

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

На правах рукописи

*Винникова*

**ВИННИКОВА**

**Анна Николаевна**

**СИНТЕЗ АНАЛОГОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО УНДЕКАПРЕНИЛФОСФАТА И  
УНДЕКАПРЕНИЛДИФОСФАТСАХАРОВ**

**02.00.03 – Органическая химия**

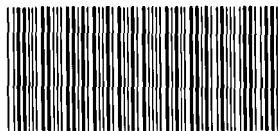
**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации**

**на соискание ученой степени**

**кандидата химических наук**

30 ОКТ 2014



**005554087**

**Москва — 2014**

Работа выполнена в лаборатории полинепредельных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН и частично в университете Куинс (Queen's University, Kingston, Canada).

- Научный руководитель: доктор химических наук, профессор, зав. лаб. полинепредельных соединений № 7 ФГБУН ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН **Веселовский Владимир Всеволодович**
- Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химии липидов ФГБУН ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН **Молотковский Юлиан Георгиевич**
- кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН (г. Пушкино, Московская обл.) **Ивашина Татьяна Владимировна**
- Ведущая организация: Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 16 декабря 2014 г в 11<sup>00</sup> на заседании Диссертационного совета Д 002.222.01 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН по адресу: 119991 Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН.

Автореферат разослан 20 октября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ИОХ РАН,

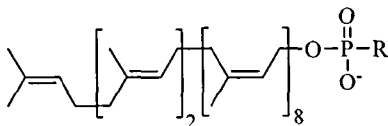
доктор химических наук



**Людмила Александровна Родиновская**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Ундекапренилфосфат (УФОС) **1** и ундекапренилдифосфатсахара (УДФС) **2** представляют собой уникальные природные соединения, которые принимают участие в биосинтезе ряда углеводовсодержащих биополимеров, в число которых входят О-специфические полисахариды (О-антигены) грамотрицательных бактерий, где УФОС играет ключевую роль в иницировании сборки углеводной цепи, а УДФС участвуют в продолжении ее построения.



1: R = O<sup>-</sup>;

2: R = O-P(=O)(O<sup>-</sup>)-[Sug]<sub>n</sub>

Sug = моносахаридный остаток

Тонкая структура О-антигенов определяет специфичность взаимодействия бактерии с другими биологическими системами, в том числе специфичность иммунного ответа высших животных и человека на инфекцию. Изучение их биосинтеза имеет первостепенное значение для поиска способов преодоления приобретенной резистентности штаммов болезнетворных грамотрицательных бактерий к известным антибиотикам. Вместе с тем изучение процессов с участием соединений **1** и **2** ограничено сложностью их выделения из природных объектов, в которых, к тому же, они содержатся в малых концентрациях. Преодолеть это препятствие оказалось возможным только посредством разработки эффективных методов синтеза биологически активных аналогов данных соединений. Особый интерес для изучения биохимии бактериальных УФОС и УДФС представляет использование синтетических и полусинтетических аналогов, содержащих фотоактивные метки\*. Наличие последних позволяет существенно увеличить чувствительность детектирования этих соединений и продуктов реакций с их участием при анализе методами ВЭЖХ и ТСХ.

**Цель работы.** Целью настоящей работы является синтез аналогов бактериальных УФОС и УДФС, содержащих фотоактивные группы на ω-конце липидной цепи и изучение их субстратных свойств в модельных реакциях сборки О-антигенов ряда грамотрицательных бактерий.

\* В понятие «фотоактивные» метки здесь и далее автор включает флуоресцентные и хромофорные группы атомов.

223

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Был осуществлен синтез новых аналогов УФОС и УДФС, содержащих в липидной части молекул фотоактивные группировки, и было показано, что эти соединения являются субстратами гликозилтрансфераз ряда грамотрицательных бактерий в иницировании сборки и наращивании цепи О-антигенов. Так, реализована оригинальная восьмистадийная трансформация доступной смеси растительных полипренолов в аналог УФОС с фенокси группой на  $\omega$ -конце изопреноидной цепи. Разработан и осуществлен синтез ранее неизвестных флуоресцентных неизопреноидных аналогов бактериальных УФОС и УДФС – 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфата, 11-[(9'-антраценилкарбонил)амино]ундецилфосфат,  $P^1$ -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- $P^2$ -( $\alpha$ -D-галактопиранозил)дифосфата и  $P^1$ -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- $P^2$ -(2-ацетамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозил)дифосфат. Получены четыре новых флуоресцентных пиррофосфатных соединения с различной протяженностью липофильной части:  $P^1$ -{16-[(9'-антраценил)окси]гексадецил}-,  $P^1$ -{11-[(9'-антраценил)окси]ундецил}-,  $P^1$ -{6-[(9'-антраценил)окси]гексил}- и  $P^1$ -[2-(9'-антраценил)этил]- $P^2$ -( $\alpha$ -D-галактопиранозил)дифосфаты. С помощью этих соединений впервые показано влияние длины углеводородной цепи на акцепторные свойства неизопреноидных флуоресцентных аналогов бактериальной ундекапренилдифосфатгалактозы в ферментативной реакции построения О-специфического полисахарида *Salmonella newport*. С практической точки зрения, использование синтезированных флуоресцентных аналогов УФОС и УДФС позволяет отказаться от применения дорогостоящих и неэкологичных радиоактивных соединений при исследованиях метаболизма грамотрицательных бактерий, имеющих первостепенное значение для поиска способов преодоления приобретенной устойчивости к известным антибиотикам и создания новых антибактериальных препаратов.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований представлены на V Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2009), 8<sup>th</sup> National Symposium recent Advances in Carbohydrate Science (Banff Alberta, Canada, 2012), 5th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates (Suzdal, Russia, 2012) и на II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 6 научных статей в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах и тезисы 5 стендовых и устных докладов на конференциях.

**Объем диссертации и ее структура.** Диссертация изложена на 98 страницах и состоит из введения, обзора литературы на тему “Синтез линейных изопреноидов, содержащих фотоактивные метки”, обсуждения результатов собственных экспериментальных исследований, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 124 наименования.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

К началу настоящей работы ассортимент доступных для биохимических исследований аналогов бактериальных УФОС и УДФС ограничивался фосфатами и дифосфатами изопреноидной природы, а также используемыми с недавних пор 11-феноксиундецилфосфатом и его фосфогликозилированными производными. Очевидным достоинством феноксиундецильных аналогов ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров является их химическая стабильность, а также наличие в молекулах хромофорной феноксигруппы, которая позволяет детектировать содержащие ее соединения в специфической области УФ-поглощения.

