



УДК 547.458.057

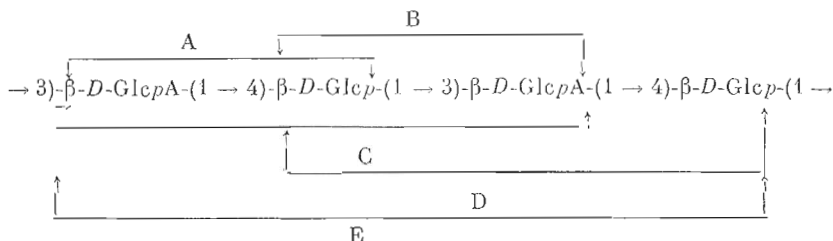
СИНТЕЗ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ КАПСУЛЯРНОГО ПОЛИСАХАРИДА *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*, ТИП 3

Черняк А. Я., Антонов К. В., Кочетков Н. К.

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

Синтезирован набор олигосахаридов (ди-, три- и тетрасахариды), состоящих из остатков глюкозы и глюкуроновой кислоты, соединенных β 1-3- и β 1-4-гликозидными связями. Олигосахариды получены в виде аллилгликозидов, удобных для превращения в синтетические антигены и иммуносорбенты методом сополимеризации.

Недавно нами описан синтез двух перекрывающихся дисахаридных фрагментов А и В (целлобиуроновая и псевдоламинарибиуроновая кислоты) линейной цепи капсулярного полисахарида *Streptococcus pneumoniae*, тип 3 (S3) [1, 2]. Полученные на их основе синтетические антигены, содержащие относительно много концевых остатков глюкуроновой кислоты или глюкозы, были использованы для подтверждения иммунодоминантного характера фрагмента А [2]. Для более детального изучения иммунохимии этого бактериального полисахарида мы решили получить набор более крупных олигосахаридных фрагментов полисахаридной цепи S3 (трисахариды С и D, тетрасахарид Е), включающих как незамененные концевые, так и замещенные остатки глюкозы и глюкуроновой кислоты.

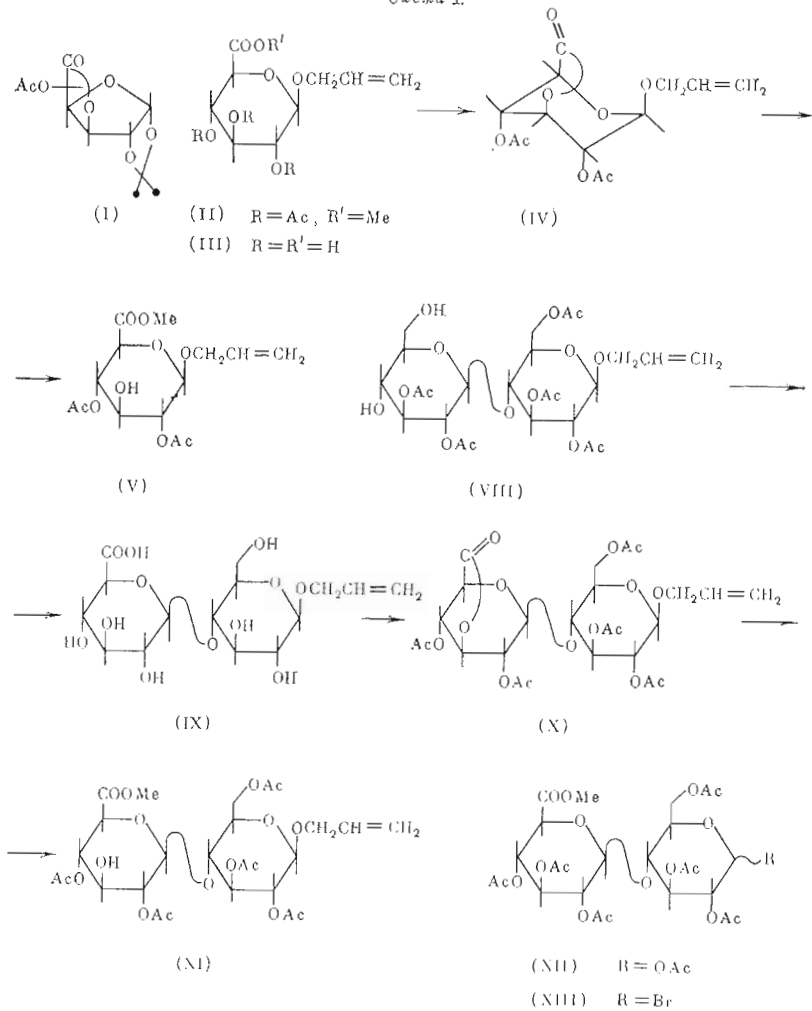


Ключевой стадией описанных ниже синтезов является образование β 1-3-гликозидной связи путем гликозилирования агликолов, включающих остаток глюкуроновой кислоты со свободной ОН-группой в положении 3. Ранее [2], в синтезе дисахаридного фрагмента В, было использовано производное глюкофурануроносовой кислоты, легко получаемое избирательным метанолизом лактонного цикла в 5-О-ацетил-1,2-О-изопропилден- α -D-глюкофурануроно-6,3-лактоне (I) [3]. Этот подход, однако, не мог быть включен в выбранную нами схему синтезов. Тем не менее сам принцип освобождения ОН-группы путем раскрытия 6,3-лактона представлялся нам перспективным и мы попытались применить его к глюкопирануроносовой кислоте.

Конденсацией метил(2,3,4-три-О-ацетил- α -D-глюкопиранозилбромид)-уроната [4] с аллиловым спиртом в условиях реакции Гельфериха с выходом 77% был получен метил(аллил-2,3,4-три-О-ацетил- β -D-глюкопиранозид)уронат (II) (схема 1). Двухстадийное удаление защитных групп в уронате (II) действием метилата натрия в метаноле и затем водно-спиртовой щелочью привело к аллил- β -D-глюкопиранозидуроносовой кислоте (III) с выходом 74%. Строение кислоты (III) подтверждено данными спектра ^{13}C -ЯМР (таблица), отнесение сигналов сделано с учетом данных для метил- β -D-глюкопиранозидуроносовой кислоты [5].

Первоначально лактонизацию кислоты (III), сопровождающуюся О-ацетилированием, проводили при перемешивании суспензии соедине-

Схема 1.



ния (III) и безводного ацетата натрия в ацетангидриде при комнатной температуре. Выход лактона (IV) составил 65%. Основанием для этой методики послужили данные о лактонизации флавоноидного гликозида глюкопиранурановой кислоты, приведенные в работе [6]. Дальнейшее исследование показало, что лактонизация протекает и при кратковременном нагревании в чистом ацетангидриде. Последующее добавление пиридина в реакционную смесь довершает O-ацетилирование. Выход лактона в этом варианте увеличивался до 80%. Строение полученного аллил-2,4-ди-O-ацетил- β -D-глюкопиранозидуроно-6,3-лактона (IV) подтверждено данными спектра $^1\text{H-NMR}$. Отнесение сигналов было сделано с помощью селективного гетероядерного резонанса после предварительного упрощения спектра (IV) при превращении аллильного агликаона в пропильный гидрированием над Pd/C (исчезновение сигналов аллильной группы из области резонанса кольцевых протонов, δ 4,2–5,2 м.д.). Небольшие значения константы спин-спинового взаимодействия кольцевых протонов (не более 5 Гц, см. «Экспериментальную часть») отражают аксиальное расположение всех заместителей, что является следствием перехода молекулы в результате замыкания лактонного цикла в необычную для β -D-гликозидов C^1 -конформацию.

Раскрытие лактона (IV) проводили методом щелочной переэтерификации [6, 7]. Следует отметить, что в данном случае применение анионита в OH^- -форме [2] в качестве катализатора процесса требует гораздо более жестких условий (кипячение в течение нескольких часов) по сравнению

Данные спектров ¹³C-ЯМР аллилгликозидов моно- и олигосахаридов *

Остаток	Атом **	III	IX	XV ***	XIX	XVII	XXI
GlcA	C6	173,6				173,2	173,6
	C5	75,7				76,0	76,0
	C4	72,4				72,3	72,3
	C3	76,5				76,4	76,4
	C2	73,9				74,0	74,0
	C1	102,5				103,6	103,6
Glc	C6			62,0	61,9	61,3	61,3
	C5			76,8	76,8	75,3	75,3
	C4			70,8	70,8	80,0	80,0
	C3			77,3	77,2	75,3	75,5
	C2			74,7	74,6	74,5	74,45
	C1			103,9	103,8	103,5	103,5
GlcA	C6		173,4	—	173,75	173,1	173,5
	C5		75,8	75,6	75,8	75,5	75,8
	C4		72,2	72,0	71,8	71,9	71,7
	C3		76,3	84,9	84,3	84,9	84,5
	C2		73,9	73,7	73,9	73,6	73,8
	C1		103,5	102,3	103,3	102,4	103,3
Glc	C6		61,2		61,2		61,3
	C5		75,4		75,5		75,5
	C4		80,1		80,1		80,2
	C3		75,5		75,5		75,5
	C2		74,05		74,1		74,1
	C1		102,3		102,25		102,4

* В D₂O при 80° C; отнесение для сигналов с близкими хим. сдвигами может быть обратным; хим. сдвиги $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O} - 134,4-134,8$; $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O} - 119,7-120,1$; $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O} - 70,9-71,8$ м. д.

** Указан тип связи между остатками.

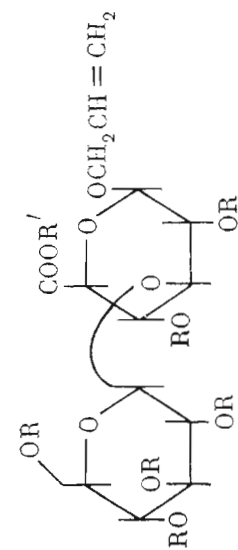
*** Данные работы [2].

с аналогичной процедурой раскрытия фурануроно-6,3-лактона (I). Метанолиз пирануронолактона (IV) в гомогенных условиях (в присутствии безводного ацетата натрия) гладко протекает за 1 ч при 20° C. В случае же лактона (I) этот вариант приводил к увеличению выхода побочного продукта миграции ацетильной группы из положения 5 в положение 3 [2]. Пиранозный агликон (V) был выделен из реакционной смеси кристаллизацией с выходом 52%. Структура уроната (V) подтверждена данными спектра ¹H-ЯМР, в котором сигнал H-3 смещен в сильное поле на 1,5 м.д. (ср. со спектром (II)).

Далее мы применили этот принцип избирательного освобождения 3-ОН-группы в остатке уроновой кислоты к аллилгликозиду целлобиурононовой кислоты (IX). Аллилгликозид (IX), представляющий собой дисахаридный фрагмент А полисахаридной цепи S3, синтезирован нами ранее [1, 2]. Теперь он был необходим нам как исходное для дальнейших синтезов, поэтому мы попытались упростить схему его получения, основанную на окислении производного целлобиозы со свободной 6'-ОН-группой [1, 2]. Оказалось, что окисление диола (VIII), промежуточного соединения в предыдущем синтезе, реагентом Джонса происходит достаточно региоселективно и после удаления О-ацетильных защитных групп с хорошим выходом приводит к аллил-β-целлобизидуруновой кислоте (IX), идентичной описанной нами ранее [1, 2]. Эта модификация позволила сократить схему синтеза дисахарида (IX) сразу на две стадии.

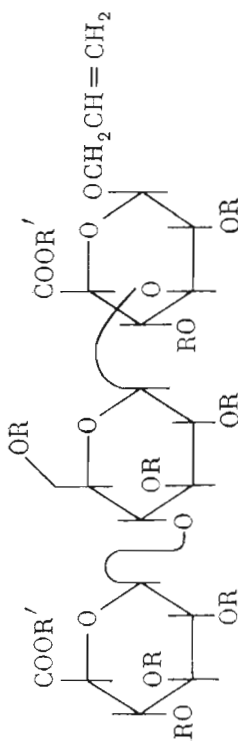
Сопровождающаяся О-ацетилированием лактонизация кислоты (IX) в ацетангидриде в присутствии ацетата натрия приводила с умеренным выходом (45%) к 6',3'-лактону (X), спектр ¹H-ЯМР которого интерпретировался с учетом данных спектра лактона (IV). Нагревание кислоты (IX) в чистом ацетангидриде не дало лучших результатов. Это может быть связано с затрудненностью перехода остатка глюкуроновой кислоты в ⁴C¹-конформацию из-за большого объема агликона. Из реакционной

Схема 2



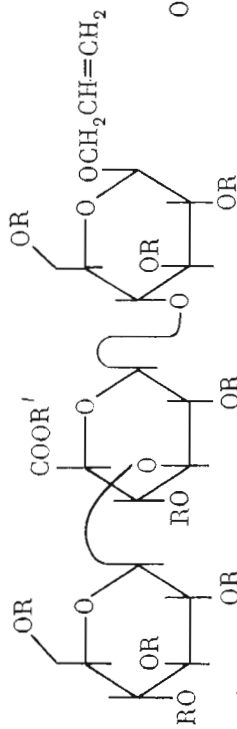
(XIV) R = Ac, R' = Me

(XV) R = R' = H



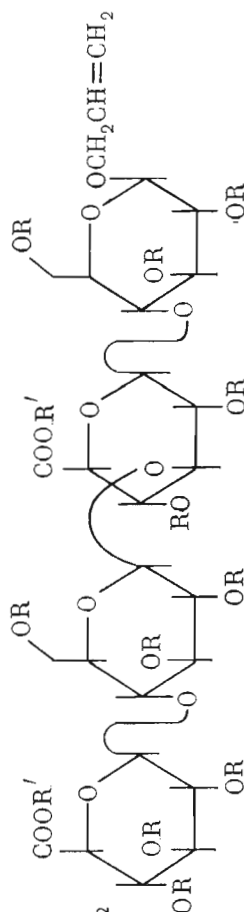
(XVI) R = Ac, R' = Me

(XVII) R = R' = H



(XVIII) R = Ac, R' = Me

(XIX) R = R' = H



(XX) R = Ac, R' = Me

(XXI) R = R' = H

смеси выделено также значительное количество компонента, превращающегося после омыления в исходную кислоту (IX). Раскрытие 6',3'-лактонного цикла в производном (X) метанолизом в присутствии ацетата натрия привело к спирту (XI) с выходом после перекристаллизации 60%. Строение соединения (XI) подтверждено данными спектра ¹H-ЯМР с учетом данных спектра ¹H-ЯМР соединения (V) (сигнал H-3' смещается в область 3,8–3,9 м.д.).

В синтезе олигосахаридов в качестве гликозилирующих компонентов мы использовали два гликозилбромиды: ацетобромглюкозу и метил(2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил- α -целлобиозилбромид)уронат (XIII) [8]. Последний был получен из метил(метил-2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил- β -целлобиозид)уроната (синтезирован из β -метилцеллобиозида по схеме, аналогичной описанной [4]) через промежуточный ацетат (XII) с общим выходом 59%.

Конденсации гликозилбромидов с соединениями (V) и (XI) проводили в одинаковых условиях в дихлорметане в присутствии трифторметансульфоната (трифлата) серебра и коллидина при строгом соблюдении температурного режима ($-40 \div -50^\circ \text{C}$); при $-25 \div 30^\circ \text{C}$ продукт не образуется. В результате стереоселективно и в основном с хорошими выходами были получены защищенные олигосахариды (XIV), (XVI), (XVIII) и (XX) (схема 2). Следует отметить, что конденсация ацетобромглюкозы с пиранозным агликоном (V) является гораздо более удобным вариантом синтеза фрагмента В по сравнению с описанным нами ранее [2], где гликозилирование протекает нестереоспецифично и необходимы дополнительные стадии для перевода остатка глюкуроновой кислоты в пиранозную форму.

Ступенчатое удаление защитных групп в полученных олигосахариды (О-деацетилирование метилатом натрия и омыление метилуронатов водно-спиртовой щелочью) привело к аллилгликозидам (XV), (XVII), (XIX) и (XXI), представляющим ди-, три- и тетрасахаридные фрагменты В, С, D и E полисахаридной цепи *S. pneumoniae* типа 3.

Полученные свободные олигосахариды (в виде аллилгликозидов) охарактеризованы данными об их хроматографической и электрофоретической подвижности на бумаге, и их строение подтверждено спектроскопией ЯМР. В спектрах ¹H-ЯМР, снятых в D₂O при 80°С, все аномерные протоны проявляются в виде дублетов в области 4,5–4,9 м.д. с *J* 7,5–8 Гц. Сигналы всех аномерных атомов углерода в спектрах ¹³C-ЯМР располагаются в области 102–104 м.д., что также указывает на β -конфигурацию всех гликозидных связей. Положение замещения остатков глюкуроновой кислоты, подвергшихся гликозилированию, следует из смещения сигнала C-3 в слабое поле (84,3–84,9 м.д.). Сопоставление спектров ¹³C-ЯМР всех полученных фрагментов А–Е (соединения (IX), (XV), (XVII), (XIX) и (XXI)), а также спектров аллил- β -D-гликопиранозидов глюкозы [2] и глюкуроновой кислоты позволяет сделать предположительное отнесение сигналов в спектрах (см. таблицу). Спектры ¹³C-ЯМР хорошо согласуются с предлагаемыми структурами синтезированных ди-, три- и тетрасахаридов, содержащих остатки глюкозы и глюкуроновой кислоты.

Получение всех олигосахаридных фрагментов в виде аллилгликозидов позволяет легко превратить их в высокомолекулярные синтетические антигены путем сополимеризации с акриламидом, как это было сделано в случае дисахаридных фрагментов А и В [1, 2]. Результаты серологических исследований с синтетическими антигенами на основе три- и тетрасахаридных фрагментов С, D и E будут опубликованы отдельно.

Экспериментальная часть

ТСХ выполнена на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) с использованием следующих систем растворителей: хлороформ – ацетон, 8:2 (А); 9:1 (Б); бензол – ацетон, 8:2 (В) и бензол – эфир, 1:1 (Г). Для обнаружения веществ пластинки прокалывали. Препаративное хроматографическое разделение осуществляли на колонках с силикагелем L 40/100 мкм (ЧССР). ВХ выполнена нисходящим мето-

дом на бумаге Filtrak FN-11 (ГДР) в системе этилацетат – уксусная кислота – муравьиная кислота – вода, 18:3:1:4. Электрофорез на бумаге проводили в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере с рН 4,5 при 28 В/см. Для детекции производных аллилгликозидов на пластинках и бумаге использовали 1% водный раствор перманганата калия. Спектры ^{13}C -ЯМР сняты на приборе Bruker WM-250 (62,89 МГц, ФРГ) в D_2O , внутренний стандарт – метанол (δ 50,15 м.д.). Спектры ^1H -ЯМР сняты на приборе Bruker WM-250 (250 МГц) в CDCl_3 , внутренний стандарт – тетраметилсилан, спектры аллилгликозидов свободных олигосахаридов – в D_2O при 80°С. Приведены химические сдвиги в миллионных долях и константы спин-спинового взаимодействия в герцах. Температуры плавления определены на микроблоке Кофлера, оптическое вращение – на поляриметре Perkin – Elmer 141 (США).

Метил(аллил-2,3,4-три-О-ацетил- β -D-глюкопиранозид)уронат (II). 500 мг метил(2,3,4-три-О-ацетил- α -D-глюкопиранозилбромид)уроната [4] и 350 мг $\text{Hg}(\text{CN})_2$ суспендировали в 15 мл свеженерегнапного (над CaO) аллилового спирта, смесь перемешивали 10 мин при 60°С и затем 12 ч при 20°С. Полученный после упаривания смеси остаток экстрагировали хлороформом, экстракт промывали насыщенным раствором KI , содержащим небольшое количество KHSO_3 , водой, сушили и упаривали. Остаток кристаллизовали из этанола. Выделили 350 мг (77%) аллилгликозида (II). Т. пл. 133–134°С, $[\alpha]_D -32^\circ$ (с 1,4, CHCl_3). Найдено, %: С 51,39; Н 6,05. $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$. Вычислено, %: С 51,33; Н 5,92. ^1H -ЯМР: 2,0–2,4 (2с, 9H, 3AcO), 3,77 (с, 3H, COOMe), 4,05 (д, 1H, $J_{3,4}$ 9,5, H-5), 4,00–4,17 (м, 1H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 4,32–4,43 (м, 1H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 4,62 (д, 1H, $J_{1,2}$ 7,5, H-1), 5,05 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 7,5, $J_{2,3}$ 9,5, H-2), 5,19–5,34 (м, 4H, H-3, H-4, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 5,77–5,93 (м, 1H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$).

Аллил- β -D-глюкопиранозидуроновая кислота (III). 300 мг уроната (II) суспендировали в 4 мл абс. метанола и добавляли по каплям 0,4 мл 1 М NaOMe в метаноле. После полного растворения исходного (40–60 мин) к смеси добавляли 0,4 мл раствора 80 мг KOH в 0,9 мл воды. Смесь выдерживали 1 ч и обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+), после чего наносили на колонку с дауэксом 1×8 (AcO^-). Колонку промывали 100 мл воды и 150 мл 20% уксусной кислоты. После упаривания и лиофилизации кислых элюатов выделено 140 мг (74%) электрофоретически и хроматографически чистой кислоты (III) в виде аморфного порошка. $[\alpha]_D -63^\circ$ (с 2,5, вода), $E_{\text{G1ca}} 0,85$, $R_{\text{G1ca}} 1,8$. Спектр ^{13}C -ЯМР – см. таблицу.

Аллил-2,4-ди-О-ацетил- β -D-глюкопиранозидуроно-6,3-лактон (IV). *Вариант А*: суспензию 450-мг кислоты (III) в 5 мл ацетангирида нагревали 10–15 мин при 70°С (до полного растворения), добавляли 5 мл пиридина и оставляли на ночь при 20°С. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в хлороформе и хроматографировали при элюировании системой Б. Выделили 500 мг (80%) хроматографически однородного лактона (IV) в виде твердой пены. $[\alpha]_D -160^\circ$ (с 1,2, CHCl_3), $R_f 0,53$ (В). Спектр ^1H -ЯМР: 2,1 и 2,2 (2с, 6H, 2AcO), 3,98–4,08 (м, 1H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 4,22–4,32 (м, 2H, $J_{3,4}$ 3,5, H-5, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 4,86 (несимм. т, 1H, $J_{4,3}=J_{4,5}=4,5$, H-4), 4,94 (с, 1H, H-1), 5,1 (ддт, 1H, $J_{3,4}$ 5, $J_{3,2}$ 4, $J_{3,1}=J_{3,5}=1$, H-3), 5,15 (д, 1H, $J_{2,3}$ 4, H-2), 5,2–5,35 (м, 2H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 5,77–5,94 (м, 1H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$).

Вариант Б: суспензию 300 мг кислоты (III) и 500 мг безводного ацетата натрия в 12 мл ацетангирида перемешивали 20 ч при 20°С, нагревали 10 мин при 100°С, смесь выливали на лед и экстрагировали хлороформом. Экстракт промывали водой, сушили и упаривали. Из полученного остатка хроматографией при элюировании системой Б выделили 240 мг (65%) лактона (IV), идентичного вышеописанному образцу.

Метил(аллил-2,4-ди-О-ацетил- β -D-глюкопиранозид)уронат (V). К раствору 190 мг лактона (IV) в 10 мл абс. метанола добавили 13 мг безводного ацетата натрия. Через 1,5 ч исходное полностью исчезло (контроль ТСХ) и появился продукт реакции с $R_f 0,28$ (В). Смесь деионизовали катионитом КУ-2 (H^+), фильтровали, фильтрат упарили. При кристаллизации остатка из смеси бензол – эфир – гексан выделили 110 мг (52%) метилуроната (V). Т. пл. 104–105°С $[\alpha]_D -70^\circ$ (с 2,3, CHCl_3). Найдено, %: С 50,54; Н 6,08. $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_9$. Вычислено, %: С 50,60; Н 6,06. Спектр ^1H -ЯМР: 2,10 и 2,15 (2с, 6H, 2AcO), 2,97 (д, 1H, $J_{3,\text{OH}}$ 6,5, OH),

3,75 (с, 3Н, COOMe), 3,75–3,82 (м, 1Н, Н-3), 3,98 (д, 1Н, $J_{5,4}$ 9,5, