



УДК 547.458.22'391.41.057:57.083.33

УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИЙ СОПОЛИМЕР СО СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ
КАПСУЛЯРНОГО ПОЛИСАХАРИДА
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, ТИП 3

Черняк А. Я., Антонов К. В., Дмитриев Б. А.,
Бочетков Н. К., Падюков Л. Н.*, Цветкова Н. В.*

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;
* Центральный научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва

Описан синтез β -аллилгликозида целлобиоуроновой кислоты и превращение его в углеводсодержащий полимер путем радикальной сополимеризации с акриламидом. Методом иммуноферментного анализа показано, что полученный сополимер (M 100–300 кДа, содержание углеводов 27%) обладает серологической активностью капсулярного полисахарида *Streptococcus pneumoniae*, тип 3.

Возросшая чувствительность современных иммунологических методов (радиоиммунный и иммуноферментный анализ) предъявляет повышенные требования к специфичности реакций, лежащих в их основе. Принципиальное значение для этих методов имеет использование стандартных препаратов антигенов. Создание подобных референс-препаратов на основе природных антигенов сопряжено с трудностью стандартизации многочисленных стадий получения антигена и с необходимостью подтверждения его структуры независимыми химическими и физико-химическими методами. Решение этой проблемы мы видим в создании искусственных антигенных препаратов, обладающих специфичностью только определяемых антигенов.

В исследовании иммунологических свойств бактериальных полисахаридов (в частности, в связи их структуры со специфичностью) значительную роль играют искусственные антигены, моделирующие различные фрагменты бактериального полисахарида [1]. Такие антигены характеризуются строгой определенностью и однородностью строения олигосахаридных детерминантных групп и, кроме того, не содержат антигенных примесей, неизбежных в случае природных антигенов, выделенных из бактериальных клеток. Включение в искусственные антигены непривидных полимеров в качестве носителя детерминантных групп позволяет теоретически избежать перекрестных и неспецифических реакций. Такие препараты, возможно, выступят в роли своеобразных «идеальных» стандартных антигенов для чувствительных реакций иммунологического микроанализа, а также в качестве контрольных препаратов при получении природных антигенов. Искусственные антигены позволяют также сделать шаг и к стандартизации препаратов антител путем получения при иммунизации антигеном популяций антител ограниченной гетерогенности. Однако ввиду отсутствия полной гомологии в строении искусственных и природных антигенов нельзя с уверенностью исключить различий поведения обоих типов антигенов в иммунологических реакциях.

Основной метод построения углеводсодержащих искусственных антигенов, разработанный еще в 30-е годы, состоит в ковалентном присоединении углеводной детерминанты к высокомолекулярному носителю — как правило, к белку [1]. Предложенный нами альтернативный вариант перехода от углеводных гаптенных к высокомолекулярному антигенному препарату заключается в использовании модифицированных олигосахаридных детерминант в качестве мономеров в реакции сополимеризации с неугле-

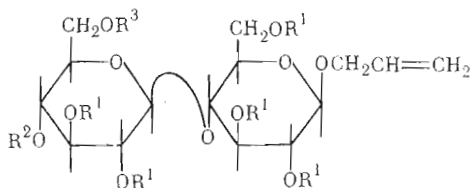
водным мономером [2]. Этот подход позволяет получать полностью синтетические углеводные антигены, не содержащие в своем составе иммуногенного белка. Так, при сополимеризации аллилгликозидов олигосахаридных детерминант с акриламидом нами были синтезированы антигены с групповой специфичностью О-антигенных полисахаридов сальмонелл серологических групп Е и В [2-5].

В настоящей работе описано применение данного подхода для получения кислого углеводсодержащего сополимера со специфичностью капсулярного полисахарида *Streptococcus pneumoniae*, тип 3 (S3), построенного из повторяющихся остатков целлобиуроновой кислоты, соединенных друг с другом ($\beta 1 \rightarrow 3$)-связями [6]. Для получения искусственного антигена неогликопротеинового типа со специфичностью полисахарида S3 Гелбел [7] использовал β -(*n*-аминобензил)гликозид целлобиуроновой кислоты, выделенной из S3-полисахарида кислотным гидролизом. Известные химические синтезы целлобиуроновой кислоты основаны или на избирательном каталитическом окислении β -бензилцеллобиозида, протекающем с низким выходом [8], или на окислении первичной гидроксильной группы при C6' в 1,6-ангидроцеллобиозе [9].