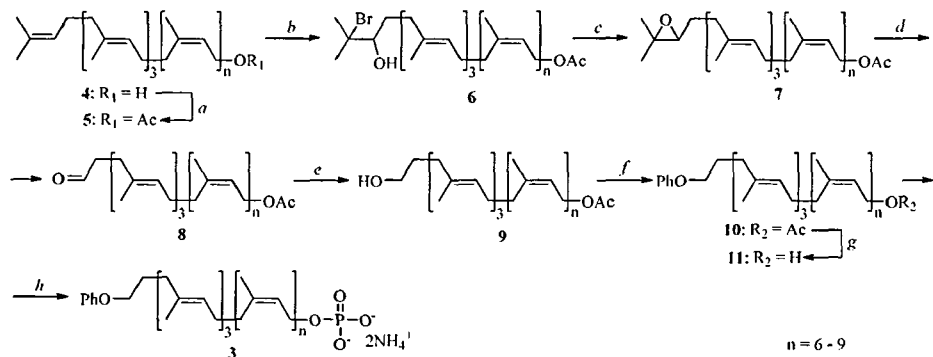
В настоящей работе, с целью расширения ассортимента и повышения функциональности синтетических аналогов бактериальных ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров были получены новые липидфосфаты и липиддифосфатмоносахариды с хромофорными, а также флуорофорными группировками. Наличие последних в еще большей степени повышает чувствительность детектирования содержащих их соединений. Продемонстрирована их биологическая активность по отношению к гликозилтрансферазам ряда грамотрицательных бактерий.

**1. Синтез аналога бактериального ундекапренилфосфата, содержащего феноксигруппу на  $\omega$ -конце олигоизопреновой цепи.**

В качестве исходного соединения для синтеза целевых фосфатов 3 (схема 1) был использован морапренол (4) – нативная смесь полипренолов из листьев шелковицы *Morus*

*nigra*, одним из основных компонентов которой является ундекапренол<sup>†</sup>. Согласно выбранному плану синтеза на первой стадии исходные полипrenoны 4 превращали в ацетаты 5. Их двухстадийная трансформация через стадию бромгидринов 6 в терминальные эпоксиды 7 по ван Тамелену оказалась препаративно приемлемой и дала искомый продукт 7 с суммарным выходом ~35%. Окислительная деградация последнего под действием  $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  гладко привела к альдегидацетатам 8, селективно восстановленным в гидроксиацетаты 9. Их трансформация в феноксиацетаты 10, которые далее гидролизовали в соответствующие спирты 11, осуществлялась посредством одного из вариантов реакции Мицунобу с последующим мягким гидролизом полученной в результате смеси феноксиацетатов 10.

Схема 1



**Реагенты и условия:** a.  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{Py}$ , 20 °C (~100%); b. NBS, aq. THF, 20 °C (55%); c.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{PhH-MeOH}$ , 20 °C (62%); d.  $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_2\text{O-THF}$ , 20 °C (98%); e.  $\text{NaBH}_4$ , DME, 20 °C (60%); f.  $\text{PhOH}$ , DEAD,  $\text{Ph}_3\text{P}$ , THF, 0→20 °C (44%); g.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{PhH-MeOH}$ , 20 °C (66%); h. 1)  $\text{CCl}_3\text{CN}$ ,  $\text{Bu}_4\text{NH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20 °C, 2) Dowex 50 W×8 ( $\text{NH}_4^+$ ),  $\text{Bu}^t\text{OMe-MeOH}$ , 3) хроматография на DEAE-целлюлозе DE-52(OAc),  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , MeOH (49%).

Полученные в итоге семи рассмотренных стадий с суммарным выходом ~6% фенокиспирты 11 далее подвергались фосфорилированию. Для этой цели была использована хорошо себя зарекомендовавшая для фосфорилирования полипренолов

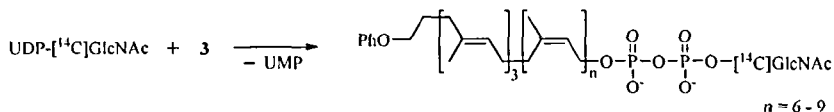
<sup>†</sup> Растительный ундекапренол  $\text{WT}_3\text{C}_7\text{OH}$  имеет отличия в структуре от бактериального  $\text{WT}_2\text{C}_8\text{OH}$ , где «W» — ω-концевое изопреновое звено олигоизопреновой цепи, а «T» и «C» — внутренние *транс*- и *цис*-изопреновые звенья соответственно

система реагентов  $\text{CCl}_3\text{CN}-\text{Ba}_4\text{NH}_2\text{PO}_4$ . Фосфаты **3** получали в виде аммониевых солей после обмена на катион аммония катиона в продукте фосфорилирования на смоле Dowex 50 W×8 ( $\text{NH}_4^+$ ), последующей анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе ( $\text{AcO}^-$ ) с элюированием раствором  $\text{AcONH}_4$  в  $\text{MeOH}$  и удаления избытка  $\text{AcONH}_4$  во фракциях его осаждением толуолом.

Строение неизвестных ранее соединений **3**, **5** – **11** подтверждено совокупностью физико-химических данных. В их спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  присутствуют сигналы, характерные для линейных олигоизопреноидов, содержащих (*E*)- и (*Z*)-изопреновые фрагменты; имеются также сигналы, отвечающие функциональным группам, находящимся в  $\omega$ - и  $\alpha$ -звеньях цепи. В ЯМР  $^{31}\text{P}$  обнаруживался синглет фосфатной группы синтезированного соединения. Данные ИК-спектров соответствуют структуре описываемых соединений. Фосфаты **3** – охарактеризованы также масс-спектром, полученным при ионизации электрораспылением (electrospray ionisation, ESI), в котором содержатся пики молекулярных ионов олигомергомологов, причем их интенсивность соответствует их содержанию в полученном продукте.

Биологическую активность фосфатов **3** исследовали в реакции инициирования сборки повторяющегося звена О-антигенных полисахаридов, катализируемой UDPGlcNAc : полипренилфосфат-GlcNAc-фосфотрансферазой цитоплазматических мембран грамотрицательных бактерий *S. arizona* серогруппа O:59 и *Aeromonas hydrophila* AH-1 с использованием радиоактивного уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамина (UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]GlcNAc) в качестве донора моносахарида [ $^{14}\text{C}$ ]GlcNAc (схема 2). В контрольных экспериментах субстратом-акцептором служил морапсенилфосфат.

Схема 2



Продукты ферментативных реакций анализировали методом ТСХ ( $\text{SiO}_2$ ) с применением метода жидкостного сцинтиляционного счета радиоактивности. В экспериментах с обоими указанными выше биологическими объектами найдено, что основная радиоактивность полученных продуктов обнаруживается на пластинах ТСХ в

области с  $R_f$  0.2 (рис. 1). Практически такое же значение  $R_f$  наблюдалось для синтетического образца морапrenилдифосфат- $\alpha$ -D-глюкозы, полученного ранее.

Из сравнения уровня радиоактивности продуктов реакции с участием морапrenилфосфата с таковым при использовании фосфатов **3** в качестве субстрата-акцептора следует, что относительная эффективность процесса в последнем случае ниже и составляет, соответственно, ~50 % и ~66 % от контроля для ферментов *S. arizona* и *A. hydrophila* АН-1.

