



УДК 547.593.261 : 118.057

© 1991 г.

А. Е. Степанов, О. В. Рунова, В. Н. Крылова,
В. И. Швец, В. Н. Бочков*, Ж. Шлевер**, Е. Спиеес**

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ ПРОИЗВОДНЫХ АСИММЕТРИЧНО
ЗАМЕЩЕННОГО *мио*-ИНОЗИТА
XXXV*. ПОЛНЫЙ СИНТЕЗ 1,4,5-ТРИФОСФАТА
sn-мио-ИНОЗИТА

Институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва, 117571;

* Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва;

** Центр нейробиологии Национального совета научных исследований и фармацевтический факультет университета им. Л. Пастера, Страсбург, Франция

Осуществлен полный синтез 1,4,5- и 3,5,6-трифосфатов *sn-мио*-инозита через стадии последовательного селективного блокирования-деблокирования гидроксильных групп *мио*-инозита, расщепления полученных асимметрично замещенных производных на энантиомеры через диастереомерные ортоэфиры с *D*-маннозой и избирательного фосфорилирования.

Возбуждение рецепторов клеточной поверхности различными внешними воздействиями (нейропередатчики, гормоны, ростовые факторы и др.) вызывает усиленный обмен инозитсодержащих фосфолипидов. Внешний сигнал обуславливает ключевое событие метаболического цикла фосфоинозитидов — гидролиз фосфатидилинозит-4,5-дифосфата фосфодиэстеразой, связанной посредством GTP-белка с поверхностными рецепторами. В результате гидролиза образуются 1,4,5-трифосфат *sn-мио*-инозита* и диацилглицерин, которые далее функционируют как внутриклеточные вторичные передатчики [5].

Систематическое изучение молекулярных механизмов биологического действия активных компонентов фосфоинозитидного цикла ставит задачу препаративного получения фосфатов *мио*-инозита и их модифицированных производных. Для этой цели возможно использование двух подходов:

а) ферментативный или химический гидролиз сложных природных фосфорсодержащих соединений *мио*-инозита, например фосфоинозитидов, фитина, выделенных из природных источников;

б) направленный полный химический синтез из свободного *мио*-инозита.

Реализация первого подхода малоэффективна вследствие большой трудоемкости и неэкономичности выделения фосфоинозитидов, содержащихся в природных сырьевых источниках в низких концентрациях; гидролиз более доступного фитина приводит к трудноразделимой смеси фосфатов *мио*-инозита, содержащей до 20 изомерных соединений.

Направленный химический синтез представляется более эффективным подходом к получению фосфатных производных *мио*-инозита в количествах,

* Сообщение XXXIV см. [1].

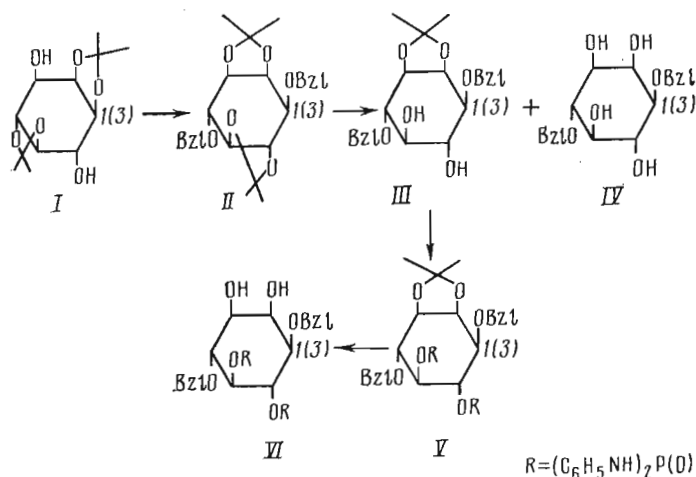
* В настоящей работе для производных *мио*-инозита используется стереоспецифическая номенклатура [2, 3]. Недавно Номенклатурный комитет Международного биохимического союза рекомендовал для применения правила нумерации атомов в соединениях *мио*-инозита с учетом ранее разработанных номенклатурных систем [4]. Эти рекомендации предназначены в основном для описания продуктов ферментативного фосфорилирования-дефосфорилирования *мио*-инозита (т. е. для свободных фосфатов *мио*-инозита). Однако, на наш взгляд, в сложных взаимопревращениях производных *мио*-инозита в ходе химического синтеза удобнее использовать стереоспецифическую номенклатуру.

необходимых для физико-химических и биологических исследований. Этим путем также возможно приготовление образцов фосфатов с модифицированной структурой, включающей в себя дополнительные функционально-активные группы или специфические метки различной природы.

Интенсивные исследования биологического цикла фосфоинозитидов вызвали в последние несколько лет быстрое увеличение числа работ, посвященных различным аспектам химии *мио*-инозита. Особые усилия многих лабораторий направлены на разработку эффективной методологии синтеза фосфатов *мио*-инозита [6]. Наша исследовательская программа включает в себя развитие методов препаративной химии хиральных фосфатных производных *мио*-инозита различного типа; физико-химическое изучение процессов комплексообразования этих лигандов с катионами щелочных и щелочноземельных металлов, редких и рассеянных элементов; установление взаимосвязей между биоактивностью и особенностями конформационного строения металлофосфатных комплексов. В этом сообщении представлены результаты полного синтеза 1,4,5-трифосфата *sn*-*мио*-инозита и его 3,5,6-изомера исходя из *мио*-инозита *.

Дикеталь *мио*-инозита (I), полученный по известному методу [9], обрабатывали хлористым бензилом в присутствии щелочи, что привело к дибензильному производному (II) с количественным выходом (схема 1).

