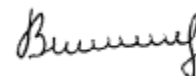


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



ВИННИКОВА Анна Николаевна

**СИНТЕЗ АНАЛОГОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО УНДЕКАПРЕНИЛФОСФАТА И
УНДЕКАПРЕНИЛДИФОСФАТСАХАРОВ**

02.00.03 – Органическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Веселовский Владимир Всеволодович

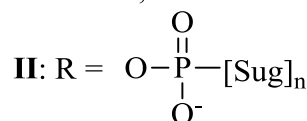
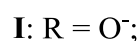
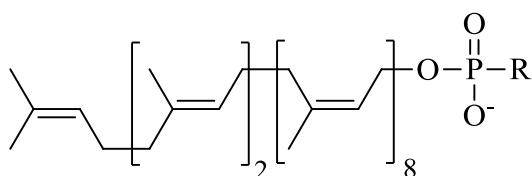
Москва — 2014

Оглавление

Введение.....	3
Синтез линейных изопреноидов, содержащих фотоактивные метки (обзор литературы). ...	5
1. Введение	5
2. Синтез линейных изопреноидов, содержащих флуоресцентные метки.	6
3. Синтез линейных изопреноидов, содержащих хромофорные метки.	18
4. Синтез линейных изопреноидов, содержащих фотоактивируемые метки.	22
5. Заключение	30
Обсуждение результатов.	31
1. Введение.	31
2. Синтез изопреноидного аналога бактериального ундекапренилфосфата, содержащий феноксигруппу на ω -конце олигоизопреновой цепи.	32
3. Синтез неизопреноидных флуоресцентных аналогов бактериального ундекапренилфосфата.	36
4. Синтез неизопреноидных флуоресцентных аналогов бактериальных ундекапренилдифосфатсахаров.	39
Экспериментальная часть.....	52
Выводы.....	81
Список сокращений	82
Список литературы	84

Введение

Ундекапренилфосфат **I** и ундекапренилдифосфатсахара **II** представляют собой уникальные природные соединения, которые принимают участие в биосинтезе таких углеводсодержащих биополимеров, как пептидогликаны, области связи тейхоевых кислот с пептидогликаном грамположительных бактерий, а также цепей O-специфических полисахаридов (O-антигенов) грамотрицательных бактерий, где ундекапренилфосфат играет ключевую роль в иницировании их сборки, а ундекапренилдифосфатсахара принимают участие в продолжении ее построения.



Sug = моносахаридный остаток

Тонкая структура O-антигенов определяет специфичность взаимодействия бактерии с другими биологическими системами, в том числе специфичность иммунного ответа высших животных и человека на инфекцию. Исследование 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 **I** и **II** ограничено сложностью их выделения из природных объектов, в которых, к тому же, они содержатся в чрезвычайно малых концентрациях. Преодолеть это препятствие оказалось возможным только посредством разработки эффективных методов синтеза биологически активных аналогов ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров. Особый интерес для развития данной области представляет использование синтетических и полусинтетических соединений, содержащих хромофорные и флуоресцентные группы атомов. Наличие последних позволяет надежно детектировать эти соединения и продукты реакций с их участием при выделении и анализе методами ВЭЖХ и ТСХ.

Предпосылкой настоящего исследования послужила обнаруженная канадскими (I. Brockhausen, et.al, Queen's University, Kingston) и российскими учеными (Т.Н. Дружинина и сотр. ИОХ РАН) возможность замены липофильного олигоизопренового фрагмента ундекапренилдифосфатсахаров и ундекапренилфосфата в их биологически активных аналогах на 11-феноксиундецил. В развитие этого направления, в данной работе

осуществлен синтез новых неизопреноидных соединений подобной структуры, в том числе, содержащих флуоресцентную метку. Синтезирован также изопреноидный аналог ундекапренилфосфата, содержащий фенокси группу в ω -изопреновом звене. Показана способность полученных соединений служить субстратами гликозил- и гликозилфосфотрасфераз ряда грамотрицательных бактерий в процессах инициирования сборки и наращивания полисахаридной цепи O-антигена.

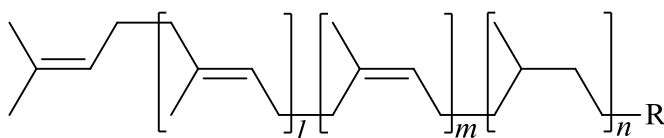
Работа выполнена в лаборатории полинепредельных соединений Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН и частично в университете Куинс (Queen's University, Kingston, Canada), в соответствии с планом НИР ИОХ РАН по темам «Разработка эффективных методов регио- и стереонаправленного синтеза, структурного анализа и переработки природных соединений и их аналогов с целью создания новых препаратов и материалов для использования в фундаментальных исследованиях живых систем, медицине, сельском хозяйстве, энергетике и других отраслях» (Рег. № 01200955060) и «Развитие методов регио- и стереонаправленного синтеза, структурного и конформационного анализа природных соединений и их аналогов с целью создания новых лекарственных веществ и материалов для использования в фундаментальных исследованиях живых систем, медицине, сельском хозяйстве, энергетике и других отраслях, а также в качестве компонентов диагностикумов и высокотехнологичных устройств» (Рег. № 01201352589). А также в соответствии с проектами, поддержанными Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 08-04-00556, № 10-04-00197 и № 13-04-00358).

Синтез линейных изопреноидов, содержащих фотоактивные* метки (обзор литературы).

1. Введение

Линейные изопреноиды регулярного строения, состоящие из изопреновых звеньев определенной конфигурации, соединенных по принципу «голова к хвосту» (см. рис. 1, R = OH, OPO₃²⁻, OP₂O₆³⁻ и др.), играют важную роль в метаболизме клеток. В частности, эти соединения участвуют в биосинтезе пренилированных белков (фарнезил- и геранилгеранилдифосфаты **1** и **2** соответственно)¹, играют важную роль в транспорте моносахаридов через клеточные мембраны и последующее включение их в биосинтез углеводов, гликопротеинов и гликолипидов (полипренолы **3**, долихолы **4** и их фосфаты **5** и **6** соответственно)²⁻⁴.

Рис. 1



1: $l = 2; m = n = 0; R = OP_2O_6^{3-}$

2: $l = 3; m = n = 0; R = OP_2O_6^{3-}$

3: $l = 2, 3; m > 3; n = 0; R = OH; (5: R = OPO_3^{2-})$

4: $l = 2; m = 8 - 20; n = 1; R = OH; (6: R = OPO_3^{2-})$

Учитывая важную биологическую роль линейных изопреноидов, изучение биохимических процессов с их участием имеет не только фундаментальное значение, но и представляет практический интерес. Так, в настоящее время на основе полученных сведений о метаболизме изопреноидов были разработаны и разрабатываются антибактериальные⁵, противораковые⁶⁻¹¹, противовирусные¹²⁻¹⁴, противопаразитарные^{15,16} и др. лекарственные препараты. Эффективными инструментами для изучения механизмов биохимических процессов с участием линейных изопреноидов являются их синтетические аналоги, содержащие фотоактивные метки. Введение последних в состав изопреноидов позволяет увеличить чувствительность детектирования этих соединений и их производных при анализе с помощью ВЭЖХ и ТСХ, применять флуоресцентную микроскопию для изучения локализации изопреноидов и их производных в клетках и

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

использовать методы FRET^{17,18} и фотореактивного зондирования^{19–21} для изучения особенностей взаимодействия субстрат–фермент (см. главы 2 – 4).

В настоящее время существует несколько областей применения содержащих фотоактивные метки изопреноидов, среди которых можно выделить три основных. Одной из них является изучение пренилирования белков, среди которых особое внимание привлекают онкопротеины суперсемейства Ras²². Они участвуют в передаче сигналов и контроле размножения клеток. Часто ошибки в биосинтезе Ras-белков могут привести к росту опухолей. Поиск возможностей ингибирования пренилирования Ras-белков является одной из стратегий борьбы с раком.⁷ Изопреноиды, содержащие фотоактивные группы, применяют также для исследования процессов с участием ундекапренилпирофосфатсинтазы (UPPS) – фермента, который катализирует биосинтез ундекапренилдифосфата. Последний является субстратом-акцептором ряда гликозилтрансфераз и участвует в биосинтезах гликоконъюгатов клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий. Изучение этих процессов также является еще одной областью применения фотоактивных изопреноидов. На ингибировании UPPS и некоторых гликозилтрансфераз основано действие ряда антибиотиков.^{23,24}

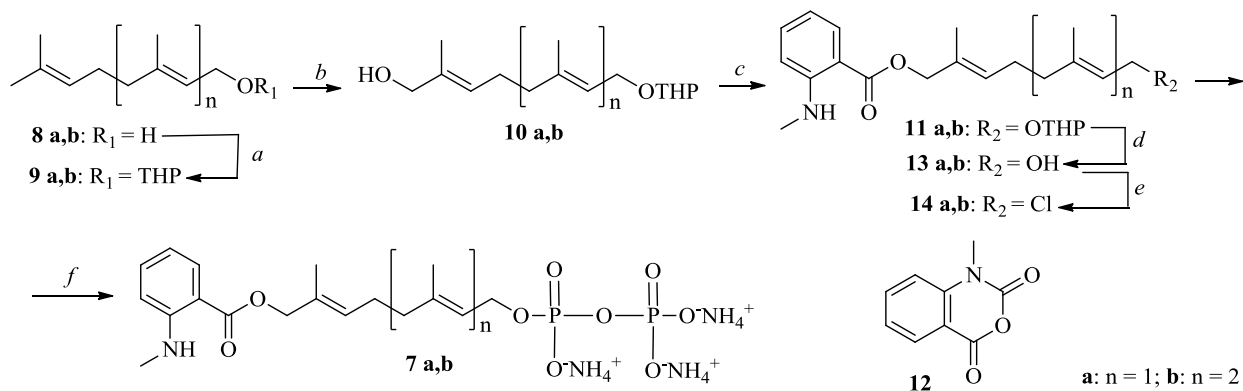
Настоящий обзор включает сведения по синтезу изопреноидов, содержащих фотоактивные метки в составе цепи, и областям их применения в биохимии, биотехнологии и т.д. Логичным представляется изложение материала по синтезу соединений этого класса, содержащих флуоресцентные, хромофорные и фотоактивируемые метки в трех отдельных главах соответственно.

2. Синтез линейных изопреноидов, содержащих флуоресцентные метки.

Одними из первых представителей изопреноидов с флуоресцентными метками были получены производные геранил- и фарнезилдифосфатов **7a** и **7b** (схема 1), содержащие остаток N-метилантранилата в 1999 году²⁵. Исходным соединением для синтеза соединения **7a** послужил коммерчески доступный гераниол **8a**. ТНР-Эфир **9a** подвергли окислению под действием оксида селена по известной методике²⁶ с образованием первичного спирта **10a**. Последний превратили в N-метилантранилат **11a** реакцией с N-метилизатовым ангидридом **12**. Полученный после удаления защитной группы ненасыщенный спирт **13a** переводили в хлорид **14a**, который дифосфорилировали с помощью гидропирофосфата трис-(тетра-*n*-бутиламмония), в результате чего было получено целевое флуоресцентное производное **7a**. Производное **7b** было синтезировано

по аналогичной схеме из фарнезола **8b**. Максимумы поглощения этих соединений практически совпали и зафиксированы при длине волны 340 нм, а максимумы флуоресценции – при 450 нм.

Схема 1



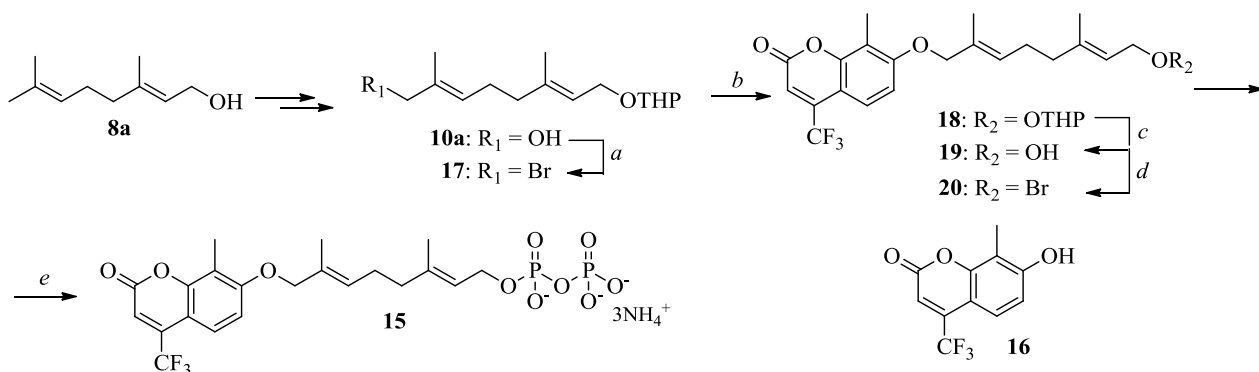
Реагенты и условия: (a) DHP, PPTs, CH_2Cl_2 ; (b) SeO_2 , t-BuOOH, салициловая кислота, CH_2Cl_2 ; (c) N-метилизатовый ангидрид **12**, Et_3N , DMAP, DMF; (d) PPTs, EtOH; (e) NCS, Me_2S , CH_2Cl_2 ; (f) $(n\text{-Bu}_4\text{N})_3\text{HP}_2\text{O}_7$, CH_3CN .

Флуоресцирующие изопреноиды **7a** и **7b** применяли для изучения везикулярного транспорта белка Rab 7 из суперсемейства Ras²⁷. Было показано, что они являются эффективными субстратами для Rab-геранилгеранилтрансферазы и присоединяются к транспортному белку Rab 7 под действием этого фермента. В дальнейшем эти соединения были использованы для синтеза флуоресцентно меченых липопротеинов, которые использовали в исследовании мутантных форм Ras-белков²⁸. В 2011 году было продемонстрировано, что N-метилантранилат **7a** также может быть субстратом для UPPS, выделенной из клеток *Escherichia coli*²⁹.

Еще одно производное **15**, содержащее флуоресцентный остаток 7-гидрокси-8-метил-4-трифторметилкумарина **16**, было получено исследователями из Китая³⁰ (схема 2). На первой стадии аллильный спирт **10a**, полученный из гераниола **8a** подвергли бромированию N-бромсукцинимидом, что привело к образованию бромида **17**. Последний превратили в ТНП-эфир **18** и конденсировали с замещенным кумарином **16**. После удаления защиты аллильный спирт **19** действием тетрабромметана перевели в ненасыщенный бромид **20**, который дифосфорилировали с помощью гидропирофосфата трис-(тетра-*n*-бутиламмония). Максимум поглощения для целевого соединения **15** наблюдали при 336 нм, а максимум флуоресценции – при 460 нм.

Дифосфат **15** был использован для характеристики UPPS *E. coli*³¹ и способен выступать не только в роли эффективного субстрата-акцептора, но и ингибировать этот фермент.³⁰

Схема 2

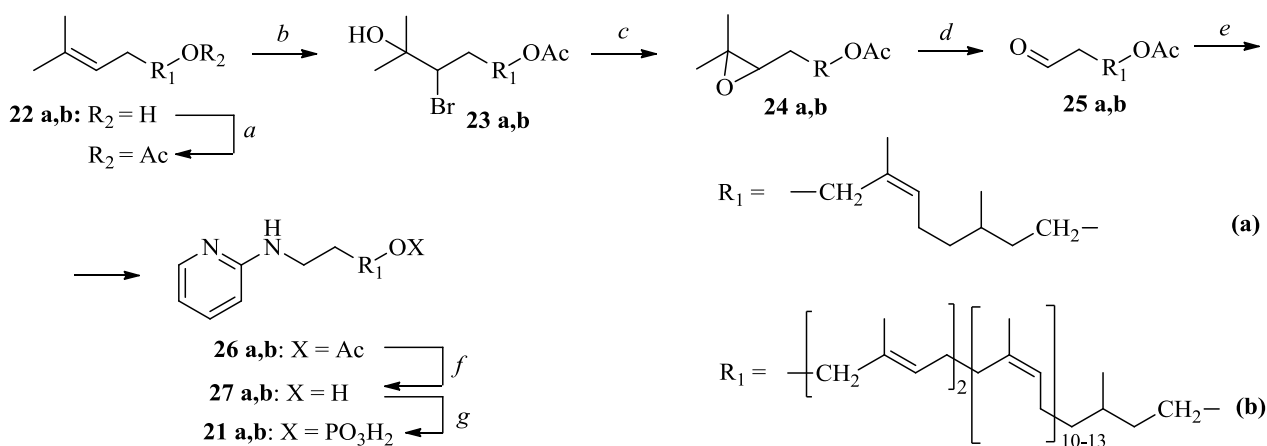


Реагенты и условия: (a) NBS, Me₂S, CH₂Cl₂; (b) K₂CO₃, DMF, **16**; (c) PPTs, EtOH; (d) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂; (e) (n-Bu₄N)₃HP₂O₇, CH₃CN.

Исследователями из Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН в 2001 году был разработан метод³², позволивший впервые осуществить синтез соединений, содержащих флуорофор в ω-звене олигоизопреновой цепи аналогов долихилфосфатов. В качестве флуорофорной группы был использован остаток 2-аминопиридина.

Первоначально авторами данной работы был проведен модельный синтез короткоцепного фосфата **21a** (схема 3).

Схема 3

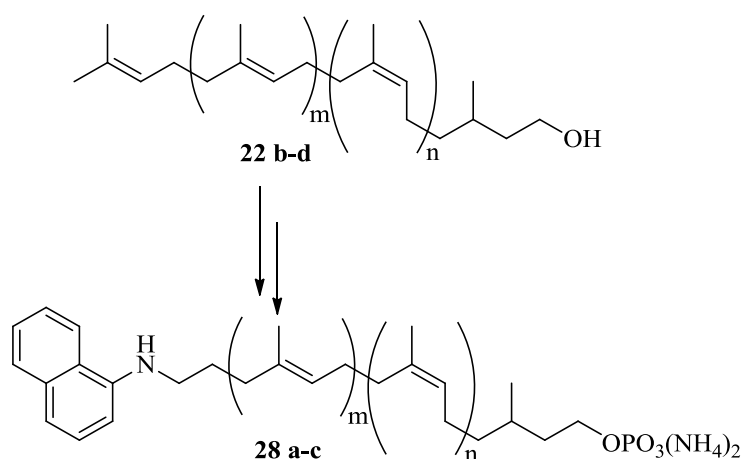


Реагенты и условия: (a) Ac₂O, Py; (b) NBS, THF-H₂O; (c) 1. K₂CO₃, MeOH 2. Ac₂O, Py; (d) HIO₄·2H₂O, THF; (e) 2-аминопиридин, NaBH(Ac)₃, (CH₂Cl)₂; (f) K₂CO₃, MeOH; (g) (n-Bu₄N)₃H₂PO₄, CCl₃CN, CH₂Cl₂.

Так, в ходе данного синтеза олигоолефины **22a** эпоксидалировали по ван Тамелену, что через стадию образования бромгидрина **23a** привело к эпоксиду **24a**. Окислительное расщепление полученных ацетоксиэпоксидов под действием $\text{HIO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ привело к образованию альдегида **25a**. Для получения производного 2-аминопиридина **26a** была использована методика восстановительного аминирования соединения **25a** в присутствии $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. Полученное таким образом ацетоксипроизводное **26a** было превращено в спирт **27a**, из которого далее синтезировали соответствующий фосфат **21a** с использованием разработанного в этом же Институте и хорошо зарекомендовавшего себя ранее метода³³. Аналогичным образом были получены производные долихилфосфатов **21b** на основе доступной смеси полусинтетических (\pm)-терпенолов **22b**.

Позднее, применяя аналогичную схему синтеза, были получены производные долихилфосфатов, содержащие флуоресцентную 1-аминонафталиновую группировку на ω -конце олигоизопреновой цепи³⁴ (схема 4). Исходными материалами для синтеза фосфатов **28 a-c** послужили смеси рацемических спиртов **22b-d**.

Схема 4



22: $m = 2, n = 10-13$ (**b**); $m = 3, n = 6, 7$ (**c**); $m = 2, n = 3, 4$ (**d**)

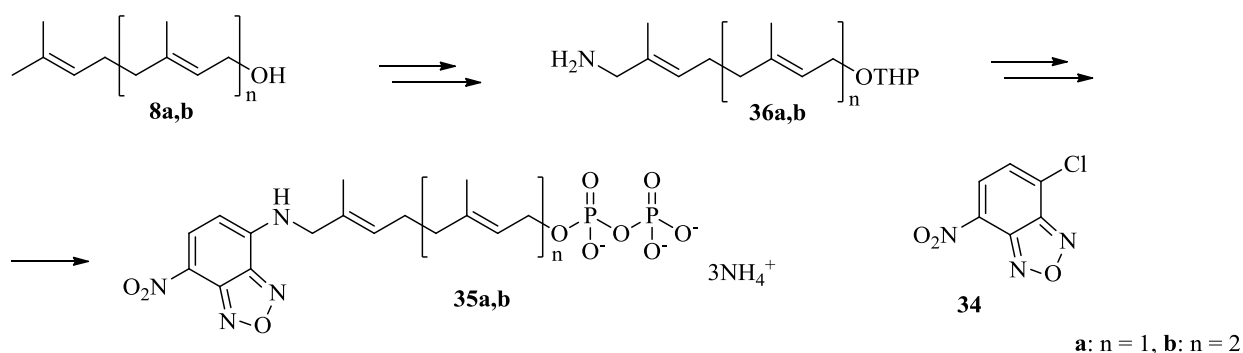
28: $m = 2, n = 12$ (**a**); $m = 3, n = 6$ (**b**); $m = 2, n = 4$ (**c**)

Биохимические исследования фосфатов **21b** и **28a-c** показали, что эти соединения являются эффективными субстратами для дрожжевой маннозилтрансферазы, катализирующей синтез долихилманнозилфосфата (важного интермедиата при биосинтезе углеводных цепей гликопротеинов) из долихилфосфата и гуанидиндифосфатманнозы (GDP-Man). Далее была установлена принципиальная возможность применения этих флуоресцентных аналогов долихилфосфата для изучения топологии фермент-субстратного комплекса с помощью метода FRET.³⁵ Максимум поглощения для соединений **28b-d** наблюдали при 340 нм, максимум флуоресценции – при 410 нм,

структуры маннозилтрансферазы из *Saccharomyces cerevisiae*, а также особенностей взаимодействия этого фермента с субстратом-акцептором методом FRET.³⁷

Другой меткой, применяемой в синтезе флуоресцентных изопреноидов, является остаток 4-хлор-7-нитробензофуразана **34** (схема 6), который использовали для синтеза фотоактивных производных **35a,b**.³⁸ Исходными соединениями для синтеза дифосфата **35a** послужил гераниол **8a**, из которого в 4 стадии получили аминопроизводное **36a**. Последнее использовали для синтеза целевого изопреноида **35a**, применяя аналогичную последовательность процедур, как и в случае превращения ТНР-эфира **10a** в дифосфат **7a** (схема 1). Флуоресцентный изопреноид **35b** был получен тем же способом из фарнезола **8b**.

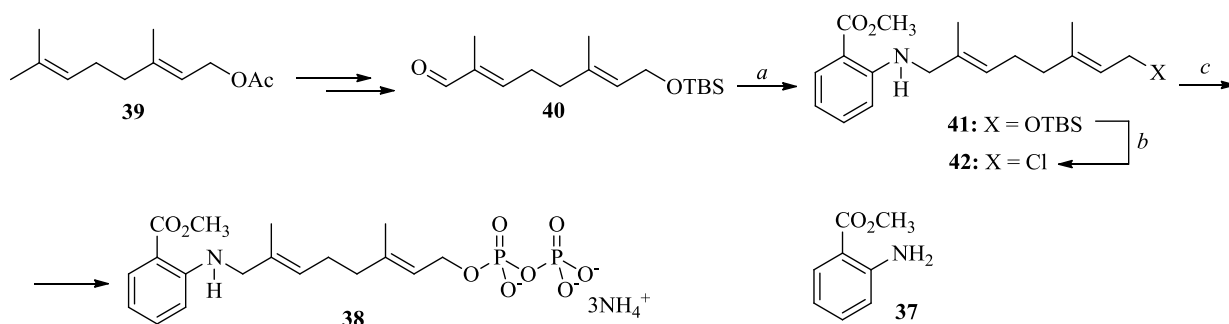
Схема 6



Максимумы поглощения и флуоресценции для соединений **35a,b** совпадают и находятся при длинах волн 487 нм и 550 нм соответственно. Эти соединения оказались эффективными субстратами-донорами липидов для ряда пренилтрансфераз и оказывали ингибирующее действие на некоторые из них.³⁸ Кроме того, производные **35a,b** применялись для наблюдения за их локализацией и взаимодействием с Ras-белками *in vivo* в клетках эпидермоидной карциномы человека.³⁸

В 2004 году американскими учеными было получено несколько новых флуоресцентных аналогов фарнезил- и геранилгеранилдифосфатов.³⁹ Один из них содержал остаток метилантранилата **37** (соединение **38** на схеме 7). Для его синтеза использовали геранилацетат **39**, который в 4 стадии был превращен в альдегид **40**. Последний вводили в реакцию восстановительного аминирования с антранилатом **37** в присутствии $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ с образованием ненасыщенного амина **41**. Его через стадию образования хлорида **42** превратили в дифосфат **38**. Максимум флуоресценции этого соединения расположен при 422 нм.

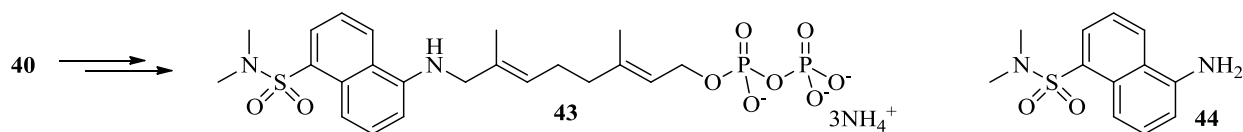
Схема 7



Реагенты и условия: (a) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH , $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$; (b) 1) TBAF, THF; 2) NCS, Me_2S , CH_2Cl_2 ; (c) $(n\text{-Bu}_4\text{N})_3\text{HP}_2\text{O}_7$, CH_3CN .

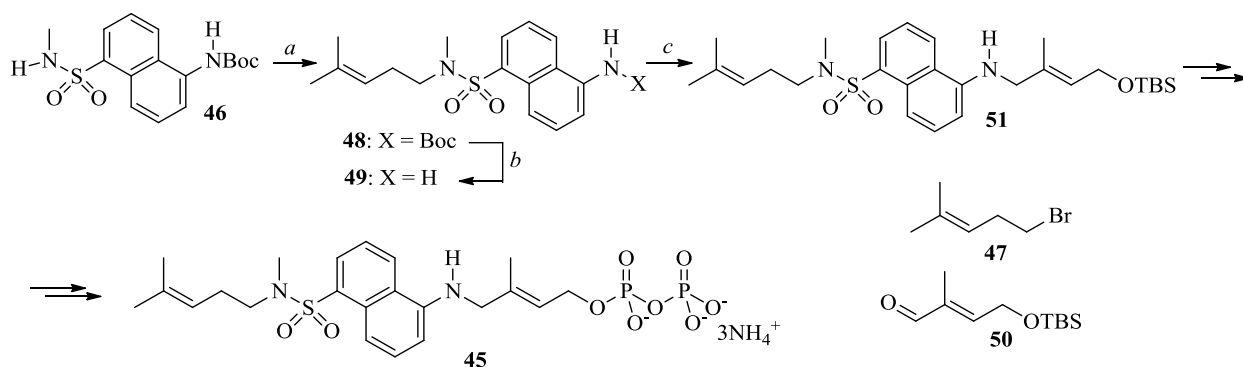
Пользуясь описанной выше последовательностью превращений, был получен флуоресцентно меченый изопреноид **43**, содержащий остаток замещенного нафтиламина **44** (схема 8). Исходным соединением для синтеза дифосфата **43** послужил альдегид **40**. Максимум поглощения для целевого соединения **43** наблюдали при 394 нм, а максимум флуоресценции – при 537 нм.

Схема 8



Другое синтетическое соединение, описанное в этой работе, содержало ту же флуоресцентную метку и два изопреноидных фрагмента (соединение **45** на схеме 9).

Схема 9



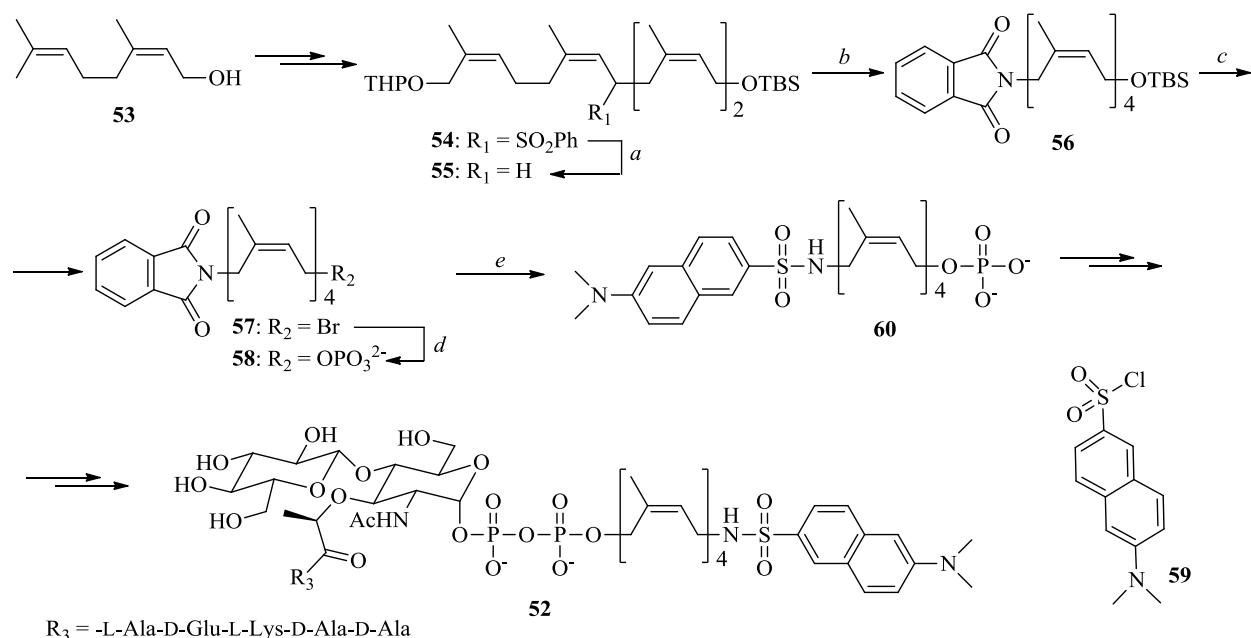
Реагенты и условия: (a) **47**, NaN , DMF; (b) HBr , AcOH ; (c) **50**, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, AcOH , $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$.

Для его синтеза использовали производное **46**, которое вводили в реакцию с аллилбромидом **47** с образованием соединения **48**. Амин **49**, полученный после удаления защитных групп, реакцией с акролеином **50** превратили в производное **51**. Последнее аналогично описанному выше в три стадии трансформировали в целевой дифосфат **45**.

Полученные изопреноиды **38**, **43** и **45** использовали для изучения с помощью флуоресцентной микроскопии особенностей проникновения пренилдифосфатов сквозь мембрану клеток, на примере клеток лейкемии RPMI-8402.³⁹ Кроме того, в ходе исследования было выяснено, что производное **38** является ингибитором некоторых фарнезилтрансфераз.³⁹

Для мечения синтетического аналога липида II **52**, полученного в 2010 году, также был применен дансил⁴⁰ (схема 10).

Схема 10



Реагенты и условия: (a) Na, EtOH; (b) 1) PPTs, MeOH; 2) MsCl, LiCl, DMF; 3) Фталимид калия, DMF; (c) 1) TBAF, THF; 2) PBr₃, Et₂O; (d) Bu₄NH₂PO₄, CH₃CN; (e) 1) Гидразин, EtOH; 2) **59**, ацетон, NaHCO₃.

Для синтеза этого соединения использовали нерол **53**, который первоначально превратили в интермедиат **54**. Десульфонилированием последнего получали изопреноид **55**, который затем в три стадии превращали в фталимид **56**. Удаления защитной TBS-группы соединения **56** привело к образованию соответствующего спирта, который затем бромировали с помощью PBr₃. Фосфат **58** получали фосфорилированием бромиды **57** обработкой дигидрофосфатом тетрабутиламмония. Это соединение через стадию

расщепления фталимидной группы гидразином с образованием соответствующего амина и взаимодействием последнего с дансилхлоридом **59** превратили в фосфат **60**. Его использовали для синтеза целевого гликоконъюгата **52**. Максимумы поглощения и флуоресценции для этого соединения были зафиксированы при 340 нм и при 520 нм соответственно.

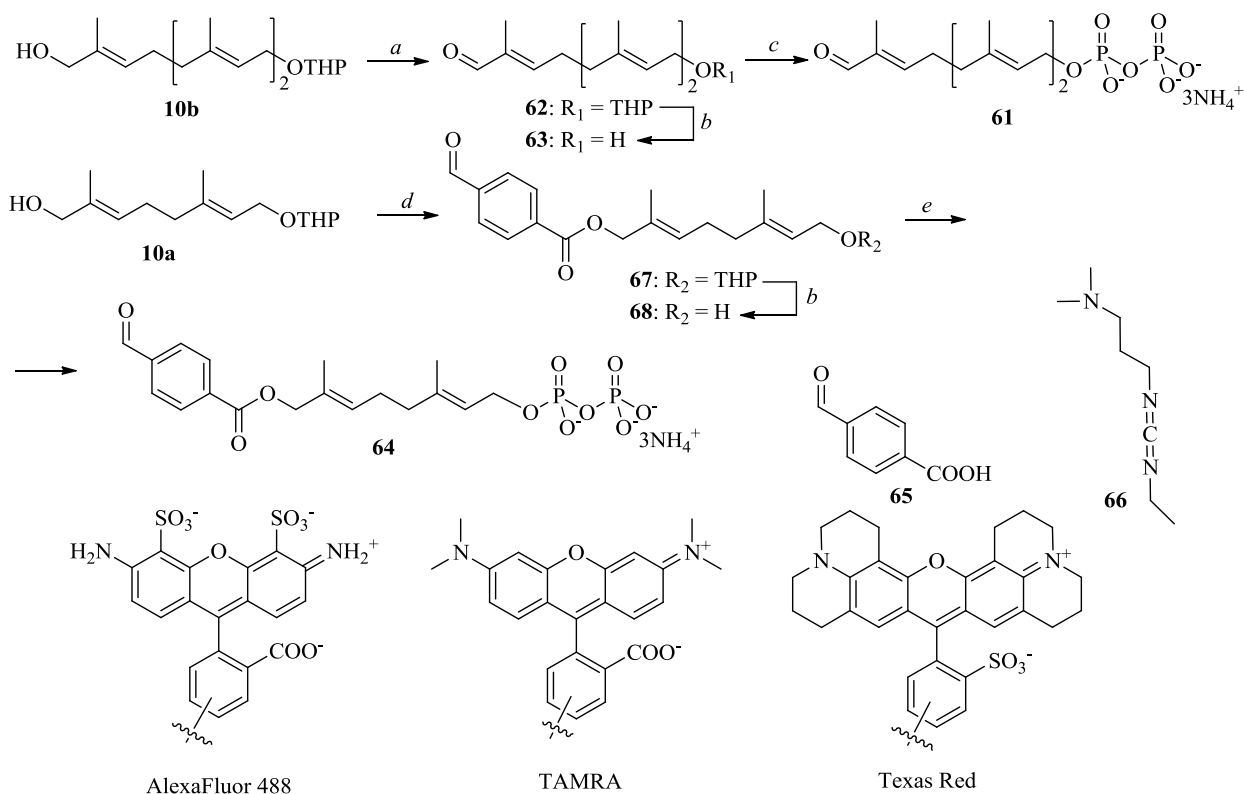
Гликоконъюгат **52** был использован для изучения активности трансгликозилаз из клеток *Clostridium difficile* и *Echerichia coli* и, как было показано, может выступать в роли эффективного ингибитора этих ферментов.⁴⁰

Изопреноиды используют для введения флуорофоров в белки при помощи специфического пренилирования аминокислотных фрагментов. Полученные конъюгаты применяют для детектирования белков в процессе изучения их функционирования как *in vitro*, так и в живой клетке.^{41–45} Для этой цели применяют производные пренилдифосфата (редко изопренола, см. ниже), содержащие альдегидную, алкиновую или азидную группы (химически активные группы), чаще всего, в ω-концевом положении изопреноидов. Затем модифицированный пренилдифосфат вводят в белок ферментативным пренилированием. На заключительном этапе флуорофор селективно присоединяют к химически активной группе атомов на конце изопреноида.

Так, в литературе описано содержащее альдегидную группу производное фарнезилпирофосфата **61**, который использовали для введения остатков флуоресцентных красителей Alexa Fluor 488, TAMRA и Texas Red в модельный белок GFP (схема 11).⁴⁶ Исходным соединением для его синтеза послужил фарнезол, из которого по описанной выше последовательности превращений получили аллильный спирт **10b**. Последний окислили до альдегида **62**. Спирт **63**, полученный после депротекции соединения **62**, дифосфорилировали с образованием дифосфата **61**.

В 2012 году был описан аналог **64** геранилдифосфата (схема 11), содержащий арилальдегидную группу в конце цепи.⁴⁷ Его также применяли для введения остатков флуоресцентных красителей TAMRA и Texas Red в GFP. Для его синтеза использовали описанный выше непредельный спирт **10a**, полученный из гераниола. Это соединение конденсировали с формилбензойной кислотой **65** в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид **66** (EDC), с образованием сложного эфира **67**. Целевой дифосфат **64** был получен дифосфорилированием аллильного спирта **68** с помощью гидрофосфата бис-триэтиламина.