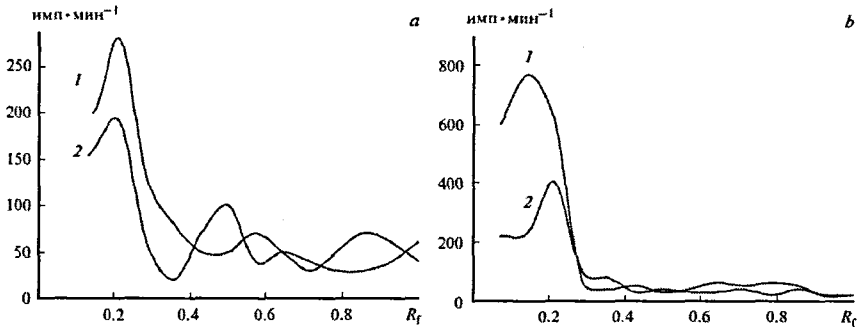


Рис. 1. Распределение радиоактивности (имп·мин<sup>-1</sup>) на хроматограмме продуктов ферментативной реакции с участием фосфата морапrenoла (1) фосфатов **3** (2), UDP-[<sup>14</sup>C]GlcNAc и препарата мембран клеток *A. hydrophila* АН-1 (а) и *S. arizona* серогруппа O:59 (b).

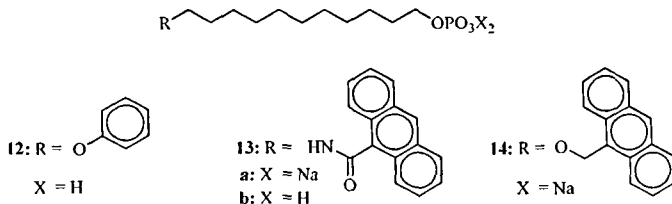
Наблюдаемый уровень активности фосфатов **3** является приемлемым для их использования в модельных системах при изучении подобных ферментативных процессов, а наличие в их молекулах феноксигруппы позволяет детектировать содержащие ее соединения, в том числе продукты биохимических реакций по специфическому поглощению ароматического ядра в УФ-области.

## 2. Синтез флуоресцентных аналогов бактериального ундекаprenилфосфата.

Ранее, учеными ИОХ РАН было обнаружено, что 11-(фенокси)ундецилфосфат **12** (схема 3) может участвовать в реакции иницирования сборки O-антигена граммотрицательных бактерий *S. arizona* O:59. В настоящей работе были получены флуоресцентные производные ундецилфосфата **13a,b** и **14** и продемонстрирована их способность служить фосфогликозилакцепторами в ферментативных реакциях, моделирующих иницирование сборки повторяющегося звена O-антигена *S. newport*.

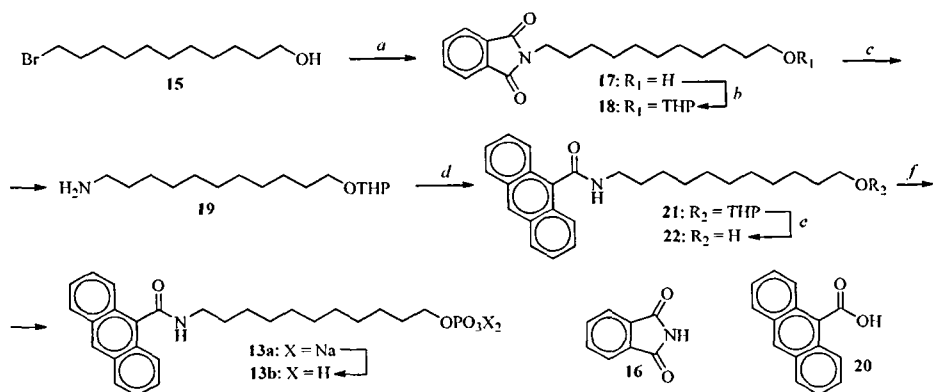


## Схема 3



Для синтеза 11-[(9-антраценилкарбонил)амино]ундецилфосфатов **13a,b** в качестве исходного вещества использовали 11-бромундеканол **15** (схема 4). Обработка последнего фталимидом калия **16** привела к N-алкилфталимиду **17**, из которого в стандартных условиях был получен ТНР-эфир **18**. Последний далее был превращен в амин **19** под действием гидразингидрата, который затем ввели в реакцию с 9-антраценкарбоновой кислотой **20** в присутствии N,N'-дциклогексилкарбодимида (DCC) с образованием амида **21**.

## Схема 4



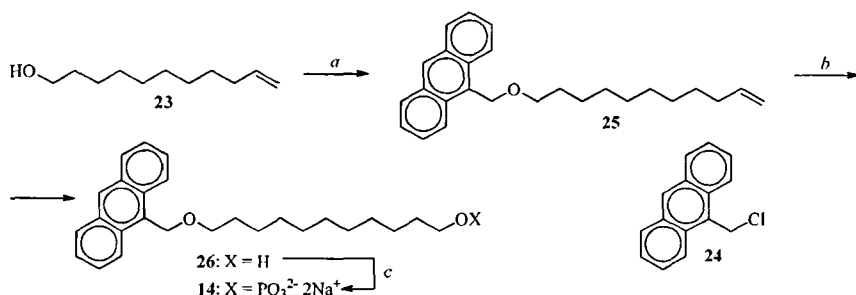
**Реагенты и условия:** *a.* **16**, DMF, 80 °C (60%); *b.* PPTS, DHP,  $CH_2Cl_2$ , 20 °C (98 %); *c.*  $N_2H_4 \cdot H_2O$ , EtOH, 20 °C (90%); *d.* **20**, DCC,  $CH_2Cl_2$ , 20 °C (50 %); *e.*  $TsOH \cdot H_2O$ , MeOH, 20 °C (53 %); *f.* 1)  $CCl_3CN$ ,  $Вu_4NH_2PO_4$ ,  $(CH_2Cl)_2$ , 20 °C; 2) NaOH (водн. р-р), 20 °C; 3) HCl (водн. р-р), 20 °C (41 %).

Полученный после удаления ТНР-защиты спирт **22** фосфорилировали по стандартной методике с использованием избытков дигидрофосфата тетрабутиламмония и трихлорацетонитрила. Строение натриевой соли **13a**, полученной после обработки

щелочным раствором продуктов реакции фосфорилирования, подтверждено данными ИК- и УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. Так, в УФ-спектре соединения **13a** наблюдались максимумы поглощения ( $\lambda_{\text{max}}$  250 и 360 нм), подтверждающие наличие антраценильной группы. Следует отметить, что чрезвычайно низкая растворимость этого соединения в воде и органических растворителях не позволила получить его ЯМР. Это обстоятельство послужило также препятствием для использования фосфата **13a** в биохимических экспериментах. Подкисление суспензии фосфата **13a** в воде до pH ~ 0 привело к более растворимому дигидрофосфату **13b**. Строение ранее неизвестных соединений **13b**, **17–19**, **21** и **22** подтверждено совокупностью данных ЯМР-, ИК- и масс-спектрометрии.

Исходным соединением для синтеза 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфата **14** послужил ундец-10-ен-1-ол **23** (схема 5). Реакция его алкоголята с 9-(хлорметил)антраценом **24** в присутствии каталитических количеств  $\text{Bu}_4\text{NI}$  дала простой эфир **25**, содержащий терминальную двойную связь. Гидроборирование последней с помощью генерируемого *in situ*  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  и последующее окисление промежуточных борсодержащих соединений  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии  $\text{NaOAc}$  привело к спирту **26**. Его фосфорилирование двумя эквивалентами смеси  $\text{POCl}_3$  и  $\text{Et}_3\text{N}$  с последующим гидролизом промежуточно образующегося фосфодихлорида водным раствором  $\text{NaOH}$  привело к образованию динатриевой соли **14** с общим выходом на три стадии 34 %.

