



УДК 547.455.6'118.057

ФРАГМЕНТЫ БИОПОЛИМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ ГЛИКОЗИЛФОСФАТОВ 13*. СИНТЕЗ ФОСФОДИЭФИРНОГО ФРАГМЕНТА ПОЛИМЕРА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Actinoplanes* sp. ИНА 3697

© 1997 г. И. А. Иванова, В. Н. Шibaев[#]

*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
117913, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47*

Поступила в редакцию 03.10.96 г. Принята к печати 06.11.96 г.

С помощью гликозил-Н-фосфонатного метода осуществлен синтез фосфодиэфирного фрагмента полимера клеточной стенки бактерии *Actinoplanes* sp. ИНА 3697 ManNAc(β1-3)GlcNAc(α)-P-6ManNAc(β1-3)GlcNAc(α)Bn. Построение необходимых для конденсации производных дисахарида, содержащего остаток N-ацетил-β-D-маннозамина, было осуществлено β-гликозилированием соответствующего защищенного производного N-ацетил-D-глюкозамина с последующим превращением дисахарида в 2'-О-трифторметансульфонат, введением азидной группы с обращением конфигурации при C2' и восстановлением.

Ключевые слова: гликозил-Н-фосфонат, *Actinoplanes*, клеточная стенка, N-ацетил-β-D-маннозид.

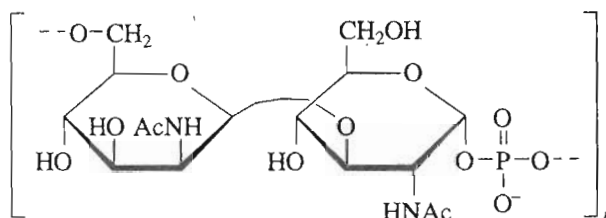
Поли(гликозилфосфаты) – природные биополимеры, построенные из повторяющихся моно- и олигосахаридных звеньев, соединенных фосфодиэфирными связями с участием полуацетального гидроксила одного из моносахаридных остатков. Полимеры такого типа с различной структурой входят в состав клеточной стенки и капсулы многих бактерий [2]. Они найдены и в ряде других микроорганизмов, причем остаток гликозилфосфата во многих случаях входит в состав детерминант, определяющих иммунохимическую специфичность.

При изучении различных путей химического синтеза гликозилфосфосахаров и более протяженных фрагментов поли(гликозилфосфатов) было найдено [3–5], что наиболее эффективен подход, основанный на использовании гликозил-Н-фосфонатов. В рамках проведенных ранее исследований этим методом был осуществлен синтез ряда ди(гликомонозил)монофосфатов – фрагментов бактериальных полимеров [1, 3, 6, 7], фосфогликанов дрожжей [6–8] и некоторых гликопротеинов [6], а также олиго(моносахаридфосфатов) – фрагментов внеклеточного фосфоманнана дрожжей *Hansenula capsulata* Y-1842 и капсульного антигена бактерий *Escherichia coli* K51 [9]. Возможности получения с помощью этого метода аналогичных

производных олигосахаридмонофосфатов остаются пока малоисследованными.

В настоящей работе мы сообщаем о первом применении Н-фосфонатного метода для синтеза фрагментов бактериальных полимеров, содержащих дисахаридмонофосфатные звенья. В качестве целевого соединения была избрана гликобиозилфосфогликобиоза (II) – фрагмент фосфорсодержащего полисахарида клеточной стенки грамположительной бактерии *Actinoplanes* sp. ИНА 3697, имеющего структуру (I) с повторяющимися звеньями, содержащими остатки N-ацетил-α-D-глюкозамина и N-ацетил-β-D-маннозамина [10, 11].

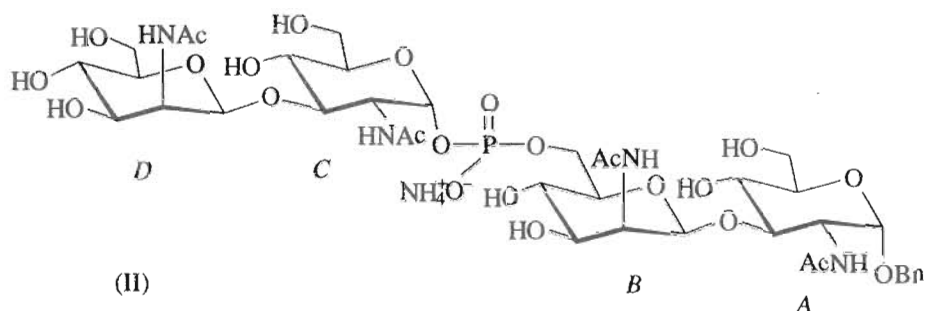
Во время выполнения данного исследования были опубликованы данные об эффективном использовании гликозил-Н-фосфонатного метода для получения ди- и олигомерных фрагментов поверхностного фосфогликана паразита класса простейших *Leishmania donovani* [12, 13] – полимера, построенного из повторяющихся звеньев β-D-Gal-(1 → 4)-α-D-Man, соединенных фосфодиэфирными связями через C1 и C6'.



(I)

* Сообщение 12 см. [1].

[#] Автор для переписки (факс: (095)135-53-28, электронная почта: shiba@ioc.ac.ru).



Применение Н-фосфонатного метода для синтеза фрагмента (II) предполагало предварительное получение производного гликобиозил-Н-фосфоната (XII) и моногидроксильного производного (XIII) (см. схему 2), содержащих О-ацильные защитные группы. Такой выбор защитных групп обусловлен возможностью использования основных условий для их удаления с конечного продукта из-за нестабильности гликозилфосфатной связи в кислой среде.

Наиболее сложным моментом при синтезе дисахаридных компонентов (XII) и (XIII) было создание β -(1 \rightarrow 3)-гликозидной связи между остатками N-ацетил-D-маннозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. Описано несколько подходов к синтезу 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -D-маннозидов с использованием в качестве гликозилдоноров производных 2-азидо-2-дезоксид- α -D-маннопиранозилбромидов (см., например, [14–16] и цитированные там работы) или производных 2-(бензоилоксимино)-2-дезоксид- α -D-арабино-гексопиранозилбромидов с последующим восстановлением оксиминогруппы, приводящим к образованию 2-аминосахаров пре-

имущественно с β -D-манно-конфигурацией [17, 18]. Другой подход предполагает использование в качестве гликозилдона активированных производных D-глюкозы и конверсию образующегося β -D-глюкозида в β -D-маннопроизводное с азотсодержащей группой при C2. Такое превращение может быть осуществлено окислением гидроксильной группы при C2 с дальнейшим превращением полученного кетона в оксим и восстановлением [19]. Другой вариант этого подхода – проведение S_N2 -замещения при C2 действием азидов соответствующие 2-О-сульфонатные производные [16, 20, 21]. Последний вариант с использованием трифторметансульфоната в качестве уходящей группы [21] представлялся наиболее привлекательным из-за доступности исходных веществ и высокой эффективности и стереоселективности на стадии гликозилирования.

