



УДК 547.458.27'435.057:542.952

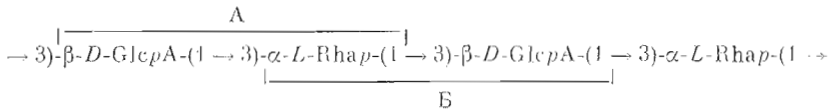
СИНТЕЗ 2-АКРИЛАМИДОЭТИЛГЛИКОЗИДОВ 3-О-(β-D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА)-α-L-РАМНОЗЫ И 3-О-(α-L-РАМНОПИРАНОЗИЛ)-β-D-ГЛЮКОПИРАНОУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И СОПОЛИМЕРНЫХ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕНОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Черняк А. Я., Кононов Э. О., Кочетков Н. К.

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

Осуществлен синтез дисахаридных повторяющихся звеньев *D*-GlcA-(β1→3)-*L*-Rha (фрагмент А) и *L*-Rha-(α1→3)-*D*-GlcA (фрагмент В) капсулярного полисахарида (K54) уropатогенного штамма *Escherichia coli* 06:K54:H10. Синтез фрагмента А включает в себя гликозилирование метил-2,4-ди-*O*-бензоил-α-*L*-рамнопиранозида, последующий ацетилиз метилглюкозида, превращение в 2-бензилоксикарбониламиноэтилгликозид, удаление защитных групп и переход к 2-акриламидоэтилгликозиду на заключительных стадиях. В синтезе фрагмента В использовано селективное раскрытие лактозного цикла в (2-азидоэтил)-2,4-ди-*O*-ацетил-β-*D*-глюкопиранозидуруноно-6,3-лактоне. Последующие стадии включают в себя рамнозилирование по освободившейся 3-ОН-группе, переход к 2-акриламидоэтилгликозиду и удаление защитных групп. Фрагменты А и В (в виде 2-акриламидоэтилгликозидов) превращены в искусственные антигены сополимерного типа.

Недавно установлена структура капсулярного полисахаридного антигена (антигена K54) уropатогенного штамма *Escherichia coli* 06:K54:H10 [1], углеводная цепь которого состоит из дисахаридных повторяющихся звеньев типа А или В:



Часть повторяющихся звеньев несет остатки гидроксаминокислот (*L*-серина и *L*-треонина), соединенных амидной связью с карбоксильной группой остатка глюкуроновой кислоты. Дисахарид 3-О-(β-*D*-глюкопиранозилурановая кислота)-*L*-рамноза был выделен также из капсулярного полисахарида (антиген K26) *E. coli* 08:K26:H⁻ [1].

В настоящей работе мы описываем синтез дисахаридных фрагментов А и В в форме 2-акриламидоэтилгликозидов и их последующее превращение в сополимерные искусственные антигены. Антигены подобного типа, как показали мы [2-5] и другие авторы [6-10], могут оказаться полезными при изучении иммунохимии природных антигенов и в диагностике бактериальных инфекций.

В качестве «пресейсера» мы использовали *N*-бензилоксикарбонил-аминоэтильный и 2-азидоэтильный агликоны, позволяющие генерировать свободную аминогруппу в достаточно мягких условиях каталитического гидрогенолиза. В этих условиях не должны происходить деградация остатков глюкуроновой кислоты и расщепление амидной связи между остатками аминокислот и глюкуроновой кислоты (имея в виду в перспективе создание более или менее общей схемы также и для синтеза фрагментов А и В, замещенных гидроксаминокислотами).

Сокращения: Ac — ацетил, Bz — бензоил, Z — бензилоксикарбонил, ТММ — тетраметилмочевина, TEMED — *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин.

Результаты гликозилирования рамнозида (II) гликозилбромидом (IV)

Номер эстера-эпита	Вариант гликозилирования*	Растворитель	Температура, °С	Количество реагентов (мольное соотношение)			Время реакции, ч	Выход продуктов реакции и возратившихся исходных эс., %						
				(III)**	(IV)**	Другие компоненты (промотор, основание и др.)		(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	
1	А	CH ₂ Cl ₂	-65 → 20	1,0	4,7	CF ₃ SO ₂ Ag 4,0 TMM 16,0	71	26	-	-	-	-	45	13
2	Б	CH ₂ Cl ₂	20	1,0	1,8	CF ₃ SO ₂ Ag 1,6 мол. сита 3 А	66	31	57	-	-	16	-	-
3	А	CH ₂ Cl ₂	-65 → 20	1,0	1,8	CF ₃ SO ₂ Ag 1,6 TMM 1,5	40	20	53	+	-	21	-	-
4	Б	CH ₃ CN	20	1,0	1,8	Hg(CN) ₂ 5,0 HgBr ₂ 1,5	66	51	-	-	-	43	-	-
5	В	CH ₃ CN	20	1,0	1,8	Hg(CN) ₂ 1,5 HgBr ₂ 1,5	40	10	21	+	-	37	-	-
6	В	CH ₃ CN	20	1,0	1,8	Hg(CN) ₂ 1,5 HgBr ₂ 1,5	230	25	-	+	-	54	-	-
7	В	CH ₃ NO ₂ - - бензол, 1:1	20	1,0	1,8	Hg(CN) ₂ 1,5 HgBr ₂ 1,5	230	5	12	+	-	56	-	-
8	Г	CH ₃ NO ₂ - - бензол, 1:1	90 (баня)	1,0	1,8×3	Hg(CN) ₂ 1,5×3 HgBr ₂ 1,5×3	312 (из них при нагре- вании 76)	5	+	-	-	25	3	-
9	Г	CH ₂ Cl ₂	20	1,0 (0,1 ммоль)	1,8×2	мол. сита 3 А Hg(CN) ₂ 1,5×4 HgBr ₂ 1,5×4	353	-	-	-	-	13	51	1
10**	А	CH ₃ CN	20	1,0 (5 ммоль)	1,5	мол. сита 3 А Hg(CN) ₂ 1,9 HgBr ₂ 1,1	65	+	8	-	-	66	-	-

4*

* Варианты гликозилирования: А — подготовка реагентов и растворителя на вакуумной установке, проведение реакции под аргоном; Б — подготовка реагентов и растворителя и смешивание компонентов на вакуумной установке; Г — обычные условия (без специальных приемов по высушиванию реагентов и растворителя и защите от влаги воздуха).

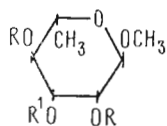
** В реакцию вводили 0,3 ммоль рамнозида (II) (если не указано иначе).

*** Приведен мольный эквивалент в пересчете на метил-1,2,3,4-тетра-О-ацетил-D-глюкопирануранат, использовавшийся для получения гликозилбромидов (IV).

**** Качественная оценка наличия (+) или отсутствия компонентов (-) в реакционной смеси по данным ТСХ.

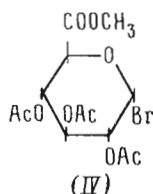
***** Эксперимент 10 подробно описан в «Экспер. части».

Дисахаридный фрагмент А был синтезирован путем гликозилирования метил-2, 4-ди-О-бензоил- α -L-рамнопиранозида (II) метил(2, 3, 4-три-О-ацетил- α -D-глюкопиранозилбромид)уронатом (IV) [11] с последующим удалением защитных групп. Частично защищенный рамнозид (II) был



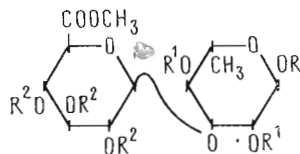
- (I) R=R¹=H
 (II) R=Bz, R¹=H
 (III) R=Bz, R¹=Ac

получен из метилрамнозида (I) по известной методике [12] с выходом 72%. Конденсация рамнозида (II) с гликозилбромидом (IV) в дихлорметане в присутствии трифлата серебра и тетраметилмочевины (ТММ) в качестве основания (табл. 1, эксперимент 1) вместо ожидаемого дисахарида



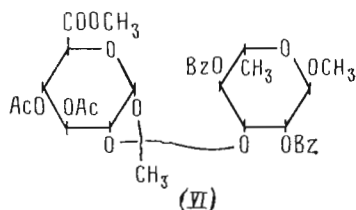
(V) привела главным образом к ортоэфиру (VI)* (изомеру дисахарида (V)) с выходом 45% и небольшому количеству α -связанного дисахарида (VII) со свободной 2-ОН-группой в остатке глюкуроновой кислоты.

При повторении конденсации в отсутствие ТММ (возможной причины образования ортоэфирного продукта) (эксперимент 2) или при ее недостат-



- (V) R=CH₃, R¹=Bz, R²=Ac
 (VII) R=R²=Ac, R¹=Bz
 (IX) R=CH₂CH₂NH₂, R¹=Bz, R²=Ac
 (X) R=H, R¹=Bz, R²=Ac
 (XI) R=CH₂CH₂NH₂, R¹=R²=H

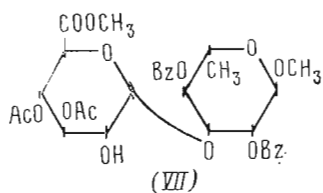
ке (эксперимент 3) удастся выделить дисахарид (V) с невысоким выходом и значительные количества (53% в эксперименте 3) 3-О-ацетилрамнозида (III). При гликозилировании рамнозида (II) гликозилбромидом (IV)



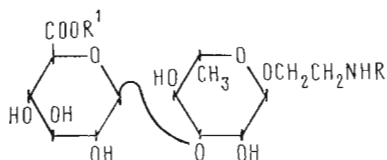
в условиях катализа солями ртути (Hg(CN)₂+HgBr₂) (эксперименты 4–10) основным продуктом реакции является дисахарид (V), причем наилучшим растворителем оказался ацетонитрил (эксперимент 4). Предваритель-

* Образование ортоэфиров при гликозилировании в присутствии трифлата серебра и ТММ отмечалось и ранее [13, 14].

