



УДК 547.458.07+576.851.49.097.1

СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ  
И ИХ ФРАГМЕНТОВ13\*. СИНТЕЗ ТРИСАХАРИДА — ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА  
О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ *SALMONELLA ANATUM*  
И *SALMONELLA NEWINGTON* С РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ  
В ОСТАТКЕ ГАЛАКТОЗЫТоргов В. И., Чекуничков В. Н., Шибает В. Н.,  
Кочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва

Осуществлен синтез трисахарида  $D\text{-Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{-L-Rhap}\alpha 1 \rightarrow 3\text{-D-[6-}^3\text{H}_1\text{]Gal}$  гликозированием бензил-2,4-ди-*O*-бензил-6-*O*-бензоил- $\beta\text{-D-[6-}^3\text{H}_1\text{]галактопиранозид}$  2,3-ди-*O*-ацетил-4-*O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- $\beta\text{-D-маннопиранозил})\text{-}\alpha\text{-L-рамнопиранозилбромид}$ ом и последующим удалением защитных групп. Полученный трисахарид идентифицирован сравнением с немеченым соединением.

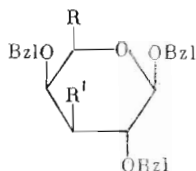
Для исследования специфичности ферментов биосинтеза *O*-антигенных полисахаридов грамотрицательных бактерий необходим набор синтетических субстратов — полипренилпирофосфатсахаров. Подобные биохимические эксперименты во многих случаях существенно облегчаются при использовании производных олигосахаридов, содержащих радиоактивную метку. В частности, при изучении полимеразы *O*-антигенных полисахаридов единственный метод контроля за протеканием реакции основан на использовании полипренилпирофосфатного производного олигосахаридного повторяющегося звена с радиоактивной меткой в остатке сахара. Поэтому синтез такого рода соединений особенно важен. В одной из предыдущих работ этой серии был описан синтез трисахарида (1) повторяющегося звена *O*-антигена *S. anatum* и *S. newington*, меченого тритием по С2 остатка маннопиранозы [1]. Однако этот путь применим лишь для получения олигосахаридов, содержащих дисахаридный фрагмент  $D\text{-Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{-L-Rhap}$ . Другая трудность в том, что после введения метки необходимо было провести еще 8 стадий синтеза до получения свободного трисахарида, общий выход которого в расчете на первое радиоактивное вещество составил лишь 7% [1].

Значительно больший интерес представляют меченые производные галактопиранозы, которые можно было бы использовать в гликозидном синтезе сразу после введения метки. Поскольку биосинтез целого ряда *O*-антигенов *Salmonella* инициируется полипренилпирофосфатгалактозой, такое меченое производное галактозы позволило бы синтезировать не

\* Сообщение 12 см. [2].

только различные олигосахариды, являющиеся промежуточными соединениями в биосинтезе, но и их аналоги.

Так как в *O*-антигенах бактерий *Salmonella* наиболее часто встречается остаток 3-*O*- и 3,6-ди-*O*-замещенной галактопиранозы, наиболее подходящим производным для введения метки и последующего гликозиллирования является бензил-2,4-ди-*O*-бензил- $\beta$ -*D*-галактопиранозид (II). Действительно, избирательное окисление гидроксильной группы при С6 до альдегидной и последующее восстановление  $\text{NaB}[^3\text{H}_4]$  позволяют легко ввести метку по С6, а избирательное бензоилирование галактозида (II) дает производное, приводящее к олигосахаридам, которые содержат 3-*O*-замещенную галактопиранозу на восстанавливающем конце [2]. Кроме того, непосредственное гликозиллирование меченого производного (II) открывает путь для получения разветвленных олигосахаридов [3].