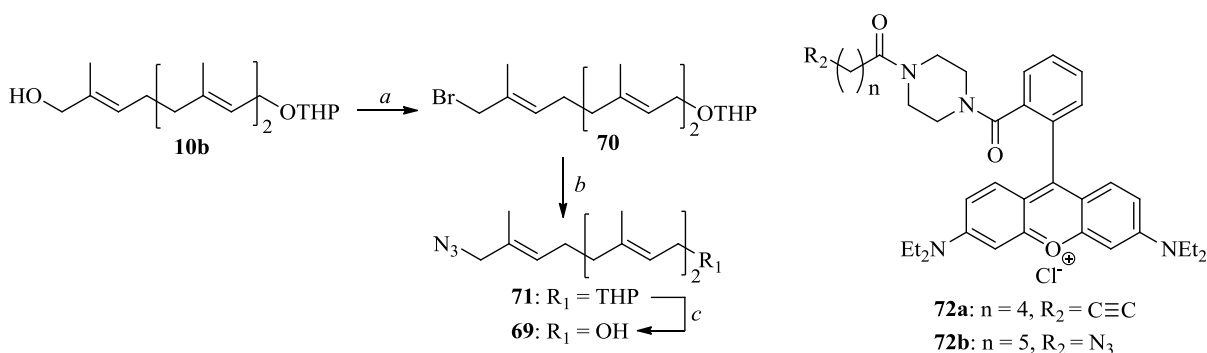
Схема 11



Реагенты и условия: (a) DMSO, $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$, Et_3N ; (b) PPTs, *i*-PrOH; (c) 1) CBr_4 , PPh_3 , CH_2Cl_2 ; 2) $(n\text{-Bu}_4\text{N})_3\text{HP}_2\text{O}_7$, CH_3CN (см. лит.⁴⁶) или $(\text{Et}_3\text{NH})_2\text{HPO}_4$, Cl_3CCN (см. лит.⁴⁷) (d) EDC, DMAP, **65**; (e) $(\text{Et}_3\text{NH})_2\text{HPO}_4$, Cl_3CCN .

Другими, часто используемыми интермедиатами для введения флуорофоров в молекулы белка являются, как упоминалось выше, азидосодержащие изопреноиды. Так, в 2011 году был описан синтез производного фарнезола **69**, содержащего азидную группу в конце изопреновой цепи⁴⁸ (схема 12).

Схема 12



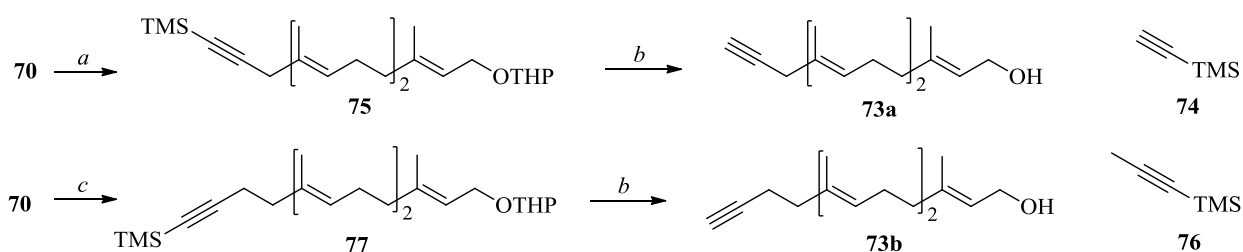
Реагенты и условия: (a) NBS, Me_2S , CH_2Cl_2 ; (b) NaN_3 , DMSO; (c) PPTs, EtOH.

Это соединение применяли для введения остатка производного флуоресцентного красителя родамина В **72a** в Т-лимфоциты человека (Jurkat T) *in vivo*. Для его синтеза

исходный аллильный спирт **10b** действием N-бромсукцинимидом переводили в бромид **70**, и далее через промежуточный азид **71** получали целевое соединение **69** после удаления THP-защитной группы из изопреноида **71**.

Еще одними часто применяемыми реагентами для пренилирования белков с последующим присоединением флуоресцентной метки по ω-концу пренильного радикала являются изопреноиды, содержащие терминальную тройную связь. Так, американскими исследователями были получены этинильные производные фарнезола **73a,b**,⁴⁸ которые использовали для введения остатка производного флуоресцентного красителя родамина В **72b** (см. схему 12) в Т-лимфоциты человека *in vivo* (схема 13).

Схема 13

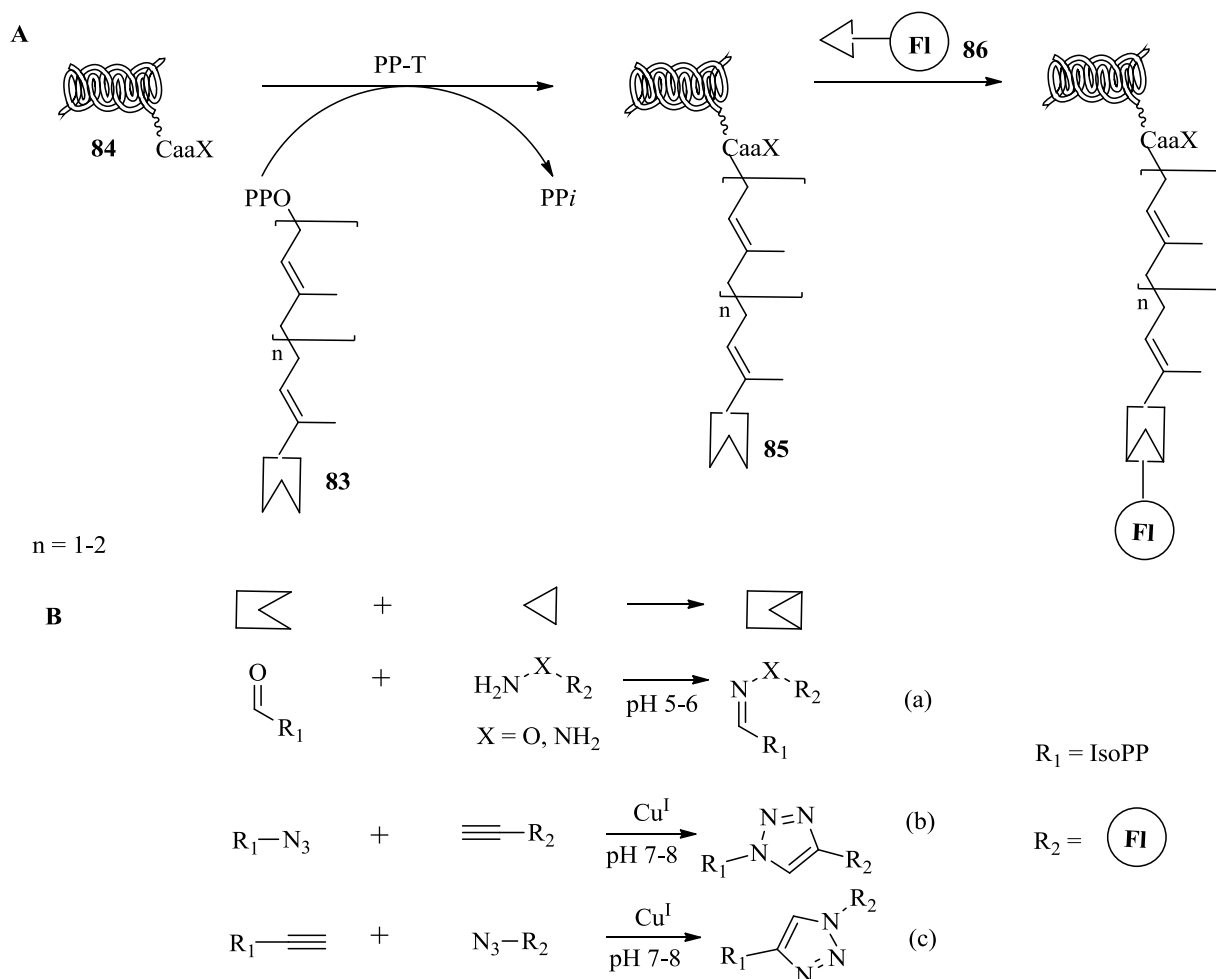


Реагенты и условия: (a) **74**, CuI, K₂CO₃, Na₂SO₃, DMF; (b) 1) PPTs, EtOH; 2) TBAF, THF; (c) **76**, *n*-BuLi, THF.

Для синтеза гидроксиалкина **73a** бромид **70** алкинилировали TMS-ацетиленом **74** с образованием производного **75**. Последовательное удаление THP и TMS-групп привело к образованию целевого аллильного спирта **73a**. Его гомолог **73b** получали алкилированием аллильного бромида **70** с использованием металлированного производного TMS-пропина **76**, что привело к образованию изопреноида **77**.

В 2013 году опубликован синтез пренилдифосфата **78** (схема 14), содержащего две активные группы атомов – альдегидную и этинильную.⁴⁹ Это соединение позволило одновременно ввести в модельный белок GFP остаток флуоресцентного красителя, содержащий азидную группировку – TAMRA–N₃, и используемый в медицине цилиарный нейротропный фактор (ЦНТФ или CNTF).⁴⁹ Для его синтеза использовали аллильный бромид **79**, полученный в две стадии из гераниола. Его конденсировали с производным фенола **80** с образованием эфира **81**. Спирт **82**, полученный после удаления THP-защитной группы из соединения **81**, дифосфорилировали действием гидрофосфата триэтиламмония, что привело к получению целевого дифосфата **78**.

Схема 15

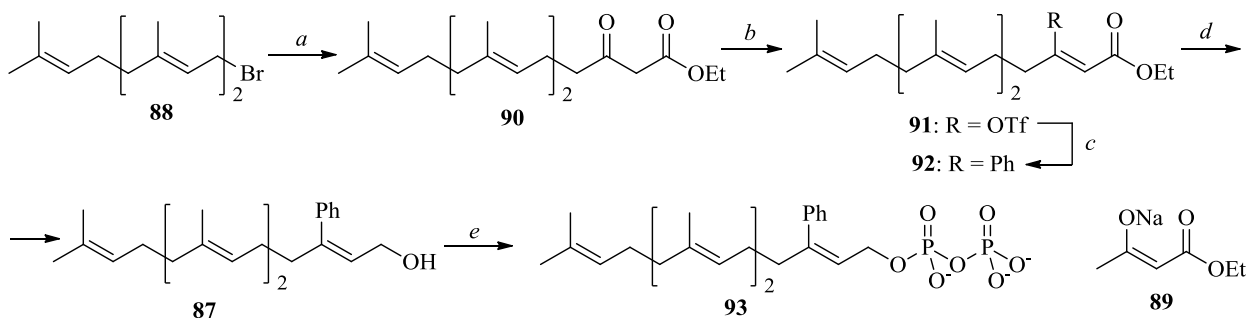


3. Синтез линейных изопреноидов, содержащих хромофорные метки.

Одним из наиболее простых из хромофоров, применяемых для синтеза биологически активных соединений, является остаток бензола.⁵⁹⁻⁶² Его использовали в синтезах различных изопреноидов, в том числе производного геранилгераниола **87**⁶³ (схема 16). Исходным соединением для его получения послужил фарнезилбромид **88**, который конденсировали с генерируемым *in situ* из натрийацетилацетоуксусного эфира **89** дианионом с образованием эфира **90**. Трифлат **91**, полученный из ацетоуксусного эфира **90**, алкилировали с помощью трибутилфенилстаннана в присутствии иодида одновалентной меди⁶⁴ с образованием сложного эфира **92**, восстановление которого DIBAH привело к целевому аллильному спирту **87**. Последний превращали в соответствующий дифосфат **93** и, наряду с другими подобными соединениями, использовали для пренилирования α -фактора – белкового феромона, продуцируемого грибками *Saccharomyces cerevisiae* – с целью изучения влияния гидрофобных заместителей на биологическую активность этого феромона.^{63,66} Позднее для получения

фенилпроизводного **92** было предложено использовать реакцию Сузуки, что заметно увеличило эффективность арилирования трифлата **91**⁶⁵.

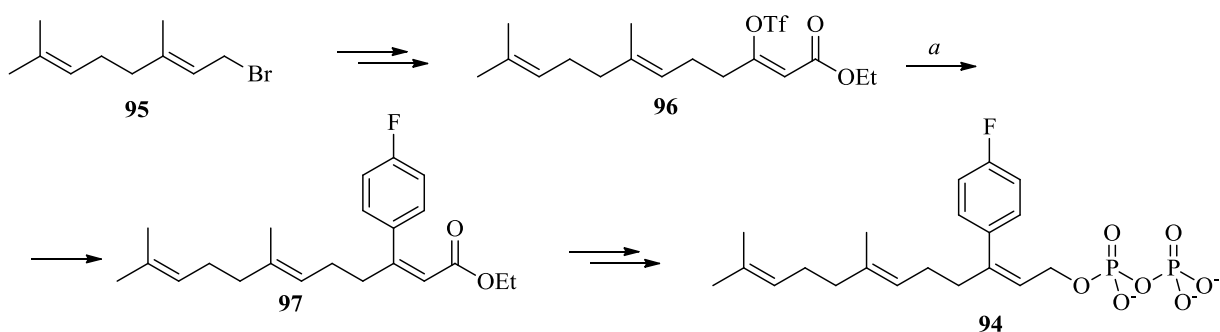
Схема 16



Реагенты и условия: (a) **89**, KN, *n*BuLi, THF; (b) KN, ArNTf₂, THF; (c) PhSnBu₃, Pd(AsPh)₃, NMP (см. лит. ⁶³) или PhB(OH)₂, Pd(AsPh)₃, Ag₂O, THF (см. лит. ⁶⁵); (d) DIBALH, PhMe; (e) 1) NCS, Me₂S, CH₂Cl₂; 2) (n-Bu₄N)₃HP₂O₇, CH₃CN.

В 1999 году для изучения путей ингибирования фарнезил- и геранилгеранилтрансфераз был использован дифосфат **93**, полученный в две стадии из спирта **87**⁶⁷ (схема 16). Позднее для тех же целей был синтезирован дифосфат **94**⁶⁸ (схема 17).

Схема 17

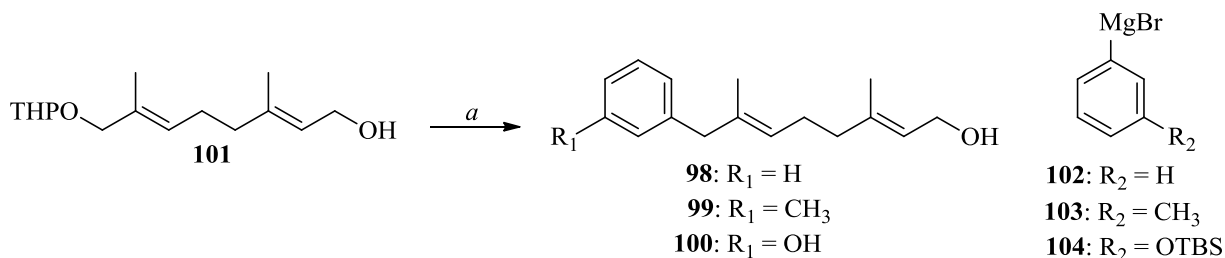


Реагенты и условия: (a) 4-F-PhMgBr (4-фторфенилмагниийбромид), CuCN, Et₂O.

Для его синтеза аналогично описанной выше последовательности реакций геранилбромид **95** превращали в трифлат **96**, который арилировали с помощью 4-фторфенилмагниийбромид в присутствии цианида одновалентной меди с образованием производного **97**. Последнее в три стадии превратили в пиродифосфат **94**.

Метод арилирования с помощью реактивов Гриньяра в присутствии солей одновалентной меди использовали также в получении арилгераниолов **98**, **99** и **100** (см. лит.⁶⁹) (Схема 18). Для их синтеза использовали ТНР-эфир **101** и магниийорганические соединения **102**, **103** и **104** соответственно.

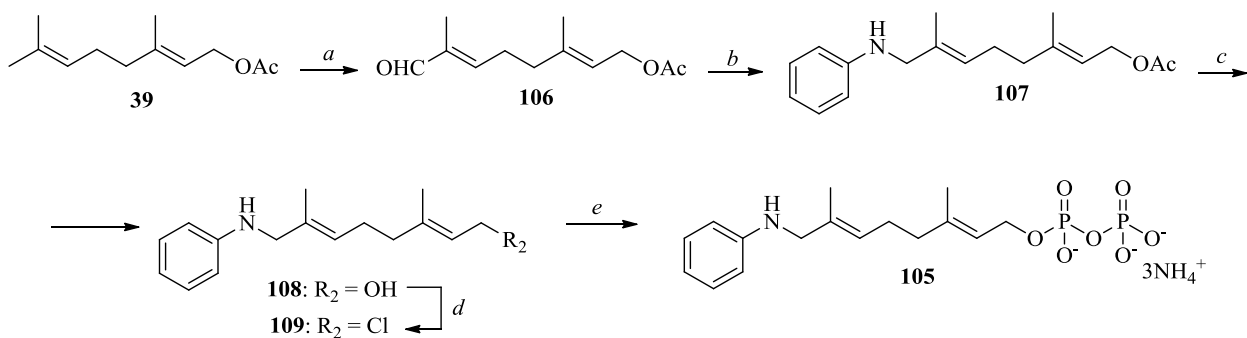
Схема 18



Реагенты и условия: (a) **102** (для **98**) или **103** (для **99**), CuI, THF; 1) **104** для **100**, CuI, THF; 2) TBAF.

Для изучения функционирования Ras-белков было также получено производное гераниола **105**, которое содержит остаток анилина⁷⁰ (схема 19). В качестве исходного соединения для его синтеза был использован ацетат гераниола **39**, который окислили в альдегид **106**. Последний подвергли восстановительному аминированию анилином в присутствии NaBH(OAc)₃ с образованием арилалкиламина **107**. Его гидролиз дал аллильный спирт **108**, который галогенировали действием дихлорида трифенилфосфина в присутствии основания Хюнига, что привело к образованию малостабильного аллильного хлорида **109**. Целевой дифосфат **105** был получен обработкой хлорида **109** гидропирифосфатом трис-(тетра-*n*-бутиламмония).

Схема 19



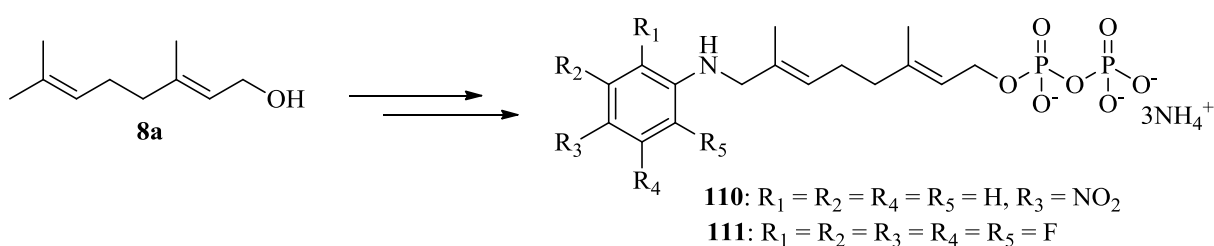
Реагенты и условия: (a) 1) SeO₂, *t*-BuOOH, салициловая кислота, CH₂Cl₂; 2) MnO₂, CH₂Cl₂; (b) анилин, NaBH(OAc)₃, AcOH, (CH₂Cl)₂; (c) K₂CO₃, H₂O, MeOH; (d) Ph₃PCl₂, *N,N*-диизопропилэтиламин (основание Хюнига), CH₃CN; (e) (*n*-Bu₄N)₃HP₂O₇, CH₃CN.

Изопреноид **105** способен также ингибировать геранилгеранилтрансферазу, участвующую в пренилировании Ras-белков, и скваленсинтазу, которая вовлечена в биосинтез холестерина. Дифосфат **105** может быть также использован для изучения функционирования фарнезилтрансфераз в клетках^{71,72}.

Позднее для исследования влияния структуры аналогов фарнезилдифосфата на ГТ (фарнезилтрансфераза), пользуясь аналогичной последовательностью превращений, из гераниола **8a** был получен ряд фотоактивных изопреноидов, среди которых производные, содержащие остатки *para*-нитроанилина **110** и пентафторанилина **111**⁷³ (схема 20). Для их синтеза стадию восстановительного аминирования проводили с коммерчески доступными *para*-нитроанилином и с пентафторанилином соответственно.

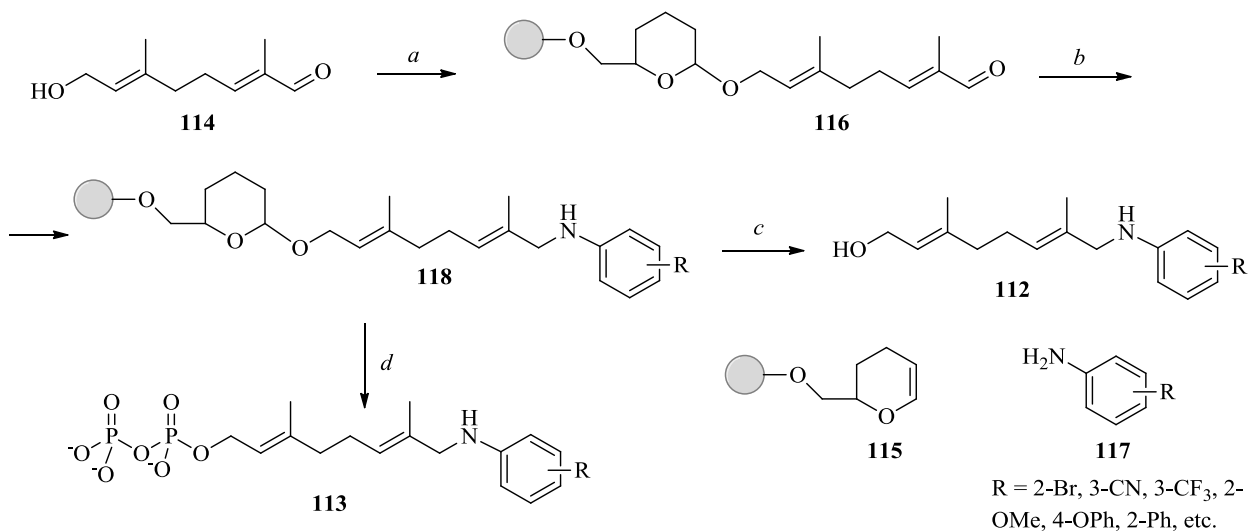
8-(Ариламино)геранилпирофосфат **110** позднее был также использован для изучения биосинтеза ундекапренилдифосфата и гликоконъюгатов грамотрицательных бактерий *Bacteriodes fragilis* и *Campylobacter jejuni*.⁷⁴⁻⁷⁶

Схема 20



С помощью органического синтеза на твердой фазе^{77,78} в 2005 году была получена серия ариламинопроизводных гераниола **112** и геранилдифосфата **113**, содержащих различные заместители в ароматическом ядре.⁷⁹ На схеме 21 представлены лишь некоторые из них. Для синтеза этих соединений использовали аллильный спирт **114**, который вводили в реакцию с ТНР-полимером **115**, полученный по описанной методике.⁸⁰

Схема 21



Реагенты и условия: (a) **115**, PPTs, (CH₂Cl)₂; (b) **117**, NaBH(OAc)₃, AcOH, THF/(CH₂Cl)₂; (c) PPTs, MeOH/(CH₂Cl)₂; (d) 1) Ph₃PBr₂, CH₂Cl₂; 2) (n-Bu₄N)₃HP₂O₇, CH₃CN.

Восстановительное аминирование акролеина **116** с замещенными анилинами **117** дало конъюгаты **118**, которые можно превратить в спирты **112** или фосфорилировать с образованием дифосфатов **113**.

Последние использовали для изучения влияния заместителей в ароматическом ядре на биологическую активность этих соединений в процессе пренилирования Ras-белков ооцитов южноафриканской лягушки *Xenopus laevis*. Исследования показали, что аналоги **112** с гидрофобностью, близкой к природному фарнезилдифосфату ($R = 4\text{-Br}, 3\text{-Et}$), проявляли субстратные свойства в данной реакции, тогда как гидрофильные аналоги ($R = 4\text{-NO}_2, 4\text{-CN}$) ингибировали FT.⁸¹ Положение заместителя в остатке анилина также влияло на биологическую роль дифосфатов **112**. Так оказалось, что *мета*- и *пара*-трифторметоксипроизводные **113** ($R = 3\text{-OCF}_3$ и 4-OCF_3 соответственно) являлись субстратами для FT, а орто-производное **113** ($R = 2\text{-OCF}_3$) ингибировало фермент.⁸²

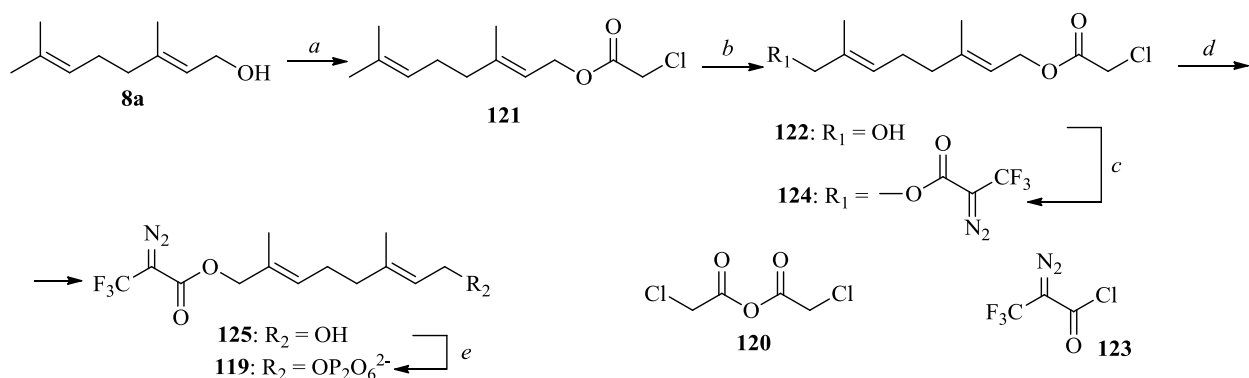
4. Синтез линейных изопреноидов, содержащих фотоактивируемые метки.

Главной отличительной чертой фотоактивируемых изопреноидов является то, что они при освещении образуют высокоректинноспособный интермедиат, который может ковалентно связываться с находящимися рядом молекулами или частями макромолекул. Для детектирования продуктов сшивки – макромолекулы и в конечном счете участка(ов) ее модификации – фотоактивируемые соединения должны содержать репортерную группу (радиоактивную, хромофорную, флуоресцентную или иммунореактивную). В результате анализа продуктов сшивки можно однозначно определить, с какими молекулами находились в контакте фотоактивные соединения в момент фотолиза. На этом свойстве соединений, содержащих фотоактивируемые метки (фотофоры), основан принцип действия метода фотоафинного мечения (фотореактивного зондирования).²⁰

Одним из первых среди фотоактивируемых линейных изопреноидов было получено содержащее диазогруппу производное геранилдифосфата **119**⁸³, для синтеза которого использовали гераниол **8a** (Схема 22). На первой стадии его защищали с помощью хлоруксусного ангидрида **120**. Полученный эфир **121** окисляли до аллильного спирта **122**, который затем ацилировали 2-диазо-3-трифторпропионилхлоридом **123** с образованием соединения **124**. Полученный после удаления защитной хлорацетильной группы спирт **125** дифосфорилировали с образованием целевого дифосфата **119**. Его субстратные свойства исследовали в реакции с UPPS из грамположительных лактобактерий *Lactobacillus plantarum*. Было показано, что субстратная активность синтетического фотоактивируемого производного **119** составила 47% от природного фарнезилдифосфата. Кроме того

оказалось, что облучение UPPS в присутствии diazосоединения **119** УФ-светом с длиной волны 254 нм полностью инактивировало фермент.

Схема 22

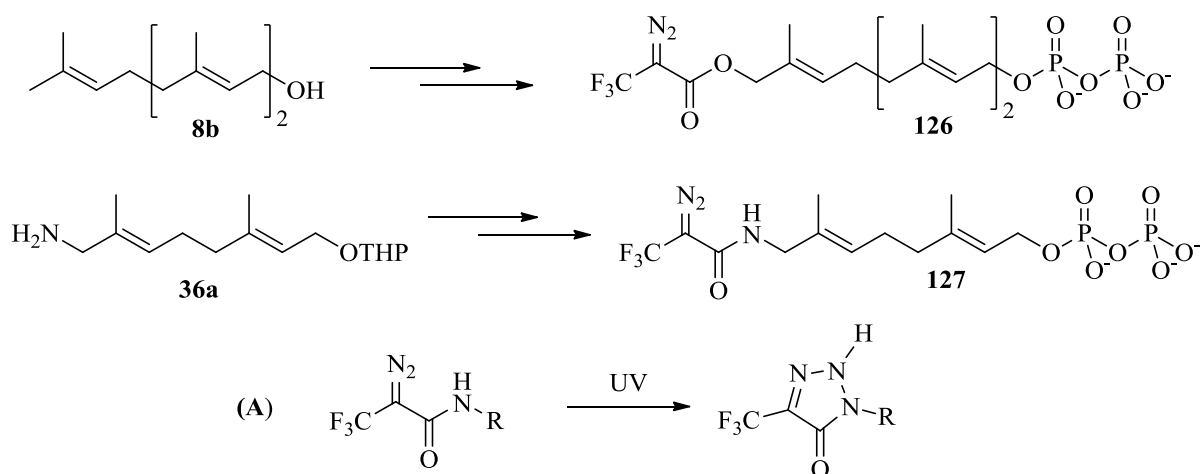


Реагенты и условия: (a) **120**, Py; (b) H_2SeO_3 , $t-BuOOH$, салициловая кислота; (c) **123**, Py; (d) NH_3 , $MeOH-H_2O$; (e) $(Et_3NH)_2HPO_4$, Cl_3CCN .

Для более детального изучения механизма инактивации UPPS были получены радиоактивно меченые ($[^{14}C]$ и $[^3H]$) аналоги дифосфата **119**.^{83,84} Использование радиоактивных субстратов позволило установить некоторые особенности взаимодействия субстрат–фермент, в том числе заключить, что реактивный интермедиат, образующийся при УФ-облучении фотоактивируемого дифосфата **119**, связывается с ферментом, что приводит к инактивации последнего.

Позднее из фарнезола **8b** было получено фотоактивируемое производное **126** и его радиоактивные аналоги^{85,86} (Схема 23). Дифосфат **126** оказался ингибитором как для FT, так и для GGT-I (геранилгеранилтрансфераза), а его радиоактивные производные использовали для изучения взаимодействия субстратов с соответствующим ферментом.

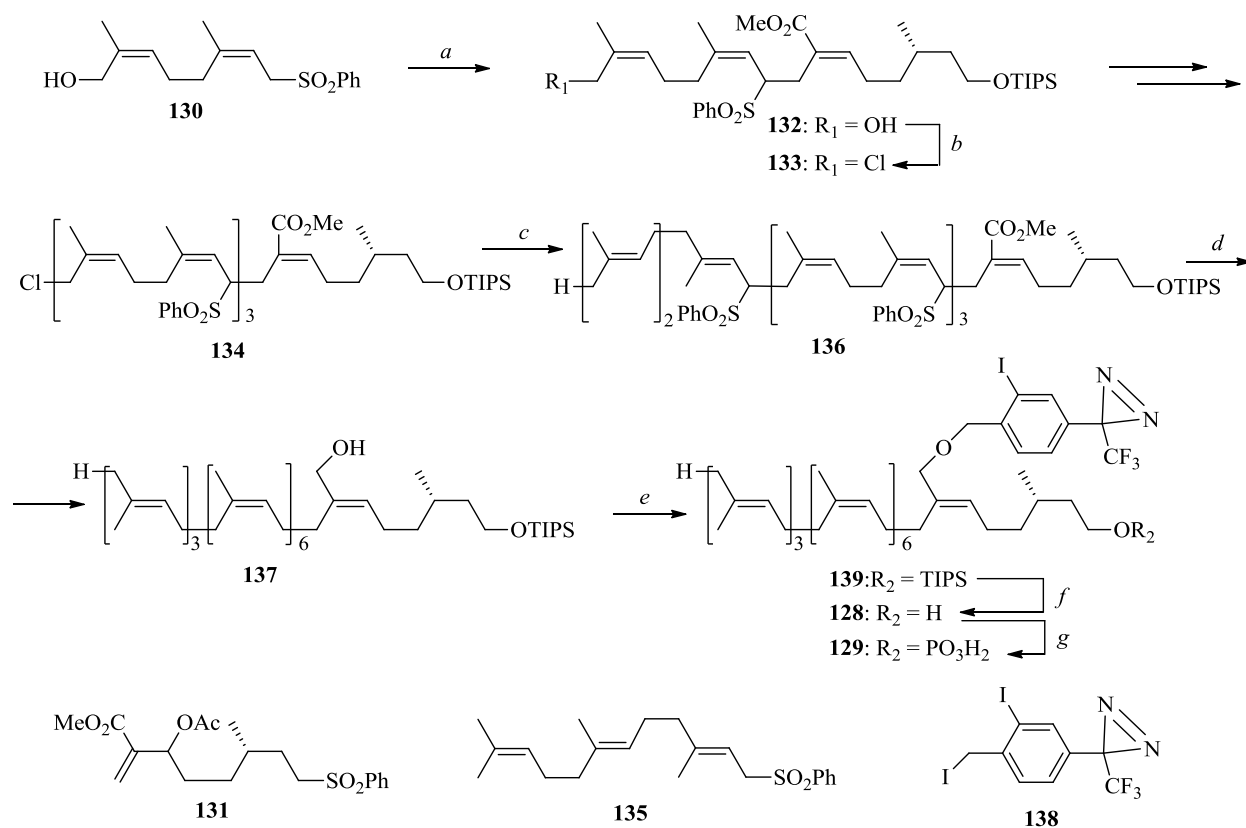
Схема 23



В 2010 году было получено фотоактивное производное геранилдифосфата **127**⁸⁷ (схема 23). Ключевой стадией в его синтезе является ацилирование полученного из гераниола амина **36a** с помощью диазохлорида **123**. Однако применение этого соединения для фотореактивного зондирования оказалось малоэффективным, так как при фотолизе амида **127** происходила его перегруппировка с образованием соответствующего триазолона (реакция А, схема 23).

Для изучения распределения долихоллов и долихилфосфатов в эндоплазматическом ретикулуле *Archaeobacteria* и взаимодействия этих липидов со специфическими белками в 1997 были синтезированы производные **128** и **129**⁸⁸ (Схема 24).

Схема 24



Реагенты и условия: (a) **131**, BuLi, THF/1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2(1H)-пиримидинон (DMTP); (b) MsCl, LiCl, коллидин, DMF; (c) **135**, BuLi, THF/DMTP; (d) 1) DIBАН, CH₂Cl₂; 2) LiEt₃BH, [PdCl₂(dppp)], THF; (e) **138**, PhH, NaOH (водн.), ТВАI; (f) THF, ТВАF; (g) POCl₃, NEt₃, гексан.

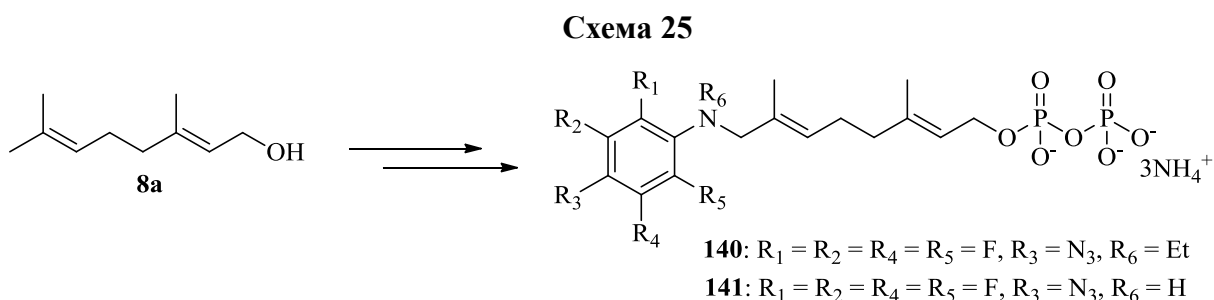
Для синтеза этих соединений на первом этапе сульфон **130** депротонировали бутиллитием и вводили в реакцию с акрилатом **131**, синтезированным в три стадии из (S)-цитронеллола.⁸⁸ Полученный аллильный спирт **132** переводили в соответствующий долихилхлорид **133**, которым аналогично описанному выше алкилировали сульфон **130**.

Образующийся при этом промежуточный аллильный спирт так же, как и в предыдущем случае, переводили в терминальный хлорид **134**, которым, в свою очередь, алкилировали фарнезилсульфон **135**. В полученном в результате соединении **136** последовательно восстанавливали сложноэфирную группу и подвергали исчерпывающему десульфированию с образованием производного долихола **137**. Далее, его конденсировали с азобензилиодидом **138** с образованием фотоактивируемого производного **139**. Замещенный долихол **128** был получен удалением TIPS-защитной группы из соединения **139**, а целевой фосфат **129** – фосфорилированием спирта **128** с помощью оксихлорида фосфора.

Описанная схема превращений была использована и при синтезе радиоактивных аналогов [¹²⁵I]**128** и [¹²⁵I]**129**.⁸⁸ При облучение УФ-светом с длиной волны около 350 нм полученные диазирины деградировали с выделением N₂, образуя карбен, способный реагировать с различными функциональными группами биомолекул, включая неактивированную С-Н связь.

Для изучения биологической активности фотоактивируемого долихола **128**, его вводили в реакцию ферментативного фосфорилирования с [γ -³²P]-цитидинтрифосфатом, катализируемую долихолкиназой из клеток *Sacharomyces cerevisiae*.⁸⁸ Анализ продуктов показал, что в данной реакции образуется радиоактивный фосфат, время удержания которого при анализе ВЭЖХ совпадает с синтетическим фосфатом **129**.

