



УДК 547.458.07

СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ  
И ИХ ФРАГМЕНТОВ10\*. СИНТЕЗ ГЕКСАСАХАРИДА — ГЛЮКОЗНОГО АНАЛОГА ДИМЕРА  
ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА  
*SALMONELLA NEWINGTON**Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В.,  
Байрамова Н. Э., Шаилов А. С.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

При конденсации ацетогалогенозы, полученной из трисахарида *D-Glcp* ( $\beta 1 - 4$ )-*L-Rhap* ( $\alpha 1 - 3$ )-*D-Gal* с 1,2-О-изопропилиден-3-О-[4-О-(2,3,4-три-О-бензил- $\beta$ -*D*-глюкопиранозил)-2,3-ди-О-бензил- $\alpha$ -*L*-рамнопиранозил]-4,6-О-этилиден- $\alpha$ -*D*-галактопиранозой, производным того же трисахарида, в условиях гликозилирования по Гельфериху с последующим снятием защитных групп получен гексасахарид, представляющий собой димер соединенных  $\beta$ -(1—6)-гликозидной связью глюкозных аналогов повторяющегося трисахаридного звена специфического полисахарида бактерии *Salmonella newington*. Осуществленный синтез является первым примером сшивания повторяющихся гетеро-олигосахаридных звеньев антигенных полисахаридов.

Химический синтез специфических бактериальных полисахаридов, построенных из повторяющихся олигосахаридных звеньев и являющихся регулярными блок-полимерами, включает в свою схему две обязательных стадии: получение собственно повторяющегося олигосахаридного звена и сшивание олигосахаридных блоков с помощью поликонденсации или ступенчатого наращивания [2]. Если на первой стадии этой общей схемы синтеза бактериальных полисахаридов уже достигнуты определенные успехи и осуществлены первые синтезы три- и тетрасахаридов, являющихся биологическими повторяющимися звеньями специфических полисахаридов *Salmonella newington* [3, 4] и *S. senftenberg* [5], то вторая стадия, состоящая в превращении олигосахаридного блока в полимерную цепь, по-прежнему остается нерешенной проблемой.

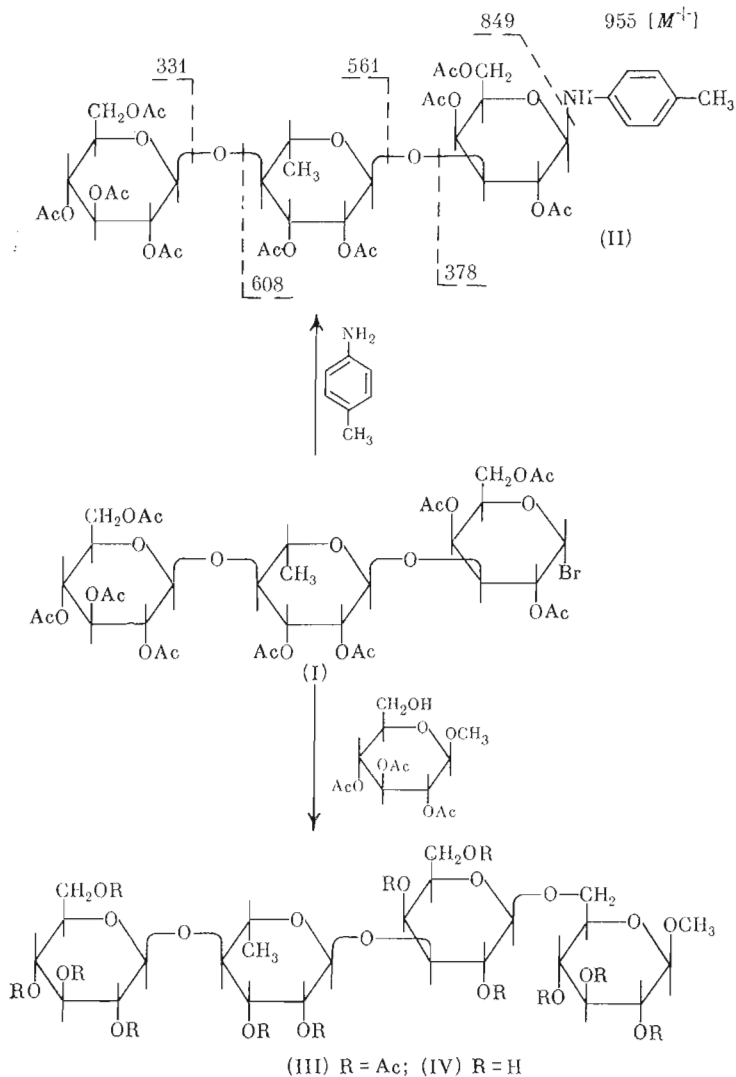
В настоящем сообщении мы приводим данные о синтезе гексасахарида, представляющего собой димер трисахарида *D-Glcp* ( $\beta 1 - 4$ )-*L-Rhap* ( $\alpha 1 - 3$ )-*D-Gal* — глюкозного аналога повторяющегося трисахаридного звена специфического полисахарида бактерии *S. newington*. Синтез трисахарида описан нами недавно [6].

Ступенчатое сшивание олигосахаридных блоков включает в себя в качестве главных моментов, помимо выбора эффективного метода гликозилирования, превращение одного блока в активный гликозилирующий компонент и расстановку защитных групп в другом блоке таким образом, чтобы высвобождалась или активировалась гидроксильная группа, необходимая для гликозилирования.

\* Сообщение 9 см. [1].

В качестве гликозилирующего компонента мы выбрали нонаацетат триозилбромид (I), который получался из полного ацетата трисахарида [6] действием бромистого водорода в смеси хлороформ—уксусная кислота и был охарактеризован данными масс-спектра N-(*n*-толил)гликозиламина (II), полученного из ацетата (I) и *n*-толуидина, как показано на схеме 1.