Схема 5

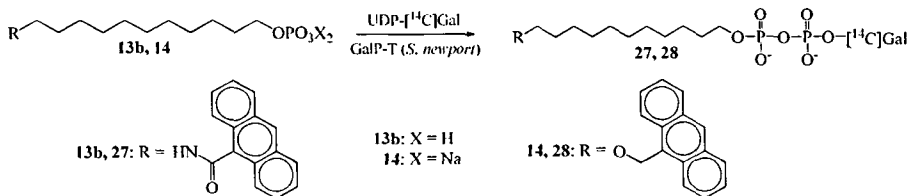


Реагенты и условия: *a.* **24**,  $\text{NaN}$ ,  $\text{Bu}_4\text{NI}$ , DMF, 20 °C (83%); *b.* 1)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , THF, 20 °C; 2)  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NaOAc}$ , 20 °C (55 %); *c.* 1)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 20 °C; 2)  $\text{NaOH}$  (водн. р-р), 20 °C (75 %).

Строение неизвестных ранее соединений **14**, **23**, **25** и **26** подтверждено совокупностью методов ЯМР и масс-спектрометрии. Так, в УФ-спектре целевого фосфата **14** наблюдались максимумы поглощения ( $\lambda_{\text{max}}$  250 и 360 нм) антраценильной группы.

Способность синтезированных фосфатов **13b** и **14** служить акцепторами галактозилфосфатного остатка уридиндифосфатгалактозы (UDP-Gal) под действием галактозилфосфотрансферазы (GalP-T) из клеточных мембран *S. newport* определялась в ферментативной реакции с радиоактивной UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Gal в качестве донора остатка гликозилфосфата (схема 6). Фосфат **13b** вводили в инкубационную смесь, содержащую препарат мембран из клеток *S. newport* и радиоактивную UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Gal. После проведения инкубации смесь хроматографировали на картридже с обращенной фазой C18 (ДиаПак). Водорастворимые компоненты, включая непрореагировавший нуклеотидсахар, элюировали водой, а липидсодержащие компоненты, в том числе ожидаемый продукт ферментативной реакции **27**, – метанолом. Фракции элюатов анализировали методом ТСХ на пластинках  $\text{SiO}_2$ .

Схема 6



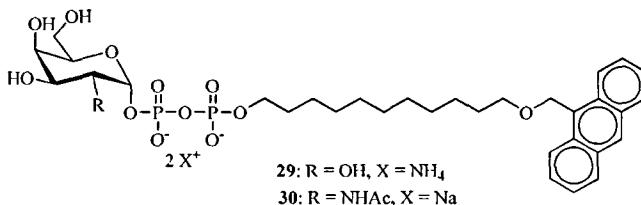
У фракций метанольного элюата наблюдалась зона с характерной хроматографической подвижностью, отличной от таковой исходного фосфата **13b**. Эта зона была также радиоактивной, что соответствовало наличию в продукте реакции остатка фосфата радиоактивной галактозы, а также флуоресцировала при облучении пластинки УФ-светом с длиной волны 360 нм, что указывало на присутствие в нем антраценильной группы. Ферментативная реакция с участием фосфата **14**, приводящая к гликозилдифосфату **28**, была проведена аналогично.

### 3. Синтез неизопреноидных флуоресцентных аналогов бактериальных ундекапренилдифосфатсахаров.

Следующий этап настоящего исследования состоял в синтезе новых неизопреноидных аналогов бактериальных УДФС, содержащих флуорофорные

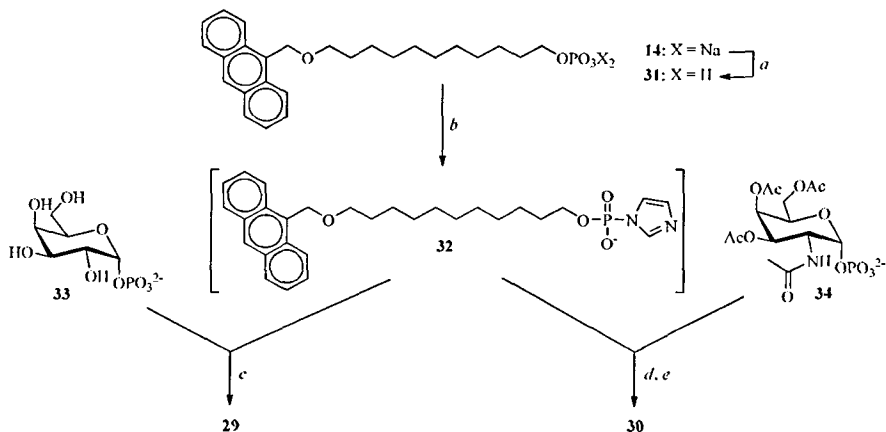
группировки, которые, как указывалось выше, перспективны в качестве инструментов для изучения процесса биосинтеза повторяющихся звеньев О-антигенов. Для получения первых двух из них –  $P^1$ -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- $P^2$ -( $\alpha$ -*D*-галактопиранозил)дифосфата **29** и  $P^1$ -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- $P^2$ -(2-ацетамидо-2-дезокси- $\alpha$ -*D*-галактопиранозил)дифосфата **30** (схема 7) – была использована упомянутая выше динатриевая соль фосфата **14**.

Схема 7



В первом случае, полученный из нее кислый фосфат **31** (схема 8), переводили в триэтиламмониевую соль, обрабатывали избытком *N,N'*-карбонилдиимидазола (CDI) и образующийся при этом *in situ* соответствующий имидазолид **32** вводили в конденсацию с бис-триэтиламмониевой солью  $\alpha$ -*D*-галактопиранозилфосфата **33** в смеси THF и DMSO.

Схема 8



**Реагенты и условия:** *a.* HCl (водн. р-р), 20 °С; *b.* 1) Et<sub>3</sub>N для **29**, (Pr<sup>t</sup>N<sub>2</sub>H для **30**) 20 °С; 2) CDI, THF, 20 °С; 3) MeOH, 20 °С; *c.* **33**, THF–DMSO, 37 °С (15 %); *d.* **34**, THF, 37 °С; *e.* MeONa, MeOH, 20 °С (25 %).

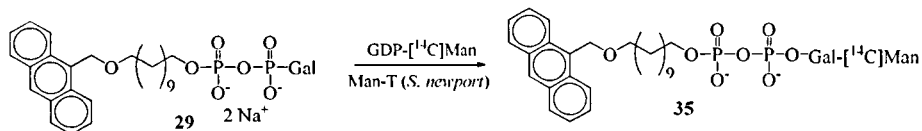
Для выделения образовавшегося дифосфата **29** реакционную смесь разбавляли MeOH и фракционировали на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52 (AcO<sup>-</sup>-форма), элюируя вещества ступенчатым градиентом ацетата аммония в метаноле. Состав фракций анализировали методом ТСХ. Фракции, содержащие ожидаемый продукт **29**, объединяли, концентрировали и хроматографировали ступенчатым градиентом MeOH в воде, выделяя индивидуальный гликозилдифосфат **29** с выходом 15% в виде аммониевой соли. Строение полученного соединения **29** подтверждено масс-спектром высокого разрешения и данными спектров ЯМР.

