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Торгов В. И., Шибеев В. Н., Шашков А. С., Кочетков Н. К. Синтез бактериальных антигенов и их фрагментов. 12. Синтез и спектр ¹³C-ЯМР ди- и трисахаридных фрагментов O-антигенов Salmonella серогрупп А, В и D₁. — Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1860—1871.
2. Шибеев В. Н., Данилов Л. Л., Чекуничков В. П., Кусов Ю. Ю., Кочетков Н. К. Новый синтез полипренилпирофосфатсахаров. — Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 308—309.
3. Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Шибеев В. Н., Кочетков Н. К. Химический синтез промежуточных соединений биосинтеза O-антигена Salmonella senftenberg. — Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 468—470.
4. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Synthesis of polyprenyl pyrophosphate sugars from unprotected mono- and oligo-saccharide phosphates. — Carbohydr. Res., 1981, v. 88, № 2, p. 203—211.
5. Вергунова Г. И., Глузодед И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. П., Шишков А. С., Шибеев В. Н. Структура морапренола и синтез морапренилфосфата. — Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1484—1492.
6. Шибеев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. Способность морапренилфосфата участвовать в реакциях биосинтеза O-антигена Salmonella anatum. — Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 1, с. 47—56.

7. Кусов Ю. Ю., Киселева Е. В., Данилов Л. Л., Шibaев В. Н., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. Специфичность ферментов биосинтеза О-антигена салмонелл. 4. Кинетика реакций биосинтеза О-антигена *S. anatum* с производными бактериального полипренола и морапrenoла.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1863—1872.
8. Шibaев В. Н., Дружинина Т. Н., Попова А. П., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. Биосинтез О-специфического полисахарида *Salmonella senftenberg*.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 7, с. 1071—1082.
9. Danilov L. L., Troitzky M. F., Utkina N. S., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Synthesis of oligosaccharide phosphates: fragments of the biosynthetic intermediates of *Salmonella* O-specific polysaccharides.— Carbohydr. Res., 1980, v. 87, № 1, p. 141—146.
10. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шibaев В. Н. Быстрый микрометод идентификации аномеров гликозилфосфатов по скорости их кислотного гидролиза.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 780—782.
11. Vaskovky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. Universal reagent for phospholipid analysis.— J. Chromatogr., 1975, v. 114, № 1, p. 129—141.
12. Hanes C. S., Isherwood F. A. Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram.— Nature (London), 1949, v. 164, № 4183, p. 1107—1109.
13. Betaneli V. I., Ovchinnikov M. V., Backinovsky L. V., Kochetkov N. K. Practical synthesis of O- β -D-mannopyranosyl-, O- α -D-mannopyranosyl- and O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-galactoses.— Carbohydr. Res., 1980, v. 84, № 2, p. 211—224.
14. Колобушкина Л. М., Крицян А. М., Михайлов С. М., Падюкова Н. С., Флорентьева В. Л. Негликозидные аналоги нуклеотидов. Сообщение 6. Моно- и трифосфаты ω -оксиялкylпроизводных нуклеиновых оснований.— Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 8, с. 1846—1850.

Поступила в редакцию
25.V.1981

SYNTHESIS OF MORAPRENYL PYROPHOSPHATE OLIGOSACCHARIDES — PUTATIVE SUBSTRATES FOR BIOSYNTHESIS OF SALMONELLA O-SPECIFIC POLYSACCHARIDES

DANILOV L. L., UTKINA N. S., SHIBAEV V. N., KOCHETKOV N. K.

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

The oligosaccharides *L*-Rha β 1-3-*D*-Gal, *D*-Man α 1-4-*L*-Rha α 1-3-*D*-Gal and *L*-Rha α 1-3-(*D*-Glc α 1-6)-*D*-Gal were converted into corresponding α -glycosyl phosphates, which were treated with moraprenyl phosphoimidazolide to give P¹-moraprenyl, P²-glycosyl pyrophosphates. The structure of oligosaccharide residues in these substances corresponds to that suggested for polyprenyl intermediates involved in the biosynthesis of O-specific polysaccharide of *Salmonella* serological groups A, B, D₁ and E₄.