



УДК 547.455.624'118'857.7.07:577.152.32

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНА  
САЛМОНЕЛЛ6\*. СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДСАХАРОВ С АКТИВАЦИЕЙ ГЛИКОЗИЛФОСФАТА.  
АНАЛОГИ ГУАНОЗИНДИФОСФАТМАННОЗЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ  
ПО ПОЛОЖЕНИЮ 6 ПУРИНОВОГО ЯДРА

Шибасв В. Н., Елисева Г. И.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

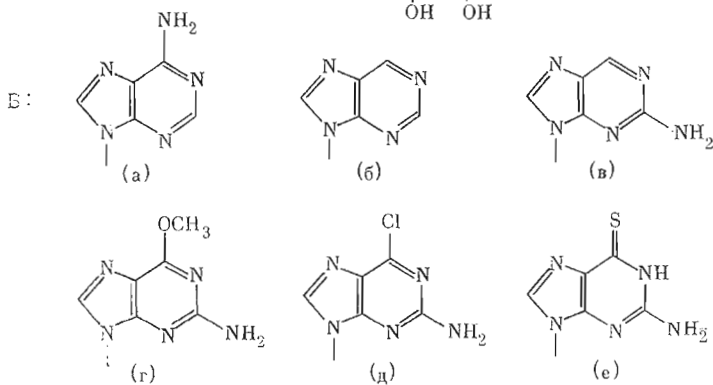
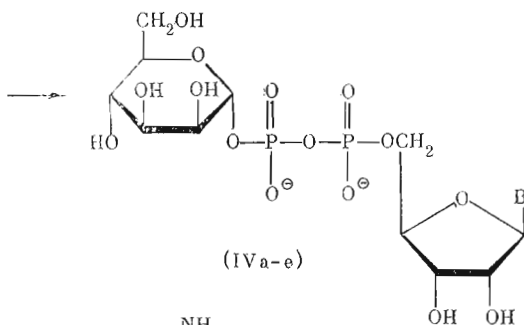
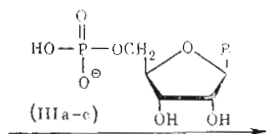
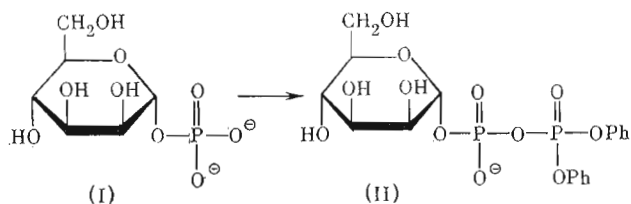
Взаимодействие  $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфата с дифенилхлорфосфатом приводит к соответствующему дифенилпирофосфатному производному, из которого реакцией с нуклеозид-5'-фосфатами получены нуклеозид-5'-( $\alpha$ -D-маннопиранозил)дифосфаты. Метод применен для получения аналогов гуанозиндифосфатманнозы — производных аденина, пурина, 2-аминопурина, 2-амино-6-метоксипурина, 2-амино-6-хлорпурина и 2-амино-6-меркаптопурина, необходимых для исследования специфичности маннозилтрансфераз салмонелл.

Гуанозиндифосфатманноза (GDP-Man) — обычный донор маннозильных остатков при биосинтезе углеводных цепей углеводсодержащих биополимеров, в частности O-специфических полисахаридов салмонелл. Ранее в рамках программы исследования специфичности ферментов биосинтеза этих полимеров нами был осуществлен синтез первых аналогов GDP-Man с модифицированным остатком гуанозина [2]. В настоящем сообщении мы описываем получение новой группы соединений этого ряда, в число которых входят 5'-( $\alpha$ -D-маннозил)дифосфаты аденозина (IVa), пуринрибозида (IVб) и аналогов гуанозина, отличающихся от природного соединения заместителем при C6-атоме пуринового ядра (IVв—е).

Обычно синтезы нуклеозиддифосфатсахаров основаны на взаимодействии активированных производных нуклеотидов с гликозилфосфатами (см. обзор [3]). Обратный порядок активации реагентов, по-видимому, невозможен при использовании гликозилфосфатов, способных к образованию 1,2-циклофосфатов, так как эта внутримолекулярная реакция должна стать преобладающей в условиях, обычно применяемых для синтеза пирофосфатов. Так, попытки получения нуклеозиддифосфатсахаров из  $\beta$ -D-глюкопиранозилфосфамида [4] были неудачными. Между тем активация сахарного компонента кажется более удобной при получении ряда аналогов нуклеозиддифосфатсахаров с модифицированным остатком нуклеозида. В этом случае отпадает необходимость специального подбора условий активации фосфатной группы нуклеотида с учетом возможного протекания реакции по гетероциклическому ядру. В случае производных  $\alpha$ -D-маннопиранозы образование 1,2-циклофосфата стерически невозможно, и мы исследовали применение подхода с активацией гликозилфосфата для получения аналогов GDP-Man (см. схему).