ное высушивание компонентов для гликозирования лиофилизацией из бензола и абсолютирование растворителя с помощью высоковакуумной ($2 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст.) установки позволило (эксперимент 5) поднять выход дисахарида (V) до 57% (66% в эксперименте 10, проведенном в препаративном масштабе).

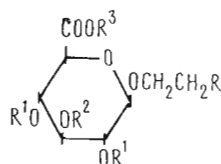


Строение веществ, выделенных в различных вариантах конденсации рамнозида (II) с гликозилбромидом (IV), следовало из данных спектров ЯМР (табл. 2). β -Конфигурацию возникшей гликозидной связи в дисаха-



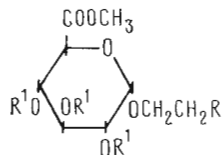
- (XII) R=H, R¹=CH₃
 (XIII) R=COCH=CH₂, R¹=CH₃
 (XIV) R=COCH=CH₂, R¹=H

риде (V) подтверждали значения химического сдвига сигнала H1' (4,70 м. д.) и КССВ ($J_{1',2'}$ 7,5 Гц). Сигнал H1' ($J_{1',2'}$ 3,4 Гц) в спектре α -дисахарида (VII) был расположен при 5,84 м. д. Кроме того, в спектре ¹H-ЯМР соединения (VI) сигнал H2' находился в более сильном поле (3,89 м. д.) по сравнению с его положением в спектре дисахарида (V)



- (XV) R=NHZ, R¹=R²=Ac, R³=CH₃
 (XVII) R=N₃, R¹=R²=Ac, R³=CH₃
 (XIX) R=N₃, R¹=R²=R³=H
 (XXI) R=N₃, R¹=Ac, R²=H, R³=CH₃

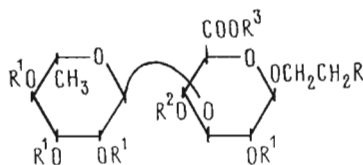
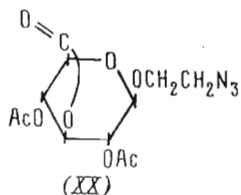
(4,87 м. д.), что указывало на отсутствие 2'-О-ацетильной группы в первом случае. Об ортоэфирной природе соединения (VI) свидетельствовало наличие в спектре ¹³C-ЯМР * сигналов четвертичного С-атома (122,45 м. д.) и С-метильной группы (21,8 м. д.). В спектре ¹H-ЯМР ортоэфира (VI)



- (XVI) R=NHZ, R¹=Ac
 (XVIII) R=N₃, R¹=Ac

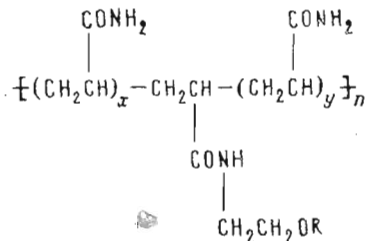
* Спектр ¹³C-ЯМР: 169,2; 168,8; 168,4; 166,1 и 165,3 (C=O), 133,5; 133,3 и 128,5-130,0 (аром. C), 122,45 (C-CH₃), 98,9 (C1, GlcA, $J_{C1, H1}$ 161), 96,7 (C1, Rha, $J_{C1, H1}$ 173), 72,8; 72,6; 72,1; 70,2; 68,85; 68,6; 68,5 и 67,0 (C2 - C5, GlcA, C2 - C5, Rha), 55,3 (OCH₃), 52,7 (COOCH₃), 21,8 (C - CH₃), 20,62 и 20,56 (COCH₃), 17,9 (C6, Rha).

присутствовал сигнал (1,64 м. д., синглет, 3H) ортоэфирной С-метильной группы, а сигнал Н1' ($J_{1',2'}$ 5,0 Гц) располагался при 5,88 м. д., что характерно для спектров 1,2-ортоацетатов сахаров [15, 16]. Строение 3-О-ацетилрамнозида (XX) следовало из сравнения спектров ^1H -ЯМР соединений (II) и (III): появление сигнала О-ацетильной группы (1,88 м. д.) и смещение сигнала Н3 в слабое поле (4,32→5,62 м. д.).



- (XXII) $R = \text{N}_3$, $R^1 = R^2 = \text{Ac}$, $R^3 = \text{CH}_3$
 (XXIII) $R = \text{NH}_2$, $R^1 = R^2 = \text{Ac}$, $R^3 = \text{CH}_3$
 (XXIV) $R = \text{NHCOCH}=\text{CH}_2$, $R^1 = R^2 = \text{Ac}$, $R^3 = \text{CH}_3$
 (XXV) $R = \text{NHCOCH}=\text{CH}_2$, $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$
 (XXVI) $R = \text{NHCOCH}=\text{CH}_2$, $R^1 = R^3 = \text{H}$, $R^2 = \text{Ac}$

Ацетоллиз метилбиозида (V) при 4°C в смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид — концентрированная серная кислота при соотношении 240 : 160 : 1 за 40 ч или при соотношении 200 : 200 : 1 за 24 ч приводил к α -ацетату (VIII) с выходом 81%. Строение продукта ацетоллиза (VIII)



- (XXVII) $R = D\text{-Glc pA}-(\beta 1 \rightarrow 3)\text{-L-Rhap}-(\alpha 1 \rightarrow$
 (XXVIII) $R = L\text{-Rhap}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{-D-Glc pA}-(\beta 1 \rightarrow$

подтверждала совокупность данных спектров ^1H - (табл. 2) и ^{13}C -ЯМР (см. «Экспериментальную часть»), в частности наличие сигнала 1-О-ацетильной группы (δ^{H} 2,23 м. д.) и смещение сигнала Н1 (остаток рамнозы) в слабое поле (6,24 м. д.). α -Конфигурацию ацетата (VIII) подтверждали значения КССВ ($^3J_{10,12}$ 2,0 Гц, $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 175,8 Гц).

При обработке раствором бромистого водорода в дихлорметане, как описано в работе [17], при 4°C ацетат (VIII) количественно переходил в гликозилбромид (данные ТСХ), конденсация которого с *N*-бензилоксикарбониламиноэтанолом [18, 19] в смеси ацетонитрил—дихлорметан в присутствии цианида и бромиды ртути приводила к гликозиду (IX) с выходом 69%. Кроме того, из реакционной смеси было выделено 13% дисахарида (X) со свободной 1-ОН-группой (α -аномер). Значения химического сдвига сигнала С5 (68,8 м.д.) [20, 21] и величина КССВ $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 170,9 Гц (см. «Экспериментальную часть») говорили об α -*L*-конфигурации биозида (IX).

Из нескольких вариантов удаления защитных групп в различной последовательности наиболее удачным оказался следующий. При О-дезацелировании полезнее защитного дисахарида (IX) 0,1 М раствором метилата натрия в метаноле (3 ч при 20°C под аргоном) был получен дезацелированный дисахарид (IX) с выходом 62%. Однако О-бензоильные группы в этих условиях удаляются не полностью*, и из реакционной смеси была

* Дезацелирование в более жестких условиях приводит к модификации агликона, наблюдавшейся нами в альтернативном варианте удаления защитных групп в гликозиде (IX). Каталитический гидрогенолиз гликозида (IX) (10% Pd/C в смеси

выделена смесь моно-*O*-бензоильных производных дисахарида (XI) (данные спектра ¹H-ЯМР (табл. 2); выход 12%).

Гидрогенолиз дисахарида (XI) над 10% палладием на угле в метаноле в присутствии 1,1 экв. уксусной кислоты привел к аминоэтилгликозиду (XII) (выход 80%), который без дополнительной очистки *N*-ацелировали акрилоилхлоридом в водном метаноле в присутствии аннионита в HCO₃⁻ форме [22]. При этом выделяли акриламидоэтилгликозид (XIII) с выходом 56%, считая на защищенный дисахарид (XI). Омыление метилбиосулата (XIII) 0,2 М раствором NaOH в водном метаноле привело к фрагменту А (в виде гликозида (XIV)) с выходом 75%. Конфигурация гликозидных связей в гликозиде (XIV) была подтверждена величинами J_{сд,ш} в спектре ¹³C-ЯМР (табл. 3): J_{сд,ш} 171 Гц (*α*-L-Rha) и J_{сд,ш} 164 Гц (*β*-D-GlcA).

В синтезе фрагмента А мы вводили *N*-защищенный аминоэтильный агликон-спейсер в уже готовый дисахарид, причем этому предшествовала стадия избирательного ацетилиза метилгликозидной связи в метилбиозиде (V). Поскольку нельзя с уверенностью рассчитывать на большую устойчивость рамнозидной связи по сравнению с метилглюкуронозидной связью в условиях ацетилиза, ключевой стадией в синтезе фрагмента Б стало рамнозилирование гликозида глюкуроновой кислоты (XXI). Для освобождения 3-OH-группы в гликозиде (XXI) был использован разработанный нами ранее способ, включающий 6,3-лактонизацию и избирательный метанолиз лактоного цикла [23].

Основываясь на данных [24] о гликозилировании *N*-бензилоксикарбоиламиноэтанолола гликозилбромидом (IV) в присутствии различных промоторов и получении при этом с низким выходом (19%) *β*-гликозида (XV), мы попытались увеличить его выход за счет предварительного высаливания реагентов и абсолютирования растворителя на высоковакуумной установке. Однако мы выделили гликозид (XV) со сравнимым низким выходом (13%), причем в отличие от данных работы [24] аномерный *α*-гликозид (XVI) не был обнаружен даже в следовых количествах.

В надежде повысить выход на стадии гликозилирования мы решили использовать 2-азидоэтанол в качестве синтетического предшественника аминоэтильного агликона. Гликозилирование 2-азидоэтанола [25] гликозилбромидом (IV) при кипячении в ацетонитриле в присутствии цианида ртути привело с выходом 44% к смеси аномерных гликозидов (XVII) и (XVIII) в соотношении 84:16 (данные ГЛХ). Кристаллизацией смеси аномеров из эфира были выделены *β*-аномер (XVII) с аномерной чистотой >99% (данные ГЛХ).

С целью повышения стереоселективности реакции и выхода *β*-аномера конденсацию гликозилбромида (IV) с 2-азидоэтанолом проводили в среде 2-азидоэтанола при повышенной температуре, основываясь на примерах успешного гликозилирования бензилового [26] и аллилового спиртов [27] гликозилбромидом (IV). Действительно, конденсация в присутствии цианида ртути при 105°С за 10 мин привела к *β*-гликозиду (XVII) с выходом 68% (примесь *α*-аномера (XVIII) составила 3% — данные ГЛХ). Избыток 2-азидоэтанола отгоняли в вакууме и использовали повторно.

При омылении метилбиосулата (XVII) 0,17 М раствором NaOH в водном метаноле при 4°С получили глюкуронозид (XIX), спектр ¹³C-ЯМР которого (табл. 3) в значительной мере совпадал со спектрами аллил- и метил-*β*-D-глюкопиранозидуроновых кислот [27, 28]. Лактонизация уроповой кислоты (XIX) под действием уксусного ангидрида при нагревании

этилацетат-метанол, 1:2, в присутствии избытка уксусной кислоты, 20°С) приводила к защищенному аминоэтилгликозиду, акрилоилирование которого (акрилоилхлорид в бензоле в присутствии поли(4-винилпиридина), 20°С) давало перацил-(2-акриламидоэтил)биозид (выход 41%). При обработке последнего 0,016 М раствором метилата натрия в метаноле (150 ч, 20°С) и затем 1 М KOH в водном метаноле (70 ч, 20°С) был выделен свободный *N*-(метоксиэтилкарбонил)аминоэтилбиозид (выход 24% в расчете на биозид (IX)), структуру которого подтвердили данные спектра ¹³C-ЯМР: 37,7 (CH₃OCH₂CH₂CO), 59,3 (CH₃OCH₂), 67,3 (OCH₂CH₂N), 40,6 (OCH₂CH₂N), 173,8 и 174,3 (2×CO), а также сигналы C-атомов остатков рамнозы и глюкуроновой кислоты.

Данные спектров ¹H-ЯМР производных 3-О-(β-D-глюкопиранозил)уруновой

Соединение	Моносахаридный остаток	Химические сдвиги (м. д.)			
		H1 (J _{1,2})	H2 (J _{2,3})	H3 (J _{3,4})	H4 (J _{4,5})
(II)	Rha	4,88 д (1,9)	5,40 дд (3,6)	4,32 дд (9,7)	5,29 т (9,5)
(III)	Rha	4,85 д (1,8)	5,53 дд (3,5)	5,62 дд (10,4)	5,49 т (9,7)
(V)	GlcA	4,70 д (7,5)	4,87 дд (9,0)	5,01 дд (9,2)	5,10 дд
	Rha	4,89 д (1,9)	5,41 дд (3,7)	4,36 дд (9,8)	5,49 дд (9,8)
(VI) **	GlcA	5,88 д (5,0)	4,13 м (3,0)	5,00 дд (1,6)	5,08 ддд (8,5)
	Rha	4,78 д (1,9)	5,54 дд (3,5)	4,38 дд (10)	5,39 дд
(VII)	GlcA	5,84 д (3,4)	3,89 т (3,0)	5,43 т (3,6)	5,26 т
	Rha	4,82 д (1,9)	5,79 дд (3,5)	5,14 дд (10)	5,42 дд
(VIII)	GlcA	4,76 д (7,5)	4,87 дд (9,0)	5,02 дд (9,3)	5,12 дд
	Rha	6,24 д (2,0)	5,43 дд (3,8)	4,39 дд (10)	5,54 дд (10)
(IX)	GlcA	4,71 д (7,5)	4,86 дд (9,0)	5,00 дд (9,0)	5,10 дд
	Rha	4,98 д (1,8)	5,40 дд (3,5)	4,35 дд (10)	5,48 дд (9,5)
(X)	GlcA	4,75 д (7,5)	4,88 дд (9,0)	5,02 дд (9,0)	5,11 дд
	Rha	5,42 д (2,0)	5,46 дд (3,6)	4,77 дд (9,8)	5,51 дд
(XI) ***	GlcA	4,47 д (7,5)	3,33 дд		
	Rha	4,66 д (1,8)	3,31 дд (3,4)	3,64 дд (9,5)	3,49 дд

* Для растворов в CDCl₃; отнесение сигналов выполнено с помощью двойного гомодер (5Н), C₆H₅СН₂ — 5,14 ус (2Н) и 5,08 ус (2Н) соответственно; для некоторых сигналов в скобках

** В спектре имеется сигнал при 1,64 м. д., синглет (С—СН₃ ортоэфирной группы).

*** Для раствора в CDCl₃+CD₃OD.

и последующее диацетилирование (уксусный ангидрид в пиридине) в условиях, описанных нами ранее [23,27], привели к 6,3-лактону (XX) с выходом 66%, считая на триацетилгликозид (XVII). О замыкании лактонного цикла, закрепляющего ¹C₄-конформацию, свидетельствовали данные спектра ¹H-ЯМР (табл. 4). Вместо характерных для β-D-глюкопиранозидов (¹C₄-конформация) КССВ (J_{1,2} ≈ 8, J_{2,3} ≈ J_{3,4} ≈ 9, J_{4,5} ≈ 9–10 Гц) в спектре лактона (XX) наблюдались гораздо меньшие по величине КССВ (J_{1,2} ≈ 1, J_{2,3} 3,8, J_{3,4} 4,6, J_{4,5} 3,5 Гц), указывающие на аксиальное расположение всех заместителей (ср. [27]).

В результате избирательного метанолиза лактонного цикла в гликозиде (XX) при 20° С получили моногидроксильное производное (XXI) (выход 76%), спектры ¹H- (табл. 4) и ¹³C-ЯМР (см. «Экспериментальную часть») которого были близки спектрам аллилгликозида аналогичного строения [27]. Отсутствие О-ацетильной группы в положении 3 следовало из величины химического сдвига сигнала H3 (3,77 м. д.).

Гликозирование глюкуронозида (XXI) ацетобромрамнозой [17] в дихлорметане в присутствии трифлата серебра при -40–20° С привело к α-связанному дисахариду (XXII) (табл. 4) с выходом 48%. При гидрировании азидоэтилгликозида (XXII) над 10% палладием на угле в этил-

кислота)-L-рамнопиранозы и вспомогательных соединений *

и КССВ (Гц)					
H5 (J _{5,s})	H6 (J _{5,e})	CH ₃ CO	OCH ₃	COOCH ₃	C ₆ H ₅ CO
4,07 дк	1,32 д (6,0)	—	3,45 с	—	7,45–7,65 м (6H) 8,05–8,15 м (4H)
4,10 дк	1,36 д (6,5)	1,88 с	3,48 с	—	7,45–7,65 м (6H) 8,05–8,15 м (4H)
3,98 д (9,7)	—	1,45 с	3,45 с	3,67 с	7,45–7,65 м (6H)
3,98 дк	1,27 д (6,3)	1,88 с 1,97 с	—	—	8,05–8,10 м (4H)
4,13 д	—	1,98 с	—	—	7,45–7,65 м (6H)
4,05 дк (9,8)	1,32 д (6,3)	2,03 с	3,49 с	3,78 с	8,05–8,15 м (4H)
4,77 д (3,5)	—	2,08 с	—	—	7,45–7,65 м (6H)
4,02 дк (10)	1,33 д (6,5)	2,12 с	3,42 с	3,80 с	8,05–8,15 м (4H)
4,00 д (9,8)	—	1,48 с 1,90 с	—	3,66 с	7,45–7,65 м (6H)
4,05 дк	1,28 д (6,3)	1,97 с 2,23 с	—	—	8,05–8,15 м (4H)
3,98 д (9,5)	—	1,47 с 1,88 с	—	3,58 с	7,45–7,65 м (6H)
3,96 дк	1,24 д (6,3)	1,97 с	—	—	8,05–8,15 м (4H)
4,00 д (9,5)	—	1,48 с 1,88 с	—	3,67 с	7,45–7,65 м (6H)
4,24 дк (10)	1,25 д (6,3)	1,97 с	—	—	8,05–8,15 м (4H)
3,83 д (9,5)	—	—	—	—	—
3,59 м	1,21 д (5,7)	—	—	3,70 с	—

ного резонанса; в спектрах соединений (IX) и (XI) имеются сигналы C₆H₅CH₂ — 7,30–7,45 м приведено число протонов соответствующее интегральной интенсивности сигнала.

ацетате в присутствии 1,1 экв. уксусной кислоты получили аминоэтилгликозид (XXIII), дающий положительную реакцию с нингидрином (ТСХ). Ацилирование аминоэтилгликозида (XXIII) акрилонитридом в этилацетате в присутствии поли(4-винилпиридина) привело к (2-акриламидоэтил)биозиду (XXIV) с выходом 44% (считая на пентаацетилгликозид (XXII)). Строение (2-акриламидоэтил)гликозида (XXIV) подтверждали данные спектров ¹H- (табл. 4) и ¹³C-ЯМР (см. «Экспериментальную часть»).

При омылении пентаацетилбиозид (XXIV) 0,14 М NaOH в водном метаноле (2 ч при 4° С) получили свободный биозид (XXV) (выход 36%) и 4-ацетат (XXVI) (выход 52%), которые были разделены ионообменной хроматографией на DEAE-сфереоне (CH₃COO-форма) при элюировании градиентом водной уксусной кислоты. Моноацетат (XXVI) был превращен в биозид (XXV) при повторном омылении 0,25 М водным NaOH (22 ч при 1° С). В итоге биозид (XXV) был получен с общим выходом 83%.

Строение биозид (XXV) (фрагмент Б) следовало из данных спектров ¹H- (табл.4) и ¹³C-ЯМР (табл. 3). α-L-Конфигурацию рамнозидной связи подтверждали величины химических сдвигов сигналов C3' (71,7 м. д.) и C5' (70,3 м. д.) [20,21]. β-D-Конфигурацию глюконозидной связи подтверждали величина КССВ J_{1,2} 7,8 Гц в спектре ¹H-ЯМР, расшифро-

Данные спектров ^{13}C -ЯМР синтезированных соединений *

Соединение	Моносахаридный остаток	Химические сдвиги (м.д.) в КССВ (^{13}C , H $^+$, Tl $^+$)											
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	COOCH $_3$	OCH $_3$	CH $_2$ N	CH $_2$ =CH	C=O	
(XI) **	β -D-GlcA α -L-Rha	104,0(164) 99,8(171)	73,4 70,4	75,5 81,9	71,4 71,4	74,6 68,4	— 17,7	52,9	66,9	40,9	—	—	156,8 (CONH) 170,6 (COOCH $_3$)
(XIII) **	β -D-GlcA α -L-Rha	104,9 100,3	73,9 70,4	76,0 82,9	72,1 71,7	75,5 68,6	— 17,8	52,9	66,5	39,6	126,8	131,0	—
(XIV)	β -D-GlcA α -L-Rha	105,0(164) 100,6(174)	74,1 70,9	76,3 81,8	72,1+ 72,5+	75,8 69,7	— 17,8	—	67,0	40,2	128,7	131,1	170,0 174,0
(XIX)	β -D-GlcA	103,2(165)	73,5	76,0	72,0	75,4	—	—	63,5	51,3	—	—	173,1
(XXV)	α -L-Rha β -D-GlcA	102,4 103,7	71,6+ 74,7	71,7+ 83,2	73,4 71,4+	70,3 77,2	17,9 —	—	70,1	40,8	128,8	131,4	174,9
(XXVII)	β -D-GlcA α -L-Rha	104,8 100,7	74,3 70,7	76,4 81,6	72,2 72,8	77,4 69,7	— 17,9	—	66,8	40,1	—	—	—
(XXVIII)	α -L-Rha β -D-GlcA	102,3 103,5	71,7 74,7	71,7 83,3	73,4 71,5	70,2 77,8	17,9 —	—	69,5	40,8	—	—	—

* Для растворов в D $_2$ O; в спектрах соединений (XXVII) и (XXVIII) хим. сдвиги (CONH $_2$) ^{13}C — 42,8—43,5, (CONH $_2$) ^{13}C — 35,4—37,1; в спектре дисахарида (XI) хим. сдвиги C $_1$ — 104,2, C $_2$ — 128,6 и 136,8, C $_6$ — 17,7.

** Для растворов в CDCl $_3$.

† Обращение может быть обратным.

ванном с помощью двойного гомоядерного резонанса. Структура 4-О-ацетильного аналога (XXVI) также следовала из спектра ^1H -ЯМР (табл. 4): сигнал Н4 располагался в слабом поле (4,93 м. д.) и в спектре присутствовал сигнал одной О-ацетильной группы (2,10 м. д.).

2-Акриламидоэтилбиозиды (XIV) и (XXV) были превращены в искусственные антигены (XXVII) и (XXVIII) сополимеризацией с акриламидом при иницировании радикального процесса персульфатом аммония и TEMED по стандартной методике, использовавшейся нами и ранее [2, 3]. Сополимеры (XXVII) и (XXVIII) (выход 85,4 и 82% соответственно) содержат замещенные углеводами и незамещенные остатки акриламида в соотношении $\sim 1:10$ (данные спектров ^{13}C -ЯМР (табл. 3), полученные путем интегрирования соответствующих сигналов).

Успешное применение 2-азидоэтильного агликона для синтеза биозида (XXV) позволяет сделать вывод о перспективности использования ω -азидоаткильных агликолов в качестве синтетических предшественников ω -аминоалкильных агликонов-снейсеров, необходимых для получения искусственных антигенов различного типа (неогликопротеинов, синтетических антигенов сополимерного типа). Наши собственные данные и результаты [29] по использованию ω -азидоэтилбис(оксиптил)гликозидов свидетельствуют об устойчивости первичной азидогруппы в условиях реакций, применяемых в химии углеводов (кислотная и щелочная обработка, условия алкилирования и гликозидного синтеза и т. д.).

Авторы благодарят А. С. Шацкова за съемку и помощь в интерпретации спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР.

Экспериментальная часть

ТСХ выполнена на пластинках: DC Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) с использованием следующих систем растворителей: этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 18:4:1:3 (А), этанол-*n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота, 100:10:10:10:3 (Б), хлороформ — ацетон, 95:5 (В), бензол — ацетон, 8:2 (Г) и 6:4 (Д), гексан — этилацетат, 6:4 (Е), 1:1 (Ж) и 4:6 (З), хлороформ — эфир, 7:3 (И), хлороформ — метанол, 85:15 (К), хлороформ — этанол, 9:1 (Л). Для обнаружения веществ пластинки погружали в раствор серной кислоты (25% в воде или 10% в метаноле) и затем нагревали на электроплитке. Для обнаружения веществ, содержащих двойную связь, пластинки опрыскивали водно-содовым раствором перманганата калия, для обнаружения уроновой кислоты — раствором бромкрезолового зеленого [30]. Вещества, содержащие аминогруппу, обнаруживали опрыскиванием 0,3% раствором нингидрина в этаноле с последующим нагреванием. Препаративное разделение осуществляли на колонках с силикагелем L100/160, Silpearl (25–40 мкм; ЧССР) или LiChroprep Si60 (40–63 мкм; Merck, ФРГ). Препаративную ВЭЖХ проводили на колонках (16×250 и 25×250 мм) с сорбентом Silasorb 600 (10 мкм, ЧССР), аналитическую ВЭЖХ — на колонке (6×150 мм) с сорбентом Silasorb 600 (5 мкм) при использовании насоса Gilson, модель 303 (Франция), дифференциального рефрактометра Knauer (ФРГ) и УФ-детектора ISCO, модель UA-5 (254 нм). ГЖХ выполнена на приборе Hewlett Packard, модель 5890 (пламенно-ионизационный детектор), снабженном интегратором модель HP 3393A, с использованием стеклянной капиллярной колонки (0,2 мм × 25 м) с фазой Ultra-1 (толщина слоя 0,33 мкм) при 200°С и давлении газа-носителя (азот) 140 кПа.