В настоящей работе для получения аллил- β -целлобиозидуроновой кислоты (VII), углеводного мономера в синтезе сополимера (VIII) со специфичностью S3, мы также исходили из целлобиозы, осуществив избирательное освобождение гидроксильной группы при C6' последовательным использованием 4',6'-О-бензилиденовой и 6'-О-тримильной защитных групп. Из ацетобромцеллобиозы и аллилового спирта в условиях реакции Гельфериха был получен аллил-2,3,6,2',3',4',6'-гепта-О-ацетил- β -целлобиозид (I) с выходом 72%. Омыление ацетильных групп метилатом натрия в метаноле дало свободный β -аллилцеллобиозид (II), строение которого было подтверждено данными спектра ^{13}C -ЯМР в сравнении со спектром β -метилцеллобиозида [10]. Аномерные атомы углерода резонировали в области 102-104 м.д., что свидетельствует о β -конфигурации обеих гликозидных связей (см. таблицу).

Кипячением β -аллилцеллобиозида (II) с α, α -дибромтолуолом в пиридине и последующим исчерпывающим ацетилированием получен кристаллический аллил-2,3,6,2',3'-пента-О-ацетил-4',6'-О-бензилиден- β -целлобиозид (III) с выходом 73%. Структуру соединения (III) подтверждало наличие характеристических сигналов защитных группировок в спектре ПМР. Гидролитическое удаление бензилиденовой группы нагреванием с разбавленной уксусной кислотой привело к аллил-2,3,6,2',3'-пента-О-ацетил- β -целлобиозиду (IV). Сравнение спектров ^{13}C -ЯМР β -аллилцеллобиозида (II) и его гепта-О-ацетата (I) показывает, что сигналы атомов углерода, особенно C3' и C5' в ацетилированном производном, заметно смещены в более сильное поле. В спектре продукта гидролиза (IV) сигналы C3' и C5' смещены в более слабое поле по сравнению с сигналами C3 и C5 и их химические сдвиги близки к химическим сдвигам C3' и C5' в спектре свободного β -аллилцеллобиозида (II). Учитывая, что сдвиг сигнала в сильное поле в данном случае обусловлен главным образом β -эффектом ацетилирования, можно считать доказанным, что в соединении (IV) гидроксильные группы в положениях 4' и 6', т. е. в β -положениях к C3' и C5', не ацетилированы.

- (I) $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{Ac}$
 (II) $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$
 (III) $\text{R}^1 = \text{Ac}$, R^2 , $\text{R}^3 = \text{PhCH} <$
 (IV) $\text{R}^1 = \text{Ac}$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$
 (V) $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{Ac}$, $\text{R}^3 = \text{Tr}$
 (VI) $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{Ac}$, $\text{R}^3 = \text{H}$



Тримильрованием пента-О-ацетата (IV) кипячением с тритилхлоридом в пиридине с последующим ацетилированием с высоким выходом получен аллил-2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил-6'-О-тримиль- β -целлобиозид (V). Строе-

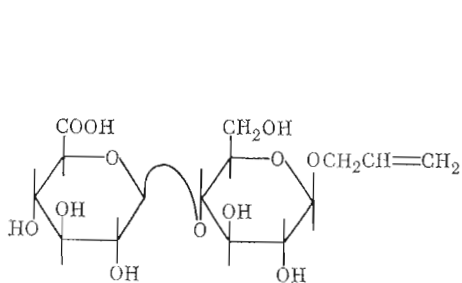
Данные спектров ^{13}C -ЯМР синтетированных соединений (δ , м. л.) ^{1*}

