



УДК 547.455.6'118.057

© 1992 г. А. В. Николаев, И. А. Иванова, В. Н. Шубаев

ФРАГМЕНТЫ БИОПОЛИМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ
ГЛИКОЗИЛФОСФАТОВ11 *. СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ПЕНТА(α -D-МАННОПИРАНОЗИЛ)-
ТЕТРАФОСФАТА — ЛИНЕЙНОГО ФРАГМЕНТА ДРОЖЖЕВОГО
ФОСФОМАННАНА *HANSENULA CAPSULATA* Y-1842

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

Синтезирован метил-6-[(1-6)-тетра(α -D-маннопиранозилфосфо)]- α -D-маннопиранозид — линейный фрагмент основной цепи фосфоманнана дрожжей *Hansenula capsulata* Y-1842. Синтез осуществлен путем ступенчатого наращивания цепи с использованием гликозилводородфосфонатов для создания фосфодиэфирных связей. Метил-2,3,4-три-О-ацетил- α -D-маннопиранозид применяли в качестве первого акцептора, фиксирующего цепь с восстанавливающего конца. Цикл наращивания включал в себя конденсацию 2,3,4-три-О-бензоил-6-О-диметокситригил- α -D-маннопиранозил-Н-фосфоната и спиртового компонента в присутствии Me_2CSOCl с последующим окислением и детритилированием. На заключительном этапе использовали 2,3,4,6-тетра-О-бензоил- α -D-маннопиранозил-Н-фосфонат. Целевой продукт получали дезацелированием защищенного пентамера с общим выходом 30%. Приведены данные спектров ЯМР синтезированных олигомеров.

Исследования последних лет показали [2–6], что водородфосфонатный метод является наиболее эффективным способом синтеза гликозилфосфосахаров — фосфодиэфирных фрагментов дрожжевых и бактериальных поли(гликозилфосфатов) [7]. Он выгодно отличается от фосфатного диэфирного и фосфитного триэфирного методов [8] простотой синтеза фосфорсодержащего компонента (производного гликозил-Н-фосфоната), быстротой протекания реакций конденсации и окисления и высокими выходами на стадиях конденсации, окисления и удаления защитных групп. В работе [1] сообщалось об исследовании реакции поликонденсации частично защищенного производного маннозилводородфосфоната как о возможном подходе к получению олиго(гликозилфосфатов). В настоящей публикации мы сообщаем об использовании для этой цели метода ступенчатого наращивания цепи.

Исследование выполняли на примере синтеза линейного (1-6)-связанного тетра(α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозида (I) (схема 1). Этот олигомер является фрагментом основной цепи внеклеточного фосфоманнана дрожжей *Hansenula capsulata* Y-1842, имеющего структуру (1-6)-поли[2-(β -D-маннопиранозил)- α -D-маннопиранозилфосфата] [9]. О синтезе фосфодиэфирного фрагмента этого полимера сообщалось ранее [3]. Часть описываемого материала была опубликована в предварительном сообщении [10].

Применение Н-фосфонатного метода при наращивании (1-6)-связанной цепи предполагало использование в качестве ключевого синтона производного маннозил-Н-фосфоната, содержащего временную защитную группу при О6. Таким соединением являлся 6-диметокситригилловый

* Сообщение 10 — см. [1].

эфир (III), который получали из 1-ОН-производного (II) [1] действием тримидазолидофосфита [11, 3-6] с последующим выделением продукта хроматографией на SiO_2 (94%). Моногидроксильное производное (V) [12] использовали в качестве первого акцептора, фиксирующего восстанавливающий конец цепи. На заключительном этапе синтеза олигомера (I) применяли ранее описанный маннозил-Н-фосфонат (IV) [4].

