



УДК 547.455.623'233.1'118

ФРАГМЕНТЫ БИОПОЛИМЕРОВ,
СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ ГЛИКОЗИЛФОСФАТОВ.2*. СИНТЕЗ ФРАГМЕНТА ПОЛИМЕРА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
MICROCOCCUS VARIANS ATCC 29750 С ПОМОЩЬЮ
ФОСФОДИЭФИРНОГО ПОДХОДАШибазев В. Н., Елисеева Г. И., Джорунбекова Дж.,
Юсупов Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Осуществлен синтез *n*-нитрофенил-2-ацетиамидо-6-О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфо)-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид — производного фрагмента полимера клеточной стенки *Micrococcus varians* ATCC 29750 — взаимодействием соответствующих защищенных производных N-ацетилглюкозамина и его α -1-фосфата с DCC. Показано, что синтез фосфодиэфира сопровождается побочной реакцией расщепления гликозилфосфатной связи, и охарактеризованы некоторые продукты, возникающие в результате такого расщепления.

Как уже отмечалось в первом сообщении настоящей серии [1], фосфодиэфирная связь, образованная остатком гликозилфосфата и гидроксильной группой моносахаридного остатка, характерна для многих углеводсодержащих биополимеров, причем полимеры бактериального происхождения отличает присутствие в них остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксигексозилфосфатов (см. обзор [2]). Между тем в синтетических работах, посвященных получению гликозилфосфосахаров — фрагментов цепей этих полимеров, как правило, речь идет о синтезе производных обычных гексоз (см. [1] и цитированные там публикации, а также [3]). Единственное исключение — недавняя работа [4], в которой описан синтез производного 6-О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфо)-D-маннозы.

В настоящей статье мы сообщаем о синтезе фрагмента полимера клеточной стенки грамположительного микроорганизма *Micrococcus varians* ATCC 29750**; это первый пример получения фрагментов полимеров бактериальной клеточной стенки такого типа. Упомянутый полимер построен из остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфата, соединенных фосфодиэфирной связью через C1 и C6 [5].

В качестве исходных веществ для получения целевого соединения *n*-нитрофенил-2-ацетиамидо-6-О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфо)-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (I) были использованы 2-ацетиамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфат (II) [6] и *n*-нитрофенил-2-ацетиамидо-3,4-ди-О-ацетил-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (III) [1, 7].

Как было показано в нашей предыдущей работе [1], наилучшие результаты при синтезе гликозилфосфосахаров с помощью фосфодиэфирного подхода достигаются при использовании в качестве конденсирующего агента N,N'-дидиклогексилкарбодимид (DCC). Оказалось, что при взаимодействии фосфата (II) и спирта (III) с DCC реакция образования фосфодиэфирной связи протекает заметно быстрее, чем в случае гликозилфосфатов — производных нейтральных гексоз, и полностью завершает-

* Сообщение 1 см. [1]. Сокращения: DCC — N,N'-дидиклогексилкарбодимид, ONp — *n*-нитрофенилокси.

** Этот микроорганизм упоминается в литературе также под названиями *Staphylococcus caseolyticus* ATCC 29750, *Staphylococcus lactis* 2102 и *Micrococcus* sp. 2102.

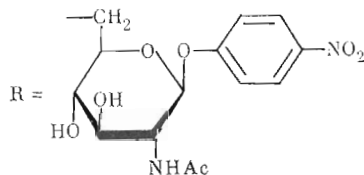
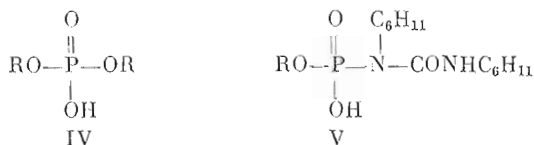
Ат. № углерода	δ, м. д.			
	(I) *	(IV)	(V) **	
Остаток моносахарида				
	А	В		
C1	99,7	95,1 д	99,7	100,0
C2	58,8	55,2 д	58,7	56,7
C3	74,8	72,1	74,7	74,7
C4	70,9	71,2	70,9	71,2
C5	76,45 д	74,25	76,2 д	76,45 д
C6	65,0 д	61,3	65,0 д	65,7 д
CH ₂	23,5	23,5	23,5	23,5
CO	176,0	176,0	176,0	176,0
Остаток <i>n</i> -нитрофенола				
C1	163,2		163,1	162,7
C2, C6	147,75		147,9	147,6
C3, C5	127,3		127,3	127,0
C4	143,5		145,7	143,3

* В остатке А С1 моносахарида связан с остатком *N*-нитрофенола, в остатке В — с фосфатной группой.

