



УДК 547.455.6'118.057

© 1992 г.

*А. В. Николаев, Н. С. Уткина, В. Н. Шибаев,  
А. В. Игнатенко, Б. В. Розынов\**

## ФРАГМЕНТЫ БИОПОЛИМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ ГЛИКОЗИЛФОСФАТОВ

### 10\*. СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ И ЛИНЕЙНЫХ ОЛИГО(МАННОЗИЛФОСФАТОВ) ПОЛИКОНДЕНСАЦИЕЙ ПРОИЗВОДНОГО МАННОЗИЛВОДОРОДФОСФОНАТА

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;  
\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва*

Исследована реакция поликонденсации 2,3,4-три-*O*-бензоил- $\alpha$ -*D*-маннопиранозилводородфосфоната в присутствии триметилацетилхлорида в пиридине как возможный подход к синтезу поли(гликозилфосфатов). После окисления *N*-фосфонатов до фосфатов и дебензоилирования выделены необычные циклические олигомеры — цикло-(1-6)-ди- и цикло-(1-6)-три( $\alpha$ -*D*-маннопиранозилфосфат) (45 и 7% соответственно). Фракция линейных (1-6)-олиго( $\alpha$ -*D*-маннопиранозилфосфатов) с длиной цепи от 3 до 7 звеньев получена с выходом 16%. Строение полученных соединений (в том числе степень полимеризации) определено на основании данных ЯМР и масс-спектрометрии ГАВ, а также анализа методом гель-хроматографии на сефадексе G-25.

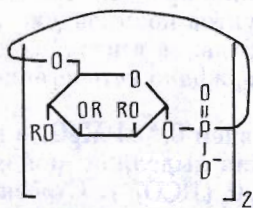
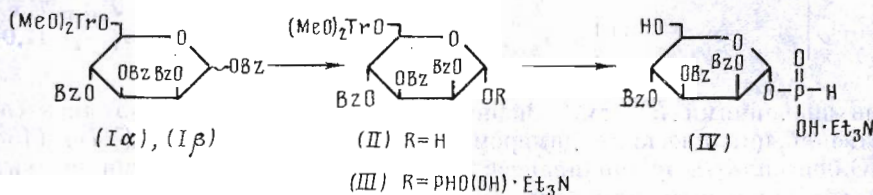
Поли(гликозилфосфаты), регулярные биополимеры, построенные из повторяющихся гликозил- или олигозилфосфатных звеньев, входят в состав поверхностных структур многих бактерий (*Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и др.), определяя их иммунологическую специфичность [2]. В предыдущих сообщениях [1, 3] было показано, что фрагменты поли(гликозилфосфатов), содержащие несколько гликозилфосфатных звеньев, могут быть эффективно получены путем ступенчатого наращивания цепи с использованием гликозилводородфосфонатного метода [4]. Альтернативным подходом к синтезу подобных структур является реакция поликонденсации частично защищенного производного гликозил-*N*-фосфоната с последующим окислением *N*-фосфонатных групп до фосфатных и деблокированием. В настоящей публикации мы сообщаем о первой попытке такого синтеза на примере поликонденсации 2,3,4-три-*O*-бензоил- $\alpha$ -*D*-маннопиранозилводородфосфоната (IV). Часть описываемого материала была опубликована в предварительных сообщениях [5, 6].

Последовательная обработка *D*-маннозы ди(*n*-анизил)фенилхлорметаном и бензоилхлоридом в пиридине привела к аномерным 6-диметокситрифиловым эфирам (1 $\alpha$ ) и (1 $\beta$ ) с выходами 81 и 12% соответственно. Селективное дебензоилирование тетрабензоата (I) диметиламином в ацетонитриле [4, 1] давало трибензоат (II) (70%), который превращали в гликозилводородфосфонат (III) действием тринидазолидофосфита с последующим гидролизом имидазольных групп [4, 1]. На заключительной стадии соединение (III) обработкой 2% дихлоруксусной кислотой при 0°С или перхлоратом пиридина в смеси нитрометан — метанол [7] было переведено в ключевое соединение (IV). Выбранные условия обеспечивали со-

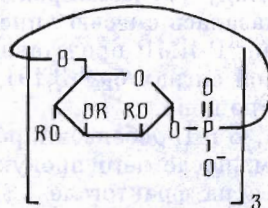
\* Сообщение 9 — см. [1].

хранение кислотолabileйной водородфосфонатной функции при С1. В обоих случаях выход соединения (IV) составил 70%. Его строение надежно подтверждалось данными спектров  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (см. «Экспериментальную часть»).

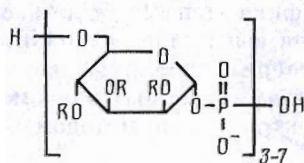
Поликонденсацию мономера (IV) выполняли в стандартных условиях водородфосфонатной конденсации [4]: в пиридине (0,1 М раствор) в присутствии 2,5 экв.  $\text{Me}_3\text{CCOCl}$ . Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реакционной смеси через 10 и 20 мин были идентичны и содержали лишь набор сигналов в области, характерной для диэфиров водородфосфоновой кислоты данной природы ( $\delta_{\text{P}}$  7,3–10,6;  $^1J_{\text{P,H}} > 700$  Гц) [8, 9]. Последующая обработка иодом в водном пиридине в присутствии  $\text{Et}_3\text{N}$  сопровождалась появлением нового спектра ( $\delta_{\text{P}}$  -3,54, -3,09, -2,58 (основные сигналы), -2,15 (минорный сигнал)), подтверждавшего полноту окисления Н-фосфонатных групп до фосфатных.



