



УДК 547.914.4'118.057

СИНТЕЗ ДОЛИХИЛФТОРФОСФАТА

© 2003 г. О. В. Сизова, С. Д. Мальцев, В. Н. Шibaев[#]

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,

119991, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 26.07.2002 г. Принята к печати 16.08.2002 г.

Разработан улучшенный метод синтеза долихил-*H*-фосфоната с использованием в качестве реагента салицилхлорфосфита (2-хлор-4*H*-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-она). Осуществлен первый синтез долихилфторфосфата из долихил-*H*-фосфоната путем его триметилсилилирования, окисления под действием йода и взаимодействия с фторид-ионом в пиридине.

Ключевые слова: долихол; долихил-*H*-фосфонат; долихилфторфосфат.

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорилированные производные долихолов, промежуточные соединения при биосинтезе гликопротеинов, играют важную роль в ряде биологических процессов [1, 2]. Долихилфосфат участвует в биосинтезе углеводных цепей гликопротеинов и обладает явно выраженными мембранотропными свойствами, проявляя разнообразную биологическую активность. Молекулярные механизмы взаимодействия долихилфосфата с компонентами биологических мембран и ферментами пока слабо изучены.

В течение ряда лет в нашей лаборатории разрабатываются различные подходы к синтезу производных долихил- и полипренилфосфатов [3, 4] и их аналогов с модифицированной анионной группой. Ранее были получены долихил-*H*-фосфонат [5], долихилтиофосфат [5] и долихилсульфат [6]. В данной работе мы сообщаем об улучшенном синтезе долихил-*H*-фосфоната и получении нового аналога указанного ряда – долихилфторфосфата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе был использован (\pm)-долихол (I), полученный из полипренолов хвой ели [7] по методу [8] (соотношение олигомергомологов с $n = 15, 16, 17$ и 18 равно $1 : 4 : 3 : 2$). Долихил-*H*-фосфонат (II) был использован в качестве исходного вещества для синтеза долихилфторфосфата (III). Соединение (II) было получено в результате реакции долихола с салицилхлорфосфитом (2-хлор-4*H*-1,3,2-бензодиоксафосфорин-4-оном) в присутствии пиридина (схема). Этот реагент был ранее использован для синтеза ряда моноэфиров *H*-фосфонатов [9], в частности, для

фосфитилирования короткоцепных пренолов с последующим превращением полученных *H*-фосфонатов в фосфодиэфиры [10]. В нашем случае в сходных условиях реакция получения долихил-*H*-фосфоната проходила за 16 ч при 20°C. После омыления промежуточного продукта действием избытка смеси пиридин–вода, неорганические фосфаты удаляли экстракцией в равновесной системе бутанол–вода. Долихил-*H*-фосфонат был выделен после ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе в виде однородной при ТСХ аммониевой соли с выходом 93%. Ацетат аммония и салициловую кислоту удаляли осаждением из холодного гептанового раствора продукта. Следует отметить, что салицилхлорфосфит в качестве фосфорилирующего агента для получения соединения (II) гораздо эффективнее применявшегося ранее триимидазолилфосфита, при использовании которого выход *H*-фосфоната не превышал 50% [5].

В литературе описано несколько методов получения моноэфиров фторфосфорной кислоты – производных нуклеозидов и углеводов [11]. Мы выбрали для получения долихилфторфосфата (III) метод, основанный на превращении моноэфиров *H*-фосфонатов в соответствующие бис(триметилсилил)фосфиты и окисление последних действием йода в присутствии фторид-иона [12]. До сих пор этот метод использовался лишь для получения нуклеозидфторфосфатов.

Было показано, что оптимальными условиями получения долихилфторфосфата (III) исходя из долихил-*H*-фосфоната является использование ~20-кратного мольного избытка триметилсилилхлорида, ~15-кратного избытка йода и ~5-кратного избытка триэтиламмонийтригидрофторида. Реакция завершается за 30 мин при комнатной температуре (~20°C). После обработки реакционной смеси раствором тиосульфата на-

[#] Автор для переписки (факс: (095) 135-53-28; тел.: (095) 137-75-70; эл. почта: shiba@ioc.ac.ru).