** В спектре присутствуют дополнительные сигналы, отвечающие остатку *N,N'*-дициклогексимочевине, связанному с атомом фосфора: 159,7 д (CO), 50,2 д (C1, J_C, ρ 5,5 Гц), 48,2 (C1'), 33,6 (C2', C5'), 32,5 д (C2, C5, J_C, ρ 11,0 Гц), 27,6 (C4, C4'), 26,3 и 25,3 (C3, C5, C3', C5').

фенил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы; данные спектра позволяют сделать вывод о β-конфигурации при С1 и замещения фосфатной группой по С6. Данные спектра ^{13}C -ЯМР (таблица) согласуются с этим заключением. Единственный сигнал в спектре ^{31}P -ЯМР находится при 2,04 м.д.; он несколько смещен в сторону слабого поля по сравнению с обычной областью сигналов фосфодиэфиров, но лежит в значительно более сильном поле, чем сигнал дианиона соответствующего фосфомоноэфира (4,75 м.д. [9]).

В соответствии с приписываемой структурой соединения (IV) ведет себя как фосфодиэфир при электрофорезе на бумаге и не изменяется при мягком кислотном гидролизе. Отношение *n*-нитрофенол — фосфор найдено близким к 2 : 1.



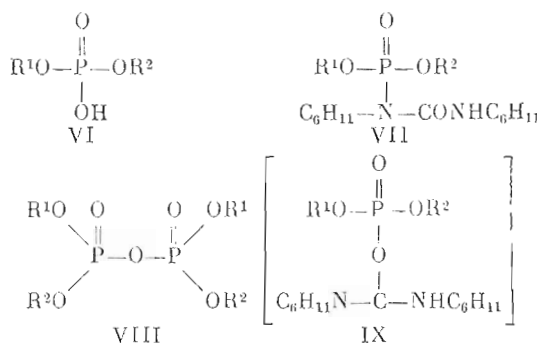
Второй побочный продукт реакции был отделен от смеси перацетатов фосфодиэфиров (I) и (IV) при хроматографии на силикагеле и подвергнут затем деацетилированию. Данные ЯМР-спектров для полученного соединения соответствуют структуре *N*-фосфорилмочевины (V).

В спектре ^1H -ЯМР этого вещества (см. «Экспериментальную часть») в дополнение к сигналам, отвечающим остатку β-фосфата *n*-нитрофенил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозиды, присутствуют сигналы протонов CH₂- и CHN-групп, показывающие наличие двух остатков цикло-

гексилamina. Соответствующие сигналы имеются и в спектре ^{13}C -ЯМР (таблица), причем расщепление за счет спин-спинового взаимодействия с атомом фосфора сигналов атомов углерода $-\text{NCON}-$, $\text{CHNH}-$ и CH_2 -группы указывает на связь остатка N,N' -дициклогексилмочевины с атомом фосфора.

Таким образом, в побочных продуктах (IV) и (V) фосфатная группа оказывается присоединенной к остатку исходного спирта (III). Очевидно, что образование этих соединений связано с расщеплением гликозилфосфатной связи в одном из промежуточных соединений, образующихся из фосфата (II) при действии DCC.

Как было показано при исследовании взаимодействия 3'-O-ацетилтимидин-5'-фосфата и 5'-O-тримидинина с DCC с помощью спектроскопии ^{31}P -ЯМР [10], целевой фосфодиэфир (VI) не является конечным продуктом, и в реакционной смеси (до добавления воды) накапливаются значительные количества производного N-фосфорилмочевины (VII) и тетразамещенного пирофосфата (VIII); в качестве промежуточного соединения при их образовании выступает, вероятно, производное O-изофосфорилмочевины (IX) (R^1 — остаток 3'-O-ацетилтимидина, R^2 — остаток 5'-O-тримидинина).



Очевидно, образование подобных же продуктов должно иметь место и при взаимодействии соединений (II) и (III) с DCC (R^1 — остаток 2-ацетамидо-3,4,6-три-O-ацетил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозы, R^2 — остаток III). В данном случае, однако, по-видимому, приобретает существенное значение побочная реакция расщепления гликозилфосфатной связи. В результате ее соединения (VII) может превратиться в продукт (V), а из соединений (VIII) и (IX) могут возникнуть активные фосфорилирующие агенты, взаимодействующие которых со спиртом (III), присутствующим в реакционной смеси, приводит через ряд стадий к симметричному фосфодиэфиру (IV).