(VI) R = H



(VIII) R = H



(X) R = H,  $\overline{\text{P}} = 3$

(XI) R = H,  $\overline{\text{P}} = 5$

(XII) R = H,  $\overline{\text{P}} = 7$

Фракционированием продуктов поликонденсации на  $\text{SiO}_2$  были выделены основные фракции А, Б и В, заметно различающиеся по хроматографической подвижности при ТСХ. Как показал последующий детальный анализ продуктов дебензоилирования (см. ниже), фракции А и Б с боль-



Данные  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ) циклических олиго(маннозилфосфатов) (VI) и (VIII)

Атом	(VI)		(VIII)	
	$\delta$ , м.д.	КССВ, Гц	$\delta$ , м.д.	КССВ, Гц
H1	5,42дд	$J_{1, P}$ 6,5	5,41дд	$J_{1, P}$ 8,7
H2	3,97дд	$J_{1,2}$ 2,0	3,95дд	$J_{1,2}$ 1,7
H3	3,88дд	$J_{2,3}$ 3,2	3,90дд	$J_{2,3}$ 3,0
H4	3,51т	$J_{3,4} = J_{4,5} = 9,0$	3,79—3,93м	
H5	3,99дт	$J_{5, 6a}$ 9,0	3,79—3,93м	
H6a	3,91ддд	$J_{6a, P}$ 4,5	3,79—3,93м	
H6b	4,30ддд	$J_{5, 6b}$ 1,5	4,26ддд	$J_{5, 6b} \sim 1$
		$J_{6b, P}$ 5,5		$J_{6b, P}$ 7,5
		$J_{6a, 6b}$ 10,0		$J_{6a, 6b}$ 11,0

шими значениями  $R_f$  (см. «Экспериментальную часть») являлись соответственно циклическими димером (V) (50%) и тримером (VII) (15%) три-*O*-бензоил- $\alpha$ -*D*-маннопиранозилфосфата. Циклический тип структур подтверждался наличием единственного положения резонанса ядер  $^{31}\text{P}$  в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $-2,08$  для (V) и  $-3,48$  для (VII)) и присутствием только одного набора сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ - (для (V)) и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (см. «Экспериментальную часть»). Кроме этого, расщепление сигналов C1, C2, C5 и C6 на атоме фосфора свидетельствовало о (1-6)-типе фосфодиэфирных связей между бензоилированными маннопиранозными остатками. Фракция В оказалась смесью линейных продуктов поликонденсации (IX) (21%). Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР представлял набор сигналов в интервале от  $-4,0$  до  $0,5$  (основной сигнал  $\delta_P = -3,19$ ), что подтверждало гетерогенность олигомеров по длине цепи.

Фракции А, Б и В дебензоилировали действием  $0,1 \text{ M MeONa}$  в метаноле с диоксаном, после чего продукты омыления выделяли ионообменной хроматографией на фрактогеле TSK DEAE-650 ( $\text{HCO}_3^-$ ). Строение полученных соединений устанавливали с использованием данных спектроскопии ЯМР и анализа продуктов мягкого кислотного гидролиза ( $0,1 \text{ M HCl}$ ,  $100^\circ \text{C}$ ). Степень полимеризации линейных и циклических олигомеров определяли методом гель-хроматографии на сефадексе G-25 в  $0,5 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$  \*. При этом была использована известная [10, 11] зависимость объема удерживания от логарифма молекулярной массы вещества, которая является линейной функцией в пределах рабочего объема колонки. Для построения калибровочного графика (рис. 1) были экспериментально найдены времена удерживания ряда соединений-стандартов близкой углеводфосфатной природы (см. «Экспериментальную часть»). Альтернативное определение молекулярной массы полученных олигомеров проводили с использованием данных масс-спектрометрии методом бомбардировки ускоренными атомами (FAB-MS).

При омылении фракций А и Б были получены продукты, идентифицированные как циклические димер (VI) и тример (VIII) соответственно. Их выходы составили 45 и 7%, считая на мономер (IV). Химические сдвиги  $^{31}\text{P}$ -ЯМР олигомеров (VI) и (VIII) ( $\delta_P = -0,40$  и  $-1,10$  соответственно) указывали на фосфодиэфирную природу остатков фосфорной кислоты.

\* Раствор соли использовали в качестве элюента вместо воды для снижения степени электростатического взаимодействия геля с фосфатными группами вещества.

Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д.,  $\text{D}_2\text{O}$ ) и некоторые КССВ ( $J_{\text{C},\text{P}}$  приведены в скобках, Гц) циклических и линейных олиго(маннозилфосфатов) (VI), (VIII) и (XI) + (XII) \*

Атом	(VI)	(VIII)	(XI) + (XII)	
			основная серия	минорные сигналы
C1	97,4д (6,7)	97,5д (4,5)	97,6д (4,1)	95,4 **
C2	71,4д (11,5)	71,8д (7,4)	71,7д (7,4)	
C3	71,0	70,9	71,1	70,7 **
C4	68,5	66,4	67,0; 67,1; 67,6	
C5	74,1д (9,0)	73,8д (8,0)	73,9ушир.	72,5ушир. **; 75,0 ***
C6	66,5д (~5)	65,2д (4,1)	65,5д; 65,8д; 66,2д (~4)	63,7ушир. **; 62,1 ***

\* Приведены сигналы спектра объединенной фракции линейных «пента-» и «гептамера» (XI) + (XII) (1:1). Для линейного «тримера» (X) был получен идентичный спектр, отличающийся только большей интенсивностью минорных сигналов.

\*\* Сигналы восстанавливающего, не замещенного по O1 остатка маннопиранозы.

\*\*\* Сигналы концевого, не замещенного по O6 остатка маннопиранозы.

Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (см. табл. 1 и 2) содержали лишь сигналы семи протонов и шести углеродных атомов остатков  $\alpha$ -D-маннопиранозы, соединенных (1-6)-фосфодиаэфирными связями, о чем свидетельствовало расщепление сигналов H1, H6, C1, C2, C5 и C6 на атоме фосфора. (1-6)-Циклический тип структур (VI) и (VIII) подтверждался отсутствием в их спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сигналов, характерных для не замещенных по O1 и O6 маннозных фрагментов, а также отсутствием сигналов фосфомоноэфирных групп в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. В качестве единственного продукта мягкого кислотного гидролиза обоих соединений был идентифицирован манноза-6-фосфат.