Схема 1

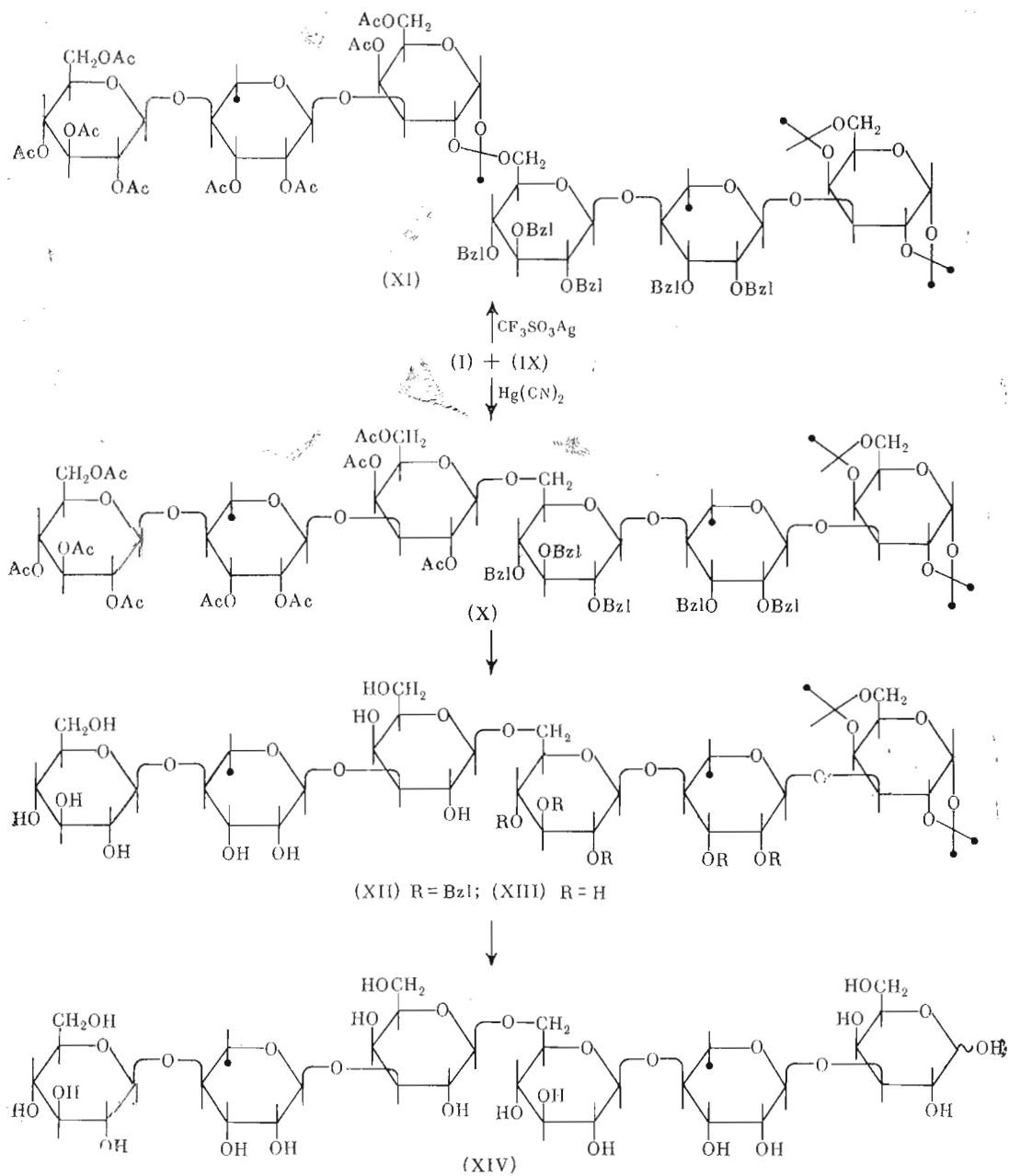


Получение гликозиламина (II) само по себе свидетельствовало, что ацетогалогеноза (I) в принципе может быть получена из трисахарида и что она обладает достаточной устойчивостью и реакционной способностью в реакции N-гликозилирования. Для проверки реакционной способности в реакции O-гликозилирования бромид (I) был введен в реакцию с метил-2,3,4-три-O-ацетил-β-D-глюкопиранозидом [7] в условиях реакции Гельфериша (схема 1). В результате с выходом 47% был получен тетрасахарид (III).

Для доказательства наличия (1—6)-гликозидной связи между остатками галактозы и глюкозы продукт конденсации (III) был омылен и полученный незамещенный тетрасахарид (IV) был исследован методом метилирования с идентификацией частично метилированных сахаров в виде



Схема 3



ацетатов полиолов методом ГЖХ-масс-спектрометрии [8]. В результате были идентифицированы 1,4,5-три-О-ацетил-2,3-ди-О-метилрампит, 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилсорбит, 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метилдульцит и 1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилсорбит в соотношении, близком к эквимолярному. О  $\beta$ -конфигурации образовавшейся (1—6)-галактозидной связи свидетельствовало разрушение остатка галактозы при окислении тетрасахарида (III)  $\text{CrO}_3$  в уксусной кислоте [9, 10]. Кроме того, строение тетрасахарида (IV) было подтверждено методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР и эти данные впоследствии были использованы при анализе структуры гексасахаридов (см. ниже). Таким образом, бромид (I) удовлетворительно выдерживал условия О-гликозилирования и в принципе мог быть использован в дальнейшем синтезе.

В качестве гликозилируемого компонента мы сначала выбрали полученное нами ранее [7] 6-О-третиловое производное (VI) (см. схему 2), надеясь осуществить его конденсацию с бромидом (I) по методу Бредерера [11]. Однако попытка гликозилирования третилового эфира (VI) бромидом (I) в присутствии  $\text{AgClO}_4$  и  $\text{CaSO}_4$  в нитрометане оказалась неудачной. Из реакционной смеси после удаления защитных групп были выделены галактоза, глюкозилрамноза и глюкозилрамнозилгалактоза; кроме того, в следовых количествах был обнаружен высший олигосахарид с низкой хроматографической подвижностью,  $R_{\text{Gal}} 0,21$  (BX).

Учитывая факт расщепления рамнозил(1—3)-галактозной связи, мы отказались от дальнейших попыток гликозилирования в присутствии перхлората серебра и обратились к методу Гельфериха. Для этой цели в качестве гликозилируемого компонента нам был необходим частично замещенный трисахарид со свободной гидроксильной группой при  $\text{C}_{(6)}$  остатка глюкозы. Вначале для защиты гидроксильных групп остатков глюкозы и рамнозы мы рассчитывали использовать О-ацетаты. С этой целью трисахарид (V) [6] был обработан *n*-анизилдифенилхлорметаном в пиридине и заацетилирован, в результате чего с выходом 78% было получено производное (VII), строение которого было подтверждено спектром ПМР.