Спектры ^1H -ЯМР сняты на приборе Bruker WM-250 (250 МГц; ФРГ), спектры ^{13}C -ЯМР — на приборе Bruker AM-300 (75,43 МГц; ФРГ) относительно тетраметилсилана. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (δ -шкала), КССВ — в герцах. ИК-спектры получены на приборе Perkin — Elmer 577. Температуры плавления определены на микроблоке Кофлера, оптическое вращение — на спектрополяриметре DIP-360 (Jasco, Япония). Ацетонитрил кипятили с KMnO_4 и NaHCO_3 , затем перегоняли над P_2O_5 и перед использованием — над CaH_2 . Бензол перегоняли над

Данные спектров ¹H-ЯМР производных глюконовой кислоты и 3-О-(α-L-рамнопи

Соединение	Моносахаридный остаток	Химические сдвиги (м. д.)					
		H1 (J _{1,2})	H2 (J _{2,3})	H3 (J _{3,4})	H4 (J _{3,4})	H5 (J _{4,5})	H6 (J _{5,6})
(XVII)	β-D-GlcA	4,64 д (7,8)	5,04 м	5,25 м (2H)		4,05 д (9,6)	—
(XVIII) **	α-D-GlcA	5,22 д (3,8)	4,90 дд (10,5)	5,56 дд	5,19 дд (9,7)	4,37 д (10,3)	—
(XX)	β-D-GlcA	4,94 yc (~1)	5,11 м (3,8)	5,09 м	4,86 дддд (4,6) J _{2,3} 1,0 J _{1,4} 1,0	4,23 м (3,5) J _{3,5} 1,0	—
(XXI)	β-D-GlcA	4,56 д (7,8)	4,92 дд (9,5)	3,77 ут	5,08 дд (9,3)	3,96 д (9,8)	—
(XXII)	α-L-Rha	4,85 д (1,6)	5,07 дд (3,6)	4,95–5,11 м (2H)		3,88 дк (9,0)	1,13 д (6,0)
	β-D-GlcA	4,54 д (7,5)	5,10 дд	3,87 т (9,0)	5,17 т (9,5)	3,94 д (9,7)	—
(XXIV)	α-L-Rha	4,87 д (2,0)	5,02–5,14 м (2H)		5,07 дд (9,5)	3,88 дк (9,3)	1,15 д (6,0)
	β-D-GlcA	4,49 д (7,1)	5,10 дд	3,88 т (8,5)	5,02 т (8,5)	3,97 д (9,3)	—
(XXV) ***	α-L-Rha	5,06 д (1,5)	3,99 дд (3,4)	3,73 дд	3,38 дд (9,6)	3,95 дк (9,6)	1,19 д (6,1)
	β-D-GlcA	4,47 д (7,8)	3,39 м	3,52–3,64 м (2H)		3,86 д (9,5)	—
(XXVI) ***	α-L-Rha	5,06 д (1,8)	3,95 дд (3,1)	3,65 дд	3,36 дд (9,5)	3,57 дк (9,0)	1,21 д (6,0)
	β-D-GlcA	4,51 д (8,0)	3,49 дд (9,2)	3,87	4,93 дд (9,2)	4,07 д (9,8)	—

* Для растворов в CDCl₃; отнесение сигналов в спектрах соединений (XVII), (XXIV)–XX (XXII) являются частично спектрами не первого порядка; для некоторых сигналов в скобках

** В смеси с β-аномером (XVII).

*** Для растворов в D₂O.

металлическим натрием и перед использованием — пад CaH₂. Дихлорметан готовили как описано в работе [31] и перед использованием перегоняли над CaH₂. Толуол перегоняли над LiAlH₄, уксусный ангидрид — пад P₂O₅. Для хроматографии использовали перегнанные растворители. Растворы унаривали в вакууме водоструйного насоса при температуре бани не выше 40° С (в случае производных с двойной связью — не выше 30° С). 2-Бензилоксикарбониламиноэтанол получали по методике [18], 2-азидоэтанол — по методике [25].

Метил-2,4-ди-О-бензоил-3-О-[метил (2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-α-L-рамнопиранозид (V). Подготовку реагентов и растворителя для синтеза проводили с помощью высоковакуумной (2·10⁻³ мм рт. ст.) установки. Гликозилбромид (IV), полученный из 2,93 г (7,79 ммоль) метил (1,2,3,4-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиран)уроната по методике [11], дважды лиофилизовали из бензола*. Смесь 2,00 (5,18 ммоль) рамнозида (II), 1,97 г. (5,47 ммоль) бромид ртути и 2,51 г (9,93 ммоль) цианида ртути в другой колбе дважды лиофилизовали из бензола*. Затем в обе колбы перегоняли ацетонитрил* (по 50–70 мл),

* Дважды перегнан над гидридом кальция при 2·10⁻³ мм рт. ст.

ранозил)- β -D-гликопирануроновой кислоты *

в КССВ (Γ ц)							
CH_3CO	COOCH_3	$\text{OCH}_A\text{H}_B\text{CH}_C\text{H}_D\text{N}$	$\text{OCH}_A\text{H}_B\text{CH}_C\text{H}_D\text{N}$	$\text{CH}_2=\text{CH}$	$\text{CH}_2=\text{CH}$		
2,03 с	3,86 с	3,69 ддд (А)	3,29 ддд (D)	-	-		
2,04 с		4,09 ддд (B)	3,51 ддд (C)				
2,07 с		$J_{A,B}$ 15,2 $J_{A,C}$ 8,6 $J_{B,D}$ 4,9	$J_{C,D}$ 13,6 $J_{B,D}$ 3,5 $J_{A,D}$ 3,5				
2,04 с	3,86 с	-	-	-	-		
2,05 с		-	-				
2,06 с		-	-				
2,10 с	-	3,58 ддд (А)	3,28 ддд (D)	-	-		
2,18 с		3,94 ддд (B)	3,46 ддд (C)				
		$J_{A,B}$ 10,3 $J_{A,C}$ 8,3 $J_{B,D}$ 4,8	$J_{C,D}$ 12,9 $J_{B,C}$ 3,6 $J_{A,D}$ 3,6				
2,08 с	3,73 с	3,66 ддд (А)	3,25 ддд (D)	-	-		
2,11 с		4,04 ддд (B)	3,48 ддд (C)				
		$J_{A,B}$ 10,6 $J_{A,C}$ 8,5 $J_{B,D}$ 4,8	$J_{C,D}$ 12,7 $J_{A,D}$ 3,3 $J_{B,C}$ 3,3				
1,96 с	3,75 с	3,55 ддд (А)	3,29 ддд (D)	-	-		
2,03 с		4,04 ддд (B)	3,49 ддд (C)				
2,08 с		$J_{A,B}$ 10,5	$J_{C,D}$ 13,2				
2,13 с		$J_{A,C}$ 8,0	$J_{A,D}$ 3,2				
2,17 с		$J_{B,D}$ 4,5	$J_{B,C}$ 3,5				
1,98 с	3,77 с	3,70-3,85 м	3,45-3,65 м	5,65 дд 6,31 дд	6,16 дд		
2,07 с		(2H)	(2H)			$J_{H, H_{gem}}$ 2,0	$J_{H, H_{trans}}$ 16,5
2,11 с							
2,18 с						$J_{H, H_{gem}}$ 2,1	$J_{H, H_{trans}}$ 16,9
(6H)							
-	-	3,70-3,95 м	3,40-3,50 м	5,70 дд 6,13 дд	6,23 дд		
			(2H)	$J_{H, H_{gem}}$ 2,4	$J_{H, H_{trans}}$ 17,0		
						$J_{H, H_{cis}}$ 9,3	
2,10 с	-	3,70-3,85 м	3,40-3,50 м	5,70 дд 6,13 дд	6,24 дд		
		(1H)	(2H)	$J_{H, H_{gem}}$ 2,4	$J_{H, H_{cis}}$ 9,3		
2,10 с	-	3,85-4,00 м					
		(1H)					

VI) выполнено с помощью двойного гомодерного резонанса; спектры соединений (XVII) и приведены число протонов, соответствующее интегральной интенсивности сигнала.

обе колбы заполняли сухим аргоном и к раствору гликозилбромид (IV) по каплям добавляли раствор агликона (II) и солей ртути. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при 20° С, затем упаривали. Остаток суспендировали в 200 мл хлороформа, отфильтровывали осадок солей ртути. Фильтрат промывали 1 М раствором KI (4×200 мл), насыщенным раствором NaHCO_3 (200 мл), водой (2×200 мл) и упаривали. Остаток (4,08 г) хроматографировали на колонке (8×3,5 см) с силикагелем L100/160 при элюировании градиентом эфира (0→25%) в бензоле. Выделили 2,43 г (выход 67%) дисахарида (V), $[\alpha]_D^{26} +22,2^\circ$ (с 1, CHCl_3), R_f 0,55 (B). Спектр ^{13}C -ЯМР: 170,15; 169,2; 166,9; 166,4 и 165,4 (C=O), 133,6; 133,3 и 128,55-130,15 (аром. C), 101,35 (C1, GlcA, $^1J_{C1, H1}$ 168,5), 98,4 (C1, Rha $^1J_{C1, H1}$ 168,5), 76,1; 73,3; 72,8; 72,5; 72,3; 71,1; 69,45 и 66,4 (C2-C5, GlcA, C2-C5, Rha), 55,4 (OCH₃), 52,8 (COOCH₃), 20,5 и 19,75 (COCH₃), 17,7 (C6, Rha).