Размеры макроциклов (VI) и (VIII), определенные методом гель-хроматографии (рис. 1), были подтверждены значениями молекулярных масс, найденными из данных масс-спектров (см. табл. 3). Последние содержали характерные для метода FAB-MS сигналы молекулярного иона и ионов, от него производных [12].

Дебензоилирование фракции В давало смесь соединений, которая при анионообменной хроматографии в градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  была разделена на три перекрывающиеся зоны (см. рис. 2). Выделенные продукты заметно различались по времени удерживания при гель-хроматографии (рис. 1) и являлись наборами линейных олигомеров (X), (XI) и (XII) со средней степенью полимеризации ( $\overline{DP}$ ), равной 3, 5 и 7 соответственно. Выход соединений (X) и (XI) составил 6 и 5%, считая на мономер (IV). По данным масс-спектров (см. табл. 3) для них были определены величины  $M$ , подтверждавшие найденные значения  $\overline{DP}$ . Для «гептамера» (XII) (выход 5%) масс-спектр получен не был, что может быть объяснено низкой летучестью олиго(гликозилфосфатов) с большей молекулярной массой (ср. [13, 14]).

Линейное строение олигомеров (X)–(XII) подтверждалось данными спектров  $^{31}\text{P}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, в которых присутствовали минорные сигналы моноэфирной гликозилфосфатной группы ( $\delta_{\text{P}} \sim 1,9$ ) и атомов C5 и C6 концевого не замещенного по O6 маннозного звена ( $\delta_{\text{C}} 75,0$  и  $62,1$  соответственно). Основные сигналы в этих спектрах отвечали диаэфирному фосфату ( $\delta_{\text{P}} -1,05$ ) и углеродным атомам 1,6-дифосфорилированных остатков  $\alpha$ -D-маннопиранозы (см. табл. 2). Следует отметить, что атомы C4 и C6 были



Данные масс-спектров FAB (положительные ионы) циклических и линейных олиго(маннозилфосфатов) (VI), (VIII), (X) и (XI)

Соединение	$m/z$	Предполагаемая структура иона
(VI) $M_r$ 484 *	615 ср.	$[M + Gro + K]^+$
	599 »	$[M + Gro + Na]^+$
	545 »	$[M - H + Na + K]^+$
	523 сил.	$[M + K]^+$
	507 »	$[M + Na]^+$
	502 »	$[M + NH_4]^+$
	485 »	$[M + H]^+$
	(VIII) $M_r$ 726 *	815 ср.
793 сил.		$[M - 2H + 3Na]^+$
771 »		$[M - H + 2Na]^+$
749 ср.		$[M + Na]^+$
(X) $M_r$ 744 *		827 »
	811 сил.	$[M - 2H + 3Na]^+$
	805 »	$[M - H + Na + K]^+$
	789 »	$[M - H + 2Na]^+$
	767 »	$[M + Na]^+$
	745 ср.	$[M + H]^+$
	709 »	$[M - HPO_3 - H + 2Na]^+$
	687 »	$[M - HPO_3 + Na]^+$
	669 сил.	$[M - H_3PO_4 + Na]^+$
	(XI) $M_r$ 1228 *	1175 »
1153 »		$[M - H_3PO_4 + Na]^+$
1131 »		$[M - H_3PO_4 + H]^+$

\* Значения молекулярных масс вычислены для  $H^+$ -форм эфиров фосфорной кислоты.

представлены несколькими близко лежащими сигналами, что, по-видимому, было связано с их зависимостью от положения маннозных звеньев в цепи. В спектрах  $^1H$ -ЯМР присутствовал основной сигнал  $H_1$  маннозилфосфатных звеньев ( $\delta_H$  5,44 дд,  $J_{1,2}$  1,2 Гц,  $J_{1,r}$  7,5 Гц).

В то же время линейная фракция содержала небольшое количество цепей, структуры которых отличались от соединений (X)–(XII). Так, в спектрах ЯМР наблюдались сигналы минорных олигомеров, содержащих фосфомоноэфирную группу при  $O_6$  ( $\delta_r \sim 5,3$ ) и/или свободный гидроксил при  $C_1$  ( $\delta_{H_1}$  5,18 д,  $J_{1,2}$  1,2 Гц;  $\delta_c$  — см. табл. 2) терминальных маннозных звеньев. Подобные цепи могли образоваться при частичном расщеплении гликозилфосфатных связей в ходе реакций поликонденсации, окисления или дебензоилирования.

Помимо этого гидролиз линейных олигомеров привел к образованию наряду с манноза-6-фосфатом небольшого количества стабильного фосфодиаэфира, являвшегося, по-видимому, ди(манноза-6)фосфатом ( $\delta_r$  1,8; 7% от общего количества фосфора в соединениях (X)–(XII)). Такие (6-6')-фосфодиаэфирные фрагменты могут появляться в результате разрыва гликозилводородфосфонатных связей в растущей цепи при поликонденсации и реакции образовавшегося 6-водородфосфоната с молекулой (IV) или 6-ОН-концом другой цепи.

Суммируя полученные результаты, необходимо отметить, что основным продуктом реакции поликонденсации производного гликозилводородфосфоната (IV) оказался необычный (1-6)-связанный циклический димер маннозилфосфата (VI) (45%). Было выделено также небольшое количество (7%) циклического тримера (VIII). Фракция линейных олигомеров с длиной цепи от 3 до 7 звеньев была получена с выходом 16%.

## Экспериментальная часть

Физико-химические и хроматографические методы частично описаны в работе [15]. Масс-спектры ФАВ сняты на приборе MS-50 TC (Cratos, Великобритания). Для проведения анализа сухое вещество прибавляли к жидкой матрице (глицерин) и добавляли каплю воды для образования гомогенного раствора. После испарения растворителя приготовленную пробу помещали в ионный источник прибора и подвергали воздействию пучка ускоренных атомов ксенона с энергией 6–8 кэВ, получая вторично-эмиссионные спектры положительных ионов.

