



УДК 547.485.3'913.3'118.057

СИНТЕЗ МОРАПРЕНИЛПИРОФОСФАТОЛИГОСАХАРИДОВ — ВОЗМОЖНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ БИОСИНТЕЗЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ *E. COLI* 08 И 09

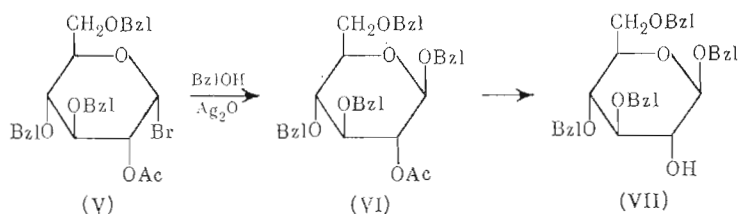
Торгов В. И., Шигаев В. И., Кочетков Н. К.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Синтезированы олигосахариды $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Glc}$, $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Glc}$, $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Glc}$, $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Glc}$ и их ацетаты, из которых по реакции Мак-Дональда получены α -гликозилфосфаты. Последние взаимодействием с морапсенилфосфомидазолидом превращены в морапсенилпирофосфатолигосахариды — возможные предшественники при биосинтезе O-специфических полисахаридов *E. coli* 08 и 09

Липополисахариды грамотрицательных бактерий являются специфическими антигенами, входящими в состав наружной бактериальной мембраны. O-Специфические полисахариды *E. coli* 08 и 09 представляют собой α -маннаны, построенные из повторяющихся олигосахаридных звеньев — трисахарида $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ (*E. coli* 08) или пентасахарида $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}$ (*E. coli* 09), соединенных $\alpha 1 \rightarrow 3$ -связями [1–4]. Биосинтез этих полимеров был исследован в последние годы К. Янпом с сотр. Оказалось, что сборка их полимерной цепи протекает путем последовательного присоединения моносахаридных остатков к невосстанавливающему концу цепи без образования промежуточных олигосахаридных соединений [5] в отличие от того, что наблюдалось при биосинтезе O-специфических полисахаридов сальмонелл [6]. Было показано, что маннаны *E. coli* 08 и 09 несут остаток глюкозы на восстанавливающем конце цепи [7, 8]. Это свидетельствовало об инициации биосинтеза этих полисахаридов глюкопиранозилпирофосфатполипренолом, что и было подтверждено [9, 10] как биохимически с помощью UDP-глюкозы, так и с использованием синтетического α -D-глюкопиранозилпирофосфатморапсепнола. Чрезвычайно интересной задачей при изучении биосинтеза 08- и 09-маннанов является установление типа и конфигурации маннозилглюкозной связи, возникающей при переносе первого остатка маннозы. Использование стандартных аналитических методов химии углеводов для решения этой задачи весьма проблематично. С другой стороны, для выяснения структуры узла связи в природном полимере кажется перспективным использование подхода [11], основанного на химическом синтезе возможных промежуточных дисахаридпирофосфатполипренолов и последующем сравнении эффективности этих соединений как акцепторов в биосинтетической системе *E. coli* 08 и 09.

Целью настоящей работы является синтез морапсенилпирофосфатдисахаридов — производных четырех изомерных α -D-маннопиранозил-D-глюкопираноз. Первым этапом был синтез дисахаридов $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Glc}$ (I), $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Glc}$ (II), $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ (III), $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Glc}$ (IV) и их полных ацетатов.



Спектры ¹³C-ЯМР соединений (I), (II), (IV), (XVI), (XX)–(XXIII) *

Атом	(I)		(II)		(XVI)			(IV)	
	α-Man	Glc	α-Man	Glc	α-Man	α-Glc	OMe	α-Man	α-Glc
C-1	100,9	97,2	102,1	97,2	102,4	100,2	56,2	100,8	97,15
C-2	98,7	90,5	102,0	93,45	71,5	72,5		71,1	93,3
	71,1	80,7	71,3	74,2					75,3
C-3	71,0	76,65	71,6	71,5	71,6	74,8		71,8	72,65
	71,55	75,7		83,6					77,1
C-4	71,65	72,45	68,0	81,0	67,9	77,5		67,95	74,2
	68,0	71,4		71,75					70,75
C-5	74,0	71,4	68,1	71,75	74,8	71,5		73,8	70,8
		76,9	74,05	76,9					75,3
C-6	62,2	72,6	62,1	72,5	62,1	61,9		62,1	71,0
		62,0		62,2					61,85
		62,0	62,0						66,85