Соответствующий пента-О-ацетат трисахарида получался при удалении монометокситретиловой группы мягким кислотным гидролизом, однако при этом происходила миграция О-ацетильных групп, приводящая к полному замещению первичноспиртового гидроксила остатка глюкозы. Вывод о миграции был сделан на основании спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР с использованием литературных данных о величинах химических сдвигов сигналов  $\text{C}_{(6)}$  в остатках глюкопиранозидов в случае незамещенной и ацетилированной первичной спиртовой группы [7].

Вследствие этого в качестве гликозилируемого компонента мы выбрали пента-О-бензиловое производное трисахарида (IX). Для этой цели *n*-метокситретиловый эфир (VII) дезацетилировали триэтиламино в метаноле и бензилировали хлористым бензилом в присутствии метилсульфиниланиона [12]. Полученное производное (VIII) обрабатывали трифторуксусной кислотой в хлористом метиле на холоду, в результате чего образовался трисахарид (IX). Строение соединений (VIII) и (IX) следовало из данных их спектров ПМР.

Гликозилирование трисахарид (IX) ацетогалогенозой (I) проводилось в ацетонитриле в присутствии цианистой ртути по методике, включающей в себя подготовку компонентов и проведение реакции в высоком вакууме [13]. В результате с выходом 60% был получен гексасахарид (X) (см. схему 3). Замена ацетонитрила на нитрометан снижала выход продукта до 10%, а добавление к реакционной смеси бензола для повышения растворимости гидроксильного компонента (IX) останавливало реакцию вообще.

Использование вместо цианистой ртути трифторметансульфоната серебра, рекомендованного недавно в качестве эффективного катализатора реакции гликозилирования [14], привело вместо ожидаемого производного (X) к изомерному гексасахаридному ортоэфиру (XI). Следует отметить, что для связывания выделяющейся в реакции трифторметансульфонокислоты мы использовали как рекомендованную авторами работы [14] тетраметилмочевину, так и 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилпиридин [15]. Однако в обоих случаях образовывалось только ортоэфирное производное (XI) с выходом ~ 20%. Близкие по хроматографической подвижности гексасахарид (X) и ортоэфир (XI) различались в условиях гидролитической пробы на ортоэфиры ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  в водном ацетоне гидролизует ортоэфирную связь, но не затрагивает гликозидную), и, кроме того, в спектрах ПМР обоих соединений существовали определенные различия.

В частности, в спектре ортоэфира (XI) имелись сигналы восьми О-ацетильных групп (1,87—2,20 м. д.) и одной С-метильной группы ортоэфирного цикла (1,58 м. д., синглет), тогда как в спектре гексасахарид (X) присутствовали сигналы девяти О-ацетильных групп (1,80—2,20 м. д.).

Свободный гексасахарид (XIV) был получен из замещенного гексасахарид (X) последовательной обработкой триэтиламинем в метаноле, гидрогенолизом над палладием и гидролизом 90% трифторуксусной кислотой. Частично замещенное производное (XIII) было использовано нами для доказательства строения полученного гексасахарид методом метилирования. Продукт метилирования был подвергнут стандартной обработке, включающей формолиз, гидролиз, восстановление боргидридом натрия и ацетилирование, в результате чего была получена смесь частично метилированных ацетатов полиолов, идентифицированных методом ГЖХ на капиллярных колонках с использованием заведомых образцов (см. табл. 1). Хромато-масс-спектрометрический анализ смеси [8] подтвердил полученные результаты, из которых следовало, что в гексасахариде (XIII) один остаток глюкозы находится на невосстанавливаемом конце, а другой замещен в положение 6; оба остатка рамнозы замещены в положение 4; один остаток галактозы — в положение 3, а другой, находящийся на восстанавливаемом конце, замещен полностью.

Таблица 1

Газохроматографический анализ гексасахарид (XIII) и метилтетразида (IV) в виде частично метилированных ацетатов полиолов\* на капиллярных колонках

Полиолы	(XIII)		(IV)	
	относительное количество	T <sub>отн</sub>	относительное количество	T <sub>отн</sub>
1,4,5-Три-О-ацетил-2,3-ди-О-метилрамнит	2	0,94	1	0,92
1,5-Ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилсорбит	1	1,00	1	1,00
1,3,5-Три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метилдальцит	1	1,16	1	1,30
1,5,6-Три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилсорбит	1	1,20	1	1,37
1,3,4,5,6-Пента-О-ацетил-2-О-метилдальцит	0,2	1,37	—	—
Гекса-О-ацетилдальцит	0,8	1,56	—	—

\* Условия ГЖХ для полиолов из (XIII): колонка длиной 65 м,  $\varnothing$  0,35—0,40 мм, OV-1; 230°; для полиолов из (IV): колонка длиной 40 м,  $\varnothing$  0,25—0,30 мм, 0,25% Dexsil-300; 205°.

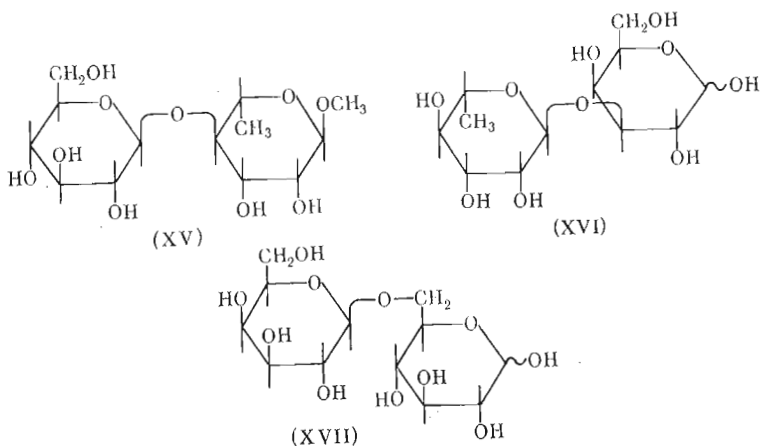
Таким образом, анализ методом метилирования показал, что в результате конденсации двух трисахаридных блоков получен гексасахарид с (1—6)-гликозидной связью между трисахаридными звеньями\*. Для определения конфигурации вновь образованной галактозидной связи гексасахарид (XIV) был подвергнут распаду по Смитсу, в результате чего образовался D-галактопиранозил-(1—1)-глицерин, содержащий интересующую нас гликозидную связь. Это соединение было выделено из реакционной смеси методом бумажной хроматографии и было индивидуально при ионообменной и, в виде полного ацетата, при газожидкостной хроматографии. При действии  $\beta$ -D-галактозидазы из *E. coli* выделенный галактозил-глицерин был полностью расщеплен на галактозу, идентифицированную с помощью углеводного анализатора и бумажной хроматографии, и глицерин, идентифицированный методом хроматографии на бумаге. Полученные данные указывали на то, что (1—6)-связь между повторяющимися трисахаридными звеньями имела  $\beta$ -конфигурацию, как и в нативном антигенном полисахариде [16].

