



УДК 547.455.22'118.057

ФРАГМЕНТЫ БИОПОЛИМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ
ГЛИКОЗИЛФОСФАТОВI. ПРИМЕНЕНИЕ ФОСФОДИЭФИРНОГО ПОДХОДА ДЛЯ
СИНТЕЗА (1→6)-СВЯЗАННЫХ ГЛИКОЗИЛФОСФОСАХАРОВ
С ОСТАТКАМИ α -D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ- И
 α -D-МАННОПИРАНОЗИЛФОСФАТА*Шибяев В. Н., Джорунбекова Дж., Елисева Г. И.,
Бочетков Н. К.**Институт органической химии им. Н. Д. Зеллинского
Академии наук СССР, Москва*

Исследовано действие различных конденсирующих реагентов для получения с помощью фосфодиэфирного подхода гликозилфосфосахаров — фосфодиэфиров, построенных из двух остатков моносахарида, один из которых связан с фосфатной группой через С-1. Наилучшие результаты получены при использовании N,N'-дициклогексилкарбодимида (DCC). С его помощью синтезированы 6-O-(α -D-гликопиранозилфосфо)-D-глюкоза, ее *n*-нитрофенилгликозид, *n*-нитрофенил-6-O-(α -D-маннопиранозилфосфо)- β -D-гликопиранозид и аналогичное производное N-ацетилглюкозамина. При использовании 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида наблюдали побочные реакции расщепления гликозилфосфатной связи, а в случае аналогичного триазолида образование фосфодиэфира вообще не отмечалось. При использовании смеси трифенилфосфин — четыреххлористый углерод получен *n*-нитрофенил-6-O-(α -D-маннопиранозилфосфо)- β -D-гликозид, хотя и с меньшим выходом, чем при применении DCC. Приведены данные спектров ¹³C-ЯМР гликозилфосфосахаров.

Гликозидная связь между моносахаридными остатками является наиболее обычным типом межмономерной связи в углеводсодержащих биополимерах. Исследования последних лет показывают, что довольно широкое распространение имеет и иной тип межмономерной связи — фосфодиэфирная связь, образованная остатком гликозилфосфата и гидроксильной группой моносахаридного остатка [1—3]. Такой тип связи встречается во многих полимерах клеточной стенки и капсулы бактерий и дрожжей, а также входит в состав углеводных цепей некоторых гликопротеинов высших животных, выполняющих специализированные биологические функции. При этом остаток гликозилфосфата, участвующий в образовании фосфодиэфирной связи, нередко является частью антигенных детерминант или структурных фрагментов полимеров, участвующих во взаимодействии со специфическими рецепторами.

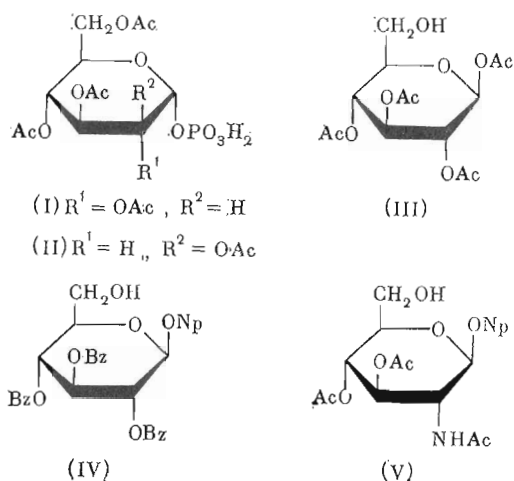
В связи с этим становится весьма интересной задача синтеза гликозилфосфосахаров — фосфодиэфиров, в которых атом фосфора связан с одним из моносахаридных остатков через полуацетальную гидроксильную группу при С-1, а с другим — через одну из спиртовых гидроксильных групп. Хотя методы синтеза фосфодиэфиров хорошо разработаны, особенно для синтеза олигонуклеотидов (см. обзор [4]), гликозилфосфаты заметно отличаются по своим химическим свойствам от фосфомоноэфиров спиртов (см., например, [5]), и вопрос синтеза гликозилфосфосахаров остается малоизученным [6—8]. Настоящим сообщением мы начинаем серию исследований, направленных на разработку эффективных методов получения гликозилфосфосахаров и более сложных фрагментов углеводсодержащих биополимеров, имеющих фосфодиэфирную связь.

Как и в случае олигонуклеотидов, возможно несколько подходов к синтезу гликозилфосфосахаров. Простейшим из них является фосфоди-

Сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, Np — *n*-нитрофенил, TPS-CI и TPS-Trt — 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид и -1,2,4-триазол.

эфирный метод — взаимодействие фосфомоноэфира и спиртового компонента в присутствии конденсирующих агентов, приводящих к превращению фосфомоноэфира в активированное производное. Достоинство этого подхода, широко применявшегося в синтезе олигонуклеотидов до конца 70-х годов, состоит в относительно легкой доступности исходных соединений. Задачей настоящей работы было исследование применения фосфодиэфирного подхода к синтезу гликозилфосфосахаров, в которых остатки моносахаридов связаны фосфодиэфирной связью через гидроксильные группы при С-6 и С-1', а в качестве фосфомоноэфира выступают гликозилфосфаты — производные нейтральных гексоз*.