Системы для ТСХ и КХ: бензол – ацетон, 99 : 1 (А); бензол – этилацетат, 9 : 1 (Б); хлороформ – метанол, 8 : 2 (В); дихлорметан – метанол,

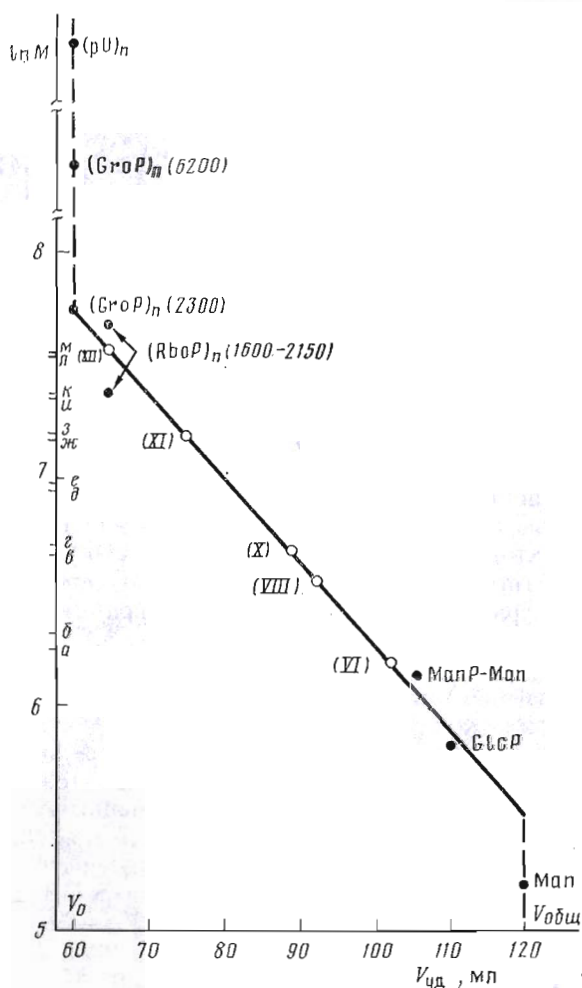


Рис. 1. Определение степени полимеризации олигомеров (VI), (VIII), (X)–(XII) методом гель-хроматографии на сефадексе G-25 с помощью калибровочной кривой, отражающей зависимость удерживаемых объемов от логарифма молекулярной массы исследуемых соединений. Для построения калибровочной кривой использован набор соединений-стандартов (отмечены черными кружками), характеристики которых приведены в «Экспер. части». На оси ординат отмечены вычисленные величины  $\lg M$  для линейных и циклических олигомеров маннопиранозилфосфата (аммониевые соли), соответствующие циклическим и линейным димерам (а и б соответственно), тримерам (в и г), тетрамерам (д и е), пентамерам (ж и з), гексамерам (и и к) и гептамерам (л и м)

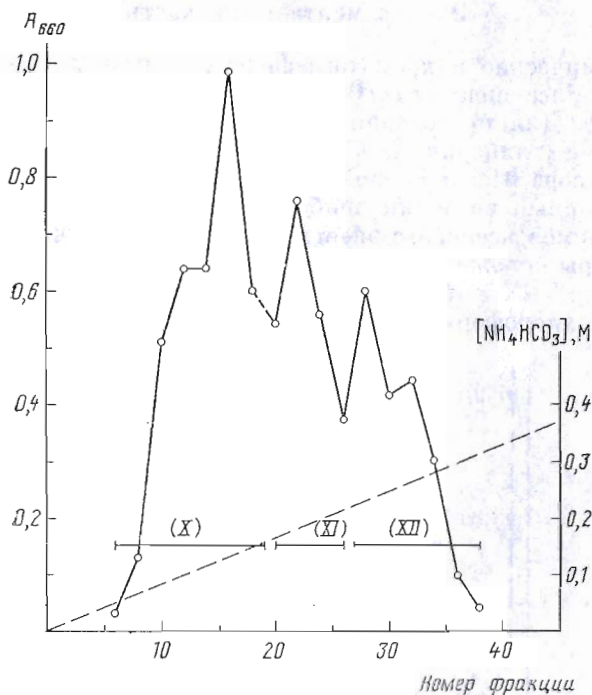


Рис. 2. Ионнообменное фракционирование смеси линейных олигомеров (X)–(XII) на фрактогеле DEAE TSK ( $\text{HCO}_3^-$ ) в линейном градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . По оси ординат отмечено оптическое поглощение при 660 нм, пропорциональное содержанию фосфора во фракциях. Объем фракции 7 мл

85 : 15 (Г). Соединения (VI), (VIII), (X)–(XII), а также продукты кислотного гидролиза выделяли ионнообменной хроматографией на колонке (1×18 см) с фрактогелем TSK DEAE-650 (S) ( $\text{HCO}_3^-$ , Merck) в линейном градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  от 0 до 0,5 М (скорость элюирования 1 мл/мин, объем фракций 7 мл), определяя во фракциях содержание фосфора по методу [16].