1-О-Ацетил-2,4-ди-О-бензоил-3-О-[метил (2,3,4-три-О-ацетил- β -D-гликопиранозил)уронат]- α -L-рамнопираноза (VIII). К раствору 1,85 г (2,635 ммоль) метилблизид (V) в 15 мл ледяной уксусной кислоты

добавляли 10 мл уксусного ангидрида и затем при 0° С и перемешивании прибавляли по каплям холодный раствор 75 мкл конц. H₂SO₄ в смеси 2 мл уксусного ангидрида и 3 мл уксусной кислоты. Смесь выдерживали 40 ч при 4° С, разбавляли 100 мл хлороформа и выливали в воду со льдом. Водный слой экстрагировали хлороформом (2 раза). Объединенный органический слой (250 мл) промывали холодной водой (250 мл), холодным насыщенным раствором NaHCO₃ (3×150 мл), водой (3×250 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали. Остаток (~2 г) упаривали с толуолом и гептаном и хроматографировали (ВЭЖХ, колонка 25×250 мм) при элюировании смесью гексан — этилацетат, 82:18. Выделили 1,55 г (выход 81%) перацетилдисахарида (VIII), $[\alpha]_D^{21} +16,4^\circ$ (с 1, CHCl₃), R_f 0,47 (В). При проведении ацетоллиза в смеси уксусный ангидрид — уксусная кислота — конц. H₂SO₄, 200:200:1 (24 ч при 4° С) получили ацилированный дисахарид (VIII) с тем же выходом. Спектр ¹³С-ЯМР: 170,1; 169,2; 168,9; 168,35; 166,8; 165,7 и 165,2 (С=О), 133,7; 133,4 и 128,55—130,1 (аром. С), 101,1 (C1, GlcA, $J_{C1,H} 161,1$), 90,5 (C1, Rha, $J_{C1,H} 175,8$), 75,5; 72,7; 72,6; 72,0; 71,2; 70,95; 69,2 и 68,7 (C2—C5, GlcA, C2—C5, Rha), 52,9 (COOCH₃), 21,1; 20,5 (2С) и 19,7 (COCH₃), 17,6 (С6, Rha).

(2-Бензилоксикарбониламиноэтил)-2,4-ди-О-бензоил-3-О-[метил(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-α-L-рамнопиранозид (IX). К раствору 122 мг (167 мкмоль) биоилацетата (VIII) в 840 мкл абс. дихлорметана при -15° С добавляли 33,6 мкл (837 мкмоль) абс. метанола и 68 мкл (921 мкмоль) бромистого ацетила. Смесь перемешивали 5 мин при -15° С и выдерживали 3,5 ч при 4° С, контролируя ход реакции ТСХ (система В). После исчезновения исходного биоилацетата (VIII) с R_f 0,47 и появления биоилбромида с R_f 0,69 реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и выливали на лед (в делительной воронке объемом 10 мл). Органический слой промывали холодным раствором NaHCO₃, холодной водой, фильтровали через вату, упаривали и сушили в вакууме над КОН.

В отдельной колбе смесь 49 мг (251 мкмоль) 2-бензилоксикарбонил-аминоэтанола, 211,5 мг (837 мкмоль) цианида ртути и 304,5 мг (837 мкмоль) бромида ртути в 2—3 мл абс. ацетонитрила перемешивали 1 ч при 20° С под аргоном с молекулярными ситами 3 Å. Затем в смесь с помощью шприца ввели раствор полученного биоилбромида в 900 мкл дихлорметана. Смесь перемешивали 16 ч при 20° С, фильтровали через слой целита-545, осадок промывали хлороформом. Объединенный фильтрат упаривали, остаток экстрагировали хлороформом. Экстракт промывали 1 М раствором KI (4 раза), насыщенным раствором NaHCO₃ (2 раза), водой, сушили сульфатом магния и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке с LiChroprep Si60 при элюировании градиентом эфира (0→10%) в хлороформе. Выделили 100 мг (выход 69%) биозида (IX), $[\alpha]_D^{28} +8,2^\circ$ (с 2,68, CHCl₃), R_f 0,57 (В), 0,37 (И), и 15 мг (выход 13%) 2,4-ди-О-бензил-3-О-[метил(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-α-L-рамнопиранозы (X), R_f 0,31 (В), 0,26 (И).

Спектр ¹³С-ЯМР биозида (IX): 170,0; 169,1; 168,8; 166,8; 166,0 и 165,3 (С=О), 158,4 (CONH), 133,5; 133,2 и 128,2—130,05 (аром. С), 101,1 (C1, GlcA, $J_{C1,H} 168,4$), 97,5 (C1, Rha, $J_{C1,H} 170,9$), 75,7 (C3, Rha), 73,0; 72,55; 72,3; 72,2; 71,0; 69,2; 67,5; 67,0 (C2—C5, GlcA, C2, C4, Rha, OCH₂CH₂N, OCH₂C₆H₅), 68,8 (C5, Rha), 52,7 (COOCH₃), 41,0 (CH₂N), 20,5 и 19,7 (COCH₃), 17,6 (С6, Rha).

(2-Бензилоксикарбониламиноэтил)-3-О-[метил-(β-D-глюкопиранозил)уронат]-α-L-рамнопиранозид (XI). К раствору 204 мг (236 мкмоль) ацил-биозида (IX) в 2 мл абс. метанола под аргоном добавляли 200 мкл 1 М раствора метилата натрия в метаноле. Смесь выдерживали под аргоном 3 ч при 20° С, затем нейтрализовали катионитом КУ-2 (H⁺). Смолу (~5 мл) промывали метанолом (200 мл) и хлороформом (100 мл). Объединенный фильтрат упаривали, остаток (138 мг) хроматографировали на колонке (10×250 мм) с LiChroprep Si60 при элюировании смесью хлороформ — метанол, 92,5:7,5. Выделили 77,6 мг (выход 62%) метил-

биоуроната (XI), R_f 0,40 (К), 0,11 (Л), и 17,7 мг (выход 12%) смеси монобензойльных производных метилбиоуроната (XI), R_f 0,60 (К). Спектр ^{13}C -ЯМР метилбиоуроната (XI) см. в табл. 3.

(2 - Акриламидоэтил)-3-О-(β -D-глюкопиранозил)уронат]- α -L-разнопиранозид (XIII). 78,8 мг (148 мкмоль) метилбиоуроната (XI) гидрировали при 20° С в присутствии 10% палладия на угле в 2 мл метанола, содержащего 9,35 мкл (163 мкмоль) уксусной кислоты. Через 1 ч, по данным ТСХ (система К), исходное исчезло и появилось вещество с R_f 0,50 (Б), дающее положительную реакцию с нингидрином. Катализатор отделяли фильтрованием, промывали метанолом, фильтрат упаривали. Получили 47 мг (выход 80%) аминоэтилгликозида (XII) в виде бесцветного сиропа.

К раствору аминоэтилгликозида (XII) в смеси 3,2 мл метанола и 0,4 мл воды в присутствии дауэкса 1×8 (HCO_3^-) при охлаждении (вода со льдом) и перемешивании прибавляли 18,1 мкл (223 мкмоль) акрилонилхлорида. Смесь перемешивали 16 ч при 20° С, затем прибавляли еще 18,1 мкл акрилонилхлорида и продолжали перемешивание. Через 2 ч смолу отделяли фильтрованием, промывали метанолом (~70 мл), фильтрат упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (10×250 мм) с LiChroprep Si60 при элюировании системой К и рехроматографировали (ВЭЖХ) на колонке (16×250 мм), элюируя смесью хлороформ – метанол, 90 : 10. Выделили 37,5 мг (выход 56%) акриламидоэтилгликозида (XIII), $[\alpha]_D^{27} -58,2^\circ$ (с 1, CH_3OH), R_f 0,23 (К). Спектр ^{13}C -ЯМР см. в табл. 3.

(2-Акриламидоэтил)-3-О-(β -D-глюкопиранозилуруоновая кислота)- α -L-разнопиранозид (XIV). К раствору 27,6 мг метилбиоуроната (XIII) в 6 мл метанола при охлаждении (вода со льдом) добавляли по каплям 1,5 мл 1 М водного раствора NaOH. Смесь перемешивали 1,5 ч при охлаждении, разбавляли равным объемом воды, наносили на колонку (10×130 мм) с катионитом КУ-2 (H^+) и промывали водой. Объединенный элюат наносили на колонку (15×250 мм) с DEAE-сфероном (CH_3COO^- , 25–40 мкм, СССР). Элюировали линейным градиентом уксусной кислоты (0→20%, 200 мл) со скоростью 3 мл/мин при детектировании с помощью УФ-детектора (254 нм). Фракции, содержащие углеводы, упаривали, остаток несколько раз упаривали с водой и высушивали в вакууме над KOH. Получили 20,1 мг (выход 75%) биоуроновой кислоты (XIV), $[\alpha]_D^{28} -97,4^\circ$ (с 1, вода), R_f 0,23 (А). Спектр ^{13}C -ЯМР (D_2O) см. в табл. 3.