Первоначально этот путь был проверен на примере синтеза соединения (IVa), полученного ранее через активированные производные аденозин-5'-фосфата [5, 6]. Предварительные опыты показали, что обработка  $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфата (I) морфолином и N,N'-дициклогексилкарбодимидом в стандартных условиях синтеза нуклеозид-5'-фосфоморфолидов [7] привела к образованию небольшого количества соединения, соответствующего по свойствам ожидаемому гликозилфосфоморфолиду. По-видимому, это указывает на пониженную нуклеофильность атома кислорода фосфатной группы, связанной с электрон-дефицитным гликозильным центром, по сравнению с кислородом алкилфосфатов. Более эффективный

\* Сообщение 5 см. [1].



метод активации фосфатных эфиров — взаимодействие с дифенилхлорфосфатом [8] — оказался, однако, успешным и в случае гликозилфосфатов.

Взаимодействие триэтиламмониевой соли  $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфата (I) с дифенилхлорфосфатом в присутствии диизопропилэтиламина приводит к гладкому его превращению в производное (II). Отделение его от избытка хлорангидрида представило некоторые трудности; наиболее удобным методом очистки дифосфата (II) оказалась препаративная хроматография на пластинках с силикагелем в системе, содержащей триэтиламмонийбикарбонат. Хотя эта процедура и сопряжена с потерями соединения (II), она позволяет быстро получить желаемый продукт активации с выходом около 35%.

Далее было исследовано взаимодействие производного (II) с аденозин-5'-фосфатом (IIIa). Анализ реакционной смеси с помощью электрофореза на бумаге показал, что уже через 1 ч при комнатной температуре исходный дифосфат (II) полностью исчезает и главным компонентом реакционной смеси становится желаемый нуклеотидсахар (IVa). Он был очищен с помощью электрофореза на бумаге с последующей хроматографией на бумаге. Свойства его (см. таблицу) полностью совпадали со свойствами производного (IVa), полученного при реакции P<sup>2</sup>,P<sup>2</sup>-дифениладенозин-5'-дифосфата с гликозилфосфатом (I). Этот результат показывает применимость подхода, основанного на активации фосфата сахара, для синтеза нуклеотидсахаров.

Нуклеозид-5'-фосфаты (IIIб-е), необходимые для синтеза аналогов GDP-Man, были получены из соответствующих модифицированных нуклеозидов фосфорилированием хлорокисью фосфора в триэтилфосфате по методу [9] с небольшими видоизменениями (см. «Экспериментальную

**Свойства нуклеозиддифосфатсахаров — аналогов GDP-Ман**

Соединение	Выход, %	Нис:Р <sub>кЛ</sub> :Р <sup>*</sup> <sub>об</sub>	R <sub>f</sub> в системах		E <sub>Рiс</sub> при pH	
			А	Б	7,5	4,0
(IVa)	36	1 : 0,95 : 1,97	0,50	0,19	1,0	0,76
(IVб)	57	1 : 0,97 : 1,94	0,66	0,32	1,05	0,90
(IVв)	41	1 : 0,97 : 2,08	0,48	0,18	1,0	0,76
(IVг)	54	1 : 0,93 : 2,08	0,66	0,30	1,0	0,85
(IVд)	38	1 : 1,01 : 1,93	0,56	0,25	0,95	0,75
(IVе)	39	1 : 1,08 : 2,10	0,56	0,29	1,0	0,76

\* Отношение нуклеозид — кислотолabileный фосфат — общий фосфат.

часть»). Наиболее удобным методом очистки нуклеотидов оказался препаративный электрофорез на бумаге. УФ-спектры полученных фосфатов соответствовали УФ-спектрам исходных нуклеозидов, они полностью дефосфорилировались под действием 5'-нуклеотидазы змеиного яда, что подтверждает положение фосфатной группы.