Производные (XII) и (XIII) были получены из общего дисахаридного предшественника (IX) (см. схему 2). Исходным соединением для синтеза дисахаридов (IX) служил легкодоступный β -глюкозид (IV), полученный с выходом 85% при взаимодействии 4,6-О-бензилиденового производного (III) [22] с ацетобромглюкозой в хлористом метиле в присутствии цианида ртути и каталитического количества бромида ртути (схема 1). Строение продукта реакции однозначно вытекало из данных ^1H -ЯМР-спектра, в частности конфигурация гликозидной связи следует из величины КССВ $J_{1,2}$ (8.4 Гц).

Последовательным кислотным гидролизом и бензоилированием из дисахаридов (IV) получали ацильное производное (V), которое далее дезацетилировали в условиях кислого метанолиза [23] и превращали в 4',6'-О-бензилиденное производное (VI). Региоизбирательное 3'-О-бензоилирование диола (VI) действием N-бензоилимидазола приводило к соединению (VII), положение бензоильной группы в котором подтверждается слабопольным сдвигом сигнала $\text{H}3'$ (5.32 м. д., $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Гц) в его спектре ^1H -ЯМР по сравнению с соединением (VI) (3.63 м. д.). Суммарный выход на пять стадий составил 48%.

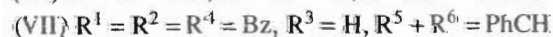
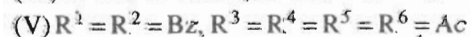
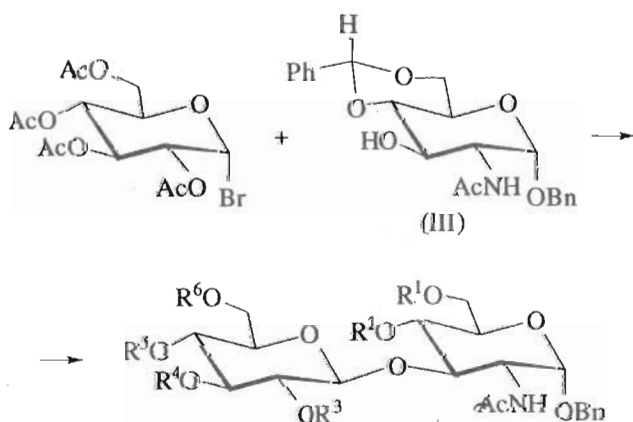


Схема 1.

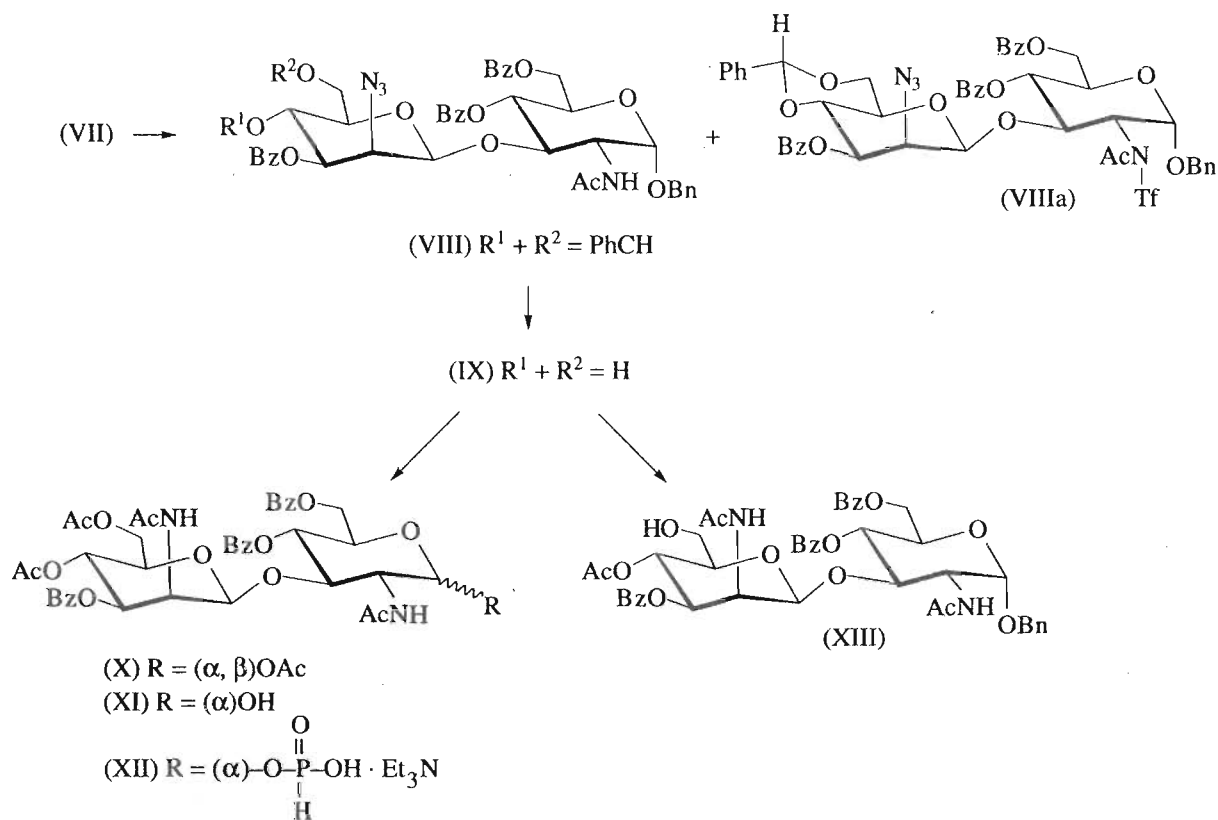


Схема 2.