Метил[(2 - азидоэтил)-2,3,4-три-О-ацетил- β -D-глюкопиранозид]уронат (XVII). К нагретому до 105° С раствору 780 мг (3,1 ммоль) цианида ртути в 3,27 мл (43,2 ммоль) 2-азидоэтанола [25] одной порцией прибавляли 1,19 г (3,0 ммоль) кристаллического гликозилбромида (IV) [10]. Полученный раствор выдерживали 10 мин при 105–110° С, при этом выпадал белый осадок. По данным ТСХ (система Е), исходный гликозилбромид (IV) с R_f 0,59 исчезал и появлялся продукт реакции с R_f 0,30. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при 20° С, затем избыток 2-азидоэтанола отгоняли в вакууме масляного насоса (<1 мм рт. ст.). К остатку добавляли 50 мл хлороформа и 50 мл воды. Водный слой экстрагировали хлороформом (3×50 мл). Объединенный органический слой (~200 мл) последовательно промывали 1 М раствором NaI (4×200 мл), насыщенным раствором NaHCO_3 (200 мл), водой (200 мл), сушили Na_2SO_4 и упаривали. Полученный желтый сироп (1,25 г) хроматографировали на колонке (25×250 мм) с силикагелем Silpearl при элюировании смесью петролейный эфир (30–40°) – этилацетат, 65 : 35. Выделили 839 мг (выход 69%) кристаллического азидоэтилгликозида (XVII), гомогенного по данным аналитической ВЭЖХ (элюент : гексан – этилацетат, 65 : 35). По данным ГЖХ, полученный образец гликозида (XVII) содержал 3% примеси α -аномера. Аналитический образец гликозида (XVII) получили перекристаллизацией из эфира, т. пл. 96–98° С, $[\alpha]_D^{24} -58^\circ$ (с 1, CHCl_3). ИК-спектр: 2120 cm^{-1} (N_3 -полоса). Пайдено. %: С 44,43; Н 5,32, N 10,56. $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_{10}$. Вычислено, %: С 44,67; Н 5,25, N 10,42. Спектр ^{13}C -ЯМР: 170,1; 169,4 и 167,1 (C=O), 100,6 (C1), 72,55; 72,0; 71,0; 69,35 и 68,8 (C2–C5, OCH_2), 52,9 (COOCH_3), 50,45 (CH_2N_3), 20,6 (COCH_3).

(2 - Азидоэтил)-2,4-ди-О-ацетил-β-D-глюкопиранозидуроно - 6,3-лактон (XX). К раствору 130 мг (323 ммоль) метилуроната (XVII) в 10 мл метанола при охлаждении добавляли по каплям 1,67 мл (1,67 ммоль) 1 М водного раствора NaOH. Смесь выдерживали 2 ч при 4° С, затем нейтрализовали катионитом КУ-2 (H⁺), упаривали, остаток 4 раза упаривали с толуолом и сушили в вакууме над КОН. Полученную уроновую кислоту (XIX) (*R_f* 0,63, система А; дает положительную реакцию с бромкрезоловым зеленым) нагревали 1,5 ч при 70° С с 6 мл уксусного ангидрида. Затем охлаждали, прибавляли 6 мл пиридина и выдерживали 12 ч при 20° С. По данным ТСХ (система Ж), в реакционной смеси присутствовал продукт реакции с *R_f* 0,42; исходный метилуронат (XVII) (*R_f* 0,49) отсутствовал. Реакционную смесь упаривали с толуолом и гептаном. Остаток растворяли в хлороформе и фильтровали через микроколону SEP-PAK Si (Millipore, США) при элюировании этилацетатом (20 мл). При упаривании элюата получили 110 мг бесцветного сиропа, который хроматографировали на колонке (10×250 мм) с LiChroprep Si60 при элюировании смесью гексан — этилацетат, 80 : 20. Выделили 70,5 мг (выход 66,5%) лактона (XX), $[\alpha]_D^{25} -154,0^\circ$ (*c* 1, CHCl₃), *R_f* 0,57 (З).

Метил[(2 - азидоэтил)-2,4-ди-О-ацетил-β-D - глюкопиранозид] уронат (XXI). Раствор 50,7 мг (154 мкмоль) лактона (XX) в 2,5 мл абс. метанола выдерживали 92 ч при 22° С. Реакционную смесь упаривали, остаток 2 раза упаривали с бензолом и затем хроматографировали на колонке (10×250 мм) с LiChroprep Si60 при элюировании системой Д. Выделили 42,4 мг (выход 76%) диацетата (XXI), $[\alpha]_D^{25} -83,2^\circ$ (*c* 1, CHCl₃), *R_f* 0,26 (З). Спектр ¹³С-ЯМР: 170,5; 170,3 и 167,7 (СОСН₃, СООСН₃), 100,6 (С1, ¹J_{С1,Н1} 161,4), 73,3; 72,7; 72,6 и 71,8 (С2—С5), 52,8 (СООСН₃), 50,5 (СН₂Н₃), 20,8 и 20,6 (СОСН₃).

Метил[(2 - азидоэтил)-2,4-ди-О-ацетил-3-О-(2,3,4 - три-О-ацетил-α-L-рамнопиранозил)-β-D-глюкопиранозид] уронат (XXII). Суспензию 2,3,4-три-О-ацетил-α-L-рамнопиранозилбромид (получен из 157,5 мг (474 мкмоль) 1,2,3,4-тетра-О-ацетил-L-рамнопиранозы по методике [17]) и 108,6 мг (300 мкмоль) диацетата (XXI) в 2 мл абс. толуола перемешивали 1 ч под аргоном с молекулярными ситами 4 Å. Затем к смеси за 20 мин при -40° С добавляли по каплям раствор 173,5 мг (675 мкмоль) трифторметансульфоната (трифлата) серебра в 2,1 мл абс. толуола. Смесь перемешивали под аргоном 1 ч при -40° С, снимали охлаждение и продолжали перемешивание (12 ч при 20° С). Осадок отделяли фильтрованием через слой целита-545, промывали хлороформом. Объединенный фильтрат промывали насыщенным раствором NaHCO₃, водным раствором тиосульфата натрия, водой, сушили Na₂SO₄ и упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (10×250 мм) с LiChroprep Si60 при элюировании градиентом ацетона (0→15%) в бензоле и рехроматографировали (ВЭЖХ) на колонке (25×250 мм), элюируя смесью гексан — этилацетат, 63 : 37. Выделили 92 мг (выход 48%) защищенного дисахарида (XXII), $[\alpha]_D^{26} -46,2^\circ$ (*c* 1, CHCl₃), *R_f* 0,28 (Ж). Спектр ¹³С-ЯМР: 170,1; 170,0; 169,4 и 167,4 (СОСН₃, СООСН₃), 100,6 (С1, GlcA, ¹J_{С1,Н1} 158,7), 99,2 (С1, Rha, ¹J_{С1,Н1} 168,5), 80,1 (С3, GlcA), 72,9; 71,3; 70,8; 70,7; 70,0; 68,9 и 67,5 (С2—С5, Rha, С2, С4, С5, GlcA), 68,2 (ОН₂), 52,9 (СООСН₃), 50,7 (СН₂Н₃), 20,8 и 20,7 (СОСН₃), 17,3 (С6, Rha).

Метил[(2 - акриламидоэтил)-2,4-ди-О-ацетил-3-О-(2,3,4-три-О-ацетил-α-L-рамнопиранозил)-β-D-глюкопиранозид] уронат (XXIV). 88 мг (139 мкмоль) азидоэтилгликозида (XXII) гидрировали над 10% палладием на угле в смеси 2 мл этилацетата и 2 мл абс. метанола, содержащей 8,85 мкмл (153,5 мкмоль) уксусной кислоты. Через 1 ч при 20° С в реакционной смеси, по данным ТСХ (система Г), исчез исходный гликозид (XXII) с *R_f* 0,43 и появился аминоэтилгликозид (XXIII) с *R_f* 0 (Г) (*R_f* 0,54, система Б), дающий положительную реакцию с пингидрином. Катализатор отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали, остаток упаривали с бензолом и сушили в вакууме, после чего растворяли в 2 мл абс. этилацетата. В присутствии поли(4-винилпиридина) (Fluka, ФРГ) при охлаждении

(вода со льдом) и перемешивании к раствору аминоэтилгликозида (XXIII) тремя равными порциями (с интервалами в 30 мин) прибавляли 51 мкл (627 мкмоль) акрилоилхлорида. Смесь перемешивали 12 ч при 20° С. По данным ТСХ (система Д), исходный аминоэтилгликозид (XXIII) исчез и появился продукт реакции с R_f 0,40, дающий положительную реакцию с перманганатом калия. Реакционную смесь фильтровали, осадок промывали этилацетатом, объединенный фильтрат упаривали. Полученный остаток хроматографировали на колонке (10×250 мм) с LiChrospher Si60 при элюировании этилацетатом. Выделили 40,4 мг (выход 44%) акриламидоэтилгликозида (XXIV), $[\alpha]_D^{24} -26^\circ$ (с 1, CHCl_3), R_f 0,31 (этилацетат). Спектр ^{13}C -ЯМР: 169,8, 169,5 (C=O), 130,9 (CH=CH₂), 126,5 (CH=CH₂), 100,8 (C1, GlcA), 99,1 (C1, Rha), 79,7 (C3, GlcA), 72,5; 71,8; 70,6; 70,3; 69,9; 68,9 и 67,6 (C2—C5, Rha C2, C4 и C5, GlcA), 69,4 (OCH₂), 53,0 (COOCH₃), 39,4 (CH₂NH), 21,0; 20,8 и 20,7 (COCH₃), 17,3 (C6, Rha).