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	OCH ₂	CH=	=CH ₂	Растворитель
(I)	99,1	70,95	72,6	76,5	71,65	61,9	99,7	71,65	72,7	68,4	72,3	62,4	69,4	116,8	134,3	DMSO- <i>d</i> ₆
(II)	99,6	71,9	73,1	76,6	72,8	62,1	100,8	72,15	72,9	68,2	71,9	61,85	70,0	117,5	133,6	CDCl ₃
(IV)	102,3	73,6	75,4	80,7	75,3	61,05	103,4	73,8	77,1	70,55	77,0	61,5	69,35	116,7	135,2	DMSO- <i>d</i> ₆
(VI)	99,35	71,9	73,55	76,6	72,75	62,1	100,6	72,0	76,05	69,1	75,95	62,4	70,0	117,6	135,5	CDCl ₃
(VII)	99,6	71,95	73,5	76,55	72,9	62,35	100,7	72,2	73,0	68,75	74,7	61,4	70,1	117,55	133,6	CDCl ₃
(VIII-1)	102,3	74,05	75,5	80,1	75,4	61,2	103,5	73,9	76,3	72,3	75,8	173,4	71,8	119,85	134,6	D ₂ O
(IX)**	103,55	74,2	75,9	80,3	75,6	61,5	103,55	74,1	76,5	72,5	75,9	—	70,0	117,5	133,5	D ₂ O
(X)**	99,7	71,5	73,0	68,7	72,0	62,15										CDCl ₃
(X)**	102,5	74,3	77,05	70,9	77,05	62,1										D ₂ O

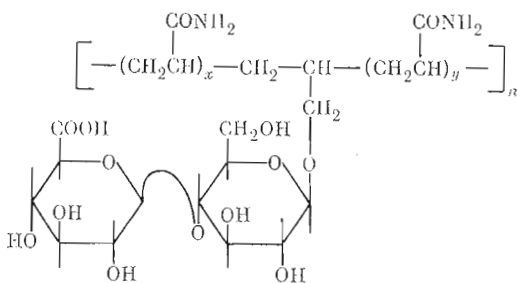
^{1*} Спектры в DMSO-*d*₆ получены при 80° С, остальные — 20°С: хим. сдвиги CH₃CO — 169, 0—170,6, CH₃ — 20,2—20,9 м. л.

^{2*} Аллил-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозид.

^{3*} Аллил-β-D-глюкопиранозид.



(VII)



(VIII-1) - (VIII-3)

ние соединения (V) подтверждают данные спектра ПМР, в котором присутствуют характеристические сигналы всех защитных групп. В частности, ацетоксильные группы проявляются в виде серии хорошо разрешенных индивидуальных сигналов, отнесение которых было сделано на основании данных спектра ПМР аналогичного производного β -метилцеллобиозида [11]. Детритилирование (V) было осуществлено метанолизом в присутствии перхлората пиридина [12] и привело к избирательному освобождению гидроксильной группы при С6' без миграции ацетильных групп, о чем свидетельствуют данные спектра ^{13}C -ЯМР. В спектре детритилированного продукта (VI) сигнал С6' смещен в область 61,4 м.д., тогда как сигналы С6 и С6' в спектре полного ацетата (I) располагаются при 62,1 и 61,85 м.д.

Гекса-О-ацетат (VI) был окислен реагентом Джонса [13] в ацетоне и после удаления ацетильных групп в продукте реакции омылением 3% водно-спиртовой щелочью была выделена аллил- β -целлобиозидуроновая кислота (VII) с выходом 80%. Сравнение спектров ^{13}C -ЯМР соединений (VII) и (II) обнаруживает их близость; отличия в спектре производного (VII) отражают появление карбоксильной группы в положении 6' [14]: сигнал С6' смещается в слабое поле с 61,5 до 173,4 м.д., сигнал С4' смещается на +1,75 м.д., а сигнал С5' — на -1,3 м.д. Наличие свободной карбоксильной группы подтверждает также электрофоретическая подвижность соединения (VII).