Исходными производными гликозилфосфатов служили 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозилфосфат (I) и 2,3,4,6-тетра-О-ацетил- α -D-маннопиранозилфосфат (II). Первое из этих соединений было получено ацетилированием α -D-глюкопиранозилфосфата уксусным ангидридом по слегка видоизмененной методике [7]: реакцию проводили в присутствии ацетата тетрабутиламмония, избыток соли после ее превращения в ацетат пиридиния удаляли отгонкой. Синтез соединения (II), где побочное образование 1,2-циклофосфата при ацетилировании гликозилфосфата невозможно, был проведен действием уксусного ангидрида в пиридине [10].

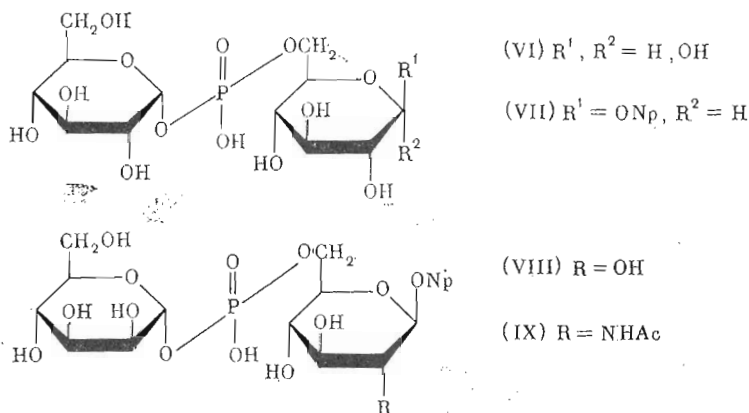


В первых опытах по исследованию фосфодиэфирного синтеза гликозилфосфосахаров в качестве исходного спиртового компонента служили 1,2,3,4-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопираноза (III). При синтезе этого соединения по методу [11] мы нашли более удобным использовать для деблокирования промежуточного 6-О-третилового эфира трифторуксусную кислоту.

Имея в виду дальнейшее применение гликозилфосфосахаров для получения конъюгатов — аффинных сорбентов и потенциальных искусственных антигенов, мы перешли далее к использованию защищенных *n*-нитрофенилгликозидов как спиртовых компонентов реакции. Из *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида последовательным тритилированием, бензоилированием и детритилированием с помощью трифторуксусной кислоты с общим выходом 73% был получен *n*-нитрофенил-2,3,4-три-О-бензоил- β -D-глюкопиранозид (IV). Данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР подтверждают приписываемую структуру. Ранее известный *n*-нитрофенил-2-ацетидамо-3,4-ди-О-ацетил-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (V) был получен по описанной схеме [12]. Для отщепления защитной *n*-метокситритильной группы от промежуточного соединения применяли метод, разработанный в нашей лаборатории [13], — обработку перхлоратом пиридиния при 37° С; отсутствие продуктов миграции ацетильных групп подтверждено данными спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР.

* Часть материала, вошедшего в настоящую работу, была опубликована в виде предварительного сообщения [9].

Исследование фосфодиэфирного синтеза гликозилфосфосахаров было начато с изучения в качестве конденсирующего агента N,N' -дициклогексилкарбодиимида (DCC). В литературе имеются данные об успешном применении DCC для получения метил-6- и метил-4-O-(α -D-маннопиранозилфосфо)- α -D-маннопиранозидов [6]. Взаимодействие фосфата (I) с 3 экв. спиртового компонента (III) и 8 экв. DCC проводили в абсолютном пиридине. По нашим данным, образование фосфодиэфира из производного гликозилфосфата протекает крайне медленно и требует для своего завершения 6–10 сут при 20°С. Ход реакции удобно контролировать электрофорезом на бумаге в 0,05 М ТЕАВ (рН 7,5); образующийся защищенный фосфодиэфир (E_n * 0,55) хорошо отделяется от исходного гликозилфосфата (I) (E_n 0,90) и его симметричного пиродифосфата (E_n 0,75), возникающего в качестве промежуточного продукта. Дальнейшая обработка реакционной смеси включала в себя добавление воды, выдерживание водно-пиридинового раствора для разложения активных промежуточных соединений и производных N-фосфорилмочевины и удаление избытка DCC и N,N' -дициклогексилмочевины. Было найдено, что для предотвращения автогидролиза образовавшихся фосфодиэфиров необходимо добавлять небольшое количество триэтиламина перед упариванием водно-пиридинового раствора. Деацетилирование продукта реакции было проведено действием метилата натрия в метаноле, и фосфодиэфир (VI) был выделен в виде триэтиламмониевой соли после очистки ионообменной хроматографией с выходом 69%.



В аналогичных условиях было проведено взаимодействие *n*-нитрофенилгликозида (IV) с ацетилированными гликозилфосфатами (I) и (II). Продукты реакции — *n*-нитрофенилгликозиды гликозилфосфосахаров (VII) и (VIII) были получены с выходами 65 и 50%.