После обработки β -D-глюкопиранозиды (VII) ангидридом трифторметансульфокислоты в хлористом метиле в присутствии пиридина в последующей реакции с NaN_3 в диметилформамиде в присутствии 18-краун-6 [24] (схема 2) было продемонстрировано образование двух веществ. Целевой продукт реакции – азид (VIII) – выделен с выходом 44%. манно-Конфигурация невосстанавливающего моносахаридного остатка (в дисахариде (VIII) подтверждается значениями КССВ $J_{1,2}$ 1.5 и $J_{2,3}$ 3.6 Гц в спектре 1H -ЯМР.

Данные спектра 1H -ЯМР второго продукта также соответствуют манно-конфигурации невосстанавливающего моносахаридного остатка, но отсутствие сигнала амидного протона и изменение мультиплетности сигнала H2 (отсутствие КССВ $J_{2,NH}$) указывают на замещение по амидной группе восстанавливающего моносахаридного остатка. Мы предполагаем, что это вещество имеет структуру N-трифторметилсульфонатного производного (VIIIa). Интересно, что в 1H -ЯМР-спектре соединения (VIIIa) наблюдается значительное смещение сигналов N-ацетильной группы и H3 в слабое поле, а сигнала H2' – в сильное поле по сравнению со спектром соединения (VIII).

Удаление 4',6'-O-бензилиденовой защитной группы кислотным гидролизом производного (VIII) дало диол (IX), выделенный с выходом 94%.

При переходе от вещества (IX) к соединению (XI), являющемуся предшественником гликобиозил-N-фосфоната (XII), встретились трудности при получении производного (X) на стадии 1-O-дебензилирования.

Восстановление азидогруппы гладко протекало при гидрировании дисахарида (IX) над 10% Pd/C в метаноле в присутствии уксусного ангидрида, однако для успешного 1-O-дебензилирования, по данным аналитических опытов, оказался необходимым продолжительный гидрогенолиз в ледяной уксусной кислоте при 40°C. В препаративном масштабе соединение (X) после двухстадийного гидрирования и ацетилирования действием уксусного ангидрида удалось выделить лишь с выходом 20%, что связано, по-видимому, со значительной адсорбцией продукта на применяемом катализаторе.

Селективное 1-O-деацетилирование пер-O-ацильного производного (X) действием Me_2NH в ацетонитриле привело к соединению (XI) с выходом 69%. Продукт был чистым α -аномером, что подтверждалось величиной $J_{1,2}$ 2.4 Гц.

Синтез спиртового компонента (XIII) был выполнен из соединения (IX) последовательным восстановлением азидогруппы в указанных выше условиях, 6'-O-алкилированием действием диметокситритилхлорида в пиридине, ацетилированием и

Химические сдвиги в ^{13}C -ЯМР-спектре соединения (II) (в D_2O)*

Моносахаридное звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
A -3GlcNAc(α)-	97.3	53.3	82.9 ^a	70.1 ^b	73.1 ^c	61.6
B -P-6ManNAc(β)-	101.1 ^d	54.7	73.3 ^c	67.9	76.4 ^{2*}	65.9 ^{3*}
C -3GlcNAc(α P)	95.4 ^{3*}	53.3 ^{4*}	82.1 ^a	69.7 ^b	74.1	61.6
D ManNAc(β)-	101.3 ^d	54.7	73.5 ^c	67.9	77.7	61.6

* В спектре присутствуют также сигналы CH_3CO -групп (23.2 и 176.1 м. д.) и $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -группы (70.9, 129.5–129.9, 138.2 м. д.). Для групп сигналов с индексами a, b, c, d отнесение может быть обратным.

^{2*} Дублет с $^3J_{\text{C,P}}$ 6.9 Гц.

^{3*} Дублеты с $^2J_{\text{C,P}}$ 3.4 Гц.

^{4*} Дублет с $^3J_{\text{C,P}}$ 7.7 Гц.

удалением диметокситритильной группы мягким кислотным гидролизом с суммарным выходом 53%.

Гликозил-Н-фосфонат (XII) получали с выходом 88% обработкой соединения (XI) триимидазолидофосфитом (образуется *in situ* из PCl_3 , имидазола и триэтиламина) с последующим гидролизом имидазолидных групп и использовали в конденсации без хроматографической очистки. Строение Н-фосфоната подтверждалось данными ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектров. Наличие водородфосфонатной группы следовало из значения химического сдвига атома фосфора δ_{P} 0.78 и присутствия в спектре ^1H -ЯМР дублетного сигнала связанного с ним протона при δ 7.9 с характерной КССВ $^1J_{\text{P,H}}$ 640 Гц. Наблюдалось также расщепление сигнала Н1 за счет спин-спинового взаимодействия с атомом фосфора ($^3J_{\text{H1,P}}$ 8.2 Гц).

Конденсацию соединений (XII) и (XIII) проводили в пиридине в присутствии 3 экв. пивалоилхлорида с последующим окислением раствором I_2 в 95% водном пиридине. Образовавшийся фосфодизфир деблокировали действием 0.05 М метилата натрия в метаноле с тетрагидрофураном. Целевой тетрасахаридфосфат (II) был выделен ионообменной хроматографией на фрактогеле TSK DEAE в градиенте NH_4HCO_3 с выходом 39%.

Строение фосфодизфира (II) подтверждалось данными спектроскопии ^{31}P -, ^{13}C - и ^1H -ЯМР (см. таблицу и "Экспериментальную часть", обозначения моносахаридных остатков показаны на формуле). Сигнал ^{31}P -ЯМР соединения (II) находился в области, характерной для дизэфиров фосфорной кислоты аналогичного типа [1, 3–10]. Наличие фосфодизфирной связи между атомами С1 остатка С и С6 остатка В подтверждалось в ^{13}C -ЯМР-спектре смещением резонанса этих и соседних С2 (С) и С5 (В) атомов по сравнению с незамещенными моносахаридами вследствие α - и β -эффектов фосфорилирования, а также дублетной формой указанных сигналов за счет спин-спинового взаимодействия с атомом фосфора. Сдвиг сигналов Н1 (С), Н6а, 6б (В) в слабое поле и наличие КССВ

$J_{\text{H1(C),P}}$ в ^1H -ЯМР-спектре подтверждали положение фосфодизфирной связи в соединении (II). Вывод об α -конфигурации гликозилфосфатной связи был сделан на основании химических сдвигов сигналов С2 и С5 остатка С, характерных для 2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозилфосфата [25], а также величиной КССВ $J_{1,2}$ для сигналов остатка С, равной 3.0 Гц. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР полученного нами тетрасахаридного фрагмента хорошо коррелируют с описанными ранее спектрами фосфорилированного полимера данного микроорганизма [11, 12].