Таким образом, экспериментально доказана принципиальная возможность синтеза регулярно построенных высших гетероолигосахаридов путем ступенчатого сшивания повторяющихся олигосахаридных звеньев.

\* Заслуживает внимания образование заметных количеств 2-О-метилдальцита, указывающее на возможную нестабильность 1,2-О-изопропилиденной защиты в 3-О-замещенной галактопиранозе в щелочных условиях. Это явление подтверждено на модельных соединениях и будет исследовано.

Хотя строение полученного гексасахарида было исчерпывающе доказано химическими методами анализа, мы, учитывая трудную доступность высших олигосахаридов и трудоемкость химических операций, считаем что в дальнейшем доказательство строения сложных олигосахаридов должно осуществляться с помощью неdestructивных физико-химических методов, и в настоящей работе приводим анализ спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР тетрасахарида (IV) и гексасахарида (XIV). Эти данные не только подтверждают строение полученных соединений, но и представляют сведения, необходимые для доказательства строения других высших олигосахаридов, синтез которых будет осуществлен в ходе выполнения программы по получению искусственных антигенов.

Для полной расшифровки спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-олигосахаридов (IV) и (XIV) мы синтезировали три дисахарида (XV) — (XVII) [17—19], мономерный состав которых и типы гликозидных связей удачным образом моделировали различные участки цепей (IV) и (XIV).



Расшифровка спектров самих дисахаридов была выполнена с привлечением литературных данных по химическим сдвигам моносахаридов с учетом влияния образования гликозидной связи [20].

Как видно из сопоставления формул (XV) и (IV), спектр (XV) должен почти точно имитировать спектр двух звеньев на невозстанавливаемом конце тетрасахарида (IV). Существенная поправка должна быть внесена только для химического сдвига  $C_{(1)}$  в рамном остатке, но спектр дисахарида (XVI) дает нам возможность определить величину этой поправки. Отнесение линий за счет резонанса атомов углерода остальных двух остатков в тетрасахариде было сделано с учетом данных по химическим сдвигам в дисахаридах (XVI) и (XVII) с допущением, что образование гликозидной связи мало влияет на химические сдвиги атомов углерода, находящихся в  $\gamma$ -положении к месту замещения [20]. Так, для определения положения резонанса  $C_{(1)}$  и  $C_{(2)}$  в рамном остатке (IV) можно использовать соответствующие химические сдвиги того же остатка в дисахаридах (XVI); положения резонанса  $C_{(3)}$ — $C_{(6)}$  галактозного остатка в соединениях в (IV) и (XVI) также должны быть близкими. Аналогично, практически без внесения каких-либо поправок можно использовать химические сдвиги, найденные для  $C_{(1)}$ ,  $C_{(5)}$  и  $C_{(6)}$  галактозного и  $C_{(3)}$ — $C_{(6)}$  глюкозного остатков из дисахарида (XVII) для отнесения соответствующих линий в спектре тетразида (IV).

По этому же принципу был расшифрован спектр гексасахарида (XIV). Однако в этом случае остается некоторая неопределенность в отнесении сигналов двух рамных звеньев. Сопоставление химических сдвигов  $C_{(1)}$  для рамных звеньев в олигосахаридах (XV), (XVI), (IV) и (XIV)

Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$ -ЯМР соединений (IV), (XIV) – (XVII) растворы в  $\text{D}_2\text{O}$ , внутренний эталон  $\text{CH}_3\text{OH}$  (50,15 м. д.),  $\delta$ -шкала

Соединение	Звено	Химические сдвиги						O—CH <sub>3</sub>	
		C <sub>(1)</sub>	C <sub>(2)</sub>	C <sub>(3)</sub>	C <sub>(4)</sub>	C <sub>(5)</sub>	C <sub>(6)</sub>		
(XV)	Glc	104,7	75,2	77,3	71,0	77,3	62,1	55,9	
	Rha	102,05	71,4	71,8	82,5	68,25	18,1		
(XVI)	Rha	103,7	71,7	71,7	73,6	70,4	18,0		
	Gal	$\alpha$	93,9	70,6	78,45	70,0	72,85		32,4
		$\beta$	98,0	71,7	81,85	69,25	76,4		62,2
(XVII)	Gal	104,55	72,0	73,95	69,9	76,4	62,2		
	Glc	$\alpha$	93,55	72,8	73,95	70,8	71,65		69,9
		$\beta$	97,6	75,5	76,9	70,8	76,05		69,9
(IV)	Glc	104,6	75,1	77,0	70,7	77,0	61,8		
	Rha	103,4	71,3	71,3	82,25	68,9	18,15		
	Gal	104,4	71,3	81,8	69,6	76,3	62,1		
	Glc'	104,4	74,3	77,2	70,6	76,1	69,6		
(XIV)	Glc	104,7	75,1	77,05	70,8	77,05	62,05	58,6	
	Rha	103,15	71,4	71,4	82,2	68,9	18,2		
	Gal	104,4	71,4	82,0	69,6	76,6	62,05		
	Glc'	103,45	75,1	77,2	70,8	76,3	69,75		
	Rha'	102,1	71,4	71,6	82,8	68,9	18,3		
	Gal'	$\beta$	97,5	72,7	80,1	69,75	76,6		62,05

свидетельствует, что положение сигнала этого атома углерода заметно зависит от общей длины цепи олигосахаридов и положения рамного звена в ней. По-видимому, это связано с большой конформационной подвижностью рамнопиранозного цикла. Однако нам не удалось заметить закономерность в изменении химических сдвигов атомов углерода рамного цикла при изменении длины цепи, и поэтому отнесение сигналов за счет резонанса атомов углерода в остатке Rha или Rha' можно считать условным (см. табл. 2).