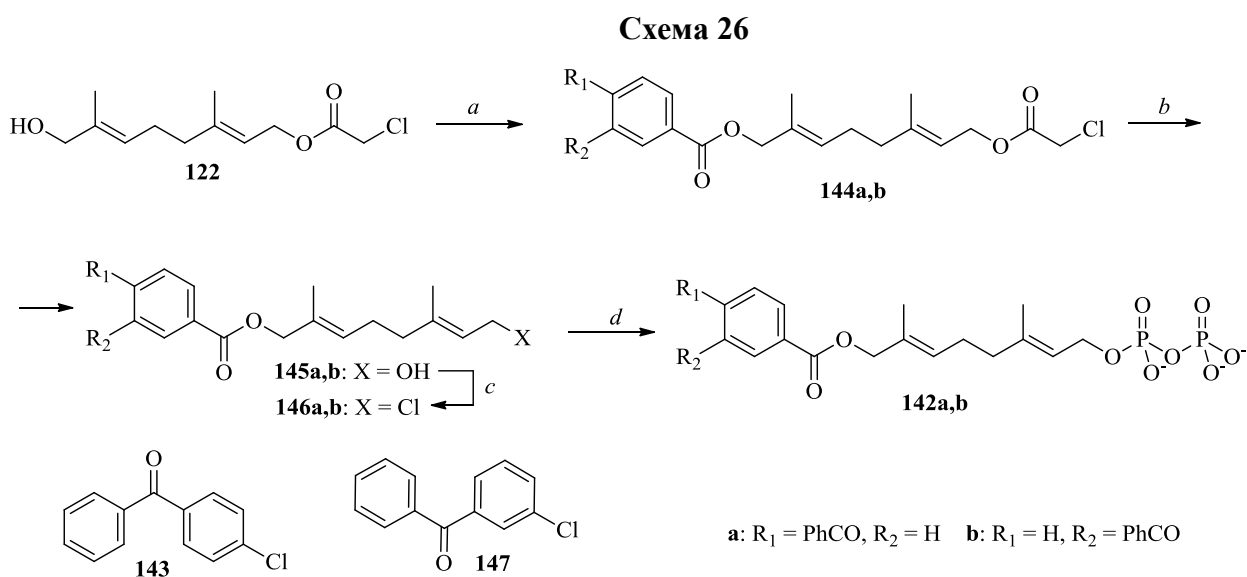
Для изучения влияния различных заместителей в ароматическом ядре на биологическую активность содержащих N-фениламиногруппу аналогов фарнезилдифосфата в 2002 году были получены фотоактивируемые дифосфаты **140** и **141**⁷³ (схема 25), содержащие арилазидную группу. Для их синтеза из гераниола **8a** использовали ту же последовательность превращений, что и для N-фениламинопроизводного **105** (см. схему 19). Ключевой стадией этого синтеза является восстановительное аминирование соответствующего альдегида с *para*-азидотетрафторанилином.



Исследования биологической активности соединений **140** и **141** показали, что наличие в ароматическом кольце четырех атомов фтора и пара-заместителя мало сказывается на эффективности этих соединений в реакции переноса на Ras-белок по сравнению с природным фарнезилдифосфатом. Однако, проведение биохимической реакции при облучении УФ-светом с длиной волны 366 нм снизило ее эффективность из-за инактивации FT в этих условиях.⁷³

Другой привлекательной фотоактивируемой группой является остаток бензофенона. Этот фрагмент более химически стабильна, чем описанные выше diazoэфир, арилизиды или диазирины, активируется в более длинноволновом УФ-диапазоне (350–360 нм), что снижает возможность деградации белков в результате облучения и образует бирадикальный интермедиат, который достаточно устойчив в используемых растворителях. Благодаря этим ценным качествам, производные, содержащие остаток бензофенона, применяются в фармакологии,^{89–91} биохимии,^{92,93} в том числе для синтеза фотоактивируемых аналогов фарнезил- и геранилдифосфатов.^{94–96}

Так, в 1996 году для изучения процессов пренилирования Ras-белков были получены фотоактивные соединения **142a,b**⁹⁷ (Схема 26).



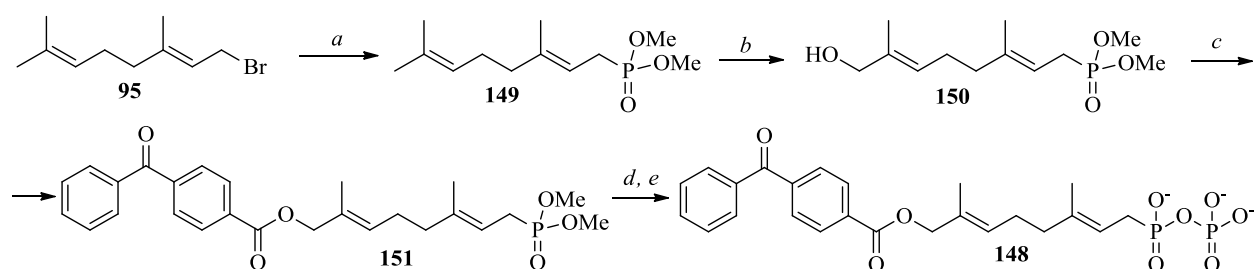
Реагенты и условия: (a) **143** (*p*-PhCOC₆H₄Cl) (для **144a**) или **147** (*m*-PhCOC₆H₄Cl) (для **144b**), Py; (b) NH₃, MeOH, H₂O; (c) NCS, Me₂S, CH₂Cl₂; (d) (n-Bu₄N)₃HP₂O₇, CH₃CN.

Для их синтеза использовали аллильный спирт **122**, который алкилировали с помощью хлорбензофенона **143**, с образованием бензофенонсодержащего соединения **144a**. Удаление хлорацетатной защитной группы из последнего привело к образованию замещенного гераниола **145a**. Последний превратили в целевой дифосфат **144a** через промежуточное образование аллильного хлорида **146a**. Изомерный фотоактивный

дифосфат **142b** получали тем же способом из изопреноида **122** и производного бензофенона **147**. Фотоактивные аналоги геранилдифосфата **142a,b** ингибировали исследуемую FT, а при фотолизе инактивировали этот фермент на 44%. Их радиоактивные производные [^{32}P]**142a,b** использовали для установления строения активного центра фермента.

Позднее был получен еще один содержащий остаток бензофенона аналог геранилдифосфата **148**, в котором фотоактивируемая группировка соединена с изопреноидной цепью сложноэфирной связью⁹⁸ (Схема 27). Для его синтеза использовали геранилбромид **95**, который превращали в фосфонат **149**. Окислением последнего с помощью оксида селена получали спирт **150**. Его конденсировали с 3-бензоилбензойной кислотой с образованием сложного эфира **151**. Полученный гидролизом фосфоната **151** интермедиат активировали карбонилдиимидазолом и обрабатывали безводной фосфорной кислотой с образованием желаемого фосфофосфоната **148**.

Схема 27



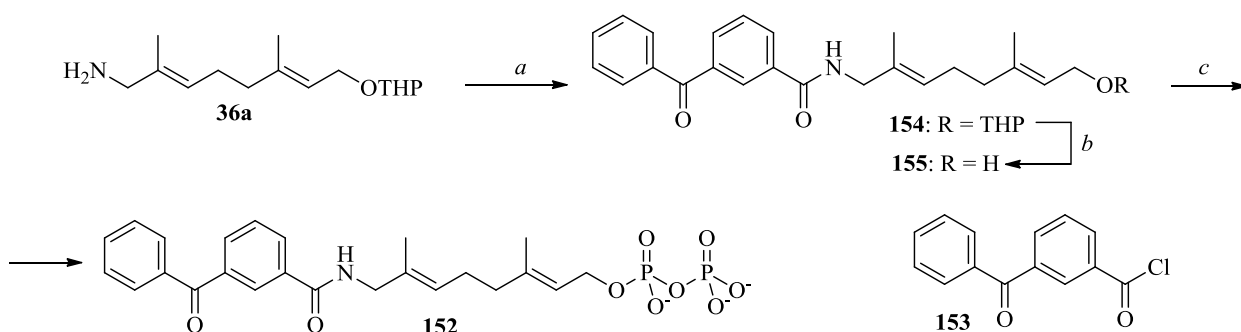
Реагенты и условия: (a) $\text{P}(\text{OCH}_3)_3$; (b) SeO_2 , $t\text{-BuOOH}$, салициловая кислота, CH_2Cl_2 ; (c) $m\text{-PhCOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 ; (d) $(\text{CH}_3)_3\text{SiCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $(\text{CH}_3)_3\text{SiBr}$, CH_2Cl_2 ; (e) 1) CDI, DMF; 2) H_3PO_4 (безв.).

Было показано, что фотоактивируемое соединение **148** и его радиоактивный аналог [^{32}P]**148** ингибирует FT и инактивирует этот фермент при фотолизе. Взаимодействие фосфонофосфата **148** с FT исследовали с помощью рентгеноструктурного анализа. Кроме того, фосфонофосфаты **148** и [^{32}P]**148** использовали для исследования биосинтеза каучука в реакции с ферментным препаратом из каучуконосного дерева *Havea brasiliensis*.⁹⁸

Известен фотоактивируемый геранильный аналог фарнезилдифосфата **152**, где остаток бензофенона соединен с изопреноидной частью молекулы амидной связью⁹⁹ (Схема 28). Исходным соединением для его синтеза послужил полученный в четыре стадии из гераниола первичный амин **36a**. Его вводили в реакцию с бензоилбензоилхлоридом **153** с образованием амида **154**. Аллильный спирт **155**, полученный удалением защитной группы из ТНР-эфира **154**, превращали в целевой дифосфат **152** реакцией с ортофосфорной кислотой в присутствии трихлорацетонитрила и

триэтиламина. Фотоактивируемый дифосфат **152** проявлял ингибирующие свойства в реакции пренилирования, катализируемой FT дрожжей. Его радиоактивный аналог [³²P]**152** использовали для изучения активных центров FT дрожжей и GGT человека.⁹⁹

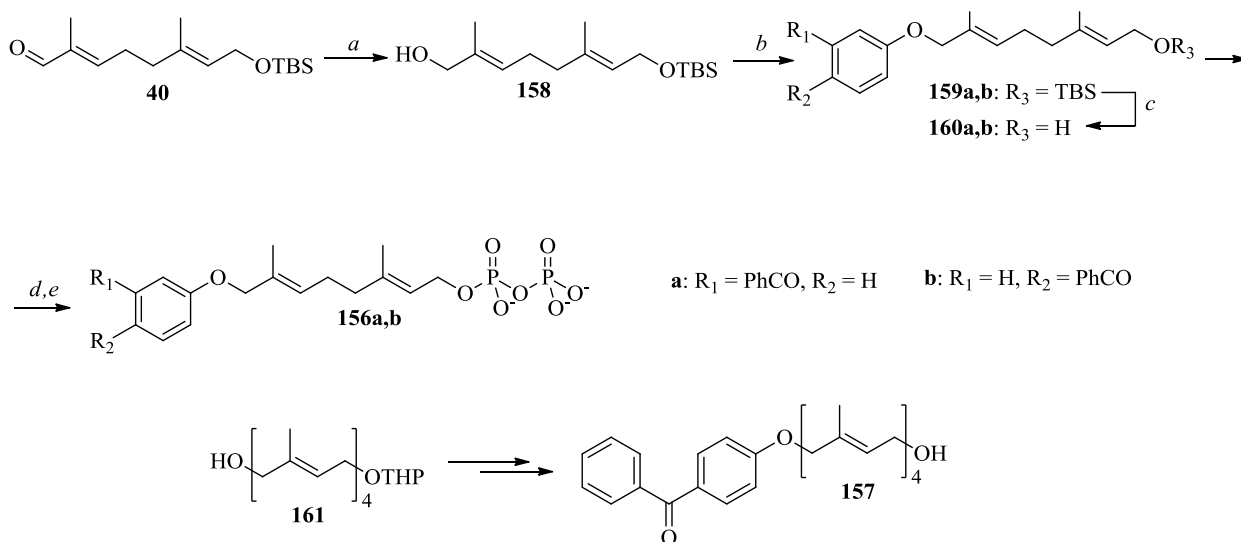
Схема 28



Реагенты и условия: (a) **153**; (b) PPTs, EtOH; (c) H₃PO₄, Et₃N, Cl₃CCN, CH₃CN.

Другими содержащими остаток бензофенона изопреноидами являются соединения **156a,b** и **157**^{100,101} (Схема 29).

Схема 29



Реагенты и условия: (a) NaBH₄, MeOH; (b) 3-гидроксибензоилфенол (для **159a**) или 4-гидроксибензоилфенол (для **159b**), Ph₃P, DEAD, THF; (c) TBAF, THF; (d) NCS, Me₂S, CH₂Cl₂; (e) (n-Bu₄N)₃HP₂O₇, CH₃CN.

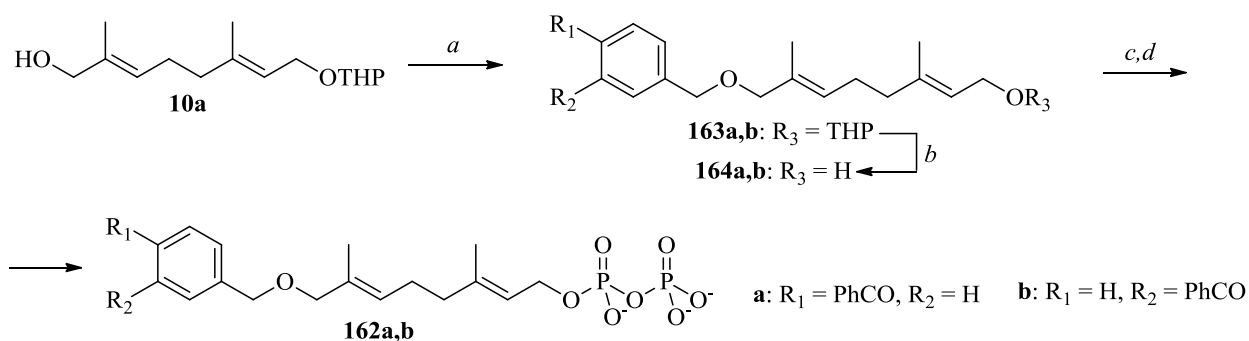
Для синтеза дифосфатов **156a,b** на первой стадии восстанавливали акролеин **40** с образованием аллильного спирта **158**. Последний конденсировали по реакции Мицунобу¹⁰² с 3-гидроксибензоилфенолом. Полученный после удаления TBS-защитной группы из соединения **159a** спирт **160a** дифосфорилировали с образованием целевого фотоактивного пирофосфата **156a**. Его изомер **156b** получали по той же схеме конденсацией аллильного спирта **158** с 4-гидроксибензоилфенолом. Фотоактивируемое

производное **157** было получено превращением геранилгераниола в соответствующий аллильный спирт **161** и последующей его конденсацией с 4-гидроксибензофеноном в целевое производное аналогично описанному выше.

Биохимические свойства дифосфатов **156a,b** исследовали в реакциях с FT и UPPS из грамположительной термофильной бактерии *Bacillus stearotherophilus* и гексапренилдифосфатсинтазой из *Micrococcus luteus*¹⁰³. А фотоактивируемый спирт **157** превращали в соответствующий хлорид, присоединяли к синтетическим белкам и использовали для изучения процесса пальмитоилирования – другого типа посттрансляционной модификации Ras-белков¹⁰³.

Другой тип связывания фрагмента бензофенона с изопреноидной цепью был использован в синтезе фотоактивируемых изомерных дифосфатов **162a,b**¹⁰⁴ (Схема 30).

Схема 30



Реагенты и условия: (a) *p*-PhCOC₆H₄CH₂Br (для **164a**) или *m*-PhCOC₆H₄CH₂Br (для **164b**), NaN, THF; (b) PPTs, EtOH; (c) Ph₃P, CBr₄, CH₂Cl₂; (d) (n-Bu₄N)₃HP₂O₇, CH₃CN.

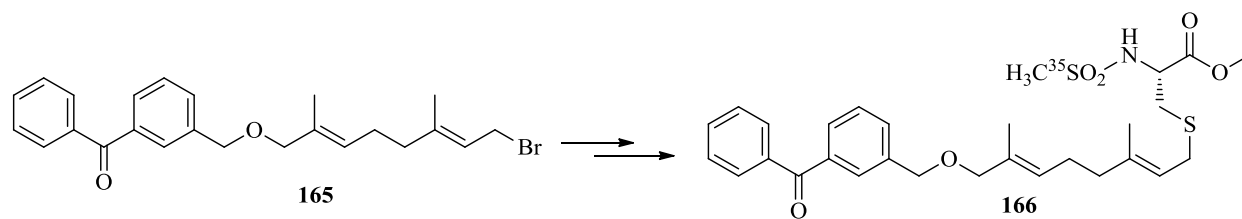
Исходным соединением для их синтеза послужило производное гераниола **10a**, которое вводили в реакцию с 4-(бромметил)бензофеноном с образованием эфира **163a**. После удаления THP-защитной группы из последнего был получен спирт **164a**. Его превращали в целевой дифосфат **163a** через стадию образования соответствующего бромида. Фотоактивный изомер **162b** был получен по аналогичной схеме синтеза из производного **10a** и 3-(бромметил)бензофенона.

Дифосфаты **162a,b** ингибировали FT дрожжей, а при фотолизе в течение 12 часов инактивировали фермент на 40%.¹⁰⁴ Они также были использованы в изучении механизма различения фарнезилтрансферазой фарнезилдифосфата и геранилгеранилдифосфата.¹⁰⁵

Для изучения белок-белкового взаимодействия с помощью фотолизного эксперимента с Rho-белком *E. coli* – ингибитором диссоциации гуанинового нуклеотида

(RhoGDI)¹⁰⁷ – из бромида **165**, был получен изопреноид, содержащий радиоактивно меченый цистеин **166**¹⁰⁶ (Схема 31).

Схема 31



5. Заключение

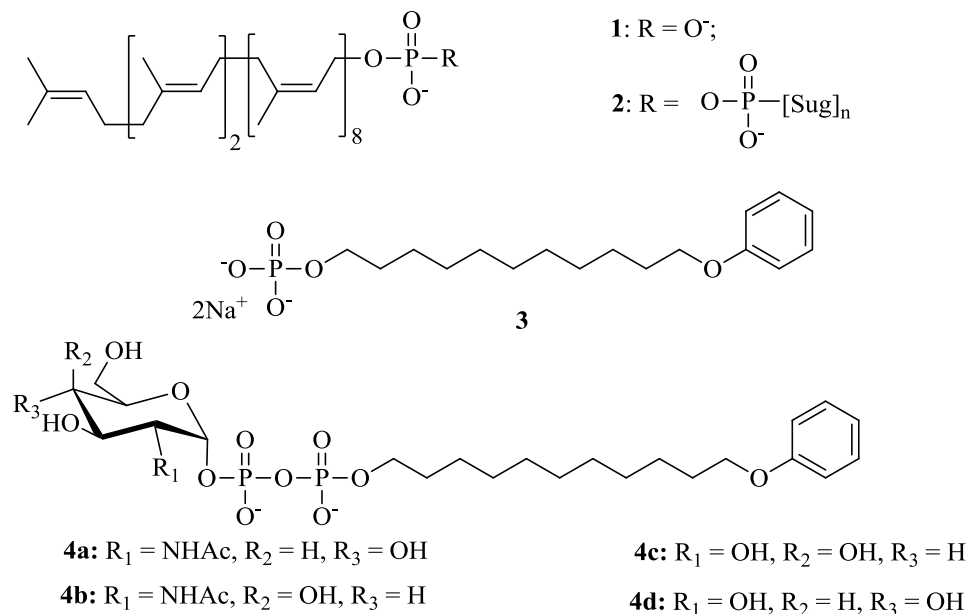
Представленный в настоящем обзоре материал демонстрирует методы синтеза модифицированных изопреноидов, содержащих в составе молекулы различные флуорофоры, хромофоры и фотофоры, объединенные здесь термином – фотоактивные группы атомов. Кроме того, показано применение этих соединений для изучения различных биохимических процессов как *in vitro*, так и непосредственно в живой клетке. Однако, более подробное рассмотрение различных аспектов их применения в этой области выходит за рамки этого обзора.

Обсуждение результатов.

1. Введение.

К началу настоящей работы ассортимент доступных для биохимических исследований аналогов бактериальных ундекапренилфосфата **1** (схема 1) и ундекапренилдифосфатсахаров **2** ограничивался фосфатами и дифосфатами изопреноидной природы, а также используемыми с недавних пор 11-феноксиундецилфосфатом **3** и его фосфогликозилированными производными **4a-d**. Изопреноидные аналоги в качестве липофильного фрагмента содержат ациклическую олигоизопреновую цепь. В качестве исходных соединений для их получения использовались синтетические терпеновые спирты,³³ а также доступные растительные полипренолы. В Институте органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН были разработаны эффективные методы фосфорилирования и последующего гликозилирования растительных полипренолов,¹⁰⁸ а на основе синтетических и полусинтетических терпенолов изучались структурные особенности, влияющие на их биологическую.³³ Эти соединения были затем использованы для изучения биосинтеза O-антигенов некоторых штаммов грамотрицательных бактерий из рода *Salmonella*.^{33,108}

Схема 1



Первый неизопреноидный аналог – P¹-[(11-фенокси)ундецил]-P²-(2-ацетамидо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозил)дифосфат **4** – был получен канадскими учеными в 2005 году и исследован ими в ферментативной реакции переноса остатка галактозы на данный

синтетический субстрат-акцептор, под действием галактозилтрансферазы из *Escherichia coli* VW187.⁶¹ Позднее новые синтетические фосфогликозилпроизводные **4b-d** были использованы в исследованиях функционирования различных бактериальных гликозилтрансфераз.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Кроме того, учеными ИОХ РАН впервые было обнаружено, что 11-феноксиундецилфосфат **3** может служить аналогом бактериального ундекапренилфосфата и участвовать в реакции инициирования сборки О-антигена грамотрицательных бактерий *S. arizona* O:59.⁶² 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.

2. Синтез изопреноидного аналога бактериального ундекапренилфосфата, содержащий феноксигруппу на ω-конце олигоизопреновой цепи.¹¹²

В качестве исходного субстрата для синтеза целевых фосфатов **5** (схема 2) был использован морапренол (**6**) – нативная смесь полипренолов из листьев шелковицы *Morus nigra*, одним из основных компонентов которой является ундекапренол[†]. Согласно разработанному плану синтеза¹¹² на первой стадии исходные полипренолы **6** превращали в ацетаты **7**. Их двухстадийная трансформация через стадию бромгидринов **8** в терминальные эпоксиды **9** по ван Тамелену оказалась препаративно приемлемой и дала искомый продукт **9** с суммарным выходом ~35%. Окислительная деградация последнего под действием $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ гладко привела к альдегидацетатам **10**, селективно восстановленным в гидроксиацетаты **11**. Их трансформация в феноксиацетаты **12**, которые

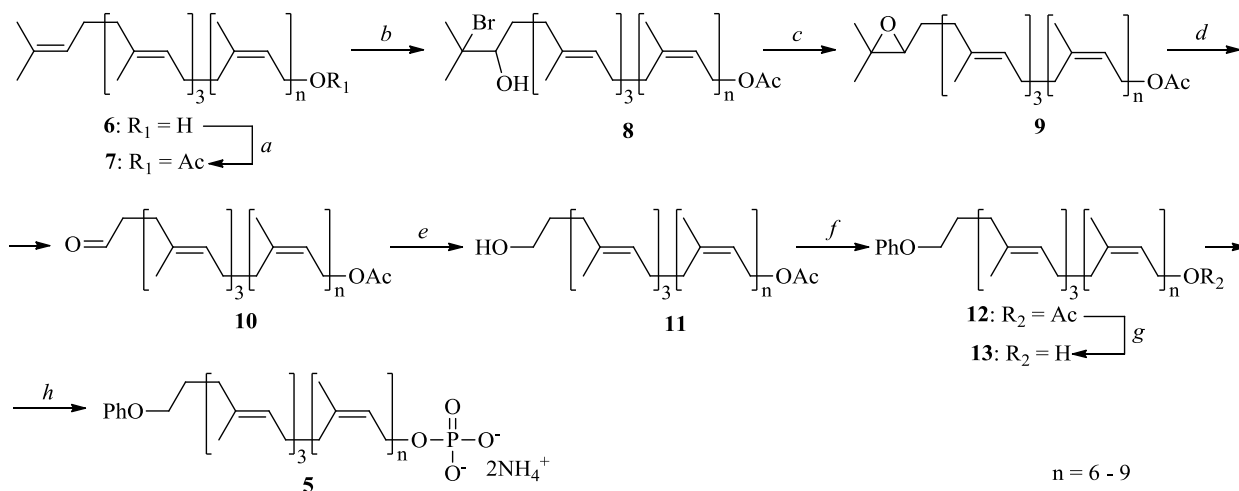
[†] Растительный ундекапренол $\text{WT}_3\text{C}_7\text{OH}$ имеет отличия в структуре от бактериального $\text{WT}_2\text{C}_8\text{OH}$, где «W» — ω-концевое изопреновое звено олигоизопреновой цепи, а «Т» и «С» — внутренние *транс*- и *цис*-изопреновые звенья соответственно.

далее гидролизировались в соответствующие спирты **13**, осуществлялась посредством одного из вариантов реакции Мицунобу с последующим мягким гидролизом полученной в результате смеси феноксиацетатов **12**.

Полученные в итоге семи рассмотренных стадий с суммарным выходом ~6% фенокиспирты **13** далее подвергались фосфорилированию. Для этой цели была использована хорошо себя зарекомендовавшая для фосфорилирования полипренолов система реагентов $\text{CCl}_3\text{CN}-\text{Bu}_4\text{NH}_2\text{PO}_4$.¹¹² Фосфаты **5** получали в виде аммониевых солей после обмена катиона в продукте фосфорилирования на смоле Dowex 50 W×8 (NH_4^+) на катион аммония, последующей анионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (AcO^-) с элюированием раствором AcONH_4 в MeOH и удаления избытка AcONH_4 во фракциях его осаждением толуолом. Фосфаты **5** оказались весьма лабильными, поэтому можно рекомендовать хранить их в инертной атмосфере при температуре не выше - 18°C.

Строение неизвестных ранее соединений **5**, **7** – **13** подтверждено совокупностью физико-химических данных. В их спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C присутствуют сигналы, характерные для линейных олигоизопреноидов, содержащих (*E*)- и (*Z*)-изопреновые фрагменты; имеются также сигналы, отвечающие функциональным группам, находящимся в ω- и α-звеньях олигоизопреновой цепи. В ЯМР ^{31}P обнаруживался синглет при 1.73 м.д., фосфатной группы синтезированного соединения.

Схема 2



Реагенты и условия: a. Ac_2O , Py , 20 °C (~100%); b. NBS , aq. THF , 20 °C (55%); c. K_2CO_3 , $\text{PhH}-\text{MeOH}$, 20 °C (62%); d. $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Et}_2\text{O}-\text{THF}$, 20 °C (98%); e. NaBH_4 , DME , 20 °C (60%); f. PhOH , DEAD , Ph_3P , THF , 0→20 °C (44%); g. K_2CO_3 , $\text{PhH}-\text{MeOH}$, 20 °C (66%); h.

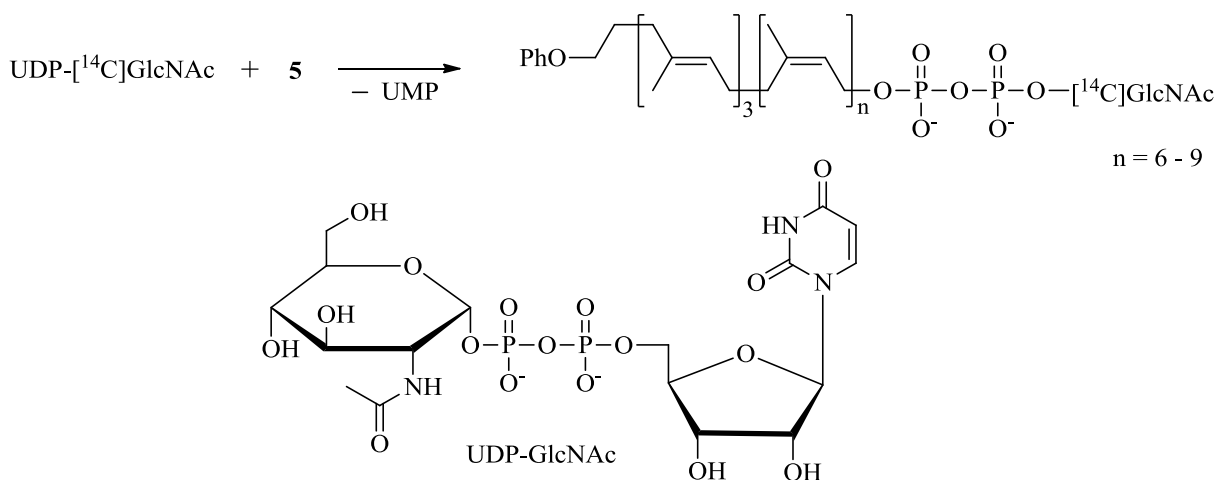
1) CCl_3CN , $\text{Bu}_4\text{NH}_2\text{PO}_4$, CH_2Cl_2 , 20 °C, 2) Dowex 50 W×8 (NH_4^+), $\text{Bu}^t\text{OMe}-\text{MeOH}$, 3) хроматография на DEAE-целлюлозе DE-52(OAc^-), NH_4OAc , MeOH (49%).

Данные ИК-спектров соответствуют структуре описываемых соединений. Фосфаты **5** – охарактеризованы также масс-спектром, полученными при ионизации электрораспылением (electrospray ionisation, ESI), в котором содержатся пики, молекулярных ионов олигомергомологов, причем их интенсивность соответствует содержанию в полученном продукте.

Биологическую активность фосфатов **5** исследовали в реакции инициирования сборки повторяющегося звена O-антигенных полисахаридов, катализируемой UDPGlcNAc : полипренилфосфат-GlcNAc-фосфотрансферазой цитоплазматических мембран грамотрицательных бактерий *Salmonella arizona* O:59 и *Aeromonas hydrophila* AH-1 с использованием радиоактивно меченого $\text{UDP}-[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}$ в качестве донора моносахарида $[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}^{112}$ (схема 3). В контрольных экспериментах гликозилакцептором служил морапсенилфосфат, любезно предоставленного к.х.н. Даниловым Л. Л.

Продукты ферментативных реакций анализировали методом ТСХ (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 морапсенилдифосфат- α -D-глюкозы, любезно предоставленного к.х.н. Даниловым Л. Л.

Схема 3



Из сравнения уровня радиоактивности продуктов реакции с участием морапренилфосфата с таковым при использовании фосфатов **5** 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.

Таким образом, в результате восьмистадийного синтеза из смеси растительных полипренолов – морапренола – был получен новый изопреноидный аналог бактериального ундекапренилдифосфата **1** – феноксиморапренилфосфат **5**. Его биологическая активность показана в ферментативных реакциях переноса остатка фосфата 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфата, катализируемой гликозилфосфотрансферазами из *S. arizona* O:59 и *A. hydrophila* АН-1.

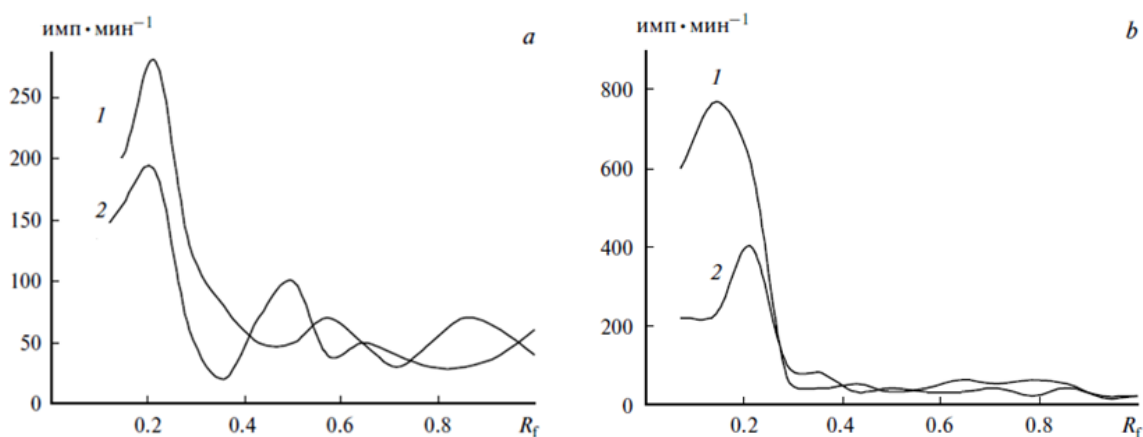


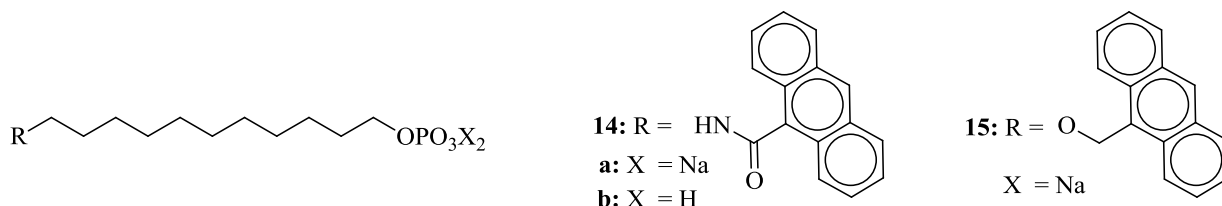
Рис. 1. Распределение радиоактивности (имп·мин⁻¹) на хроматограмме продуктов ферментативной реакции с участием фосфата морапренола (1) фосфатов **5** (2), UDP-[¹⁴C]GlcNAc и препарата мембран клеток *A. hydrophila* АН-1 (a) и *S. arizona* серогруппа O:59 (b).

Наблюдаемый уровень активности фосфатов **5** 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.

3. Синтез неизопреноидных флуоресцентных аналогов бактериального ундекаprenилфосфата.^{113, 114}

В настоящей по оригинальной методке впервые были получены флуоресцентные производные ундецилфосфата **14a,b** и **15** (схема 4) и продемонстрирована их способность служить фосфогликозилакцепторами в ферментативных реакциях, моделирующих иницирование сборки повторяющегося звена О-антигена *S. newport*.

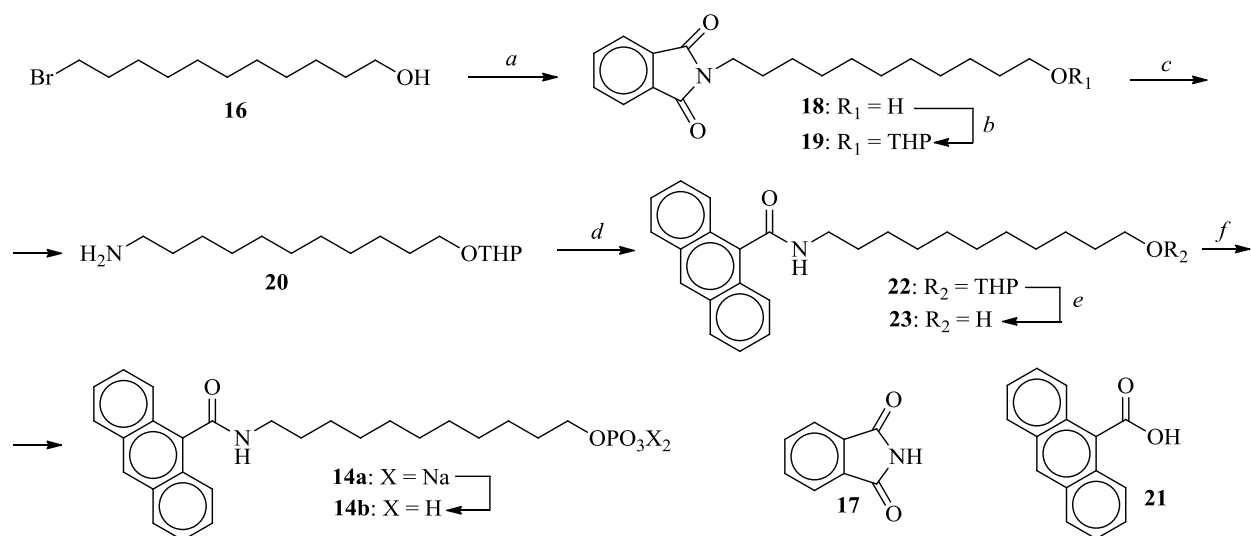
Схема 4



Для синтеза 11-[(9'-антраценилкарбонил)амино]ундецилфосфатов **14a,b** в качестве исходного вещества использовали 11-бромундеканол **16** (схема 5).¹¹³ Обработка последнего фталимидом калия **17** привела к N-алкилфталимиду **18**, из которого в стандартных условиях был получен ТНР-эфир **19**. Последний далее превращали в амин **20** под действием гидразингидрата, который затем вводили реакцию с 9-антраценкарбоновой кислотой **21** в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) с образованием амида **22**. Полученный после удаления ТНР-защиты спирт **23** фосфорилировали по стандартной методике с использованием избытков дигидрофосфата тетрабутиламмония и трихлорацетонитрила. Строение натриевой соли **14a**, полученной после обработки раствором NaOH продуктов реакции фосфорилирования, подтверждено данными ИК- и УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. Так, в УФ-спектре соединения **14a** наблюдались максимумы поглощения (λ_{max} 250 и 360 нм), подтверждающие наличие антраценильной группы. Масс-спектр ESI высокого разрешения содержал сигнал m/z 516.1885, который соответствует $[M + H]^+$ для фосфата **14a** с брутто-формулой $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{NO}_5\text{PNa}_2$ (m/z 516.1886). 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 **14a** в биохимических экспериментах. Подкисление суспензии фосфата **14a** в воде до pH ~ 0 привело к более растворимому дигидрофосфату **14b**, который был получен в виде желтой воскообразной массы. Его строение было подтверждено данными масс- и ^1H , ^{13}C и ^{31}P ЯМР-спектроскопии. В спектре ^1H ЯМР фосфата **14b** наблюдались характерные сигналы

протонов соответствующим образом замещенного углеводородного радикала: мультиплет при δ 3.77 м.д. (CH_2N), мультиплет при δ 3.43 м.д. (CH_2OR) и сигналы внутренних метиленовых групп в области 1.60–1.20 м.д., а также сигналы ароматического радикала в области 8.29–7.24 м.д. Спектр ^{31}P ЯМР соединения **14b** содержал единственный синглет при δ 0.9 м.д., что характерно для фосфомоноэфиров в кислой форме. Строение ранее неизвестных промежуточных соединений **14b**, **18–20**, **22** и **23** подтверждено совокупностью данных ЯМР-, ИК- и масс-спектрометрии.