Строение фосфодиэфиров (VI)–(VIII) подтверждено результатами периодатного окисления: для вещества (VI) наблюдали поглощение 6 моль периодата на 1 моль фосфата, для продуктов (VII) и (VIII) — 4 моль. При мягком кислотном гидролизе происходит расщепление гликозилфосфатной связи с образованием моносахарида и соответствующего фосфомоноэфира. Для соединений (VII) и (VIII) отношение *n*-нитрофенол (по УФ-поглощению) — общий фосфор — восстанавливающий сахар после мягкого кислотного гидролиза было близким к 1 : 1 : 1.

Приписываемая структура однозначно подтверждалась спектрами ^{13}C -ЯМР этих соединений. Сигналы атомов углерода C-6 и C-1', участвующих в образовании фосфодиэфирной связи, легко могут быть идентифицированы в спектре. Они смещены в сторону слабого поля на ~3 м.д. по сравнению с соответствующими сигналами незамещенных моносахаридов. Спин-спиновое взаимодействие с атомом фосфора приводит к расщеплению сигналов до дублетов с $^2J_{C,P} = 4-6,5$ Гц. Величина β -эффекта

* E_n — подвижность относительно пикриновой кислоты.

замещения мала, сигналы атомов углерода C-5 и C-2' расщеплены до дублетов ($^3J_{C, P} = 7-8,5$ Гц).

Таким образом, применение ДСС в качестве конденсирующего агента позволяет осуществить синтез гликозилфосфосахаров. Его использование оказалось успешным не только при введении в реакцию производных нейтральных гексоз, но и в том случае, когда в качестве спиртового компонента было применено производное N-ацетилглюкозамина — гликозид (V). Взаимодействие последнего с гликозилфосфатом (II) в присутствии ДСС привело к соответствующему фосфодиэфиру. После дезацетилирования действием раствора триэтиламина в водном метаноле гликозилфосфосахар (IX) был выделен с помощью препаративного электрофореза на бумаге с выходом 15%. Структура его подтверждена аналитическими данными и продуктами мягкого кислотного гидролиза.

Крайне медленное образование фосфодиэфиров в присутствии ДСС побудило нас исследовать применение для этой цели более энергичных конденсирующих агентов. В литературе имеется сообщение [7] об успешном использовании 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида (TPS-Cl) для получения производных 2-ацетиамидо-6-О-(α -D-глюкопиранозилфосфо)-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозы. Мы провели взаимодействие гидроксильного компонента (IV) с защищенными гликозилфосфатами (I) и (II) в аналогичных условиях. Анализ реакционных смесей с помощью ТСХ показал, что через 40–44 ч в смеси присутствовал практически единственный фосфорсодержащий продукт. После удаления ацильных защитных групп он был выделен с помощью ионообменной хроматографии с выходами 65–70% (по УФ-поглощению). Продукты исследованных реакций по своей электрофоретической подвижности (E_n 0,7) соответствовали фосфодиэфирам. По поведению при хроматографии на бумаге оба вещества были идентичны и отличались от соединений (VII) и (VIII). При периодатном окислении наблюдали поглощение 2 моль окислителя на 1 моль фосфора, при мягком кислотном гидролизе не происходило образования восстанавливающего сахара. Для вещества, полученного при взаимодействии фосфата (II), спиртового компонента (IV) и TPS-Cl, был снят спектр ^{13}C -ЯМР. В нем присутствуют сигналы атомов углерода, соответствующие остатку *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозо-6-фосфата, но отсутствуют сигналы, ожидаемые для остатка α -D-маннопиранозилфосфата; неожиданно в спектре был обнаружен сигнал, отвечающий CN_2OP -группе. На основании этих данных полученному веществу можно приписать структуру *n*-нитрофенил-6-О-(метилфосфо)- β -D-глюкопиранозид (X). Его образование, очевидно, является результатом побочного процесса, протекающего после первоначального образования фосфодиэфира. Этот процесс приводит к расщеплению гликозилфосфатной связи с образованием активного фосфорилирующего агента, последний взаимодействует далее с метанолом, используемым в данной процедуре [7] для разложения реакционной смеси.

Результаты этих опытов показывают, что TPS-Cl мало удобен для синтеза гликозилфосфосахаров, так как при его использовании наблюдались побочные реакции, приводящие к распаду продуктов. В поисках других возможностей для синтеза этих соединений с помощью фосфодиэфирного подхода мы на примере взаимодействия фосфата (II) и спиртового компонента (IV) изучили возможность использования двух других конденсирующих агентов, предложенных для синтеза олигонуклеотидов.

Применение 2,4,6-триизопропилбензолсульфонил-1,2,4-триазола — реагента, который был эффективным для синтеза некоторых диэфиров — производных нуклеотидов [14], в нашем случае не привело к положительным результатам. При анализе реакционной смеси с помощью ТСХ и электрофореза на бумаге даже после продолжительной инкубации не удалось обнаружить образования фосфодиэфира.