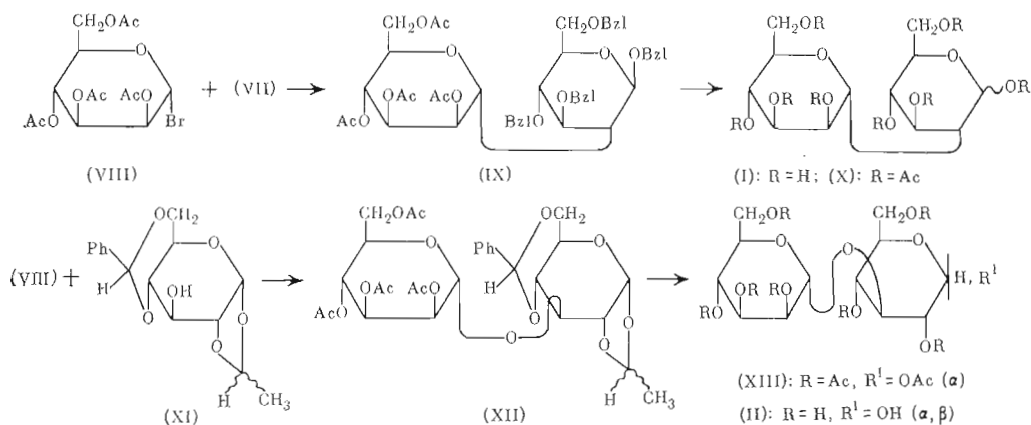
Атом	(XX)		(XXI)		(XXII)		(XXIII)	
	α-Man	α-Glc	α-Man	α-Glc	α-Man	α-Glc	α-Man	α-Glc
C-1	98,6	92,55	102,2	95,8	101,7	94,5	100,0	95,05
C-2	70,7	75,85	71,2	71,6	70,8	72,3	71,1	73,4
C-3	71,5	72,5	71,7	80,9	71,4	74,0	71,8	74,65
C-4	68,0	71,2	67,9	71,7	67,0	76,6	68,0	70,8
C-5	74,1	73,5	73,9	73,5	74,0	70,8	73,96	71,7
C-6	62,2	61,9	62,0	61,6	61,3	61,0	62,2	66,6

* Расщепление сигналов атомов углерода в остатке α-D-маннопиранозы вызвано различным влиянием α- и β-аномеров глюкопиранозы. Верхние значения отвечают β-аномеру глюкозы. Для соединений (XX)–(XXIII) J_{C1–p} 5,5 Гц, J_{C2–p} 6 Гц.

Взаимодействие 2-О-ацетил-3,4,6-три-О-бензил-α-D-глюкопиранозил-бромид (V) [12] с бензиловым спиртом в присутствии Ag₂O и молекулярных сит 4 Å привело к β-глюкозиду (VI) с выходом 67%. Строение продукта (VI) следовало из данных спектра ¹H-ЯМР, в котором присутствовали сигналы протонов О-ацетильной и четырех бензильных групп. Омыление ацетата (VI) метилом натрия в метаноле дало кристаллический продукт (VII) с выходом 80%. Полноту удаления О-ацетильной группы подтверждал спектр ¹H-ЯМР. Гликозидирование производного (VII) ацетобромманиозой (VIII) в условиях реакций Гельфериха приводит к дисахаридному производному (IX) с выходом 98%. В спектре ¹H-ЯМР соединения (IX) присутствовали сигналы протонов четырех ацетильных и четырех бензильных групп. В результате последовательного омыления и гидролиза производного (IX) с высоким выходом получается свободный дисахарид (I). Его строение подтверждено кислотным гидролизом, давшим только глюкозу и маннозу в соотношении 1:1, а также данными спектра ¹³C-ЯМР (таблица), в котором присутствовали сигналы углеродных атомов α-D-маннопиранозы (C-3 71,6 м. д., C-5 74,0 м. д.) и 2-О-замещенной α,β-D-глюкозы (C-2_α 76,65 м. д., C-2_β 80,7 м. д.) [13]. Дисахарид (I) индивидуален по данным ионообменной хроматографии в боратном буфере [14]. Его ацетилирование привело к ацетату (X), в спектре ¹H-ЯМР которого присутствовали сигналы протонов восьми ацетильных групп.

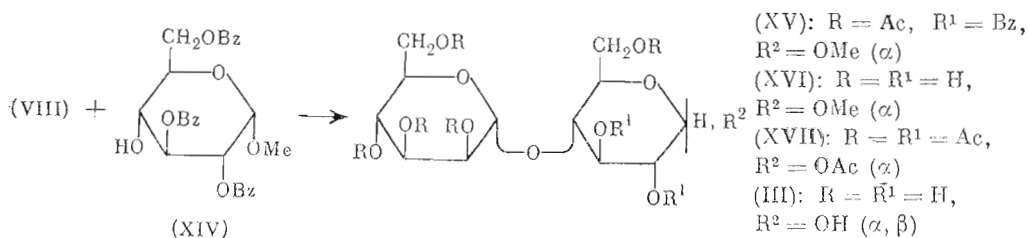
Для синтеза дисахарид (II) мы использовали 1,2-О-этилиден-4,6-О-бензилиден-α-D-глюкопиранозу (XI), примененную ранее для синтеза 1→3-гексозилглюкопираноз [15].