Синтез *P*<sup>1</sup>-{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}-*P*<sup>2</sup>-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозил)дифосфата **30** проводили аналогично, конденсацией имидазолида **32** с бис-диизопропиламмониевой солью 3,4,6-три-*O*-ацетил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозилфосфата **34** (схема 8). Промежуточный ацетат выделяли хроматографией на колонке с гелем (Sephadex-G15) и обрабатывали метилатом натрия для удаления защитных ацетильных групп. Целевой дифосфат **30** выделяли с выходом 25 % на колонке с обращенной фазой C18 (SepPak) в виде динатриевой соли.

Строение флуоресцентного соединения **30** подтверждено данными ЯМР-и масс-спектрометрии. Максимум спектра поглощения для производного **30** был зафиксирован при 247 нм, а флуоресценции – при 415 нм.

Способность синтетических флуоресцентных аналогов УДФС **29** и **30** служить субстратами-акцепторами соответствующих гликозилтрансфераз исследовали в модельных реакциях сборки *O*-антигенов ряда грамотрицательных микроорганизмов. В частности, активность соединения **29** изучали в ферментативной реакции переноса остатка маннозы, катализируемой маннозилтрансферазой (Man-T) из *S. newport* (схема 9).

Схема 9

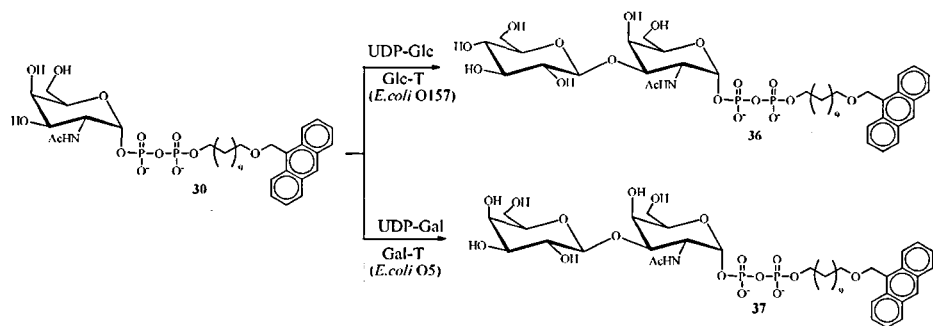


Так, дифосфат **29** вводили в инкубационную смесь, содержащую препарат мембран из клеток *S. newport* и радиоактивную гуанидиндифосфатманнозу (GDP-[<sup>14</sup>C]Man). После проведения инкубации, коагуляции белка и осаждения коагулята центрифугированием

супернатант фракционировали на картридже C18 (ДиаПак). Водорастворимые компоненты, включая непрореагировавший нуклеозиддифосфатсахар, элюировали водой, а липидсодержащие компоненты, в том числе ожидаемые продукты ферментативной реакции дифосфат **35**, – метанолом. Фракции элюатов анализировали методом ТСХ. При этом, как это обычно наблюдается в подобных случаях, дисахарид **35** имел меньшую хроматографическую подвижность по сравнению с исходным моносахаридом **29**. Соответствующая продукту зона была радиоактивной, что указывало на присутствие остатка радиоактивной маннозы, и так же, как и исходное соединение **29**, обладала голубой флуоресценцией при облучении пластинки УФ с длиной волны 365 нм, что отвечало наличию в продукте реакции антраценильной группы. Совокупность этих данных подтверждает образование в изучаемой ферментативной реакции дисахариддифосфата **35**.

Для изучения субстратных свойств производного **30** использовали ферментные препараты, которые содержали трансферазы, продуцируемые бактериями *E. coli* BL21 с внедренными в них клонированными генами *wbdN* (*E. coli* O157) или *wbWc* (*E. coli* O5). Так, дифосфат **30** вводили ферментативные реакции с радиоактивной или нерадиоактивной уридиндифосфатглюкозой (UDP-Glc), катализируемые глюкозилтрансферазой (Glc-T) *WbdN* из *E. coli* O157 (схема 10).

Схема 10



После проведения инкубации реакцию смесь наносили на картридж C18 (SepPak) и фракционировали, как в случае продуктов ферментативной реакции дифосфата **29**. Метанольные фракции, содержащие радиоактивность, концентрировали в вакууме и анализировали ВЭЖХ на обращенной фазе RP-18 (УФ-детектор, 247 нм), собирая фракции

по 1 мл. При этом было зафиксировано два пика с временами удержания 26 и 38 мин, причем последний соответствовал исходному дифосфату **30** (рис. 2а, линия  $A_{247}$ ). В полученных фракциях измеряли радиоактивность (рис. 2, линия СРМ) и флуоресценцию при 415 нм (линия  $F_{415}$ ).

В результате было установлено, что для фракций, содержащих продукт с временем удерживания 26 мин наблюдается совпадение максимального уровня радиоактивности и максимального значения флуоресценции, что однозначно свидетельствует о протекании желаемой ферментативной реакции с образованием ожидаемого производного дисахарида **36**.

В экспериментах с нерадиоактивным углеводным донором (UDP-Glc), дифосфат **36** выделяли препаративно и характеризовали масс-спектром высокого разрешения.

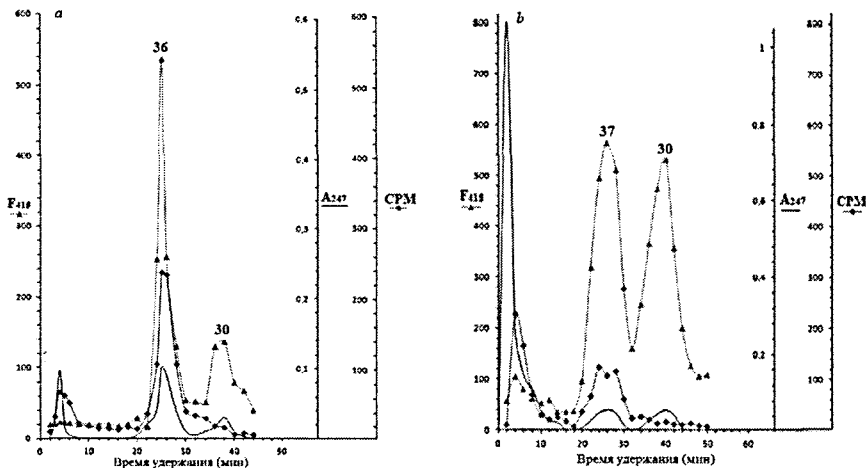


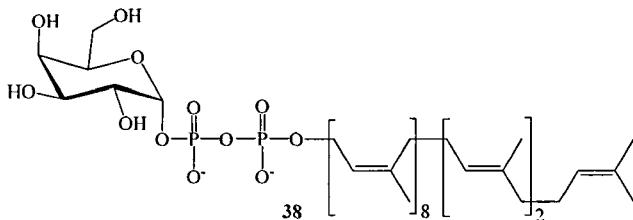
Рис. 2 Распределение поглощения при 247 нм ( $A_{247}$ ), радиоактивности (СРМ) и флуоресценции при 415 нм ( $F_{415}$ ) во фракциях ВЭЖХ, полученных при разделении продуктов ферментативных реакций с участием гликозилдифосфата **30**, катализируемых Glc-T WbdN из *E. coli* O157 (а) и Gal-T WbwC из *E. coli* O5 (b).