Таким образом, с помощью Н-фосфонатного метода был синтезирован тетрасахаридный фосфодизфирный фрагмент фосфорсодержащего полисахарида клеточной стенки *Actinoplanes* sp. ИНА 3697, первый представитель гликобиозилфосфогликобиоз, содержащий остатки N-ацетилгексозаминов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оптическое вращение измеряли на поляриметре Jasco DIP-360. Температуры плавления определяли на блоке Кофлера. Спектры ^1H -, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - и ^{31}P -ЯМР записывали на приборах Bruker WM-250 (250 МГц по ^1H), Bruker AM-300 (75 МГц по ^{13}C) и Bruker AC-200 (81.015 МГц по ^{31}P). Химические сдвиги выражены в шкале δ (м. д.) относительно Me_4Si для ^1H и ^{13}C и относительно 85% H_3PO_4 (внешний стандарт) для ^{31}P ; КССВ даны в герцах. Растворы высушивали фильтрованием через вату и упаривали в вакууме при температуре не выше 40°C. Аналитическую ТСХ выполняли на пластинках с закрепленным слоем SiO_2 Kieselgel 60 F254 (Merck), обнаруживая вещества по УФ-поглощению или 10% H_2SO_4 в метаноле при нагревании. Колоночную хроматографию (КХ) проводили на силикагеле Silpearl (25–40 мкм; Sclappu Cavalier, Чехия) и L 40/100 (Chemapol, Чехия). Системы для ТСХ: бензол–ацетон, 4 : 1 (А),

7 : 3 (Б); хлороформ–метанол, 9 : 1 (В), 95 : 5 (Г), 4 : 1 (Д); толуол–ацетон, 4 : 1 (Е); изопропиловый спирт–вода, 5 : 1 (Ж). Пиридин готовили как описано в работе [8].

Бензил-2-ацетиамидо-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-α-D-глюкопиранозид (IV). Суспензию 1 г (2.43 ммоль) соединения (III) [22], 1.23 г (4.86 ммоль) $\text{Hg}(\text{CN})_2$, 180 мг (0.5 ммоль) HgBr_2 и 2 г молекулярных сит 4 \AA в 40 мл дихлорметана перемешивали 1 ч при кипячении в атмосфере аргона, после чего к смеси добавляли по каплям раствор 2 г (4.84 ммоль) ацетобромглюкозы в 10 мл дихлорметана. Реакционную смесь выдерживали при кипячении 4 ч и при $\sim 20^\circ\text{C}$ 16 ч, осадок отфильтровывали и промывали хлороформом. Объединенный фильтрат промывали 0.5 М водным раствором KBr , насыщенным водным раствором NaHCO_3 , водой, высушивали и упаривали. Методом КХ в бензоле с ацетоном (0 → 20%) выделяли 1.5 г (85%) соединения (IV), т. пл. $208\text{--}210^\circ\text{C}$ (хлороформ–гексан), $[\alpha]_D^{25} +34^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.2 (А). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.95–2.02 (5с, CH_3CO), 3.49 (ддд, 1H, H5', $J_{4,5'} 9.2$, $J_{5',6a'} 2.6$, $J_{5',6b'} 4.3$), 3.73 (дд, 1H, H4', $J_{3,4'} = J_{4,5'} = 9.0$), 3.79 (дд, 1H, H6a', $J_{5,6a'} = J_{6a',6b'} = 9.7$), 3.90 (ддд, 1H, H5', $J_{5,6b'} 3.9$), 3.95 (дд, 1H, H6a', $J_{6a',6b'} 12.1$), 3.96 (дд, 1H, H3', $J_{2,3} 9.8$), 4.13 (дд, 1H, H6b'), 4.23 (дд, 1H, H6b'), 4.33 (ддд, 1H, H2', $J_{1,2} 3.7$, $J_{2,\text{NH}} 9.2$), 4.47 (д, 1H, CH_2Ph , J 11.6), 4.71 (д, 1H, H1', $J_{1,2} 8.4$), 4.71 (д, 1H, CH_2Ph), 4.95 (д, 1H, H1), 4.97 (дд, 1H, H2', $J_{2,3} 9.2$), 5.04 (дд, 1H, H4', $J_{3,4'} 9.2$), 5.12 (дд, 1H, H3'), 5.57 (с, 1H, C_6H_5), 5.60 (д, 1H, NH), 7.30–7.52 (м, 10H, C_6H_5).

Бензил-2-ацетиамидо-4,6-ди-О-бензоил-2-дезоксид-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-α-D-глюкопиранозид (V). Дисахарид (IV) (3.63 г, 4.84 ммоль) растворяли в 50 мл 70% водной AsOH и выдерживали 2 ч при 70°C , упаривали, от остатка отгоняли толуол. Остаток растворяли в хлороформе, раствор промывали водным насыщенным раствором NaHCO_3 , водой, высушивали и упаривали. Остаток после упаривания растворяли в 20 мл пиридина и добавляли 1.68 мл (14.52 ммоль) хлористого бензоила. Реакционную смесь выдерживали 1 сут при 20°C , добавляли 5 мл MeOH , упаривали, остаток высушивали отгонкой толуола. Методом КХ в бензоле с ацетоном (0 → 20%) выделили 2.8 г (68%) соединения (V), т. пл. $127\text{--}129^\circ\text{C}$ (хлороформ–эфир), $[\alpha]_D^{25} +18^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.25 (А). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.86, 1.94, 1.95, 2.01, 2.04 (5с, CH_3CO), 3.51 (ддд, 1H, H5', $J_{4,5'} 9.9$, $J_{5',6a'} 2.5$, $J_{5',6b'} 4.9$), 3.67 (дд, 1H, H6a', $J_{6a',6b'} 12.2$), 3.77 (дд, 1H, H6b'), 4.11 (дд, 1H, H3', $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$), 4.27–4.38 (м, 2H, H5, H6a), 4.44–4.55 (м, 3H, H2, H6b', CH_2Ph), 4.63 (д, 1H, H1', $J_{1,2}$

8.0), 4.73–4.83 (м, 3H, H2', H4', CH_2Ph), 4.92 (д, 1H, H1, $J_{1,2} 3.6$), 5.08 (дд, 1H, H3', $J_{2,3'} = J_{3,4'} = 9.9$), 5.35 (дд, 1H, H4', $J_{4,5} 9.6$), 5.62 (д, 1H, NH, $J_{2,\text{NH}} 9.4$), 7.30–7.60, 8.00–8.08 (м, 15H, C_6H_5).