Схема 1



Строение соединения (II) подтверждено данными ИК-спектра, в котором имелись полосы поглощения ароматической системы бензильных групп ($3030, 1605, 1495 \text{ см}^{-1}$) и в отличие от спектра исходного дикетала (I) отсутствовали полосы валентных колебаний гидроксильных групп; наличие двух бензильных групп подтверждено величиной поглощения в УФ-спектре производного (II). Селективный гидролиз *транс*-кетальной группы в соединении (II) водно-ацетоновым раствором *n*-толуолсульфокислоты (TsOH) [10] приводил к смеси дибензилмонокетала (III) и дибензильного эфира *мио*-инозита (IV), из которой индивидуальные вещества выделили последовательным избирательным осаждением хлороформом и четыреххлористым углеродом. Дибензилмонокеталь (III) далее был использован как исходное асимметрично замещенное производное для направленного синтеза целевых трифосфатов. Для построения молекулы инозиттрифосфата требовалось выбрать метод и последовательность введения фосфатных групп в определенные положения циклитного кольца, а также в ходе синтеза провести расщепление рацемических производных *мио*-инозита на энантиомеры для получения конечных продуктов с заданной стереохимической конфигурацией.

Основные трудности при синтезе полифосфатов *мио*-инозита связаны с проведением одновременного фосфорилирования вицинальных гидро-

* Краткие сообщения см. [7, 8].

кислых групп в положениях 4 и 5 циклитного остова молекулы. Различная реакционная способность и стереохимическая неравноценность гидроксигрупп в положениях 4 и 5 значительно осложняют проведение исчерпывающего фосфорилирования. Ранее в нашей лаборатории осуществлялось сравнительное изучение эффективности фосфорилирования замещенных производных *мио*-инозита, в том числе содержащих 4,5-диольную группировку. В качестве фосфорилирующих агентов были испытаны дифенилхлорфосфат, хлороксид фосфора, *о*-фениленхлорфосфат, (ди-*n*-нитробензил)хлорфосфат, дибензилхлорфосфат, дианилидохлорфосфат [11]. Наибольшая эффективность достигнута при использовании дианилидохлорфосфата [12], который был применен в данной работе для фосфорилирования вицинальных гидроксильных групп. Обработка дибензилмонокетала (III) 8-кратным избытком дианилидохлорфосфата в пиридине при комнатной температуре дала дифосфатное производное (V) с выходом 96%, при последующем удалении кетальной защиты соединения (V) в условиях мягкого кислотного гидролиза выделили дибензилдианилидофосфат (VI) с выходом 51,2%. Относительно невысокий выход соединения (VI) обусловлен частичным расщеплением лабильной фосфамидной связи в условиях гидролиза.

Следующий этап работы состоял в оптическом расщеплении рацемического дифосфата (VI) с целью получения хиральных соединений в результате синтеза. Для разделения рацемических производных *мио*-инозита в качестве хиральных расщепляющих реагентов применяются углеводы [13, 14], оптически активные кислоты [6], а также ВЭЖХ на хиральных носителях [15] и ферментативное расщепление [16].

Последние два метода пока недостаточно разработаны; использование оптически активных кислот для расщепления рацематов *мио*-инозита требует для каждого конкретного производного эмпирического подбора кислоты, которая обеспечивала бы эффективное разделение на антиподы. Ранее в нашей лаборатории был разработан метод оптического расщепления рацемических производных *мио*-инозита посредством получения диастереомерных производных с углеводами; метод апробирован на ряде рацемических соединений *мио*-инозита [11] и был применен в настоящей работе для расщепления дибензилдифосфата (VI) на энантиомеры.

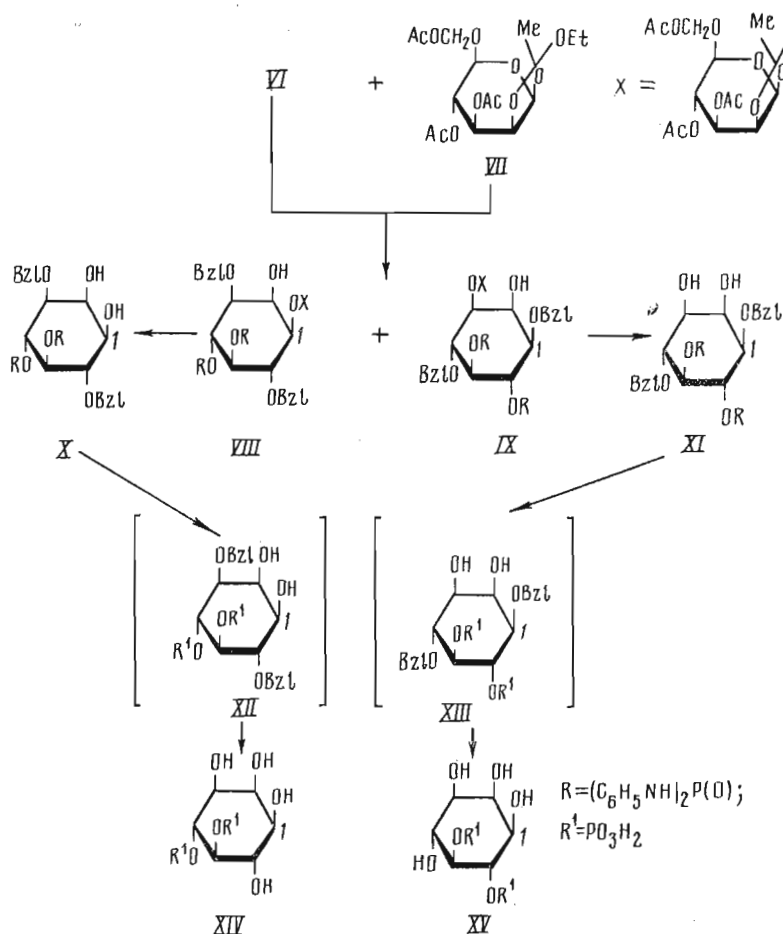
В качестве асимметрического агента использовали 3,4,6-три-*O*-ацетил-1,2-этилортоацетил- β -*D*-маннопиранозу (VII). Реакцию перэтерификации ортоэфира (VII) дибензилдифосфатом (VI) проводили в стандартных условиях [14] (схема 2). Для выделения диастереомерных ортоэфиров (VIII) и (IX) первоначально использовали метод препаративной ТСХ на окиси алюминия, однако вследствие высокой лабильности диастереомеров и их быстрого разрушения в ходе хроматографии положительного результата достигнуто не было. Для эффективного разделения компонентов реакции перэтерификации затем была применена ВЭЖХ и подобраны соответствующие условия. В результате разделения на колонке с силикагелем были выделены индивидуальные диастереомеры (VIII) и (IX) с выходами ~ 23 и 22,9% соответственно.