Гликозилакцепторные свойства дифосфата **30** были также изучены в ферментативной реакции с UDP-Gal, катализируемой Gal-T WbwC из *E. coli* O5 (схема 8). Образование продукта этой реакции **37** подтверждали аналогично описанному выше для дисахарида **36**

(рис. 2b). Кроме того, было продемонстрировано, что соединение **30** также является субстратом-акцептором Gal-T WbWc из *E. coli* O104.

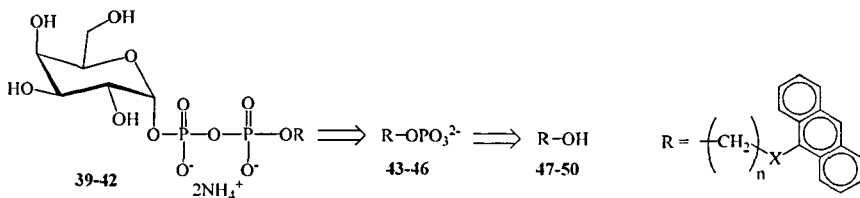
Таким образом, впервые синтезированные неизопреноидные флуоресцентные аналоги бактериальных УДФС **29** и **30** оказались активными в модельных ферментативных реакциях сборки О-антигенов ряда грамотрицательных бактерий и могут служить инструментами для изучения деталей метаболизма этих микроорганизмов.

На заключительном этапе, было проведено исследование, направленное на оптимизацию структурных параметров неизопреноидных аналогов ундекапренилдифосфатгалактозы **38** и, в частности, размеров их липофильной части.



Для этой цели был осуществлен синтез четырех новых флуоресцентных аналогов **39–42** гликозилдифосфата **38** с разной протяженностью липофильного фрагмента (схема 11) и проведено сравнение их эффективности в качестве гликозилакцепторов в ферментативной реакции, катализируемой Man-T из *S. newport*.

Схема 11



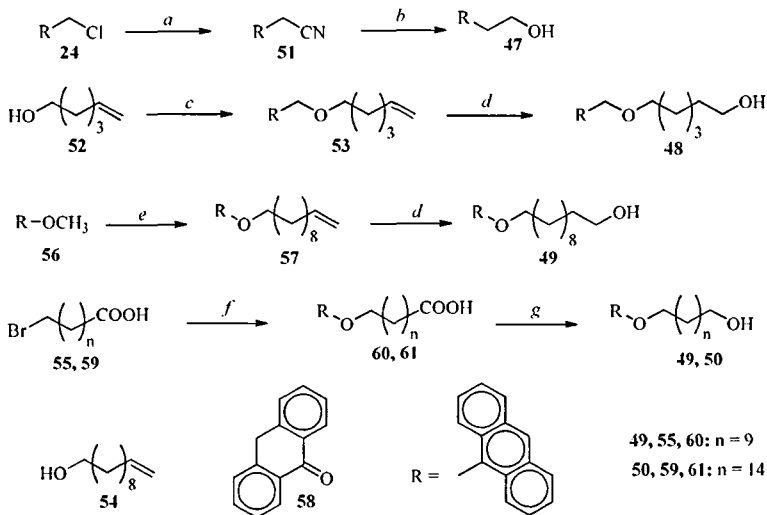
**39, 43, 47:**  $n = 1$ ;  $X = -CH_2-$ ; **40, 44, 48:**  $n = 6$ ;  $X = -O-CH_2-$ ; **41, 45, 49:**  $n = 11$ ;  $X = -O-$ ; **42, 46, 50:**  $n = 16$ ;  $X = -O-$

Синтез галактозилдифосфатов **39–42** осуществляли по общей схеме фосфогалактозилированием фосфоэфиров **43–46** соответствующих спиртов **47–50**. Так, 2-(9-Антраценилокси)этанол **47** был получен, исходя из 9-(хлорметил)антрацен **24**.



Последний конденсировали с цианидом натрия и образующийся нитрил **51** последовательным действием DIBAH и  $\text{NaBH}_4$  восстанавливали до целевого спирта **47**. Неизвестные ранее спирты **48-50** были получены на основе доступных предшественников (схема 12). Для синтеза 6-(9'-антраценилметокси)гексан-1-ола **48** был использован коммерчески доступный гекс-5-ен-1-ол **52**, алкогольят которого конденсировали с 9-(хлорметил)антраценом **24** в присутствии каталитического количества  $\text{Bu}_4\text{NI}$  с образованием 6-(9'-антраценилметокси)гекс-1-ена **53**. Гидроборирование последнего, генерируемым *in situ*  $\text{BH}_3$ , и последующее окисление промежуточных борсодержащих соединений  $\text{H}_2\text{O}_2$  дало целевой спирт **48** с общим выходом на две стадии 62 %.

Схема 12



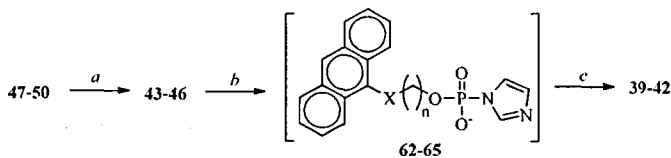
**Реагенты и условия:** *a.* 1)  $\text{NaCN}$ , DMF,  $20^\circ\text{C}$ ; 2) 3М аq.  $\text{NaOH}$ ,  $20^\circ\text{C}$  (77 %); *b.* 1) DIBAH, THF,  $-10^\circ\text{C}$ — $20^\circ\text{C}$ ; 2)  $\text{NaBH}_4$ , THF,  $-10^\circ\text{C}$ — $20^\circ\text{C}$  (31%); *c.* 1) **51**, NaH,  $\text{Bu}_4\text{NI}$ , THF,  $20^\circ\text{C}$ , (85%); *d.* 1)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ; 2) 3М аq.  $\text{NaOAc}$ , 30% аq.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (73% для **49**, 31% для **50**); *e.* **54**, TsOMe, PhH,  $80^\circ\text{C}$ , (56%); *f.* 1) **58**,  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , 48% аq. KOH, PhCH<sub>3</sub>, кипячение; 2) 30% аq. HCl, (38% для **60**, 61% для **61**); *g.* 1)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ; 2)  $\text{H}_2\text{O}$ , (82% для **49**, 86% для **50**).

Синтез 11-(9'-антраценилокси)ундекан-1-ола **49** был осуществлен двумя альтернативными способами из доступных ундец-10-ен-1-ола **54** и 11-бромундекановой кислоты **55**. В первом случае гидроксидолефин **54** использовали для пералкилирования 9-

(метокси)антрацена **56**, катализируемого TsOMe. Продукт реакции – терминальный oleфин **57** – превращали в целевой спирт **49** аналогично описанной выше процедуре гидроборирования–окисления. По альтернативной схеме алкилирование бромкислоты **55** антроном **58** в присутствии щелочи и каталитического количества  $\text{Bu}_4\text{NBg}$  привело к образованию 11-(9'-антраценилокси)ундекановой кислоты **60**, которую затем восстанавливали в спирт **49** полученным *in situ* комплексом  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ . 16-(9'-Антраценилокси)гексадекан-1-ол **50** получали аналогично, исходя из коммерчески также доступной 16-бромгексадекановой кислоты **59** через стадию образования 16-(9'-антраценилокси)гексадекановой кислоты **61**.