Бензил-2-ацетиамидо-3-О-(4,6-О-бензилиден-β-D-глюкопиранозил)-4,6-ди-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (VI). К раствору 2.7 г (3.18 ммоль) дисахарид (V) в 15 мл хлористого метилена добавляли раствор HCl в метаноле, полученный добавлением 0.6 мл AsCl к 15 мл MeOH при 0°C . Реакционную смесь выдерживали 48 ч при $\sim 20^\circ\text{C}$ и упаривали. Остаток после упаривания с толуолом растворяли в 50 мл ацетонитрила, добавляли 0.715 мл (4.77 ммоль) диметилацетата бензальдегида и 100 мг $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, реакционную смесь выдерживали 4 ч, нейтрализовали триэтиламинном и упаривали. Из остатка методом КХ в бензоле с ацетоном (0 → 40%) выделяли 1.95 г (80%) соединения (VI), т. пл. $262\text{--}264^\circ\text{C}$ (хлороформ–эфир), $[\alpha]_D^{26} +49^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.5 (В). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 2.01 (с, CH_3CO), 2.61 (дд, 1H, H6a', $J_{5',6a'} = J_{6a',6b'} = 10.2$), 3.11 (ддд, 1H, H5', $J_{4,5'} 9.4$, $J_{5',6b'} 5.1$), 3.25 (дд, 1H, H4', $J_{3,4'} 9.4$), 3.31 (дд, 1H, H6b'), 3.36 (дд, 1H, H2', $J_{1,2'} 7.6$, $J_{2,3'} 9.4$), 3.63 (дд, 1H, H3'), 4.01 (дд, 1H, H3', $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8$), 4.26 (д, 1H, H1'), 4.29–4.41 (м, 2H, H5, H6a), 4.48 (ддд, 1H, H2', $J_{1,2} 3.8$, $J_{2,\text{NH}} 9.8$), 4.56 (д, 1H, CH_2Ph , J 11.7), 4.57 (дд, 1H, H6b', $J_{5,6b} 2.8$, $J_{6a,6b} 12.3$), 4.79 (д, 1H, CH_2Ph), 5.01 (д, 1H, H1), 5.21 (с, 1H, C_6H_5), 5.47 (дд, 1H, H4', $J_{4,5} 9.8$), 6.04 (д, 1H, NH), 7.28–7.62, 8.02–8.09 (м, 20H, C_6H_5).

Бензил-2-ацетиамидо-3-О-(4,6-О-бензилиден-3-О-бензоил-β-D-глюкопиранозил)-4,6-ди-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (VII). К раствору 1.23 г (18 ммоль) имидазола в 20 мл хлористого метилена при 0°C добавляли по каплям 1.04 мл (9 ммоль) хлористого бензоила, смесь выдерживали 30 мин при $\sim 20^\circ\text{C}$. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали хлористым метиленом (3 × 5 мл). Объединенный фильтрат добавляли к раствору 3.5 г (4.55 ммоль) дисахарид (VI) в 30 мл бензола. Реакционную смесь выдерживали 8 ч при кипячении и 16 ч при $\sim 20^\circ\text{C}$, разбавляли хлороформом, промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 , водой, высушивали и упаривали. Методом КХ в бензоле с ацетоном (0 → 20%) выделили 3.54 г (89%) соединения (VII), т. пл. $232\text{--}235^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} +34^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.6 (Б). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.98 (с, CH_3CO), 2.69 (дд, 1H, H6a', $J_{5',6a'} = J_{6a',6b'} = 9.4$), 3.20–3.33 (м, 2H, H5', H6b'), 3.49 (дд, 1H, H4', $J_{3,4'} = J_{4,5'} = 9.0$), 3.67 (дд, 1H, H2', $J_{1,2'} 6.8$, $J_{2,3'} 9.0$), 4.12 (дд, 1H, H3', $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$), 4.27 (ддд, 1H, H5', $J_{4,5} 9.6$, $J_{5,6a} 4.5$, $J_{5,6b} 2.2$), 4.38 (дд, 1H, H6a', $J_{6a,6b} 11.6$), 4.43–4.52 (м, 2H, H1', H2), 4.57 (дд, 1H, H6b), 4.57 (д, 1H, CH_2Ph , J 11.6), 4.80 (д, 1H,

CH_2Ph), 5.09 (д, 1H, H1, $J_{1,2}$ 3.9), 5.20 (с, 1H, CHPh), 5.32 (дд, 1H, H3'), 5.52 (дд, 1H, H4), 6.32 (д, 1H, NH, $J_{2,\text{NH}}$ 9.6), 7.21–7.66, 8.0–8.1 (м, 25H, C_6H_5).