Ортоэфиры (VIII) и (IX) имели близкие ИК- и ¹H-ЯМР-спектры, подтверждающие строение этих веществ. Кривые ДОВ диастереомерных ортоэфиров (VIII) и (IX), противоположные по знаку, имели плавный характер.

Кислотный гидролиз соединений (VIII) и (IX) приводил к энантиомерам (X) и (XI); данные ИК- и УФ-спектров этих соединений, их хроматографическая подвижность в условиях ТСХ совпадали с подобными характеристиками рацемического производного (VI). Их кривые ДОВ имели характерную для энантиомеров плавную форму с противоположными знаками.

При расщеплении рацемических производных *мио*-инозита на энантиомеры пространственное строение последних может быть подтверждено посредством химической корреляции с соединениями заведомой стереохимической конфигурации. В случае энантиомерных дибензилдифосфатов (X) и (XI) такое отнесение было сделано путем их превращения в хираль-

Схема 2



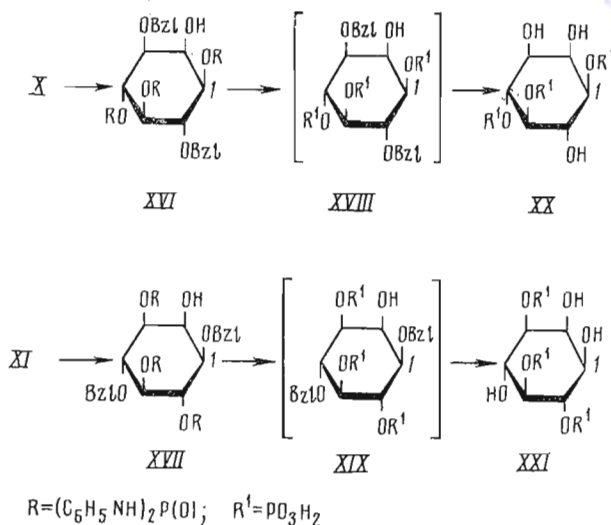
ные дифосфаты (XIV) и (XV) соответственно, стереохимическое строение которых установлено ранее [11]. Превращение энантиомеров (X) и (XI) в соединения (XIV) и (XV) является также новым препаративным методом синтеза хиральных дифосфатов *мио*-инозита.

После удаления бензильной и анилидной защитных групп в производных (X) и (XI) дифосфаты (XIV) и (XV) были выделены в форме циклогексиламмониевых солей для предотвращения миграции фосфатных групп. По данным хроматографической подвижности, значения температуры плавления и углов оптического вращения соединения (XIV) и (XV) были идентичны при прямом сравнении с известными образцами дифосфатов, синтезированными другим методом [17].

Таким образом, полученные энантиомеры (X) и (XI) обладали требуемой асимметрией молекулы, необходимой для перехода к построению структуры целевых трифосфатов. Соединения (X) и (XI) имели свободные гидроксильные группы в положениях 1,2 и 2,3 соответственно, что потребовало проведения селективного фосфорилирования диольных группировок в положения 1 и 3 в отличие от противоположной задачи исчерпывающего фосфорилирования при синтезе дибензилдифосфатного производного (VI). Условия селективного фосфорилирования выбирали с учетом аксиальной ориентации гидроксильной группы в положении 2 соединений (X) и (XI), что обуславливает ее пониженную реакционную способность в сравнении с остальными гидроксильными циклитного кольца. Обработка диолов (X) и (XI) 5-кратным избытком дианилидохлорфосфата в присутствии каталитических количеств диметиламинопиридина при комнатной температуре приводила к трифосфатным производным (XVI) и (XVII) с выходами 44,3 и 44,1% (схема 3). При изучении строения продуктов реакции спектраль-

ными и хроматографическими методами в сравнении с заведомым образцом 1(3), 4(6)-ди-О-бензил-2,5,6(4)-три-О-(дианилидо)фосфо-*sn*-*мио*-инозита, синтезированного другим методом [18], установлено, что в использованных условиях избирательно фосфорилируется экваториальная гидроксильная группа диолов (X) и (XI), образования изомера по положению 2 и тетрафосфатного производного практически не наблюдалось. Далее последовательное деблокирование защищенных трифосфатов (XVI) и (XVII) посредством расщепления фосфамидных связей действием раствора изоамилнитрита и удаления бензильных групп каталитическим гидрогенолизом приводило к образованию целевых трифосфатов (XX) и (XXI) соответственно (схема 3).