Спирты **47–50** фосфорилировали избытком  $\text{POCl}_3$  в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  с последующим щелочным гидролизом промежуточно образующихся фосфодихлоридов (схема 13). Подкислением образующихся при этом натриевых солей разбавленной соляной кислотой получены соответствующие кислые фосфаты **43–46** с выходами от 35% до 92%, которые далее вводили в пирофосфатный синтез с галактозилфосфатом.

Схема 13



62:  $n = 1$ ,  $X = -\text{CH}_2-$ ; 63:  $n = 6$ ,  $X = -\text{OCH}_2-$ ; 64:  $n = 11$ ,  $X = -\text{O}-$ ; 65:  $n = 16$ ,  $X = -\text{O}-$

**Реагенты и условия:** *a.* 1)  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{NEt}_3$ , THF,  $20^\circ\text{C}$ ; 2) 2.5 M aq. NaOH; 3) 3 % aq. HCl; *b.* 1) CDI, THF,  $20^\circ\text{C}$ ; *c.* 1)  $\alpha$ -D-галактопиранозилфосфата бистриэтиламониевая соль, THF, DMSO,  $37^\circ\text{C}$ ; 2) хроматография на DEAE-целлюлозе DE-52 (OAc<sup>-</sup>),  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , MeOH; 3) хроматография на картридже C-18 (SepPak).

Так, полученные *in situ* бис-триэтиламониевые соли фосфатов **43–46** избытком CDI переводили в соответствующие имидазолиды **62–65**, которые без выделения конденсировали с бис-триэтиламониевой солью  $\alpha$ -D-галактопиранозилфосфата в смеси THF и DMSO. Образовавшиеся целевые дифосфаты **39–42** выделяли аналогично описанному выше для  $P^1$ -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- $P^2$ -( $\alpha$ -D-галактопиранозил)дифосфата **29**.

Строение неизвестных ранее соединений **39–46**, **48–50**, **53**, **57**, **60** и **61** подтверждено совокупностью физико-химических данных. В их ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  спектрах присутствуют сигналы, характерные для функционализированных линейных углеводов и антраценильного фрагмента. В ЯМР  $^1\text{H}$  спектрах галактозилпирофосфатов **39–42** четко идентифицируются сигналы галактозильного остатка. Положение полос, как в спектрах поглощения, так и флуоресценции для дифосфатов **39–42** оказалось практически одинаковым. В качестве примера на рис. 3 приведены спектры галактозилпирофосфата **39** в водном растворе (максимум поглощения  $\lambda$  253 нм, максимум флуоресценции  $\lambda$  415 нм).

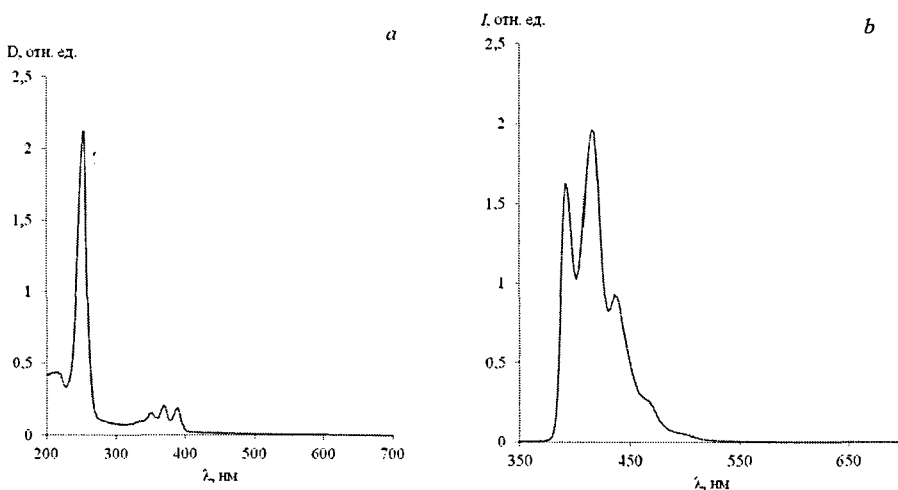
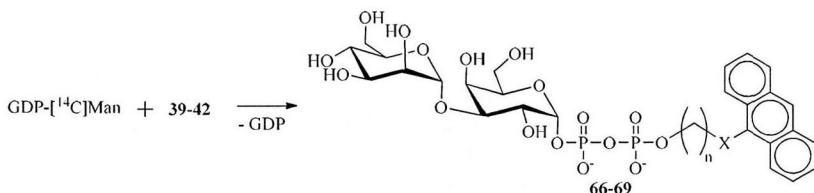


Рис.3 *a* – спектр поглощения дифосфата **39** (аммониевая соль),  $2 \cdot 10^{-5}$  М водный раствор; *b* – спектр флуоресценции дифосфата **39** (аммониевая соль),  $2 \cdot 10^{-5}$  М водный раствор.

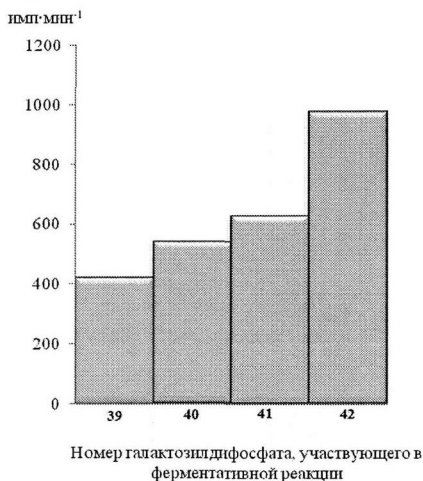
Способность дифосфатов **39–42** служить субстратами-акцепторами маннозилтрансферазы клеточных мембран бактерий *S. newport* и сравнение их эффективности в этом процессе определяли в ферментативных реакциях аналогично описанному выше протоколу (для каждого в двух независимых экспериментах). Так, соединения **39–42** инкубировали с препаратом клеточных мембран *S. newport*, содержащем указанную трансферазу, и, в качестве углеводного донора, радиоактивную GDP- $[^{14}\text{C}]$ Man (схема 14). Продукты ферментативных реакций **66–69** выделяли хроматографией на обращенной фазе C18 (картриджи SepPak).

Схема 14



66:  $n = 1$ ,  $X = -\text{CH}_2-$ ; 67:  $n = 6$ ,  $X = -\text{OCH}_2-$ ; 68:  $n = 11$ ,  $X = -\text{O}-$ ; 69:  $n = 16$ ,  $X = -\text{O}-$

Водорастворимые компоненты, включая непрореагировавший радиоактивный нуклеозиддифосфатсахар, элюировали водой, а липидсодержащие компоненты, в том числе, ожидаемые дифосфаты 66–69, – метанолом. Продукты реакции идентифицировали методом ТСХ по совпадению на пластинах флуоресцирующих (365 нм) и радиоактивных зон, что обнаруживает в составе молекул этих соединений фрагменты исходных гликозилакцепторов 39–42 и меченного маннозильного остатка.



**Рис. 4.** Сравнение уровней радиоактивности липофильных продуктов биохимических реакций с участием галактозилдифосфатов 39–42 и  $\text{GDP-}^{[14]\text{C}}\text{Man}$ , катализируемых маннозилтрансферазой из клеток *S. newport*.