При использовании в качестве исходного вещества гликозилфосфата (II) в соединениях (VII) — (IX) заместителем при C1 остатка моносахарида является остаток полностью замещенного производного фосфорной или пирофосфорной кислоты — хорошая уходящая группа при нуклеофильной атаке, это делает расщепление гликозилфосфатной связи вполне объяснимым. В качестве нуклеофила в этой реакции может выступать пиридин, используемый как растворитель. Однако тот факт, что несимметричные фосфодиэфиры — производные обычных гексоз были получены в аналогичной реакции с высокими выходами [1], позволяет предполагать содействие ацетамидной группы при C2 остатка гликозилфосфата расщеплению гликозилфосфатной связи.

Как и можно было ожидать, количество побочных продуктов увеличивается при увеличении продолжительности реакции. Для оценки степени расщепления гликозилфосфатной связи была использована упрощенная процедура анализа реакционной смеси: разделение продуктов реакции с помощью препаративного электрофореза, дезацетилирование фракции фосфодиэфиров и определение в полученном растворе отноше-

ния *n*-нитрофенол (по УФ-поглощению) — N-ацетилглюкозамин после мягкого кислотного гидролиза. При проведении реакции в течение 4 сут при $\sim 20^\circ \text{C}$ это отношение найдено равным 7,8;1, а при уменьшении продолжительности реакции до 16 ч — 1,8:1. В этих условиях в смеси остается, однако, значительное количество исходных веществ и выход фосфодиэфиров невелик.

Побочные реакции расщепления гликозилфосфатной связи имеют место при взаимодействии соединений (II) и (III) в присутствии других конденсирующих агентов. Было найдено, что при использовании смеси трифенилфосфии — четыреххлористый углерод отношение *n*-нитрофенол — N-ацетилглюкозамин после мягкого кислотного гидролиза во фракции фосфодиэфиров составляет 6,2:1, а при конденсации с 1-(2,4,6-триизопротилбензолсульфонил)тетразолом — 5:1.

Несмотря на побочные реакции, ограничивающие выход целевых продуктов, фосфодиэфирный подход с использованием ДСС пригоден для получения недоступных ранее гликозилфосфосахаров, содержащих остатки 2-ацетамидо-2-дезоксигексозилфосфатов — фрагментов биополимеров клеточной поверхности бактерий.

Экспериментальная часть

Определение фосфора и *n*-нитрофенола, носители для хроматографии и обнаружение веществ на пластинках и бумаге описаны в работе [1]. N-Ацетилглюкозамин определяли по методике [11] после гидролиза 0,1 М HCl в течение 15 мин при 100°C . Электрофорез на бумаге проводили в 0,05 М ТЕАВ, подвижность веществ определяли относительно пикриновой кислоты (E_{pic}). Использовали следующие системы растворителей: для ТСХ — хлороформ — метанол — 0,05 М водн. ТЕАВ, 60:35:6 (А); для хроматографии на колонке с силикагелем — хлороформ — метанол — 0,05 М водн. ТЕАВ, 60:25:4 (Б); для хроматографии на бумаге — *n*-бутанол — этанол — вода, 13:8:4 (В). Спектры ЯМР сняты на приборах Bruker WM-250 (250 МГц по ^1H , 62,89 МГц по ^{13}C) и AM-300 (121,5 МГц по ^{31}P); растворы в D_2O или 0,1 М NH_4HCO_3 в D_2O . Химические сдвиги выражены в шкале δ , КССВ — в Гц.

Концентрации гликозилфосфатов определяли по количеству фосфора, веществ, содержащих остаток *n*-нитрофенола, — спектрофотометрически.

2-Ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфат (II) получен по методике [6] с использованием для очистки защищенного производного хроматографии на колонке с силикагелем (хлороформ — ацетон, 4:1), R_f 0,33 (А), E_{pic} 1,25.

n-Нитрофенил-2-ацетамидо-3,4-ди-*O*-ацетил-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (III) получен по схеме [7] с проведением последней стадии как описано в работе [1].