Схема 3



На заключительном этапе работы разработаны условия выделения полученных трифосфатов (XX) и (XXI) из реакционной смеси после удаления защитных групп *.

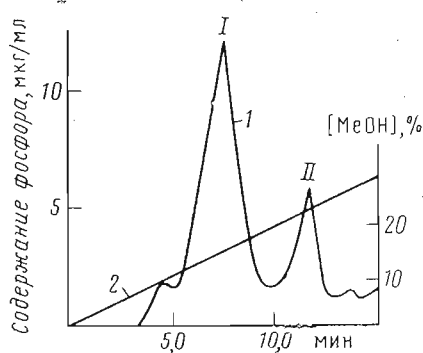
Качественный анализ состава реакционных масс после гидрогенолиза бензиловых эфиров (XVIII) и (XIX) с помощью хроматографии на бумаге в присутствии образца природного инозиттрифосфата показал наличие помимо целевых трифосфатов побочного фосфорсодержащего соединения.

Заключительный этап работы состоял в подборе метода и условий выделения целевых трифосфатов (XX) и (XXI) из смеси продуктов реакции гидрирования. Для этой цели были выполнены эксперименты по использованию ионообменной хроматографии на смоле Dowex-1 в разных режимах элюирования, а также с помощью анионообменной ВЭЖХ (адсорбент — Partisil 10SAX) изучены оптимальные условия разделения модельной системы из смеси нуклеотидов (AMP, ADP и ATP) с учетом известных данных о близких хроматографических свойствах ATP и инозиттрифосфата [19].

На основании результатов, полученных при модельном разделении нуклеотидов, выделение трифосфата (XX) из реакционной смеси проводили на обращенно-фазной колонке Versapak C₁₈ при градиентном элюировании метанолом в 0,1 М растворе формиата аммония (0—60%) при pH 5,7 (рисунок). В качестве вещества-стандарта при хроматографии использовали меченый 1,4,5-трифосфат *sn*-*мио*-[³H]инозита. При элюировании фракции анализировали на содержание фосфора и на радиоактивность, целевой хиральный трифосфат (XX) был выделен в виде аммониевой соли. Анализ фракций, соответствующих пику II на кривой 1 (рисунок), по ха-

* Отработка условий выделения хиральных трифосфатов (XX) и (XXI) проведена на соответствующем рацемическом производном.

Выделение трифосфата (XX) методом ВЭЖХ. Линейный градиент, метанол (0—60%) в 0,1 М формиате аммония за 30 мин. Колонка Varsapak C₁₈ (4,6 × 250 мм, Altech), детекция при 254 нм или по радиоактивности, расход элюента 1 мл/мин. 1 — содержание фосфора во фракциях, мкг/мл; 2 — концентрация метанола



рактистическому поглощению в УФ-спектре показал наличие соединения с бензильными группами, которое на основании данных ИК- и УФ-спектров и прямого сравнения с заведомым образцом 1(3),4(6),5-три-О-фосфо-3(1),6(4)-ди-О-бензил-*sp*-мио-инозита [20] было идентифицировано как дибензилтрифосфат (XVIII). Аналогично выделен второй энантиомер — 3,5,6-трифосфат *sp*-мио-инозита (XXI). Были предприняты попытки оптимизировать хроматографическое разделение для сокращения времени элюирования фосфатов путем применения более крутого градиента метанола (0—60%) в 0,1 М растворе формиата аммония в течение 15 мин или 0—90% за 30 мин, однако это не привело к увеличению эффективности разделения.

Строение выделенных трифосфатов (XX) и (XXI) подтверждено данными спектров ³¹P-ЯМР и углами оптического вращения, которые соответствовали литературным данным [21]. Идентичность синтезированных трифосфатов и образца природного трифосфата *мио*-инозита из мозга быка [22] показана методами ВЭЖХ, анионообменной и бумажной хроматографии. Трифосфат (XX) был испытан на проявление биологической активности путем введения в тромбоциты, обработанные сапонином. В результате отмечен выброс кальция из внутриклеточных кальциевых депо тромбоцитов, причем концентрация фосфата, при которой проявлялась его активность, соответствовала ранее полученным данным [23].

В последнее время опубликовано несколько работ по синтезу 1,4,5-трифосфата *sp*-мио-инозита [6], в сравнении с которыми предлагаемый нами путь синтеза отличается меньшим числом стадий, простотой получения исходных веществ, высоким выходом основных промежуточных соединений, использованием доступных ортоацетатов моносахаридов для оптического расщепления рацематов, новым подходом к препаративному выделению целевых трифосфатов.

В условиях изложенного подхода возможно препаративное получение производных *мио*-инозита с иным числом и расположением фосфатных групп в циклитном кольце. Очевидно, что, изменяя последовательность введения защитных групп на стадии получения асимметрично замещенных производных типа (II)—(VI), можно приготовить исходные соединения для последующего синтеза фосфатов модифицированной структуры. Одновременно необходимо отметить, что в химии полифосфатных производных *мио*-инозита остаются актуальные проблемы, связанные с дальнейшим поиском препаративных методов фосфорилирования вицинальных диольных систем и с разработкой эффективных подходов к расщеплению рацематов на энантиомеры.