Гель-хроматографию проводили на колонке (1,5×64 см;  $V_0=60$  мл,  $V_{\text{общ}}=120$  мл) с сефадексом G-25 (Pharmacia) в 0,5 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1 мл/мин) при рефрактометрическом детектировании. Для построения калибровочного графика (рис. 1) были использованы следующие соединения с известной молекулярной массой: полиуридиловая кислота,  $\text{K}^+$ -соль,  $M_r \sim 315\,000$  ( $V_{\text{уд}}=60$  мл); частично гликозилированная глицеринтейхоевая кислота из *Streptomyces rutgersensis* var. *castelarensis* ВКМ Ас-238,  $M_r \sim 6200$  [17] ( $V_{\text{уд}}=60$  мл); глицеринтейхоевая кислота из *St. levoris* К-3053,  $M_r \sim 2300$  [18] ( $V_{\text{уд}}=60$  мл); частично гликозилированная рибиттейхоевая кислота из *St. azureus* RIA 1009,  $M_r \sim 1600-2150$  [19] ( $V_{\text{уд}}=64$  мл); метил-6- $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфо- $\alpha$ -D-маннопиранозид,  $\text{Na}^+$ -соль,  $M_r$  458 [15] ( $V_{\text{уд}}=106$  мл);  $\alpha$ -D-глюкопиранозилфосфат, ди- $\text{K}^+$ -соль,  $M_r$  336 ( $V_{\text{уд}}=110$  мл); D-манноза,  $M_r$  180 ( $V_{\text{уд}}=120$  мл).

Электрофорез выполняли на приборе ПВЭФ-1 при градиенте напряжения 10 В/см в 0,05 М триэтиламмонийбикарбонате (ТЕАВ, pH 7,5) на бумаге Filtrak FN-16, обнаруживая фосфаты реагентом [20]. Приготовление пиридина — см. [15].

1,2,3,4-Тетра-О-бензоил-6-О-*n,n'*-диметокситригил- $\alpha$ -(I $\alpha$ ) и - $\beta$ -D-маннопираноза (I $\beta$ ). Раствор 0,72 г (4 ммоль) D-маннозы и 1,44 г (4,25 ммоль) ди(*n*-анизил)фенилхлорметана в 13 мл пиридина выдерживали 18 ч при 20° С. При охлаждении (3° С) прибавляли 2,7 мл (23,3 ммоль) бензоил-



хлорида. Смесь перемешивали 20 ч при 20° С, выливали в воду со льдом, выпавший маслообразный осадок растворяли в  $\text{CHCl}_3$ , промывали ледяным насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, высушивали  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Из остатка двукратной КХ на  $\text{SiO}_2$  в бензоле с этилацетатом (0 → 7%  $\text{EtOAc}$ ) и в системе А выделили 2,9 г соединения (I $\alpha$ ) (81%, аморфный),  $[\alpha]_D^{29} -58,6^\circ$  (с 1, хлороформ),  $R_f$  0,20 (А), 0,65 (В); спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 3,20 (дд, 1H, H6a,  $J_{5,6a}$  3,3,  $J_{6a,6b}$  10,5), 3,52 (дд, 1H, H6b,  $J_{5,6b}$  2,0), 3,65 и 3,66 (2с, 6H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4,34 (ддд, 1H, H5), 5,92 (дд, 1H, H2,  $J_{2,3}$  3,0), 5,94 (дд, 1H, H3), 6,40 (т, 1H, H4,  $J_{3,4}=J_{4,5}=9,9$ ), 6,62 и 6,65 (2д, 4H, *o*-протоны  $\text{C}_6\text{H}_4$ -групп,  $J$  8,8), 6,72 (д, 1H, H1,  $J_{1,2}$  1,5), 7,07–8,28 (м, 29H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ , *m*-протоны  $\text{C}_6\text{H}_4$ -групп), спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 55,1 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 61,45 (C6), 66,4 (C4), 70,0 (C3), 70,8 (C2), 72,9 (C5), 86,1 ( $\text{Ar}_3\text{C}$ ), 91,8 (C1,  $^1J_{\text{C,H}}$  175,8), 113,1, 126,6–130,2, 133,1–136,0, 144,8, 158,4, ( $\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 165,0, 165,5, 165,8 (COO); а также 0,42 г соединения (I $\beta$ ) (12%, аморфный),  $[\alpha]_D^{30} -73,5^\circ$  (с 2, хлороформ),  $R_f$  0,15 (А), 0,60 (В); спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 3,29 (дд, 1H, H6a,  $J_{5,6a}$  3,5,  $J_{6a,6b}$  10,5), 3,60 (дд, 1H, H6b,  $J_{5,6b}$  2,0), 3,68 и 3,81 (2с, 6H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4,06 (ддд, 1H, H5), 5,68 (дд, 1H, H3), 6,11 (д, 1H, H2,  $J_{2,3}$  3,1), 6,28 (т, 1H, H4,  $J_{3,4}=J_{4,5}=10,0$ ), 6,39 (с, 1H, H1), 6,65 и 6,85 (2д, 4H, *o*-протоны  $\text{C}_6\text{H}_4$ -групп,  $J$  8,8), 7,10–8,28 (м, 29H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ , *m*-протоны  $\text{C}_6\text{H}_4$ -групп); спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 55,1 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 61,85 (C6), 66,5 (C4), 69,7 (C2), 72,1 (C3), 75,0 (C5), 86,2 ( $\text{Ar}_3\text{C}$ ), 91,5 (C1), 113,0, 126,6–130,15, 133,1–136,0, 144,9, 158,3 ( $\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 164,0, 164,9, 165,9 (COO). Найдено, %: для (I $\alpha$ ) С 73,38, Н 5,27; для (I $\beta$ ) С 73,53, Н 5,45.  $\text{C}_{55}\text{H}_{46}\text{O}_{12}$ . Вычислено, %: С 73,48, Н 5,16.