Схема 5

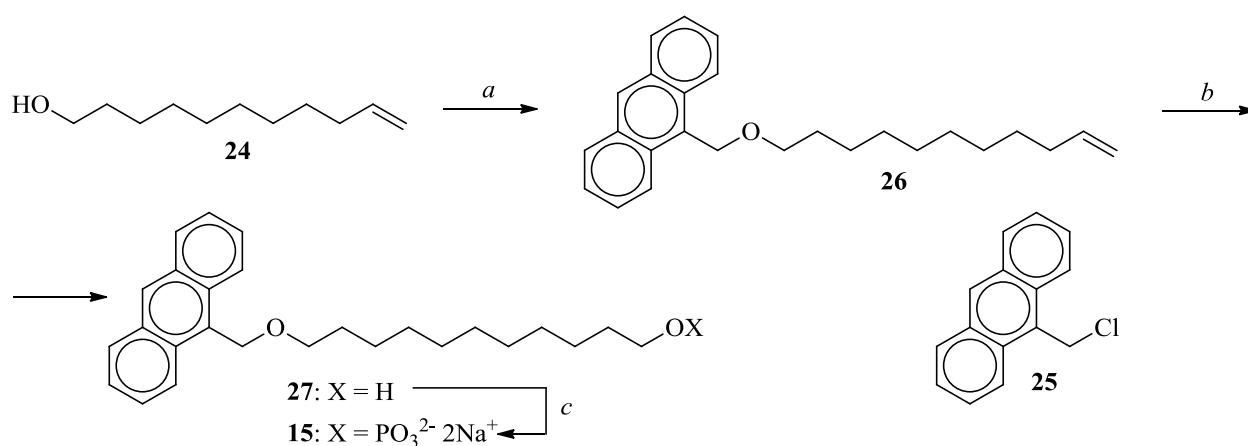


Реагенты и условия: *a.* **17**, DMF, 80 °C (60%); *b.* PPTS, DHP, CH_2Cl_2 , 20 °C (98 %); *c.* $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, 20 °C (90%); *d.* **21**, DCC, CH_2Cl_2 , 20 °C (50 %); *e.* $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, MeOH, 20 °C (53 %); *f.* 1) CCl_3CN , $\text{Bu}_4\text{NH}_2\text{PO}_4$, $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$, 20 °C; 2) NaOH (водн. р-р), 20 °C; 3) HCl (водн. р-р), 20 °C (41 %).

Исходным соединением для синтеза 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфата **15** послужил ундец-10-ен-1-ол **24** (схема 6).¹¹⁴ Реакция его алкоголята с 9-(хлорметил)антраценом **25** в присутствии каталитических количеств Bu_4NI дала простой эфир **26**, содержащий терминальную двойную связь. Гидроборирование последней с помощью генерируемого *in situ* $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ и последующее окисление промежуточных борсодержащих соединений H_2O_2 в присутствии NaOAc привело к спирту **27**. Его фосфорилирование двумя эквивалентами смеси POCl_3 и Et_3N с последующим гидролизом промежуточно образующегося фосфодихлорида водным раствором NaOH привело к динатриевой соли **15**, которая была получена в виде желтого порошка с общим выходом на три стадии 34 %. Строение неизвестных ранее соединений **15**, **24**, **26** и **27** подтверждено

совокупностью методов ЯМР и масс-спектрометрии. Так, в УФ-спектре целевого фосфата **15** наблюдались максимумы поглощения (λ_{\max} 250 и 360 нм) антраценильной группы. В спектре ЯМР ^1H этого соединения присутствуют сигналы в области 7.51–8.59 м.д., характерные для ароматических протонов, обнаружен синглет при 5.50 м.д., характерный для CH_2O группы, связывающей антраценовый фрагмент с углеводородной цепью. Сигналы метиленовых звеньев $\text{H}_2\text{C}-1$ и $\text{H}_2\text{C}-11$ липидной цепи наблюдаются в виде мультиплета в области 4.23 – 4.30 м.д. и триплета при 3.60 м.д. соответственно. В спектре ЯМР ^{31}P наблюдается синглет при 5.25 м. д., отвечающий фосфатной группе соединения **15**.

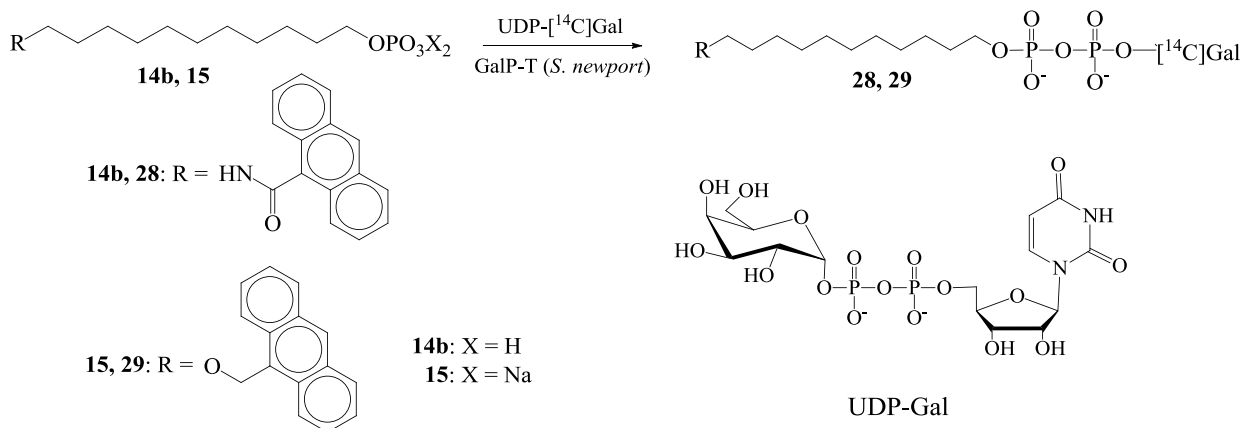
Схема 6



Реагенты и условия: *a.* **25**, NaH, Bu_4NI , DMF, 20 °C (83%); *b.* 1) NaBH_4 , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, THF, 20 °C; 2) H_2O_2 , NaOAc, 20 °C (55 %); *c.* 1) POCl_3 , Et_3N , THF, 20 °C; 2) NaOH (водн. р-р), 20 °C (75 %).

Способность синтезированных фосфатов **14b** и **15** служить акцепторами галактозилфосфатного остатка UDP-Gal под действием галактозилфосфотрансферазы (GalP-T) из клеточных мембран *S. Newport* определялась в ферментативной реакции с радиоактивно меченой UDP- ^{14}C Gal в качестве донора остатка гликозилфосфата (схема 7). Фосфат **14b** вводили в инкубационную смесь, содержащую препарат мембран из клеток *S. Newport* и радиоактивную UDP- ^{14}C Gal.¹¹³ После проведения инкубации реакцию 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 **28**, – метанолом. Фракции элюатов анализировали методом ТСХ на пластинках SiO_2 в системе $\text{CHCl}_3\text{--MeOH--H}_2\text{O}$, 60:25:4.

Схема 7



У фракций метанольного элюата наблюдалась зона с характерной хроматографической подвижностью, отличной от таковой исходного фосфата **14b**. 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 **15**, приводящая к гликозилдифосфату **29**, была проведена аналогично.¹¹⁴

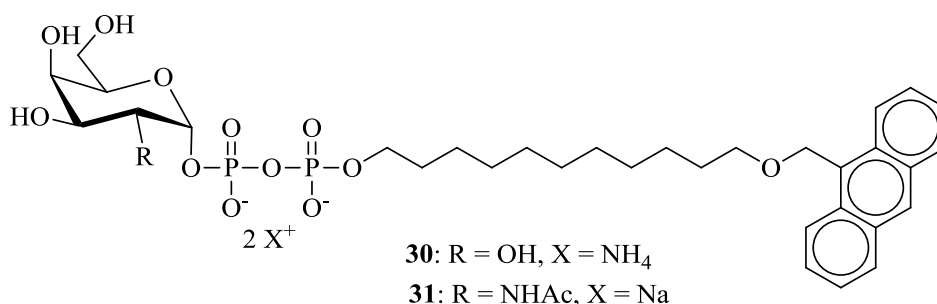
Таким образом, в результате данного исследования осуществлен синтез новых неизопреноидных аналогов бактериального ундекапренилфосфата, содержащих флуоресцентную метку и различающихся способом присоединения этой метки к углеводородной цепи. В модельных ферментативных реакциях продемонстрирована их способность служить субстратами-акцепторами галактозилфосфотрансферазы из клеток *S. newport*.

4. Синтез неизопреноидных флуоресцентных аналогов бактериальных ундекапренилдифосфатсахаров.^{114–116}

Следующий этап настоящего исследования состоял в синтезе новых неизопреноидных аналогов бактериальных ундекапренилдифосфатсахаров, 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 -(α -D-галактопиранозил)дифосфата **30**¹¹⁴ и P^1 -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- P^2 -(2-

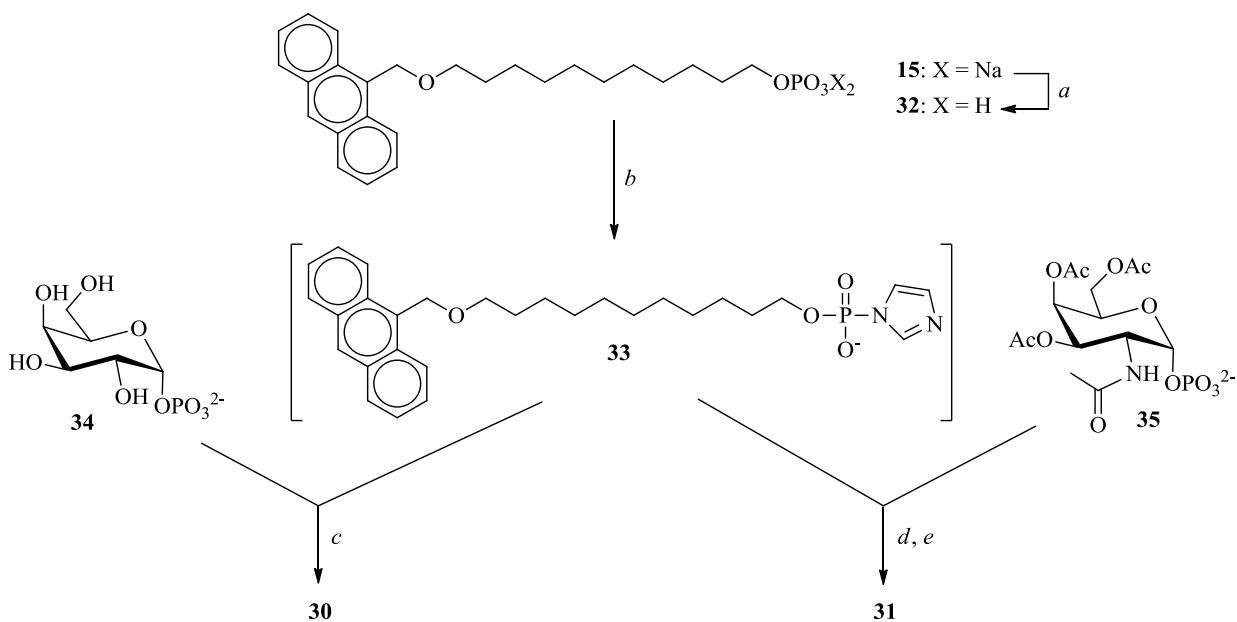
ацетида-2-дезокси- α -D-галактопиранозил)дифосфата **31**¹¹⁵ (схема 8) – была использована упомянутая выше динатриевая соль фосфата **15**.

Схема 8



В первом случае, полученный из нее кислый фосфат **32** (схема 9), переводили в триэтиламмониевую соль, обрабатывали ее избытком *N,N'*-карбонилдиимидазола (CDI), и образующийся при этом *in situ* соответствующий имидазолид **33** вводили в конденсацию с бис-триэтиламмониевой солью α -D-галактопиранозилфосфата **34** в смеси THF и DMSO.

Схема 9



Реагенты и условия: *a.* HCl (водн. р-р), 20 °С; *b.* 1) Et₃N для **30**, (Pr^tN₂H для **31**), 20 °С; 2) CDI, THF, 20 °С; 3) MeOH, 20 °С; *c.* **34**, THF–DMSO, 37 °С (15 %); *d.* **35**, THF, 37 °С; *e.* MeONa, MeOH, 20 °С (25 %).

Для выделения образовавшегося дифосфата **30** реакцию смесь разбавляли MeOH и фракционировали на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52 (AcO⁻-форма), элюируя вещества ступенчатым градиентом ацетата аммония в метаноле. Состав фракций

анализировали методом ТСХ. Фракции, содержащие ожидаемый продукт **30**, объединяли, концентрировали и хроматографировали ступенчатым градиентом MeOH в воде, выделяя индивидуальный гликозилдифосфат **30** с выходом 15% в виде аммонийной соли. Строение полученного впервые соединения **30** было подтверждено масс-спектром высокого разрешения и данными спектров ЯМР. Так, масс-спектр ESI высокого разрешения содержал сигнал m/z 699.2341, который соответствует брутто-формуле $[M-H]^- C_{32}H_{46}O_{13}P_2$ (m/z 699.2351) соединения **30**. Спектр ^{31}P -ЯМР содержал два уширенных синглета при δ – 10.7 и –12.7 м.д., характерные для несимметричных P^1 , P^2 -диэфиров пирофосфорной кислоты. Из-за низкой растворимости соединения **30** спектр 1H -ЯМР был плохо разрешен. Тем не менее, в нем удалось идентифицировать сигналы протонов антраценилметоксигруппы [синглет при 8.38 м.д., дублет при 8.28 м.д. (J 8.4), дублет при 7.93 м.д. (J 8.4), триплет при 7.55 м.д. (J 7.8), триплет при 7.48 м.д. (J 7.8) и синглет при 5.39 м.д.], сигнал аномерного протона остатка галактозилфосфата (уширенный дублет дублетов при 5.52 м.д.), а также внутренних метиленовых групп ундецильного остатка (мультиплет в области 1.95–1.10 м.д.).

Синтез P^1 -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- P^2 -(2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозил)дифосфата **31** проводили аналогично, конденсацией имидазолида **33** с бис-диизопропиламмониевой солью 3,4,6-три-О-ацетил-2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозилфосфата **35** (схема 9). Промежуточный ацетат выделялся хроматографией на колонке с гелем (Sephadex-G15) и обрабатывался метилатом натрия для удаления защитных ацетильных групп. Целевой дифосфат **31** выделяли с выходом 25 % на колонке с обращенной фазой C18 (SepPak) в виде динатриевой соли.

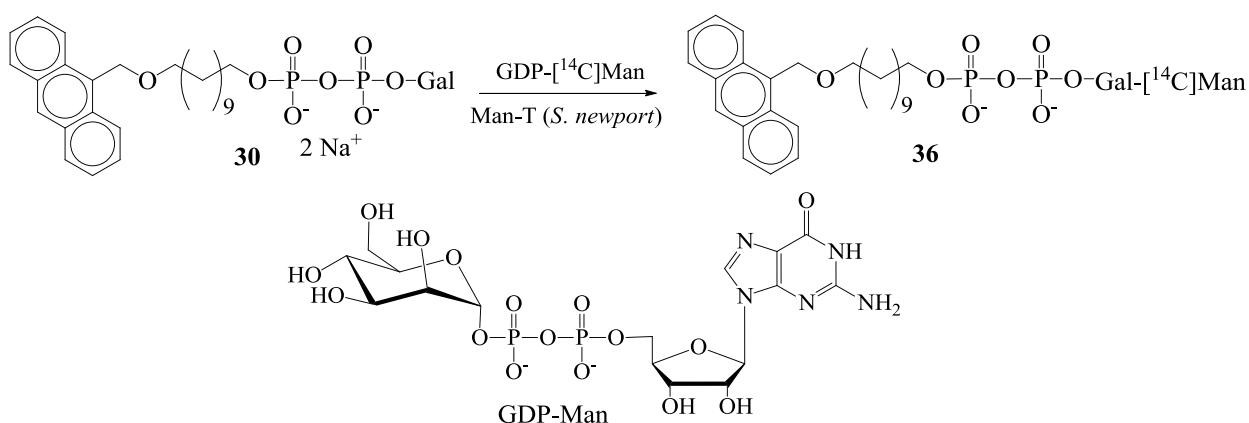
Строение флуоресцентного соединения **31** было подтверждено данными ЯМР-и масс-спектрометрии. Спектр 1H ЯМР содержал сигналы ароматического радикала, сигналы протонов углеводной части [синглет при 5.64 м.д. (H-1), дублет при 4.45 м.д. (H-2) и мультиплеты при 4.17 м.д. (H-3), 3.91 м.д. (H-4) и области 3.72–3.78 м.д. (H-5, H-6 и H-6')] и углеводородной цепи липиддифосфатгликозида **31**. Сигналы в спектре ^{31}P ЯМР для дифосфата **31** практически полностью совпали с таковыми для соединения **30**. Максимум спектра поглощения для производного **31** был зафиксирован при 247 нм, а флуоресценции – при 415 нм.

После лиофилизации из абс. бензола соединения **30** и **31** представляли собой светло-желтые порошки, которые хранили при $-18^\circ C$ в инертной атмосфере.

Способность синтетических флуоресцентных аналогов ундекапиренилдифосфатсахаров **30** и **31** служить субстратами-акцепторами

соответствующих гликозилтрансфераз исследовали в модельных реакциях сборки О-антигенов ряда грамотрицательных микроорганизмов. В частности, активность соединения **30** изучали в ферментативной реакции переноса остатка маннозы, катализируемой маннозилтрансферазой (Man-T), входящей в состав ферментативного коктейля, полученного из *S. newport*¹¹⁴ (схема 10). Так, дифосфат **30** вводили в инкубационную смесь, содержащую препарат мембран из клеток *S. newport* и радиоактивную гуанидиндифосфатманнозу (GDP-[¹⁴C]Man). После проведения инкубации, коагуляции белка и осаждения коагулята центрифугированием супернатант фракционировали на картридже С18 (ДиаПак). Водорастворимые компоненты, включая непрореагировавший нуклеозиддифосфатсахар, элюировали водой, а липидсодержащие компоненты, в том числе ожидаемый продукт ферментативной реакции дифосфат **36**, – метанолом.

Схема 10

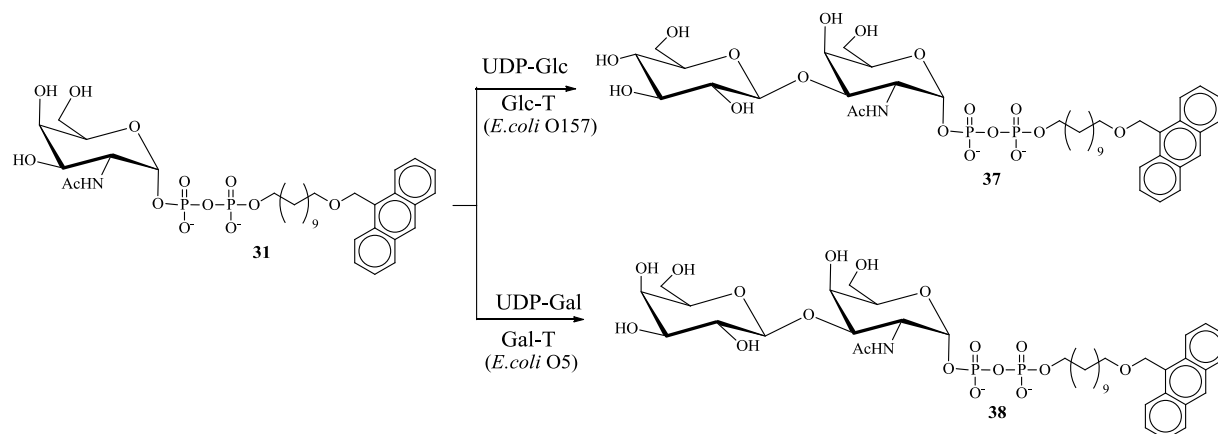


Фракции элюатов анализировали методом ТСХ на пластинках с SiO₂. При этом, как это обычно наблюдается в подобных случаях, дисахарид **36** имел меньшую хроматографическую подвижность по сравнению с исходным моносахаридным производным **30**. Соответствующая продукту зона была радиоактивной, что указывало на присутствие остатка радиоактивной маннозы, и так же, как и исходное соединение **30**, 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 **36**.

Для изучения субстратных свойств производного **31** 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 **31** вводили в ферментативные реакции с радиоактивной или нерадиоактивной уридиндифосфатглюкозой (UDP-Glc), катализируемые глюкозилтрансферазой (Glc-T) WbdN из *E. coli* O157^{115,116} (схема 11).

Схема 11



После проведения инкубации реакционную смесь наносили на картридж C18 (SepPak) и фракционировали, как в случае продуктов ферментативной реакции дифосфата **30**. Метанольные фракции, содержащие радиоактивность, концентрировали в вакууме и анализировали ВЭЖХ на обращенной фазе RP-18 (УФ-детектор, 247 нм), собирая фракции по 1 мл.

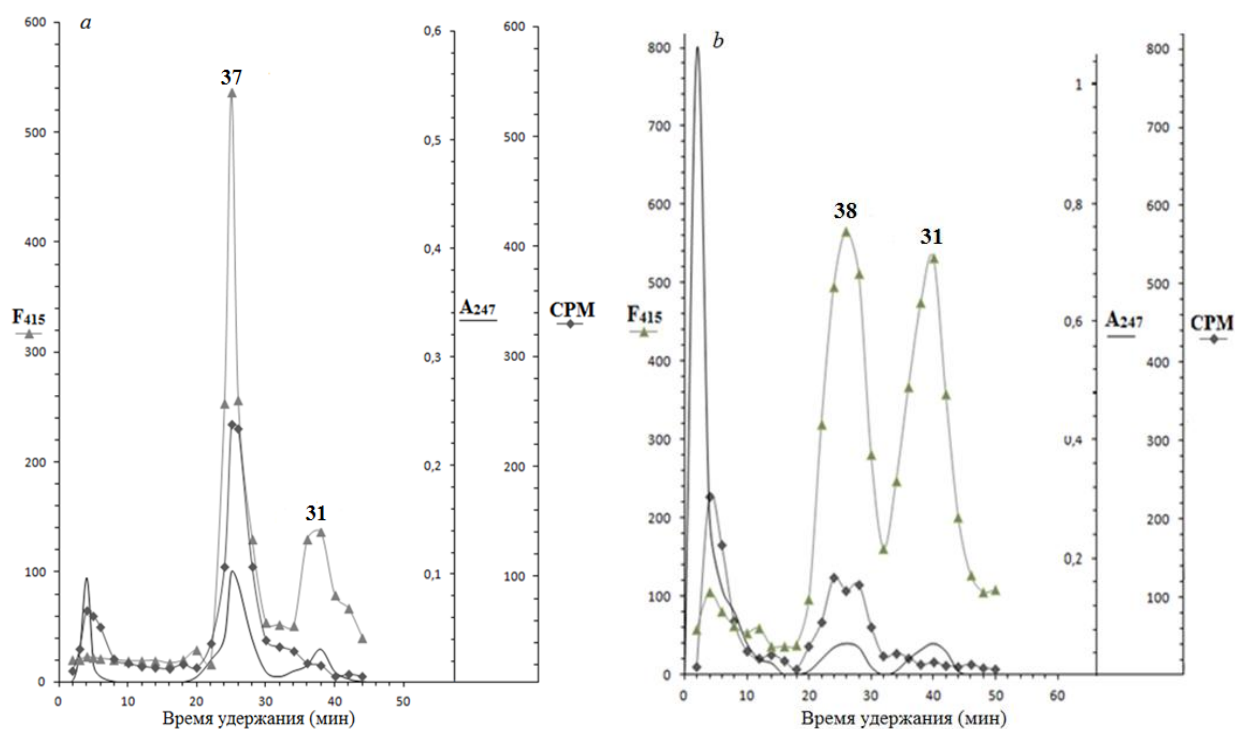


Рис. 2 Распределение поглощения при 247 нм (A_{247}), радиоактивности (СРМ) и флуоресценции при 415 нм (F_{415}) во фракциях ВЭЖХ, полученных при разделении продуктов ферментативных реакций с участием гликозилдифосфата **31**, катализируемых Glc-T WbdN из *E. coli* O157 (a) и Gal-T WbwC из *E. coli* O5 (b).

При этом было зафиксировано два пика с временами удержания 26 и 38 мин, причем последний соответствовал исходному дифосфату **31** (рис. 2a, 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 **37**.

На основании данных, полученных из серии ферментативных реакций с участием доноров радиоактивно меченых моносахаров, были определены кинетические характеристики эффективностей клонированных ферментов WbdN и WbwC. Так, было установлено, что значение K_M для субстрата **31** в процессе, катализируемом глюкозилтрансферазой WbdN, составило 0.009 мМ, а V_{max} – 3 нмоль/ч/мг. В случае переноса остатка галактозы при катализе галактозилтрансферазой WbwC значение K_M составило 0.120 мМ, V_{max} – 128 нмоль/ч/мг.

Кроме того, было продемонстрировано, что соединение **31** является также субстратом-акцептором Gal-T WbwC из *E. coli* O104.¹¹⁷

В экспериментах с нерадиоактивным углеводным донором (UDP-Glc), дифосфат **37** выделяли препаративно и характеризовали масс-спектром MALDI высокого разрешения (рис. 3A). Гликозилакцепторные свойства дифосфата **31** были также изучены в ферментативной реакции с UDP-Gal, катализируемой Gal-T WbwC из *E. coli* O5¹¹⁵ (схема 11). Образование продукта этой реакции **37** подтверждали аналогично описанному выше для дисахарида **36** (рис. 2b и рис. 3B).

Таким образом, впервые синтезированные неизопреноидные флуоресцентные аналоги бактериальных ундекапренилдифосфатсахаров **30** и **31** оказались активными в модельных ферментативных реакциях сборки О-антигенов ряда граммотрицательных бактерий и могут служить инструментами для изучения деталей метаболизма этих микроорганизмов.

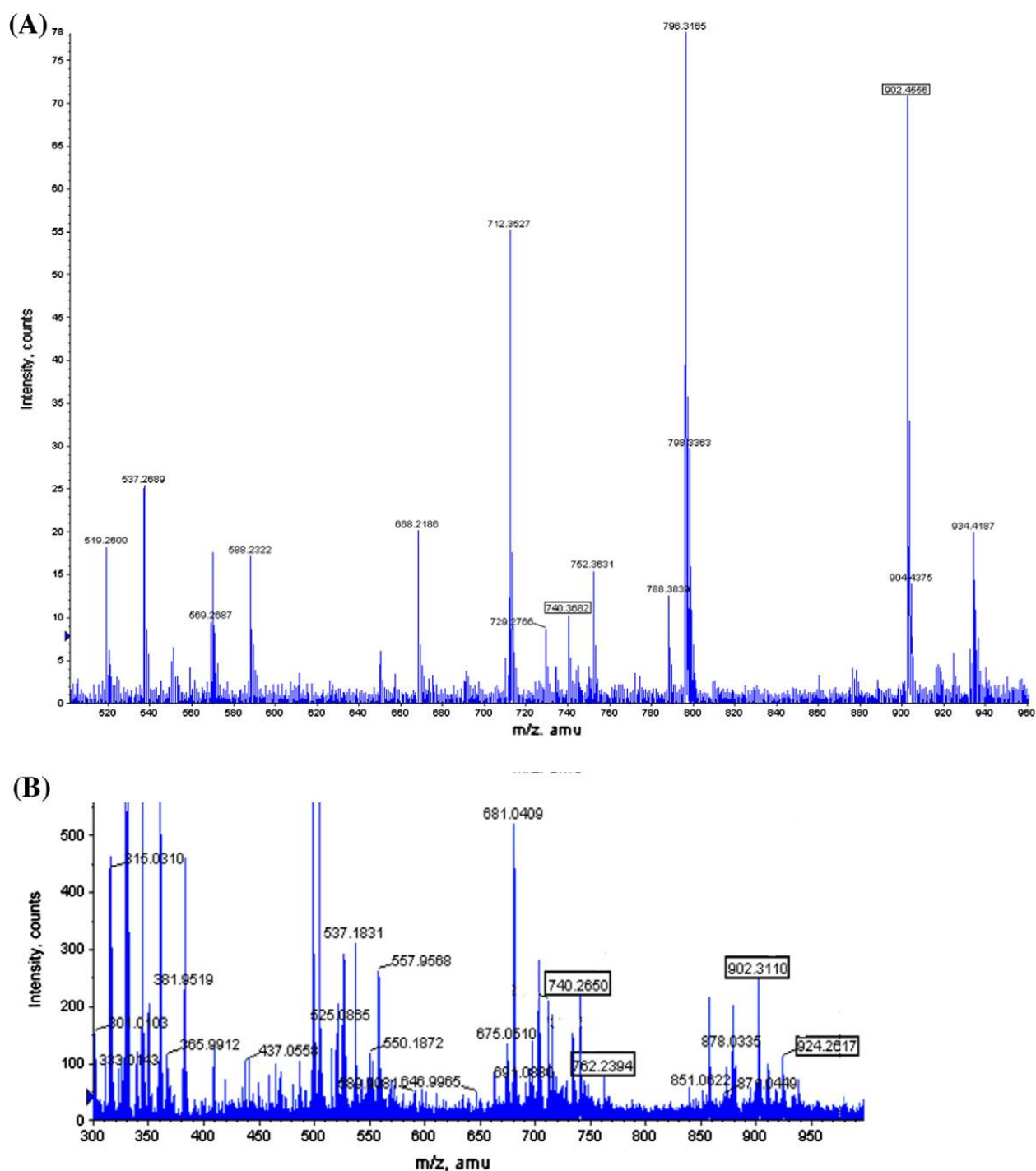
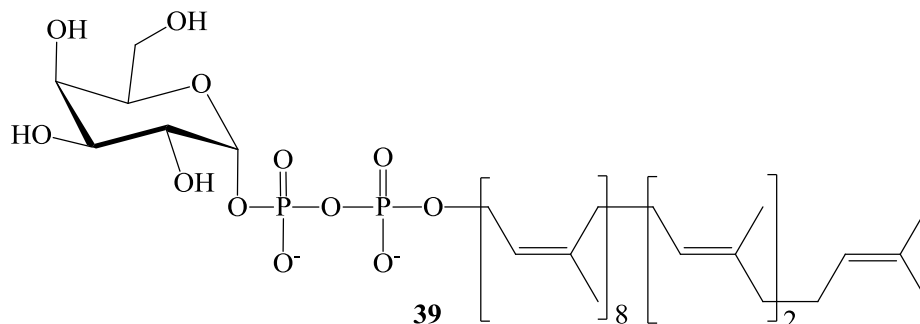


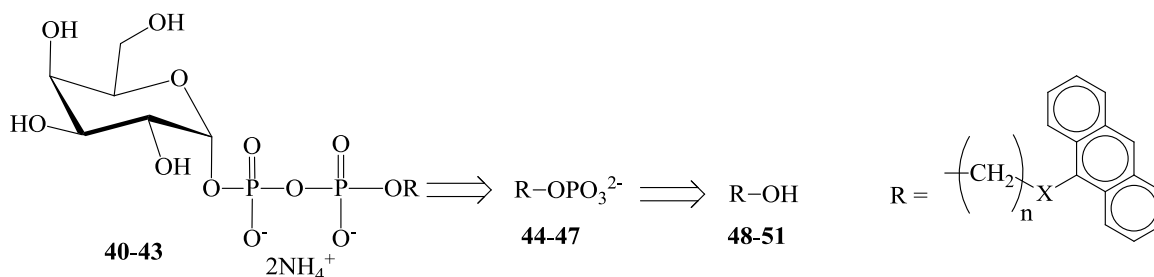
Рис. 3. Масс-спектры MALDI (область отрицательно заряженных ионов) реакционной смеси ферментативных реакций с участием дифосфата **31** после очистки на картридже с обращенной фазой C18 (SepPak). **(A)** Реакция, катализируемая глюкозилтрансферазой WbdN. Исходный дифосфат **31** виден при m/z 740.38 $[M+H]^-$, продукт реакции **37** – при 902.46 $[M+H]^-$. **(B)** Реакция, катализируемая галактозилтрансферазой WbwC. Исходный дифосфат **31** виден при m/z 740.26 $[M+H]^-$ и при m/z 762.24 $[M+Na]^-$, продукт реакции **38** – при 902.31 $[M+H]^-$ и при m/z 924.26 $[M+Na]^-$.

На заключительном этапе работы было проведено исследование, направленное на оптимизацию структурных параметров неизопrenoидных аналогов ундекапренилдифосфатгалактозы **39** и, в частности, размеров их липофильной части.



Для этой цели был осуществлен синтез четырех новых флуоресцентных аналогов **40-43** гликозиддифосфата **39** с разной протяженностью липофильного фрагмента (схема 12) и проведено сравнение их эффективности в качестве гликозилакцепторов в ферментативной реакции, катализируемой Man-T из *S. Newport*.

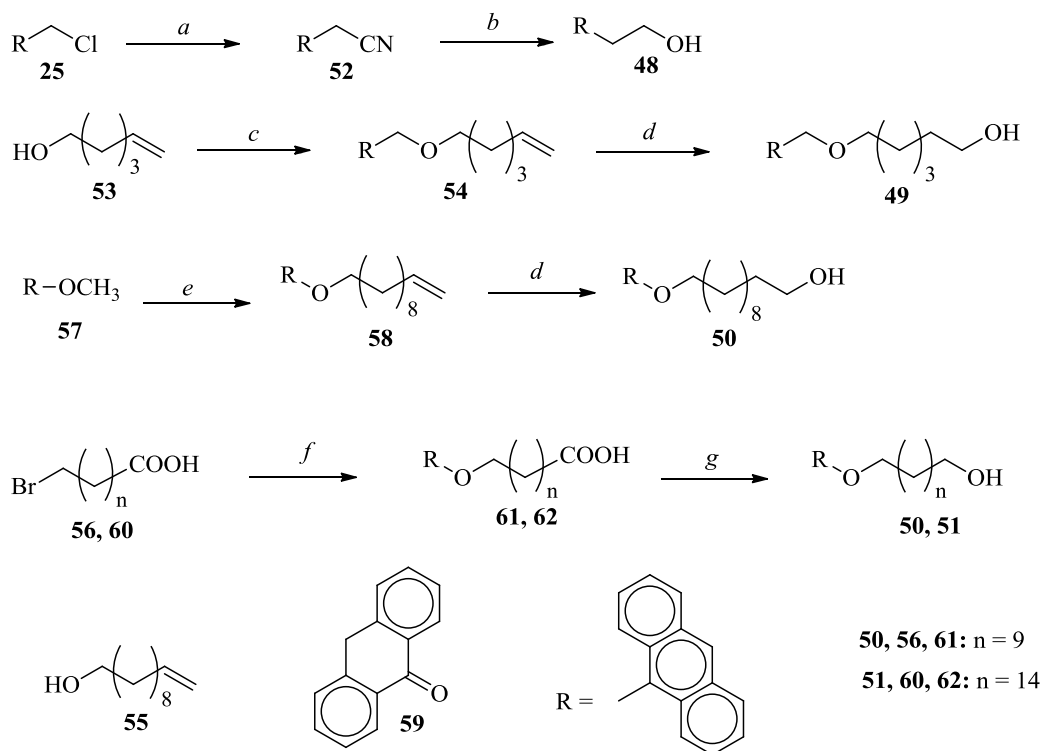
Схема 12



40, 44, 48: $n = 1$; $X = -CH_2-$; **41, 45, 49:** $n = 6$; $X = -O-CH_2-$; **42, 46, 50:** $n = 11$; $X = -O-$; **43, 47, 51:** $n = 16$; $X = -O-$

Синтез галактозиддифосфатов **40-43** осуществляли по общей схеме фосфогалактозилированием фосфоэфиров **44-47** соответствующих спиртов **48-51**. Известный 2-(9-антраценилокси)этанол **48** был получен, исходя из 9-(хлорметил)антрацена **25**. Последний конденсировали с цианидом натрия и образующийся нитрил **52** последовательным действием DIBAL и $NaBH_4$ восстанавливали в целевое соединение **48** (схема 13).¹¹⁸ Неизвестные ранее спирты **49-51** были получены на основе доступных предшественников.

Схема 13



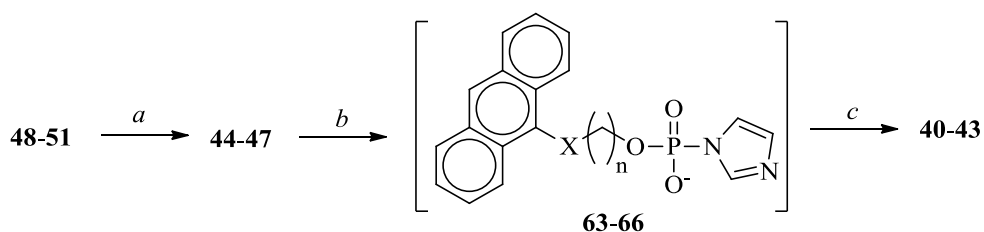
Реагенты и условия: *a.* 1) NaCN, DMF, 20°C; 2) 3M aq. NaOH, 20°C (77 %); *b.* 1) DIBAL, THF, -10°C→20°C; 2) NaBH₄, THF, -10°C→20°C (31%); *c.* 1) **52**, NaNH, Bu₄NI, THF, 20°C, (85%); *d.* 1) NaBH₄, BF₃·Et₂O, 20°C; 2) 3M aq. NaOAc, 30% aq. H₂O₂, (73% для **50**, 31% для **51**); *e.* **55**, TsOMe, PhH, 80°C, (56%); *f.* 1) **59**, Bu₄NBr, 48% aq. KOH, PhCH₃, кипячение; 2) 30% aq. HCl, (38% для **61**, 61% для **62**); *g.* 1) NaBH₄, BF₃·Et₂O, 20°C; 2) H₂O, (82% для **50**, 86% для **51**).

Для синтеза 6-(9'-антраценилметокси)гексан-1-ола **49** был использован коммерчески доступный гекс-5-ен-1-ол **53**, алкоголь которого конденсировали с 9-(хлорметил)антраценом **25** в присутствии каталитического количества Bu₄NI с образованием 6-(9'-антраценилметокси)гекс-1-ена **54**. Гидроборирование последнего, генерируемым *in situ* BH₃, и последующее окисление промежуточных борсодержащих соединений H₂O₂ дало целевой спирт **49** с общим выходом на две стадии 62 %. Синтез 11-(9'-антраценилокси)ундекан-1-ола **50** был осуществлен двумя альтернативными способами из доступных ундец-10-ен-1-ола **55** и 11-бромундекановой кислоты **56**. В первом случае гидроксидолефин **55** использовали для переалкилирования 9-(метокси)антрацена **57**, катализируемого TsOMe. Продукт реакции – терминальный олефин **58** – превращали в целевой спирт **50** аналогично описанной выше процедуре

гидроборирования – окисления. По альтернативной схеме алкилирование бромкислоты **56** антроном **59** в присутствии щелочи и каталитического количества Bu_4NBr привело к образованию 11-(9'-антраценилокси)ундекановой кислоты **61**, которую затем восстанавливали в спирт **50** полученным *in situ* комплексом $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$. 16-(9'-Антраценилокси)гексадекан-1-ол **51** получали аналогично, исходя из коммерчески также доступной 16-бромгексадекановой кислоты **60** через стадию образования 16-(9'-антраценилокси)гексадекановой кислоты **62**.