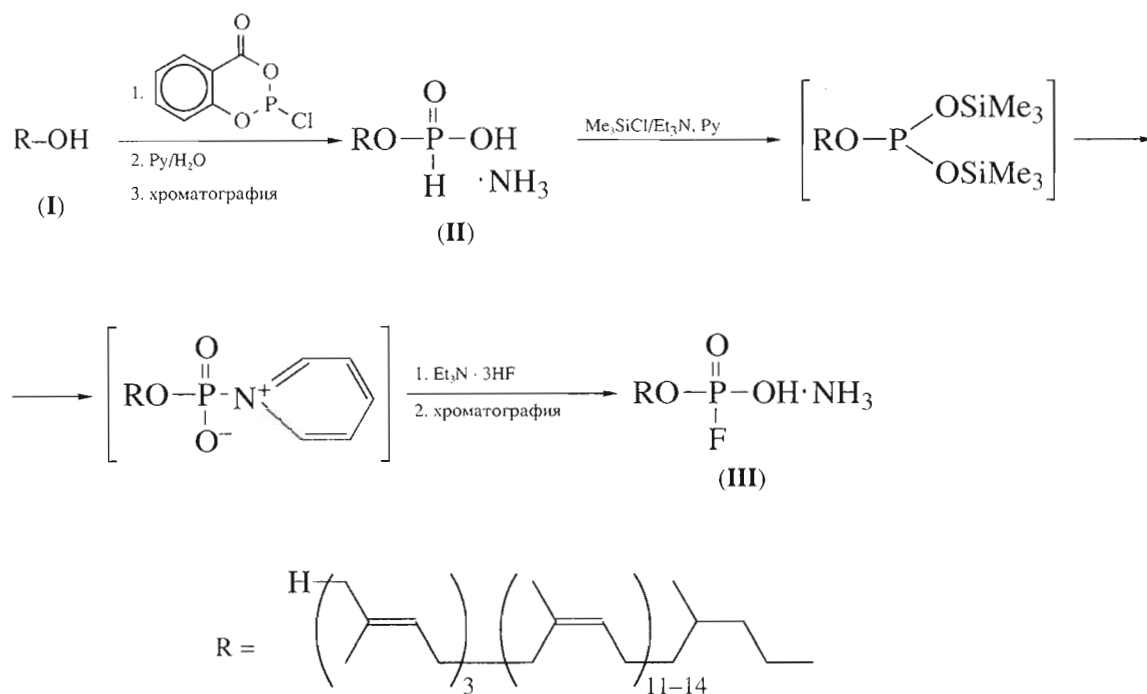


Схема.

трия и насыщенным раствором NaCl органические растворители удаляли упариванием. Целевой долихилфторфосфат был выделен в виде аммониевой соли после ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе с выходом 72%, продукт был однороден при ТСХ.

Структуру полученных производных подтверждали данными спектроскопии ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{31}P . Сигналы в ^1H -ЯМР-спектрах соединений (II) и (III) практически соответствуют сигналам углеводородного радикала в спектре долихилфосфата (I) [3]. Для долихил-*H*-фосфоната в ^1H -ЯМР-спектре наблюдается характерный сигнал $\underline{\text{H}}$ -P при 6.74 м.д. ($J_{\text{H,P}}$ 649 Гц).

Спектры ^{13}C -ЯМР долихил-*H*-фосфоната и долихилфторфосфата практически совпадают со спектром долихилфосфата [3, 6].

Наиболее информативными для модифицированных по фосфатной группе соединений являются ^{31}P -ЯМР-спектры, в которых проявляются сигналы с большими значениями константы спин-спинового взаимодействия. В ^{31}P -ЯМР-спектре долихил-*H*-фосфоната (II) наблюдали дублет при 5.29 м.д. с $J_{\text{H,P}}$ 649 Гц, что характерно для моноэфиров *H*-фосфонатов. В ^{31}P -ЯМР-спектре соединения (III) присутствует сигнал при -7.85 м.д. ($J_{\text{P,F}}$ 931 Гц).

Таким образом, в настоящей работе предложен новый эффективный метод синтеза долихил-

H-фосфоната и разработан метод синтеза еще одного фосфорилированного производного – долихилфторфосфата. Проведенное ранее изучение свойств долихил-*H*-фосфоната в качестве субстрата для гликозилтрансфераз из микросом печени и мозга крыс показало [13], что это производное может служить акцептором гликозильных остатков в реакциях гликозилирования. Исследование поведения долихилфторфосфата в аналогичных реакциях гликозилирования представляет значительный интерес.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР снимали на приборе Bruker AMD-500 (500 МГц по ^1H ; 125.7 МГц по ^{13}C и 202.5 МГц по ^{31}P) и AC-200 (200 МГц по ^1H ; 50.3 МГц по ^{13}C и 81 МГц по ^{31}P). Величины химических сдвигов приведены в миллионных долях, относительно Me_4Si , константы спин-спинового взаимодействия (J) – в герцах. ТСХ проводили на пластинках (5 × 2 см) с закрепленным слоем силикагеля (Silica Gel 60, Merk, ФРГ) в системе хлороформ–метанол–вода, 60 : 25 : 4. Непредельные соединения обнаруживали в парах J_2 с последующей обработкой 50% водным раствором H_2SO_4 и прокаливанием. Диоксан, бензол и толуол абсолютизировали перегонкой над LiAlH_4 . Хлороформ очищали пропусканием через колонку с Al_2O_3 .