2,3,4-Три-*O*-бензоил-6-*O*-*n,n'*-диметокситригил- $\alpha$ -*D*-маннопираноза (II). К раствору 940 мг (1,05 ммоль) тетрабензоата (I $\alpha$ ) в 10 мл  $\text{CH}_3\text{CN}$  при охлаждении ( $-20^\circ\text{C}$ ) прибавляли 0,28 мл (4,23 ммоль) диметиламина. Реакционную смесь выдерживали при 20° С, через 18 ч дополнительно прибавили 0,1 мл диметиламина. Через 24 ч после начала (контроль методом ТСХ в системе В) раствор упаривали досуха, от остатка отгоняли ацетонитрил. Методом КХ в бензоле с ацетоном (97 : 3) выделили 580 мг соединения (II) (70%, аморфный),  $[\alpha]_D^{26} -121,6^\circ$  (с 1, хлороформ),  $R_f$  0,30 (В). Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 3,26 (дд, 1H, H6a,  $J_{5,6a}$  4,0,  $J_{6a,6b}$  10,5), 3,38 (д, 1H, OH,  $J_{1,\text{OH}}$  2,0), 3,46 (дд, 1H, H6b,  $J_{5,6b}$  2,0), 3,69 (с, 6H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4,47 (ддд, 1H, H5), 5,57 (дд, 1H, H1,  $J_{1,2}$  1,8), 5,76 (дд, 1H, H2,  $J_{2,3}$  3,1), 5,89 (дд, 1H, H3), 6,22 (т, 1H, H4,  $J_{3,4}=J_{4,5}=10,2$ ), 6,66 и 6,68 (2д, 4H, *o*-протоны  $\text{C}_6\text{H}_4$ -групп,  $J$  9,0), 7,09–8,25 (м, 24H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ , *m*-протоны  $\text{C}_6\text{H}_4$ -групп). Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 55,2 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 61,9 (C6), 67,0 (C4), 70,5 (C3+C5), 71,3 (C2), 86,1 ( $\text{Ar}_3\text{C}$ ), 92,6 (C1,  $^1J_{\text{C,H}}$  173,3), 113,1, 126,7–130,2, 133,1–136,2, 144,9, 158,4 ( $\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 165,2, 165,8, 166,2 (COO). Найдено, %: С 72,43, Н 5,60.  $\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{O}_{11}$ . Вычислено, %: С 72,53, Н 5,33.

2,3,4-Три-*O*-бензоил- $\alpha$ -*D*-маннопиранозилводородфосфонат, триэтиламмониевая соль (IV). а) К раствору 975 мг (14,3 ммоль) имидазола в 25 мл  $\text{CH}_3\text{CN}$  при перемешивании и охлаждении ледяной водой прибавляли 0,38 мл (4,33 ммоль)  $\text{PCl}_3$  и 2,1 мл (15,1 ммоль)  $\text{Et}_3\text{N}$ ; через 15 мин прибавляли по каплям раствор 790 мг (0,98 ммоль) соединения (II) в 25 мл ацетонитрила в течение 30 мин. Охлаждение прекращали, к смеси через 5 мин при 20° С прибавляли 7 мл 1 М ТЕАВ (рН 8). Раствор перемешивали 15 мин, упаривали, от полученного сиропа отгоняли смесь пиридин –  $\text{Et}_3\text{N}$  (4 : 1, 10 мл). Остаток растворяли в  $\text{CHCl}_3$  (100 мл), промывали охлажденным 0,5 М ТЕАВ (4×40 мл), высушивали  $\text{MgSO}_4$  и упаривали досуха. Полученный продукт (III) (950 мг,  $R_f$  0 (В), 0,43 (В)) растворяли в 40 мл дихлорметана и обрабатывали охлажденным 4% раствором дихлоруксусной кислоты в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 мл) в течение 45 с при 0° С. Затем смесь промывали ледяным 1 М ТЕАВ (3×30 мл), высушивали и



упаривали. Из остатка методом КХ в дихлорметане (содержащем 2% Et<sub>3</sub>N) с метанолом (7→14% MeOH) выделили 450 мг Н-фосфоната (IV) (70%, аморфный),  $[\alpha]_D^{30} -109,7^\circ$  (с 1, хлороформ),  $R_f$  0,35 (B), 0,50 (Г). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 1,33 (т, 9H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, J 7,1), 3,03 (к, 6H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3,76 (дд, 1H, H6a, J<sub>5,6a</sub> 4,5, J<sub>6a,6b</sub> 12,4), 3,83 (дд, 1H, H6b, J<sub>5,6b</sub> 2,5), 4,46 (ддд, 1H, H5), 5,73 (дд, 1H, H2, J<sub>2,3</sub> 3,3), 5,83 (т, 1H, H4, J<sub>3,4</sub> = J<sub>4,5</sub> = 10,0), 5,86 (дд, 1H, H1, J<sub>1,2</sub> 1,9, J<sub>1,р</sub> 8,3), 6,04 (дд, 1H, H3), 7,10 (д, 1H, НР, J<sub>Н,р</sub> 639,7), 7,20–8,10 (м, 15H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 8,9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 45,8 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 61,6 (C6), 67,4 (C4), 69,9 (C3), 71,1 (д, C2, J<sub>с,р</sub> 7,5), 72,1 (C5), 92,9 (д, C1, J<sub>с,р</sub> 4,9, <sup>1</sup>J<sub>с,н</sub> 170,9), 128,3–130,0, 133,2–133,6 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 165,55, 166,2 (COO). Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 1,63 (<sup>1</sup>J<sub>р,н</sub> 639,7).

б) Раствор 100 мг Н-фосфоната (III) (см. «а», ~0,4 ммоль) и 50 мг (0,28 ммоль) перхлората пиридиния в 3 мл смеси нитрометан – MeOH (2 : 1) выдерживали 3–4 ч при 20° С (ТСХ-контроль в системе В). Реакцию останавливали прибавлением 0,1 мл пиридина, смесь упаривали. Остаток растворяли в CHCl<sub>3</sub>, промывали 0,5 М ТЕАВ, высушивали и упаривали. Выделили (см. «а») 46 мг соединения (IV) (~70%).