Превращение аллил- β -целлобиозидуроновой кислоты (VII) в высокомолекулярный препарат (VIII) было осуществлено путем сополимеризации с акриламидами в водном растворе при иницировании реакции N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамином и персульфатом аммония. Сополимер (VIII) был выделен из реакционной смеси гель-хроматографией на сефадексе G-50 при элюировании пиридин-ацетатным буфером (рН 5). По данным ультрафильтрации через мембраны «Diaflo» молекулярная масса сополимера составляет 100–300 кДа. При варьировании соотношения аллилгликозида (VII) и акриламида в исходной смеси сополимеризации (2:1, 1:1 и 1:2) были получены сополимеры (VIII-1)–(VIII-3), содержащие 27, 13 и 3% углеводных детерминант. Содержание глюкозы и глюкуроновой кислоты определяли после предварительного метанолиза сополимеров (1 н. HCl, 100°С) методом ГЖХ в виде ацетатов метилгликозидов с добавлением гексаацетата инозита в качестве внутреннего стандарта; по данным анализа, глюкоза и глюкуроновая кислота присутствуют в сополимерах (VIII-1)–(VIII-3) в соотношении 1:1. Строение сополимера (VIII-1) подтверждают также данные спектра ^{13}C -ЯМР (см. таблицу). Положение сигналов атомов углерода, относящихся к углеводным остаткам, в спектре сополимера (VIII-1) отвечает их положению в спектре углеводного мономера (VII), а смещение сигнала С1 остатка глюкозы в спектре (VIII-1) закономерно обусловлено изменением структуры агликона при переходе от мономера к сополимеру. Кроме сигналов углеводных остатков в спектре сополимера (VIII-1) имеются сигналы неуглеводной линейной цепи: CONH₂-групп (180,6 и 181,6 м.д.), CH-групп (42,7–43,5 м.д.) и CH₂-групп (35,4–37,1 м.д.).

Серологическая специфичность сополимеров (VIII-1)–(VIII-3) с раз-

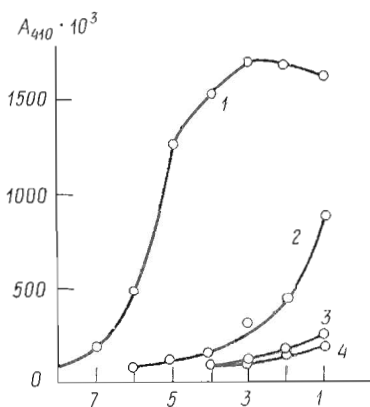


Рис. 1

Рис. 1. Активность реакции полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 3 в ИФА с антисыворотками к *S. pneumoniae* серотипов 3 (1), 8 (2), 12 (3) и 1 (4). (Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс приведены логарифмы разведений сывороток, начальное разведение 1:100)

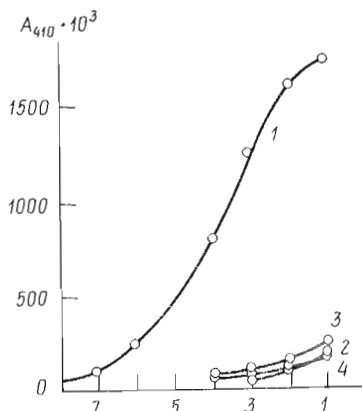


Рис. 2

Рис. 2. Активность реакции сополимера (VIII-1) в ИФА с антисыворотками к *S. pneumoniae* серотипов 3 (1), 8 (2), 12 (3) и 1 (4)

личным содержанием детерминантных групп была изучена методом иммуноферментного анализа (ИФА) с 15 антисыворотками к различным серотипам и серогруппам пневмококков (см. «Экспериментальную часть»). Следует отметить, что сополимеры лучше сенсibilizировали планшеты при pH 7,2, чем при pH 9,6. При кислых значениях pH (аланинацетатный буфер) сенсibilизация практически не наблюдалась. В ИФА с природным полисахаридом S3 была выявлена четкая реакция с гомологичной антисывороткой к серотипу 3 пневмококка (рис. 1), а также слабая перекрестная реакция с антисывороткой к серотипу 8, отмеченная ранее в литературе [15]. С другими антипневмококковыми сыворотками реакция не обнаруживалась или была очень слабой (не более 250 ед. в разведении сыворотки 1:100 и менее 100 ед. в разведении 1:800).

Активность реакции сополимера (VIII-1) в ИФА с антисывороткой к серотипу 3 была сравнима с реакцией природного антигена (рис. 2). Так же вел себя и сополимер (VIII-2), но интенсивность реакции была несколько ниже. Сополимер (VIII-3) реагировал одинаково слабо со всеми использованными антипневмококковыми сыворотками.

Мы специально вызвали высокую концентрацию препаратов при сенсibilизации, чтобы выявить все возможные неспецифические реакции. При снижении концентрации антигенов до 10 мкг/мл наблюдалась реакция только с антисывороткой к серотипу 3 пневмококка.

Таким образом, синтезированные образцы сополимера (VIII) выражено и специфично реагируют с антисывороткой к серотипу 3 пневмококка и, следовательно, обладают серологической специфичностью кансулярного полисахарида *S. pneumoniae*, тип 3.