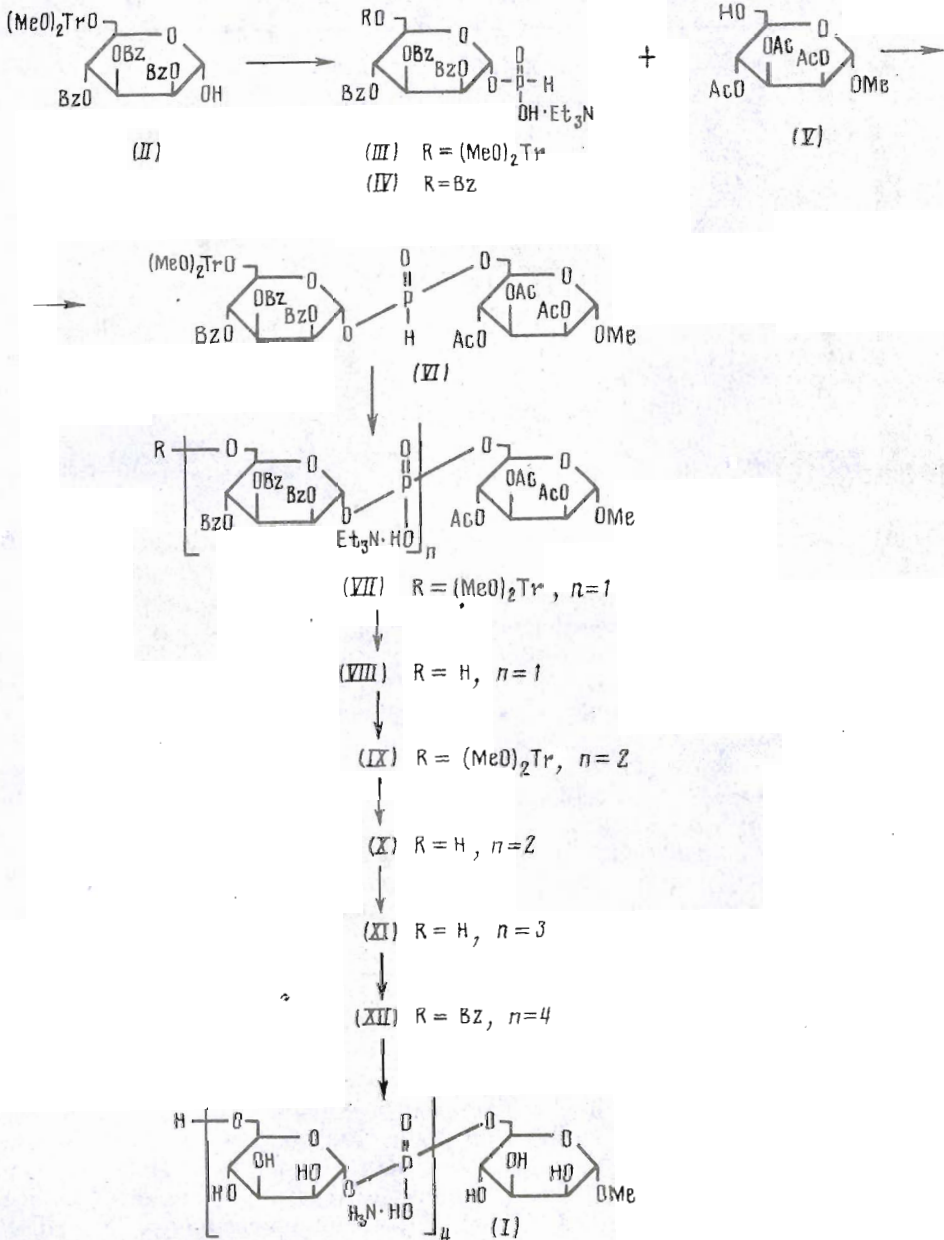
Теоретически возможными являются два варианта ступенчатого наращивания олигомерной цепи с использованием водородфосфонатов. Один из них, широко применяющийся в ступенчатом синтезе олигонуклеотидов [13-15], предусматривает проведение заданного количества синтетических циклов с последующим окислением всех диэфирных Н-фосфонатных групп одновременно после выполнения последней конденсации. Однако ранее мы показали [3], что углеводные диэфиры, в которых остаток водородфосфоновой кислоты связан с одним из моносахаридных звеньев через полуацетальный гидроксил, являются существенно более лабильными соединениями по сравнению с динуклеозид-Н-фосфонатами. Такие производные могут расщепляться по гликозил-Н-фосфонатной связи при хроматографическом выделении на SiO_2 или кислотном удалении диметокситритильной защитной группы.

Действительно, попытка проведения конденсации производных (III) и (V) в стандартных условиях (Me_3CCOCl в пиридине [2-6]) и последующего детритилирования (2% CHCl_2COOH в CH_2Cl_2 , 0° C) образовавшегося диэфира (VI) привела к появлению сложной смеси продуктов. Методом ТСХ в качестве основных соединений были идентифицированы 2,3,4-три-О-бензоил-*D*-манноза (продукт расщепления) и, неожиданно, фосфодиэфиры (VII) и (VIII) (см. «Экспериментальную часть», синтез соединения (VIII), «б»). Последние, по-видимому, образовались из производного (VI) в результате реакций частичного детритилирования и окисления Н-фосфонодиэфиров под действием диметокситрилий-катиона. После окисления смеси иодом и повторного детритилирования фосфодиэфир (VIII) был выделен с выходом только 34%. В то же время выполнение стадии детритилирования (1% TFA/ CH_2Cl_2) после окисления продукта конденсации (VI) до фосфодиэфира (VII) ($\text{I}_2/\text{Py}-\text{H}_2\text{O}$) позволило получить соединение (VIII) с выходом 90%.

Второй вариант ступенчатого наращивания предполагает проведение окисления после каждой стадии водородфосфонатной конденсации. Достаточно высокая стабильность образующихся гликозилфосфоэфиров дает возможность осуществлять их избирательное деблокирование и хроматографическое выделение. Практическая реализация такого подхода требовала в первую очередь выяснений возможности использования моногидроксильного производного (VIII), содержащего фосфатную диэфирную группу, в качестве спиртового компонента в реакции с гликозил-Н-фосфонатами.