*Поликонденсация.* 400 мг (0,61 ммоль) Н-фосфоната (IV) высушивали отгонкой с пиридином (3×3 мл), растворяли в 6 мл пиридина и при перемешивании прибавляли 0,19 мл (1,5 ммоль) триметилацетилхлорида; через 20 мин при 20° С прибавляли 0,43 мл (3 ммоль) Et<sub>3</sub>N и раствор 630 мг (2,44 ммоль) иода в 6 мл смеси пиридин – вода (98 : 2). Через 15 мин раствор разбавляли хлороформом (100 мл), промывали 1 М Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (2×50 мл), 1 М ТЕАВ (3×50 мл), высушивали и упаривали. Из остатка двукратной КХ на SiO<sub>2</sub> в дихлорметане (содержащем 1% Et<sub>3</sub>N) с метанолом (0→20% MeOH) выделили фракции А (200 мг, 50%), Б (61 мг, 15%) и В (85 мг, 21%).

Фракция А – *цикло-(1-6)-ди(2,3,4-три-О-бензоил-α-D-маннопиранозилфосфат)* (V), аморфный  $[\alpha]_D^{27} -145,4^\circ$  (с 1, хлороформ),  $R_f$  0,37 (Г); спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 1,18 (т, 9H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2,85 (к, 6H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 4,22–4,32 (м, 2H, H6a, H6b), 4,77 (ддд, 1H, H5, J<sub>5,6a</sub> 7,1, J<sub>5,6b</sub> 3,6), 5,68 (дд, 1H, H2, J<sub>2,3</sub> 3,4), 5,69 (т, 1H, H4, J<sub>3,4</sub> = J<sub>4,5</sub> = 10,0), 5,85 (дд, 1H, H1, J<sub>1,2</sub> 1,8, J<sub>1,р</sub> 6,9), 5,92 (дд, 1H, H3), 7,20–8,10 (м, 15H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 8,5 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 45,5 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 65,4 (д, C6, J<sub>с,р</sub> 4,9), 68,2 (C4), 70,15 (C3), 70,8 (д, C2+C5, J<sub>с,р</sub> ~11), 93,9 (д, C1, J<sub>с,р</sub> 4,9), 128,15–129,8, 132,9–133,3 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 165,2, 165,3, 165,7 (COO); спектр <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): –2,08.

Фракция Б – *цикло-(1-6)-три(2,3,4-три-О-бензоил-α-D-маннопиранозилфосфат)* (VII), сироп,  $R_f$  0,18 (Г); спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 8,7 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 45,7 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 64,2 (д, C6, J<sub>с,р</sub> ~5), 66,9 (C4), 70,8 (д, C2+C3, J<sub>с2,р</sub> ~7), 71,2 (д, C5, J<sub>с,р</sub> 9,3), 94,2 (ушир., C1), 128,2–130,2, 132,9–133,3 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 165,4, 165,45, 165,5 (COO); спектр <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): –3,48.

Фракция В – набор линейных (1-6)-олиго(2,3,4-три-О-бензоил-α-D-маннопиранозилфосфатов) (IX), сироп,  $R_f$  ~0 (Г); спектр <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): –3,85, –3,19 (основной сигнал), –2,80, –2,37, –2,18, –1,55, –0,98, 0, 0,31.

*Цикло-(1-6)-ди(α-D-маннопиранозилфосфат), аммониевая соль* (VI). К раствору 50 мг фракции А (см. поликонденсацию) в 10 мл смеси метанол – 1,4-диоксан (1 : 1) прибавляли 1 мл 1 М MeONa в MeOH. Смесь выдерживали 30 мин при 20° С, обрабатывали последовательно катионитами Dowex-50(H<sup>+</sup>) и Dowex-50(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), фильтровали, фильтрат разбавляли водой до 50 мл, экстрагировали эфиром и упаривали. Из остатка ионообменной хроматографией выделили 18 мг соединения (VI) (45% на мономер (IV); аморфный),  $[\alpha]_D^{28} +34,5^\circ$  (с 0,62, вода), при гель-хроматографии V<sub>уд</sub> = 102 мл. Спектры <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР – см. табл. 1 и 2. Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР (D<sub>2</sub>O): –0,40. Данные масс-спектра – см. табл. 3.

Цикло-(1,6)-три( $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфат), аммониевая соль (VIII). Фракцию Б (61 мг, см. поликонденсацию) дебензоилировали как описано в синтезе соединения (VI). Ионообменной хроматографией выделили 11 мг соединения (VIII) (7% на мономер (IV); аморфный,  $[\alpha]_D^{28} +17,8^\circ$  (с 1, вода), при гель-хроматографии  $V_{уд}=92$  мл. Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР — см. табл. 1 и 2. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $-1,10$ . Данные масс-спектра — см. табл. 3.

Линейные (1-6)-олиго( $\alpha$ -D-маннопиранозилфосфаты), аммониевые соли (X)–(XII). Фракцию В (85 мг, см. поликонденсацию) дебензоилировали как описано в синтезе соединения (VI). Ионообменной хроматографией (рис. 2) выделили соединения (X)–(XII), являющиеся смесями линейных олигомеров со средней степенью полимеризации 3, 5 и 7 соответственно.

«Тример» (X): 9,5 мг (6% на мономер (IV); аморфный), при гель-хроматографии  $V_{уд}=88$  мл; данные  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5,18 (д,  $J_{1,2}$  1,2, минорный сигнал), 5,44 (дд,  $J_{1,2}$  1,2,  $J_{1,\text{P}}$  7,5, основной сигнал); спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $-1,05, 1,92, 5,53$  (6 : 1 : 1).

«Пентамер» (XI): 8 мг (5% на мономер (IV); аморфный), при гель-хроматографии  $V_{уд}=75$  мл; спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР идентичен спектру соединения (X); спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $-4,05, 1,82$  (5 : 1).

«Гептамер» (XII): 8 мг (5% на мономер (IV); аморфный), при гель-хроматографии  $V_{уд}=64$  мл; спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР идентичен спектру соединения (X); спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $-1,14, 1,86, 5,10$  (12 : 2 : 1).

Смесь (XI)–(XII) (1 : 1):  $[\alpha]_D^{28} +34,8^\circ$  (с 0,69, вода). Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР — см. табл. 2. Данные масс-спектров — см. табл. 3.