Спирты **48–51** фосфорилировали избытком POCl_3 в присутствии Et_3N с последующим щелочным гидролизом промежуточно образующихся фосфодихлоридов (схема 14).

Схема 14



63: $n = 1$, $X = -\text{CH}_2-$; **64:** $n = 6$, $X = -\text{OCH}_2-$; **65:** $n = 11$, $X = -\text{O}-$; **66:** $n = 16$, $X = -\text{O}-$

Реагенты и условия: *a.* 1) POCl_3 , NEt_3 , THF, 20°C ; 2) 2.5 М аq. NaOH; 3) 3 % аq. HCl; *b.* CDI, THF, 20°C ; *c.* 1) α -D-галактопиранозилфосфата бис-триэтиламониевая соль, THF, DMF, 37°C ; 2) хроматография на DEAE-целлюлозе DE-52 (OAc^-), NH_4OAc , MeOH; 3) хроматография на картридже C-18 (SepPak).

Подкислением образующихся при этом натриевых солей разбавленной соляной кислотой получены соответствующие кислые фосфаты **44–47** с выходами от 35% до 92%, которые далее вводили в пирофосфатный синтез с галактозилфосфатом.

Так, полученные *in situ* бис-триэтиламониевые соли фосфатов **44–47** избытком CDI переводили в соответствующие имидазолиды **63–66**, которые без выделения конденсировали с бис-триэтиламониевой солью α -D-галактопиранозилфосфата в смеси THF и DMSO. Образовавшиеся целевые дифосфаты **40–43** выделяли аналогично описанному выше для P^1 -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- P^2 -(α -D-галактопиранозил)дифосфата **30**. После лиофилизации из абс. бензола соединения **40–43** представляли собой белые порошки, которые могут храниться практически не изменяясь при -18°C в инертной атмосфере.

Строение неизвестных ранее соединений **40–47**, **49–51**, **54**, **58**, **61** и **62** подтверждено совокупностью физико-химических данных. В их ЯМР ^1H и ^{13}C спектрах присутствуют сигналы, характерные для функционализированных линейных углеводов и антраценильного фрагмента. В ЯМР ^1H спектрах галактозилдифосфатлипидов **40–43** четко идентифицируются сигналы галактозильного остатка.

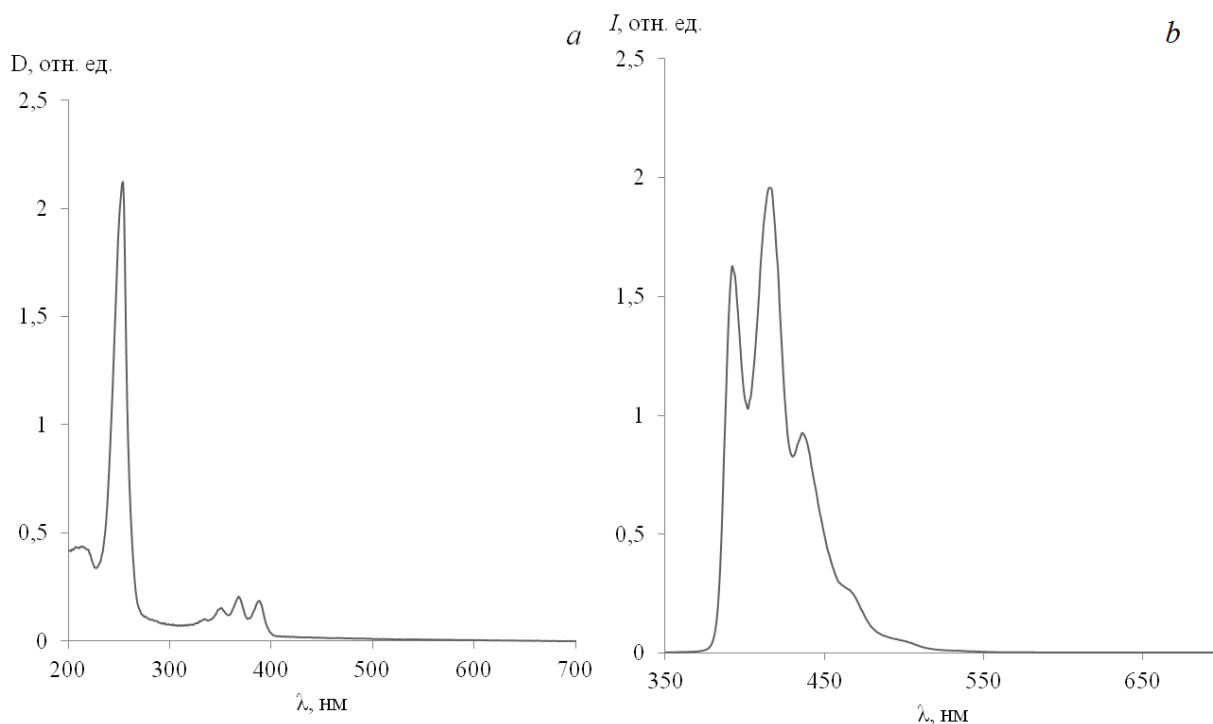
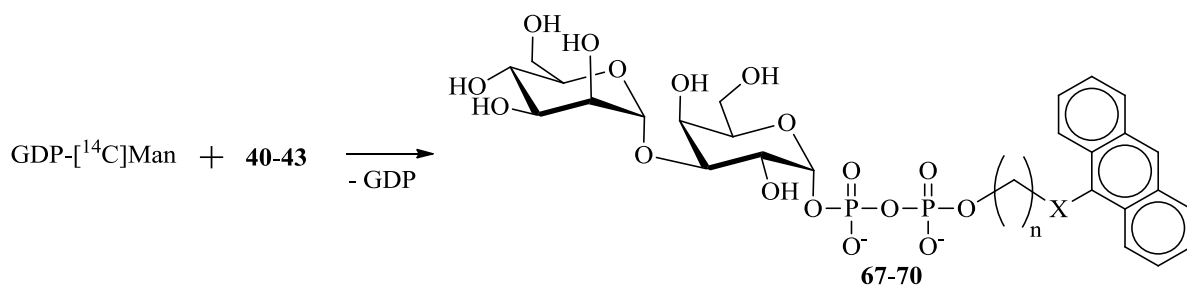


Рис.4 *a* – спектр поглощения дифосфата **40** (аммониевая соль), $2 \cdot 10^{-5}$ М водный раствор; *b* – спектр флуоресценции дифосфата **40** (аммониевая соль), $2 \cdot 10^{-5}$ М водный раствор.

Положение полос, как в спектрах поглощения, так и флуоресценции для дифосфатов **40–43** оказалось практически одинаковым. В качестве примера на рис. 4 приведены спектры соединения **40** в водном растворе (максимум поглощения λ 253 нм, максимум флуоресценции λ 415 нм).

Способность дифосфатов **40–43** служить субстратами-акцепторами маннозилтрансферазы 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 **40–43** (в количестве 2 нмоль) инкубировали с препаратом клеточных мембран *S. newport*, содержащем указанную трансферазу, и, в качестве донора остатка маннозы, радиоактивную GDP- ^{14}C Man (схема 15). Продукты ферментативных реакций **68–71** выделяли хроматографией на обращенной фазе C18 (картриджи SepPak).

Схема 15



67: n = 1, X = -CH₂-; **68:** n = 6, X = -OCH₂-; **71:** n = 11, X = -O-; **70:** n = 16, X = -O-

Водорастворимые компоненты, включая непрореагировавший радиоактивный нуклеозиддифосфатсахар, элюировали водой, а липидсодержащие компоненты, в том числе, ожидаемые дифосфаты **67–70** – метанолом. Продукты реакции идентифицировали методом ТСХ по совпадению на пластинах флуоресцирующих (365 нм) и радиоактивных зон, что подтверждает наличие в составе молекул этих соединений фрагментов исходных гликозилакцепторов **40–43** и меченного маннозильного остатка.

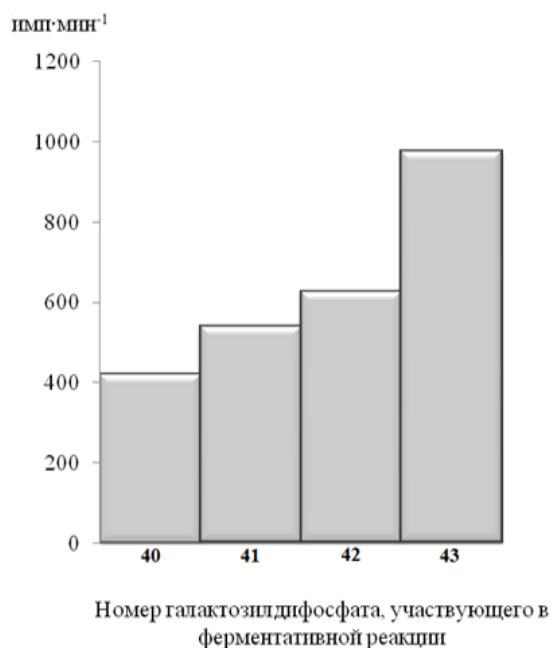


Рис. 5. Сравнение уровней радиоактивности липофильных продуктов биохимических реакций с участием галактозилдифосфатов **40–43** и GDP-[¹⁴C]Man, катализируемых маннозилтрансферазой из клеток *S. Newport*.

При сопоставлении результатов ферментативных реакций в ряду галактозилпирофосфатов **40–43**, 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 **43** с наибольшей протяженностью липидного фрагмента, а наименьшей – производное **40** с самым коротким липидным остатком (см. рис. 5).

Кроме того, была проведена указанная ферментативная реакция с применением нерадиоактивной GDP-Man в качестве субстрата-донора и дифосфата **43** в качестве субстрата-акцептора с увеличением количеств ее компонентов в 30 раз по сравнению с описанным выше экспериментом.

Целевой продукт **70** выделяли с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе (RP-18) и идентифицировали масс-спектрометрией (ESI) высокого разрешения.

Экспериментальная часть

ИК-спектры регистрировали на приборах «Specord M-80» и «Bruker ALPHA-T». Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) соединений **30**, **31**, **40–43** регистрировали на спектрометре «Bruker AVANCE II-600», соединений **5**, **15**, **14a,b**, **23**, **32**, **44–47** – на спектрометре «Bruker AM-300», остальных соединений на спектрометре «Bruker AC-200». Масс-спектр (ESI) фосфатов записывали на спектрометре «Bruker micrOTOF II» при потенциале капилляра 4500 В с прямым (шприцевым) вводом раствора образца в метаноле (3 мкл·мин⁻¹) в режиме отрицательных и положительных ионов. Масс-спектры высокого разрешения (MALDI) получены на спектрометре Applied Biosystems/MDS Sciex QSTAR XL, оснащенного системой Agilent HP1100 CapLC в режиме отрицательных ионов. Спектр МС (сканирование от m/z 300 до m/z 2000) получен в режиме регистрации отрицательных ионов. Основной поток азота 4 л·мин⁻¹ (180 °С). УФ-спектры (λ_{max} , нм) получены на спектрофотометре «LKB biochrom ultrospec 4050». Спектры флуоресценции, для соединения **31** регистрировали на приборе LS 55 Perkin Elmer, для соединений **40–43** регистрировали на приборе «Флюорат-02-Панорама».

Аналитическую хроматографию проводили на пластинках с закрепленным слоем Silica Gel 60 (Merck, Германия) и Silica gel/TLC-cards DC-Alufolien-Kieselgel 254 нм (Fluka). Продукты ферментативных реакций анализировали на пластинах DC-Alufolien Kieselgel F₂₅₄ (Fluka). Вещества обнаруживали при облучении УФ-светом (254 нм или 360 нм, лампа Vilber Lourmat, Франция), обработкой парами I₂ и 10% H₂SO₄ в метаноле с последующим нагреванием.

Колоночную хроматографию проводили на колонке (1.5×30 см) с силикагелем (40–60 мкм, Acros Organics) и «Silica gel 60» (0.04–0.06 мм, «Fluka»), контролируя разделение по ТСХ. Колоночную анионообменную хроматографию фосфата **5** проводили на DEAE-целлюлозе DE-52 («Whatman», Англия) Анализ ВЭЖХ проводили на колонке, заполненной Separon SGX C-18 (5 мкм, 150×3.3 мм); элюент – EtOH (0.5 мл·мин⁻¹), УФ-детектор (210 нм). Выделение продуктов ферментативных реакций проводили на мини-колонках ДиаПак C18 (ЗАО БиоХимМак СТ, Москва) и SepPak C18 (SepPak, Waters, США).

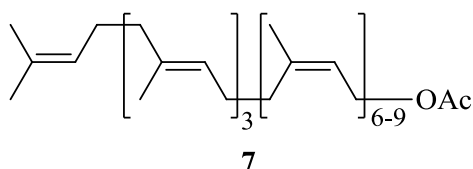
UDP-[¹⁴C]Gal, GDP-[¹⁴C]Man, UDP-[¹⁴C]GlcNAc, 285 мКи·ммоль⁻¹ (Amersham, Англия), UDPGal (Sigma), разбавляли нерадиоактивными нуклеотидсахарами (Sigma, США). В работе использовали диоксанный сцинтиллятор типа ЖС-7 (Реахим) и Ready

Safe (Beckman Coulter). Радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе при помощи жидкостно-сцинтилляционного счетчика «Delta 300» (Tracor Analytic, Голландия).

Смесь полипренолов **6** (WT₃C₆OH, WT₃C₇OH, WT₃C₈OH, WT₃C₉OH, 5 : 25 : 20 : 2) была любезно предоставлена к.х.н. Л. Л. Даниловым. 2-(9'-Антраценил)этанол **48**¹²³, 9-метоксиантрацен **57**¹¹⁸ и 3,4,6-три-О-ацетил-2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозилфосфат **35**⁶¹ получали по известным методикам. α -D-Галактопиранозилфосфат **34** (Reanal, Венгрия) переводили в бис-Et₃NH⁺ соль соупариванием с триэтиламином в бутаноле и лиофильным высушиванием из абс. бензола после обработки смолой Dowex 50 W×8 (H⁺).

A. hydrophila АН-1 (1 мг·мл⁻¹ белка) любезно предоставлен профессором Х. Томасом (Juan Tomas) из Университета Барселоны (Испания) готовили по известной методике¹¹⁹. Препарат мембран *S. arizonae* O:59, содержащий 1 мг·мл⁻¹ белка, готовили по известной методике¹¹⁸ из культуры клеток этого микроорганизма, выращенной в Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Препарат мембран *S. Newport*, содержащий 1 мг·мл⁻¹ белка, готовили по известной методике¹¹⁹ из культуры клеток этого микроорганизма, предоставленной НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Бактерии *E. coli* BL21 были клонированы как описано¹¹¹, с внедрением вектора pET28a, содержащего гены *wbdN* и *wbwC* в ТЕДА Нанкайского университета (г. Тянь-дзинь, КНР). Растворители, в том числе петролейный эфир (т.кип. 40–70 °С), очищали по стандартным методикам. В работе использовали реактивы фирмы «Acros Organics»: NBS, HIO₄·2H₂O, CCl₃CN, Ph₃P, Bu₄NH₂PO₄, DEAD, NaBH₄, 9-хлорметилантрацен, DIBAL, 5-гексен-1-ол, NaBH₄, BF₃·Et₂O, 10-ундец-1-ол, антрон, TsOH, 11-бромундекановую кислоту, 16-бромгексадекановую кислоту, POCl₃, CDI, 11-бромундеканол, 9-антраценкарбоновая кислота, ундец-10-ен-1-ол и 9-(хлорметил)антрацен, UDP-[³H]Gal, UDP-Gal, UDP-[³H]Glc, UDP-Glc

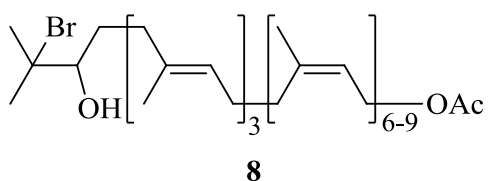
Ацетаты (7)



Раствор смеси спиртов **6** (4 ммоль, 3 г), DMAP (0.98 ммоль, 0.12 г), Ac₂O (6.0 ммоль, 0.61 г) и Py (6.0 ммоль, 0.48 г) в THF (12 мл) выдерживали 20 мин в атмосфере аргона при 20

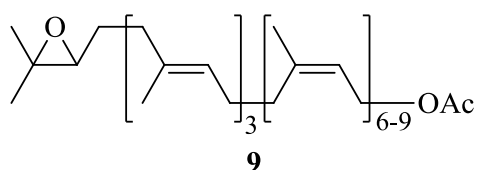
°С, затем разбавили петролейным эфиром (80 мл), промыли насыщенным раствором NaHCO_3 , водой, затем насыщенным раствором NaCl , сушили Na_2SO_4 и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на SiO_2 . Элюирование смесью петролейный эфир – MeOBU^t , (9:1) дало 3.12 г (~ 100 %) ацетатов **7** в виде бесцветного масла, R_f 0.51 («Silufol», петролейный эфир – MeOBU^t , 6:1). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.61 (уш.с, *cis*-Me); 1.70 (уш.с, *trans*-Me); 1.78 (уш.с MeC(3)); 1.90–2.20 (м, CH_2); 2.12 (с, MeCO); 4.57 (д, H_2CO , J 7.2); 5.14 (м, $\text{HC}=\text{C}$); 5.37 (уш.т, $\text{HC}(2)$, J 7.2), ср. лит.¹²⁰.

Бромгидрины (8)



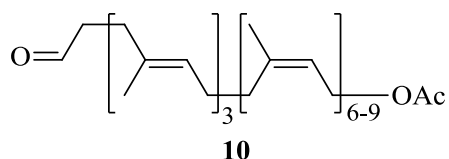
К перемешиваемому при 10 °С в атмосфере аргона раствору смеси ацетатов **7** (3.8 ммоль, 3.12 г) в THF (54 мл) и H_2O (9 мл) прибавили порциями в течение 20 мин NBS (5.4 ммоль, 0.96 г). Реакционную массу выдержали 3 ч, затем разбавили MeOBU^t (100 мл). Органический слой отделили, промыли водой, насыщенным раствором NaCl , сушили Na_2SO_4 и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на SiO_2 . Элюирование смесью петролейный эфир – MeOBU^t , (8:1) дало 1.95 г (~ 55 %) смеси бромгидринов **8** в виде бесцветного масла, R_f 0.56 («Silufol», петролейный эфир – MeOBU^t , 4:1). ИК-спектр, ν/cm^{-1} , (тонкий слой): 848, 1060, 1260, 1336, 1370, 1400, 1700, 2800–2900, 3550. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.34 и 1.36 (оба с, Me_2CO); 1.61 (уш.с, *cis*-Me); 1.69 (уш.с, *trans*-Me); 1.77 (уш.с MeC(3)); 1.90–2.20 (м, CH_2); 2.11 (с, MeCO); 3.99 (д.д, HCBBr , J 1.9, J 11.1), 4.57 (д, H_2CO , J 7.3); 5.05–5.26 (м, $\text{HC}=\text{C}$); 5.38 (уш.т, $\text{HC}(2)$, J 7.3). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 15.8; 16.0; 21.0; 23.4; 23.5; 25.8; 26.6; 29.7; 32.0; 32.2; 32.3; 38.1; 39.6; 39.7; 61.1; 70.9; 72.4; 119.1; 124.1; 124.3; 124.4; 124.9; 125.0; 126.0; 132.9; 134.7; 135.2; 135.3; 135.8; 142.6; 171.0.

Эпоксиды (9)



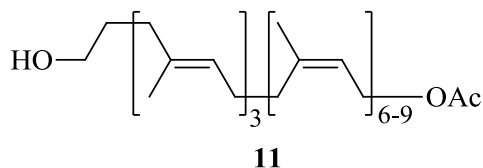
К перемешиваемому при 20 °С в атмосфере аргона раствору смеси бромгидринов **8** (3.9 ммоль, 3.5 г) в бензоле (30 мл) и MeOH (15 мл) прибавили K₂CO₃ (7.3 ммоль, 1.01 г). Реакционную массу выдержали 4 ч, затем разбавили MeOBu^t (100 мл), промыли водой, насыщенным раствором NaCl, сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на 150 г SiO₂. Градиентное элюирование смесью петролейный эфир – MeOBu^t, (от 9:1 до 4:1) дало 1.99 г (~ 62 %) смеси эпоксидов **9** в виде бесцветного масла, R_f 0.78 («Silufol», петролейный эфир – MeOBu^t, 4:1). ИК-спектр, ν/см⁻¹, (тонкий слой): 840, 930, 960, 1060, 1090, 1130, 1230, 1380, 1450, 1670, 1740, 2730, 2860, 2930, 2960. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃): 1.24 и 1.27 (оба с, Me₂CO); 1.61 (уш.с, *cis*-Me); 1.69 (уш.с, *trans*-Me); 1.77 (уш.с MeC(3)); 1.92–2.20 (м, CH₂); 2.12 (с, MeCO); 2.70 (т, HCO, *J* 6.6), 4.58 (д, H₂CO, *J* 7.3); 5.10–5.27 (м, HC=); 5.39 (уш.т, HC(2), *J* 7.2). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃): 16.1; 18.8; 21.1; 23.4; 23.5; 25.0; 26.4; 26.7; 27.5; 32.0; 32.3; 32.4; 36.4; 39.7; 39.8; 58.3; 61.1; 64.2; 119.3; 124.2; 124.3; 124.4; 125.0; 125.1; 134.0; 134.9; 135.2; 135.3; 135.4; 135.9; 142.6; 171.1.

Альдегиды (**10**)



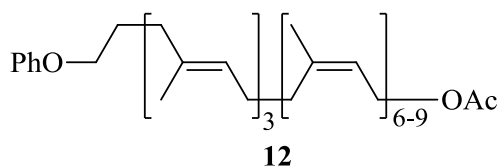
К перемешиваемому при 20 °С в атмосфере аргона раствору смеси эпоксидов **9** (2.4 ммоль, 1.99 г) в Et₂O (30 мл) за 5 мин прибавили раствор HIO₄·2H₂O (4.8 ммоль, 0.98 г) в THF (25 мл). Реакционную массу выдержали 2 ч, затем разбавили MeOBu^t (100 мл), промыли водой, насыщенным раствором NaCl, сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на 60 г SiO₂. Градиентное элюирование смесью петролейный эфир – MeOBu^t, (от 9:1 до 4:1) дало 1.85 г (~ 97 %) смеси альдегидов **10** в виде бесцветного масла, R_f 0.36 («Silufol», петролейный эфир – MeOBu^t, 5:1). ИК-спектр, ν/см⁻¹, (тонкий слой): 840, 920, 1020, 1230, 1300, 1380, 1460, 1740, 2860–2960. Спектр ЯМР ¹H CDCl₃): 1.62 (уш.с, *cis*-Me); 1.68 (уш.с, *trans*-Me); 1.76 (уш.с MeC(3)); 1.94–2.55 (м, CH₂); 2.11 (с, MeCO); 4.56 (д, H₂CO, *J* 7.4); 5.13 (м, HC=); 5.37 (уш.т, HC(2), *J* 7.4); 9.75 (т, CHO, *J* 1.7). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃): 15.9; 16.0; 21.0; 23.4; 23.5; 26.3; 26.4; 26.5; 26.6; 29.7; 31.8; 31.9; 32.1; 32.3; 39.4; 39.7; 42.1; 61.0; 119.2; 124.1; 124.3; 124.4; 124.9; 125.0; 125.4; 135.0; 135.1; 135.2; 135.7; 142.5; 171.2; 202.5.

Гидроксиацетаты (11)



К перемешиваемому при 20 °С в атмосфере аргона раствору альдегидов **10** (2.3 ммоль, 1.85 г) в DME (20 мл) за 5 мин прибавили NaBH₄ (1.85 ммоль, 0.07 г). Реакционную массу выдержали 50 мин, затем разбавили MeOBu^t (50 мл). Последовательно промыли насыщенным раствором NH₄Cl, H₂O, насыщенным раствором NaCl, сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на 50 г SiO₂. Градиентное элюирование смесью петролейный эфир – MeOBu^t, (от 9:1 до 2:1) дало 1.1 г (~ 60 %) смеси гидроксиацетатов **11** в виде бесцветного масла, R_f 0.18 («Silufol», петролейный эфир – MeOBu^t, 4:1). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃): 1.61 (уш.с, *cis*-Me); 1.69 (уш.с, *trans*-Me); 1.77 (уш.с MeC(3)); 1.90–2.60 (м, CH₂); 2.13 (с, MeCO); 3.53 (т, H₂COH, *J* 6.4); 4.56 (д, H₂COAc, *J* 7.3); 5.14 (м, HC=); 5.38 (уш.т, HC(2), *J* 7.3). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃): 15.8; 15.9; 21.0; 23.4; 23.5; 26.4; 26.6; 30.7; 31.9; 32.2; 36.0; 39.6; 39.7; 42.0; 61.0; 62.8; 119.1; 124.1; 124.2; 124.3; 124.8; 124.9.; 125.0; 134.5; 134.8; 135.2; 135.3; 135.8; 142.6; 171.1.

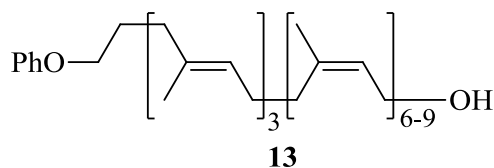
Феноксиацетаты (12)



К перемешиваемому при 0 °С в атмосфере аргона раствору смеси гидроксиацетатов **11** (0.5 ммоль, 0.39 г), Ph₃P (0.65 ммоль, 0.17 г) и PhOH (1.59 ммоль, 0.15 г) в THF (5 мл) за 5 мин прибавили раствор DEAD (0.52 ммоль, 0.09 г). Реакционную массу выдержали 15 ч при 0 °С, затем разбавили MeOBu^t (20 мл). Последовательно промыли H₂O, насыщенным раствором NaCl, сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на 20 г SiO₂. Градиентное элюирование смесью петролейный эфир – MeOBu^t, (от 9:1 до 4:1) дало 0.19 г (~ 44 %) смеси феноксиацетатов **12** в виде бесцветного масла, R_f 0.77 («Silufol», петролейный эфир – MeOBu^t, 4:1). ИК-спектр, ν/cm⁻¹, (тонкий слой): 680, 720, 780, 900, 1060, 1080, 1110, 1170, 1240, 1380, 1400, 1450, 1480, 1500, 1550,

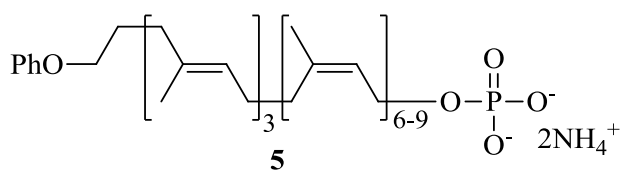
1630, 1660, 1680, 1740, 2860, 2880, 2930, 2960. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.61 (уш.с, *cis*-Me); 1.65 (с, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{Me}})\text{C}=\text{}$); 1.71 (уш.с, *trans*-Me); 1.78 (уш.с MeC(3)); 1.98–2.22 (м, CH_2); 2.13 (с, MeCO); 3.95 (т, H_2COPh , J 6.5); 4.58 (д, H_2COAc , J 7.2); 5.15 (м, $\text{HC}=\text{}$); 5.39 (уш.т, $\text{HC}(2)$, J 7.2); 6.93 и 7.29 (оба м, $\text{HC}_{\text{аром}}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 16.9; 21.0; 23.4; 26.4; 27.5; 32.0; 32.2; 32.4; 35.8; 39.6; 39.7; 61.1; 67.3; 114.5; 119.2; 120.4; 124.1; 124.3; 124.9; 125.0; 128.4; 128.5; 128.7; 129.4; 133.5; 133.9; 135.2; 135.3; 135.8; 142.3; 171.2.

Феноксиспирты (13)



К перемешиваемому при 20 °С в атмосфере аргона раствору смеси ацетатов **12** (0.22 ммоль, 0.19 г) в MeOH (5 мл) и бензола (5 мл) прибавили одной порцией K_2CO_3 (0.72 ммоль, 0.15 г). Реакционную массу выдержали 17 ч, затем разбавили MeOBu^t (20 мл). Последовательно промыли H_2O , насыщенным раствором NaCl, сушили Na_2SO_4 и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на 20 г SiO_2 . Градиентное элюирование смесью петролейный эфир–MeOBu^t, (от 9:1 до 4:1) дало 0.12 г (~ 66 %) смеси феноксиспиртов **13** в виде бесцветного масла, R_f 0.23 («Silufol», петролейный эфир – MeOBu^t, 6:1). Времена удерживания (ВЭЖХ, мин) основных компонентов смеси **13**: 4.7 ($\text{C}_{53}\text{H}_{82}\text{O}_2$), 5.7 ($\text{C}_{58}\text{H}_{90}\text{O}_2$), 7.0 ($\text{C}_{63}\text{H}_{98}\text{O}_2$) и 8.6 ($\text{C}_{68}\text{H}_{106}\text{O}_2$) при их соотношении ~5 : 25 : 20 : 2 соответственно. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.62 (уш.с, *cis*-Me); 1.65 (с, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{Me}})\text{C}=\text{}$); 1.70 (уш.с, *trans*-Me); 1.77 (уш.с MeC(3)); 1.97–2.21 (м, CH_2); 3.94 (т, H_2COPh , J 6.5); 4.12 (д, H_2COH , J 7.2); 5.15 (м, $\text{HC}=\text{}$); 5.47 (уш.т, $\text{HC}(2)$, J 7.2); 6.94 и 7.30 (оба м, $\text{HC}_{\text{аром}}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 15.9; 23.3; 26.2; 26.5; 27.4; 31.9; 32.1; 35.7; 39.5; 39.6; 58.9; 67.2; 114.4; 120.4; 124.0; 124.2; 124.4; 124.8; 124.9; 129.3; 135.1; 135.2; 135.9; 139.7.

Фосфаты (5)



К смеси спиртов **13** (0.1 ммоль, 0.089 г) при 20 °С в атмосфере аргона последовательно прибавили 0.5 М раствор $\text{Bu}^n_4\text{NH}_2\text{PO}_4$ (0.64 мл) в CH_2Cl_2 и 1 М раствор Cl_3CCN в CH_2Cl_2 (0.5 мл). Реакционную смесь выдержали 48 ч при 20 °С, затем сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в верхней (органической) фазе равновесной смеси Bu^nOH –вода (3 мл). Раствор промыли нижней фазой той же смеси (4×1 мл), сконцентрировали в вакууме, остаток растворили в толуоле (5 мл) и вновь сконцентрировали. К остатку прибавили смесь MeOBu^t – MeOH , 2:1 (6 мл), концентрированный водный раствор NH_3 (50 мкл) и катионит Dowex 50W×8 (NH_4^+) (1.5 г) и перемешивали 1 ч. Ионообменную смолу отфильтровали и промыли на фильтре смесью MeOBu^t – MeOH , 2:1 (100 мл). Полученный раствор пропустили через колонку 8×1 см с DEAE-целлюлозой (OAc^-), колонку дополнительно промыли 50 мл смеси MeOBu^t – MeOH , 2:1, затем MeOH (50 мл) и элюировали фосфаты **5** 50 мМ раствором AcONH_4 в MeOH (150 мл), контролируя разделение методом ТСХ (Silica Gel 60 «Merck») в системе CHCl_3 – MeOH – H_2O , 60 : 25 : 4). Фракции, содержащие фосфат, сконцентрировали в вакууме, остаток растворили в 8 мл толуола и оставили на 16 ч при 0 °С. Толуольный раствор декантировали с выпавшего осадка, сконцентрировали в вакууме. Процедуру осаждения из толуольного раствора проводили еще дважды, после чего продукт вакуумировали (40 °С, 2 Торр) в течение 2 ч. Получено 49.2 мг (~ 50 %) маслообразной смеси фосфатов **5**, R_f 0.45 (Silica Gel 60 «Merck»), CHCl_3 – MeOH – H_2O , 60 : 25 : 4). Масс-спектр ESI (m/z ($I_{\text{отн}}$, (%)), брутто-формула, молекулярная масса иона [$M - H$]): 829.58 (19), $\text{C}_{53}\text{H}_{81}\text{O}_5\text{P}$, 829.19; 897.65 (100), $\text{C}_{58}\text{H}_{89}\text{O}_5\text{P}$, 897.31; 965.71 (82), $\text{C}_{63}\text{H}_{97}\text{O}_5\text{P}$, 965.43; 1033.77 (12), $\text{C}_{68}\text{H}_{105}\text{O}_5\text{P}$, 1033.55. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 – CD_3OD , 5:1): 1.51 (уш.с, *cis*-Me); 1.54 (уш.с, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{Me}})\text{C}=\text{}$); 1.59 (уш.с, *trans*-Me); 1.63 (уш.с MeC(3)); 1.83–2.07 (м, CH_2); 3.83 (т, H_2COPh , J 6.4); 4.30 (м, H_2COP); 5.04 (м, $\text{HC}=\text{}$); 5.28 (уш.т, $\text{HC}(2)$, J 7.0); 6.82 и 7.18 (оба м, $\text{HC}_{\text{аром}}$). Спектр ЯМР ^{13}C (125.03 МГц, CDCl_3 – CD_3OD , 5:1): 15.7; 23.0; 26.0; 26.2; 26.4; 27.3; 29.5; 31.7; 32.0; 35.6; 39.4; 39.5; 61.6 (CH_2OP); 67.2 (CH_2OPh); 114.3; 120.3; 122.0; 124.0; 124.1; 124.2; 124.7; 124.8; 129.2; 135.0; 135.3; 139.2. Спектр ЯМР ^{31}P (CDCl_3 – CD_3OD , 5:1): 1.73.

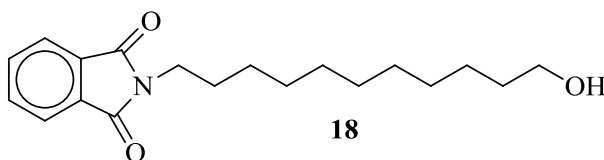
Биохимические исследования (общая методика).

Смесь 40 нмоль фосфатов **5**, 30 мкл буферного раствора 0.1 мМ трис- HCl (рН 8.0), 4 мкл 0.2 М водного раствора MgCl_2 , 15 мкл 0.5%-ного водного раствора Tween 85 и 10 мкл метанола солюбилизировали в течение 60 с на вибраторе Vortex 40. К полученной эмульсии добавляли UDP- ^{14}C GlcNAc (1 – 1.5 нмоля, 85000 – 100000 имп/мин), затем 20 мкл (~ 20 мкг белка) соответствующего препарата мембран. Пробы перемешивали 45 мин

при 35 °С, затем разбавляли холодной дистиллированной водой до объема 400 – 500 мкл и выдерживали 12 – 24 ч при 0 – 4 °С. Скоагулировавший белок удаляли центрифугированием (8000 об/мин, 10 мин), надосадочный раствор наносили на мини-колонку ДиаПак С18. Непрореагировавший UDP-[¹⁴C]GlcNAc элюировали водой, контролируя полноту элюции по радиоактивности элюата. Продукт реакции – пренилдифосфосахар – элюировали метанолом (5×1 мл), метанольные элюаты концентрировали и анализировали ТСХ на пластинах Silica gel/TLC-cards DC-Alufolien-Kieselgel 254 nm (Fluka).

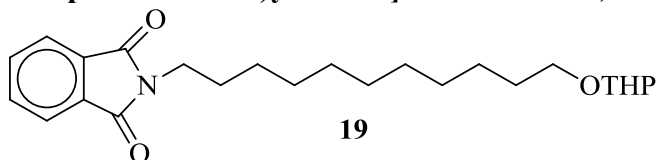
Хроматографическую подвижность в системе CHCl₃–MeOH–H₂O (60 : 25 : 4) поглощающих УФ продуктов определяли при облучении пластинки λ 254 нм, а радиоактивные зоны локализовали после разрезания пластинки длиной 9 см на полоски 0.5×1 см измерением интенсивности излучения фрагментов методом жидкостного сцинтилляционного счета.

2-(11-Гидроксиундецил)изоиндолин-1,3-дион (18)



К перемешиваемому при 20°С раствору 11-бромундеканола **16** (2.12 г, 8.45 ммоль) в абс. DMF (20 мл) добавляли фталимид калия **17** (1.72 г, 9.3 ммоль). Смесь выдерживали 4.5 ч при 80°С, охлаждали до 20°С, осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали до 3 мл, разбавляли CH₂Cl₂ (30 мл), органический слой промывали H₂O (2×15 мл), насыщенным раствором NaCl (2×15 мл), высушивали Na₂SO₄ и растворитель удаляли в вакууме. Выход соединения **18** 1.62 г (5.1 ммоль, 60%), *t*_{пл.} 84–85°С (лит.¹²¹ *t*_{пл.} 85–86°С), *R*_f 0.33 (петролейный эфир–MeO^tBu, 1:1). Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃): 1.20–1.45 (14H, м, CH₂), 1.47–1.78 (4H, м, H2 и H10), 3.59–3.73 (4H, м, H1 и H11), 7.65–7.77 (2H, м, аром. H), 7.78–7.90 (2H, м, аром. H), ср. лит.¹²².

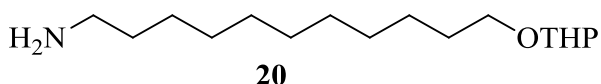
2-[11-(Тетрагидро-2H-пиран-2-илокси)ундецил]изоиндолин-1,3-дион (19).