Конденсацию Н-фосфоната (III) и фосфодиэфирного блока (VIII) выполняли в пиридине в присутствии 2,5 экв. Me_3CCOCl . Анализ реакционной смеси методом ТСХ через 4 мин показал образование единственного диметокситриликсодержащего олигомерного продукта (см. «Экспериментальную часть»), и далее картина не изменялась. После окисления и хроматографии на SiO_2 было получено соединение, содержавшее, по данным спектров ^{31}P - и ^1H -ЯМР, две фосфатные диэфирные группировки (δ_{P} - 2,68, -2,92 (1:1)) и три маннопиранозных звена (δ_{H} 4,69д, δ_{H} и δ_{H} ~5,81м). Спектр ^1H -ЯМР в целом подтверждал структуру производного триманнозилдифосфата (IX), выход которого составил 78%.

Полученный результат свидетельствовал о том, что наличие в составе спиртового компонента (VIII) фосфодиэфирной группы не приводит к образованию заметных количеств продуктов ее взаимодействия с фос-



фонатом (III) (например, смешанного ангидрида (XV) — см. схему 2). С высоким выходом был выделен только продукт конденсации по гидроксильной группе — тример (IX). Таким образом, дальнейшее наращивание цепи с помощью описанной последовательности реакций представлялось возможным.

Ранее мы показали [16], что смешанные ангидриды типа (XIII) (схема 2) являются основными интермедиатами в синтезе гликозилфосфа-

Химические сдвиги ^{13}C -ЯМР (6, D_2O) и некоторые КССВ ($J_{\text{C}, \text{P}}$ приведены в скобках, Гц) пентаманнозилтетрафосфата (I) и метил-6- α -D-маннопиранозилфосфо- α -D-маннопиранозида (XVII) [3]

Атом	(I)	(XVII) *	Атом	(I)	(XVII) *
C1	102,3	102,1	C1''''	97,7 ушпр.	
C2	71,2	71,1	C2''''	71,9д (6,4)	
C3	71,8	71,8	C3''''	71,3	
C4	67,8	67,7	C4''''	67,8	
C5	72,8д (7,5)	72,7д (7,3)	C5''''	75,2	
C6	66,3д (4,9)	66,0д (4,9)	C6''''	62,2	
C'-C1'''	97,7 ушпр.	97,4д (4,9)	CH ₃	56,3	56,0
C2'-C2'''	71,9д (6,4)	71,8д (7,3)			
C3'-C3'''	71,3	71,1			
C4'-C4'''	67,3	67,7			
C5'-C5'''	74,0д (6,5)	75,0			
C6'-C6'''	66,0 ушпр.	62,1			

* Отнесение сигналов C2 и C3 в спектре фосфодиэфира (XVII) в данной работе обратное по сравнению с [3, 18]. Исправление сделано в соответствии с данными селективного гетероядерного резонанса.

харов из гликозилводородфосфонатов в присутствии Me_3CCOCl . На основании известных данных о механизме синтеза фосфодиэфиров водородфосфонатным [17] методом можно предположить, что взаимодействие активированного производного (XIII) с фосфодиэфирной группой соединения (VIII), приводящее к смешанному ангидриду (XV), является обратимым процессом. В то же время реакция с гидроксильной группой протекает необратимо с образованием линейного олигомера (XIV), который был зафиксирован методом ТСХ и далее окислен до дифосфата (IX). Расщепление ангидрида (XV), очевидно, может протекать также при участии пиридина, как нуклеофильного катализатора, с образованием активированного интермедиата (XVI).

Дальнейшее наращивание цепи проводили по отработанной выше схеме. Предварительно моногидроксильный трисахаридный блок (X) (схема 1) получали из соединения (IX) обработкой 1% TFA в дихлорметане при 0°С с выходом 97%.

Синтез линейного тетраманнозилтрифосфатного производного (XI) включал в себя конденсацию соединений (III) и (X) с последующим окислением и детригилированием в стандартных условиях. Выход тетрасахаридного блока (XI) составил 71%. На заключительной стадии была выполнена его конденсация с бензоилированным маннозил-Н-фосфонатом (IV). После окисления О-ацелированное пентаманнозное производное (XII) было выделено с выходом 72%. Дезацелирование проводили действием 0,1 М раствора MeONa в метаноле с диоксаном. Целевой пентаманнозилтетрафосфат (I) выделяли ионообменной хроматографией на фрактогеле TSK DEAE (HCO_3^-) в линейном градиенте NH_4HCO_3 с выходом 88%. Суммарный выход продукта (I) составил 30%, считая на акцентор (V).

Строение полученных соединений подтверждалось данными спектроскопии ^{31}P -, ^{13}C - и ^1H -ЯМР (см. «Экспериментальную часть» и таблицу). Сигналы ^{31}P -ЯМР олиго(гликозилфосфатов) (VIII)–(XII) находились в области, характерной для положений резонанса диэфиров фосфорной кислоты данной природы [1–6, 16, 18]. В спектрах защищенных ди- и трифосфатного олигомеров (IX) и (XI) наблюдались дискретные сигналы атомов фосфора, что свидетельствовало о неэквивалентности фосфатных групп в этих производных: для (XI) δ_{P} –2,54, –3,05 (2:1), для

(IX) — см. выше. В то же время незащищенный пентаманнозилтетрафосфат (I) давал один сигнал $\delta_p - 1,12$, который был близок к положениям резонанса фосфодиефирных групп линейных (1-6)-связанных олиго(маннозилфосфатов) ($\delta_p - 1,05$ и $-1,14$), полученных в работе [1].

В спектре ^{13}C -ЯМР триманнозного производного (X) сигналы $\text{C}1'$, $\text{C}1''$, $\text{C}2'$, $\text{C}2''$, $\text{C}5$, $\text{C}5'$, $\text{C}6$ и $\text{C}6'$ были представлены в виде дублетов вследствие спин-спинового взаимодействия с атомом фосфора. В спектре защищенного пентамера (XII) атомы $\text{C}1'-\text{C}1''''$ и $\text{C}6-\text{C}6''''$ имели уширенные полосы резонанса из-за наложения близко лежащих сигналов. Здесь легко выделялись только индивидуальные сигналы $\text{C}1-\text{C}3$, $\text{C}5$ и $\text{C}6''''$ терминальных звеньев. Атомы $\text{C}2'-\text{C}2''''$, $\text{C}3'-\text{C}3''''$ и $\text{C}5'-\text{C}5''''$ имели близкие хим. сдвиги и резонировали в виде одного широкого мультиплета.

При анализе спектра ^{13}C -ЯМР целевого пентаманнозилтетрафосфата (I) в первую очередь была отмечена близость хим. сдвигов атомов терминальных маннозных звеньев и соответствующих сигналов более короткого олигомера — (1-6)-связанного диманнозилфосфата (XVII) [3] (см. таблицу). Наличие (1-6)-фосфодиефирных связей подтверждалось дублетной (или уширенной) формой сигналов атомов $\text{C}1'-\text{C}1''''$, $\text{C}2'-\text{C}2''''$, $\text{C}5-\text{C}5''''$ и $\text{C}6-\text{C}6''''$, связанной с их расщеплением на атоме фосфора. Характеристичными являлись также заметные изменения хим. сдвигов $\text{C}1'-\text{C}1''''$, $\text{C}5$ и $\text{C}6-\text{C}6''''$ по сравнению с сигналами α -D-маннозы [19] (или метил- α -D-маннозида [20] для $\text{C}5$ и $\text{C}6$) вследствие α - и β -эффектов фосфорилирования: $\Delta\delta = +2,4$ м.д. для $\text{C}1'-\text{C}1''''$, $-0,9$ м.д. для $\text{C}5$, $+4,2$ м.д. для $\text{C}6$ и $+3,7$ м.д. для $\text{C}6'-\text{C}6''''$. Для атомов $\text{C}5'-\text{C}5''''$ влияние на хим. сдвиг оказывали фосфатные группы не только при $\text{C}6'-\text{C}6''''$, но и при $\text{C}1'-\text{C}1''''$ ($\Delta\delta = +0,3$ м.д., ср. [19], [21] и [22]). β -Эффект на $\text{C}2'-\text{C}2''''$ был выражен весьма слабо ($-0,1$ м.д.). В то же время наблюдалось некоторое влияние фосфатных заместителей при $\text{C}6$ на хим. сдвиг $\text{C}4$ (ср. $\delta_{\text{C}4'-\text{C}4''''}$ и $\delta_{\text{C}4''''}$), что согласовалось с данными ^{13}C -ЯМР α -D-манноза-6-фосфата [22].

α -Конфигурация маннозилфосфатных связей следовала из положений резонанса $\text{C}3'-\text{C}3''''$ и $\text{C}5'-\text{C}5''''$, которые были близки к хим. сдвигам $\text{C}3$ и $\text{C}5$ α -D-маннопиранозилфосфата [21]. Длина цепи пентамера (I), как и его ацилированного предшественника (XI), подтверждалась в спектрах ^{13}C -ЯМР соотношениями суммарных интегральных интенсивностей сигналов $\text{C}1'-\text{C}1''''$ и $\text{C}6-\text{C}6''''$ к интенсивностям $\text{C}1$ и $\text{C}6''''$ соответственно. В обоих случаях эти отношения равнялись $\sim 4:1$. Соотношение интенсивностей сигналов $\text{C}5$, $\text{C}5'-\text{C}5''''$ и $\text{C}5''''$ для соединения (I) было близким к $1:3:1$.

Таким образом, в данной работе предложен эффективный подход к синтезу олиго(гликозилфосфатов) путем ступенчатого наращивания цепи гликозилводородфосфонатным методом. Показана возможность использования в качестве спиртовых компонентов олигомерных блоков, содержащих фосфатные диэфирные группировки. Разработанный подход был успешно применен нами в синтезе тетрамерного фрагмента капсульного антигена *E. coli* K51, построенного из (1-3)-связанных 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфатных звеньев [23]. После экспериментального завершения настоящей работы, при подготовке к печати публикации [10] появилось сообщение [24], посвященное ступенчатому синтезу олигодезоксирибонуклеотидов аналогичной последовательностью реакций.