При сопоставлении результатов ферментативных реакций в ряду галактозилпирофосфатов 39–42, сравнением уровней радиоактивности соответствующих метанольных фракций, можно сделать вывод, что самой высокой активностью в качестве

субстрата-акцептора маннозилтрансферазы клеточных мембран бактерий *S. newport* обладает соединением **42** с наибольшей протяженностью липидного фрагмента, а наименьшей – производное **39** с самым коротким липидным остатком (см. рис. 4).

Также, была проведена указанная ферментативная реакция с применением нерадиоактивной GDP-Map в качестве субстрата-донора и дифосфата **42** в качестве субстрата-акцептора с увеличением количества ее компонентов в 30 раз по сравнению с описанным выше экспериментом. Целевой продукт **69** выделяли с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе (RP-18) и идентифицировали масс-спектрометрией (ESI) высокого разрешения.

### Выводы

1. Разработаны оригинальные методы синтеза неизвестных ранее биологически активных аналогов бактериальных УФОС и УДФС, содержащих легко детектируемые фотоактивные группировки. В их числе:
  - (а) полученный впервые на основе растительных полипренолов аналог бактериального УФОС, содержащий феноксигруппу на  $\omega$ -конце олигоизопреновой цепи.
  - (б) серия новых неизопреноидных аналогов УФОС различной структуры, содержащих флуоресцентные группировки в составе их липофильных фрагментов;
  - (в) представители новых флуоресцентных аналогов УДФС неизопреноидной природы.
2. С использованием ферментативных систем ряда грамтрицательных бактерий показана способность вновь синтезированных соединений участвовать в иницировании (аналоги УФОС) и наращивании (аналоги УДФС) повторяющегося звена соответствующих О-антигенных полисахаридов и установлено, что эффективность синтетических субстратов-акцепторов растет с увеличением длины углеводородной цепи.
3. Показано влияние размеров липофильных фрагментов флуоресцентных аналогов ундекапренилдифосфатгалактозы на эффективность их участия в модельных ферментативных реакциях, катализируемых маннозилтрансферазой из клеток *Salmonella newport*.

**Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:**

1. Веселовский, В. В. Аналог ундекапренилфосфата, содержащий феноксигруппу на ω-конце олигоизопреновой цепи. / В.В. Веселовский, Л.Л. Данилов, А.Н. Винникова, Т.Н. Дружинина // Изв. АН. Сер.хим. – 2010. – №6. – С. 1240–1244.
2. Gao, Y. Functional identification of bacterial glucosyltransferase WbdN. / Y. Gao, A.N. Vinnikova, I. Brockhausen // Meth. Mol. Biol. – 2013. – V. 1022. – P. 199–214.
3. Vinnikova, A. N. Synthesis of a fluorescent acceptor substrate for glycosyltransferases involved in the assembly of O-antigens of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and O5. / A.N. Vinnikova, T.N. Druzhinina, L.L. Danilov, N.S. Utkina, V.I. Torgov, V.V. Veselovsky, B. Liu, L. Wang, I Brockhausen // Carbohydr. Res. – 2013. – V. 366. – P. 17–24.
4. Винникова, А. Н. Синтез и акцепторные свойства 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфата и P<sup>1</sup>-{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}-P<sup>2</sup>-(α-D-галактопиранозил)дифосфата в ферментативных реакциях, катализируемых галактозилфосфотрансферазой и маннозилтрансферазой *Salmonella newport*. / А.Н. Винникова, Н.С. Уткина, Л.Л. Данилов, В.И. Торгов, Т.Н. Дружинина, В.В. Веселовский // Биооргани. химия. – 2013. – Т. 39. – № 1. – С. 99–104.
5. Данилов, Л. Л. Синтез 11-[(2-пиридил)амино]- и 11-[(9-антраценилкарбонил)-амино]ундецилфосфата и исследование их акцепторных свойств в ферментативной реакции, катализируемой галактозилтрансферазами из клеток *Salmonella*. / Л.Л. Данилов, Н.М. Балагурова, А.Н. Винникова, Н.С. Уткина, В.И. Торгов, Н.А. Калинин, Т.Н. Дружинина, В.В. Веселовский // Биооргани. химия. – 2014. – Т. 40, № 1. – С. 99–107.
6. Wang, S. Characterization of two UDP-Gal: GalNAc-diphosphate-lipid β1,3-galactosyltransferases WbwC from *Escherichia coli* serotypes O104 and O5. / S. Wang, D. Czuchry, B. Liu, A.N. Vinnikova, Y. Gao, J.Z. Vlahakis, W.A. Szarek, L. Wang, L. Feng, I. Brockhausen // J. Bacteriol. – 2014. – V. 196. – P. 3122–3133.
7. Винникова, А. Н. Химико-ферментативный синтез фрагментов О-антигенных полисахаридов грамм-отрицательных бактерий с использованием синтетических липидных акцепторов / А.Н. Винникова, Т.Н. Дружинина, Л.Л. Данилов, В.В.

- Веселовский // V Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва – 2009. – С. 101.
8. Vinnikova, A. N. P<sup>1</sup>-11-(9-AntracenyImethoxy)undecyl, P<sup>2</sup>-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyra-nosyl diphosphate as an acceptor substrate analog for the study of glycosyl transferases involved in the biosynthesis of O-antigene repeating units / A.N. Vinnikova, V.I. Torgov, V.V. Veselovsky, I. Brockhausen // 8<sup>th</sup> National Symposium recent Advances in Carbohydrate Science, Banff Alberta, Canada – 2012. – P. 18.
9. Vinnikova, A. N. Synthesis and investigation of acceptor properties of 11-(9'-anthracenyl)methoxyundecyl diphosphate  $\alpha$ -d-galactose and 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -d-galactose in the enzymic reactions catalyzed by glycosyl transferases from *Salmonella newport* and *Escherichia coli* / A.N. Vinnikova T.N. Druzhinina, N.C. Utkina, V.I. Torgov, L.L. Danilov, I. Brockhausen, V.V. Veselovsky // 5<sup>th</sup> Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Russia, Suzdal – 2012. – P. 15.
10. Utkina, N. S. Chemical synthesis of fluorescent undecyl phosphate derivatives and assay of their acceptor properties in the enzymic reactions catalyzed by galactosylphosphotransferases from *S. anatum* and *S. newport* / N.S. Utkina, T.N. Druzhinina, A.N. Vinnikova, K.A. Demirova, V.I. Torgov, N.A. Kalinchuk, L.L. Danilov, V.V. Veselovsky // 5<sup>th</sup> Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Russia, Suzdal – 2012. – P. 15.
11. Винникова, А. Н. Синтез аналогов бактериальной ундекапренилдифосфогалактозы, содержащих флуоресцентную метку / А.Н. Винникова, К.А. Демирова, Т.Н. Дружинина, В.В. Веселовский // II Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология», Саратов – 2012. – С. 24.

7

Подписано в печать: 10.10.2014

Объем: 0,8 п.л.

Тираж: 80 экз. Заказ № 2023

Отпечатано в типографии «Реглет»

119526, г. Москва, Мясницкие Ворота д.1, стр. 3

(495) 971-22-77; [www.reglet.ru](http://www.reglet.ru)