Проведенная таким образом полная расшифровка спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР тетрасахарида (IV) и гексасахаридов (XIV) не оставляла сомнений в правильности приписываемых им структур. Действительно, изменение конфигурации хотя бы одной гликозидной связи или изменение ее положения в одном из циклов привели бы к множественным изменениям в спектрах, исключаям совпадение их со спектрами модельных дисахаридов (XV)–(XVII). В частности, замещение глюкозы по C<sub>(6)</sub> в олигосахаридах (IV) и (XIV) следовало из величин химических сдвигов этого углеродного атома — 69,6 и 69,75 м. д. (незамещенный C<sub>(6)</sub> 61,8–62,1 м. д.), а также сигналов C<sub>(5)</sub> — 76,1 и 76,3 м. д. (в случае незамещенного C<sub>(6)</sub> 77,0–77,3 м. д.).  $\beta$ -Конфигурация галактозидной связи подтверждалась сигналами C<sub>(1)</sub> (104,4 м. д.), C<sub>(2)</sub> (71,3–71,4 м. д.), C<sub>(3)</sub> (81,8–82,0 м. д.) и C<sub>(5)</sub> (76,3–76,6 м. д.) остатка галактозы. В случае  $\alpha$ -галактозидной связи эти атомы имели бы химические сдвиги, близкие к 100,5; 70,6; 78,5 и 71,8 м. д. соответственно [20].

### Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на блоке Кофлера, оптическое вращение — на поляриметре Perkin-Elmer 141, ГЖХ выполняли на приборах ЛХМ-8МД и Биохром-1 с использованием набивных и капиллярных колонок (см. табл. 1). Масс-спектры снимали на приборе Varian MAT CN-6, хромато-масс-спектрометрический анализ проведен на приборе Varian MAT-111 Gnom на 1,5-метровой стальной колонке, заполненной 10%-



ной OV-1 на хромосорбе W. Анализ свободных сахаров проводили на автоматическом анализаторе углеводов Technicon на колонке (0,6 × 25 см) с анионитом DA-X4 в 0,5 М боратном буфере (рН 9) при 55° (скорость 60 мл/мин). Спектры ПМР снимали на спектрометрах Varian D-60-IL и Tesla BS-497 относительно ТМС в шкале δ. Спектры <sup>13</sup>С-ЯМР соединений (V), (XIV)—(XVII) снимались на приборе Bruker WP-60 с рабочей частотой по углероду 15,08 МГц (растворы в D<sub>2</sub>O, температура 30°, внутренний эталон СН<sub>3</sub>ОН, химический сдвиг относительно ТМС — 50,15 м. д. был определен в специальном эксперименте). Условия съемки: импульс 5,5 мкс (45°), объем памяти 8/4 К, масштаб 100 Гц/см, частота повторения импульсов 1,1 с.

Растворы упаривали в вакууме при ≤ 40°. Аналитическую ТСХ выполняли на пластинках с незакрепленным слоем силикагеля ЛС 5/40 ммк + + 6% гипса (ЧССР) при проявлении 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, препаративную ТСХ (ПТСХ) — на закрепленном слое того же силикагеля при проявлении водой. Гексасахариды (X) и (XI) выделяли методом ПТСХ на силикагеле ЛСЛ<sub>254</sub> 5/40 ммк (ЧССР). Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Л 100/250 ммк (ЧССР), элюируя в градиенте эфира в бензоле (0 → 100% эфира). Системы растворителей для ТСХ: ацетон — хлороформ, 15 : 85 (А); этилацетат — метанол, 1 : 1 (Б); метанол — хлороформ, 2 : 8 (В); ацетон — хлороформ, 2 : 8 (Г); этилацетат (Д); ацетон — хлороформ, 3 : 97 (Е); ацетон — хлороформ, 7 : 93 (Ж); метилэтилкетон — бензол, 2 : 8 (З); этанол — хлороформ, 3 : 7 (И). БХ выполнена на бумаге Filtrak FN 18 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) при проявлении KIO<sub>4</sub> — AgNO<sub>3</sub> — NaOH или кислым фталатом анилина. Гидролитическая проба на ортоэфиры: 1—2 мг соединения обрабатывали 30 мин при 20° 1% ацетоновым раствором 0,1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, нейтрализовали каплей пиридина и упаривали. Остаток анализировали методом ТСХ. Фермент β-D-галактозидаза (лактаза) — препарат фирмы Schuchart (ФРГ).

*2,4,6-Три-О-ацетил-3-О-[4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-2,3-ди-О-ацетил-α-L-рамнопиранозил]-α-D-галактопиранозилбромид (I)*. К раствору 100 мг дека-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил-(1—4)-α-L-рамнопиранозил-(1—3)-D-галактозы [6] в 10 мл абс. СНCl<sub>3</sub> при 0° добавляли 2 мл 33% HBr в ледяной АсОН и выдерживали 2 ч при 0°. После этого смесь разбавляли СНCl<sub>3</sub>, промывали охлажденным раствором NaHCO<sub>3</sub>, ледяной водой, сушили и упаривали. Получили сиропообразный бромид (I), содержащий лишь следы распада (по ТСХ), который немедленно вводили в гликозилирование без дополнительной очистки. Выход 100 мг (98%), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +58° (с 1, СНCl<sub>3</sub>), R<sub>f</sub> 0,61 (А).

*2,4,6-Три-О-ацетил-3-О-[4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-2,3-ди-О-ацетил-α-L-рамнопиранозил]-N-п-толил-β-D-галактопиранозиламин (II)*. В 5 мл абс. эфира растворяли 5 мг бромида (I), 5 мг *n*-толуидина и оставляли на 16 ч при 20°. Затем смесь разбавляли 10 мл эфира, промывали 0,05 н. HCl, водой, сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали; из остатка методом ПТСХ в системе А выделяли *n*-толуидид (II) в виде аморфного порошка, идентичный ранее описанному [21]. Т. пл. 101—105°, данные масс-спектрометрии приведены на схеме 1, R<sub>f</sub> 0,61 (А).