Экспериментальная часть

Физико-химические и хроматографические методы, приготовление пиридина описаны в работе [23]. Системы для ТСХ: хлороформ — метанол, 8:2 (А), бензол — ацетон, 85:15 (Б), хлороформ — метанол — вода, 85:20:2 (В), изопропиловый спирт — вода, 7:3 (Г). Системы для колоночной хроматографии (КХ) на SiO₂ (градиентное элюирование): дихлорметан — метанол — триэтиламин, 97:2:1 → 92:7:1 (Д), 96:3:1 → 87:12:1 (Е), дихлорметан — метанол — триэтиламин — вода, 94:5:1:0,5 → 83:15:1:1,5 (Ж).

2,3,4-Три-О-бензоил-6-О-п,п'-диметокситригил-α-D-маннопиранозилводородфосфонат, триэтиламмониевая соль (III). К раствору 228 мг (3,36 ммоль) имидазола в 6 мл CH₃CN при перемешивании и охлаждении ледяной водой прибавляли 0,089 мл (1,01 ммоль) PCl₃ и 0,49 мл (3,53 ммоль) триэтиламина; через 15 мин прибавляли по каплям раствор 196 мг (0,247 ммоль) соединения (II) [1] в 6 мл ацетонитрила в течение 30 мин. Охлаждение прекращали, к смеси через 5 мин при 20° С прибавляли 1,4 мл 1 М ТЕАВ (рН 8). Раствор перемешивали 15 мин, упаривали, к полученному сиропу добавляли и отгоняли смесь C₅H₅N—Et₃N (4:1). Остаток растворяли в СНCl₃ (50 мл), промывали охлажденным 0,5 М ТЕАВ (4×30 мл), высушивали и упаривали. Методом КХ в системе Д выделили 223 мг Н-фосфоната (III) (94%, аморфный), $[\alpha]_D^{26} -83,7^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,43 (А), 0 (Б). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1,30 (т, 9H, CH₃CH₂), 2,98 (к, 6H, CH₃CH₂), 3,17 (дд, 1H, H6a, J_{5,6a} 3,5, J_{6a,6b} 10,2), 3,45 (дд, 1H, H6b, J_{5,6b} 2,0), 3,66, 3,68 (2с, 6H, CH₃O), 4,54 (ддд, 1H, H5), 5,78 (дд, 1H, H2, J_{2,3} 3,1), 5,87 (дд, 1H, H3), 5,93 (дд, 1H, H1, J_{1,2} 2,0, J_{1,p} 9,0), 6,22 (т, 1H, H4, J_{3,4}=J_{4,5}=10,0) 6,62 и 6,67 (2д, 4H, о-протоны C₆H₄-групп), 7,15 (д, 1H, НР, J_{н,р} 638,3), 7,05—8,15 (м, 24H, C₆H₅, ж-протоны C₆H₄-групп).

2,3,4,6-Тетра-О-бензоил-α-D-маннопиранозилводородфосфонат, триэтиламмониевая соль (IV), получали из 70 мг 2,3,4,6-тетра-О-бензоил-α-D-маннопиранозы по методике [4, 18]. Полученный продукт хроматографировали на SiO₂ в системе Д. Выделили 79 мг соединения (IV) (88%, аморфный), данные ЯМР — см. [4, 18].

Метил-2,3,4-три-О-ацетил-6-(2,3,4-три-О-бензоил-α-D-маннопиранозилфосфо)-α-D-маннопиранозид, триэтиламмониевая соль (VIII). а) Смесь 108 мг (0,113 ммоль) Н-фосфоната (III) и 40 мг (0,125 ммоль) соединения (V) [12] высушивали отгонкой с пиридином (3×2 мл). К раствору остатка в 1 мл пиридина при перемешивании прибавляли 0,037 мл (0,30 ммоль) триметилацетилхлорида. Анализ методом ТСХ в системе Б через 5 мин показал присутствие диметокситригилсодержащего продукта (очевидно, диэфира (VI), R_f 0,51, дававшего оранжевое окрашивание при проявлении кислотой) и следовых количеств исходных. Через 10 мин реакционную смесь обработали 2 мл раствора иода (59 мг, 0,23 ммоль) в смеси пиридин — вода (95:5, 10 мин, 20° С). Раствор разбавляли хлороформом, промывали 1 М Na₂S₂O₃, 1 М ТЕАВ, высушивали и упаривали. Полученный сироп растворяли в 6 мл дихлорметана и обрабатывали 6 мл охлажденной 2% CF₃COOH в дихлорметане 1 мин при 0° С. Смесь промывали ледяным насыщенным раствором NaHCO₃, 1 М ТЕАВ, высушивали и упаривали. Из остатка методом КХ в системе Д выделили 99 мг фосфоэфира (VIII) (90%, аморфный), $[\alpha]_D^{28} -50^\circ$ С (с 1, хлороформ), R_f 0,38 (А). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1,39 (т, 9H, CH₃CH₂), 1,99, 2,06, 2,12 (3с, 9H, CH₃CO), 3,12 (к, 6H, CH₃CH₂), 3,39 (с, 3H, CH₃O), 3,76 (дд, 1H, H6a', J_{5,6a'} 5,2, J_{6a',6b'} 12,7), 3,82 (дд, 1H, H6b', J_{5a',6b'} 2,2), 3,96—4,21 (м, 3H, H5, H6a, H6b), 4,51 (ддд, 1H, H5'), 4,65 (д, 1H, H1, J_{1,2} 1,7),

5,20 (дд, 1H, H2, $J_{2,3}$ 3,5), 5,27 (т, 1H, H4, $J_{3,4}=J_{4,5}=10,2$), 5,34 (дд, 1H, 3H), 5,77 (т, 1H, H4', $J_{3',4'}=J_{4',5'}=10,3$), 5,79 (м, 1H, H2'), 5,80 (дд, 1H, H1', $J_{1',2'}$ 2,2 $J_{1',p}$ 8,9), 6,02 (дд, 1H, H3', $J_{2',3'}$ 3,0), 7,15–8,10 (м, 15H, C₆H₅). Спектр ³¹P-ЯМР (CDCl₃): -2,45.

б) Конденсацию соединений (III) (110 мг, 0,115 ммоль) и (V) (39 мг, 0,122 ммоль) в присутствии Me₃CCOCl (0,034 мл, 0,275 ммоль) выполняли как описано выше (см. «а»). Через 6 мин смесь разбавляли 0,2 мл 1 М TEAB, упаривали, к остатку добавляли и отгоняли толуол. Полученный сироп растворяли в 8 мл охлажденного (0° С) 2% раствора SNCl₂COOH в дихлорметане, через 1,5 мин нейтрализовали раствором NaHCO₃ и обрабатывали обычным путем. Анализ методом ТСХ в системе А показал образование 2,3,4-три-О-бензоил-*D*-маннозы (*R*_f 0,85), фосфодиефиров (VII) и (VIII) (*R*_f 0,55 и 0,38 соответственно) и ряда неидентифицированных продуктов. Смесь обрабатывали последовательно раствором иода в водном пиридине и 1% TFA в дихлорметане при 0° С как описано выше (см. «а»). Методом КХ, элюируя продукт последовательно системой Б, дихлорметаном и системой Д, выделили 2,3,4-три-О-бензоил- α -*D*-маннопиранозу, аморфное вещество, *R*_f 0,85 (А). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃+CD₃OD): 3,78 (м, 2H, H6a, H6b), 4,25 (м, 1H, H5), 5,57 (д, 1H, H1, $J_{1,2}$ 1,8), 5,75 (дд, 1H, H2, $J_{2,3}$ 3,2), 5,95 (т, 1H, H4, $J_{3,4}=J_{4,5}=8,9$), 6,10 (дд, 1H, H3), 7,25–8,10 (м, 15H, C₆H₅) и 38 мг соединения (VIII) (выход 34%).

*Метил-2,3,4-три-О-ацетил-6-[2,3,4-три-О-бензоил-6-(2,3,4-три-О-бензоил-6-О-*n,n'*-диметокситригил- α -*D*-маннопиранозилфосфо)- α -*D*-маннопиранозилфосфо]- α -*D*-маннопиранозид, бис-триэтиламмониевая соль (IX).* Конденсацию соединений (III) (48 мг, 0,05 ммоль) и (VIII) (35 мг, 0,036 ммоль) в присутствии Me₃CCOCl (0,016 мл, 0,125 ммоль) выполняли как описано выше. ТСХ-анализ в системе А через 4 мин показал образование диметокситригилсодержащего продукта (очевидно, олигомера (XIV), *R*_f 0,62). После обработки смеси через 20 мин иодом (26 мг, 0,1 ммоль) в водном пиридине и выделения (см. синтез диэфира (VIII)) получили 54 мг производного (IX) (78%, аморфный), $[\alpha]_D^{25}$ -57,4° (с 1, хлороформ), *R*_f 0,42 (А). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1,22 (т, 18H, CH₃CH₂), 1,95, 2,04, 2,06 (3с, 9H, CH₃CO), 2,93 (к, 12H, CH₃CH₂), 3,05 (дд, 1H, H6a'', $J_{5'',6a''}$ 2,4, $J_{6a'',6b''}$ 10,5), 3,34 (с, 3H, CH₃O), 3,39 (дд, 1H, H6b'', $J_{5'',6b''}$ 1,5), 3,63 (с, 6H, CH₃OAr), 4,02–4,18 (м, 3H, H5, H6a, H6b), 4,20–4,33 (м, 2H, H6a', H6b'), 4,47 (ддд, 1H, H5''), 4,65–4,72 (м, 1H, H5'), 4,68 (д, 1H, H1, $J_{1,2}$ 1,5), 5,19 (дд, 1H, H2, $J_{2,3}$ 3,4), 5,24 (т, 1H, H4, $J_{3,4}=J_{4,5}=9,7$), 5,34 (дд, 1H, H3), 5,76–5,86 (м, 5H, H1', H1'', H2', H2'', H3''), 5,84 (т, 1H, H4', $J_{3',4'}=J_{4',5'}=9,9$), 5,99 (дд, 1H, H3', $J_{2',3'}$ 2,9), 6,31 (т, 1H, H4'', $J_{3'',4''}=J_{4'',5''}=10,3$), 6,58 и 6,62 (2д, 4H, *o*-протоны C₆H₄-групп), 7,10–8,20 (м, 39H, C₆H₅, *m*-протоны C₆H₄-групп). Спектр ³¹P-ЯМР (CDCl₃): -2,68, -2,92 (1:1).