В результате гликозидирования этилиденного производного (XI) бромидом (VIII) в условиях реакции Гельфериха был получен замещенный дисахарид (XII) с выходом 46%. Несмотря на то что соединение (XI) является смесью эндо- и экзоизомеров по этилиденовой группе [15], выделение продукта реакции (XII) не вызывало затруднений. В спектре ¹H-ЯМР производного (XII) присутствовали сигналы протонов бензили-



деновой, этилиденовой (смесь *R*- и *S*-изомеров) и четырех *O*-ацетильных групп. С помощью мягкого ацетоллиза [15] дисахарид (XII) был превращен в полный ацетат (XIII) с выходом 48%. В спектре ¹H-ЯМР последнего присутствовали сигналы восьми *O*-ацетильных групп. Омыление ацетата (XIII) привело к дисахариду (II) с выходом 87%. Строение дисахарид (II) подтверждено кислотным гидролизом, давшим только глюкозу и маннозу в соотношении 1:1, а также данными спектра ¹³C-ЯМР (таблица), в котором легко идентифицировались сигналы атомов углерода остатков α-*D*-маннопиранозы (C-3 71,6 м. д., C-5 74,0 м. д.) и 3-*O*-замещенной α,β-*D*-глюкопиранозы (C-3_α 81,0 м. д., C-3_β 83,6 м. д.) [13]. Данные ионообменной хроматографии подтвердили индивидуальность дисахарид (II).

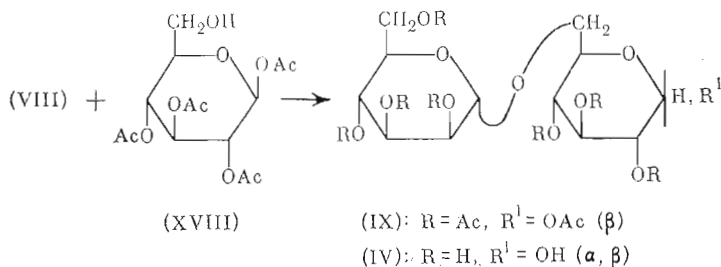
Для синтеза дисахарид (III) мы воспользовались «традиционным» синтоном — трибензоатом α-*D*-метилглюкозида (XIV) [16] в качестве гликозилируемого компонента. В результате его реакции с бромидом (VIII) было выделено дисахаридное производное (XV) с выходом 83%. В спектре ¹H-ЯМР соединения (XV) присутствовали сигналы протонов метоксильной, четырех ацетильных и трех бензоильных групп. Его омыление привело к метилглюкозиду (XVI), строение которого однозначно следовало из данных спектра ¹³C-ЯМР, где присутствовали сигналы атомов углерода остатков α-*D*-маннопиранозы (C-3 71,6 м. д., C-5 74,8 м. д.) и 4-*O*-замещенного метил-α-*D*-глюкопиранозид (C-1 100,2 м. д., C-4 77,5 м. д.) [13].



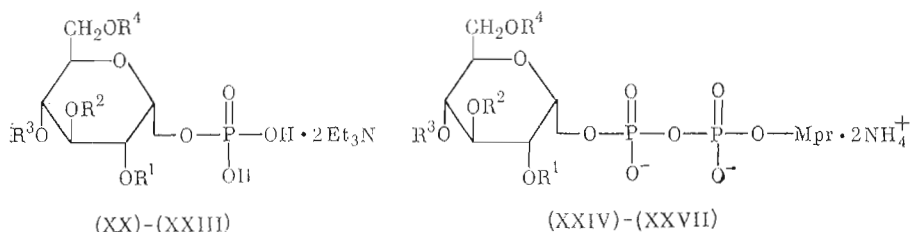
В результате ацетилирования производного (XVI) и последующего мягкого ацетоллиза получен октаацетат (XVII) с выходом 87%. Омыление (XVII) с высоким выходом привело к свободному дисахариду (III), который был гомогенен при ионообменной хроматографии и при кислотном гидролизе дал только маннозу и глюкозу в соотношении 1:1.

Гликозилирование тетраацетата (XVIII) [17] бромидом (VIII) в условиях реакции Гельфериха дало октаацетат (XIX) с выходом 87%. В спектре ¹H-ЯМР соединения (XIX) присутствовали сигналы протонов восьми ацетильных групп. При омылении ацетата (XIX) получен свободный дисахарид (IV) с выходом 90%. Строение (IV) подтверждено кислотным гидролизом, давшим только глюкозу и маннозу в соотношении 1:1, а также спектром ¹³C-ЯМР, в котором присутствовали сигналы атомов уг-

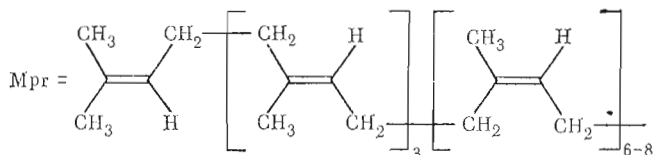
перода остатков α -D-маннопиранозы (C-3 71,8 м. д., C-5 73,8 м. д.) и 6-O-замещенной α,β -D-глюкопиранозы (C-6 66,85; 66,95 м. д.) [13]. Дисахарид (IV) был индивидуален по данным ионообменной хроматографии.