Более удачным оказалось использование реагента для синтеза фосфодиэфиров путем окислительно-восстановительной конденсации — смеси трифенилфосфина и четыреххлористого углерода; ранее было описано успешное применение этой смеси для получения цианэтиловых эфиров

нуклеозид-5'-фосфатов [15]. В этом случае в реакционной смеси уже через 6 ч при 20° С накапливаются заметные количества фосфодиэфира. После дезацилирования продукта реакции действием метилата натрия, экстракции эфиром для удаления трифенилфосфина и трифенилфосфин-оксида и ионообменной хроматографии *n*-нитрофенилгликозид фосфодиэфира (VIII) был выделен с выходом 18%. Этот результат демонстрирует принципиальную возможность применения реагентов последнего типа для синтеза гликозилфосфосахаров, хотя для оптимизации этого процесса требуются дополнительные исследования.

Авторы глубоко благодарны М. И. Стручковой и А. С. Шанкову за съемку спектров ЯМР и интерпретацию части спектров.

Экспериментальная часть

Фосфор определяли как описано в работах [16, 17], периодат — по методу [18], восстанавливающие сахара — по методу [19]. Носители для хроматографии и обнаружение веществ на пластинках и бумаге описаны в работе [20]. Общие системы для ТСХ: хлороформ — метанол — вода, 60 : 25 : 4 (А), 60 : 35 : 6 (Б) и 10 : 10 : 3 (В), хлороформ — метанол — 0,05 М водный ТЕАВ, 60 : 35 : 6 (Г). Для хроматографии на бумаге использовались системы: этанол — 1 М ацетат аммония (рН 7,5), 5 : 2 (Д), и изопропанол — конц. аммиак — вода, 6 : 3 : 1 (Е). Электрофорез на бумаге проводили в 0,05 М ТЕАВ, подвижность определяли относительно индикаторной кислоты ($E_{\text{и}}$). Мягкий кислотный гидролиз проводили 0,1 М HCl или 0,5 М уксусной кислотой в течение 15 мин при 100° С. Количество вещества во фракциях при ионообменном разделении определяли по УФ-поглощению при 300 нм (принимая для *n*-нитрофенилгликозидов ϵ_{300} 10800 [21]) или по количеству общего фосфора. Спектры ЯМР сняты на приборах Bruker WP-60 и WM-250, химические сдвиги приведены в миллионных долях, константы спин-спинового расщепления (J) — в герцах.

2,3,4,6-Тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозилфосфат, пиридиниевая соль (I). К раствору 0,26 ммоль пиридиниевой соли α -D-глюкопиранозилфосфата (из 100 мг дигидрата К-соли) в 1 мл воды добавляли 2 мл 1М водного раствора тетрабутиламмонийацетата (получен нейтрализацией раствора гидроксида), растворитель упаривали. Остаток высушивали отгонкой смеси толуол — спирт, 1 : 1 (3×5 мл), и толуола (3×5 мл), добавляли 2 мл уксусного ангидрида, встряхивали до гомогенности и оставляли на 16 ч при 20° С. Медленно добавляли 4 мл 50% водного пиридина, выдерживали 3 ч при 20° С, растворитель упаривали. Остаток упаривали с водой (3×10 мл) и метанолом (3×10 мл), растворяли в 10 мл 50% водного спирта и добавляли 6 г дауэкса 50W×8 (пиридиниевая форма). Встряхивали 4 ч при 20° С, фильтровали, фильтрат дополнительно пропускали через колонку (6×1,8 см) с пиридиниевой формой катионита и колонку промывали 50% водным спиртом. После упаривания растворителя и высушивания остатка упариванием с пиридином получали (I). Выход 87%, $E_{\text{и}}$ 0,88, R_f при ТСХ: 0,52 (Б), 0,45 (В), при хроматографии на бумаге: 0,74 (*n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 5 : 2 : 3).

2,3,4,6-Тетра-О-ацетил- α -D-маннопиранозилфосфат, пиридиниевая соль (II) получена ацелированием триэтиламмониевой соли α -D-маннопиранозилфосфата по прописи (а) для получения К-соли (II) в работе [10] и последующим переводом в пиридиниевую соль. $E_{\text{и}}$ 0,88, R_f 0,74 (А).

1,2,3,4-Тетра-О-ацетил- β -D-глюкопираноза (III). К раствору 2 г (3,4 ммоль) 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-6-О-третил- β -D-глюкопиранозы [11] в 5 мл хлороформа добавляли 10 мл 90% водного раствора трифторуксусной кислоты, выдерживали 30 мин при 20° С, добавляли охлажденный до 0° С насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (50 мл). Продукт извлекали хлороформом (4×50 мл), экстракт промывали водой (4×100 мл), высушивали сульфатом магния. После упаривания фильтрата получали продукт (III). Выход 85%, т.пл. 127–128° С (лит. 129–130° С [11]), R_f 0,84 (ТСХ, хлороформ — метанол, 5 : 1).