*Метил-2,3,4-три-О-ацетил-6-[2,3,4-три-О-бензоил-6-(2,3,4-три-О-бензоил- α -*D*-маннопиранозилфосфо)- α -*D*-маннопиранозилфосфо]- α -*D*-маннопиранозид, бис-триэтиламмониевая соль (X).* Производное (IX) (54 мг) детритилировали действием 1% CF₃COOH в дихлорметане, как описано в синтезе фосфодиефира (VIII) (методика «а»). Методом КХ в системе Е выделили 44 мг соединения (X) (97%, аморфный), *R*_f 0,20 (А). Спектр ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 9,6 (CH₃CH₂), 20,65, 20,75 (CH₃CO), 45,7 (CH₃CH₂), 55,0 (CH₃O), 61,3 (C6''), 64,7, 65,05 (2д, C6, C6', $J_{C,p}\sim 4,0$), 66,4 (C4'), 67,4 (C4+C4''), 69,5 (C3), 69,55 (д, C5, $J_{C,p}$ 7,7), 69,6 (C2), 70,1, 70,2 (C3', C3''), 70,5, 70,7, 70,8 (3д, C2', C2'', C5', $J_{C,p}\sim 7,3$), 72,1 (C5''), 93,6, 93,7 (2д, C1', C1'', $J_{C,p}\sim 4,2$), 97,95 (C1), 128,1–129,7, 132,9–133,2 (C₆H₅), 165,1, 165,4, 165,7 (PhCOO), 169,8, 170,2 (MeCOO). Спектр ³¹P-ЯМР (CDCl₃): -2,59.

Метил-2,3,4-три-О-ацетил-6-(2,3,4-три-О-бензоил-6-[2,3,4-три-О-бензоил-6-(2,3,4-три-О-бензоил- α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозилфосфо]- α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозид, трис-триэтиламмониевая соль (XI). Конденсацию соединений (III) (148 мг, 0,154 ммоль) и (X) (168 мг, 0,103 ммоль) в присутствии Me_3CCOCl (0,049 мл, 0,385 ммоль; 20 мин, 20°С), последующее окисление иодом (76 мг, 0,3 ммоль) и детритилирование выполняли по методике «а» синтеза фосфодизфира (VIII). Методом КХ в системе Ж выделили 167 мг тетрамера (XI) (71%, аморфный), $[\alpha]_D^{26} -69,3^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,07 (А), 0,35 (В). Спектр ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): -2,54, -3,05 (2:1).

Метил-2,3,4-три-О-ацетил-6-(2,3,4-три-О-бензоил-6-(2,3,4-три-О-бензоил-6-[2,3,4-три-О-бензоил-6-(2,3,4,6-тетра-О-бензоил- α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозилфосфо]- α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозид, тетракис-триэтиламмониевая соль (XII). Конденсацию 79 мг (0,104 ммоль) Н-фосфоната (IV) и 167 мг (0,073 ммоль) производного (XI) в присутствии 0,033 мл (0,26 ммоль) Me_3CCOCl и последующее окисление иодом (76 мг, 0,3 ммоль) в водном пиридине выполняли как описано в синтезе фосфодизфира (VIII) (методика «а»). Методом КХ в системе Ж выделили 159 мг ацилированного пентамера (XII) (72%, аморфный), $[\alpha]_D^{30} -55,9^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,43 (В). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 8,9 (CH_3CH_2), 22,5 (CH_3CO), 45,6 (CH_2CH_2), 55,0 (CH_2O), 62,3 ($\text{C6}''''$), 64,9 (ушир., $\text{C6}-\text{C6}''''$), 66,7, 67,1 ($\text{C4}-\text{C4}''''$), 69,1 (C3), 69,5 (д, $\text{C2}+\text{C5}$, $J_{\text{C5,P}} \sim 7$), 70,0-70,15 (м, ($\text{C2}'-\text{C2}''''$)+($\text{C3}'-\text{C3}''''$)+($\text{C5}'-\text{C5}''''$)), 93,7 (ушир., $\text{C1}'-\text{C1}''''$), 97,9 (C1), 128,1-129,8, 132,75-133,0 (C_6H_5), 165,1, 165,2, 165,8 (PhCOO), 169,8, 170,2 (MeCOO). Спектр ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): -2,97.