Экспериментальная часть

ИК-спектры сняты на спектрофотометре Shimadzu IR-435 (Япония) в вазелиновом масле. УФ-спектры записаны на спектрофотометре Beckman DU-6 (США) для растворов в этаноле в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм. Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker WM-250: для ¹H-ЯМР — в дейтерохлороформе (внутренний стандарт — тетраметилсилан), для ³¹P-ЯМР — в дейтероводе (внутренний стандарт — 85%-

ная H_3PO_4). Кривые ДОВ и $[\alpha]^{20}$ измеряли на спектрополяриметрах Perkin — Elmer 241-МС (Швеция) и Jasco DIP-360 (Япония).

ТСХ проводили на пластинах Silufol UV-254 (Chemapol, Чехословакия) (вариант I) и Kieselgel 60F-254 HPTLC (Merck, ФРГ) (вариант II) в системах растворителей: хлороформ — этилацетат, 1 : 1 (А), бензол — ацетон, 7 : 3 (Б), хлороформ — ацетон — метанол, 17 : 2 : 2 (В). Хроматографию на бумаге выполняли на Ватмане № 1, обработанном формальдегидом в системах растворителей: *n*-пропанол — 25 % аммиак — вода, 5 : 4 : 1 (Г), этанол — бутанол — 25 % аммиак — вода, 36 : 30 : 10 : 24 (Д). При ТСХ по варианту I пятна веществ обнаруживали обугливанием при 400° С, по варианту II — опрыскиванием молибденовым синим с последующим прокаливанием при 300—350° С; при БХ пятна веществ обнаруживали по методу Соболева [24]. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 мкм (Chemapol) в системе хлороформ — ацетон, 20 : 1 (Е).

Аналитическую ВЭЖХ соединений (VIII), (IX) осуществляли на жидкостном хроматографе Liquochrome (Венгрия) с колонкой Lichrosorb SI-60 (4,6 × 250 мм, 7 мкм, Merck) в системе петролейный эфир — изопропанол, 7 : 1 (Ж) при скорости элюирования 2 мл/мин (детектирование при 270 нм). Аналитическую ВЭЖХ соединений (XX), (XXI) осуществляли на жидкостном хроматографе Du-Pont (США) с колонкой Partisil 10 SAX (4,6 × 250 мм, 10 мкм, Whatman) в линейном градиенте вода — 2,5 М формиат аммония (рН 4, муравьиная кислота) (З) при скорости элюирования 1 мл/мин (детектирование при 254 нм и по радиоактивности).

Препаративную ВЭЖХ соединений (VIII), (IX) осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ) с колонкой Zorbax SIL (21,2 × 250 мм, 10 мкм, Du-Pont) в системе петролейный эфир — изопропанол, 10 : 1 (И) при скорости элюирования 20 мл/мин (детектирование при 290 нм). Препаративную ВЭЖХ соединений (XX), (XXI) проводили на жидкостном хроматографе Gilson (США) с колонкой Versapack C₁₈ (4,6 × 250 мм, 5 мкм, Altech) в градиенте концентраций метанола 0 → 60 % в 0,1 М растворе формиата аммония (К) при скорости элюирования 1 мл/мин (детектирование при 254 нм).

Все синтезированные соединения имели удовлетворительные данные элементного анализа.

1(3), 4(6)-Ди-О-бензил-2,3(1) : 5,6(4)-ди-О,О-изопропилиден-*sn*-мио-инозит (II) (39 г, выход 95,1 %) синтезировали в условиях метода [9] из 24,3 г дицетала (I). Т. пл. 155—156° С.

1(3), 4(6)-Ди-О-бензил-2,3(1)-О-изопропилиден-*sn*-мио-инозит (III). К раствору 18 г соединения (II) в 220 мл ацетона при перемешивании добавляли раствор 1,3 г TsOH в 55 мл ацетона и 6 мл воды, реакциюную массу перемешивали 45 мин при 20° С, добавляли 1,8 мл триэтиламина, упаривали растворитель, добавляли 100 мл хлороформа, отфильтровывали 1(3),4(6)-ди-О-бензил-*sn*-мио-инозит (IV). Выход (IV) 1,1 г (10,0 %). Т. пл. 202—203° С (из метанола) ([10]: 201—203° С). Фильтрат пропускали через слой силикагеля, удаляли растворитель, остаток обрабатывали 100 мл четыреххлористого углерода, отфильтровывали 9,3 г (57,0 %) соединения (III), R_f 0,6 (I, Б), 0,5 (I, А). Т. пл. 163—164° С (из этилацетата) ([25]: т. пл. 161—163° С). ИК (ν , см⁻¹): 3400 (ОН), 1600, 1500 (C₆H₅), 1100 (C—O в C—O—C). УФ (этанол, λ_{max} , нм): 258.

1(3), 4(6)-Ди-О-бензил-2,3(1)-О-изопропилиден-5,6(4)-ди-О-(дианилидо)-фосфо-*sn*-мио-инозит (V). К охлажденному до -10° С раствору 4,4 г соединения (III) в 25 мл пиридина по каплям прибавляли при перемешивании раствор 42 г дианилидохлорфосфата, полученного по методу [26], т. пл. 170—171° С, в 140 мл пиридина перемешивали 2 сут при 20° С, добавляли 250 мл 5 % раствора ацетата калия и через 30 мин экстрагировали вещество хлороформом (3 × 100 мл); экстракт промывали 3 % HCl (9 × 100 мл) и водой до нейтральной реакции. Смесь веществ разделяли колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя соединение (V) системой Е. Выход 9,1 г (96,0 %). R_f 0,72 (II, Б). Т. пл. 110—111° С (из этано-

ла). ИК (ν , см^{-1}): 3145 (NH), 1605, 1500 (C_6H_5), 1240, 1220 ($\text{P}=\text{O}$), 1210, 1200, 1180, 1080, 1035 ($\text{P}-\text{O}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$ в $\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 810 ($\text{P}-\text{N}$). УФ (этанол, λ_{max} , нм): 275.