**n*-Нитрофенил-2,3,4-три-О-бензоил- β -D-глюкопиранозид (IV)*. К раствору 2,0 г (6,8 ммоль) *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид [22] в 50 мл абс. пиридина добавляли 2,78 г (10 ммоль) трифенилхлорметана, выдерживали 20 ч при 40° С. Главный продукт имел R_f 0,72 (ТСХ, хлороформ — метанол, 5 : 1). При –10° С медленно добавляли 2,8 мл (3,4 г, 24 ммоль)

хлористого бензоила, оставляли на 16 ч при 20° С. Смесь медленно добавляли при перемешивании и охлаждении к 100 мл насыщенного водного раствора бикарбоната натрия. Продукт извлекали хлороформом (3×50 мл), вытяжки промывали водой (3×100 мл) и упаривали. Остаток высушивали упариванием со смесью спирт — толуол (1:1) и толуолом, перемешивали 16 ч при 20° С с 50 мл петролейного эфира. Выпавшие кристаллы (R_f 0,32, ТСХ, гексан — ацетон, 3:2) отфильтровывали, промывали петролейным эфиром, растворяли в 10 мл хлороформа, добавляли 1,5 мл 99% трифторуксусной кислоты и выдерживали 20 мин при 20° С. Смесь нейтрализовали насыщенным раствором бикарбоната натрия, извлекали продукт хлороформом (200 мл), вытяжки промывали водой (5×100 мл), упаривали, остаток высушивали упариванием со смесью спирт — толуол (1:1) и толуолом, растворяли в смеси петролейный эфир — этилацетат (7:1). Хроматографией на колонке с силикагелем (петролейный эфир — этилацетат, от 7:1 до 3:2) выделили 2,6 г (73%) (IV), т.пл. 160–162° С (эфир — петролейный эфир). УФ-спектр: λ_{\max} 309 нм (ϵ 9200). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃): 2,84 (широкий с, 1H, OH), 3,76–4,11 (м, с широкими линиями, 2H, H-6, H-6'), 4,15 (ддд, 1H, H-5, $J_{5,4}$ 9,5, $J_{5,6'}$ 4,5, $J_{5,6}$ 2,5), 5,67 (д, 1H, H-4, $J_{1,2}$ 7,5), 5,73 (т, 1H, H-4, J 9,5), 5,95 (дд, 1H, H-2, $J_{2,3}$ 9,5, $J_{2,1}$ 7,5), 6,18 (т, 1H, H-3, J 9,5), 7,21 (д, 2H, H-2, H-6, C₆H₄NO₂, $J_{2,3}=J_{6,5}=8,0$), 7,36–7,72 и 7,92–8,12 (м, 15H, 3 C₆H₅CO), 8,28 (д, 2H, H-3, H-5, C₆H₄NO₂, $J_{3,2}=J_{5,6}=8,0$). Спектр ¹³C-ЯМР: 61,3 (C-6), 69,2 (C-4), 71,6 (C-2), 72,5 (C-3), 75,5 (C-5), 98,75 (C-1), 116,8 (C-2, C-6, C₆H₄NO₂), 125,9 (C-3, C-5, C₆H₄NO₂), 128,50; 128,55 и 128,63 (3 C-3, C-5, C₆H₅CO), 129,85 (3 C-2, C-6, C₆H₅CO), 130,0 (3 C-4, C₆H₅CO), 133,5; 133,6 и 133,9 (3 C-4, C₆H₅CO), 143,35 (C-4, C₆H₄NO₂), 161,35 (C-1, C₆H₄NO₂), 165,1; 165,8 и 166,1 (3 CO). Вычислено, %: С 65,05; Н 4,92; N 2,19. С₃₃H₂₇O₁₁N. Найдено, %: С 64,91; Н 4,40; N 2,28.

n-Нитрофенил-2-ацетамидо-3,4-ди-*O*-ацетил-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозид (V). Исходный *n*-нитрофенил-2-ацетамидо-3,4-ди-*O*-ацетил-2-дезоксид-β-*D*-глюкопиранозид получали по методу [12] и очищали хроматографией на колонке с силикагелем (хлороформ — ацетон, 4:1). Растворяли 376 мг (0,51 ммоль) исходного вещества в смеси 11 мл нитрометана и 5 мл абс. метанола, добавляли 240 мг перхлората пиридиния и выдерживали 4 ч при 37° С. Раствор упаривали до 5 мл, хроматографией на колонке с силикагелем (хлороформ — метанол, 10:1) выделяли 200 мг (91%) соединения (V), R_f 0,25 (ТСХ, хлороформ — ацетон, 4:1), т.пл. 235° С (лит. 234–236° С [12]). Спектр ¹H-ЯМР (C₆D₅N — CD₃OD): 2,05; 2,07 и 2,10 (3 с, 9H, CH₃CO), 3,95 (дд, 1H, H-6', $J_{6',6}$ 12, $J_{6',5}$ 5,5), 4,06 (дд, 1H, H-6, $J_{6,6'}$ 12, $J_{6,5}$ 2,5), 4,17 (ддд, 1H, H-5, $J_{5,4}$ 9,5, $J_{5,6'}$ 5,5, $J_{5,6}$ 2,5), 4,61 (дд, 1H, H-2, $J_{2,3}$ 9,5, $J_{2,1}$ 8,5), 5,54 (т, 1H, H-4, J 9,5), 5,91 (т, 1H, H-3, J 9,5), 5,97 (д, 1H, H-4, $J_{1,2}$ 8,5), 7,30 (д, 2H, H-2, H-6, C₆H₄NO₂, $J_{2,3}=J_{6,5}=10$), 8,14 (д, 2H, H-3, H-5, C₆H₄NO₂, $J_{3,2}=J_{5,6}=10$). Спектр ¹³C-ЯМР: 20,6 (CH₃COO), 23,0 (CH₃CON), 55,2 (C-2), 61,3 (C-6), 69,9 (C-4), 73,7 (C-3), 76,2 (C-5), 98,6 (C-1), 117,2 (C-2, C-6, C₆H₄NO₂), 126,2 (C-3, C-5, C₆H₄NO₂), 162,7 (C-1, C₆H₄NO₂), 170,2; 170,95; 174,5 (3 CO).