Экспериментальная часть

ТСХ выполнена на пластинках «Silufol» (ЧССР) с использованием следующих систем растворителей: хлороформ — ацетон, 8:2 (А) и 9:1 (Б), хлороформ — этанол, 9:1 (В) и 97:3 (Г). Для обнаружения веществ пластинки нагревали при 200—250°С. Препаративное хроматографическое разделение осуществляли на колонках с силикагелем L 40/100 мкм (ЧССР). ВХ выполнена нисходящим методом на бумаге «Filtrak FN11» (ГДР) в системе этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 18:3:1:4 (система Д). Электрофорез на бумаге проводили в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере с pH 4,5 при 28 В/см. Для детекции производных аллилгликозидов на пластинках и бумаге использовали водно-содовый

раствор $KMnO_4$. Спектры ПМР сняты на приборе Varian DA-60-IL (60 МГц, США), внутренний стандарт — тетраметилсилан (ТМС). Спектры ^{13}C -ЯМР получены на приборе Bruker WM-250 (62,89 МГц, ФРГ), при съемке спектров в $CDCl_3$ и $DMSO-d_6$ внутренним эталоном служил ТМС, для растворов в D_2O — метанол (δ 50,15 м.д.). ГЖХ выполнена на приборе Pye Unicam-104 с использованием стальной колонки ($150 \times 0,4$ см) с 3% OV-1 на диатомите CQ (100—120 меш) при $200^\circ C$ и скорости газа-носителя (N_2) 30 мл/мин. Температуры плавления определены на микроблоче Кофлера, оптическое вращение — на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141 (США). Для проведения сополимеризации использовали перекристаллизованный 4 раза акриламид (Serva, ФРГ). Аллил- β -D-глюкопиранозид и аллил-2,3,4,6-тетра-O-ацетил- β -D-глюкопиранозид получены по методике [16].

Капсулярный полисахарид *S. pneumoniae*, тип 3 (S3), был получен осаждением ацетоном супернатанта от выращивания бактериальных клеток (штамм № 3) на жидкой питательной среде с последующей депротеинизацией осадка [17]. Препарат S3 обладал специфической активностью в реакциях преципитации.

В работе были использованы кроличьи антисыворотки к следующим серотипам и серогруппам *S. pneumoniae*: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 15, 18, 19, 23 и 25. Сыворотки были получены ранее в ЦНИИВС им. И. И. Мечникова [18].

Гетерогенный ИФА проводили в планшетах для гемагглютинации (отечественного производства) с округлым дном либо в планшетах из жаропрочного полистирола (экспериментальная партия) с плоским дном. При подборе условий сенсibilизации для растворов антигенов были использованы следующие буферы: 0,1 М аланин-ацетатный, pH 4,3; 0,1 М фосфатный, pH 7,2, и 0,1 М карбонат-бикарбонатный, pH 9,6. Растворы антигенов (100 мкг/мл) вносили в лунки и инкубировали 24 ч при $4^\circ C$. Затем планшеты отмывали от несвязавшегося материала, вносили антисыворотки двукратного разведения (начиная с 1:100), инкубировали 1 ч при $37^\circ C$, отмывали несвязавшийся материал и вносили раствор конъюгата (антитела к γ -глобулину кролика, связанные с пероксидазой хрена), оптимальное разведение 1:2000. Препарат конъюгата получен в ЦНИИВС им. И. И. Мечникова. После инкубации в течение 1 ч при $37^\circ C$ планшеты вновь отмывали и вносили субстратную смесь (перекись водорода с 5-аминосалициловой кислотой). Через 1 ч результаты регистрировали на мини-спектрофотометре при 410 нм. Активность реакции выражали в оптических единицах поглощения, умноженного на 10^3 ($A \cdot 10^3$).