(2⁻-Акриламидоэтил)-3-О-(α -L-рамнопиранозил)- β -D-глюкопиранозидуроновая кислота (XXV). К раствору 40 мг (60,6 мкмоль) метилбиоуроната (XXIV) в 3,64 мл метанола при охлаждении (вода со льдом) прибавляли по каплям за 10 мин 608 мкл (608 мкмоль) 1 М водного раствора NaOH. Смесь выдерживали 2 ч при 4° С, затем разбавляли равным объемом воды, наносили на колонку (10×130 мм) с катионитом KV-2 (H⁺) и элюировали водой. Элюат наносили на колонку (15×120 мм) с DEAE-сфероном (CH₃COO⁻) и элюировали линейным градиентом уксусной кислоты (0→20%, 200 мл) со скоростью 3 мл/мин. Выделили 9,6 мг (выход 36%) биоуроновой кислоты (XXV) (R_f 0,25, система А) и 15,7 мг (выход 52%) 4-ацетата (XXVI), R_f 0,34 (А). К раствору 4-ацетата (XXVI) в мл воды при охлаждении (вода со льдом) за 10 мин добавляли по каплям 0,5 мл 1 М водного раствора NaOH. Смесь выдерживали 22 ч при 1° С и обрабатывали как описано выше. Выделили еще 12,2 мг (общий выход 82,5%) биоуроновой кислоты (XXV), $[\alpha]_D^{25} -42,8^\circ$ (с 1, вода). Спектр ^{13}C -ЯМР (D₂O) см. в табл. 3.

Сополимеризация углеводных мономеров (XIV) и (XXV) с акриламидом. К дегазированному в вакууме водоструйного насоса раствору 20 мг (45,7 мкмоль) биозида (XIV) и 32,5 мг (457 мкмоль) акриламида в 1 мл дистиллированной воды под аргоном прибавляли 10 мкл раствора TEMED (20 мкл в 80 мкл воды) и 1 мг персульфата аммония. Раствор перемешивали при 20° С и через 2,5 ч добавляли еще 10 мкл раствора TEMED. Загустевшую реакционную смесь перемешивали 24 ч при 20° С, разбавляли 2 мл воды и наносили на колонку (2,6×39 см) с сфадексом G-50 и элюировали пиридин-ацетатным буфером (2 мл уксусной кислоты и 4 мл пиридина в 1 л водного раствора, pH 5,5) со скоростью 1 мл/мин при использовании рефрактометрического детектора. Фракции, содержавшие сополимер (время выхода 92 мин), упаривали и лиофилизировали, сушили в вакууме над P₂O₅. Получили 44,85 мг (выход 85%) сополимера (XXVII), $[\alpha]_D^{28} -18^\circ$ (с 0,5, вода). Спектр ^{13}C -ЯМР (D₂O) см. в табл. 3.

К дегазированному раствору 21,8 мг (50 мкмоль) биозида (XXV) и 35,4 мг (500 мкмоль) акриламида в 1 мл дистиллированной воды под аргоном добавляли 20 мкл раствора TEMED (10 мкл в 90 мкл воды) и 1 мг персульфата аммония. Смесь перемешивали при 20° С, через 10 мин к загустевшей смеси добавляли еще 1 мл воды и продолжали перемешивание (24 ч при 20° С). Затем реакционную смесь разбавляли водой и фракционировали как описано выше. Выделили 46,8 мг (выход 82%) сополимера (XXVIII), $[\alpha]_D^{28} -21^\circ$ (с 1,0, вода). Спектр ^{13}C -ЯМР (D₂O) см. в табл. 3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hofmann P., Jann K., Jann B. // Carbohydr. Res. 1985. V. 139. P. 261—274.
2. Кочетков И. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Покровский В. И., Гендегник Ю. Я., Овчарова Н. М. Сополимер 3-О-[4-О-(β -D-маннопиранозил)- α -L-рамнопиранозил]- β -аллил-D-галактопиранозида с акриламидом, обладающий серологической специфичностью О-фактора 3 бактерий рода Сальмонелла, относящихся к серологической группе Е: А. с. 879970 СССР // Б. И. 1982. № 26. С. 316.
3. Chernyak A. Ya., Antonov K. V., Kochetkov N. K., Padyukov L. N., Tsvetkova N. V. // Carbohydr. Res. 1985. V. 141. № 1. P. 199—212.
4. Покровский В. В., Треуб А. В., Гендегник Ю. Я., Покровский В. И., Кочетков Н. К., Черняк А. Я., Левинский А. Б. // Иммунология. 1986. № 1. С. 46—50.

5. Тендетник Ю. Я., Овчарова Н. М., Покровский В. И., Грудкова М., Мали Д., Черняк А. Я., Левинский А. Б., Кочетков Н. К. // Иммунология. 1987. № 1. С. 80–82.
6. Юровский В. В., Бовин П. В., Сафонова Н. Г., Василов Р. Г., Хорлин А. Я. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 100–105.
7. Kosma P., Gass K., Schulz G., Christian R., Unger F. M. // Carbohydr. Res. 1987. V. 167. P. 39–54.
8. Roy R., Tropper F. // Glycoconjugate J. 1988. V. 5. № 3. P. 203–206.
9. Mariño-Albernas J., Verez-Bencomo V., Gonzalez-Rodriguez L., Perez-Martinez C. S., Gonzalez-Abreu Castell E., Gonzalez-Segredo A. // Carbohydr. Res. 1988. V. 183. № 2. P. 175–182.
10. Kosma P., Schulz G., Brude H. // Carbohydr. Res. 1988. V. 183. № 2. P. 183–199.
11. Литвак М. М., Бетанели В. И., Бакиновский Л. В., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 8. С. 1133–1142.
12. Wessel H.-P., Bundte D. R. // Carbohydr. Res. 1983. V. 124. № 2. P. 301–311.
13. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В., Байрамова Н. Э., Шашков А. С. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 1. С. 64–76.
14. Черняк А. Я., Антонов К. В., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1113–1127.
15. Dais P., Shing T. K. M., Perlin A. S. // Carbohydr. Res. 1983. V. 122. № 2. P. 305–313.
16. Бакиновский Л. В., Цветков Ю. Е., Байрамова Н. Э., Балаи Ш. Ф., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1980. № 8. С. 1905–1911.
17. Байрамова Н. Э., Бакиновский Л. В., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1985. № 5. С. 1122–1128.
18. King R. R., Cooper F. P., Bishop C. T. // Carbohydr. Res. 1977. V. 55. P. 83–93.
19. Rose W. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1947. V. 69. № 6. P. 1384–1387.
20. Bock K. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1984. V. 42. P. 193–225.
21. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. С. 59–75.
22. Черняк А. Я., Левинский А. Б., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1047–1058.
23. Черняк А. Я., Кононов Л. О., Антонов К. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1988. № 7. С. 1660–1667.
24. Dawson M. I., Hobbs P. D. // Carbohydr. Res. 1980. V. 85. № 1. P. 121–129.
25. Карпенко Г. В., Кошокова А. Б., Коряков Н. Я., Рогачев В. Л. // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 1978. Т. 21. № 11. С. 1591–1593.
26. Tietze L. F., Seele R. // Carbohydr. Res. 1986. V. 148. № 2. P. 349–352.
27. Черняк А. Я., Антонов К. В., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 7. С. 958–966.
28. Шашков А. С., Чижов О. С. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437–497.
29. Abram-Zollo P.-H., Sinaij P. // Carbohydr. Res. 1986. V. 150. P. 199–212.
30. Хроматография в тонких слоях/Ред. Э. Шталь. М.: Мир, 1965. С. 476.
31. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир. 1976. С. 440.

Поступила в редакцию
6.III.1989

SYNTHESIS OF 2-(ACRYLAMIDO)ETHYL GLYCOSIDES
OF 3-O-(β -D-GLUCOPYRANOSYLURONIC ACID)- α -L-RHAMNOSE
AND 3-O-(α -L-RHAMNOPYRANOSYL)- β -D-GLUCOPYRANURONIC ACID
AND THEIR FURTHER CONVERSION INTO COPOLYMER
ARTIFICIAL ANTIGENS

CHERNYAK A. Ya., KONONOV L. O., KOCHETKOV N. K.

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

The synthesis of disaccharide repeating units, *D*-GlcA-(β 1 \rightarrow 3)-*L*-Rha (fragment A) and *L*-Rha-(α 1 \rightarrow 3)-*D*-GlcA (fragment B), of the K54-antigenic polysaccharide from nonpathogenic *Escherichia coli* 06:K54:H10 is described. Essential stages of the synthesis of fragment A involved the glycosylation of methyl 2,4-di-O-benzoyl- α -*L*-rhamnopyranoside followed by acetolysis of the methyl glycoside obtained and further transformation into 2-(benzylloxycarbonylamino)ethyl glycoside; deprotection and, finally, conversion into 2-(acrylamido)ethyl glycoside. Selective opening of lactone ring in 2-azidoethyl 2,4-di-O-acetyl- β -*D*-glucopyranoside-6,3-lactone was used for deprotection of 3-OH group in the synthesis of fragment B. Rhamnosylation of the glucuronic acid derivative thus obtained followed by transformation into 2-(acrylamido)ethyl glycoside and deprotection gave fragment B. Both fragments A and B were converted into artificial antigens of copolymer type.