Взаимодействие гликозилфосфатов и производных моносахаридов в присутствии DCC. Смесь пиридиниевой соли тетраацетилгликозилфосфата (1 экв.) и защищенного моносахарида (2–3 экв.), предварительно высушенных над P₂O₅ и упариванием с пиридином, растворяли в абс. пиридине (0,1 М раствор по фосфату). Добавляли 8 экв. DCC и выдерживали 7–10 сут при 20° С. Добавляли 4 объема воды, оставляли на 3 ч при 20° С, отфильтровывали осадок и промывали его пиридином. Водно-пиридиновый раствор экстрагировали смесью эфир — петролейный эфир, 1:1 (4×20 мл), добавляли триэтиламин (2 экв.), раствор упаривали и остаток высушивали упариванием со смесью спирт — толуол, 1:1 (3×5 мл). Защитные группы удаляли по одной из описанных ниже процедур, продукты выделяли как описано в конкретных примерах.

Общие методики дезацилирования фосфодиэфиров. А. Остаток после:

упаривания обрабатывали 0,33 М раствором метилата натрия в метаноле в течение 1,5 ч при 20°С, раствор нейтрализовали дауэксом 50W×8 в пиридиниевой форме. Катионит отфильтровывали, промывали 50% водным спиртом, фильтрат упаривали, остаток растворяли в воде.

В. Остаток после упаривания растворяли в смеси метанол — триэтиламин — вода (2 : 1 : 1), выдерживали 16 ч при 20°С, упаривали, остаток растворяли в воде.

6-*O*-(α -*D*-Глюкопиранозилфосфо)-*D*-глюкоза (VI) получена по общей методике из 0,26 ммоль фосфата (I) и 0,7 ммоль спиртового компонента (III); реакцию проводили в течение 10 сут. При анализе смеси электрофорезом на бумаге главный продукт имел E_n 0,55, R_f 0,55 (A), 0,75 (B). После дезацелирования по методике А продукт выделяли ионообменной хроматографией на колонке (17×1,2 см) с дауэксом AG1×8 (HCO₃⁻), элюируя линейным градиентом ТЕАВ (0,02—0,5 М). Выход (VI) 69%, E_n 0,70, R_f 0,30 (B), 0,56 (D), 0,58 (E). Спектр ¹³C-ЯМР (Na-соль, D₂O): 61,7 (C-6'), 65,8 (д, C-6, $J_{C,P}$ 4,6), 70,5 (C-4, C-4'), 72,7 (д, C-2', C-5 α , $J_{C,P}$ 8,2 Гц), 72,8 (C-2 α), 73,9 (C-3 α , C-5'), 74,1 (C-3'), 75,5 (C-2 β), 76,0 (д, C-5 β , $J_{C,P}$ 8,2), 76,9 (C-3 β), 93,5 (C-1 α), 96,6 (д, C-1', $J_{C,P}$ 6,6), 97,1 (C-1 β).

n-Нитрофенил-6-*O*-(α -*D*-глюкопиранозилфосфо)- β -*D* - глюкопиранозид (VII) получен по общей методике из 0,13 ммоль фосфата (I) и 0,35 ммоль спиртового компонента (IV); реакцию проводили в течение 9 сут. Главный продукт имел E_n 0,54, R_f 0,70 (A), 0,79 (B). После дезацелирования по методике А продукт выделяли ионообменной хроматографией на колонке (15×1,2 см) с дауэксом AG1×8 (HCO₃⁻), элюируя 0,05 М ТЕАВ. Выход (VII) 65%, E_n 0,77, R_f 0,35 (A), 0,45 (B), 0,68 (D), 0,69 (E). Отношение *n*-нитрофенол — общий фосфор — восстанавливающий сахар после мягкого гидролиза 1 : 1 : 1. Спектр ¹³C-ЯМР (Na-соль, D₂O): 61,4 (C-6'), 65,3 (д, C-6, $J_{C,P}$ 5,5), 70,1; 70,3 (C-4, C-4'), 72,6 (д, C-2', $J_{C,P}$ 8,2), 73,8 (C-5'), 74,1 (C-2, C-3'), 76,3 (д, C-5, $J_{C,P}$ 7,3), 76,5 (C-3), 96,6 (д, C-1', $J_{C,P}$ 6,4), 100,7 (C-1), 117,8 (C-2, C-6, C₆H₄NO₂), 127,4 (C-3, C-5, C₆H₄NO₂).