(II)  $\text{R} = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{R}' = \text{OH}$

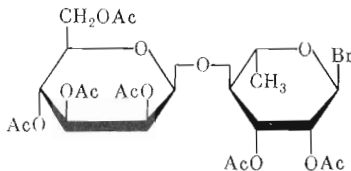
(III)  $\text{R} = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{R}' = \text{OAc}$

(IV)  $\text{R} = \text{CHO}$ ,  $\text{R}' = \text{OAc}$

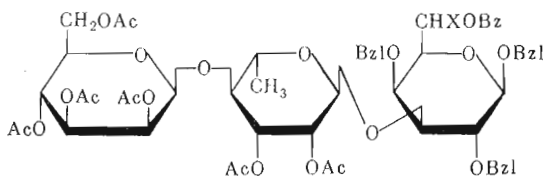
(V)  $\text{R} = \text{CH}[^3\text{H}]\text{OH}$ ,  $\text{R}' = \text{OH}$

(VI)  $\text{R} = \text{CH}[^3\text{H}]\text{OBz}$ ,  $\text{R}' = \text{OH}$

(VII)  $\text{R} = \text{CH}_2\text{OBz}$ ,  $\text{R}' = \text{OH}$

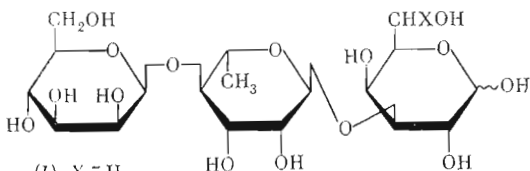


(VIII)



(IX)  $\text{X} = \text{H}$

(X)  $\text{X} = [^3\text{H}]$



(I)  $\text{X} = \text{H}$

(XI)  $\text{X} = [^3\text{H}]$

Избирательным тритилированием галактозида (II) избытком тритилхлорида в пиридине с последующим ацетилированием и детритилированием с выходом 60% синтезирован 3-*O*-ацетат (III). Присутствие одной ацетиальной и трех бензильных групп в галактозиде (III) следует из рассмотрения  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра. Наличие единственной гидроксильной группы при С6 показано в результате метилирования этого соединения диазومتаном в присутствии  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , последующего гидрогенолиза, восстановления и ацетилирования с идентификацией ацетата 6-*O*-метилдольцита методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

Окислением галактозида (II) реагентом дициклогексилкарбодимид — диметилсульфоксид — трифторацетат пиридина [4] гладко и с хорошим выходом получен альдегид (IV). Его строение подтверждено данными  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра, в котором присутствовали сигналы протонов альдегидной, ацетиальной и трех бензильных групп. Восстановление альдегида (IV)  $\text{NaB}[^3\text{H}_4]$  в этаноле привело к кристаллическому диолу (V) с выходом 71% (48%, считая на исходный спирт (III)) и уд. акт. 40,9 Ки/моль\*.

\* Включение метки с выходом 4,2%, считая на номинальную активность взятого  $\text{NaB}[^3\text{H}_4]$ ; этот результат может отражать низкое качество использованного препарата  $\text{NaB}[^3\text{H}_4]$ .

Галактозид (V) по данным ТСХ идентичен немеченому соединению (II), а при просчете хроматограммы обнаружена единственная радиоактивная зона. Избирательное бензоилирование галактозида (V) аналогично [2] с выходом 80% привело к меченому бензоату (VI), который по данным ТСХ и отсутствию депрессии температуры плавления пробы смешения идентичен немеченому соединению.

Поскольку для дальнейших биохимических исследований необходимо было иметь небольшие количества трисахарида (I) с высокой удельной активностью, перед нами встала задача отработки условий гликозилирования при проведении реакции с микроколичествами веществ (<0,1 ммоль). Модельные опыты по гликозилированию «холодного» бензоата (VII) бромидом (VIII), проведенные в условиях Гельфериха со стабилизацией раствора бромида 2,4,6-коллидином [5], показали, что проведение реакции в небольших объемах (концентрация около 0,2 М) и применение двукратного избытка гликозилирующего агента позволяет получать защищенный трисахарид (IX) с выходом 85%. Строение последнего подтверждено данными <sup>1</sup>H-ЯМР-спектра, в котором присутствовали сигналы протонов бензоильной, трех бензильных, шести ацетильных и одной С-метильной групп. После удаления защитных групп был выделен трисахарид (I), выход которого составил 90%, а его константы совпали с литературными данными.