Аллил-2,3,6,2',3',4',6'-гепта-O-ацетил- β -целлобиозид (I). Суспензию 6,6 г 2,3,6,2',3',4',6'-гепта-O-ацетил- α -целлобиозилбромид [19] и 2,38 г цианида ртути в 30 мл свеженерегнанного (над CaO) аллилового спирта перемешивали при $50-60^\circ C$ до полного растворения бромид (~0,5 ч). По данным ТСХ (система А), реакционная смесь содержит продукт реакции с R_f 0,63 и небольшую примесь с R_f 0,23. Смесь упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе и промывали насыщенным раствором KI, содержащим $KHCO_3$, водой, сушили $MgSO_4$ и упаривали. Хроматографией остатка при элюировании смесью хлороформ — ацетон, 9:1, выделяли 4,5 г (71,7%) аллил-2,3,6,2',3',4',6'-гепта-O-ацетил- β -целлобиозид (I), т. пл. $186-188^\circ C$ (из этанола), $[\alpha]_D^{20} -23^\circ$ (с 4,8; $CHCl_3$). Найдено, %: C 51,40; H 5,94. $C_{29}H_{40}O_{18}$. Вычислено, %: C 51,47; H 5,95.

β -Аллилцеллобиозид (II). 4 г аллил-гепта-O-ацетил- β -целлобиозид (I) суспендировали в 30 мл 0,1 н. раствора $MeONa$ в метаноле, суспензию перемешивали при $20^\circ C$ до полного растворения (1—1,5 ч), после чего реакционную смесь нейтрализовали катионитом КУ-2 (H^+), фильтровали, смолу промывали метанолом, объединенный фильтрат упаривали, остаток перекристаллизовывали из изопропанола с добавкой этанола. Выделено 1,9 г (85%) β -аллилцеллобиозид (II), т. пл. $134-136^\circ C$, $[\alpha]_D^{20} -18^\circ$ (с 1,8; $MeOH$), R_{G1CUA} 1,6 (Д). Найдено, %: C 46,84; H 6,69. $C_{25}H_{28}O_{11}$. Вычислено, %: C 47,11; H 6,85.

Аллил-2,3,6,2',3'-пента-О-ацетил-4',6'-О-бензилиден-β-целлобиозид (III). Раствор 2 г β-аллилцеллобиозида (II) в 45 мл сухого пиридина кипятили 1 ч с 1 мл (1,2 экв.) свежеперегнанного α,α-дибромтолуола. К охлажденной реакционной смеси добавляли 10 мл уксусного ангидрида, смесь выдерживали 12 ч при 20° С, после чего выливали на лед, выпавший осадок растворяли в хлороформе и промывали холодным раствором КНСО₃ и водой, сушили MgSO₄. Полученный при упаривании остаток упаривали с толуолом и гептаном и затем хроматографировали при элюировании хлороформом, при этом выделили продукт реакции с R_f 0,65 (B), после перекристаллизации из этанола получили 2,6 г (73%) производного (III), т. пл. 234–236° С, $[\alpha]_D^{20} -43^\circ$ (с 1; СНСl₃). Спектр ПМР (CDCl₃, δ, м.д.): 2,00–2,14 (15H, AcO), 4,36 (д, 1H, J_{1,2} 8 Гц, H-1), 4,53 (д, 1H, J_{1,2} 8 Гц, H-1'), 5,64 (с, 1H, PhCH), 5,60–6,10 (м, 1H, CH₂=CHCH₂O-), 7,27–7,55 (м, 5H, Ph). Найдено, %: С 56,61; Н 5,72. C₃₂H₄₀O₁₆. Вычислено, %: С 56,47; Н 5,92.

Аллил-2,3,6,2',3'-пента-О-ацетил-β-целлобиозид (IV). Суспензию 2,5 г бензилиденевого производного (III) в 60 мл 50% уксусной кислоты нагревали при 100° С до получения гомогенного раствора, упаривали, остаток многократно упаривали с толуолом и спиртом. По данным ТСХ (система В), остаток содержит продукт реакции с R_f 0,4 и менее подвижную примесь. Хроматографией при элюировании градиентом этанола (0→11%) в хлороформе выделяли 1,94 г (87%) аллил-2,3,6,2',3'-пента-О-ацетил-β-целлобиозида (IV), т. пл. 194–196° С (из толуола), $[\alpha]_D^{23} -37^\circ$ (с 2,6; СНСl₃). Найдено, %: С 51,09; Н 5,98. C₂₃H₃₆O₁₆. Вычислено, %: С 50,67; Н 6,12.