n-Нитрофенил-6-*O*-(α -*D*-маннопиранозилфосфо)- β -*D* - глюкопиранозид (VIII) получен по общей методике из 32 мкмоль фосфата (II) и 64 мкмоль спиртового компонента (IV); реакцию проводили в течение 14 сут. Главный продукт имел E_n 0,58. После дезацелирования по методике А продукт выделяли ионообменной хроматографией на колонке (10×1,8 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (HCO₃⁻). Колонку промывали водой (50 мл), 0,02 М ТЕАВ (50 мл), продукт элюировали 0,05 М ТЕАВ. Выход (VIII) 50%, E_n 0,70, R_f 0,58 (D), 0,67 (E). Отношение *n*-нитрофенол — общий фосфор — восстанавливающий сахар после мягкого гидролиза 1 : 1 : 1. Спектр ¹³C-ЯМР (Et₃NH-соль, D₂O): 9,4 (CH₃), 48,1 (CH₂N), 62,0 (C-6'), 65,6 (д, C-6, $J_{C,P}$ 3,7), 67,6 (C-4'), 70,3 (C-4), 71,2 (C-3'), 71,7 (д, C-2', $J_{C,P}$ 7,4), 74,05 (C-5'), 74,85 (C-2), 76,3 (д, C-5, $J_{C,P}$ 8,3), 76,6 (C-3), 97,3 (д, C-1', $J_{C,P}$ 5,0), 100,8 (C-1), 117,9 (C-2, C-6, C₆H₄NO₂), 127,3 (C-3, C-5, C₆H₄NO₂).

n-Нитрофенил-2-ацетамидо-6-*O*-(α -*D* - маннопиранозилфосфо)-2-*dez* - окси- β -*D*-глюкопиранозид (IX) получен по общей методике из 15 мкмоль фосфата (II) и 20 мкмоль спиртового компонента (V); реакцию проводили в течение 12 сут. Главный продукт имел E_n 0,50, ТСХ, R_f 0,62 (Г). После дезацелирования по методике Б смесь разделяли с помощью препаративного электрофореза на бумаге Whatman ЗММ, получили (IX). Выход 15%, E_n 0,65, R_f 0,10 (Г). Отношение *n*-нитрофенол — общий фосфор — восстанавливающий сахар после мягкого гидролиза 1 : 0,98 : 0,99. В продуктах мягкого кислотного гидролиза идентифицированы манноза (R_f 0,32, БХ, *n*-бутанол — этанол — вода, 13 : 8 : 4) и фосфат *n*-нитрофенил-2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозида (E_n 1,16).

Взаимодействие фосфата (II) и защищенного глюкозида (IV) в присутствии различных конденсирующих агентов

1. Реакция с TPS-Cl. К раствору смеси 80 мкмоль пиридиниевой соли (II) и 160 мкмоль соединения (IV) в 2 мл абс. пиридина добавляли 36 мг (120 мкмоль) TPS-Cl. Анализ смеси через 48 ч при ~20°С показал при-

существование основного продукта с R_f 0,59 (А), 0,80 (В). Добавляли 25 мкл триэтиламина и 2 мл абс. метанола, оставляли на 16 ч при 20°С. После упаривания растворителя и дезацилирования по процедуре А продукты выделяли ионообменной хроматографией на колонке (16,5×1,2 см) с лауэксом AG1×8 (HCO₃⁻), элюируя 0,025 М ТЕАВ (100 мл) и 0,05 М ТЕАВ (300 мл). Промывание 0,1 М ТЕАВ дало основной продукт — 6-метилфосфат *n*-нитрофенил-β-D-глюкопиранозида (X). Выход 64%, E_n 0,70, R_f 0,28 (А), 0,52 (Д), 0,42 (Е). При мягком кислотном гидролизе восстанавливающий сахар не образуется. Спектр ¹³С-ЯМР (Et₃NH-соль, D₂O): 9,4 (CH₃), 48,1 (CH₂N), 53,85 (д, CH₂OP, $J_{C,P}$ 5,0), 65,3 (д, C-6, с малым J), 70,4 (C-4), 75,2 (C-2), 76,3 (д, C-5, $J_{C,P}$ 7,5), 76,7 (C-3), 100,8 (C-1), 117,9 (C-2, C-6, C₆H₄NO₂), 127,2 (C-3, C-5, C₆H₄NO₂), 143,7 (C-4, C₆H₄NO₂), 163,1 (C-1, C₆H₄NO₂).

2. Реакция с TPS-Tri. К раствору смеси 0,105 ммоль пиридиниевой соли (II) и 0,2 ммоль соединения (IV) в 0,8 мл абс. пиридина добавляли 100 мг (0,29 ммоль) TPS-Tri, выдерживали при 25°С 11 сут. Основным продуктом имел E_n 1,0, R_f 0,82 (А). Добавляли еще 100 мг TPS-Tri, выдерживали еще 3 сут, картина не изменилась. Добавляли 2 объема воды, выдерживали 2 ч, добавляли триэтиламин до pH 8, упаривали, остаток высушивали упариванием со смесью спирт — толуол, 1 : 1 (3×2 мл), и толуолом (3×2 мл). После дезацилирования по методике А получили продукт с E_n 1,25.