*Додека-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил-(1—4)-α-L-рамнопиранозил-(1—3)-β-D-галактопиранозил-(1—6)-метил-β-D-глюкопиранозид (III)*. В 5 мл абс. СН<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> растворяли 100 мг (0,41 ммоль) бромида (I), 32 мг (0,40 ммоль) метил-2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозид [7] и 28 мг (0,11 ммоль) Hg(CN)<sub>2</sub>, высушенных в вакууме над щелочью. Смесь перемешивали 18 ч при 50°, разбавляли СНCl<sub>3</sub>, промывали 1 н. KBr, раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, высушивали и упаривали. Остаток ацетилировали Ас<sub>2</sub>O в пиридине. После упаривания реакционной смеси с толуолом из остатка методом ПТСХ в системе А выделили 55 мг ацетата (III) в виде сиропа. Выход 47%, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> —18,4° (с 2,5; СНCl<sub>3</sub>), R<sub>f</sub> 0,46 (А). Спектр ПМР (CDCl<sub>3</sub>): 1,25 д

(3H, C—CH<sub>3</sub> рамнозы,  $J_{6,5}$  6 Гц); 1,87—2,17 (36H, CH<sub>3</sub>COO); 3,45 с (3H, O—CH<sub>3</sub>).

*β-D-Глюкопиранозил-(1-4)-α-L-рамнопиранозил-(1-3)-β-D-галактопиранозил-(1-6)-метил-β-D-глюкопиранозид (IV)*. 40 мг ацетата метилтетразида (III) обрабатывали 1 ч при 20° 5 мл 0,2 М раствора метилата натрия в метаноле, деионизовали катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>), упаривали. Получили 23 мг хроматографически однородного метилтетразида (IV). Выход 100%,  $[\alpha]_D^{20}$  —33,5° (с1, H<sub>2</sub>O),  $R_f$  0,39 (Б),  $R_{Gal}$  0,43 (БХ). После гидролиза (IV) (2 н. HCl, 2 ч, 100°) и упаривания остаток содержал глюкозу, рамнозу и галактозу в соотношении 2 : 1 : 1. Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР рассматривается в общей части.

*1,2-O-Изопропилиден-3-O-[4-O-(2,3,4-три-O-ацетил-6-O-монометокситритил-β-D-глюкопиранозил)-2,3-ди-O-ацетил-α-L-рамнопиранозил]-4,6-O-этилиден-α-D-галактопираноза (VII)*. 300 мг (0,54 ммоль) (V) [6] и 500 мг (1,62 ммоль) *n*-анизилдифенилхлорметана растворяли в 25 мл абс. пиридина и оставляли на 16 ч при 20°. ТСХ-анализ показал, что исходное соединение исчезло ( $R_f$  0,16 (В)) и образовался единственный продукт с  $R_f$  0,49 (В). Далее добавляли к раствору 20 мл Ac<sub>2</sub>O и оставляли еще на 20 ч. Затем смесь выливали в воду со льдом и экстрагировали хлороформом, экстракт промывали раствором NaHCO<sub>3</sub>, водой, высушивали MgSO<sub>4</sub> и упаривали. Из остатка методом колоночной хроматографии выделили 440 мг хроматографически однородного соединения (VII) в виде стекловидного аморфного порошка (т. пл. 110—114°). Выход 78%,  $[\alpha]_D^{20}$  —4° (с1, CHCl<sub>3</sub>),  $R_f$  0,66 (Г), 0,32 (Е). Спектр ПМР (CCl<sub>4</sub>): 1,15—1,50 (12H, C—CH<sub>3</sub>); 1,65 с, 1,92с, 1,97с (9 H, CH<sub>3</sub>COO); 2,08 с (6H, CH<sub>3</sub>COO); 3,73 с (3 H, O—CH<sub>3</sub>); 5,73 д (1 H, аномерный протон галактозы,  $J_{1,2}$  4 Гц); 6,63—7,47 (14 H, ароматич., в том числе два дублета по 2 H *n*-метоксифенильного кольца при 6,73 и 7,25 м.д.,  $J_{A,B} = J_{B,A} = 9$  Гц).

*Демонетокситритилирование трисахарида (VII)*. К 430 мг трисахарида (VII) в 10 мл абс. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при 2—4° добавляли 10 мл 2% CF<sub>3</sub>COOH в абс. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Через 1,5 мин раствор обрабатывали сухим дауэксом 1 × 8 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), промытым спиртом и хлороформом, до прекращения выделения CO<sub>2</sub>. Смолу отфильтровывали, фильтрат упаривали и методом колоночной хроматографии выделили 200 мг сиропообразного пентаацетата трисахарида с  $R_f$  0,22 (Г) и 0,55 (Д). Выход 63%,  $[\alpha]_D^{20}$  —34° (с 2, CHCl<sub>3</sub>). Спектр ПМР (CDCl<sub>3</sub>): 1,15—1,50 (12 H, C—CH<sub>3</sub>); 1,93; 1,97; 2,00; 2,03; 2,08 (15 H, CH<sub>3</sub>COO); 5,82 д (1 H, аномерный протон галактозы  $J_{1,2}$  4 Гц). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, TMC): 63,0 м. д. — сигнал C<sub>(6)</sub> остатка глюкозы. В соответствии с данными [7] сигнал C<sub>(6)</sub> со свободной OH-группой лежит в области 61,1—61,7 м. д., с ацетилированной — при 62,1—62,5 м. д.

*1,2-O-Изопропилиден-3-O-[4-O-(2,3,4-три-O-бензил-6-O-монометокситритил-β-D-глюкопиранозил)-2,3-ди-O-бензил-α-L-рамнопиранозил]-4,6-O-этилиден-α-D-галактопираноза (VIII)*. Получение метилсульфиниланиона. 50 мг NaN (50% суспензия в минеральном масле) в токе аргона промывали пентаном (3 × 5 мл), добавляли 5 мл абс. диметилсульфоксида и перемешивали при 60° до полного растворения. Через 1 ч получали прозрачный светло-зеленый раствор.