К перемешиваемому при 20°С раствору PPTS (0.125 г, 0.5 ммоль) в CH₂Cl₂ (20 мл) прибавляли спирт **18** (1.55 г, 4.88 ммоль) и дигидропиран (0.62 г, 7.32 ммоль). Через 15 ч реакционную смесь концентрировали до 5 мл, разбавляли MeO^tBu (30 мл), осадок

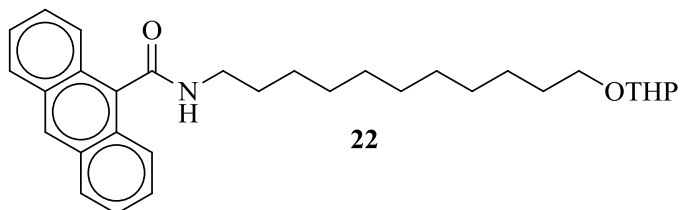
отфильтровывали. Фильтрат промывали H₂O (2×15 мл), насыщенным раствором NaCl (2×15 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Выход соединения **19** 1.92 г (4.78 ммоль, 98%), *R_f* 0.69 (петролейный эфир–MeO^tBu, 1:1). ИК-спектр (NaCl): 668, 720, 816, 868, 904, 988, 1032, 1076, 1120, 1200, 1368, 1396, 1436, 1468, 1540, 1616, 1716, 1772, 2856, 2928. Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃): 1.18–1.88 (22H, м, CH₂), 3.28–3.91 (8H, м, H11 и H1), 4.55 (1 H, т, *J* 3.4, ОСНО), 7.63–7.74 (2 H, м, аром. H), 7.76–7.87 (2H, м, аром. H). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: *m/z* 440.2201, вычислено для C₂₄H₃₅NO₄, [M+K]⁺: 440.2198.

11-(Тетрагидро-2*H*-пиран-2-илокси)ундециламин (**20**).



К перемешиваемому при 53°C в атмосфере аргона раствору соединения **19** (0.89 г, 2.22 ммоль) в EtOH (45 мл) прибавляли N₂H₄·H₂O (1.11 г, 22.2 ммоль). Через 3 ч реакцию смесь профильтровывали, фильтрат концентрировали в вакууме, остаток растворяли в петролейном эфире (30 мл) и оставляли при 0°C на 18 ч. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Фракции, содержащие целевой продукт, концентрировали в вакууме. Выход амина **22** 0.54 г (2 ммоль, 90%). ИК-спектр (NaCl): 668, 724, 816, 868, 904, 988, 1032, 1076, 1120, 1184, 1320, 1352, 1440, 1464, 1648, 1684, 2852, 5924. Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃): 1.12–1.82 (22H, м, CH₂), 2.59 (2H, т, *J_{NH,1}* 6.8, H₂N), 3.23–3.87 (4H, м, H11 и H1), 4.55 (1 H, т, *J* 3.3, ОСНО). Масс-спектр найдено: *m/z* 272.2595, вычислено для C₁₆H₃₃NO₂, [M+H]⁺ 272.2584.

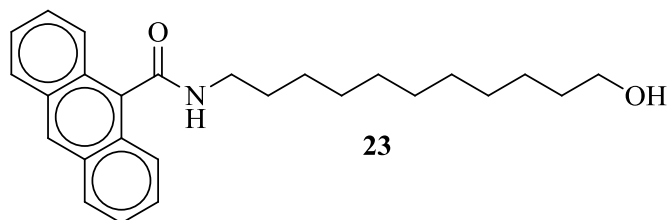
N-[11-(Тетрагидро-2*H*-пиран-2-илокси)ундецил]антрацен-9-карбоксамид (**22**).



К перемешиваемому при 20°C в атмосфере аргона раствору амина **20** (0.27 г, 1 ммоль) в абс. CH₂Cl₂ (20 мл) добавляли 9-антраценкарбоновую кислоту **21** (0.36 г, 1.6 ммоль) и DCC (0.31 г, 1.5 ммоль). Через 15 ч реакцию массу упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Фракции, содержащие целевой продукт, концентрировали в вакууме. Выход амида **22** 0.235 г (0.5 ммоль, 50%), т. пл. 80–83°C, *R_f* 0.47 (петролейный эфир–MeO^tBu, 1:1). ИК-спектр (KBr): 430, 453, 559, 602, 646, 733, 792,

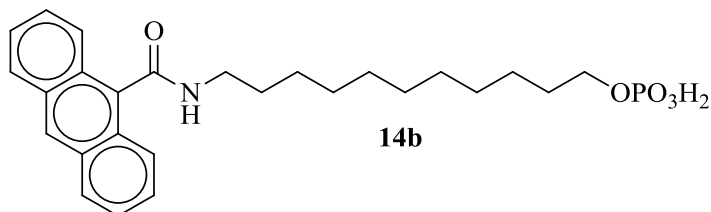
815, 847, 870, 903, 967, 1023, 1077, 1137, 1155, 1166, 1184, 1201, 1265, 1293, 1355, 1441, 1466, 1553, 1629, 2343, 2361, 2852, 2928, 3055, 3084, 3262. Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3): 1.25–1.91 (22 H, м, CH_2), 3.31–3.95 (8H, м, H1 и H11), 6.08 (1H, т, $J_{\text{NH},1}$ 5.3, OCNH), 4.58 (1 H, т, J 3.4, OCHO), 7.43–7.62 (4 H, м, аром. H), 7.97–8.14 (4H, м, аром. H), 8.49 (1 H, с, аром. H). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 498.2975, вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{O}_3\text{N}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 498.2979.

11-[(9-Антраценилкарбонил)амино]ундекан-1-ол (**23**).



К перемешиваемой при 20°C суспензии амида **22** (0.47 г, 1 ммоль) в MeOH (30 мл) добавляли $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.05 г, 0.26 ммоль). Через 3 ч растворитель удаляли, остаток экстрагировали бензолом (150 мл), экстракт промывали насыщенным раствором NaHCO_3 (2×30 мл), H_2O (2×30 мл), насыщенным раствором NaCl (2×30 мл), сушили Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток кристаллизовали из этилового спирта. Выход соединения **23** 0.21 г (0.53 ммоль, 53%), $t_{\text{пл}} = 142\text{--}145^\circ\text{C}$, R_f 0.67 (MeO^tBu). ИК-спектр (KBr): 430, 470, 557, 601, 646, 730, 788, 840, 878, 972, 1032, 1052, 1073, 1135, 1161, 1255, 1265, 1295, 1428, 1464, 1544, 1631, 1719, 1788, 2847, 2924, 2936, 3028, 3049, 3258, 3433. Спектр ^1H ЯМР (CDCl_3): 1.30–1.60 (16H, м, CH_2), 1.75 (2 H, м, H2), 3.64 (2 H, т, $J_{1,2}$ 7.8, H1), 3.71 (2H, м, H11), 6.03 (1 H, уш. т, $J_{\text{NH},1}$ 5.3, OCNH), 7.48–7.54 (4 H, м, аром. H), 8.01–8.10 (4 H, м, аром. H), 8.49 (1 H, с, аром. H). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 392.2587, вычислено для $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{NO}_2$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 392.2584.

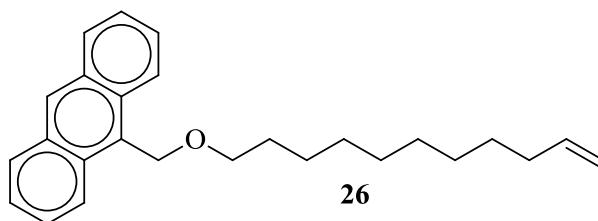
11-[(9-Антраценилкарбонил)амино]ундецилфосфат (**14b**).



К перемешиваемому при 50°C в атмосфере аргона раствору спирта **23** (0.07 г, 0.178 ммоль) в 1,2-дихлорэтано (7 мл) добавляли дигидрофосфат тетрабутиламмония (0.24 г, 0.7 ммол) и CCl_3CN (0.116 г, 0.8 ммоль). Через 3 ч реакцию смесь концентрировали в вакууме, остаток растворяли в верхней фазе равновесной смеси BuOH– H_2O (4 мл),

промывали нижней фазой (4×1.5 мл), органическую фазу упаривали в вакууме, остаток растворяли в MeOH (3 мл), прибавляли 5 M водный раствор NaOH (0.08 мл) и выдерживали в течение 12 ч при –18°C. Осадок отфильтровывали и высушивали. Выход динатриевой соли фосфата **14a** 41 мг, $t_{пл}$ 215–217°C, R_f 0.35 (CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 60:25:4). ИК-спектр (KBr): 555, 733, 913, 1135, 1234, 1444, 1466, 1525, 1637, 2853, 2926, 3056, 3306, 3406. УФ-спектр (MeOH), λ_{max} (ϵ): 250 (65500), 360 (4625). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 516.1885, вычислено для C₂₆H₃₂NNa₂O₅P, [M+H]⁺ 516.1886. Полученные кристаллы суспендировали в H₂O (7 мл), подкисляли суспензию конц. HCl до pH ~ 0 и экстрагировали EtOAc (30 мл). Экстракт промывали H₂O (2×7 мл), насыщенным раствором NaCl (2×7 мл), сушили Na₂SO₄ и растворитель удаляли в вакууме. Выход дигидрофосфата **14b** 34 мг (0.073 ммоль, 41%), R_f 0.33 (CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 60:25:4). Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃–CD₃OD, 2:1): 1.27 (14H, м, CH₂), 1.38–1.60 (4H, м, H2 и H10), 3.43 (2 H, м, $J_{1,2}$ 7.1, H1), 3.77 (2 H, м, $J_{11,10}$ 6.63, H11), 7.38–7.24 (4 H, м, аром. H), 7.90–7.75 (4 H, м, аром. H), 8.29 (1 H, с, аром. H). Спектр ¹³C ЯМР (CDCl₃–CD₃OD, 2:1): 25.18, 26.81, 28.90, 28.98, 29.11, 29.19, 29.26, 29.99, 30.08, 39.93, 66.58, 124.58, 125.21, 126.36, 127.83, 128.21. Спектр ³¹P ЯМР (CDCl₃–CD₃OD, 2:1): 0.9. Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 470.2102, вычислено для C₂₆H₃₄NO₅P, [M–H][–] 470.2102.

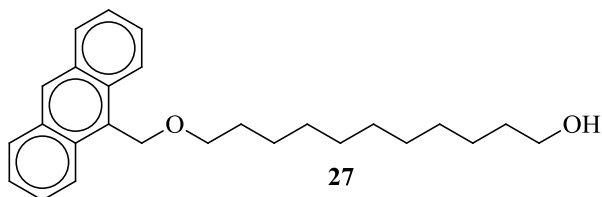
11-(9-Антраценилметокси)ундец-1-ен (**26**)



К перемешиваемому при 20 °C (Ar) раствору 0.8 г (4.7 ммоль) ундец-10-енола **24** в 11 мл DMF прибавили 0.13 г (5.44 ммоль) NaNH и 0.035 г (0.1 ммоль) Bu₄NI. Смесь выдержали 2 ч, после чего добавили 0.1 г (4.7 ммоль) 9-хлорметилантрацена **25**. Реакционную массу выдержали 15 ч, затем разбавили 50 мл MeO^tBu, промыли H₂O, насыщенным раствором NaCl, сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на Si₂O. Градиентное элюирование смесью петролейный эфир - MeOBu^t (от 9:1 до 1:1) дало 1.4 г (83%) эфира **26** в виде бесцветного масла. ИК-спектр, ν/cm^{-1} (NaCl): 636, 732, 784, 840, 868, 884, 996, 1020, 1036, 1096, 1160, 1180, 1228, 1260, 1340, 1444, 1464, 1524, 1624, 1640. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃): 1.20-1.54 (м, 12H, CH₂); 1.58-1.79 (м, 2H, H₂C(10)); 1.99-2.18 (м, 2H, H₂C(3)); 3.71 (т, 2H, H₂C(11), $J = 6.52$); 4.94-5.16 (м, 2H, H₂C(1)), 5.50 (с, 2H, OCH₂C), 5.89 (м, 1H, HC(2), $J_1 = 1.34$, $J_2 = 6.69$, $J_3 = 6.58$, $J_4 =$

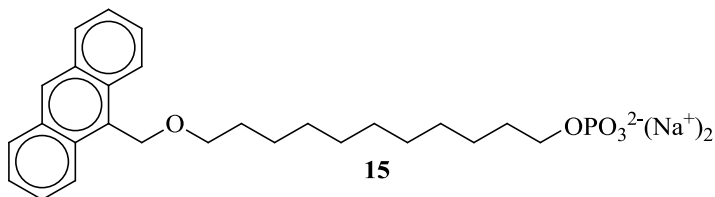
10.08, $J_5 = 16.88$), 7.46-7.65 (м, 4Н, аром Н), 8.00-8.10 (м, 2Н, аром Н), 8.39-8.52 (м, 3Н, аром Н). Найдено (%): С, 86.89; Н, 9.19. $C_{26}H_{32}O$. Вычислено (%): С, 86.62; Н, 8.95.

11-(9-Антраценилметокси)ундекан-1-ол (27).



К перемешиваемой при 20 °С (Ar) суспензии 0.23 г (6.14 ммоль) $NaBH_4$ в 9 мл тетрагидрофурана добавили по каплям раствор 1.2 г (8.2 ммоль) $BF_3 \cdot OEt_2$ в 7 мл ТГФ. Смесь выдержали 10 мин, после чего к ней добавили 3.0 г (8.2 ммоль) олефина **26**. Реакционную массу выдержали 1 ч, затем при 0 °С к ней добавили последовательно по каплям 4 мл 3 М NaOAc и 1,5 мл 30%-ого H_2O_2 и выдержали 15 ч. Смесь упарили на 3/4 объема, разбавили 50 мл $MeOBu^t$, органический слой промыли H_2O , насыщенным раствором NaCl, сушили Na_2SO_4 и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на Si_2O . Градиентное элюирование смесью петролейный эфир - $MeOBu^t$ (от 9:1 до 1:1) дало 1.7 г (55%) спирт **27** в виде бесцветного масла. ИК-спектр, ν/cm^{-1} (раствор, $CHCl_3$): 636, 840, 868, 888, 928, 1000, 1044, 1088, 1160, 1180, 1232, 1340, 1368, 1444, 1464, 1496, 1520, 1540, 1624, 1716, 1844, 1944, 2308, 2352, 2396, 2400, 2856, 2928, 3008, 3056, 3084, 3628, 3778. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$): 1.1-1.46 (м, 14Н, CH_2); 1.47-1.77 (м, 4Н, $H_2C(2)$ и $H_2C(10)$); 3.61 и 3.69 (оба т, 4Н, $H_2C(1)$ и $H_2C(11)$, J 6.57 и J 6.57), 5.47 (с, 2Н, OCH_2O), 7.42-7.62 (м, 4Н, аром Н), 7.97-8.09 (м, 2Н, аром Н), 8.34-8.50 (м, 3Н, аром Н). Найдено (%): С, 82.33; Н, 9.04. $C_{26}H_{34}O_2$. Вычислено (%): С, 82.49; Н, 9.05.

11-[(9'-Антраценил)метокси]ундецилфосфат, динатриевая соль (15).



К раствору $POCl_3$ (0.18 мл, 2 ммоль) в абс. THF (6 мл), перемешиваемому при 20°C в атмосфере аргона, последовательно добавляли Et_3N (0.27 мл, 2 ммоль) и раствор соединения **27** (0.38 г, 1 ммоль) в абс. THF (7 мл). Реакционную смесь выдерживали 1 ч и при интенсивном перемешивании постепенно прибавляли к ней 2.5М водный раствор NaOH (4.8 мл) в THF (20 мл). Через 2 ч реакционную смесь концентрировали в вакууме, прибавляли Pr^tOH (10 мл), перемешивали 10 мин, растворители удаляли в вакууме.

Остаток экстрагировали MeOH (2×5 мл), метанольные экстракты объединяли и осаждали целевое соединение петролейным эфиром. Выход фосфата **15** 375 мг (0.75 ммоль, 75%), R_f 0.43 (CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 60:25:4), 0.70 (CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 10:10:3), $t_{пл} = 300^\circ\text{C}$ (разл.). ИК-спектр (KBr): 414, 438, 475, 520, 545, 589, 637, 655, 705, 731, 787, 839, 867, 884, 1004, 1104, 1138, 1229, 1284, 1341, 1367, 1420, 1445, 1466, 1515, 1542, 1604, 1624, 1644, 1670, 1734, 1763, 1811, 1937, 2342, 2852, 2924, 3053, 3084, 3423, 3629, 3670. Спектр ¹H ЯМР (CD₃OD–D₂O, 1:1): 1.10–1.95 (16H, м, CH₂), 2.13 (2H, м, H₂), 3.60 (2H, т, $J_{11,10}$ 6.6, H₁₁), 4.23–4.30 (2H, м, H₁), 5.50 (2H, C9'-CH₂O), 7.51–7.75 (4H, м, аром. H), 7.97–8.13 (2H, м, аром. H), 8.36–8.59 (3H, м, аром. H). Спектр ³¹P ЯМР (CD₃OD): 5.25. Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 457.2148, вычислено для C₂₆H₃₄O₅P, [M–H][–]: 457.2149. УФ-спектр (MeOH–H₂O, 1:1), $\lambda_{max}(\epsilon)$: 250 (45860), 365 (5260).

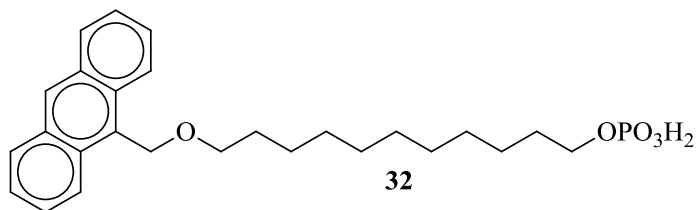
Акцепторные свойства 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфата (**15**).

Инкубационная смесь для определения акцепторных свойств соединения **15** (конечный объем 70 мкл) содержала 36 нмоль синтетического акцептора **15** в 2 мкл метанола, 20 мкл 50 мМ Трис-НCl, pH 8.0, 4 мкл 0.2 М MgCl₂, 2 нмоль UDP-[¹⁴C]Gal, 20 мкл препарата мембран из клеток *S. newport* (200 мкг белка). Инкубацию проводили в течение 25 мин при 32°C, затем, для увеличения суммарного выхода продукта, в смесь вносили нерадиоактивную UDP-Gal (100 нмоль, 20 мкл) и инкубировали еще 20 мин при 25°C. Ферментативную реакцию останавливали охлаждением до 0°C. Реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой (0.70 мл) и выдерживали 12 ч при 4°C для коагуляции белка. Белок осаждали центрифугированием при 10000 об/мин и супернатант наносили на картридж C18 (ДиаПак). Картридж промывали водой (6 мл) и метанолом (5 мл), собирая фракции по 1 мл. Фракции концентрировали в токе инертного газа и анализировали методом ТСХ в системе CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 10:10:3, используя в качестве свидетеля синтетический фосфат **15**. При анализе фракций метанольного элюата при УФ-облучении пластинок (λ_{365}) визуализировалась флуоресцирующая зона, хроматографическая подвижность которой совпадала с таковой для соединения **15** (R_f 0.82). Пластины длиной 9 см разрезали на квадраты 0.5×0.5 см, погружали их в сцинтиллятор и измеряли радиоактивность. Анализ фрагментов пластин показал, что радиоактивная зона совпадала по хроматографической подвижности с флуоресцирующей зоной.

Акцепторные свойства 11-[(9-антраценилкарбонил)амино]ундецилфосфата (14b).

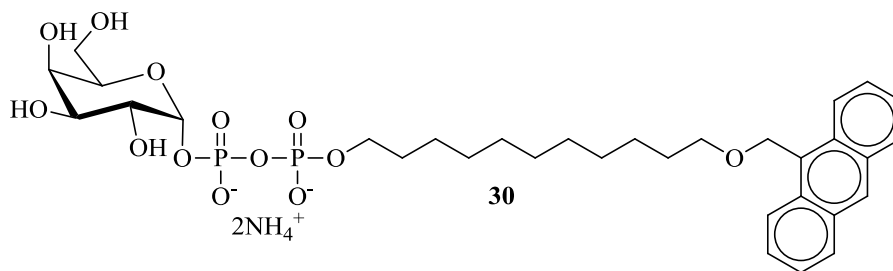
Инкубационная смесь для определения акцепторных свойств соединения **14b** (конечный объем 205 мкл) содержала 60 нмоль синтетического акцептора **14b** в 30 мкл метанола, 60 мкл 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 15 мкл 0.2 М MgCl₂, 30 нмоль UDP[¹⁴C]Gal, 70 мкл препарата мембран из клеток *S. newport* (200 мкг белка). Инкубацию проводили в течение 30 мин при 33°C. После обработки, аналогичной описанному выше (см. стр.), фракции метанольного элюата, в которых была обнаружена радиоактивность, объединяли, концентрировали в токе инертного газа и анализировали методом ТСХ в системе СНCl₃–СН₃ОН–Н₂О, 10:10:3. При облучении УФ-светом (λ_{254} или λ_{360}) визуализировалась флуоресцирующая зона с R_f 0.60. Пластины длиной 9 см разрезали на квадраты 0.5×1 см, погружали их в сцинтиллятор и измеряли радиоактивность. Анализ фрагментов пластин на локализацию радиоактивности показал, что радиоактивная зона совпадает по хроматографической подвижности с флуоресцирующей зоной.

11-[(9'-Антраценил)метокси]ундецилдигидрофосфат (32).



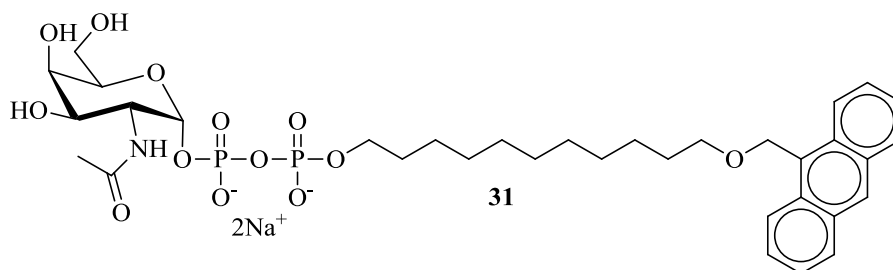
Раствор динатриевой соли фосфата **15** (0.053г, 0.1 ммоль) в воде (5 мл) подкислили 10%-ным водным раствором соляной кислоты до рН ~ 0. Суспензию выдержали 10 мин при перемешивании и экстрагировали EtOAc (3×15 мл). Органический слой промыли насыщенным раствором NaCl (50 мл), сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Было получено 0.028 г (60%) дигидрофосфата **32** в виде желтого масла R_f 0.45 (СНCl₃–СН₃ОН–Н₂О, 60:25:4). ¹Н ЯМР (CD₃OD): 1.16–1.42 (м, 14Н, 7СН₂), 1.55–1.68 (м, 4Н, Н2, Н10), 3.68 (т, J 6.5, 2Н, Н11), 3.91–3.98 (м, 2Н, Н1), 5.46 (с, 2Н, ОСН₂Anthr), 7.47 (т, J 7.4, 2Н, аром. Н), 7.54 (м, J 7.4, J 1.2, 2Н, аром. Н), 8.03 (д, J 8.4, 2Н, аром. Н), 8.39 (д, J 8.4, 2Н, аром. Н), 8.50 (с, 1Н, аром. Н). ¹³С ЯМР (CD₃OD): 26.7, 26.9, 27.2, 30.3, 30.6, 30.7, 65.7, 67.7 (д, $J_{C,P}$ 5.1 Hz), 71.6, 125.4, 126.1, 127.2, 129.4, 130.1. ³¹P ЯМР (CD₃OD): 1.4 (с). Масс-спектр ESI высокого разрешения [M+H]⁺, найдено: 457.2139, вычислено для C₂₆H₃₄O₅P: 457.2144.

***P*¹-{(11-[(9'-Антраценил)метокси]ундецил)}-*P*²-(α -*D*-галактопиранозил)дифосфат (**30**).**



К раствору дигидрофосфата **32** (0.035 г, 76 мкмоль) в толуоле (2 мл) прибавляли триэтиламин (0.1 мл, 1 ммоль), перемешивали, затем смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в абс. бензоле и лиофильно высушивали. К перемешиваемому при 20°C в атмосфере аргона раствору полученной бис-триэтиламмониевой соли 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфата (13 мг, 20 мкмоль) в абс. THF (2 мл) прибавляли *N,N'*-карбонилдиимидазол (13 мг, 80 мкмоль). Через 1.5 ч ТСХ в системе CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 10:10:3 показала полное превращение исходного фосфата (*R_f* 0.70) в 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфоимидазолид **33** (*R_f* 0.76). К реакционной смеси прибавляли MeOH (0.1 мл), оставляли ее при 20°C на 0.5 ч, затем растворители удаляли в вакууме. К остатку, растворенному в абс. THF (1 мл), в атмосфере аргона прибавляли раствор бис-триэтиламмониевой соли α -*D*-галактопиранозилфосфата **34** (17 мг, 37 мкмоль) в абс. DMSO (0.5 мл) и выдерживали смесь 120 ч при 37°C. Реакционную смесь разбавляли MeOH (10 мл) и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Колонку промывали последовательно MeOH (20 мл), 0.1 *M* NH₄OAc в MeOH (40 мл), 0.2 *M* NH₄OAc в MeOH (40 мл) и 0.3 *M* NH₄OAc в MeOH (40 мл). Собирали фракции по 10 мл и анализировали их методом ТСХ. Фракции, содержащие в основном продукт **30**, объединяли и упаривали. Остаток разделяли на две порции, каждую из которых растворяли в H₂O (30 мл) и подвергали очистке на картридже C18 (SepPak), предварительно промытом последовательно метанолом (15 мл) и водой (15 мл). После нанесения раствора продукты элюировали водой (40 мл), 50-%ным водным MeOH (30 мл), 75%-ным водным MeOH (30 мл) и MeOH (30 мл). Фракции, содержащие целевой продукт **30**, объединяли и растворитель удаляли в вакууме. Выход соединения **30** 2 мг (3 мкмоль, 15%), *R_f* 0.59 (CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 10:10:3). Спектр ³¹P ЯМР (CHCl₃–CH₃OH, 1:2): -10.7 (уш. с, P1), -12.7 (уш. с, P2). Масс-спектр ESI высокого разрешения: найдено *m/z* 699.2341, вычислено для C₃₂H₄₆O₁₃P₂ [*M*–H][–]: 699.2351.

***P*¹-{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}-*P*²-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозил)дифосфат (31).**



К раствору дигидрофосфата **32** (0.096 г, 0.21 ммоль) в бензоле (3 мл) добавили диизопропиламин (0.2 мл) и лиофилизовали. Остаток растворили в абс. THF (2 мл) и добавили к нему CDI (0.146 г, 0.9 ммоль). Суспензию перемешивали в атмосфере аргона. Через 1.5 ч ТСХ в системе CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 60:25:4 показала полное превращение исходного фосфата (*R*_f 0.30) в 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфоимидазолид **33** (*R*_f 0.44). К реакционной смеси прибавили метанол (0.2 мл) и перемешивали еще 1 ч. Растворители удалили в вакууме. Остаток растворили в абс. THF (2 мл) и к полученному раствору добавили диизопропиламмонийную соль 3,4,6-три-*O*-ацетил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозилфосфата **35**. Реакционную смесь выдержали 96 ч в атмосфере аргона при 37°C и сконцентрировали в вакууме без нагревания. Часть полученного в результате *P*¹-{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}-*P*²-(3,4,6-три-*O*-ацетил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозил)дифосфата (0.015 г, 0.017 ммоль) была выделена с помощью гель-фильтрации (Sephadex G15). Элюирование проводили 0.1%-ным раствором NH₄HCO₃ в метаноле. *R*_f 0.34 (CHCl₃–CH₃OH–H₂O, 60:25:4). ¹H ЯМР (CD₃OD): 1.17–1.41 (м, 14H, 7CH₂), 1.58–1.67 (м, 4H, H₂C-2, H₂C-10), 1.92, 1.99, 2.02, 2.12 (4с, 12H, 4COCH₃), 3.70 (т, *J* 6.6, 2H, H₂C-11), 3.96–4.03 (м, 2H, H₂C-1), 4.04–4.08 (м, 1H, H-6'), 4.19–4.26 (v, 1H, H-6), 4.53–4.62 (м, 2H, H-2, H-5), 5.24 (уш дд, *J* 9.6, 1H, H-3), 5.45 (м, 1H, H-4), 5.49 (с, 2H, OCH₂Anthr), 5.64 (уш д, 1H, H-1), 7.48 (т, *J* 7.2, 2H, аром. H), 7.55 (т, *J* 7.2, 2H, аром. H), 8.01 (д, *J* 8.4, 2H, аром. H), 8.40 (д, *J* 8.4, 2H, аром. H), 8.51 (с, 1H, аром. H). ¹³C NMR (CD₃OD): 19.4, 20.7, 22.9, 23.2, 26.9, 27.2, 30.4, 30.6, 30.7, 30.8, 62.2, 65.7, 68.6, 70.4, 71.6, 115.3, 125.4, 126.1, 127.2, 129.3, 130.1. ³¹P NMR (CD₃OD): -10.3 (д, *J*_{P₂,P₁} 19.3, P-2), -13.2 (д, *J*_{P₁,P₂} = 19.3, P-1). Масс-спектр ESI высокого разрешения: найдено *m/z* 888.2699, вычислено для C₄₀H₅₃NNaO₁₆P₂ [M+Na]⁻: 888.2636.

К раствору основной порции *P*¹-{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}-*P*²-(3,4,6-три-*O*-ацетил-2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозил)дифосфата в MeOH (5 мл) добавили 2 *M* раствор метилата натрия в метаноле (0.05 мл). Реакционную смесь

перемешивали 2 ч при комнатной температуре, затем добавили к ней концентрированную уксусную кислоту (0.14 мл) и перемешивали еще 20 мин. Растворитель удалили в вакууме без нагревания. Остаток растворили в воде (20 мл) и хроматографировали на картридже с обращенной фазой C18 (SepPak). Градиентное элюирование (от воды до метанола) дало гликозилдифосфат **31** (0.053 г, 25%). R_f 0.52 (CHCl₃-CH₃OH-H₂O, 10:10:3). ¹H NMR (CD₃OD): 1.19–1.42 (м, 14H, 7CH₂), 1.59–1.65 (м, 4H, H2C-2, H2C-10), 2.03, (с, 3H, COCH₃), 3.71 (т, J 6.6, 2H, H2C-11), 3.72–3.75 (м, 1H, H-6), 3.84–3.78 (м, 2H, H-5, H-6'), 3.91 (м, 1H, H-4), 3.93–3.99 (м, 2H, H2C-1), 4.17 (м, 1H, H-3), 4.45 (уш дд, J 10.2, 1H, H-2), 5.49 (с, 2H, OCH₂Anthr), 5.64 (уш д, 1H, H-1), 7.48 (т, J 7.8, 2H, аром. H), 7.55 (т, J 7.8, 2H, аром. H), 8.05 (д, J 8.4, 2H, аром. H), 8.40 (д, J 8.4, 2H, аром. H), 8.52 (с, 1H, аром. H). ϵ_m (H₂O) = 46400. ³¹P NMR (CD₃OD): -10.8 (уш д, P-2), -12.6 (уш д, P-1). Масс-спектр ESI высокого разрешения: найдено m/z 762.2431, вычислено для C₃₄H₄₇NNaO₁₃P₂ [M+Na]⁻: 762.2426.

Акцепторные свойства P^1 -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- P^2 -(α -D-галактопиранозил)дифосфата (30**).**

Инкубационная смесь (конечный объем 70 мкл) содержала 36 нмоль синтетического акцептора **30**, 2 нмоль GDP-[¹⁴C]Man (180000 имп/мин), 20 мкл 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 4 мкл 0.2 М MgCl₂, 20 мкл препарата мембран из клеток *S. newport* (200 мкг белка). Инкубацию проводили в течение 25 мин при 32°C. Ферментативную реакцию останавливали охлаждением до 0°C. Реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой (0.70 мл). Белок осаждали центрифугированием при 10000 об/мин и супернатант наносили на картридж C18 (ДиаПак). Картридж промывали водой (6 мл) и метанолом (5 мл), собирая фракции по 1 мл. Фракции метанольного элюата концентрировали в токе аргона и анализировали методом ТСХ в системе CHCl₃-CH₃OH-H₂O, 10:10:3. При УФ-облучении пластинок (λ_{365}) визуализировалась флуоресцирующая зона с меньшей хроматографической подвижностью (R_f 0.79), чем у субстрата-акцептора **30** (R_f 0.82), что характерно при образовании дисахаридных производных из моносахаридных. Пластины длиной 9 см разрезали на квадраты 0.5×0.5 см, погружали их в сцинтиллятор и измеряли радиоактивность. Анализ фрагментов пластин на локализацию радиоактивности показал, что радиоактивная зона совпадает по хроматографической подвижности с флуоресцирующей зоной.

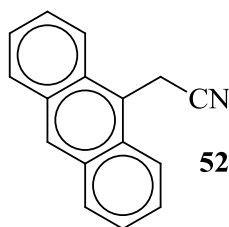
Акцепторные свойства P^1 -{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}- P^2 -(2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галакто-пиранозил)дифосфата (31) (общая методика).

Инкубационная смесь (конечный объем 40 мкл) содержала 1 нмоль синтетического акцептора **31**, 32 нмоль UDP-[^3H]Gal (2266 cpm/нмоль) или нерадиоактивной UDP-Gal, 1 мкл 0.5 M MgCl_2 , 10 мкл 0.5 M буфера MES (pH 7.0) и 10 мкл ферментативного гомогената (содержащего 5 мг белка). Инкубацию проводили в течение 10 мин при 37°C. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0.7 мл ледяной воды. Полученную суспензию наносили на картридж SepPak C18, промывали водой (5 мл). Липофильные продукты ферментативной реакции элюировали метанолом (4 мл), собирая фракции по 1 мл. Из каждой отбирали по 0.5 мл, добавляли во флаконы с сценциляционной жидкостью (5 мл) и измеряли радиоактивность. Остаток метанольных фракций объединяли, концентрировали до ~ 100 мкл и делили с помощью ВЭЖХ C18 (элюент $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$, 35:65; УФ-детектор 247 нм; скорость потока 1мл/мин). При этом собирали фракции по 2 мл. В полученных фракциях измеряли радиоактивность и интенсивность флуоресценции (при 415 нм) (см. рис. 2 на стр. 43). Контрольная реакция для сравнения уровня радиоактивности не содержала акцептор **31**. Контрольная смесь для сравнения уровня интенсивности флуоресценции не содержала нуклеотидсахар.

Ферментативную реакцию дифосфата **31** с образованием продукта **38** под действием глюкозилтрансферазы WbdN проводили аналогично, но в качестве донора моносахарида добавляли 18 нмоль UDP-[^3H]Glc (5550 cpm/нмоль) или нерадиоактивную UDP-Glc.

Строение продуктов **37**, **38** ферментативных реакций с участием нерадиоактивных нуклеотидсахаров было подтверждено масс-спектрами MALDI высокого разрешения (см. рис. 3 на стр. 45).

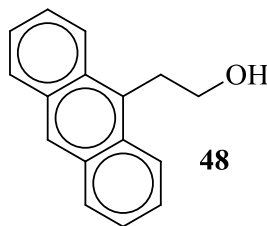
2-(9'-Антраценил)ацетонитрил (52).



К суспензии цианида натрия (7.3 ммоль, 0.36 г) в DMF (20 мл), перемешиваемой при 20°C в атмосфере аргона, добавили 9-хлорметилантрацен **25** (6.6 ммоль, 1.5 г). Реакционную массу перемешивали в течение 12 ч, затем прибавили к ней 3 M раствор NaOH (50 мл) и насыщенный раствор NaCl (20 мл) и перемешивали 10 мин. Полученную

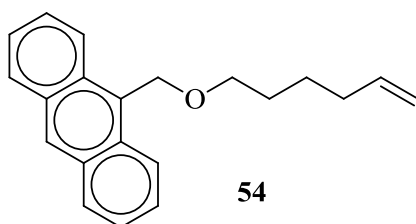
смесь экстрагировали AcOEt (3×100 мл), объединенный органический слой промыли насыщенным раствором NaCl, высушили NaSO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток кристаллизовали из MeOH. Получено 1.1 г (77%) нитрила **52** в виде желтых кристаллов с т.пл. 160—163 °С (ср. лит.¹²² т.пл. 163—164 °С), *R_f* 0.48 (AcOEt : петролейны эфир 1:2). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃): 4.61 (с, 2 H, CH₂); 7.51 – 7.69 (м, 4 H, CH_{аром.}); 8.08 (д, 2 H, CH_{аром.}, *J* 8.4); 8.18 (д, 2 H, CH_{аром.}, *J* 8.4); 8.53 (с, 1 H, CH_{аром.}). (Ср. лит.¹²³).

2-(9'-Антраценилокси)этанол (**48**).



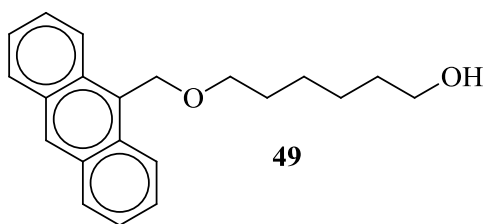
К раствору 2-(9'-антраценил)ацетонитрила **52** (5 ммоль, 1.1 г) в смеси толуола (10 мл) и THF (10 мл), перемешиваемому при –10°C в атмосфере аргона, прибавили за 10 мин 7 мл 1.2 *M* раствора DIBAL (7.5 ммоль) в THF. Реакционной смеси позволили нагреться до 20°C, перемешивали ее 2 ч в атмосфере аргона, прибавили к охлажденному до 0°C 10%-ному водному раствору HCl (60 мл). После перемешивания в течение 1 ч смесь экстрагировали AcOEt (3×50 мл), объединенный органический слой промыли насыщенным раствором NaCl, высушили NaSO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в смеси CH₂Cl₂ (10 мл) и MeOH (20 мл) и охладили до –10°C. К полученному раствору порциями за 10 мин прибавили NaBH₄ (28 ммоль, 1.12 г). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при –10°C (Ar) и 2 ч при 20 °С, затем разбавили 10%-ным водным раствором HCl (60 мл) и экстрагировали AcOEt (3×50 мл). Объединенный органический слой промыли насыщенным раствором NaCl, высушили NaSO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на SiO₂. Элюирование смесью AcOEt – петролейный эфир, 1: 2 дало 0.34 г (31%) спирта **48** в виде желтых кристаллов с т.пл. 105—107 °С (лит.¹²⁴ т.пл. 106—108 °С), *R_f* 0.37 (AcOEt : петролейны эфир 1:2). Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., *J*/Гц): 1.55 (уш. с., 1 H, OH), 4.61 (с, 2 H, CH₂); 3.95 (т, 2 H, H₂C(2), *J*= 6.5); 4.10 (т, 2 H, H₂C(1), *J*= 6.5); 7.44 – 7.58 (м, 4 H, CH_{аром.}); 8.03 (д, 2 H, CH_{аром.}, *J*= 7.5); 8.38 (д, 2 H, CH_{аром.}, *J*= 7.5); 8.39 (CDCl₃). (Ср. лит.¹²³).