Бензил-3-О-(2-азидо-4,6-О-бензилиден-3-О-бензоил-2-дезоксид-β-D-маннопиранозил)-2-ацетамидо-4,6-ди-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (VIII). К раствору 875 мг (1 ммоль) дисахариды (VII) в 30 мл хлористого метилена, содержащему 0.81 мл (10 ммоль) пиридина, в атмосфере аргона при -78°C при перемешивании добавляли по каплям 0.67 мл (4 ммоль) $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{O}$, доводили температуру до 0°C и выдерживали 18 ч. Реакционную смесь выливали на лед, водный слой экстрагировали хлороформом. Органический экстракт промывали ледяной 0.1 М HCl , насыщенным водным раствором NaHCO_3 , водой, высушивали и упаривали. От остатка отгоняли бензол и в атмосфере аргона добавляли 325 мг (5 ммоль) NaN_3 , 60 мг (0.2 ммоль) 18-краун-6 и 20 мл диметилформамида. Реакционную смесь перемешивали 1 сут, разбавляли эфиром и выливали на лед, экстрагировали эфиром, объединенный экстракт промывали водным насыщенным раствором NaHCO_3 , водой и упаривали с добавлением толуола. Методом КХ в толуоле с ацетоном (0 → 20%) выделяли 395 мг (44%, аморфный) соединения (VIII), $[\alpha]_D^{28} -10^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.4 (E). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 2.06 (с, CH_3CO), 3.05 (дд, 1H, H6a', $J_{5,6a'} = J_{6a',6b'} = 10.3$), 3.23 (ддд, 1H, H5', $J_{4,5'} 9.5$, $J_{5,6b'} 4.7$), 3.58 (дд, 1H, H6b'), 3.86 (дд, 1H, H4', $J_{3,4'} 9.5$), 4.16 (дд, 1H, H2', $J_{1,2'} 1.5$, $J_{2,3'} 3.6$), 4.16 (дд, 1H, H3, $J_{2,3} 9.0$, $J_{3,4} 9.5$), 4.35 (ддд, 1H, H5, $J_{4,5} 9.5$, $J_{5,6a} 5.5$, $J_{5,6b} 2.5$), 4.41 (дд, 1H, H6a, $J_{6a,6b} 11.8$), 4.55 (д, 1H, CH_2Ph , J 11.9), 4.56 (ддд, 1H, H2, $J_{1,2} 3.8$, $J_{2,\text{NH}} 9.0$), 4.59 (дд, 1H, H6b), 4.80 (д, 1H, CH_2Ph), 4.83 (д, 1H, H1'), 4.98 (д, 1H, H1), 5.17 (дд, 1H, H3'), 5.48 (дд, 1H, H4), 5.83 (д, 1H, NH), 7.20–7.65, 8.0–8.12 (м, 25H, C_6H_5). При хроматографии выделено также 360 мг (35%, аморфный) соединения (VIIIa), $[\alpha]_D^{28} +44^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.6 (E). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 2.31 (с, CH_3CO), 3.00–3.11 (м, 3H, H4', H5', H6a'), 3.69 (дд, 1H, H2', $J_{1,2'} 1.3$, $J_{2,3'} 3.7$), 3.68–3.72 (м, 1H, H6b'), 4.40–4.53 (м, 2H, H5, H6a), 4.46 (д, 1H, CH_2Ph , J 11.8), 4.56 (дд, 1H, H2, $J_{1,2} 3.4$, $J_{2,3} 10.4$), 4.68 (дд, 1H, H6b, $J_{5,6b} 2.7$, $J_{6a,6b} 11.9$), 4.77 (д, 1H, CH_2Ph), 4.98 (д, 1H, H1), 5.01 (д, 1H, H1'), 5.20 (дд, 1H, H3', $J_{3,4'} 10.0$), 5.23 (с, 1H, CHPh), 5.48 (дд, 1H, H3, $J_{3,4} 9.0$), 5.74 (дд, 1H, H4, $J_{4,5} 10.0$), 7.15–7.70, 7.97–8.20 (м, 25H, C_6H_5).

Бензил-3-О-(2-азидо-3-О-бензоил-2-дезоксид-β-D-маннопиранозил)-2-ацетамидо-4,6-ди-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (IX). Раствор 330 мг (0.37 ммоль) соединения (VIII) в 6 мл 70% водной AcOH выдерживали 2.5 ч при 70°C , упаривали и от остатка отгоняли толуол. Мето-

дом КХ в толуоле с ацетоном (0 → 20%) выделяли 280 мг (94%, аморфный) соединения (IX), $[\alpha]_D^{25} +27^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.15 (E). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 2.05 (с, CH_3CO), 3.24 (ддд, 1H, H5', $J_{4,5'} 8.7$, $J_{5,6a'} 4.2$, $J_{5,6b'} 2.3$), 3.38 (дд уш, 1H, H6a'), 3.52 (дд уш, 1H, H6b'), 3.84 (ддд, 1H, H4', $J_{3,4'} 8.7$, $J_{4,\text{OH}} 3.6$), 3.97 (дд, 1H, H2', $J_{1,2'} 0.8$, $J_{2,3'} 3.3$), 4.28 (дд, 1H, H3, $J_{2,3} 9.0$, $J_{3,4} 10.0$), 4.35–4.45 (м, 2H, H5, H6a), 4.53 (д, 1H, CH_2Ph , J 11.4), 4.52–4.66 (м, 2H, H2, H6b), 4.78 (д, 1H, CH_2Ph), 4.95 (дд, 1H, H1'), 4.96 (д, 1H, H1, $J_{1,2} 3.8$), 5.00 (дд, 1H, H3'), 5.48 (дд, 1H, H4, $J_{4,5} 10.0$), 5.89 (д, 1H, NH, $J_{2,\text{NH}} 0.9$), 7.31–7.65, 8.00–8.16 (м, 20H, C_6H_5).

2-Ацетамидо-3-О-(2-ацетамидо-4,6-ди-О-ацетил-3-О-бензоил-2-дезоксид-β-D-маннопиранозил)-4,6-ди-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопираноза (XI). Соединение (IX) (160 мг, 0.19 ммоль) в 5 мл метанола, содержащего 50 мкл Ac_2O , гидрировали 6 ч над 10% Pd/C . Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом, объединенный фильтрат упаривали и высушивали. Остаток растворяли в 5 мл ледяной AcOH и гидрировали над 10% Pd/C 20 ч при 40°C . Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом, объединенный фильтрат упаривали, от остатка отгоняли метанол и высушивали его в вакууме над NaOH . Остаток растворяли в 5 мл смеси пиридин– Ac_2O (1 : 1), смесь выдерживали 5 ч и упаривали, добавляя толуол. Методом КХ из остатка выделяли 30 мг (20%, аморфный) пер-О-ацильного производного (X) (R_f 0.4 (Г)).

К раствору соединения (X) в 2 мл ацетонитрила при -5°C добавляли 16 мкл (0.245 ммоль) диметиламина. Реакционную смесь выдерживали 1 сут при $\sim 20^\circ\text{C}$ и упаривали с добавлением толуола. Методом КХ в хлороформе с метанолом (0 → 5%) выделили 20 мг (69%, аморфный) соединения (XI), $[\alpha]_D^{28} -10^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.25 (Г). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 1.90, 1.95, 2.05, 2.07 (4 с, CH_3CO), 3.31–3.49 (м, 2H, H5', H6a'), 3.60 (дд, 1H, H6b', $J_{5,6b'} 4.8$, $J_{6a',6b'} 12.5$), 4.19 (дд, 1H, H3, $J_{2,3} 8.9$, $J_{3,4} 9.5$), 4.30–4.41 (м, 2H, H5, H6a), 4.47–4.58 (м, 2H, H2, H6b), 4.73 (ддд уш, H2', $J_{2,\text{NH}} 7.1$), 4.87 (д уш, 1H, H1'), 4.99–5.10 (м, 2H, H3', H4'), 5.28 (д, 1H, H1, $J_{1,2} 2.4$), 5.43 (дд, 1H, H4, $J_{4,5} 9.5$), 6.00 (д, 1H, NH, $J_{2,\text{NH}} 7.4$), 6.88 (д, 1H, NH'), 7.32–7.65, 7.88–8.12 (м, 15H, C_6H_5).