Взаимодействие производного (II) с фосфатами (IIIб—е) в условиях, применявшихся для реакции с нуклеотидом (IIIа), привело к набору аналогов GDP-Ман с модифицированным гетероциклическим ядром (IVб—е) (см. таблицу). Их электрофоретическая подвижность указывает на структуру друзамещенных пирофосфатов, а УФ-спектры совпадают с УФ-спектрами соответствующих нуклеотидов. Результаты определения отношения нуклеозид — кислотолabileный фосфор — общий фосфор соответствуют приписываемой структуре. Выходы нуклеотидсахаров, полученные при эквимолекулярном соотношении компонентов, сравнимы с выходами, получаемыми при активации нуклеотидного компонента в аналогичных условиях реакции.

Полученные результаты показывают, таким образом, что при благоприятной структуре гликозилфосфата подход к синтезу нуклеозиддифосфатсахаров, основанный на активации сахарного компонента, вполне оправдывает себя и может найти более широкое применение для синтеза набора аналогов природных нуклеозиддифосфатсахаров с модифицированным остатком нуклеозида в связи с исследованиями специфичности гликозилтрансфераз. Впервые полученные в данной работе аналоги GDP-Ман были изучены как аналоги природных субстратов маннозилтрансфераз, участвующих в биосинтезе O-специфических полисахаридов салмонелл; результаты этого исследования будут опубликованы отдельно.

### Экспериментальная часть

Общие методы описаны в работах [1, 2, 10]. Для хроматографии на бумаге использованы системы: этанол — 0,5 М ацетат аммония, pH 7,5 (5 : 2) (А), этанол — 0,5 М ацетат аммония, pH 4,0 (5 : 2) (Б), для электрофореза на бумаге при pH 7,5 — 0,05 М ТЕАВ (при препаративных разделениях — 0,2 М ТЕАВ), при pH 4,0 — 0,075 М триэтиламмонийацетат. Препаративную хроматографию на силикагеле проводили на пластинках с закрепленным слоем силикагеля F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — 0,05 М ТЕАВ (60 : 35 : 6) (В), для элюции вещества с пластинок употребляли раствор хлороформ — метанол — 0,05 М ТЕАВ (10 : 10 : 3) (Г).

*P*<sup>1</sup>-( $\alpha$ -D-Маннопиранозил)-*P*<sup>2</sup>,*P*<sup>2</sup>-дифенилдифосфат (II). 0,1 ммоль триэтиламмониевой соли  $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфата высушивали отгонкой смеси спирт — бензол (1 : 1) (3×5 мл), растворяли в 1,5 мл диметилформамида и добавляли 30 мкл дифенилхлорфосфата и 30 мкл диизопропиламина. Через 30 мин при ~20°С повторно добавляли по 30 мкл дифенилхлорфосфата и диизопропилэтиламина, выдерживали еще 30 мин и добавляли 10 мл эфира. Осадок отделяли декантацией и растворяли в 0,1 мл смеси (Г), раствор наносили на пластинку (10×2 см) силикагеля. После хроматографии в системе (В) обнаруживали зоны с R<sub>f</sub> 0,20; 0,41 и 0,64, из средней зоны получали триэтиламмониевую соль (II), выход 35%, электрофоретическая подвижность относительно пикриновой кис-

лоты ( $E_{\text{P1c}}$ ) 0,57 (рН 7,5). При стоянии в смеси (Г) в течение 2 сут дифосфат (II) полностью расщепляется, давая фосфат (I) и дифенилфосфат.

**Нуклеозид-5'-фосфаты (IIIб-е).** Смесь 0,1 ммоль нуклеозида, 0,4 мл триэтилфосфата и 20 мкл  $\text{POCl}_3$  выдерживали 4 ч при 5° С, выливали в 25 мл абс. эфира. Осадок отделяли центрифугированием, промывали эфиром (2×5 мл) и растворяли в 0,1 мл 1 М ТЕАВ. Нуклеозид-5'-фосфаты выделяли препаративным электрофорезом на бумаге при рН 7,5. С помощью этой процедуры получены: из 9-(β-D-рибофуранозил)пурина (Sigma, США) фосфат (IIIб) (ср. [11]), выход 50%,  $R_f$  0,55 (А), 0,58 (Б),  $E_{\text{P1c}}$  1,16 (рН 7,5), 0,75 (рН 4); из 2-амино-9-(β-D-рибофуранозил)-пурина [12] фосфат (IIIв), выход 62%,  $R_f$  0,40 (А), 0,38 (Б),  $E_{\text{P1c}}$  1,2 (рН 7,5), 0,76 (рН 4); из 2-амино-6-метокси-9-(β-D-рибофуранозил)пурина [13] фосфат (IIIг) (ср. [14]), выход 46%,  $R_f$  0,49 (А), 0,50 (Б),  $E_{\text{P1c}}$  1,2 (рН 7,5), 0,69 (рН 4); из 2-амино-9-(β-D-рибофуранозил)-6-хлорпурина [13] фосфат (IIIд) (ср. [15]), выход 27%,  $R_f$  0,49 (А), 0,50 (Б),  $E_{\text{P1c}}$  1,11 (рН 7,5), 0,60 (рН 4); из 6-тиогуанозина [16] фосфат (IIIе), выход 63%,  $R_f$  0,49 (А), 0,58 (Б),  $E_{\text{P1c}}$  1,19 (рН 7,5), 0,61 (рН 4).