1(3), 4(6)-Ди-О-бензил-5,6(4)-ди-О-(дианилидо)фосфо-*sn*-мио-инозит (VI). Обработкой 7,6 г дибензильового производного (V) в условиях метода [18] получали 3,7 г (51,2%) соединения (VI). Т. пл. 183—184° С (из этанола) ([18]: 182—183° С).

Перезэтерификация 3,4,6-три-О-ацетил-1,2-О-этилортоацетил- β -D-маннопиранозы (VII) 1(3),4(6)-ди-О-бензил-5,6(4)-ди-О-(дианилидо)фосфо-*sn*-мио-инозитом (VI). Раствор 0,67 г дифосфата (VI) и 0,615 г ортоацетата (VII) [13] в 15 мл сухого дихлорэтана кипятили 10 мин в аппарате Сокслета, поместив в его экстракционную часть 5 г молекулярных сит 4 Å, затем в реакционную массу вносили 6,1 мг TsOH и продолжали кипятить в течение 7,5 ч; по окончании реакции добавляли 1 мл пиридина, фильтровали реакционную массу через оксид алюминия, отгоняли дихлорэтан, получали смесь веществ, состоящую из исходных ортоацетата D-маннозы (VII), R_f 0,88, и дибензилдифосфата (VI), R_f 0,28, диастереомеров (VIII) и (IX), R_f 0,68 и 0,71 (II, В). Препаративной ВЭЖХ выделяли исходные соединения (VI) и (VII), R_t 7,3 и 18,0 мин соответственно, и два хроматографически гомогенных диастереомера (VIII и IX), R_t 46,7 и 61,6 мин.

Выход диастереомера (VIII) 210 мг (23,2%). R_f 0,68 (II, В), т. пл. 192—193° С (из эфира). $[\alpha]_{539}^{20} + 27,0^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20} + 36,2^\circ$, $[\alpha]_{435}^{20} + 64,1^\circ$, $[\alpha]_{407}^{20} + 79,3^\circ$, $[\alpha]_{366}^{20} + 114,0^\circ$, $[\alpha]_{334}^{20} + 174,2^\circ$, $[\alpha]_{312}^{20} + 257,0^\circ$ (с 1,65, хлороформ). ИК (ν , см^{-1}): 3246 (ОН), 3200, 1534 (NH), 1597, 1500 (C_6H_5), 2700, 1200 ($\text{P}=\text{O}$), 1040, 1020, 1000 ($\text{C}-\text{O}$ в $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, $\text{C}-\text{OH}$, $\text{P}-\text{O}-\text{C}$), 830 ($\text{P}-\text{N}$). УФ (этанол, λ_{max} , нм): 275. ^1H -ЯМР (дейтерохлороформ, δ , м. д.): 1,74с ($\text{C}-\text{CH}_3$), 2,00с (3 CH_3CO). R_t 46,7 мин (II).

Выход диастереомера (IX) 207 мг (22,9%), R_f 0,71 (II, В). Т. пл. 201—202° С (из эфира). $[\alpha]_{539}^{20} - 21,1^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20} - 23,8^\circ$, $[\alpha]_{435}^{20} - 51,6^\circ$, $[\alpha]_{407}^{20} - 66,6^\circ$, $[\alpha]_{366}^{20} - 104,0^\circ$, $[\alpha]_{334}^{20} - 168,0^\circ$, $[\alpha]_{312}^{20} - 275,1^\circ$, (с 1,63, хлороформ). ИК (ν , см^{-1}): 3250 (ОН), 3195 (NH), 1600, 1500 (C_6H_5), 2690, 1200 ($\text{P}=\text{O}$), 1040, 1015, 1000 ($\text{C}-\text{O}$ в $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, $\text{C}-\text{OH}$, $\text{P}-\text{O}-\text{C}$). УФ (этанол, λ_{max} , нм): 275. ^1H -ЯМР (дейтерохлороформ, δ , м. д.): 1,75с ($\text{C}-\text{CH}_3$), 1,94с (CH_3CO), 2,06с (2 CH_3CO). R_t 61,6 мин (II).

3,6-Ди-О-бензил-4,5-ди-О-(дианилидо)фосфо-*sn*-мио-инозит (X). 0,38 г ортоэфира (VIII) обрабатывали 90 мл 0,1 н. серной кислоты в 90% водном ацетоне 1 ч при 18—20° С, смесь перемешивали 10 мин со смолой Amberlite IRA-400 (ОН-форма) до нейтральной реакции, фильтровали смолу на фильтре, промывали 20 мл хлороформа, 20 мл ацетона, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 30 мл хлороформа, сушили сульфатом натрия, упаривали, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле в системе (Е). Выход соединения (X) 0,23 г (82,0%). R_f 0,28 (II, В). Т. пл. 182—183° С (из этанола). $[\alpha]_{539}^{20} + 35,1^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20} + 44,0^\circ$, $[\alpha]_{407}^{20} + 104,1^\circ$, $[\alpha]_{366}^{20} + 155,2^\circ$, $[\alpha]_{334}^{20} + 239,5^\circ$, $[\alpha]_{312}^{20} + 372,0^\circ$ (с 2,3, хлороформ). ИК (ν , см^{-1}): 3300 (ОН), 3200 (NH), 1600, 1500 (C_6H_5), 1240, 1220 ($\text{P}=\text{O}$), 1280, 1210, 1200 ($\text{C}-\text{O}$ в $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, $\text{P}-\text{O}-\text{C}$), 810 ($\text{P}-\text{N}$). УФ (этанол, λ_{max} , нм): 275.