2-Ацетамидо-3-О-(2-ацетамидо-4,6-ди-О-ацетил-3-О-бензоил-2-дезоксид-β-D-маннопиранозил)-4,6-ди-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозилводородфосфонат, триэтиламониевая соль (XII). К раствору 22 мг (0.33 ммоль) имидазола в 0.5 мл ацетонитрила при перемешивании и охлаждении (0°C) добавляли 9 мкл (0.1 ммоль) PCl_3 и 50 мкл (0.35 ммоль) Et_3N , через 15 мин прибавляли

по каплям раствор 20 мг (0.023 ммоль) соединения (XII) в 0.5 мл ацетонитрила в течение 30 мин. Охлаждение прекращали, к смеси через 5 мин при 20°C прибавляли 0.2 мл 1 М ТЕАВ (рН 8). Раствор перемешивали 15 мин, упаривали, к полученному сиропу добавляли смесь пиридин-Et₃N (4 : 1) и упаривали раствор. Остаток растворяли в хлороформе, промывали ледяной водой, охлажденным 0.5 М ТЕАВ, высушивали, упаривали. Полученный хроматографически чистый продукт высушивали в вакууме над NaOH. Выход 20 мг (88%, аморфный), $[\alpha]_D^{28} + 25^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0.4 (Д).

Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.31 (т, 9H, CH₃CH₂), 1.87, 1.92, 2.01, 2.02 (4с, CH₃CO), 3.03 (квадруплет, 6H, CH₃CH₂), 3.45 (ддд, 1H, H5', J_{4',5'} 9.0, J_{5',6a'} 2.5, J_{5',6b'} 4.7), 3.49 (дд, 1H, H6a', J_{6a',6b'} 11.6), 3.57 (дд, 1H, H6b'), 4.33 (дд, 1H, H6a, J_{5,6a} 1.5, J_{6a,6b} 10.2), 4.34 (дд, 1H, H3, J_{2,3} 8.3, J_{3,4} 10.2), 4.42 (ддд, 1H, H5, J_{4,5} 8.6, J_{5,6b} 3.0), 4.52 (дд, 1H, H6b), 4.56 (ддд, 1H, H2, J_{1,2} 2.7, J_{2,NH} 8.3), 4.72 (ддд, 1H, H2', J_{1',2'} 1.5, J_{2',3'} 3.0, J_{2',NH'} 7.6), 4.99 (д, 1H, H1'), 4.96-5.10 (м, 2H, H3', H4'), 5.49 (дд, 1H, H4), 5.62 (дд, 1H, H1, J_{1,P} 8.2), 5.84 (д, 1H, NH), 7.11 (д, 1H, NH'), 7.80 (д, 1H, PH, J_{N,P} 640), 7.31-7.65, 7.82-8.10 (м, 15H, C₆H₅). Спектр ³¹P-ЯМР (CDCl₃): 0.78.

Бензил-2-ацетиамидо-3-О-(2-ацетиамидо-4-О-ацетил-3-О-бензоил-2-дезоксид-β-D-маннопиранозил)-4,6-ди-О-бензоил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (XIII). Соединение (IX) (160 мг, 0.19 ммоль) в 20 мл метанола, содержащего 100 мкл As₂O, 8 ч гидрировали над 10% Pd/C. Катализатор отфильтровывали, промывали метанолом, объединенный фильтрат упаривали, добавляли метанол и упаривали. Остаток высушивали в вакууме над NaOH, растворяли в 2 мл пиридина, добавляли 130 мг (0.38 ммоль) диметокситритилхлорида, выдерживали 1 сут и добавляли 0.5 мл As₂O. Реакционную смесь выдерживали 16 ч и выливали на лед. Водный слой экстрагировали хлороформом, объединенный экстракт промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃, водой, высушивали и упаривали. От остатка отгоняли толуол, растворяли в 2 мл 90% AcOH, выдерживали 2 ч. Раствор упаривали, к остатку добавляли толуол и упаривали. Методом КХ в бензоле с ацетоном (0 → 20%) выделили 87 мг (53%, аморфный) соединения (XIII), $[\alpha]_D^{30} + 12^\circ$ (с 0.5, хлороформ), R_f 0.5 (Г). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 1.89, 1.95, 1.99 (3с, CH₃CO), 2.90-3.08 (м, 2H, H5', H6a'), 3.18 (дд, 1H, H6b', J_{5',6b'} 1.5, J_{6a',6b'} 12), 4.07 (дд, 1H, H6a, J_{5,6a} 1.5, J_{6a,6b} 13.2), 4.17 (дд, 1H, H3, J_{2,3} 9.2, J_{3,4} 9.5), 4.27 (ддд, 1H, H5, J_{4,5} 9.3, J_{5,6b} 5.0), 4.38 (дд, 1H, H6b), 4.44 (ддд, 1H, H2, J_{1,2} 3.5, J_{2,NH} 9.2), 4.53 (д, 1H, CH₂Ph, J 11.8), 4.75 (д, 1H, CH₂Ph), 4.76 (ддд, 1H, H2', J_{1',2'} 1.4, J_{2',3'} 3.6, J_{2',NH'} 8.2), 4.91 (д, 1H, H1'), 4.98 (д, 1H, H1), 5.10 (дд, 1H,

H3', J_{3',4'} 10.0), 5.12 (дд, 1H, H4', J_{4',5'} 10.0), 5.52 (дд, 1H, H4), 5.88 (д, 1H, NH), 6.15 (д, 1H, NH'), 7.29-7.68, 7.85-8.18 (м, 20H, C₆H₅).