Взаимодействие фосфата (II) и спирта (III) в присутствии ДСС и фракционирование продуктов. Смесью 120 мкмоль пиридиниевой соли гликозилфосфата (II) и 54 мг (140 мкмоль) соединения (III) высушили отгонкой абс. бензола и пиридина, добавили 400 мг (1,94 ммоль) ДСС и выдержали 3 сут при $\sim 20^\circ \text{C}$. Добавили 5 мл воды, оставили на 4 ч при 20°C , отфильтровали осадок и промыли его пиридином. Водно-пиридиновый раствор экстрагировали смесью эфир — гексан (1:1), добавили триэтиламин (16 мкл, 120 мкмоль), раствор упарили. Остаток высушивали отгонкой толуола, растворили в системе Б и хроматографировали на колонке (75×1,8 см) с силикагелем с элюцией этой же системой. Выделили фракции Ф1 (R_f 0,67, А) и Ф2 (R_f 0,56, А). Раствор Ф2 (спектр ^{31}P -ЯМР в метаноле содержит сигналы с $-0,09$ и $1,63$ м.д.) упарили, остаток растворили в смеси триэтиламин — метанол — вода (1:2:1), выдержали 16 ч при 20°C , упарили. Остаток разделили препаративной хроматографией на бумаге в системе В, элюировали водой зоны с R_f 0,43 (фракция Ф21) и 0,30 (фракция Ф22).

n-Нитрофенил-2-ацетамидо-2-дезоксид-6-*O*-(2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфо)- β -D-глюкопиранозид (I) получен упариванием раствора Ф22. Выход 24 мкмоль (20%), E_{pic} 0,40, R_f 0,3 (система В). Отношение *n*-нитрофенол — общий фосфор — N-ацетилглюкозамин 1:1:1. Спектр ^{31}P -ЯМР: $-0,90$; ^1H -ЯМР: 8,33д (2H, $J_{2,(3,6)}$ 9,0, H3(H5) ONp),

7,24д (2H, H2(H6) ONp), 5,41дд (1H, $J_{1,2}$ 3,0, $J_{1',P}$ 6,8, H1'), 5,37д (1H, $J_{1,2}$ 8,2, H1), 4,25ддд (1H, $J_{6a,5}$ 2,10, $J_{6a,P}$ 4,5, $J_{6a,6b}$ 11,10, H6a), 4,15ддд (1H, $J_{6b,5}$ 3,5, $J_{6b,P}$ 5,9, H6), 4,08дд (1H, $J_{2,3}$ 10,0, H2), 3,87ддд (1H, $J_{2',P}$ 3,0, $J_{2',3}$ 10,5, H2'), 3,6–3,85м (7H), 3,51дд (1H, $J_{4,3}$ 10,1, $J_{4,5}$ 8,0, H4), 2,04с и 2,06с (6H, CH₃CON); ¹³C-ЯМР — см. таблицу.

Бис(п-нитрофенил-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозидо-6-)-фосфат (IV) получен упариванием раствора Ф21. Выход 18 мкмоль (15%) E_{P1c} 0,40, R_f 0,43 (система В). Отношение *p*-нитрофенол — фосфор 2 : 1. Спектр ³¹P-ЯМР: 2,04; ¹H-ЯМР: 7,95д (2H, $J_{3,2(5,6)}$ 9,3, H3(H5) ONp), 6,94д (2H, H2(H6) ONp), 5,21д (1H, $J_{1,2}$ 8,5, H1), 4,38ддд (1H, $J_{6a,5}$ 2,10, $J_{6a,P}$ 5,20, $J_{6a,6b}$ 11,50, H6a), 4,14ддд (1H, $J_{6b,5}=J_{6b,P}=5,90$, H6), 4,10дд (1H, $J_{2,3}$ 10,5, H2), 3,93м (1H, H5), 3,79дд (1H, $J_{3,4}$ 8,9, H3), 3,62дд (1H, $J_{4,5}$ 9,8, H4), 2,13с (3H, CH₃CON); ¹³C-ЯМР — см. таблицу.

N,N'-Дициклогексил-N-(п-нитрофенил-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозидо-6-)-фосфоно)мочевина (V). Раствор Ф1 упарили, остаток обработали смесью триэтиламин — метанол — вода, 1 : 2 : 1 (16 ч, ~20° С). Из остатка ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе DE-52 (HCO₃⁻) выделили продукт (V) (элюция 0,01 М NH₄HCO₃). Выход 42 мкмоль (35%), E_{P1c} 0,40, R_f 0,36 (система В). Спектр ¹H-ЯМР: 8,29д (2H, $J_{3,2(5,6)}$ 9,30, H3(H5) ONp), 7,23д (2H, H2(H6) ONp), 5,36д (1H, $J_{1,2}$ 8,3, H1), 4,19ддд (1H, $J_{6a,5}$ 2,1, $J_{6a,P}$ 5,20, $J_{6a,6b}$ 11,50, H6a), 4,11дд (1H, $J_{2,3}$ 9,5, H2), 4,06ддд (1H, $J_{6b,5}=J_{6b,P}=6,0$, H6), 3,83м (1H, H5), 3,53–3,79м (2H, H3, H4), 3,37–3,53м (4H, CHN), 2,07с (3H, CH₃CON), 1,95–2,05м, 1,42–1,81м и 1,02–1,42м (2OH, CH₂); ¹³C-ЯМР — см. таблицу.