6-(9'-Антраценилметокси)гексен-1 (54).



К перемешиваемому при 20°C в атмосфере аргона раствору 5-гексен-1-ола **53** (6.5 ммоль, 0.65 г) в THF (11 мл), прибавили 0.4 г 60 %-ной дисперсии NaH (10 ммоль) в минеральном масле и (0.11 ммоль, 0.04 г) Vu_4Ni , затем через 1 ч – 9-(хлорметил)антрацен **25** (6.5 ммоль, 1.47 г). Через 48 ч осадок отфильтровали, промыв на фильтре 50 мл MeOBu^t , филтрат промыли H_2O , насыщенным раствором NaCl, высушили NaSO_4 и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на SiO_2 . Элюирование смесью MeOBu^t — петролейный эфир (1: 9) дало олефин **54** (1.61 г, 85 %) в виде желтого масла, R_f 0.48 (MeOBu^t : петролейны эфир 1:9). Найдено (%): C, 86.89; H, 7.63. $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}$. Вычислено (%): C, 86.85; H, 7.64. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.41—1.56 (м, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(3)$); 1.63—1.77 (м, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(4)$); 2.00—2.11 (м, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(5)$); 3.70 (т, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(6)$, J 6.7); 4.98 (уш. д, 1 H, $=\text{CH}_{\text{цис}}$, J 9.9); 5.00 (уш. д, 1 H, $=\text{CH}_{\text{транс}}$, J 16.8); 5.49 (с, 2 H, OCH_2); 5.80 (ддт, 1 H, $=\text{HC}$ -, $J_{2,\text{транс}}$ 16.8, $J_{2,\text{цис}}$ 9.9, $J_{2,3}$ 6.7), 7.45—7.61 (м, 4 H, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.04 (д, 2 H, $\text{CH}_{\text{аром.}}$; J 7.7); 8.40 (с, 1 H, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.46 (д, 2 H, $\text{CH}_{\text{аром.}}$; J 7.7). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 25.61; 29.43; 33.57; 65.08; 70.55; 114.53; 124.49; 124.99; 126.14; 128.30; 129.06; 138.83.

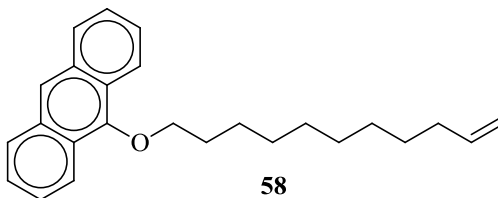
6-(9'-Антраценилметокси)гексан-1-ол (49).



К перемешиваемой при 20°C в атмосфере аргона суспензии NaBH_4 (2.5 ммоль, 0.095 г) в THF (5 мл) добавили раствор $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.75 ммоль, 0.39 г) в THF (4 мл) и через 10 мин олефин **54** (2.75 ммоль, 0.8 г). После перемешивания в течение 1 ч к охлажденной до 0°C реакционной смеси последовательно прибавили 3 M водный раствор NaOAc (1.75 мл) и по каплям 30%-ный водный раствор H_2O_2 (0.6 мл). Смесью выдержали 15 ч при 20°C, затем разбавили AcOEt (15 мл), промыли H_2O , насыщенным раствором NaCl (2×10 мл).

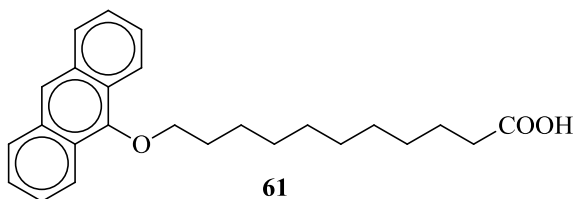
Органический слой сушили Na_2SO_4 и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на SiO_2 . Элюирование смесью AcOEt – петролейный эфир (2: 1) дало спирт **49** (0.62 г, 73 %) в виде желтого масла, R_f 0.63 (AcOEt : петролейный эфир 2:1). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 331.1669, вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_2$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 331.1667. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.29–1.54 (м, 6 Н, CH_2); 1.56–1.73 (м, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(5)$); 3.55 (т, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(1)$, J 6.4); 3.68 (т, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(6)$, J 6.4); 5.48 (с, 2 Н, OCH_2); 7.45–7.60 (м, 4 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.02 (д, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$; J 7.7); 8.39 (с, 1 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.45 (д, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$; J 7.7). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 25.51; 26.05; 29.85; 32.68; 62.84; 65.02; 124.47; 124.97; 126.11; 128.28; 129.04.

11-(9'-Антраценилокси)ундец-1-ен (**58**).



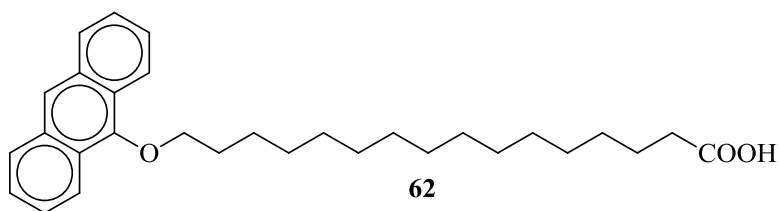
К раствору 10-ундец-1-ола **55** (8.7 ммоль, 1.48 г) в бензоле (35 мл), перемешиваемому при 20 °С в атмосфере аргона, добавили последовательно 9-(метокси)антрацен **57** (10.5 ммоль, 2.18 г) и TsOMe (0.8 ммоль, 0.14 г). Реакционную смесь перемешивали при 80 °С в течение 72 ч, затем фильтровали. Фильтрат сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на SiO_2 . Элюирование смесью AcOEt – петролейный эфир (1:6) дало олефин **58** (1.7 г, 56 %) в виде желтого порошка с т.пл. 27–29 °С, R_f 0.83 (AcOEt : петролейный эфир 1:4). Найдено (%): С, 86.55; Н, 8.51. $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}$. Вычислено (%): С, 86.66; Н, 8.73. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.31–1.52 (м, 10 Н, CH_2); 1.63–1.77 (м, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(9)$); 2.02–2.16 (м, 4 Н, $\text{H}_2\text{C}(3)$ и $\text{H}_2\text{C}(10)$); 4.23 (т, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(11)$); 4.99 (уш. д, 1 Н, $=\text{CH}_{\text{цис}}$, J 9.7); 5.06 (уш. д, 1 Н, $=\text{CH}_{\text{транс}}$, J 16.8); 5.88 (ддт, 1 Н, $=\text{HC}-$, $J_{2,\text{транс}}$ 16.8, $J_{2,\text{цис}}$ 9.7, $J_{2,3}$ 6.7); 7.45–7.55 (м, 4 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 7.98–8.05 (м, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.24 (с, 1 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.32–8.37 (м, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 26.33; 29.04; 29.23; 29.56; 29.68; 30.79; 33.90; 76.27; 114.23; 122.00; 122.58; 124.87; 125.07; 125.50; 128.50; 139.30.

11-(9'-Антраценилокси)ундекановая кислота (**61**).



К суспензии антрона **59** (5 ммоль, 1 г) в толуоле (5 мл), перемешиваемой при 20 °С в атмосфере аргона, последовательно прибавили 11-бромундекановую кислоту **56** (6.5 ммоль, 1.7 г), Cu_4NBr (0.3 ммоль, 0.1 г) и 48 %-ный водный раствор KOH (1.8 мл). Реакционную смесь кипятили 5 ч, затем охладили до комнатной температуры, разбавили H_2O (15 мл), подкислили 30 %-ной HCl до $\text{pH} \sim 1$ и экстрагировали экстрагировали AcOEt (3×50 мл). Объединенный органический слой промыли H_2O (2×20 мл), насыщенным раствором NaCl (2×20 мл), сушили Na_2SO_4 и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на SiO_2 . Градиентное элюирование смесью AcOEt – петролейный эфир (от 1:6 до 1: 2) дало кислоту **61** (0.72 г, 38 %) в виде желтой аморфной массы, R_f 0.51 (Silica Gel 60, «Merck», AcOEt : петролейны эфир 1:1). Найдено (%): С, 79.27; Н, 8.03. $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_3$. Вычислено (%):С, 79.33; Н, 7.99. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.28–1.49 (м, 10 Н, CH_2); 1.60–1.73 (м, 4 Н, $\text{H}_2\text{C}(2)$ и $\text{H}_2\text{C}(9)$); 2.00–2.14 (м, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(10)$); 2.38 (т, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(1)$, J 7.5); 4.21 (т, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(11)$, J 6.7); 7.42–7.52 (м, 4 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 7.96–8.03 (м, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.22 (с, 1 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.26–8.36 (м, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 24.79; 26.33; 29.15; 29.32; 29.49; 29.65; 30.78; 33.95; 122.01; 122.58; 125.09; 125.52; 128.50; 132.56; 151.63; 179.01.

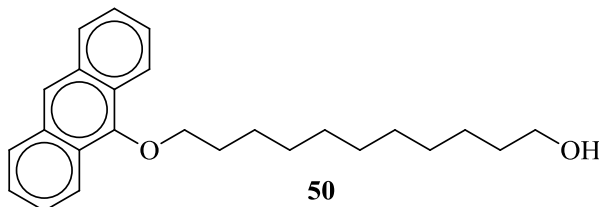
16-(9'-Антраценилокси)гексадекановая кислота (**62**).



Аналогично из антрона **59** (3 ммоль, 0.58 г) и 16-бромгексадекановой кислоты **60** (3 ммоль, 1 г) получено соединения **62** (0.83 г, 61 %) в виде желтой аморфной массы, R_f 0.48 (Silica Gel 60, «Merck», AcOEt : петролейный эфир 1:1). Найдено (%): С, 80.43; Н, 8.69. $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_3$. Вычислено (%):С, 80.31; Н, 8.99. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.24–1.49 (м, 22 Н, CH_2); 1.58–1.75 (м, 4 Н, $\text{H}_2\text{C}(2)$ и $\text{H}_2\text{C}(14)$); 2.00–2.14 (м, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(15)$); 2.36 (т, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(1)$,

J 7.5); 4.21 (т, 2 Н, H₂C(16), *J* 6.5); 7.43–7.52 (м, 4 Н, CH_{аром.}); 7.96–8.03 (м, 2 Н, CH_{аром.}); 8.22 (с, 1 Н, CH_{аром.}); 8.28–8.33 (м, 2 Н, CH_{аром.}). Спектр ЯМР ¹³С (CDCl₃): 24.79; 26.35; 29.16; 29.33; 29.53; 29.77; 30.79; 33.96; 62.30; 76.31; 122.59; 125.09; 125.52; 127.34; 128.50; 132.56; 151.65; 179.13.

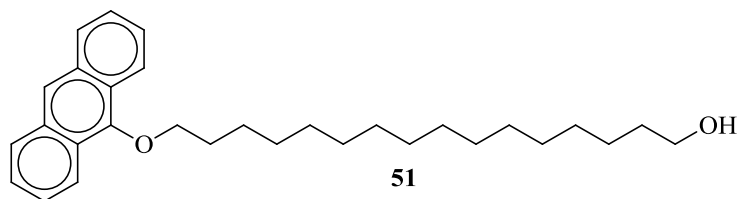
11-(9'-Антраценилокси)ундекан-1-ол (50).



А. Аналогично описанному выше для спирта **49** из олефина **58** (12 ммоль, 2.5 г) получен спирт **50** (1.36 г, 31 %), *R_f* 0.27 (Silica Gel 60, «Merck», AcOEt : петролейный эфир 1:4). Найдено (%): С, 82.32; Н, 8.82. C₂₅H₃₂O₂. Вычислено (%): С, 82.49; Н, 9.05. Спектр ЯМР ¹Н (CDCl₃): 1.29–1.50 (м, 12 Н, CH₂); 1.54–1.76 (м, 4 Н, H₂C(2) и H₂C(9)); 2.01–2.15 (м, 2 Н, H₂C(10)); 3.66 (т, 2 Н, H₂C(1), *J* 6.5); 4.22 (т, 2 Н, H₂C(11), *J* 6.7); 7.42–7.55 (м, 4 Н, CH_{аром.}); 7.96–8.06 (м, 2 Н, CH_{аром.}); 8.23 (с, 1 Н, CH_{аром.}); 8.30–8.35 (м, 2 Н, CH_{аром.}). Спектр ЯМР ¹³С (CDCl₃): 25.73; 26.16; 29.40; 29.52; 29.56; 30.61; 32.68; 62.72; 76.09; 121.89; 122.37; 124.95; 125.33; 128.36; 132.40; 151.43.

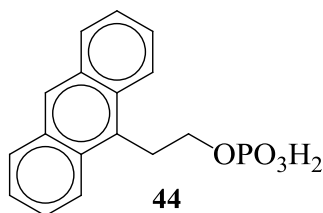
В. К суспензии NaBH₄ (3.5 ммоль, 0.133 г) в THF (2 мл), перемешиваемой при 20 °С в атмосфере аргона, за 10 мин прибавили раствор BF₃·Et₂O (3.5 ммоль, 0.5 г) в THF (2 мл), затем через 15 мин – по каплям раствор кислоты **61** (2 ммоль, 0.76 г) в THF (2 мл) за 10 мин. Реакционную массу перемешивали 4 ч, затем разложили H₂O (10 мл) и через 10 мин экстрагировали MeOBu^t (30 мл). Органический слой отделили, промыли H₂O, насыщенным раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl (2×20 мл), сушили Na₂SO₄ и сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на SiO₂. Градиентное элюирование смесью AcOEt – петролейный эфир (от 1:3 до 1: 1) дало спирт **50** (0.6 г, 82.3 %), практически идентичного *R_f*, ЯМР описанному выше образцу.

16-(9'-Антраценилокси)гексадекан-1-ол (51).



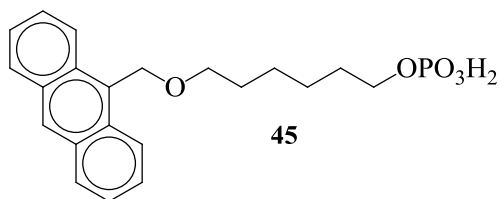
Аналогично из кислоты **62** (0.67 ммоль, 0.3 г) получен спирт **51** (0.25 г, 86 %), в виде желтого порошка с т.пл. 50–52 °С, R_f 0.46 (AcOEt : петролейны эфир 1:4). Найдено (%): С, 82.45; Н, 9.94. $C_{30}H_{42}O_2$. Вычислено (%): С, 82.90; Н, 9.74. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$): 1.25–1.41 (м, 22 Н, CH_2); 1.54–1.71 (м, 4 Н, $H_2C(2)$ и $H_2C(14)$); 2.00–2.14 (м, 2 Н, $H_2C(15)$); 3.65 (т, 2 Н, $H_2C(1)$, J 6.5); 4.21 (т, 2 Н, $H_2C(16)$, J 6.5); 7.43–7.52 (м, 4 Н, $CH_{аром.}$); 7.98–8.03 (м, 2 Н, $CH_{аром.}$); 8.23 (с, 1 Н, $CH_{аром.}$); 8.28–8.33 (м, 2 Н, $CH_{аром.}$). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 25.83; 26.34; 29.53; 29.70; 29.76; 30.80; 32.91; 62.30; 76.30; 122.59; 125.08; 125.52; 127.34; 128.50; 132.57; 151.43.

2-(9'-Антраценил)этилдигидрофосфат (**44**).



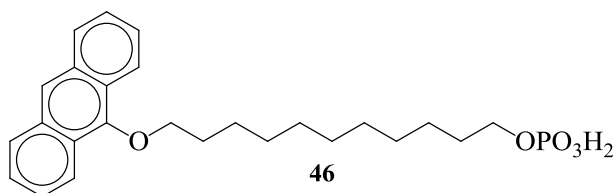
К перемешиваему при -10 °С в атмосфере аргона раствору $POCl_3$ (3 ммоль, 0.46 г) в THF (3 мл), с интервалом в 10 мин добавили раствор Et_3N (3 ммоль, 0.3 г) в THF (4 мл) и раствор спирта **48** (1.5 ммоль, 0.34 г) в THF (6 мл), затем через 1 ч реакционную смесь вылили в интенсивно перемешиваемый 2.5 М водный раствор NaOH (15 мл). Смесь выдерживали 2 ч, сконцентрировали в вакууме и дважды соупаривали с Pf^iOH (2×7 мл). Остаток растворили в H_2O (10 мл), подкислили раствор 10%-ной HCl до pH~0 и экстрагировали AcOEt (3×30 мл). Объединенный органический слой промыли насыщенным раствором NaCl, сушили Na_2SO_4 и сконцентрировали в вакууме. Остаток кристаллизовали из бензола. Получено (0.16 г, 35%) фосфата **44** в виде желтого порошка с т.пл. 182–185 °С, R_f 0.21 (Silica Gel 60, «Merck», $CHCl_3$ –MeOH– H_2O , 60 : 25 : 4). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 303.0778, вычислено для $C_{16}H_{15}O_4P$, $[M+H]^+$: 303.0781. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$): 4.01 (т, 2 Н, $H_2C(2)$, J 8.0); 4.18–4.31 (м, 2 Н, $H_2C(1)$); 7.37–7.53 (м, 4 Н, $CH_{аром.}$); 7.96 (д, 2 Н, $CH_{аром.}$, J 7.9); 8.29–8.35 (м, 3 Н, $CH_{аром.}$). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$): 29.92; 30.01; 67.11, 67.19; 125.06; 125.99; 127.14; 129.76; 130.27. Спектр ЯМР ^{31}P ($CDCl_3$): 1.13 (с).

6-(9'-Антраценилметокси)гексадигидрофосфат (45).



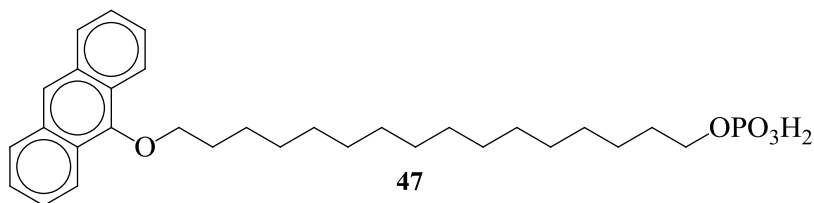
Аналогично из спирта **49** (1.52 ммоль, 0.47 г) получен фосфат **45** (0.35 г, 75 %) в виде желтого масла, R_f 0.25 (Silica Gel 60, «Merck», CHCl_3 -MeOH- H_2O , 60:25:4). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 387.1367, вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{P}$, $[\text{M}-\text{H}]^-$: 387.1367. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.12–1.32 (м, 4 Н, CH_2); 1.44–1.63 (м, 4 Н, $\text{H}_2\text{C}(5)$ и $\text{H}_2\text{C}(4)$); 3.58 (т, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(1)$, J 6.3); 3.78–3.89 (м, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(6)$); 5.35 (с, 2 Н, OCH_2); 7.32–7.48 (м, 4 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 7.90 (д, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$; J 8.3); 8.23 (с, 1 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.25 (д, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$; J 8.3). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 25.01; 25.52; 29.39; 60.44; 64.73; 66.50; 70.44; 124.00; 124.75; 125.98; 128.14; 128.77. Спектр ЯМР ^{31}P (CDCl_3): 1.04 (с).

11-(9'-Антраценилокси)ундецилдигидрофосфат (46).



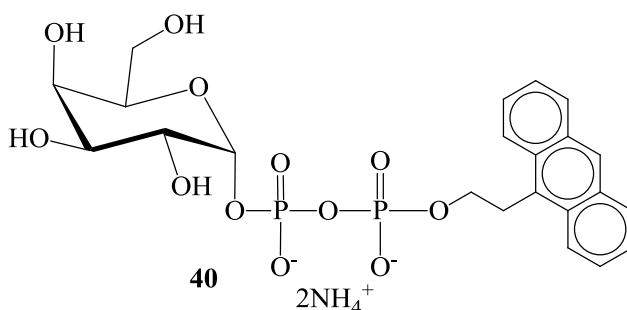
Аналогично из спирта **50** (0.66 ммоль, 0.24 г) получен фосфат **46** (0.22 г, 75%) в виде желтого масла, R_f 0.42 (Silica Gel 60, «Merck», CHCl_3 -MeOH- H_2O , 60:25:4). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 443.1991, вычислено для $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_5\text{P}$, $[\text{M}-\text{H}]^-$: 443.1993. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.16–1.37 (м, 12 Н, CH_2); 1.48–1.64 (м, 4 Н, $\text{H}_2\text{C}(2)$ и $\text{H}_2\text{C}(9)$); 1.88–2.02 (м, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(10)$); 3.83–3.93 (м, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(1)$); 4.09 (т, 2 Н, $\text{H}_2\text{C}(11)$, J 6.7); 7.31–7.41 (м, 4 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 7.85–7.91 (м, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.11 (с, 1 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.11–8.21 (м, 2 Н, $\text{CH}_{\text{аром.}}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 26.25; 28.92; 29.16; 29.23; 29.63; 30.68; 32.46; 62.71; 76.25; 122.44; 125.06; 125.45; 126.63; 127.26; 127.97; 128.54; 139.94. Спектр ЯМР ^{31}P (CDCl_3): 1.62 (с).

16-(9'-Антраценилокси)гексадецилдигидрофосфат (47).



Аналогично из спирта **51** (0.51 ммоль, 0.22 г) получен фосфат **47** (0.24 г, 92 %) в виде желтого аморфного порошка с т.пл. 74–80°C, R_f 0.46 (Silica Gel 60, «Merck», $\text{CHCl}_3\text{--MeOH--H}_2\text{O}$, 60:25:4). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 513.2765, вычислено для $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_5\text{P}$, $[\text{M--H}]^-$: 513.2765. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3): 1.18–1.43 (м, 22 H, CH_2); 1.54–1.71 (м, 4 H, $\text{H}_2\text{C}(2)$ и $\text{H}_2\text{C}(14)$); 1.94–2.08 (м, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(15)$); 3.92–4.05 (м, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(1)$); 4.15 (т, 2 H, $\text{H}_2\text{C}(16)$, J 6.5); 7.38–7.47 (м, 4 H, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 7.93–7.98 (м, 2 H, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.17 (с, 1 H, $\text{CH}_{\text{аром.}}$); 8.23–8.30 (м, 2 H, $\text{CH}_{\text{аром.}}$). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): 26.35; 29.75; 29.86; 29.91; 29.99; 30.79; 76.20; 122.53; 125.03; 125.46; 128.47; 128.50; 132.53; 151.62. Спектр ЯМР ^{31}P (CDCl_3): 2.44 (с).

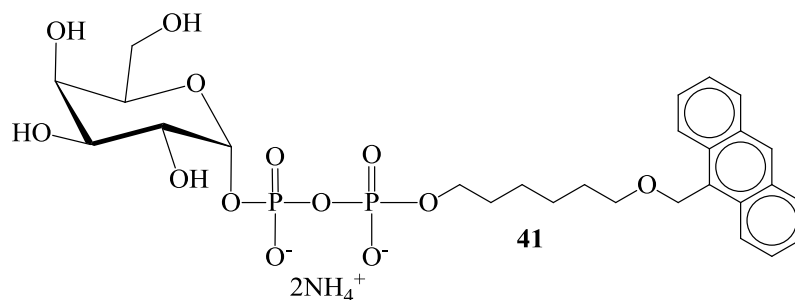
***P*¹-[2-(9''-Антраценил)этил]-*P*²-(α -D-галактопиранозил)дифосфата аммониевая соль (40).**



К суспензии фосфата **44** (0.166 ммоль, 0.05 г) в толуола (2 мл) прибавили при 20 °C триэтиламин (0.1 мл) и, после перемешивания 5 мин, полученный раствор сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в сухом бензоле и лиофилизовали. К раствору полученной в результате бис-триэтиламмониевой соли в THF (2 мл) при 20 °C в атмосфере аргона прибавили (0.664 ммоль, 0.107 г) CDI и перемешивали реакционную смесь 1.5 ч (контроль ТСХ) до полного превращения исходного фосфата **44** (R_f 0.24; Silica Gel 60, «Merck», $\text{CHCl}_3\text{--MeOH--H}_2\text{O}$, 10:10:3) в соответствующий имидазолид **63** (R_f 0.39). Затем к смеси прибавили MeOH (0.2 мл) и после выдерживания 30 мин сконцентрировали в вакууме. К остатку, растворенному в абс. THF (1 мл) в атмосфере аргона, прибавили раствор бис-триэтиламмониевой соли α -D-галактопиранозилфосфата **34** (0.16 ммоль, 0.074 г) в сухом DMSO (0.5 мл), выдержали реакционную смесь 120 ч при 37°C, затем разбавили MeOH (10 мл) и наносили полученный раствор на колонку с DEAE-целлюлозой. Колонку последовательно элюировали MeOH (20 мл), 0.1M NH_4OAc в MeOH (40 мл), 0.2 M NH_4OAc в MeOH (40 мл) и 0.3 M NH_4OAc в MeOH (40 мл), собирая фракции по 10 мл и анализируя их методом ТСХ. Фракции, содержащие продукт **40**, объединили и упарили. Остаток разделили на две порции, каждую из которых растворили в H_2O (40 мл) и

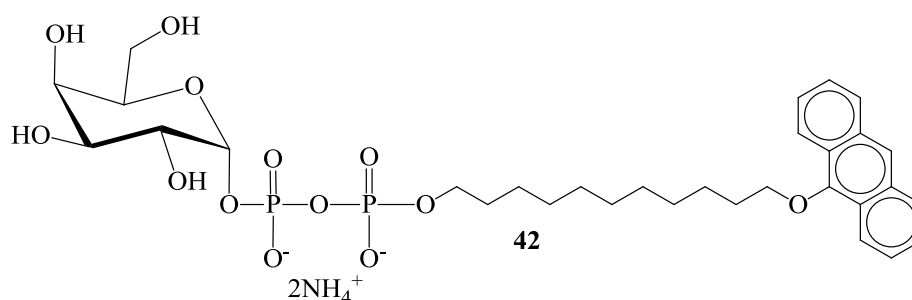
подвергли очистке на картридже C18 (SepPak), предварительно промытом MeOH (15 мл), затем H₂O (15 мл). Последовательным элюированием водой (40 мл), 50%-ным водным MeOH (30 мл), 75%-ным водным MeOH (30 мл) и MeOH (30 мл) выделен галактозилдифосфата **40** (17 мг, 18 %) с *R_f* 0.48 (Silica Gel 60, «Merck», CHCl₃–MeOH–H₂O, 10:10:3). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: *m/z* 543.0820, вычислено для C₂₂H₂₅O₁₂P₂, [M–H][–]: 543.0827. Спектр ЯМР ¹H (CD₃OD): 3.66 (дд, 1 H, HC(4'), *J*_{4,3} 12.0, *J*_{4,5} 4.2); 3.73–3.81 (м, 3 H, HC(6'), HC(2'), H'C(6)); 3.85 (д, 1 H, HC(5'), *J* 2.4); 4.08 (т, 2 H, H₂C(2), *J* 8.0); 4.16 (т, 1 H, HC(3') *J* 6.0); 4.30–4.34 (м, 2 H, H₂C(1)); 5.72 (уш. т, 1 H, HC(1')); 7.45 (т, 2 H, CH_{аром.}, *J* 7.2); 7.55 (т, 2 H, CH_{аром.}, *J* 7.2); 8.00 (д, 1 H, CH_{аром.}, *J* 7.2); 8.38 (с, 1 H, CH_{аром.}); 8.47 (д, 1 H, CH_{аром.}, *J* 7.2). Спектр ЯМР ³¹P (CD₃OD): –10.21 (с); –12.03 (с).

***P*¹-[6-(9''-Антраценилметокси)гексил]-*P*²-[α-D-галактопиранозил]дифосфата аммониевая соль (**41**).**



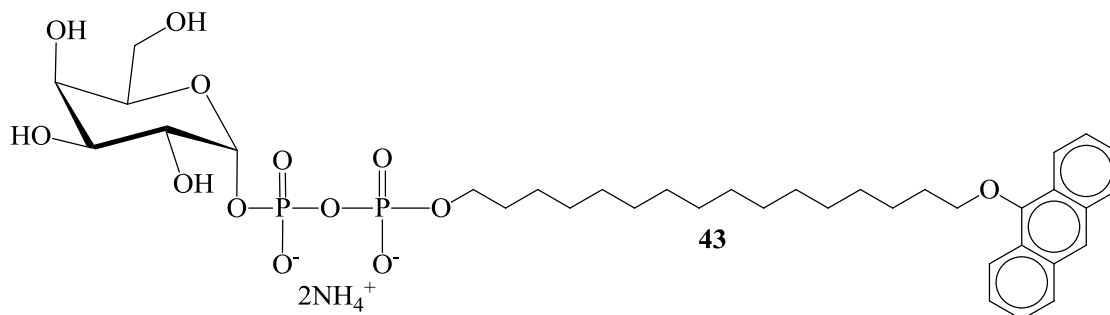
Аналогично из фосфата **45** (0.116 ммоль, 0.045 г) и бис-триэтиламмониевой соли α-D-галактопиранозилфосфата (0.108 ммоль, 0.05 мг) получен галактозилдифосфат **41** (8 мг 15 %) в виде светло-желтого аморфного порошка, *R_f* 0.40 (Silica Gel 60, «Merck», CHCl₃–MeOH–H₂O, 10:10:3). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: *m/z* 629.1558, вычислено для C₂₇H₃₅O₁₃P₂, [M–H][–]: 629.1558. Спектр ЯМР ¹H CD₃OD): 1.25–1.36 (м, 2 H, H₂C(3)); 1.38–1.39 (м, 2 H, H₂C(4)); 1.57–1.69 (м, 4 H, H₂C(2) и H₂C(5)); 3.68 (дд, 1 H, HC(4'), *J*_{4,3} 12.0, *J*_{4,5} 4.2); 3.71–3.77 (м, 3 H, HC(6'), H'C(6'), H₂C(1)); 3.83 (дд, 1 H, HC(2'), *J*_{2,3} 10.2, *J*_{2,1} 3.0); 3.91 (уш. д, 1 H, HC(5'), *J* 2.4); 3.94–3.96 (м, 2 H, H₂C(1)); 4.17 (м, 1 H, HC(3')); 5.49 (с, 2 H, C(9'')–CH₂O); 5.69 (уш. т, 1 H, HC(1')); 7.48 (т, 2 H, CH_{аром.}, *J* 7.4); 7.56 (д, 2 H, CH_{аром.}, *J* 7.4); 8.05 (д, 1 H, CH_{аром.}, *J* 7.2); 8.41 (д, 1 H, CH_{аром.}, *J* 7.2); 8.51 (с, 1 H, CH_{аром.}). ЯМР ³¹P (CD₃OD): –9.96 (уш. д); –11.90 (уш. д).

***P*¹-[11-(9"-Антраценилокси)ундецил]-*P*²-(α -D-галактопиранозил)дифосфата аммониевая соль (42).**



Аналогично из фосфата **46** (0.112 ммоль, 0.050 г) и (0.13 ммоль, 0.063 г) бис-триэтиламмониевой соли α -D-галактопиранозилфосфата получен галактозилпирофосфат **42** (16 мг, 20 %) в виде светло-желтого аморфного порошка, R_f 0.61 (Silica Gel 60, «Merck», CHCl_3 -MeOH-H₂O, 10:10:3). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 707.2006, вычислено для $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{O}_{13}\text{P}_2\text{Na}$, $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$: 707.2004. Спектр ЯМР ¹H (CD₃OD): 1.35–1.43 (м, 10 H, CH₂); 1.47–1.50 (м, 2 H, H₂C(9)); 1.65–1.71 (м, 4 H, H₂C(3) и H₂C(10)); 2.03–2.06 (м, 2 H, H₂C(2)); 3.67 (дд, 1 H, HC(4'), $J_{4,3}$ 12.0, $J_{4,5}$ 4.2); 3.74–3.78 (м, 3 H, HC(6'), HC(2'), H'C(6'')); 3.82–3.84 (м, 1 H, HC(3'')); 3.91 (уш. д, 1 H, HC(5'), J 2.4); 3.96–4.00 (м, 2 H, H₂C(1)); 4.18 (т, 2 H, H₂C(11), J 8.0); 5.67 (уш. т, 1 H, HC(1')); 7.45–7.50 (м, 4 H, CH_{аром.}); 8.02 (д, 1 H, CH_{аром.}, J 7.2); 8.25–8.27 (м, 3 H, CH_{аром.}). ЯМР ³¹P (CD₃OD): –10.09 (уш. д); –11.96 (уш. д).

***P*¹-[16-(9"-Антраценилокси)гексадецил]-*P*²-(α -D-галактопиранозил)дифосфата аммониевая соль (43).**



Аналогично из фосфата **47** (0.144 ммоль, 0.074 г) и бис-триэтиламмониевой соли α -D-галактопиранозилфосфата (0.142 ммоль, 0.066 г) получен галактозилпирофосфат **43** (9 мг, 8 %) в виде светло-желтого аморфного порошка, R_f 0.22 (Silica Gel 60, «Merck», CHCl_3 -MeOH-H₂O, 60:25:4). Масс-спектр ESI высокого разрешения найдено: m/z 755.2978, вычислено для $\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_{13}\text{P}_2$, $[\text{M}-\text{H}]^-$: 755.2967. Спектр ЯМР ¹H (CD₃OD): 1.28–1.43 (м, 20 H, CH₂); 1.46–1.50 (м, 2 H, H₂C(14)); 1.63–1.70 (м, 4 H, H₂C(3) и H₂C(15));

2.02–2.06 (м, 2 Н, H₂C(2)); 3.68 (д.д, 1 Н, HC(4'), J_{4,3} 12.0, J_{4,5} 4.2); 3.75–3.77 (м, 2 Н, HC(6'); Н'С(6')); 3.84 (дд, 1 Н, HC(2'), J_{2,3} 10.2, J_{2,1} 3.0); 3.92 (уш. д, 1 Н, HC(5'), J 2.4); 3.96–4.00 (м, 2 Н, H₂C(1)); 4.17 (уш. т, 1 Н, HC(3')); 4.19 (т, 2 Н, H₂C(16), J 6.6) 5.67 (уш. т, 1 Н, HC(1')); 7.45–7.49 (м, 4 Н, CH_{аром.}); 8.01 (д, 1 Н, CH_{аром.}, J 7.2); 8.25–8.27 (м, 3 Н, CH_{аром.}). ЯМР ³¹P (CD₃OD): –10.25 (уш. д); –12.26 (уш. д).

Изучение субстратной специфичности маннозилтрансферазы клеточных мембран бактерий *S. newport* по отношению к галактозилпирофосфатам 40–43 (общая методика).

Смесь, содержащую 2 нмоль синтетического акцептора **40–43**, 2 нмоль GDP-[¹⁴C]Man, 15 мкл 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 5 мкл 0.2 М раствора MgCl₂, 20 мкл суспензии мембран из клеток *S. newport* (200 мкг белка) и воду (общий объем 70 мкл), инкубировали 30 мин при 35 °С. Затем реакцию останавливали добавлением 0.7 мл охлажденной до 0 °С дистиллированной воды, белок осаждали центрифугированием при 10000 об/мин и супернатант наносили на колонку с обращенной фазой С-18 (картридж SepPak). Картридж элюировали водой (6 мл) и метанолом (5 мл), собирая фракции по 1 мл. Метанольные фракции концентрировали в токе инертного газа и анализировали методом ТСХ на пластинах (10×1 см) Silica Gel 60, «Merck» в системе (CHCl₃–MeOH–H₂O, 10:10:3). При анализе фракций метанольного элюата при УФ-облучении пластинок (λ₃₆₅) визуализировалась флуоресцирующая зона (R_f 0.58). Пластины длиной 9 см разрезали на квадраты 1×1 см, каждый из которых помещали в сцинтиллятор и измеряли радиоактивность. Найдено, что фрагменты пластины с максимальной радиоактивностью совпадали с флуоресцирующей зоной. Для каждого из тестируемых соединений **40–43** аналогичные данные получали в двух независимых экспериментах.

При масштабировании ферментативной реакции с участием галактозилдифосфата **43** (60 нмоль) и нерадиоактивной GDP-Man (60 нмоль), которое проводили согласно общей методике, продукт реакции **71** выделяли методом ВЭЖХ (время удерживания 11 мин; для исходного **43** – 13 мин) и характеризовали масс-спектром ESI высокого разрешения, найдено: m/z 917.3395, вычислено для C₄₂H₆₄O₁₈P₂, [M–H][–]: 917.3495.

Выводы

1. Разработаны оригинальные методы синтеза неизвестных ранее биологически активных аналогов бактериальных ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров, содержащих легко детектируемые фотоактивные группировки. В их числе:

(а) полученный впервые на основе растительных полипренолов аналог бактериального ундекапренилфосфата, содержащий содержащий феноксигруппу на ω -конце олигоизопреновой цепи.

(b) серия новых неизопреноидных аналогов ундекапренилфосфата различной структуры, содержащих флуоресцентные группировки в составе их липофильных фрагментов;

(с) представители новых флуоресцентных аналогов ундекапренилдифосфатсахаров неизопреноидной природы.

2. С использованием ферментативных систем ряда грамотрицательных бактерий показана способность вновь синтезированных соединений участвовать в иницировании (аналоги ундекапренилфосфата) и наращивании (аналоги ундекапренилдифосфатсахаров) повторяющегося звена соответствующих O-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*.