Следующим этапом работы был синтез α -гликозилфосфатов дисахаридов и морапренолпирофосфатдисахаридов. Сплавление ацетатов дисахаридов (X), (XIII), (XVII), (XIX) с H_3PO_4 в условиях реакции Мак-Дональда [18] с последующим омылением гидроокисью лития и ионообменной хроматографией на смоле Durrum DA \times 4 в 0,15 М триэтиламмонийбикарбонатном буфере привело к гликозилфосфатам (XX)–(XXIII) с выходом $\sim 50\%$. Лишь в случае синтеза гликозилфосфата (XXIII) наблюдался незначительный фосфороллиз α -1 \rightarrow 6-гликозидной связи, однако примесь гликозилфосфатов моносахаридов легко отделялась от целевого продукта с помощью ионообменной хроматографии.



XX), (XXIV): $\text{R}^1 = \alpha$ -D-Man,
 (XXI), (XXV): $\text{R}^2 = \alpha$ -D-Man,
 $\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{H}$
 (XXII), (XXVI): $\text{R}^3 = \alpha$ -D-Man,
 $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^4 = \text{H}$
 (XXIII), (XXVII): $\text{R}^4 = \alpha$ -D-Man,
 $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$



Строение гликозилфосфатов следовало из данных ^{13}C -ЯМР (см. таблицу). Так, наличие сигнала C-1 в районе 92 м.д. для соединения (XX) (β -эффект гликозилирования) и 95 м.д. для фосфатов (XXI)–(XXIII) с константой спин-спинового взаимодействия $J_{\text{C1-P}}$ 5,5 Гц однозначно указывает на α -конфигурацию гликозилфосфатной связи [19]. Отсутствие значительных изменений в химических сдвигах сигналов остальных углеродных атомов говорит о неизменности дисахаридной части молекулы в соединенных (XX)–(XXIII).

Синтез морапренолпирофосфатдисахаридов (XXIV)–(XXVII) осуществлен по описанной методике [20]. Целевые продукты были выделены с выходами 20–35% ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте метанол–ацетат аммония. По поведению при ионообменной хроматографии и ТСХ эти соединения соответствовали ранее описанным полипренолпирофосфатдисахаридам [21]. Идентификация характерных продуктов деградации при обработке производных (XXIV)–(XXVII) 40% водным фенолом (10 мин, 100°C) [20] также подтвердила их строение. Как и в работах [20, 22], целевые соединения (XXIV)–(XXVII) были

устойчивы при хранении в метанольных растворах, содержащих ацетат аммония.

Результаты биохимических исследований этих соединений будут опубликованы отдельно.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определены на столике Кофлера (ГДР) и не исправлены. Спектры $^1\text{H-NMR}$ снимали на приборе Varian DA-60-1L (США) с Me_4Si в качестве внутреннего стандарта (δ -шкала, м.д.); спектры $^{13}\text{C-NMR}$ — на приборе Bruker WP-60 (ФРГ) при частоте 15,05 МГц и Bruker WM-250 (ФРГ) при частоте 62,89 МГц; растворы веществ в $^2\text{H}_2\text{O}$, внутренний стандарт — MeOH (50,15 м.д. от Me_4Si). Растворы упаривали в вакууме при 40°C . Ионообменную хроматографию нейтральных углеводов проводили на колонке ($25 \times 0,46$ см) со смолой DA \times 4 (Dugan, США) в следующих условиях: 0,7 М натрий-боратный буфер, pH 7,7; 70°C , 0,8 мл/мин, детектирование с помощью 0,1% раствора орцина в конц. H_2SO_4 . Измеряли времена удерживания (R_t). Ионообменную хроматографию гликозилфосфатов осуществляли на колонке ($8 \times 0,9$ см) со смолой DA \times 4 в следующих условиях: 0,15 М триэтиламоний-бикарбонат, pH 7; 1,2 мл/мин. Кислотолабильный фосфат ($\text{P}_{\text{кл}}$) определяли согласно методике [21]. Электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN-16 (ГДР) в 0,05 М триэтиламонийбикарбонатном буфере, pH 8,5, обнаруживая фосфаты реагентом [23] и определяя хроматографическую подвижность относительно α -D-глюкозо-1-фосфата ($E_{\text{Glc 1P}}$). Морапренилпирофосфатолигосахариды выделяли на колонке (8×1 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (OAc-форма) (Whatman) в линейном градиенте концентрации ацетата аммония ($0 \rightarrow 0,125$ М) в метаноле (общий объем 150 мл), скорость элюирования 36 мл/ч, объем фракции 5 мл. Моносахаридный состав устанавливали после кислотного гидролиза 1 н. HCl (100°C , 16 ч). Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Kieselgel G-60, Merck, ФРГ). Системы растворителей: бензол — этилацетат, 1 : 1 (А), этилацетат — метанол, 6 : 4 (Б), бензол — эфир, 8 : 2 (В), этилацетат — метанол, 1 : 1 (Г), *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (Д), бензол — эфир, 7—3 (Е), бензол — эфир, 6 : 4 (Ж), хлороформ — метанол — вода, 60 : 25 : 4 (З). Для колоночной хроматографии применяли силикагель Silpearl (СССР). Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141 (Швеция). Ацетонитрил и пиридин перегоняли над CaH_2 . Удаление бензильных групп осуществляли гидролизом над 10% Pd/C в этаноле при 36°C . Хроматографию углеводов проводили на бумаге Filtrak FN 11 (ГДР) в системе Д, определяя подвижность веществ относительно D-глюкозы (R_{Glc}). В спектрах $^1\text{H-NMR}$ приведены наиболее характерные сигналы.