*Бензилирование*. 100 мг трисахарида (VII) омыляли 5 мл 10% триэтиламина в метаноле (16 ч, 20°), высушивали в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, растворяли в 3 мл абс. диметилсульфоксида и добавляли к полученному метилсульфиниланиону, охлажденному до 20°. Раствор перемешивали 0,5 ч, добавляли 0,4 мл хлористого бензила и перемешивали еще 24 ч при 20°. Затем смесь разбавляли хлороформом, промывали водой до тех пор, пока хлороформный слой не становился прозрачным (7—10 раз), высушивали и упаривали. Из остатка методом ПТСХ в системе Е выделяли 95 мг хроматографически однородного соединения (VIII) в виде сиропа. Выход 77%,  $[\alpha]_D^{20}$  + 16° (с1, CHCl<sub>3</sub>),  $R_f$  0,53 (Е). Спектр ПМР (CDCl<sub>3</sub>): 1,20—1,50 (12 H, C—CH<sub>3</sub>); 3,62 с (3 H, O—CH<sub>3</sub>); 5,72 д (1 H, аномерный протон га-

лактозы,  $J_{1,2}$  3,5 Гц); 6,50—7,50 (39 Н, ароматич., в том числе дублет (2 Н) протонов *n*-метоксифенильного кольца при 6,63 м. д.,  $J_{A,B}$  9 Гц).

*1,2-O-Изопропилиден-3-O-[4-O-(2,3,4-три-O-бензил-β-D-глюкопиранозил)-2,3-ди-O-бензил-α-L-рамнопиранозил]-4,6-O-этилиден-α-D-галактопираноза (IX)*. Раствор 390 мг соединения (VIII) в 20 мл абс.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  обрабатывали в 20 мл 2%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  в абс.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при 2—4° в течение 1 мин. Затем смесь выливали в охлажденный раствор  $\text{NaHCO}_3$ , органический слой промывали водой, высушивали и упаривали. Из остатка методом колоночной хроматографии выделяли 280 мг трисахарида (IX) в виде сиропа. Выход 91%,  $[\alpha]_D^{20} +15,1^\circ$  (с 1,4;  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f$  0,32 (Ж). Спектр ПМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 1,15—1,50 (12 Н, С— $\text{CH}_3$ ); 5,82 д (1 Н, аномерный протон галактозы,  $J_{1,2}$  4 Гц); 7,00—7,38 (25 Н, ароматич.).

*Гексасахарид (X)*. Синтез проводили на установке высокого вакуума [13]. В один из отростков двурогой ампулы помещали 56 мг (0,06 ммоль) соединения (I) и 45 мг (0,045 ммоль) трисахарида (IX) в 2 мл абс. бензола, в другой — 15 мг (0,06 ммоль)  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  и магнит. Ампулу присоединяли к высоковакуумной системе, содержимое лиофилизovali и высушивали при  $10^{-3}$  мм рт. ст. Затем в ампулу перегоняли 2 мл абс.  $\text{CH}_3\text{CN}$ , отсоединяли от системы с сохранением вакуума, содержимое обоих отростков объединяли и перемешивали магнитной мешалкой при 20°. Через 16 ч растворитель упаривали, остаток растворяли в  $\text{CHCl}_3$ , промывали 1 н.  $\text{KBr}$ , раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, высушивали и упаривали. Из остатка методом ПТСХ в системе 3 выделяли 50 мг гексасахарида (X) в виде сиропа. Выход 60%,  $[\alpha]_D^{20} -7^\circ$  (с 1,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f$  0,15 (З). Продукт устойчив при гидролитической пробе на ортоэфир. Спектры ПМР ( $\text{CCl}_4$ ): 1,15—1,50 (15 Н, С— $\text{CH}_3$ ); 1,80—2,20 (27 Н,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 5,70 д (1 Н, аномерный протон концевой галактозы,  $J_{1,2}$  4 Гц); 6,90—7,35 (25 Н, ароматич.).

*Ортоэфир (XI)*. 50 мг (0,05 ммоль) трисахарида (IX), 86 мг (0,33 ммоль)  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Ag}$  и 70 мг (0,33 ммоль) 4-метил-2,6-ди-*трет*-бутилпиридина [15], предварительно высушенных в вакууме, перемешивали в 3 мл абс.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  в темноте при 20° с небольшим количеством молекулярных сит 4 Å. Через 3 ч добавляли по каплям раствор 100 мг (0,11 ммоль) бромида (I) в 2 мл абс.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и перемешивали еще 16 ч. Осадок отфильтровывали, фильтрат промывали холодной водой, холодной 1 н.  $\text{HCl}$ , снова водой, охлажденным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, высушивали и упаривали. Из остатка методом ПТСХ в системе 3 выделяли 20 мг ортоэфира (XI) в виде сиропа. Выход 22%,  $[\alpha]_D^{20} +4^\circ$  (с 1,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f$  0,20 (З). При гидролитической пробе ортоэфир (XI) распадался на трисахарид (IX) и продукт омыления галогенозы: (I) по  $\text{C}_{(1)}$  галактозы ( $R_f$  соответственно 0,25 и 0,03 в системе 3). Спектр ПМР ( $\text{CCl}_4$ ): 1,15—1,50 (15 Н, С— $\text{CH}_3$ ); 1,58 с (3 Н, С— $\text{CH}_3$  ортоэфирного цикла); 1,87—2,20 (24 Н,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 5,60 д (1 Н, аномерный протон галактозы, лежащей в середине цепи,  $J_{1,2}$  4,5 Гц); 5,73 д (1 Н, аномерный протон концевой галактозы,  $J_{1,2}$  3,5 Гц); 7,00—7,38 (25 Н, ароматич.).

*Гексасахарид (XII)*. Раствор 50 мг соединения (X) и 0,6 мл абс. триэтиламина в 5,4 мл абс. метанола перемешивали 16 ч при 20°. После упаривания с метанолом получили 40 мг (100%) хроматографически однородного сиропообразного (XII),  $[\alpha]_D^{20} -2^\circ$  (с 1,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $R_f$  0,40 (И).

*Гексасахарид (XIII)*. 40 мг гексасахарида (XII) в 10 мл метанола гидрировали 8 ч при 40° на 10% палладии на угле. Получили 25 мг хроматографически однородного гексасахарида (XIII) в виде сиропа. Выход 90%,  $[\alpha]_D^{20} -15,4^\circ$  (с 1,3;  $\text{CH}_3\text{OH}$ ),  $R_f$  0,25 (Б). После гидролиза (2 М  $\text{HCl}$ , 2 ч, 100°) и упаривания остаток содержал глюкозу, рамнозу и галактозу в соотношении 1 : 1 : 1.