Список сокращений

- CDI – *N,N'*-карбонилдиимидазол;
- DCC – *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид;
- DEAE-целлюлоза – диэтиламиноэтилцеллюлоза;
- DEAD – диэтилазодикарбоксилат;
- DHP – 3,4-дигидро-2*H*-пиран;
- DIBALH – диизобутилалюминийгидрид Bu^i_2AlH ;
- DMAP – 4-диметиламинопиридин;
- DME – 1,2-диметоксиэтан (моноглим);
- DMTP – 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2(1*H*)-пиримидинон;
- dppp – 1,3-бис(дифенилфосфино)пропан;
- EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид;
- FRET (fluorescence resonance energy transfer) – метод резонансного переноса энергии флуоресценции;
- FT – фарнезилтрансфераза (фермент);
- Gal-T – галактозилтрансфераза (фермент);
- GDP-Man – гуанидиндифосфатманноза;
- GFP – green fluorescent protein – зеленый флуоресцирующий белок – выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который флуоресцирует в зелёном диапазоне при освещении его синим светом;
- GGT – геранилгеранилтрансфераза;
- Glc-T – глюкозилтрансфераза (фермент);
- LDA – диизопропиламид лития Pr^i_2NLi ;
- Man-T – маннозилтрансфераза (фермент);
- MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота;
- Ms – метилсульфонил (мезил);
- NBS – *N*-бромсукцинимид;
- NCS – *N*-хлорсукцинимид;
- NMP – *N*-метил-2-пирролидон;
- PPTs – пиридиния *para*-толуолсульфонат;
- TBAF – фторид тетрабутиламмония Bu_4NF ;

ТВАI – иодид тетрабутиламмония Bu_4NI ;

ТНР – 2-тетрагидропиранил;

Тs – *para*-толуолсульфонил (тозил);

UDP-Gal – уридиндифосфатгалактоза;

UDP-Glc – уридиндифосфатглюкоза;

UDP-GlcNAc – уридиндифосфат-*N*-ацетилглюкозамин;

UPPS – ундекапренилдифосфатсинтаза (фермент);

Трис - трис(гидроксиметил)аминометана $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$.

Список литературы

1. Maltese, W. A. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells / W.A. Maltese // *FASEB J.* – 1990. – V. 4. – P. 3319–3328.
2. Rip, J. W. Distribution, metabolism and function of dolichol and polyprenols / J.W. Rip, C.A. Rupa, K. Ravi, K.K. Carroll // *Prog. Lipid. Res.* – 1985. – V. 24. – Issue 4.– 269–309.
3. Whitfield, C. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria / C. Whitfield, M.A. Valvano // *Adv. Microb. Physiol.* – 1993. – V. 35. – P. 135–246.
4. Schenk, B. The ins(ide) and out(side) of dolichyl phosphate biosynthesis and recycling in the endoplasmic reticulum / B. Schenk, F. Fernandez, C.J. Waechter // *Glycobiology* – 2001. – V. 11. – Issue 4. – 61R-70R.
5. Zhu, W. Antibacterial drug leads targeting isoprenoid biosynthesis / W. Zhu, Y. Zhang, W. Sinko, M.E. Hensler, J. Olson, K.J. Molohon, S. Lindert, R. Cao, K. Li, K. Wang, Y. Wang, Y.L. Liu, A. Sankovsky, C.A. de Oliveira, D.A. Mitchell, V. Nizet, J.A. McCammon, E. Oldfield // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – V. 110. – № 1.– P. 123–128.
6. Lackner, M. R. Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors / M.R. Lackner, R.M. Kindt, P.M. Carroll, K. Brown, M.R. Cancilla, C. Chen, H. de Silva, Y. Franke, B. Guan, T. Heuer, T. Hung, K. Keegan, J.M. Lee, V. Manne, C. O'Brien, D. Parry, J.J. Perez-Villar, R.K. Reddy, H. Xiao, H. Zhan, M. Cockett, G. Plowman, K. Fitzgerald, M. Costa, P. Ross-Macdonald // *Cancer Cell* – 2005. – V. 7. – Issue 4. – P. 325–336.
7. Berndt, N. Targeting protein prenylation for cancer therapy / N. Berndt, A.D. Hamilton, S.M. Sebt // *Nat. Rev. Cancer* – 2011. – V. 11. – P. 775–791.
8. Brunner, T. B. Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations / T.B. Brunner, S.M. Hahn, A.K. Gupta, R.J. Muschel, W.G. McKenna, E.J. Bernhard // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63. – Issue 18. – P. 5656–5668.
9. Crul, M. Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey / G.J. de Klerk, J.H. Beijnen, J.H. Schellens // *Anticancer Drugs* – 2001. – V. 12. – 163–184.

10. Ohkanda, J. The development of protein farnesyltransferase inhibitors as signaling-based anticancer agents / J. Ohkanda, M.A. Blaskovich, S.M. Sebti, A.D. Hamilton // *Prog. Cell Cycle Res.* – 2003. – V. 5. – P. 211–217.
11. Sebti, S. M. Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: Lessons from mechanism and bench-to bedside translational studies / S. M. Sebti, A.D. Hamilton // *Oncogene* – 2000. – V. 19. – P. 6584–6593.
12. Prenylome profiling reveals S-farnesylation is crucial for membrane targeting and antiviral activity of ZAP long-isoform / G. Charron, M.M.H. Li, M.R. MacDonald, H.C. Hang // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – V. 110. – № 27. – P. 11085–11090.
13. Ye, J. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation / J. Ye, C. Wang, Jr.R. Sumpter, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Jr.M. Gale // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – V. 100. – № 26. – P. 15865–15870.
14. del Real, G. Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity / G. del Real, S. Jiménez-Baranda, E. Mira, R.A. Lacalle, P. Lucas, C. Gómez-Moutón, M. Alegret, J.M. Peña, M. Rodríguez-Zapata, M. Alvarez-Mon, C. Martínez-A, S. Mañes // *J. Exp. Med.* – 2004. – V. 200. – Issue 4. – P. 541–547.
15. Yokoyama, K. Protein farnesyltransferase from *Trypanosoma brucei*. A heterodimer of 61- and 65-kDa subunits as a new target for antiparasite therapeutics / K. Yokoyama, P. Trobridge, F.S. Buckner, W.C. Van Voorhis, K.D. Stuart, M.H. Gelb // *J. Biol. Chem.* 1998. – V. 273. – Issue 41. – P. 26497–26505.
16. Buckner, F. S. Cloning, heterologous expression, and substrate specificities of protein farnesyltransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* / F.S. Buckner, R.T. Eastman, J.L. Nepomuceno-Silva, E.C. Spielmon, P.J. Myler, W.C. Van Voorhis, K. Yokoyama // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 2002. – V. 122. – Issue 2. – P. 181–188.
17. Bilgrami, S. Fretting about FRET in cell and structural biology / S. Bilgrami, S. Mayor, ed. by D. Zuk – *Evaluating Techniques in Biomedical Research.* – Cambridge: Cell Press, 2008 – P. 43–49.

18. Sekar, R. B. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations / R.B. Sekar, A. Periasamy // *J. Chem. Biol.* – 2003. – V. 160. – Issue 5. – P. 629–633;
19. Hatanaka, Y. Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier / Y. Hatanaka, Y. Sadakane // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2002. – V. 2. – Issue 3. – P. 271–288.
20. Водовозова, Е. Л. Метод фотоаффинного мечения и его применение в структурно-биологических исследованиях / Е.Л. Водовозова // *Биохимия* – 2007. – Т. 72. – № 1. С. 5–26.
21. Xia, Y. Photoactivatable lipid probes for studying biomembranes by photoaffinity labeling / Y. Xia, L. Peng // *Chem. Rev.* – 2013. – V. 113. – Issue 10. – P. 7880–7929.
22. Hancock, J. F. Ras proteins: different signals from different locations / J.F. Hancock // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – V. 4 – P. 373–385.
23. Reid, C. W. Opportunites in bacterial cell wall biogenesis / C.W. Reid, D. Gutelius // *J. Glycomics Lipidomics* – 2012. – V. 2. – Issue 3. – e110.
24. Teng, K.-H. Structures, mechanisms and inhibitors of undecaprenyl diphosphate synthase: A cis-prenyltransferase for bacterial peptidoglycan biosynthesis / K.-H. Teng, P.-H. Liang // *Bioorg. Chem.* – 2012. – V. 43. – P. 51-57.
25. Owen, D. J. Chemoenzymatic Synthesis of Fluorescent Rab 7 Proteins; Tools for Studying Vesicular Trafficking in Cells / D.J. Owen, K. Alexandrov, E. Rostkova, A.J. Scheidig, R.S. Goody, H. Waldmann // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1999. – V. 38. – № 4. – P. 509 – 512.
26. Mann, K. R. Allylic oxidation of olefins by catalytic stoichiometric selenium dioxide with *tert*-butyl hydroperoxide / K.R. Mann, N.S. Lewis, V.M. Miskowski, D.K. Erwin, G.S. Hammond, H.B. Gray // *J. Am. Chem. Soc.* – 1977. – V. 94. – P. 5526–5528.
27. Stenmark, H. The Rab GTPase family / H. Stenmark, V.M. Olkkonen // *Genome Biology* – 2001. – V. 2. – № 5. – Access mode: <http://genomebiology.com/2001/2/5/reviews/3007.1>.

28. Kuhn, K. Synthesis of functional Ras lipoproteins and fluorescent derivatives / K. Kuhn, D.J. Owen, B. Bader, A. Wittinghofer, J. Kuhlmann, H. Waldmann // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123. – Issue 6. – P. 1023–1035.
29. Teng, K.-H. Fluorescent substrate analog for monitoring chain elongation by undecaprenyl pyrophosphate synthase in real time / K.-H. Teng, A. P.-C. Chen, C.-J. Kuo, Y.-C. Li, H.-G. Liu, C.-T. Chen, P.-H. Liang // *Anal. Biochem.* – 2011. – V. 417. – Issue 1. – P. 136–141.
30. Chen, A. P.-C Synthesis and application of a fluorescent substrate analogue to study ligand interactions for undecaprenyl pyrophosphate synthase / A. P.-C. Chen, Y.-H. Chen, H.-P. Liu, Y.-C. Li, C.-T. Chen, P.-H. Liang // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. – Issue 51. – P. 15217–15224.
31. Chen, A. P.-C. Substrate and product specificities of cis-type undecaprenyl pyrophosphate synthase / A. P.-C. Chen, S.-Y. Chang, Y.-C. Lin, Y.-S. Sun, C.-T. Chen, A. H.-J. Wang, P.-H. Liang // *Biochem. J.* – 2005. – V. 386. – P. 169–176.
32. Веселовский, В. В. Производные долихилфосфата с флуоресцентной меткой. Аналоги долихилфосфата, содержащие в ω -звене остаток 2-аминопиридина / В.В. Веселовский, А.В. Лозанова, С.Д. Мальцев, Л.Л. Данилов, В.Н. Шибает, М. Дж. Йердзейас // *Изв. АН, Сер. хим.* – 2001. – № 3. – С. 509–514.
33. Danilov, L. L Polyprenyl phosphates: synthesis and structure-activity relationship for a biosynthetic system of *Salmonella anatum* O-specific polysaccharide / L.L Danilov, T.N. Druzhinina, N.A. Kalinchuk, S.D. Maltsev, V.N. Shibaev // *Chem. Phys. Lipids.* – 1989. – V. 51. – P. 191–203.
34. Веселовский, В. В. Производные долихилфосфата с флуоресцентной меткой. Аналоги долихилфосфата с различной длиной изопреновой цепи, содержащие в ω -звене остаток 1-аминонафталина / В.В. Веселовский, А.В. Лозанова, С.Д. Мальцев, Л.Л. Данилов, В.Н. Шибает, М. Дж. Йердзейас // *Изв. АН, Сер. хим.* – 2001. – № 11. – С. 2121–2126.
35. Shibaev, V. N. Synthesis of dolichyl phosphate derivatives with fluorescent label at the ω -end of the chain, new tools to study protein glycosylation / V.N. Shibaev, V.V. Veselovsky,

A.V. Lozanova, S.D. Maltsev, L.L. Danilov, W.T. Forsee, J. Xing, H.C. Cheung, M.J. Jedrzejak // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2000. – V. 10. – Issue 2. – P. 189–192.

36. Григорьева, Н. Я. Синтез долихилфосфатов, содержащих флуоресцентную метку в γ -изопреновом звене цепи / Н.Я. Григорьева, О.А. Пинскер, С.Д. Мальцев, Л.Л. Данилов, В.Н. Шибяев, М.Дж. Йедрзейас // *Изв. АН, Сер. хим.* – 2000. – № 12. – С. 2100–2106.

37. Lamani, E. Structural studies and mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* dolichyl-phosphate-mannose synthase: insights into the initial step of synthesis of dolichyl-phosphate-linked oligosaccharide chains in membranes of endoplasmic reticulum / E. Lamani, R.B. Mewbourne, D.S. Fletcher, S.D. Maltsev, L.L. Danilov, V.V. Veselovsky, A.V. Lozanova, N.Y. Grigorieva, O.A. Pinsker, J. Xing, W.T. Forsee, H.C. Cheung, J.S. Schutzbach, V.N. Shibaev, M.J. Jedrzejak // *Glycobiology.* – 2006. – V. 16. – Issue 7. – P. 666–678.

38. Dursina, B. Identification and specificity profiling of protein prenyltransferase inhibitors using new fluorescent phosphoisoprenoids / B. Dursina, R. Reents, C. Delon, Y. Wu, M. Kulharia, M. Thutewohl, A. Veligodsky, A. Kalinin, V. Evstifeev, D. Ciobanu, S.E. Szedlacsek, H. Waldmann, R.S. Goody, K. Alexandrov // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. – Issue 9. – P. 2822–2835.

39. Kim, M. K. Synthesis and activity of fluorescent isoprenoid pyrophosphate analogues / MeeK. Kim, T. S. Kleckley, A. J. Wiemer, S. A. Holstein, R. J. Hohl, D. F. Wiemer // *J. Org. Chem.* – 2004. – V. 69. – № 24. – P. 8186 – 8193.

40. Liu, C.-Y. Synthesis and evaluation of new fluorescent transglycosylase substrate: Lipid II-based molecule possessing a dansyl-C20 polyprenyl moiety / C.-Y. Liu, C.-W. Guo, Y.-F. Chang, J.-T. Wang, H.-W. Shih, Y.-F. Hsu, C.-W. Chen, S.-K. Chen, Y.-C. Wang, T.-J. R. Cheng, C. Ma, C.-H. Wong, J.-M. Fang, W.-C. Cheng // *Org. Lett.* – 2010. – V. 12. – Issue 9. – P. 1608–1611.

41. Wu, Y.-W. Probing protein function by chemical modification / Y.-W. Wu, R.S. Goody // *J. Pept. Sci.* – 2010. – V. 16. – Issue 10. – P. 514–523.

42. Rashidian, M. Enzymatic labeling of proteins: techniques and approaches / M. Rashidian, J.K. Dozier, M.D. Distefano // *Bioconjugate Chem.* – 2013. – V. 24. – Issue 8. – P. 1277–1294.

43. Lin, M. Z. Selective labeling of proteins with chemical probes in living cells / M.Z. Lin, L. Wang // *Physiology* – 2008. – V. 23. – P. 131–141.
44. Soh, N. Selective chemical labeling of proteins with small fluorescent molecules based on metal-chelation methodology / N. Soh // *Sensors* – 2008. – V. 8. – Issue 2. – P. 1004–1024.
45. Chen, I. Site-specific labeling of proteins with small molecules in live cells / I. Chen, A.Y. Ting // *Curr. Opin. Biotech.* – 2005. – V. 16. – P. 35–40.
46. Rashidian, M. Selective labeling of polypeptides using protein farnesyltransferase via rapid oxime ligation / M. Rashidian, J.K. Dozier, S. Lenevich, M.D. Distefano // *Chem. Commun.* – 2010. – V. 46. – Issue 47. – P. 8998–9000.
47. Rashidian, M. Chemoenzymatic reversible immobilization and labeling of proteins without prior purification / M. Rashidian, J.M. Song, R.E. Pricer, M.D. Distefano // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – V. 134. – Issue 20. – P. 8455–8467.
48. G. Charron Alkynyl-farnesol reporters for detection of protein S-prenylation / G. Charron, L.K. Tsou, W. Maguire, J.S. Yount, H.C. Hang // *Mol. BioSyst.* – 2011. – V. 7. – P. 67–73.
49. Rashidian, M. Simultaneous dual protein labeling using a triorthogonal reagent / M. Rashidian, S.C. Kumarapperuma, K. Gabrielse, A. Fegan, C.R. Wagner, M.D. Distefano // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – V. 135. – Issue 44. – P. 16388–16396.
50. Hosokawa, A. Evaluation of an alkyne-containing analogue of farnesyl diphosphate as a dual substrate for protein-prenyltransferases / A. Hosokawa, J.W. Wollack, Z. Zhang, L. Chen, G. Barany, M.D. Distefano // *Int. J. Res. Pept. Ther.* – 2007. – V. 13. – Issue 1-2. – P. 345–354.
51. Duckworth, B. P. Selective labeling of proteins by using protein farnesyltransferase / B.P. Duckworth, Z. Zhang, A. Hosokawa, M.D. Distefano // *ChemBioChem* – 2007. – V. 8. – Issue 1. – P. 98–105.
52. Labadie, G. R. Farnesyl diphosphate analogues with ω -bioorthogonal azide and alkyne functional groups for protein farnesyl transferase-catalyzed ligation reactions / G.R. Labadie, R. Viswanathan, C.D. Poulter // *J. Org. Chem.* – 2007. – V. 72. – Issue 24. – P. 9291–9297.

53. Nguyen, U. T. Exploiting the substrate tolerance of farnesyltransferase for site-selective protein derivatization / U.T. Nguyen, J. Cramer, J. Gomis, R. Reents, M. Gutierrez-Rodriguez, R.S. Goody, K. Alexandrov, H. Waldmann // *ChemBioChem* – 2007. – V. 8. – Issue 4. – P. 408–423.
54. Duckworth, B. P. Site-specific, covalent attachment of protein to a solid surface / B.P. Duckworth, J. Xu, T.A. Taton, A. Guo, M.D. Distefano // *Bioconjugate Chem.* – 2006. – V. 17. – Issue 4. – P. 967–974.
55. Kho, Y. A tagging-via-substrate technology for detection and proteomics of farnesylated proteins / Y. Kho, S.C. Kim, C. Jiang, D. Barma, S.W. Kwon, J. Cheng, J. Jaunbergs, C. Weinbaum, F. Tamanoi, J. Falck, Y. Zhao // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – V. 101. – № 34. – P. 12479–12484.
56. Kolb, H. C. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions / H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2001. – V. 40. – № 11. – 2004–2021.
57. Saxon, E. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction / E. Saxon, C.R. Bertozzi // *Science* – 2000. – V. 287. – № 5460. – P. 2007–2010.
58. Lang, K. Bioorthogonal reactions for labeling proteins / K. Lang, J.W. Chin // *ACS Chem. Biol.* – 2014. – V. 9. – Issue 1. – P. 16–20.
59. Micali, E. Protein farnesyltransferase isoprenoid substrate discrimination is dependent on isoprene double bonds and branched methyl groups / E. Micali, K.A.H. Chehade, R.J. Isaacs, D.A. Andres, H.P. Spielmann // *Biochemistry* – 2001. – V. 40. – Issue 41. – P. 12254–12265.
60. Zhou, C. Aromatic farnesyl diphosphate analogues: vinyl triflate-mediated synthesis and preliminary enzymatic evaluation / C. Zhou, Y. Shao, R.A. Gibbs // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2002. – V. 12. – Issue 10. – P. 1417–1420.
61. Montoy-Peleaz, P. J. Identification of a UDP-Gal: GlcNAc-R galactosyltransferase activity in *Escherichia coli* VW187 / P.J. Montoy-Peleaz, J.C. Rily, W.A. Szarek, M.A. Valvano, J.S. Schutzbach, I. Brockhausen // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2005. – V. 15. – Issue 4. – P. 1205–1211.

62. Druzhinina, T. N. 11-Phenoxyundecyl phosphate as a 2-acetamido-2-deoxy- α -d-glucopyranosyl phosphate acceptor in O-antigen repeating unit assembly of *Salmonella arizonae* O:59 / T.N. Druzhinina, L.L. Danilov, V.I. Torgov, N.S. Utkina, N.M. Balagurova, V. V. Veselovsky, A. O. Chizhov // *Carbohydr. Res.* – 2010. – V. 345. – Issue 18. – P. 2636–2640.
63. Dawe, A. L. Novel modifications to the farnesyl moiety of the a-factor lipopeptide pheromone from *Saccharomyces cerevisiae*: a role for isoprene modifications in ligand presentation / A.L. Dawe, J.M. Becker, Y. Jiang, F. Naider, J.T. Eummer, Y.Q. Mu, R.A. Gibbs // *Biochemistry* – 1997. – V. 36. – Issue 40. – P. 12036–12044.
64. Gibbs, R. A. A Stereoselective palladium/copper-catalyzed route to isoprenoids: synthesis and biological evaluation of 13-methylidene-farnesyl diphosphate / R.A. Gibbs, U. Krishnan, J.M. Dolence, C.D. Poulter // *J. Org. Chem.* – 1995. – V. 60. – Issue 24. – P. 7821–7829.
65. Mu, Y. Q. Coupling of isoprenoid triflates with organoboron nucleophiles: synthesis and biological evaluation of geranylgeranyl diphosphate analogues / Y.Qi Mu, L.M. Eubanks, C.D. Poulter, R.A. Gibbs // *Bioorg. Med. Chem.* – 2002. – V. 10. – Issue 5. – P. 1207–1219.
66. Xie, H. Synthesis and biological evaluation of the geometric farnesylated analogues of the a-factor mating peptide of *Saccharomyces cerevisiae* / H. Xie, Y. Shao, J.M. Becker, F. Naider, R.A. Gibbs // *J. Org. Chem.* – 2000. – V. 65. – Issue 25. – P. 8552–8563.
67. Gibbs, B. S. Novel farnesol and geranylgeraniol analogues: a potential new class of anticancer agents directed against protein prenylation / B.S. Gibbs, T.J. Zahn, Y.Q. Mu, J.S. Sebolt-Leopold, R.A. Gibbs // *J. Med. Chem.* – 1999. – V. 42. – Issue 19. – P. 3800–3808.
68. Zahn, T.J. Grignard-mediated synthesis and preliminary biological evaluation of novel 3-substituted farnesyl diphosphate analogues / T.J. Zahn, C. Weinbaum, R.A. Gibbs // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2000. – V. 10. – Issue 15. – P. 1763–1766.
69. Mechelke, M. F. Synthesis of farnesol analogues through Cu(I)-mediated displacements of allylic THP ethers by grignard reagents / M.F. Mechelke, D.F. Wiemer // *J. Org. Chem.* – 1999. – V. 64. – Issue 13. – P. 4821–4829.

70. Chehade, K. A. H. Design and synthesis of a transferable farnesyl pyrophosphate analogue to Ras by protein farnesyltransferase / K.A.H. Chehade, D.A. Andres, H. Morimoto, H.P. Spielmann // *J. Org. Chem.* – 2000. – V. 65. – Issue 10. – P. 3027–3033.
71. Troutman, J. M. Tools to analyze protein farnesylation in cells / J.M. Troutman, M.J. Roberts, D.A. Andres, H.P. Spielmann // *Bioconjugate Chem.* – 2005. – V. 16. – Issue 5. – P. 1209–1217.
72. Troutman, J. M. Protein farnesyl transferase target selectivity is dependent upon peptide stimulated product release / J.M. Troutman, D.A. Andres, H.P. Spielmann // *Biochemistry* – 2007. – V. 46. – Issue 40. – P. 11299–11309.
73. Chehade, K. A. H. Photoaffinity analogues of farnesyl pyrophosphate transferable by protein farnesyl transferase / K.A.H. Chehade, K. Kiegiel, R.J. Isaacs, J.S. Pickett, K.E. Bowers, C.A. Fierke, D.A. Andres, H.P. Spielmann // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – V. 124. – Issue 28. – P. 8206–8219.
74. Lujan, D. K. Chemoenzymatic synthesis of an isoprenoid phosphate tool for the analysis of complex bacterial oligosaccharide biosynthesis / D.K. Lujan, J.A. Stanziale, A.Z. Mostafavi, S. Sharma, J.M. Troutman // *Carbohydr.Res.* – 2012. – V. 359. – P. 44–53.
75. Mostafavi, A. Z. Biosynthetic assembly of the *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide A precursor bactoprenyl diphosphate-linked acetamido-4-amino-6-deoxygalactopyranose / A.Z. Mostafavi, J.M. Troutman // *Biochemistry* – 2013. – V. 52. Issue 11. – P. 1939–1949.
76. Mostafavi, A. Z. Fluorescent probes for investigation of isoprenoid configuration and size discrimination by bactoprenol-utilizing enzymes / A.Z. Mostafavi, D.K. Lujan, K.M. Erickson, C.D. Martinez, J.M. Troutman // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – V. 21. – Issue 17. – P. 5428–5435.
77. Gordon, K. Solid phase synthesis – designer linkers for combinatorial chemistry: a review / K. Gordon, S. Balasubramanian // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 1999. – V. 74. – Issue 9. – P. 835–851.
78. Vaino, A. R. Solid-phase organic synthesis: a critical understanding of the resin / A.R. Vaino, K.D. Janda // *J. Comb. Chem.* – 2000. – V. 2. – Issue 6. – P. 579–596.

79. Subramanian, T. Directed library of anilino geranyl analogues of farnesyl diphosphate via mixed solid- and solution-phase synthesis / T. Subramanian, Z. Wang, J.M. Troutman, D.A. Andres, H.P. Spielmann // *Org. Lett.* – 2005. – V. 7. – Issue 11. – P. 2109–2112.
80. Ma, S. Palladium(0)-catalyzed coupling–cyclization reaction of polymer-supported aryl iodides with 1,2-allenyl carboxylic acids. Solid-phase parallel synthesis of butenolides / S. Ma, D. Duan, Y. Wang // *J. Comb. Chem.* – 2002. – V. 4. – Issue 3. – P. 239–247.
81. Roberts, M. J. Hydrophilic anilino geranyl diphosphate prenyl analogues are Ras function inhibitors / M.J. Roberts, J.M. Troutman, K.A.H. Chehade, H.C. Cha, J.P.Y. Kao, X. Huang, C.-G. Zhan, Y.K. Peterson, T. Subramanian, S. Kamalakkannan, D.A. Andres, H.P. Spielmann // *Biochemistry* – 2006. – V. 45. – Issue 51. – P. 15862–15872.
82. Troutman, J. M. Selective modification of CaaX peptides with ortho-substituted anilino geranyl lipids by protein farnesyl transferase: competitive substrates and potent inhibitors from a library of farnesyl diphosphate analogues / J.M. Troutman, T. Subramanian, D.A. Andres, H.P. Spielmann // *Biochemistry* – 2007. – V. 46. – Issue 40. – P. 11310–11321.
83. Baba, T. Inactivation of undecaprenyl pyrophosphate synthetase with a photolabile analog of farnesyl pyrophosphate / T. Baba, C.M. Allen // *Biochemistry* – 1984. – V. 23. – Issue 6. – P. 1312–1322.
84. Baba, T. Photoaffinity labeling of undecaprenyl pyrophosphate synthetase with a farnesyl pyrophosphate analogue / T. Baba, J. Muth, C.M. Allen // *J. Biol. Chem.* – 1985. – V. 260. – Issue 19. – P. 10467–10473.
85. Yokoyama, K. Mammalian protein geranylgeranyltransferase-I: substrate specificity, kinetic mechanism, metal requirements, and affinity labeling / K. Yokoyama, P. McGeady, M.H. Gelb // *Biochemistry* – 1995. – V. 34. – Issue 4. – P. 1344–1354.
86. Bukhtiyarov, Y. E. Photoreactive analogues of prenyl diphosphates as inhibitors and probes of human protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I / Y.E. Bukhtiyarov, C.A. Omer, C.M. Allen // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – Issue 32. – P. 19035–19040.
87. Hovlid, M. L. Synthesis, properties, and applications of diazotrifluoropropanoyl-containing photoactive analogs of farnesyl diphosphate containing modified linkages for

- enhanced stability / M.L. Hovlid, R.L. Edelstein, O. Henry, J. Ochocki, A. DeGraw, S. Lenevich, T. Talbot, V.G. Young, A.W. Hruza, F. Lopez-Gallego, N.P. Labello, C.L. Strickland, C. Schmidt-Dannert, M.D. Distefano // *Chem. Biol. Drug. Des.* – 2010. – V. 75. – Issue 1. – P. 51–67.
88. Grassi, D. Synthesis and Enzymatic Phosphorylation of a Photoactivatable Dolichol Analogue / D. Grassi, V. Lippuner, M. Aebi, J. Brunner, A. Vasella // *J. Am. Chem. Soc.* – 1997. – V. 119. – Issue 45. – 10992–10999.
89. Prabhakar, B. T. Anti-tumor and proapoptotic effect of novel synthetic benzophenone analogues in Ehrlich ascites tumor cells / B.T. Prabhakar, S.A. Khanum, K. Jayashreed, B.P. Salimath, S. Shashikanth // *Bioorg.Med.Chem.* – 2006. – V. 14. – Issue 2. – P. 435–446.
90. Prabhakar, B. T. Antiangiogenic effect of 2-benzoyl-phenoxy acetamide in EAT cell is mediated by HIF-1alpha and down regulation of VEGF of in-vivo / B.T. Prabhakar, S.A. Khanum, S. Shashikanth, B.P. Salimath // *Invest. New Drugs* – 2006. – V. 24. – Issue 6. – P. 471–478.
91. Ranganatha, V. L. Synthesis, angiopreventive activity, and in vivo tumor inhibition of novel benzophenone-benzimidazole analogs / V.L. Ranganatha, B.R. Vijay Avin, P. Thirusangu, T. Prashanth, B.T. Prabhakar, S.A. Khanum // *Life Sci.* – 2013. – V. 93. – Issue 23. – P. 904–911.
92. Dorman, G. Benzophenone photophores in biochemistry / G. Dorman, G.D. Prestwich // *Biochemistry* – 1994. – V. 33. – Issue 19. – P. 5661–5673.
93. Prestwich, G. D. Benzophenone photoprobes for phosphoinositides, peptides and drugs / G.D. Prestwich, G. Dormán, J.T. Elliott, D.M. Marecak, A. Chaudhary // *Photochem. Photobiol.* – 1997. – V. 65. – Issue 2. – P. 222–234.
94. Turek, T. C. Analogs of farnesyl pyrophosphate incorporating internal benzoylbenzoate esters: Synthesis, inhibition kinetics and photoinactivation of yeast protein farnesyltransferase / T.C. Turek, I. Gaon, M.D. Distefano // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – V. 37. – Issue 28. – P. 4845–4848.

95. Turek, T. C. Synthesis of farnesyl diphosphate analogues containing ether-linked photoactive benzophenones and their application in studies of protein prenyltransferases / T.C. Turek, I. Gaon, M.D. Distefano // *J. Org. Chem.* – 2001. – V. 66. – Issue 10. – P. 3253–3264.
96. Guy, M. R. Novel prenyl-linked benzophenone substrate analogues of mycobacterial mannosyltransferases / M.R. Guy, P.A. Illarionov, S.S. Gurcha, L.G. Dover, K.J.C. Gibson, P.W. Smith, D.E. Minnikin, G.S. Besra // *Biochem. J.* – 2004. – V. 382. – P. 905–912.
97. Gaon, I. Photoactive analogs of farnesyl pyrophosphate containing benzoylbenzoate esters: synthesis and application to photoaffinity labeling of yeast protein farnesyltransferase / I. Gaon, T.C. Turek, V.A. Weller, R.L. Edelstein, S.K. Singh, M.D. Distefano // *J. Org. Chem.* – 1996. – V. 61. – Issue 22. – P. 7738–7745.
98. DeGraw, A. J. A photoactive isoprenoid diphosphate analogue containing a stable phosphonate linkage: synthesis and biochemical studies with prenyltransferases / A.J. DeGraw, Z. Zhao, C.L. Strickland, A.H. Taban, J. Hsieh, M. Jefferies, W. Xie, D.K. Shintani, C.M. McMahan, K. Cornish, M.D. Distefano // *J. Org. Chem.* – 2007. – V. 72. Issue 13. – P. 4587–4595.
99. Turek, T. C. Synthesis and evaluation of benzophenone-based photoaffinity labeling analogs of prenyl pyrophosphates containing stable amide linkages / T.C. Turek, I. Gaon, D. Gamache, M.D. Distefano // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1997. – V. 7. – Issue 16. – P. 2125–2130.
100. Marecak, D. M. Benzoylphenoxy analogs of isoprenoid diphosphates as photoactivatable substrates for bacterial prenyltransferases / D.M. Marecak, Y. Horiuchi, H. Arai, M. Shimonaga, Y. Maki, T. Koyama, K. Ogura, G.D. Prestwich // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1997. – V. 7. – Issue 15. – P. 1973–1978.
101. Völkert, M. Synthesis and biological activity of photoactivatable N-Ras peptides and proteins / M. Völkert, K. Uwai, A. Tebbe, B. Popkirova, M. Wagner, J. Kuhlmann, H. Waldmann // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – Issue 42 – P. 12749–12758.
102. Swamy, K. C. K. Mitsunobu and related reactions: advances and applications / K.C.K. Swamy, N.N.B. Kumar, E. Balaraman, K.V.P.P. Kumar // *Chem. Rev.* – 2009. – V. 109. – Issue 6. – P. 2551–2651.

103. Völkert, M. The chemical biology of Ras lipidation / M. Völkert, M. Wagner, C. Peters, H. Waldmann // *Biol. Chem.* – 2001. – V. 382. – Issue 8. – P. 1133–1145.
104. Gaon, I. Farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate analogs incorporating benzoylbenzyl ethers: Synthesis and inhibition of yeast protein farnesyltransferase / I. Gaon, T.C. Turek, M.D. Distefano // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – V. 37. – Issue 49. – P. 8833–8836.
105. Turek-Etienne, T. C. Biochemical and structural studies with prenyl diphosphate analogues provide insights into isoprenoid recognition by protein farnesyl transferase / T.C. Turek-Etienne, C.L. Strickland, M.D. Distefano // *Biochemistry* – 2003. – V. 42. – Issue 13. – P. 3716–3724.
106. Kale, T. A. A photoactivatable prenylated cysteine designed to study isoprenoid recognition / T.A. Kale, C. Raab, N. Yu, Dennis C. Dean, M.D. Distefano // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123. – Issue 19. – P. 4373–4381.
107. Dovas, A. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities / A. Dovas, J.R. Couchman // *Biochem J.* – 2005. – V. 390. – P. 1–9.
108. Danilov L. L. Phosphopolyrenols and their glycosyl esters: chemical synthesis and biochemical application / L.L.Danilov, V.N Shibaev // *Studies in natural products chemistry*, New York: Elsevier, 1991. – V. 8. – P. 63 – 114.
109. Yi, W. The wbnH gene of Escherichia coli O86:H2 encodes an α -1,3-N-acetylgalactosaminyl transferase involved in the O-repeating unit biosynthesis / W. Yi, Q. Yao, Y. Zhang, E. Motari, S. Lin, P.G. Wang // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – V. 344. – Issue 2. – P. 631–639.
110. Уткина, Н.С. Синтез P^1 -(11-феноксиундецил)- P^2 -(α -D-галактопиранозил)дифосфата и P^1 -(11-феноксиундецил)- P^2 -(α -D-глюкопиранозил)дифосфата; исследование их акцепторных свойств в реакции переноса остатка маннозы, катализируемой маннозилтрансферазой Salmonella newport // *Биоорг. химия* – 2012. – Т. 38. – № 4. – С. 472–481.
111. Gao, Y. Biochemical characterization of WbdN, a β 1,3-glucosyltransferase involved in O-antigen synthesis in enterohemorrhagic Escherichia coli O157 / Y. Gao, B. Liu, S. Strum, J.S. Schutzbach, T.N. Druzhinina, N.S. Utkina, V.I. Torgov, L.L. Danilov, V.V. Veselovsky, J.Z.

Vlahakis, W.A. Szarek, L. Wang, I. Brockhausen // *Glicobiology* – 2012. – V. 22. – Issue 8. – P. 1092–1102.

112. 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.

113. 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 // *Биоорган. химия* – 2014. – Т. 40, № 1. – С. 99–107.

114. Винникова, А. Н. Синтез и акцепторные свойства 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфата и P¹-{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил}-P²-(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 // *Биоорган. химия* – 2013. – Т. 39. – № 1. – С. 99–104.

115. 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.

116. Gao, Y. Functional identification of bacterial glucosyltransferase WbdN / Y. Gao, A.N. Vinnikova, I. Brockhausen // *Meth. Mol. Biol.* – 2013. – V. 1022. – P. 199–214.

117. 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.

118. de Barry Barnett, E. Studies in the anthracene series. Part V / E. de Barry Barnett, J.W. Cook, M.A. Matthews // *J. Chem. Soc.* – 1923. – V. 123. – P. 1994–2008.

119. Шибяев, В. Н. Способность морапренилфосфата участвовать в реакциях биосинтеза О-антигена *Salmonella anatum* / В. Н. Шибяев, Ю. Ю. Кусов, Т. Н. Дружинина,

- Н. А. Калинин, Н. К. Кочетков, В. А. Килессо, С. Ш. Рожнова // *Биоорганическая химия* – 1978. – Т. 4. – № 1. – С. 47–56.
120. Ibata, K. Polyprenols from conifers: multiplicity in chain length distribution / K. Ibata, A. Kageyu, T. Takigawa, M. Okada, T. Nishida, M. Mizuno, Y. Tanaka // *Phytochemistry* – 1984. – V. 23. – Issue 11. – P. 2517–2521.
121. Ihara, H. Effect of photopolymerization on the morphology of helical supramolecular assemblies / H. Ihara, M. Takafuji, C. Hirayama, D.F. O'Brien // *Langmuir* – 1992. – V. 8. – Issue 6. – P. 1548–1553.
122. Stewart, F. H. C. The preparation of some surface active alcohols containing the anthracene nucleus / F.H.C. Stewart // *Aust. J. Chem.* – 1960. – V. 13. – № 4. – P. 478–487.
123. Bach, A. Cell-permeable and plasma-stable peptidomimetic inhibitors of the postsynaptic density-95/N-methyl-D-aspartate receptor interaction / A. Bach, J.N.N. Eildal, N. Stühr-Hansen, R. Deeskamp, M. Gottschalk, S.W. Pedersen, A.S. Kristensen, K. Strømgaard // *J. Med. Chem.* – 2011. – V. 54. – Issue 4. – P. 1333–1346.
124. Becker, H. D. Synthesis and photochemical isomerization of 1,2-di-9-anthrylethanol and 1,2-di-9-anthrylethanone / H.D. Becker, L. Hansen, K. Andersson // *J. Org. Chem.* – 1986. – V. 51. – Issue 15. – P. 2956–2961.