1,4-Ди-О-бензил-5,6-ди-О-(дианилидо)фосфо-*sn*-мио-инозит (XI) получали в условиях, описанных для вещества (X), исходя из 381 мг ортоэфира (IX). Выход 0,23 г (81,5%). Т. пл. 181° С (из этанола). $[\alpha]_{539}^{20} - 34,1^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20} - 44,2^\circ$, $[\alpha]_{407}^{20} - 106,0^\circ$, $[\alpha]_{366}^{20} - 154,3^\circ$, $[\alpha]_{334}^{20} - 239,0^\circ$, $[\alpha]_{312}^{20} - 380,1^\circ$ (с 2,3, хлороформ). ИК- и УФ-спектры аналогичны указанным для соединения (X).

Циклогексиламмониевая соль 4,5-ди-О-фосфо-*sn*-мио-инозита (XIV). К раствору 0,1 г дифосфата (X) в 10 мл смеси пиридин — уксусная кислота (1 : 1) добавляли 1 мл изоамилнитрита, перемешивали 3 ч при 18° С, реакционную массу упаривали с пиридином при температуре не более 20° С, остаток растворяли в смеси 6 мл этанола и 1,5 мл воды, гидрирова-

ли в присутствии 0,01 г палладиевой черни при комнатной температуре, через 24 ч катализатор отделяли, промывали водой, фильтрат концентрировали при температуре не выше 20° С, добавляли циклогексиламин до pH 9, ацетоном осаждали дифосфат (XIV). Выход 7,4 мг (6,2%). R_f 0,33 (Г). Т. пл. 138—139° С, $[\alpha]_{589}^{20} -15,3^\circ$ (с 0,74, вода). [17]: т. пл. 138—140° С, $[\alpha]_{589}^{20} -15,4^\circ$ (с 0,58, вода).

Циклогексиламмониевая соль 5,6-ди-О-фосфо-сп-мио-инозита (XV). К раствору 0,13 г дифосфата (XI) в 12 мл смеси пиридин — уксусная кислота (1 : 1) добавляли 1 мл изоамилнитрита, обработкой, как описано для соединения (XIV), получали вещество (XV). Выход 0,01 г (6,7%). R_f 0,33 (Г). Т. пл. 142—143° С, $[\alpha]_{589}^{20} +14,4^\circ$ (с 0,1, вода). [17]: т. пл. 140—142° С, $[\alpha]_{589}^{20} +14,8^\circ$ (с 0,5, вода).

1,4,5-Три-О-(дианилидо)фосфо-3,6-ди-О-бензил-сп-мио-инозит (XVI). Взаимодействием 0,22 г соединения (X) в 10 мл пиридина и 0,36 г дианилидо-хлорфосфата в 2 мл пиридина в условиях синтеза производного (V) получали соединение (XVI). Выход 85 мг (44,3%, в расчете на прореагировавший дифосфат (X)). R_f 0,74 (II, В). Т. пл. 230—231° С (из этанола), $[\alpha]_{539}^{20} +16,2^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20} +20,8^\circ$, $[\alpha]_{435}^{20} +41,6^\circ$, $[\alpha]_{407}^{20} +52,7^\circ$, $[\alpha]_{566}^{20} +84,0^\circ$, $[\alpha]_{334}^{20} +134,5^\circ$ (с 3,5, хлороформ). ИК (в, см⁻¹): 3300 (ОН), 3200 (NH), 1610, 1510 (C₆H₅), 1275, 1225, 1120 (C—O в C—O—C, P—O—C), 1190 (P=O), 940, 880 (P—N). УФ (этанол, $\lambda_{\max}$, нм): 275.

1,4-Ди-О-бензил-3,5,6-три-О-(дианилидо)фосфо-сп-мио-инозит (XVII) получали из 0,22 г дифосфата (XI) в условиях синтеза производного (XVI). Выход 84,6 мг (44,1%, в расчете на прореагировавший дифосфат (XI)). R_f 0,74 (II, В). Т. пл. 229° С (из этанола), $[\alpha]_{539}^{20} -17,9^\circ$, $[\alpha]_{546}^{20} -21,8^\circ$, $[\alpha]_{407}^{20} -53,1^\circ$, $[\alpha]_{334}^{20} -85,3^\circ$, $[\alpha]_{334}^{20} -141,0^\circ$ (с 3,35, хлороформ). ИК- и УФ-спектры аналогичны спектрам соединения (XVI).

Аммониевая соль 1,4,5-трифосфата-сп-мио-инозита (XX). Обработкой 68 мг соединения (XVI) в условиях синтеза производного (XIV) получали трифосфат (XX). Продукты реакции разделяли препаративной ВЭЖХ. Для определения времени выхода целевого фосфата (XX) использовали меченый 1,4,5-трифосфат мио-[³H]инозита (Amersham). Фракции анализировали на содержание фосфора и радиоактивность. Радиоактивность фракций измеряли методом жидкостной сцинтилляционной спектрометрии в тритонсодержащем толуольном сцинтилляторе. При анализе фракций на содержание фосфора использовали модифицированный микрометод Бартлетта [28]. Выход соединения (XX) 7,5 мг (22,1%). R_f 0,30 (Д). $[\alpha]_{539}^{23} -28,0^\circ$ (с 0,37, вода, pH 10). [21]: $[\alpha]_{539}^{20} -27,4^\circ$ (вода, pH 9,5). ³¹P-ЯМР (дейтериевогода, δ , м. д.): 3,38д, 5,09д, 5,18д (pD 10). [27]: 3,38д, 5,11д, 5,21д (pD12). R_t 37,54 (3), $7,5 \pm 0,5$ мин (К).