**Нуклеозиддифосфатсахара (IVа-е).** К 30 ммоль триэтиламмониевой соли (II), высушенной отгонкой смеси спирт-бензол (1:1), добавляли раствор 30 ммоль нуклеозид-5'-фосфата (IIIа-е) в смеси 1 мл диметилформамида и 0,5 мл абс. пиридина. Перемешивали 1 ч при ~20° С и выливали раствор в 25 мл абс. эфира. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в небольшом количестве воды и выделяли пиродифосфаты препаративным электрофорезом на бумаге при рН 7,5; рехроматографией в системе А получали аммониевые соли (IVа-е) (выходы и свойства — см. таблицу).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шубаев В. Н., Елисеева Г. И., Краевская М. А., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 376–380.
2. Шубаев В. Н., Дружинина Т. Н., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 257–267.
3. Kockeikov N. K., Shibaev V. N. *Advances in Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 1973, v. 28, p. 307–399.
4. Ueda T. *Chem. Pharm. Bull.*, 1960, v. 8, № 5, p. 459–463.
5. Preiss J., Wood E. J. *Biol. Chem.*, 1964, v. 239, № 10, p. 3119–3126.
6. Recondo E., Dankert M., Passeron S. *Biochim. et biophys. acta*, 1965, v. 107, № 1, p. 129–131.
7. Moffatt J. G., Khorana H. G. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1961, v. 83, № 3, p. 649–658.
8. Michelson A. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1964, v. 91, № 1, p. 1–13.
9. Yoshikawa M., Kato T., Takenishi T. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1969, v. 42, № 12, p. 3505–3508.
10. Шубаев В. Н., Уткина Н. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1778–1781.
11. Freist W., Cramer F. In: *Nucleic Acid Chemistry* / Eds Townsend L. B., Tipson R. S. N. Y.: John Wiley, 1978, v. 2, p. 827–836.
12. Fox J. J., Westren I., Humpton A., Doerr I. L. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1958, v. 80, № 7, p. 1669–1675.
13. Gerster J. F., Jones J. M., Robins R. K. *J. Org. Chem.*, 1963, v. 28, № 4, p. 945–946.
14. Gerchman L. L., Dombrowski J., Ludlum D. B. *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 272, № 4, p. 672–675.
15. Amarnath V., Broom A. D. *Biochemistry*, 1976, v. 15, № 20, p. 4386–4389.
16. Eccleston J. F., Trentham D. R. *Biochem. J.*, 1977, v. 163, № 1, p. 15–29.

Поступила в редакцию 15.XI.1982

#### SPECIFICITY OF THE ENZYMES OF SALMONELLA O-ANTIGEN BIOSYNTHESIS. 6. SYNTHESIS OF SUGAR NUCLEOTIDES THROUGH ACTIVATED GLYCOSYL PHOSPHATES. ANALOGS OF GUANOSINE DIPHOSPHATE MANNOSE MODIFIED AT C<sup>6</sup> OF PURINE NUCLEUS

SHIBAEV V. N., ELISEEVA G. I.

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

Interaction of α-D-mannopyranosyl phosphate with diphenyl phosphochloridate gave the trisubstituted pyrophosphate which was converted through the reaction with nucleoside 5'-phosphates into nucleoside 5'-(α-D-mannopyranosyl)pyrophosphates. The method was used for preparation of guanosine diphosphate mannose analogs derived from adenine, purine, 2-aminopurine, 2-amino-6-methoxypurine, 2-amino-6-chloropurine, and 2-amino-6-mercaptapurine. These analogs are necessary for study on substrate specificity of mannosyltransferases of Salmonella O-specific polysaccharides biosynthesis.