*β-D-Глюкопиранозил-(1—4)-α-L-рамнопиранозил-(1—3)-β-D-галактопиранозил-(1—6)-β-D-глюкопиранозил-(1—4)-α-L-рамнопиранозил-(1—3)-D-галактоза (XIV)*. 40 мг гексасахарида (XIII) обрабатывали 1 ч 5 мл 90%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  при 20°. Раствор упаривали с толуолом досуха и из остатка выделяли гексасахарид (XIV) в виде сиропа методом препаративной ВХ.

Выход 26 мг (70%),  $[\alpha]_D^{18} = -18^\circ$  (с 1, H<sub>2</sub>O),  $R_{Gal}$  0,27 (БХ). Продукт содержит глюкозу, рамнозу и галактозу в соотношении 1 : 1 : 1. Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР рассматривается в общей части.

*Распад по Смуту и ферментативный гидролиз.* 15 мг гексасахарид (XIV) обрабатывали 72 ч 3 мл 0,1 М раствора NaIO<sub>4</sub> в темноте при 20°. Затем добавляли 120 мг NaBH<sub>4</sub>, через 2 ч подкисляли CH<sub>3</sub>COOH и деионизовали на колонке с сефадексом G-15 (2 × 66 см, V<sub>0</sub> 70 мл) в пиридин-ацетатном буфере. Элюат содержал примесь ацетата пиридиния, которую удаляли катионитом КУ-2 (H<sup>+</sup>). После упаривания остаток гидролизовали 24 ч 2 мл 0,5 н. HCl при 20°. Галактопиранозилглицерин, выделенный из гидролизата методом препаративной БХ ( $R_{Gal}$  1,1), был однократно на углеводном анализаторе при ионообменной хроматографии на анионите DA-X4 (время выхода 25 мин) и, в виде полного ацетата, при ГЖХ на 2-метровой стальной колонке, заполненной 3%-ной SE-30 на хроматоне N-AW (240°, T<sub>удерж</sub> 3,6 мин). После гидролиза (2 н. HCl, 2 ч, 100°) с помощью БХ были идентифицированы галактоза и глицерин ( $R_{Gal}$  1,8).

К 1 мг галактопиранозилглицерина в 0,2 мл фосфатного буфера (рН 7) добавили две капли раствора β-D-галактозидазы и инкубировали 24 ч при 38°. По данным БХ и анализа на углеводном анализаторе, в гидролизате содержались галактоза, глицерин и полностью отсутствовал исходный галактопиранозилглицерин.

Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук Э. А. Мистрюкову за любезно предоставленную возможность проведения ГЖХ-анализа с использованием капиллярных колонок.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шибасв В. Н., Чекуничков В. Н., Кочетков Н. К. (1978) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2124—2128.
2. Kochetkov N. K. (1975) Pure and Appl. Chem., 42, 327—350.
3. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Malysheva N. N., Chernyak A. Ya., Klimov E. M., Bayramova N. E., Torgov V. I. (1975) Carbohydr. Res., 45, 283—290.
4. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2578—2581.
5. Kochetkov N. K., Malysheva N. N., Torgov V. I., Klimov E. M. (1977) Carbohydr. Res., 54, 269—274.
6. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В., Байрамова Н. Э. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1609—1613.
7. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Байрамова Н. Э., Николаев А. В. (1978) Изв. АН СССР. Сер. хим., 652—656.
8. Jansson P.-E., Kenne L., Liendgren H., Lindberg B., Lönngren J. (1976) A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates, University of Stockholm, Chem. Commun., № 8, pp. 1—75.
9. Angyal S., James W. (1970) Carbohydr. Res., 12, 124—131.
10. Hoffman J., Lindberg B., Svensson S. (1972) Carbohydr. Res., 26, 661—666.
11. Bredereck H., Wagner A., Geissel D., Gross P., Hutten U., Ott H. (1962) Chem. Ber., 95, 3056—3063.
12. Stoffin A., Stoffin P. (1967) J. Org. Chem., 32, 4001—4006.
13. Бочков А. Ф., Обручников И. В., Кочетков Н. К. (1974) Ж. общ. химии, 44, 1197—1203.
14. Hanessian S., Vanoub J. (1977) Carbohydr. Res., 53, C13—C16.
15. Anderson A. G., Stang P. J. (1976) J. Org. Chem., 41, 3034—3036.
16. Hellerqvist C. G., Lindberg B., Lönngren J., Lindberg A. A. (1971) Acta chem. scand., 25, 939—944.
17. Bebault G. M., Dutton G. G. S. (1972) Can. J. Chem., 50, 3373—3378.
18. Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Байрамова Н. Э. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 142—148.
19. Masamune M., Kamiyama S. (1957) Tôhoku J. Exptl. Med., 60, 43—49; (1958) Chem. Abstr., 52, 8974—8975.
20. Шашков А. С., Чижов О. С. (1976) Биоорг. химия, 2, 437—496.
21. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Байрамова Н. Э. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2231—2234.

Поступила в редакцию  
30.VI.1978

SYNTHESIS OF ANTIGENIC BACTERIAL POLYSACCHARIDES AND THEIR  
FRAGMENTS. 10. SYNTHESIS OF HEXASACCHARIDE, A GLUCOSE ANALOG  
OF DIMER OF THE REPEATING UNIT OF SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM  
*SALMONELLA NEWINGTON*

KOCHETKOV N. K., DMITRIEV B. A., NIKOLAEV A. V.,  
BAYRAMOVA N. E., SHASHKOV A. S.

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

Condensation of 2,4,6-tri-O-acetyl-3-O-[4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2,3-di-O-acetyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl bromide with 1,2-O-isopropylidene-3-O-[4-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2,3-di-O-benzyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]-4,6-O-ethylidene- $\alpha$ -D-galactopyranose in Helferich reaction followed by removal of the protecting groups lead to the hexasaccharide composed of two glucose analogs of the repeating unit of *Salmonella newington* specific polysaccharide linked by  $\beta$ -(1-6) glycosidic bond. This synthesis is the first example of coupling the repeating heterooligosaccharide units of antigenic polysaccharides.

---