Аллил-2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил-6'-О-третил-β-целлобиозид (V). К раствору 1,68 г пентаацетата (IV) в 40 мл сухого пиридина добавляли 1,85 г трифенилхлорметана, смесь кипятили 3 ч до исчезновения исходного вещества. По данным ТСХ (система Г), появлялся продукт реакции с R_f 0,4, содержащий третильную группу (характерное желтое окрашивание при нагревании пластинки). К охлажденной смеси добавляли 5 мл уксусного ангидрида, через 12 ч смесь упаривали, остаток многократно упаривали с толуолом и гептаном до полного удаления пиридина и уксусного ангидрида. Остаток хроматографировали при элюировании градиентом ацетона (0→4%) в хлороформе, выделили 2,16 г (87%) хроматографически однородного третилового эфира (V) в виде бесцветной пены, $[\alpha]_D^{20} +3,4^\circ$ (с 4,5; СНСl₃), R_f 0,63 (B). Спектр ПМР (CDCl₃, δ, м.д.): 1,73 (с, 3H, AcO-4'), 1,83 (с, 3H, AcO-3), 1,95 (с, 3H, AcO-3'), 2,03 (с, 6H, AcO-2' и AcO-2), 2,10 (с, 3H, AcO-6), 4,15 (д, 1H, J_{1,2} 7,5 Гц, H-1), 4,52 (д, 1H, J_{1,2} 7,5 Гц, H-1'), 5,60–6,10 (м, 1H, CH₂=CHCH₂O), 7,20–7,50 (15H, Ph₃C).

Аллил-2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил-β-целлобиозид (VI). 1,27 г перхлората пиридиния, предварительно высушенного в вакууме над P₂O₅ (100° С, 2 ч), прибавляли к раствору 2 г третилового эфира (V) в смеси 30 мл абс. нитрометана и 10 мл абс. метанола. Смесь нагревали 5 ч при 60–65° С до исчезновения исходного вещества, при этом появлялся продукт реакции с R_f 0,5 (B). Смесь упаривали, остаток растворяли в хлороформе, фильтровали, фильтрат пропускали через небольшой слой силикагеля и упаривали. Присутствующий в остатке трифенилкарбинол экстрагировали горячим гексаном (3×70 мл), получали 1,2 г хроматографически чистого гексаацетата (VI), $[\alpha]_D^{20} -23^\circ$ (с 2,4; СНСl₃).

Аллил-β-целлобиозидуриновая кислота (VII). К раствору 270 мг аллил-2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил-β-целлобиозида (VI) в 5 мл ацетона добавляли 0,4 мл реагента Джонса (1 г CrO₃, 1,5 мл воды и 0,5 мл конц. H₂SO₄), смесь перемешивали 2 ч при 20° С. Избыток окислителя разлагали 2 мл этанола, затем смесь нейтрализовали насыщенным раствором КНСО₃ и фильтровали, фильтрат обрабатывали КУ-2 (H⁺) и экстрагировали хлороформом. Органический слой фильтровали через слой силикагеля, промывали этанолом, при упаривании элюата получали 260 мг бесцветного сиропа с R_f 0,3 (A). Сироп растворяли в 8 мл 3% раствора КОН в 90% водном

спирте, полученный раствор выдерживали 1,5 ч при 20° С, затем нейтрализовали КУ-2 (Н⁺) и фильтровали через слой активированного угля на целите, фильтрат концентрировали и лиофилизировали. Получено 135 мг (80%) аморфного порошка β-аллилгликозида (VII), однородного по данным БХ ($R_{\text{ГЛЮА}}$ 1,3, система Д) и электрофореза на бумаге ($E_{\text{ГЛЮА}}$ 0,7). Аналитический образец β-аллилгликозида (VII) получен с помощью ионообменной хроматографии на колонке с дауэксом 1×8 (100–200 меш) в АСО-форме. Вещество наносили на колонку в водном растворе, затем колонку промывали водой и 10% уксусной кислотой элюировали аллил-β-целлобиозидуроновою кислоту (VII), $[\alpha]_D^{25} -35,5^\circ$ (с 1, вода).

Сополимеры аллил-β-целлобиозидуроновою кислоты (VII) с акриламидом. Раствор 50 мг аллил-β-целлобиозидуроновою кислоты (VII) и 25 мг акриламида в 0,7 мл дистиллированной воды деаэрировали 10–15 мин в вакууме водоструйного насоса, затем в смесь добавляли 2 мкл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина и 1 мг персульфата аммония и выдерживали 2 ч при 20° С. Загустевшую смесь разбавляли 1 мл воды и наносили на колонку (35×2 см) с сефадексом G-50 (V_0 45 мл), элюировали пиридин-ацетатным буфером с рН 5, собирая фракции по 5 мл (анализ фракций осуществляли с помощью углеводного анализатора). Фракции 9–14, содержащие сополимер, объединяли, концентрировали, несколько раз упаривали с водой и лиофилизировали. Получено 40 мг сополимера (VIII-1), $[\alpha]_D^{20} -8^\circ$ (с 0,5; вода).