Бензил-2-ацетиамидо-3-О-(2-ацетиамидо-6-О-[2-ацетиамидо-3-О-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-маннопиранозил)-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозил]-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид, аммониевая соль (II). Смесь 20 мг (0.02 ммоль) H-фосфоната (XII) и 22 мг (0.025 ммоль) дисахарида (XIII) высушивали отгонкой с пиридином (3 × 0.5 мл). К раствору остатка в 0.25 мл пиридина при перемешивании прибавляли 8 мкл (0.06 ммоль) пивалоилхлорида и через 15 мин раствор 10 мг (0.04 ммоль) I₂ в 0.25 мл смеси пиридин-вода (95 : 5). Через 30 мин смесь разбавляли хлороформом, промывали 1 М Na₂S₂O₃, 1 М ТЕАВ, экстракт высушивали и упаривали. К раствору остатка в 0.5 мл тетрагидрофурана прибавляли 0.5 мл 0.1 М MeONa в метаноле и выдерживали 16 ч при 4°C, обрабатывали дауэксом 50W × 4 (H⁺), фильтрат немедленно нейтрализовали триэтиламино и упаривали, от остатка отгоняли метанол. Фосфодиэфир (II) выделяли ионообменной хроматографией на колонке (1 × 18 см) с фрактогелем TSK DEAE-650 (S) (HCO₃⁻) в линейном градиенте NH₄HCO₃ (0 → 0.33 М, скорость элюирования 1 мл/мин). Выход 8 мг (39%, аморфный), $[\alpha]_D^{25} + 14^\circ$ (с 1, вода), R_f 0.4 (Ж). Спектр ¹³C-ЯМР - см. таблицу. Спектр ¹H-ЯМР (D₂O): 1.96, 1.99, 2.00, 2.03 (4с, CH₃CO), 3.94-4.11 (м, 2H, H6a, H6b (B)), 4.37 и 4.40 (2 дд, 2H, H2 (B) и H2 (D), J_{1,2} 1.7, J_{2,3} 4.5), 4.53 (д, 1H, CH₂Ph, J 11.2), 4.70 (д, 1H, CH₂Ph), 4.82-4.88 (м, 3H, H1 (A), H1 (B), H1 (D)), 5.42 (дд, 1H, H1 (C), J_{1,2} 3.0, J_{1,P} 7.3), 7.38-7.45 (м, 5H, C₆H₅). Спектр ³¹P-ЯМР (D₂O): -1.22.

Авторы глубоко благодарны А.С. Шашкову за съемку и помощь в интерпретации спектров ¹H- и ¹³C-ЯМР и А.В. Игнатенко - за съемку спектров ³¹P-ЯМР.

Работа была выполнена при частичной финансовой поддержке International Science Foundation (гранты MMG000 и MMG300), а также РФФИ (грант 96-03-32473).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уткина Н.С., Елисеева Г.И., Николаев А.В., Шубаев В.Н. // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. С. 228-235.
2. Kenne L., Lindberg B. // The Polysaccharides. V. 2 / Ed. G.O. Aspinall. N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 287-363.
3. Westerduin P., Veeneman G.H., van der Marel G.A., van Boom J.H. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 6271-6274.
4. Николаев А.В., Шубаев В.Н., Кочетков Н.К. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. С. 1591-1593.

5. Nikolaev A.V., Ivanova I.A., Shibaev V.N., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1990. V. 204. P. 65–78.
6. Елисеева Г.И., Иванова И.А., Николаев А.В., Шибает В.Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1401–1411.
7. Уткина Н.С., Николаев А.В., Шибает В.Н. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 531–539.
8. Николаев А.В., Рябцева Е.В., Шибает В.Н., Кочетков Н.К. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1649–1659.
9. Nikolaev A.V., Ivanova I.A., Shibaev V.N. // Carbohydr. Res. 1993. V. 242. P. 91–107.
10. Шаиков А.С., Стрешинская Г.М., Наумова И.Б., Терехова Л.П., Алферова И.В. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 202–210.
11. Shashkov A.S., Streshinskaya G.M., Naumova I.B., Terekhova L.P., Alferova I.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1199. P. 96–100.
12. Nikolaev A.V., Rutherford T.J., Ferguson M.A.J., Brimacombe J.C. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1995. P. 1977–1987.
13. Nikolaev A.V., Chudek J.A., Ferguson M.A.J. // Carbohydr. Res. 1995. V. 272. P. 179–189.
14. Paulsen H., Helppap B., Lorentzen J.P. // Carbohydr. Res. 1988. V. 179. P. 173–197.
15. Sugawara T., Igarashi K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 172. P. 195–207.
16. Цветков Ю.Е., Бакиновский Л.В., Кочетков Н.К. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 1534–1549.
17. Kaji E., Lichtenthaler F.W., Mishino T., Yamane A., Zen S. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1988. V. 61. P. 1291–1299.
18. Kaji E., Lichtenthaler F.W., Osa Y., Takahashi K., Zen S. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1995. V. 68. P. 2401–2408.
19. Micheli E., Nicotra F., Panza L., Ronchetti F., Toma L. // Carbohydr. Res. 1985. V. 139. P. c1–c3.
20. David S., Malleron A., Dini C. // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. P. 193–200.
21. Classon H., Garegg P.J., Oscarson S., Tiden A.-K. // Carbohydr. Res. 1991. V. 216. P. 187–196.
22. Gross P.H., Jeanloz R.W. // J. Org. Chem. 1967. V. 32. P. 2759–2763.
23. Byramova N.E., Ovchinnikov M.V., Backinowsky L.V., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1983. V. 124. P. c8–c11.
24. Bundle D.R., Gerken M., Peters T. // Carbohydr. Res. 1988. V. 174. P. 239–251.
25. Bundle D.R., Jennigs H.J., Smith I.C.P. // Can. J. Chem. 1973. V. 51. P. 3812–3819.

Fragments of Biopolymers Containing Glycosyl Phosphate Residues. 13. The Synthesis of a Phosphodiester Fragment of the Cell Wall Polymer of *Actinoplanes* sp. INA 3697

I. A. Ivanova and V. N. Shibaev

Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

Abstract—Phosphodiester fragment $\text{ManNAc}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\alpha)\text{-P-6ManNAc}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\alpha)\text{Bn}$ of the cell wall polymer of the *Actinoplanes* sp. INA 3697 bacteria was synthesized by the glycosyl H-phosphonate method. The disaccharide derivatives containing *N*-acetyl- β -*D*-mannosamine, which are necessary for the condensation, were prepared via β -glucosylation of the corresponding protected derivative of *N*-acetyl-*D*-glucosamine with the subsequent conversion of the disaccharide into 2'-*O*-trifluoromethane sulfonate, introduction of the azide group with inversion at C-2', and reduction.

Key words: glycosyl H-phosphonate, *Actinoplanes*, cell wall, *N*-acetyl- β -*D*-mannoside.