Кислотный гидролиз олигомеров (VI), (VIII), (X)–(XII). Образец олигомера (~1 мг) обрабатывали 1 мл 0,1 М HCl (15 мин,  $100^\circ\text{C}$ ), раствор упаривали досуха, к остатку добавляли и отгоняли воду ( $3\times 1$  мл). Продукты анализировали методом электрофореза. При гидролизе циклических димера (VI) и тримера (VIII) обнаружили только манноза-6-фосфат ( $E_{\text{G1CP}}$  0,95). Гидролиз каждого из линейных соединений (X)–(XII) приводил к манноза-6-фосфату (основной продукт) и ди(манноза-6)фосфату (минорный продукт).

10,5 мг (40 мкмоль фосфора [16]) смеси (X)+(XI)+(XII) (1 : 1 : 1) гидролизовали 3 мл 0,1 М HCl как описано выше. Ионообменной хроматографией выделили 2,7 мкмоль (7%) ди(манноза-6)фосфата ( $E_{\text{G1CP}}$  0,49; спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,76), а также 31,3 мкмоль (78%) манноза-6-фосфата,  $E_{\text{G1CP}}$  0,95; спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3,59 (м, 1H, H5), 3,66 (т, 1H, H4,  $J_{3,4}=J_{4,5}=9,2$ ), 3,75 (дд, 1H, H3), 3,82 (дд, 1H, H2,  $J_{2,3}$  3,0), 3,94 (м, 2H, H6a, H6b), 5,07 (д, 1H, H1,  $J_{1,2}$  1,3); спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 2,64 (pD 5–6, моноанион); 5,26 (pD 9–10, дианион).

Авторы благодарят И. Б. Наумову и Г. М. Стрешинскую (МГУ) за любезно предоставленные образцы теихоевых кислот, а также А. С. Пашкова (ИОХ АН СССР) за съемку и помощь в интерпретации спектров  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаев А. В., Иванова И. А., Шibaев В. Н. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 126–141.
2. Kenne L., Lindberg B. // The Polysaccharides. V. 2./Ed. Aspinnall G. O. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 287–363.
3. Николаев А. В., Иванова И. А., Шibaев В. Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 12. С. 1696–1699.
4. Nikolaev A. V., Ivanova I. A., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1990. V. 204. № 1. P. 65–78.
5. Николаев А. В., Уткина Н. С., Шibaев В. Н., Игнатенко А. В., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 555–557.
6. Nikolaev A. V., Utkina N. S., Shibaev V. N., Ignatenko A. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1989. V. 187. P. c1–c5.



7. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Байрамова Н. Э., Николаев А. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 3. С. 652–656.
8. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg P. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 3. P. 655–662.
9. Николаев А. В., Иванова И. А., Шибает В. Н., Игнатенко А. В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 11. С. 1550–1561.
10. Бельский Б. Г., Виленчик Л. З. Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978. С. 192–199.
11. Нефедов П. П., Лавренко П. Н. Транспортные методы в аналитической химии полимеров. Л.: Химия, 1979. С. 128–129.
12. Dell A. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1987. V. 45. P. 19–72.
13. Hoogerhout P., Funke C. W., Mellema J.-R., Wagenaars G. N., van Boeckel C. A. A., Evanberg D., Poolman J. T., Lefeber A. W. M., van der Marel G. A., van Boom J. H. // J. Carbohydr. Chem. 1988. V. 7. № 2. P. 399–416.
14. Elie C. J. J., Muntendam H. J., van den Elst H., van der Marel G. A., Hoogerhout P., van Boom J. H. // Recueil trav. chim. Pays-Bas. 1989. V. 108. № 6. P. 219–223.
15. Николаев А. В., Рябцева Е. В., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 12. С. 1649–1659.
16. Hess H. H., Derr J. E. // Anal. Biochem. 1975. V. 63. P. 607–613.
17. Тульская Е. М., Вылегжанина Е. С., Стрешинская Г. М., Шашков А. С., Наумова И. Б. // Биохимия. 1989. Т. 54. № 4. С. 531–536.
18. Вылегжанина Е. С., Дмитриева Н. Ф., Полин А. Н., Наумова И. Б., Епишин Ю. Н., Крупенина Л. В., Огарков В. И., Оксман Т. М. // Антибиотики. 1986. Т. 31. № 8. С. 584–587.
19. Стрешинская Г. М., Наумова И. Б., Романов В. В., Шашков А. С. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 9. С. 1409–1418.
20. Hanes C. S., Isherwood F. A. // Nature. 1949. V. 164. № 4183. P. 1107–1109.

Поступила в редакцию  
20.VI.1991

A. V. NIKOLAEV, N. S. UTKINA, V. N. SHIBAEV, A. V. IGNATENKO,  
B. V. ROZYNOV\*

FRAGMENTS OF BIOPOLYMERS CONTAINING GLYCOSYL PHOSPHATE  
RESIDUES. 10. SYNTHESIS OF CYCLIC AND LINEAR  
OLIGO (MANNOSYL PHOSPHATES) VIA POLYCONDENSATION OF  
MANNOSYL HYDROGENPHOSFONATE DERIVATIVE

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Moscow;*

\* *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Moscow*

Synthesis of the title compounds was performed through the polycondensation reaction of 2,3,4-tri-O-benzoyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl H-phosphonate in the presence of trimethylacetyl chloride followed by oxidation and debenzoylation. Unusual cyclo(1-6)di( $\alpha$ -D-mannopyranosyl phosphate) was obtained as the main product (45%). Previously inaccessible cyclic trimer (7%) and fraction of linear (1-6)oligo( $\alpha$ -D-mannopyranosyl phosphates) (d. p. = 3–7, 16%) were also isolated. Gel filtration on Sephadex G-25 column and FAB mass-spectrometry were used for determination of the d. p. of both cyclic and linear oligomers. The data of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{31}\text{P}$  NMR spectra are discussed.