Данные элементного анализа (С, Н) соединений (VI), (VII), (X), (XII), (XIII), (XV), (XVII), (XIX) удовлетворительно совпадали с вычисленными значениями.

Бензил-2-О-ацетил-3,4,6-три-О-бензил- β -D-глюкопиранозид (VI). К суспензии 10 мл перегнанного бензильного спирта, 7 г Ag_2O , 2 г молекулярных сит 4 Å в 20 мл хлороформа при перемешивании прибавляли по каплям раствор 5 г бромиды (V) [12] в 20 мл хлороформа, перемешивали 2 ч, фильтровали, осадок промывали 50 мл хлороформа, объединенные фильтраты упаривали в вакууме при 100°C . Колоночной хроматографией остатка получали 3,5 г бензилглюкозида (VI). Выход 67%, $[\alpha]_D^{20} -16^\circ$ (с 10, CHCl_3), R_f 0,5 (В). Спектр $^1\text{H-NMR}$ (CCl_4): 7,2 (м, 20 H, ароматические протоны), 1,83 (с, 3 H, OAc).

Бензил-3,4,6-три-О-бензил- β -D-глюкопиранозид (VII). К раствору 3,4 г ацетата (VI) в 20 мл абс. метанола добавляли 0,5 мл 1 н. MeONa в метаноле, оставляли на 16 ч при 20°C , упаривали, остаток растворяли в 100 мл хлороформа, промывали водой (2×100 мл), органический слой отделяли, упаривали. Колоночной хроматографией остатка получали 2,62 г соединения (VII). Выход 80%, $[\alpha]_D^{20} -22,8^\circ$ (с 2, CHCl_3), R_f 0,3 (В),

т. пл. 70–71° С (толуол – гептан). Спектр ¹H-ЯМР (С²НCl₃): 7,2 (м, 20 Н, ароматические протоны).

Бензил-3,4,6-три-О-бензил-2-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-маннопиранозил)-β-D-глюкопиранозид (IX). К раствору 200 мг (0,36 ммоль) соединения (VII) и 110 мг (0,44 ммоль) Hg(CN)₂ в 1 мл ацетонитрила при перемешивании прибавляли по каплям в течение 30 мин раствор ацетобромманнозы (VIII) (получена из 217 мг (0,56 ммоль) пентаацетата D-маннозы по методике [24]) в 1 мл ацетонитрила, затем перемешивали 2 ч. Реакционную смесь разбавляли 50 мл хлороформа, органический слой отделяли, упаривали. Колоночной хроматографией остатка получали 315 мг дисахарида (IX). Выход 98%, $[\alpha]_D^{20} +21,1^\circ$ (с 3,6, CHCl₃), R_f 0,6 (B). Спектр ¹H-ЯМР (CCl₄): 7,2 (м, 20 Н, ароматические протоны), 2,0 (м, 12 Н, OAc).

2-О-α-D-Маннопиранозил-D-глюкопираноза (I). К раствору 310 мг защищенного дисахарида (IX) в 5 мл абс. метанола добавляли 4 капли 1 н. MeONa в метаноле, оставляли на 14 ч, обрабатывали смолой КУ-2 (H⁺), фильтровали, упаривали. Остаток растворяли при нагревании в 40 мл этанола и гидрировали (контроль ТСХ в системе Г). Катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Получали 110 мг дисахарида (I). Выход 90%, $[\alpha]_D^{20} +61,4^\circ$ (с 2,2, вода), R_f 0,5 (Г), R_{Glc} 0,6, R_t 15 мин. Спектр ¹³C-ЯМР см. в таблице.