По аналогичной методике при соотношении соединения (VII) и акриламида 1 : 1 и 1 : 2 в исходной смеси получены образцы сополимера (VIII) с меньшим содержанием углеводных детерминант. Для определения содержания углеводов образцы сополимеров подвергали метанолизу (1 М HCl, 100° С, 12 ч), упаривали, ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине, удаляли избыток реагентов упариванием с толуолом и спиртом и полученную смесь метилгликозидов анализировали методом ГЖХ с добавлением ацетата инозита в качестве внутреннего стандарта.

Авторы благодарят А. С. Шашкова за съемку спектров ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stowell C. P., Lee Y. C. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1980, v. 37, p. 225–281.
2. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Покровский В. И., Тендетник Ю. Я. Докл. АН СССР, 1982, т. 263, № 5, с. 1277–1280.
3. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Chernyak A. Ya., Levinsky A. V. Carbohydr. Res., 1982, v. 110, № 2, p. C16–C20.
4. Покровский В. И., Тендетник Ю. Я., Покровский В. В., Овчарова И. М., Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я. Ж. микробиол., 1983, № 4, с. 62–65.
5. Покровский В. В., Тендетник Ю. Я., Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я. Ж. микробиол., 1983, № 4, с. 65–67.
6. How M. J., Brimacombe J. S., Stacey M. Adv. Carbohydr. Chem., 1964, v. 19, p. 303–358.
7. Goebel W. F. J. Exp. Med., 1938, v. 68, № 4, p. 469–484.
8. Jaume G., Demmig W. Chem. Ber., 1960, v. 93, № 2, p. 356–360.
9. Lindberg B., Selleby L. Acta chem. scand., 1960, v. 14, № 5, p. 1051–1053.
10. Крылова Р. Г., Усов А. И., Шашков А. С. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1578–1585.
11. Koizumi K., Utamura T. Chem. Pharm. Bull., 1981, v. 29, № 10, p. 2791–2798.
12. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Байрамова Н. Э., Николаев А. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1978, № 3, с. 652–656.
13. Bowden K., Heilbron I. M., Jones E. R. H., Weedon B. C. L. J. Chem. Soc., 1946, p. 39–47.
14. Шашков А. С., Чижов О. С. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437–497.
15. Russel H., Edwards L. R., Wortham E. W., Facklam R. R. J. Clin. Microbiol., 1980, v. 11, № 1, p. 198–199.
16. Lee R. T., Lee Y. C. Carbohydr. Res., 1974, v. 37, № 1, p. 193–201.
17. Цветкова Н. В., Ванеева Н. И., Шагам Н. Л., Кузнецова Е. М., Батура А. П. Ж. микробиол., 1981, № 12, с. 66–69.
18. Батура А. П., Лифшиц М. Б., Клименко Т. В. Ж. микробиол., 1981, № 12, с. 50–52.
19. Fischer E., Zemplén G. Chem. Ber., 1910, v. 43, № 2, p. 2536–2543.

Поступила в редакцию
21.III.1984

CARBOHYDRATE-CONTAINING COPOLYMER HAVING THE SPECIFICITY
OF CAPSULAR POLYSACCHARIDE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
TYPE 3

CHERNYAK A. Ya., ANTONOV K. V., DMITRIEV B. A.,
KOCHETKOV N. K., PADYUKOV L. N.*, TSVETKOVA N. V.*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; * I. I. Mechnikov Central Research Institute
of Vaccines and Sera, Moscow*

The synthesis of allyl β -glycoside of cellobiuronic acid by chemical modification of cellobiose was described. The carbohydrate-containing polymers with different content of determinant groups were obtained via radical copolymerization of this hapten with acrylamide. The copolymer which contained 27% carbohydrates and had molecular mass about 100–300 kilodaltons had the serological specificity of the capsular polysaccharide *Streptococcus pneumoniae* type 3 as shown by an enzyme linked immunosorbent assay.