Аммониевая соль 3,5,6-трифосфата-сп-мио-инозита (XXI). Энантиомер (XXI) получен в условиях, описанных для синтеза (XX), исходя из 0,07 г соединения (XVII). Выход (XXI) 7,9 мг (20,8%). $[\alpha]_{589}^{20} +30,0^\circ$ (с 0,29, вода, pH 10). Хроматографические и спектральные характеристики трифосфата (XXI) совпадают с данными, приведенными для энантиомера (XX).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сибриков Ю. И., Степанов А. Е., Швец В. И. // Журн. орган. химии. 1990. Т. 26. В. 5. С. 1043—1049.
2. Klyashchitskii B. A., Shvets V. I., Preobrazhenskii N. A. // Chem. Phys. Lipids. 1969. V. 3. № 4. P. 394—400.
3. Швец В. И., Евстигнеева Р. И. // Журн. орган. химии. 1972. Т. 8. В. 7. С. 1550—1552.
4. Biochem. J. 1989. V. 258. P. 1—2.
5. Berrige M. J. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1986. V. 367. № 6. P. 447—456.
6. Billington D. C. // Chem. Soc. Rev. 1989. V. 18. P. 83—122.
7. Степанов А. Е., Рунова О. Б., Крылова В. Н., Бочков В. Н., Швец В. И. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 850—852.
8. Stepanov A. E., Runova O. B., Schlewer G., Spiess B., Shvets V. I. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 38. P. 5125—5128.

9. Gigg J., Gigg R., Payne S., Conant R. // Carbohydr. Res. 1985. V. 142. № 1. P. 132—134.
10. Gigg J., Gigg R., Payne S., Conant R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1. 1987. № 2. P. 423—429.
11. Швец В. И., Степанов А. Е., Крылова В. Н., Гулак П. В. мио-Инозит и фосфоинозитиды. М.: Наука, 1987. 248 С.
12. Крылова В. Н., Горнаева Н. П., Олейник Г. Ф., Швец В. И. // Журн. орган. химии. 1980. Т. 16. В. 2. С. 315—322.
13. Shvets V. I., Klyashchitskii B. A., Stepanov A. E., Evstigneeva R. P. // Tetrahedron. 1973. V. 29. № 2. P. 331—340.
14. Stepanov A. E., Shvets V. I. // Chem. Phys. Lipids. 1979. V. 25. № 3. P. 247—264.
15. Ozaki S., Kohno M., Nakahira H., Bunya M., Watanabe Y. // Chem. Lett. 1988. P. 77.
16. Liu Y.-C., Chen C.-S. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 13. P. 1617—1620.
17. Крылова В. Н., Кобелькова Н. И., Олейник Г. Ф., Швец В. И. // Журн. орган. химии. 1980. Т. 16. В. 1. С. 62—68.
18. Крылова В. Н., Горнаева Н. П., Олейник Г. Ф., Швец В. И. // Журн. орган. химии. 1980. Т. 16. В. 2. С. 315—322.
19. Dean N. M., Moyer J. D. // Biochem. J. 1987. V. 242. № 2. P. 361—366.
20. Степанов А. Е., Рунова О. Б., Крылова В. Н., Швец В. И. // Журн. орган. химии. 1988. Т. 24. В. 6. С. 1342—1343.
21. Tomlinson R. V., Ballou C. E. // J. Biol. Chem. 1964. V. 236. № 7. P. 1902—1906.
22. Шрагин А. С., Парнова Р. Г., Селищева А. А., Берман А. Л., Кляцицкий Б. А., Швец В. И. // Укр. биохим. журн. 1988. Т. 60. № 2. С. 72—77.
23. Adinolfi S. E., Dean W. L. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 128. P. 106—111.
24. Соболев А. М. // Физиол. растений. 1964. Т. 11. № 1. С. 106—111.
25. Лютик А. И., Крылова В. Н., Козлова С. П., Кляцицкий Б. А., Швец В. И., Евстигнеева Р. П., Жданович Е. С. // Журн. общей химии. 1971. Т. 41. № 12. С. 2747—2753.
26. Houben-Weyl. Methoden der organischen Chemie. Stuttgart: Georg Time Verlag, 1964. V. 12/2. S. 173.
27. Cooke A. M., Potter B. V. L., Gigg R. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 20. P. 2305—2308.
28. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. С. 79—80.

Поступила в редакцию
19.XII.1989

После доработки
21.II.1990

A. E. STEPANOV, O. B. RUNOVA, V. N. KRYLOVA, V. I. SHVETS,
V. N. BOCHKOV†, G. SCHLEWER**, B. SPIESS**

STUDIES OF ASYMMETRICALLY SUBSTITUTED DERIVATIVES OF *myo*-INOSITOL. XXXV. TOTAL SYNTHESIS OF *sn-myo*-INOSITOL-1, 4, 5-TRISPHOSPHATE

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow, 117571;

** All-Union Cardiology Research Centre, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow;*

*** Centre de Neurochimie du CNRS et Faculté de Pharmacie, Université
Louis Pasteur de Strasbourg, France*

sn-myo-Inositol-1,4,5-trisphosphate and its enantiomer, *sn-myo*-inositol-3,5,6-trisphosphate, were prepared by successive protection-deprotection of racemic *myo*-inositol hydroxy groups, separation of asymmetrically substituted *myo*-inositols into enantiomers through formation of *D*-mannose orthoester diastereoisomeric derivatives and selective phosphorylations.