1,3,4,6-Тетра-О-ацетил-2-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-маннопиранозил)-D-глюкопираноза (X). К раствору 110 мг дисахарида (I) в 2 мл абс. пиридина добавляли 2 мл уксусного ангидрида, оставляли на 14 ч, добавляли 1 мл метанола и упаривали в вакууме. Колоночной хроматографией остатка получали 200 мг ацетата (X). Выход 92%, $[\alpha]_D^{20} +34,3^\circ$ (с 2, CHCl₃). Спектр ¹H-ЯМР (С²НCl₃): 2,0 (м, 24 Н, OAc).

4,6-О-Бензильден-1,2-О-этилиден-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-маннопиранозил)-α-D-глюкопираноза (XII). К раствору 300 мг (1,02 ммоль) производного (XI) [15] и 300 мг (1,19 ммоль) Hg(CN)₂ в 1 мл ацетонитрила при перемешивании прибавляли по каплям в течение 30 мин раствор бромиды (VIII) (получен из 470 мг (1,2 ммоль) пентаацетата D-маннозы) в 0,5 мл ацетонитрила, перемешивали 1 ч, разбавляли 50 мл хлороформа, промывали 100 мл воды, органический слой отделяли и упаривали. Колоночной хроматографией остатка выделяли 290 мг соединения (XII). Выход 46%, $[\alpha]_D^{20} +65,4^\circ$ (с 2,9, CHCl₃), R_f 0,7–0,75 (A) (смесь R- и S-изомеров по этилиденовой группе [15]). Спектр ¹H-ЯМР (CCl₄): 7,3 (м, 5 Н, ароматические протоны), 2,0 (м, 12 Н, OAc), 1,44 и 1,34 (два д, 3 Н, J_{сн-сн} 5 Гц, изомеры СН₂ этилиденовой группы).

1,2,4,6-Тетра-О-ацетил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-маннопиранозил)-α-D-глюкопираноза (XIII). Ацетоллиз 250 мг соединения (XII) по методике [15] приводил после колоночной хроматографии к 130 мг дисахарида (XIII). Выход 48%, $[\alpha]_D^{20} +31,1^\circ$ (с 2,6, CHCl₃), R_f 0,45 (A). Спектр ¹H-ЯМР (С²НCl₃) 2,0 (м, 24 Н, OAc).

3-О-α-D-Маннопиранозил-D-глюкопираноза (II). К раствору 60 мг соединения (XIII) в 4 мл абс. метанола добавляли 4 капли 1 н. MeONa в метаноле, выдерживали 30 мин при 20° С (контроль ТСХ, система Б), обрабатывали смолой КУ-2 (H⁺), фильтровали и упаривали. Получали 26 мг дисахарида (II). Выход 87%, $[\alpha]_D^{20} +71,5^\circ$ (с 2,6, вода), R_{Glc} 0,7, R_f 0,4 (B), R_t 65 мин. Спектр ¹³C-ЯМР см. в таблице.

Метил-2,3,6-три-О-бензоил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-маннопиранозил)-α-D-глюкопиранозид (XV). К раствору 300 мг (0,6 ммоль) соединения (XIV) [16] и 500 мг (2 ммоль) Hg(CN)₂ в 1 мл ацетонитрила при перемешивании прибавляли по каплям в течение 30 мин раствор бромиды (VIII) (получен из 780 мг (2 ммоль) пентаацетата D-маннозы) в 1 мл ацетонитрила, перемешивали 18 ч при 20° С, разбавляли 50 мл хлороформа, промывали водой (2×50 мл), органический слой отделяли и упаривали. Колоночной хроматографией остатка получали 420 мг дисахарида (XV). Выход 83%, $[\alpha]_D^{20} +85,0^\circ$ (с 4,2, CHCl₃), R_f 0,5 (E). Спектр ¹H-ЯМР

(CCl₄): 8,2–7,2 (м, 15 Н, ароматические протоны), 3,4 (с, 3 Н, ОСН₃), 2,0 (м, 12 Н, ОАс).

Метил-4-О-α-D-маннопиранозил-α-D-глюкопиранозид (XVI). К раствору 400 мг соединения (XV) в 5 мл абс. метанола добавляли 6 капель 1 н. MeONa в метаноле, оставляли на 14 ч, обрабатывали смолой КУ-2 (H⁺), фильтровали и упаривали. Остаток растворяли в 1 мл метанола, добавляли 10 мл гексана, встряхивали, отделяли гексановый слой, метанольный раствор упаривали. Получали 156 мг гликозида (XVI). Выход 93%, $[\alpha]_D^{20} +110,1^\circ$ (с 3,2, вода), R_f 0,7 (B). Спектр ¹³C-ЯМР см. в таблице.