Долихил-*H*-фосфонат, аммониевая соль. К раствору 205 мг (~0.174 ммоль) долихола в 2.1 мл диоксана добавляли 0.19 мл диизопропилэтиламина. Реакционную смесь охлаждали в жидком азоте, добавляли раствор 282 мг (1.39 ммоль) салицилхлорфосфита [14] в 0.45 мл абс. диоксана. После нагревания смеси до 20°C в течение 30 мин реакцию смесь выдерживали 16 ч при 20°C. К смеси добавляли 1.2 мл смеси пиридин–вода (5 : 1) и через 1 ч при 20°C разбавляли 4 мл верхней фазы равновесной системы бутанол–вода. Промывали нижней фазой той же системы (3 × 1 мл). К органической фазе добавляли по 2 мл толуола и метанола, упаривали раствор до объема 2 мл, добавляли еще 4 мл толуола и раствор упаривали. К остатку добавляли 5 мл гептана и смесь выдерживали 8 ч при 4°C. Выпавший осадок отделяли фильтрацией, а полученный раствор разбавляли до 150 мл смесью хлороформ–метанол (2 : 1) и наносили на колонку (1 × 10 см) с DEAE-целлюлозой (DE-52, AcO⁻-форма, Whatman, Англия). Колонку промывали 60 мл той же смеси и элюировали 200 мл 10 мМ раствора ацетата аммония в той же смеси растворителей. Элюат упаривали до 1 мл, добавляли 2 мл метанола и 20 мл толуола, упаривали до 5 мл, добавляли еще 20 мл толуола и упаривали досуха. К остатку добавляли 4 мл гептана и смесь выдерживали 18 ч при 4°C. После отделения выпавшего осадка фильтрат выдерживали еще 48 ч при 4°C и после отделения выпавшего осадка упаривали досуха. Получили 206.0 мг долихил-*H*-фосфоната (выход 93%), R_f 0.63. Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 6.74 (1 H, д, H-P, $J_{H,P}$ 649), 5.12 (16 H, м, CH=), 3.92 (2 H, м, CH₂OP), 2.03 (60 H, м, -CH₂-C=), 1.69 (42 H, с, CH₃C=, *Z*-звено + *W*-цис), 1.62 (3 H, с, CH₃C = C, *W*-транс), 1.61 (6 H, с, CH₃C = C, *E*-звено), 1.56–1.47 (1 H, уш. м, CH₂-CH-CH₂, *S*-звено), 1.39–1.15 (4 H, уш. м, CH₂-CH-CH₂), 0.90 (3 H, д, CH₃-C3, J 6.7). Спектр ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 135.2 (CH₃C=, *Z*-звено), 134.9 (CH₃C=, *E*-звено), 125.1 (CH=, *Z*-звено), 124.3 (CH=, *E*-звено), 63.2 (C1), 39.7 (CH₂C(CH₃)=, *E*-звено), 37.7 (C2), 37.6 (C4), 32.2 (CH₂C(CH₃)=, *Z*-звено), 29.1 (C3), 26.7 (CH₂CH=, *E*-звено), 26.4 (CH₂CH=, *Z*-звено), 25.2 (C5), 23.4 (CH₃C=, *Z*-звено), 22.5 (CH₃-C3), 18.8 (CH₃C=, *W*-звено), 15.7 (CH₃C=, *E*-звено). Спектр ³¹P-ЯМР (CDCl₃): +5.29 ($J_{H,P}$ 649).

Долихилфторфосфат, аммониевая соль. К раствору долихил-*H*-фосфоната (27.4 мкмоль) в 0.6 мл смеси пиридин–бензол (2 : 1) добавляли 0.07 мл триэтиламина (50.8 мг, 0.9 ммоль) и через 15 мин при 20°C (под аргоном) раствор обрабатывали 0.06 мл триметилсилхлорида (51.4 мг, 0.6 ммоль) и 11.4 мг йода (45 мкмоль) в 0.09 мл той же смеси растворителей. Смесь выдерживали при 20°C в течение 15 мин. После этого к реакционной смеси добавляли 0.024 мл триэтиламмонийтригидрофторида (23.7 мг, 0.15 ммоль).