Метил-6-(6-{6-(α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозид, тетракис-аммониевая соль (I). К раствору 155 мг производного (XII) в 17 мл 1,4-диоксана прибавляли 10 мл метанола и 3 мл 1 М MeONa/MeOH . Смесь выдерживали 1 ч при 20°С, нейтрализовали катионитом Dowex 50W \times 4 (H^+), фильтровали, фильтрат немедленно обрабатывали триэтиламино (2 мл) и упаривали. Остаток растворяли в воде (100 мл), экстрагировали эфиром (2 \times 30 мл) и упаривали. Пентаманнозилтетрафосфат (I) выделяли ионообменной хроматографией на колонке (1 \times 18 см) с фрактогелем TSK DEAE-650 (S) (HCO_3^-) в линейном градиенте NH_4HCO_3 (0 \rightarrow 0,3 М, скорость элюирования 1 мл/мин). Выход 55 мг (88%), аморфное вещество, $[\alpha]_D^{25} +34^\circ$ (с 1, вода), R_f 0,18 (Г). Данные ^1H -ЯМР (D_2O): 3,32 (с, 3H, CH_3O), 3,93 (дд, линии уширены, 4H, $\text{H2}'-\text{H2}''''$, $J_{2'-2''''}, 3'-3'''' \sim 3,0$), 4,05 (м, 8H, $\text{H6}-\text{H6}''''$), 4,70 (H1, закрыт сигналом НОД), 5,35 (дд, линии уширены, 4H, $\text{H1}'-\text{H1}''''$, $J_{1'-1''''}, 2'-2'''' \sim 1,5$, $J_{1'-1''''}, \text{P}-\text{P}'''' \sim 7,6$). Спектр ^{31}P -ЯМР (D_2O): -1,12. Спектр ^{13}C -ЯМР — см. таблицу.

Авторы благодарят А. С. Шашкова за съемку и помощь в интерпретации спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР и А. В. Игнатенко — за съемку спектров ^{31}P -ЯМР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаев А. В., Уткина Н. С., Шибяев В. Н., Игнатенко А. В., Розынов Б. В. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 2. С. 272-282.
2. Westerduin P., Veeneman G. H., van der Marel G. A., van Boom J. H. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 51. P. 6271-6274.
3. Николаев А. В., Рябцева Е. В., Шибяев В. Н., Коцетков Н. К. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 12. С. 1649-1659.
4. Nikolaev A. V., Ivanova I. A., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1990. V. 204. № 1. P. 65-78.

5. Уткина Н. С., Николаев А. В., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 531-539.
6. Елисеева Г. И., Иванова И. А., Николаев А. В., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 10. С. 1401-1411.
7. Шибает В. Н. // Успехи биол. химии. 1982. Т. 23. С. 61-101.
8. Thiem J., Franzkowiak M. // J. Carbohydr. Chem. 1989. V. 8. № 1. P. 1-28.
9. Gorin P. A. J., Mazurek M. // Can. J. Chem. 1974. V. 52. № 17. P. 3070-3076.
10. Николаев А. В., Иванова И. А., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 12. С. 1696-1699.
11. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Chem. scr. 1986. V. 26. № 1. P. 59-62.
12. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Байрамова Н. Э., Николаев А. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 3. С. 652-656.
13. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051-4054.
14. Garegg P. J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4055-4058.
15. Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399-5407.
16. Николаев А. В., Иванова И. А., Шибает В. Н., Игнатенко А. В. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 11. С. 1550-1561.
17. Garegg P. J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 3. P. 655-662.
18. Николаев А. В., Иванова И. А., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 8. С. 1105-1117.
19. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59-75.
20. Gorin P. A. J., Mazurek M. // Can. J. Chem. 1975. V. 53. № 8. P. 1212-1223.
21. O'Connor J. V., Nunez H. A., Barker R. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 3. P. 500-507.
22. Gorin P. A. J. // Can. J. Chem. 1973. V. 51. № 13. P. 2105-2109.
23. Николаев А. В., Иванова И. А., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 126-141.
24. Грязнов С. М., Поганов В. К. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1419-1423.

Поступила в редакцию
19.VII.1991

A. V. NIKOLAEV, I. A. IVANOVA, V. N. SHIBAEV

**FRAGMENTS OF BIOPOLYMERS CONTAINING GLYCOSYL PHOSPHATE
RESIDUES. 11. STEP-BY-STEP SYNTHESIS OF
PENTA(α -D-MANNOPYRANOSYL)TETRAPHOSPHATE, LINEAR FRAGMENT
OF THE PHOSPHOMANNAN OF *HANSENULA CAPSULATA* Y-1842**

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

Step-by-step synthesis of linear (1-6)-linked methyl tetra(α -D-mannopyranosyl phosphate)- α -D-mannopyranoside was carried out with the use of the hydrogenphosphonate method. Methyl 2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranoside served as the first acceptor of the oligo(mannosyl phosphate) chain. Elongation cycle included coupling of 2,3,4-tri-O-benzoyl-6-O-dimethoxytrityl- α -D-mannopyranosyl H-phosphonate and a hydroxyl component in the presence of Me₃CCOCl followed by oxidation and detritylation. 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyl H-phosphonate was employed at the final step. After complete deprotection the title oligomer was isolated in the 30% overall yield. The data of ¹³C NMR spectra of the title compound are discussed.