3. Реакция с Ph₃P и CCl₄. К раствору смеси 0,9 ммоль пиридиниевой соли (II) и 0,3 ммоль (IV) добавляли в 7 мл абс. пиридина 0,24 мл четыреххлористого углерода и 600 мг (2,3 ммоль) трифенилфосфина. Выдерживали 6 ч при 20°С. Анализ смеси ТСХ в системе (Г) показал, что основным продуктом имел R_f 0,70. Растворитель упаривали, остаток дезацилировали по методике А. Полученный раствор экстрагировали эфиром (5×10 мл) и хроматографией на DELE-целлюлозе DE-52, как описано выше, выделяли (VIII) с выходом 18%. Вещество идентично полученному с использованием DCC по хроматографическим данным и спектру ¹³С-ЯМР.

Взаимодействие фосфата (I) и спиртового компонента (IV) в присутствии TPS-Cl. Реакцию проводили как описано выше для реакции (II) с (IV), исходя из 65 мкмоль пиридиниевой соли (I) и 130 мкмоль соединения (IV). Выход 6-метилфосфата (X) 73%, продукт идентичен полученному выше по данным хроматографии и электрофореза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шубаев В. Н. Усп. биол. химии. 1982, т. 23, с. 64—101.
2. Costello A. J., Glonek T., Stodki M. E., Seymour F. R. Carbohydr. Res., 1975, v. 42, № 1, p. 27—37.
3. Kobata A. In: Biology of carbohydrates/Eds Ginsburg V., Robbins P. W. N. Y.—L.: Wiley, 1984, v. 2, p. 87—162.
4. Зарыгова В. Ф., Кнорре Д. Г. Усп. химии, 1985, т. 54, № 2, с. 313—337.
5. Шубаев В. Н., Елисеева Г. И. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 684—687.
6. Sawley T. N., Letters R. Carbohydr. Res., 1971, v. 19, № 3, p. 373—382.
7. Warren C. D., Nasir-ud-Din, Jeanloz R. W. Carbohydr. Res., 1978, v. 64, p. 43—56.
8. Ogawa T., Seta A. Carbohydr. Res., 1982, v. 110, № 1, p. C1—C4.
9. Кочетков Н. К., Шубаев В. Н., Джорунбекова Дж., Стручкова М. И. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 570—572.
10. Warren C. D., Jeanloz R. W. Biochemistry, 1973, v. 12, № 25, p. 5031—5037.
11. Уистлер Р. Л., Довер Л. У., Косик М. В. в кн.: Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975, с. 311—313.
12. Malta R. L., Barlow J. J. Carbohydr. Res., 1975, v. 43, p. 299—304.
13. Кочетков Н. К., Дмитриев В. А., Байрамови Н. Э., Николаев А. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1978, № 3, с. 652—656.
14. Englard T. E., Neilson T. Can. J. Chem., 1976, v. 54, № 11, p. 1714—1721.
15. Зарыгова В. Ф., Кузнецова Л. М., Ломакина Т. С., Старостин В. П. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н. Вып. 1, 1979, № 2, с. 93—100.
16. Данилов Л. Л., Уткина И. С., Шубаев В. П. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 780—782.
17. Шубаев В. Н., Елисеева Г. И., Краевская М. А., Кочетков Н. К. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 376—380.
18. Avigad G. Carbohydr. Res., 1969, v. 11, № 1, p. 119—123.
19. Park J. T., Johnson M. J. J. Biol. Chem., 1949, v. 181, № 1, p. 149—151.

20. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. Биорганик. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 109—113.
21. Borooah J., Leaback D. H., Walker P. G. Biochem. J., 1961, v. 78, № 1, p. 106—110.
22. Latham H. C., May E. L., Mossetig E. J. Org. Chem., 1950, v. 15, № 4, p. 884—889.

Поступила в редакцию
17.I.1986

**FRAGMENTS OF BIOPOLYMERS WITH GLYCOSYL PHOSPHATE RESIDUES.
I. USE OF PHOSPHODIESTER APPROACH FOR SYNTHESIS OF (1 → 6)-LINKED
GLYCOSYL PHOSPHOSUGARS DERIVED FROM α -D-GLUCOPYRANOSYL AND
 α -D-MANNOPYRANOSYL PHOSPHATES**

SHIBAEV V. N., JORUPBEKOVA J., ELISEYEVA G. I., KOCHETKOV N. K.

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

Several condensing reagents were tested in phosphodiester approach to synthesis of glycosyl phosphosugars, i. e. phosphodiester derived from glycosyl phosphate and another monosaccharide. The best results were obtained with N,N' -dicyclohexylcarbodiimide (DCC) which was successfully applied for synthesis of 6-O-(α -D-glycopyranosylphospho)-D-glucose, its *p*-nitrophenyl glycoside, *p*-nitrophenyl 6-O-(α -D-mannopyranosylphospho)- β -D-glycopyranoside and analogous derivative of N-acetyl-D-glucosamine. Use of 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride was not successful due to splitting of glycosyl-phosphate linkage; in the case of the analogous triazolide no phosphodiester was detected. Glycosyl phosphosugars could also be obtained through the reaction with Ph_3P/CCl_4 reagent, although with a lower yield. The data of ^{13}C -NMR spectra for the glycosyl phosphosugars were reported.