Реакция в присутствии смеси трифенилфосфин — четыреххлористый углерод. К раствору смеси 20 мкмоль пиридиневой соли гликозилфосфата (II) и 4,3 мг (11,3 мкмоль) спирта (III) в 0,15 мл абс. пиридина добавили 5 мкл четыреххлористого углерода и 24 мг (9,1 мкмоль) трифенилфосфина, выдержали 5 ч при 20° С. Растворитель упарили, остаток растворили в 1 мл смеси триэтиламин — метанол — вода (1 : 2 : 1) и оставили на 16 ч при ~20° С. Растворитель упарили, остаток растворили в воде, промыли эфиром и разделили препаративным электрофорезом на бумаге. Выделили зону с E_{P1c} 0,40. Выход (по содержанию нитрофенола) 60%, отношение *p*-нитрофенол — N-ацетилглюкозамин 6,2 : 1.

Реакция в присутствии 1-(2,4,6-триизопропилбензолсульфоил)тетразола. К раствору 26 мкмоль пиридиновой соли гликозилфосфата (II) и 8,5 мг (22 мкмоль) спирта (III) в 0,5 мл абс. пиридина добавили 25 мг (65 мкмоль) 2,4,6-триизопропилбензолсульфоилтетразола [12], выдержали 16 ч при ~20° С. Добавили 1 мл смеси пиридин — вода (1 : 1), через 3 ч при 20° С отфильтровали осадок и упарили фильтрат. Из остатка с помощью хроматографии на колонке с силикагелем (система Б) выделили фракцию фосфодиэфиров. Выход 13 мкмоль (59%), R_f 0,52 (А). E_{P1c} 0,50. Часть полученного вещества подвергли O-деацетилированию (триэтиламин — метанол — вода, 1 : 2 : 1; 16 ч; 20° С), отношение *p*-нитрофенол — N-ацетилглюкозамин найдено равным 5 : 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шибает В. Н., Джорунбекова Дж., Елисева Г. И., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1225–1233.
2. Шибает В. Н. // Успехи биол. химии. 1982. Т. 23. С. 61–101.
3. Srivastava O. P., Hindsgaul O. // Carbohydr. Res. 1985. V. 143. P. 77–85.
4. Madiyalakan R., An S.-H., Jain R. K., Malta K. L. // Carbohydr. Res. 1985. V. 145. № 1. P. 89–98.
5. Archibald A. R., Stafford G. H. // Biochem. J. 1972. V. 130. № 3. P. 681–690.
6. Warren C. D., Herscovics A., Jeanloz R. W. // Carbohydr. Res. 1978. V. 61. P. 181–196.
7. Malta K. L., Barlow J. J. // Carbohydr. Res. 1975. V. 43. P. 299–304.
8. Ogawa T., Seta A. // Carbohydr. Res. 1982. V. 110. № 1. P. C1–C4.
9. Горбач В. И., Исаков В. В., Кулеш Ю. Г., Лукьянов П. Л., Соловьева Т. Ф., Овдов Ю. С. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 1. С. 81–84.

10. Заритова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 2. С. 189–198.
11. Reissig J. L., Strominger J. L., Leloir L. F. // J. Biol. Chem. 1955. V. 217. № 2. P. 959–966.
12. Stavinsky J., Kozumi T., Narang S. A. // Can. J. Chem. 1975. V. 54. № 4. P. 670–672.

Поступила в редакцию
30.X.1986

FRAGMENTS OF BIOPOLYMERS CONTAINING GLYCOSYL
PHOSPHATE RESIDUES. 2. SYNTHESIS OF A FRAGMENT
OF THE CELL WALL POLYMER FROM *MICROCOCCUS VARIANS*
ATCC 29750 THROUGH PHOSPHODIESTER APPROACH

SHIBAEV V. N., ELISEYEVA G. I., DJORUPBEKOVA J., KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zel'nsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

p-Nitrophenyl 2-acetamido-6-O-(2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranosylphospho)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside, derivative of a fragment of the cell wall polymer from *Micrococcus varians* ATCC 29750 was synthesised through interaction of protected derivatives of N-acetylglucosamine and the corresponding α -1-phosphate with DCC. Side reaction of cleavage of glycosyl-phosphate linkage was observed and some products of the reaction were characterized.