Через 15 мин при комнатной температуре реакционную смесь разбавляли 8 мл хлороформа и промывали 1 М раствором тиосульфата натрия (5 × 1 мл). Далее органический слой промывали насыщенным раствором хлорида натрия (10 × 1 мл), каждый раз центрифугируя смесь (2 мин, 5000 об/мин) для четкого разделения фаз. Органическую фазу упаривали досуха, к остатку добавляли 4 мл гептана и оставляли смесь на 18 ч при 4°C. Фильтрат разбавляли до 120 мл смесью хлороформ–метанол (2 : 1, с добавлением 2% воды) и наносили на DEAE-целлюлозу. Продукт выделяли анионообменной хроматографией как описано выше. Получили 28.3 мг долихилфторфосфата (выход 72%), R_f 0.87. Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃-CD₃OD, 6 : 1): 5.04 (16 H, м, CH=), 3.93 (2 H, м, CH₂OP), 1.97 (60 H, м, -CH₂-C=), 1.60 (42 H, с, CH₃C=, *Z*-звено + *W*-цис), 1.52 (9 H, с, CH₃C = C, *E*-звено + *W*-транс), 1.55–1.48 (1 H, уш. м, CH₂-CH-CH₂, *S*-звено), 1.40–1.05 (4 H, уш. м, CH₂-CH-CH₂), 0.83 (3 H, д, J 6.7, CH₃-C3). Спектр ¹³C-ЯМР (CDCl₃-CD₃OD, 6 : 1): 135.0 (CH₃C=, *Z*-звено), 134.7 (CH₃C=, *E*-звено), 124.8 (CH=, *E*-звено), 124.0 (CH=, *Z*-звено), 65.1 (C1), 39.5 (CH₂C(CH₃)=, *E*-звено), 37.2 (C2 и C4), 32.0 (CH₂C(CH₃)=, *Z*-звено), 28.9 (C3), 26.5 (CH₂CH=, *E*-звено), 26.2 (CH₂CH=, *Z*-звено), 25.0 (C5), 23.2 (CH₃C=, *Z*-звено), 22.4 (CH₃-C3), 18.8 (CH₃C=, *W*-звено), 15.7 (CH₃C=, *E*-звено). Спектр ³¹P-ЯМР (CDCl₃-CD₃OD, 6 : 1): -7.85 ($J_{P,F}$ 931).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны д.х.н. В.В. Веселовскому (ИОХ РАН) за предоставление препаратов полипренолов, д.х.н. А.С. Шашкову и к.х.н. Л.О. Кононову (ИОХ РАН) за съемку спектров ЯМР.

Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ (проект № 00-03-32799а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krag S.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 243. P. 1–5.
2. Schenk B., Fernandez F., Waechter C.J. // Glycobiology. 2001. V. 11. P. 61R–70R.
3. Danilov L.L., Shibaev V.N. // Studies in Natural Products Chemistry / Ed. Atta-ur-Rahman. Amsterdam; Oxford; New York; Tokyo: Elsevier, 1991. V. 8. P. 63–114.
4. Shibaev V.N., Danilov L.L. // Glycopeptides and Related Compounds / Eds D.C. Large, C.D. Warren. New York; Basel; Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1997. P. 427–504.
5. Данилов Л.Л., Мальцев С.Д., Шибяев В.Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1292–1293.
6. Мальцев С.Д., Сизова О.В., Данилов Л.Л., Шибяев В.Н. // Биоорган. химия. 2001. Т. 27. С. 449–452.

7. *Ibata K., Mizuno M., Tanaka Y., Kageyu A.* // *Phytochemistry*. 1984. V. 23. P. 783–786.
8. *Веселовский В.В.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 1999. № 5. С. 1909–1911.
9. *Замятина А.Ю., Бушнев А.С., Швец В.И.* // *Биоорган. химия*. 1994. Т. 20. С. 1253–1295.
10. *Birault V., Pozzi G., Plobeck N., Eifler S., Schmutz M., Palanche T., Raya J., Brisson A., Nakatani Y., Ourisson G.* // *Chem. Eur. J.* 1996. V. 2. P. 789–799.
11. *Bollmark M., Stawinski J.* // *Nucleosides Nucleotides*. 1998. V. 17. P. 663–680.
12. *Bollmark M., Stawinski J.* // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 5739–5742.
13. *Sizova O.V., Maltsev S.D., Shibaev V.N., Jankowski W.J., Choinacki T.* // *Acta Biochim. Polon.* 1998. V. 45. P. 1021–1030.
14. *Young R.W.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1952. V. 74. P. 1672–1675.

A Synthesis of Dolichyl Phosphorofluoridate

O. V. Sizova, S. D. Mal'tsev, and V. N. Shibaev[#]

[#] *Phone: +7 (095) 137-7570; fax: +7 (095) 135-5328; e-mail: shiba@ioc.ac.ru*

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 119991 Russia

An improved method for the synthesis of dolichyl *H*-phosphonate was developed using 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (salicyl chlorophosphate) as a reagent. Dolichyl phosphorofluoridate was for the first time synthesized from dolichyl *H*-phosphonate by its treatment with chlorotrimethylsilane, oxidation with iodine, and subsequent interaction with fluoride ion in pyridine. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: dolichyl H-phosphonate, dolichyl phosphorofluoridate, dolichol