Гликозилирование меченого галактозида (VI) в условиях, разработанных для немеченого аналога (IX), привело к выходом 85% к трисахариду (X), который был идентичен ранее синтезированному (IX) по данным ТСХ. После удаления защитных групп с выходом 90% выделен свободный трисахарид (XI). При ионообменной хроматографии в боратном буфере [7] трисахарида (XI) единственный радиоактивный пик совпал по времени удерживания с заведомым образцом трисахарида (I). Общий выход меченого трисахарида (XI), считая на агликоп (V), составил 62%.

Таким образом, в итоге проведенной работы удалось реализовать синтетическую схему получения радиоактивного трисахарида, в которой используется, по-видимому, минимально возможное число стадий между введением метки и получением целевого продукта. Все стадии протекают с достаточно высокими выходами. Исходные радиоактивные вещества (V) и (VI) достаточно устойчивы, так как нами не было обнаружено продуктов распада при хранении их в виде растворов в бензоле (~10 мг/мл) в течение года при 20°С. Это облегчает их возможное использование в синтезе других меченых фрагментов О-антигенов.

### Экспериментальная часть

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР снимали на приборе «Varian DA-60-IL» (США) в ССl<sub>4</sub> с Me<sub>4</sub>Si в качестве внутреннего стандарта. Оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin-Elmer 141» (Швеция). Растворы упаривали при 40°С в вакууме. Ионообменную хроматографию (ИОХ) нейтральных углеводов проводили на жидкостном хроматографе 71-100 А (ЧССР) на смоле DA×4 (Durrum, США) в натрий-боратном буфере (коллонка 13×0,5 см, 0,5 М, pH 8,5; 55°С, 30 мл/ч); ТСХ — на пластинках с закрепленным слоем SiO<sub>2</sub> (Merck, ФРГ). Для колоночной хроматографии применяли силикагель L 100/160 мкм (Chemapol, ЧССР). БХ проводили на бумаге FN-11 (ГДР). Радиоактивность определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике «Isoscap-300» (США). Для определения радиоактивности растворенных в органических растворителях веществ (V), (VI) и (X) и зон при ТХС использовали толуольный сцинтиллятор, для трисахарида (XI), растворимого в воде, — диоксановый сцинтиллятор [4]. Системы растворителей для хроматографии: бензол — этилацетат, 7 : 3 (А), бензол — этилацетат, 1 : 1 (Б); хлороформ — ацетон, 95 : 5 (В), бензол — этилацетат, 8 : 2 (Г), *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (Д).

Ацетонитрил и пиридин перегоняли над  $\text{CaH}_2$ . Удаление бензильных групп осуществляли гидрогенолизом над 10%  $\text{Pd/C}$  в этаноле при 36°С. Метилирование диазотетаном в присутствии  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  проводили аналогично работе [8]. Анализ ацетатов частично метилированных полиолов проводили как описано в [9].  $\text{NaB}[^3\text{H}_4]$  предоставлен конторой «Изотоп».

*Бензил-3-О-ацетил-2,6-ди-О-бензил-β-D-галактопиранозид (III)*. Раствор 300 мг (1,7 ммоль) бензил-2,4-ди-О-бензил-β-D-галактопиранозида (II) [10] и 1,1 г (3,4 ммоль) тритилхлорида в 10 мл пиридина нагревали 2 ч при 90°С, охлаждали, добавляли 5 мл уксусного ангидрида, оставляли на 12 ч. К реакционной смеси добавляли 5 мл этанола, упаривали, остаток многократно вновь упаривали с гептаном. Остаток растворяли в 20 мл хлороформа, к раствору добавляли 2 мл 99% трифторуксусной кислоты и выдерживали 30 мин при 20°С. Раствор промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (1×20 мл), водой (3×20 мл), упаривали, остаток хроматографировали на колонке (элюция хлороформ→ацетон). Выход 600 мг (60%);  $R_f$  0,4 (А);  $[\alpha]_D^{20} +13,6^\circ$  (с 1; хлороформ). Найдено, %: С 70,82; Н 6,49.  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_7$ . Вычислено, %: С 70,73; Н 6,50.  $^1\text{H-NMR}$  (δ, м.д.): 7,17 (15 Н, м, ароматические протоны), 1,78 (3 Н, с, О—Ас).