1,2,3,6-Тетра-О-ацетил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-маннопиранозил)-α-D-глюкопираноза (XVII). К раствору 150 мг гликозида (XVI) в 2 мл абс. пиридина добавляли 2 мл уксусного ангидрида, оставляли на 14 ч, добавляли 1 мл метанола и упаривали. Остаток растворяли в 5 мл уксусного ангидрида, добавляли 5 мл 4% раствора H₂SO₄ в уксусном ангидриде, оставляли на 4 ч при 20° С, смесь выливали на лед, перемешивали 1 ч, экстрагировали хлороформом (2×50 мл), органический слой промывали 100 мл насыщенного раствора NaHCO₃ в воде, водой (3×100 мл), органический слой отделяли и упаривали. Колоночной хроматографией остатка получали 250 мг ацетата (XVII). Выход 87%. $[\alpha]_D^{20} +37,4^\circ$ (с 2,5, CHCl₃). Спектр ¹H-ЯМР (C²HCl₃): 2,0 (м, 24 Н, ОАс).

4-О-α-D-Маннопиранозил-D-глюкопираноза (III). Омыление 100 мг ацетата (XVII) аналогично получению дисахарида (II) приводило к 46 мг дисахарида (III). Выход 88%, $[\alpha]_D^{20} +65,3^\circ$ (с 2, вода), R_t 15 мин.

1,2,3,4-Тетра-О-ацетил-6-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-маннопиранозил)-β-D-глюкопираноза (XIX). К раствору 400 мг (1,15 ммоль) производного (XVIII) [17], 300 мг (1,19 ммоль) Hg(CN)₂ в 1 мл ацетонитрила при перемешивании прибавляли по каплям раствор бромид (VIII) (получен из 500 мг (1,3 ммоль) пентаацетата-D-маннозы) в 1 мл ацетонитрила в течение 30 мин, перемешивали 1 ч, разбавляли 50 мл хлороформа, промывали 100 мл воды, органический слой отделяли и упаривали. Колоночной хроматографией остатка выделяли 530 мг дисахарида (XIX). Выход 68%, $[\alpha]_D^{20} +40^\circ$ (с 5,3, CHCl₃), R_f 0,5 (A). Спектр ¹H-ЯМР (C²HCl₃): 2,0 (м, 24 Н, ОАс).

6-О-α-D-Маннопиранозил-D-глюкопираноза (IV). 520 мг соединения (XIX) дезацетилировали, как описано для дисахарида (II), получали 240 мг дисахарида (IV). Выход 90%, $[\alpha]_D^{20} +68,2^\circ$ (с 2,2, вода). Лит. данные: $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$ (с 1,8, вода) [25]. R_{Glc} 0,5, R_f 0,45 (B), R_t 65 мин. Спектр ¹³C-ЯМР см. в таблице.

Общая методика синтеза гликозилфосфатов. В небольшую колбу с магнитной мешалкой помещали 40–60 мкмоль ацетата дисахарида, лиофилизовали 2 раза из абс. бензола, добавляли 160 мг безводной H₂PO₄, сплавливали при перемешивании в вакууме при 56–60° С в течение 2 ч, охлаждали, подщелачивали 5 мл 1 н. LiOH до pH > 10, оставляли при перемешивании на 14 ч. Реакционную смесь фильтровали, осадок промывали 10 мл 0,1 н. LiOH, объединенные фильтраты обрабатывали смолой дауэксом-50 (Pu⁺-форма) до pH ~ 8, фильтровали и упаривали. Ионнообменной хроматографией на Dugum BA×4 выделяли гликозилфосфат дисахарида (контроль по кислотолабильному фосфату). После упаривания триэтил-аммонийбикарбонатного буфера с водой получали гликозилфосфаты в виде триэтиламмониевой соли.

2-О-α-D-Маннопиранозил-α-D-глюкопиранозилфосфат (XX). Из 30 мг (44,2 мкмоль) соединения (X) получали 22 мкмоль фосфата (XX). Выход 50%, $[\alpha]_D^{20} +68,7^\circ$ (с 690 мкг P_i/мл, вода), E_{Glc} 1P 0,84, $P_{Glc}/Glc/Man=1:1:1$. Спектр ¹³C-ЯМР см. в таблице.

3-О-α-D-Маннопиранозил-α-D-глюкопиранозилфосфат (XXI). Из 38 мг (56 мкмоль) соединения (XIII) получали 29 мкмоль вещества (XXI). Выход 52%, $[\alpha]_D^{20} +75,5^\circ$ (с 890 мкг P_i/мл, вода), E_{Glc} 1P 0,84, $P_{Glc}/Glc/Man=1:0,9:1$. Спектр ¹³C-ЯМР см. в таблице.

4-О-α-D-Маннопиранозил-α-D-глюкопиранозилфосфат (XXII). Из

46 мг (67,8 мкмоль) соединения (XVII) получали 34 мкмоль фосфата (XXII). Выход 50%, $[\alpha]_D^{20} +98,9^\circ$ (с 670 мгт P₁/мл, вода), $E_{Glc\ 1P}$ 0,84, P_{1,2}/Glc/Man=1:1:1. Спектр ¹³C-ЯМР см. в таблице.

6-О-α-D-Маннопиранозил-α-D-глюкопиранозилфосфат (XXIII). Из 45 мг (66,4 мкмоль) соединения (XIX) получали 31,7 мкмоль вещества (XXIII). Выход 48%, $[\alpha]_D^{20} +65,7^\circ$ (с 500 мгт P₁/мл, вода), $E_{Glc\ 1P}$ 0,84, P_{1,2}/Glc/Man=1:1:1. Спектр ¹³C-ЯМР см. в таблице.

Морапренилпирофосфатдисахариды (XXIV)–(XXVII) получали по методике [21] со стандартной загрузкой 20 мкмоль триоктиламмониевой соли гликозилфосфата дисахарида и 5 мкмоль активированного фосфата морапренола. Выделение ключевых соединений осуществляли аналогично [21]. Получали: (XXIV), 3,16 мкмоль, 32%, R_f 0,1 (3); (XXV), 3,47 мкмоль, 35%, R_f 0,1 (3); (XXVI), 2,35 мкмоль, 24%, R_f 0,1 (3); (XXVII), 2,1 мкмоль, 21%, R_f 0,1 (3).

Фенольную деградацию (XXIV)–(XXVII) проводили аналогично описанному в работе [21]; $E_{Glc\ 1P}$ для всех образующихся гликозилпирофосфатов составила 0,73.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lüderitz O., Westphal O., Staub A. M., Nikaïdo H. In: Microbial Toxins/Eds Weinbaum G., Kadis S., Ajl S. J. N. Y.: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 369–433.
2. Jann K., Westphal O. In: The Antigens/Ed. Sela M. N. Y.: Acad. Press, 1975, v. 4, p. 1–125.
3. Reske K., Jann K. Eur. J. Biochem., 1972, v. 31, № 2, p. 320–328.
4. Prehm P., Jann K. Eur. J. Biochem., 1976, v. 67, № 1, p. 53–56.
5. Kormann H. J., Jann K. Eur. J. Biochem., 1975, v. 60, № 2, p. 587–601.
6. Nikaïdo H. In: Bacterial Membranes and Walls/Ed. Lieve L. N. Y.: Decker M., 1973, p. 131–208.
7. Flemming H. C., Jann K. Eur. J. Biochem., 1978, v. 83, № 1, p. 47–52.
8. Flemming H. C., Jann K. FEMS Microbiol. Lett., 1978, v. 4, № 1, p. 203–205.
9. Jann K., Goldemann G., Weisgerber C., Wolf-Ullrich C., Kanegasaki S. Eur. J. Biochem., 1982, v. 127, № 1, p. 157–164.
10. Weisgerber C., Jann K. Eur. J. Biochem., 1982, v. 127, № 1, p. 165–168.
11. Шибает В. Н., Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Торгов В. И., Роголашвили Л. М., Уткина Н. С. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 4, с. 564–566.
12. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Chizhov O. S., Klimov E. M., Malysheva N. N., Cherniak A. Ya., Bayratova N. E., Torgov V. I. Carbohydr. Res., 1974, v. 33, № 2, p. C5–C7.
13. Шапков А. С., Чижов О. С. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437–497.
14. Деревицкая В. А., Арбарский Н. П., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1975, т. 223, № 5, с. 1137–1139.
15. Торгов В. И., Кудашова О. В., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 114–119.
16. Williams J. M., Richardson A. C. Tetrahedron, 1967, v. 23, № 3, p. 1369–1378.
17. Helferich B., Klein W. Liebigs Ann. Chem., 1926, B. 450, S. 219–229.
18. MacDonald D. L. Methods Carbohydr. Chem., 1972, v. 6, p. 389–392.
19. O'Connor J. W., Nunez H. A., Barker R. Biochemistry, 1979, v. 18, № 3, p. 500–507.
20. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 88, № 2, p. 203–211.
21. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибает В. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 780–782.
22. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1718–1722.
23. Hanes C. S., Isherwood F. A. Nature (London), 1949, v. 164, № 4183, p. 1107–1109.
24. Беганели В. И., Овчинников М. В., Бакиновский Л. В., Кочетков Н. К. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1979, № 12, с. 2751–2758.
25. Gorin P. A. G., Perlin A. S. Can. J. Chem., 1961, v. 39, p. 2474–2485.

Поступила в редакцию
15.XI.1983

SYNTHESIS OF MORAPRENYL PYROPHOSPHATE OLIGOSACCHARIDES — POSSIBLE BIOSYNTHETIC PRECURSORS OF *E. COLI* 08 AND 09 O-ANTIGENS TORGOV V. I., SHIBAEV V. N., KOCHETKOV N. K.

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

Oligosaccharides Man α1→2 Glc, Man α1→3 Glc, Man α1→4 Glc, and Man α1→6 Glc have been synthesized. Using standard procedures, the oligosaccharides were converted to α-glycosyl phosphates and moraprenyl pyrophosphate oligosaccharides. The latter may serve as possible precursors in *E. coli* 08 and 09 O-antigen biosynthesis.