*Бензил-3-О-ацетил-6-альдо-2,4-ди-О-бензил-β-D-галактопиранозид (IV)*. Раствор 240 мг (0,5 ммоль) спирта (III) в 2 мл сухого бензола лиофилизуют, остаток растворяли в 1,6 мл смеси бензол—ДМСО, 1 : 1; добавляли 300 мг (1,5 ммоль) дициклогексилкарбодимиды, 0,06 мл пиридина и 0,05 мл трифторуксусной кислоты и перемешивали 16 ч при 20°С. К раствору добавляли 2 мл раствора щавелевой кислоты в метаноле (1 г в 10 мл), после прекращения выделения газа раствор фильтровали, осадок на фильтре промывали бензолом (2×25 мл), объединенный фильтрат промывали водой (4×100 мл), сушили, упаривали, остаток хроматографировали на колонке (элюция бензол→этилацетат). Выход 150 мг (62%);  $R_f$  0,5 (А);  $[\alpha]_D^{20} +13,2^\circ$  (с 2; хлороформ). ПМР (δ, м.д.): 9,55 (1 Н, с, альдегидный протон), 7,20 (15 Н, м, ароматические протоны), 1,85 (3 Н, с, О—Ас).

*Бензил-2,4-ди-О-бензил-β-D-[6- $^3\text{H}_1$ ]галактопиранозид (V)*. К раствору 140 мг альдегида (IV) в 5 мл этанола прибавляли при перемешивании 34 мг  $\text{NaB}[^3\text{H}_4]$  (200 мКи), 0,15 мл воды. Через 12 ч к раствору прибавляли 10 мл метанола, денонизовали катионитом КУ-2 ( $\text{H}^+$ ), смолу отфильтровывали, промывали метанолом, объединенный фильтрат упаривали с метанолом (5×10 мл). Остаток хроматографировали на колонке (элюция бензол→этилацетат). Выход 100 мг (71%); 9,1 мКи, кристаллы, уд. акт. 40,9 Ки/моль;  $R_f$  0,5 (Б), совпадает по подвижности с «холодным» галактозидом (II), вся радиоактивность сосредоточена в этой зоне.

*Бензил-2,4-ди-О-бензил-6-О-бензоил-β-D-[6- $^3\text{H}_1$ ]галактопиранозид (VI)*. К раствору 40 мг (3,64 мКи, 0,08 ммоль) полученного выше галактозида (V) в 2 мл пиридина при -40°С прибавляли 0,013 мл хлористого бензола и выдерживали 12 ч при 20°С. Раствор многократно упаривали с гептаном, растворяли с хлороформе (40 мл), промывали водой (4×30 мл), упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (элюция бензол→этилацетат). Выход 40 мг (81%); т. пл. 76—77°С (толуол—гептан) [2]: 2,95 мКи;  $R_f$  0,8 (В, Г).

*Бензил-2,4-ди-О-бензил-6-О-бензоил-3-О-[2,3-ди-О-ацетил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозил]-β-D-галактопиранозид (IX)*. К раствору 30 мг (0,07 ммоль) гликозида (VII), 25 мг  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  в 0,5 мл ацетонитрила по каплям при перемешивании в течение 30 мин прибавляли раствор бромида (VIII) (получен из 100 мг (0,16 ммоль) 1,2,3-три-О-ацетил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозы [11] аналогично [5]) и 0,01 мл 2,4,6-коллинды в 0,5 мл ацетонитрила, перемешивали дополнительно 30 мин, добавляли 25 мл хлороформа, промывали водой (3×25 мл), упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (элюция толуол→этилацетат).

Выход 50 мг (85%),  $R_f$  0,35 (Г);  $[\alpha]_D^{20}$   $-50,8^\circ$  (с 1; хлороформ), ПМР (б, м.д.): 8,0–7,0 (20 H, ароматические протоны), 2,0 (18 H, O–Ac), 1,3 (3 H д,  $J_{5,6}$  4 Гц, C–CH<sub>3</sub> рамнозы).

3-О-[4-О-(β-D-Маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозил] - D - галактоза (I). Омывляли 50 мг защищенного трисахарида (IX) 2 мл 0,1 н. метилата натрия в метаноле, деионизовали КУ-2 (H<sup>+</sup>), смолу отделяли, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 5 мл этанола и гидрировали над 10% Pd/C, катализатор отфильтровывали, промывали 50 мл 50% этанола, объединенный фильтрат упаривали. Выход 20 мг (91%);  $[\alpha]_D^{20}$   $-15,0^\circ$  (с 1; вода). Лит. данные:  $[\alpha]_D^{20}$   $-15,2^\circ$  [5];  $-13^\circ$  [6]; ВХ:  $R_{Gal}$  0,39 (Д); ИОХ:  $\tau_R$  55 мин.

Бензил - 2,4 - ди-О-бензил-6-О-бензоил-3-О-[2,3-ди-О-ацетил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозил]-β-D - [6-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]-галактопиранозид (X) синтезировали гликозилированием 30 мг (2,21 мКи) галактозида (V) в условиях, приведенных для немеченого соединения (IX). Выход 50 мг (85%); 1,84 мКи;  $R_f$  0,35 (Г), вся радиоактивность в этой зоне.

3 - О-[4-О-(β-D-маннопиранозил)-α-L-рамнопиранозил] - D-[6-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]галактозу (XI) получали деблокированием 50 мг защищенного трисахарида (X) в условиях, описанных для получения немеченого соединения (I), с выходом 20 мг (91%); 1,65 мКи; ИОХ:  $\tau_R$  55 мин, вся радиоактивность в этом пике; удельная активность 40,9 Ки/моль;  $[\alpha]_D^{20}$   $-16^\circ$  (с 1; вода).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шлябаев В. Н., Чекунчиков В. Н., Кочетков Н. К. (1978) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2124–2128.
2. Торгов В. И., Шлябаев В. Н., Шашков А. С., Кочетков Н. К. (1980) Биоорган. химия, 6, 1860–1871.
3. Кочетков Н. К., Малышева Н. Н., Торгов В. И., Климов Е. М. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 654–658.
4. Pfitzner K. E., Moffatt J. G. (1963) J. Amer. Chem. Soc., 85, 3027–3028; (1965) 87, 5661–5678.
5. Betaneli V. I., Ovchinnikov M. V., Baskinovskiy L. V., Kochetkov N. K. (1980) Carbohydr. Res., 84, 214–224.
6. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2578–2581.
7. Деревицкая В. А., Арбатский П. П., Кочетков Н. К. (1975) Докл. АН СССР, 223, 1137–1139.
8. Деферари Дж. О., Грос Е. Г., Тилл И. М. Е. (1975) в кн.: Методы исследования углеводов (под ред. А. Я. Хорлина), с. 279–280, «Мир», М.
9. Jansson P. E., Kenne L., Lindgren H., Lindberg B., Lönngren J. (1976) A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates, pp. 1–75, University of Stockholm Chem. Comm.
10. David S., Johnson C. A., Vejrierres A. (1973) Carbohydr. Res., 28, 121–124.
11. Behault G. M., Dutton G. G. S. (1974) Carbohydr. Res., 37, 309–319.

Поступила в редакцию  
1.VII.1980

#### SYNTHESIS OF BACTERIAL ANTIGENIC POLYSACCHARIDE AND THEIR FRAGMENTS. 13. SYNTHESIS OF TRISACCHARIDE REPEATING UNIT OF O-ANTIGENIC POLYSACCHARIDES FROM SALMONELLA ANATUM AND SALMONELLA NEWINGTON WITH RADIOACTIVE LABEL AT GALACTOSE RESIDUE

TORGOV V. I., CHEKUNCHIKOV V. N., SHIBAEV V. N., KOCHETKOV N. K.

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

A trisaccharide, D-Manβ1→4-L-Rhapα1→3-D-[6-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]Gal, has been synthesized by glycosylating benzyl-2,4-di-O-benzyl-6-O-benzoyl-β-D-[6-<sup>3</sup>H<sub>1</sub>]galactopyranoside with 2,3-di-O-acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-mannopyranosyl)-α-L-rhamnopyranosylbromide followed by deblocking. The trisaccharide thus obtained was identified by comparison with the respective unlabeled compound.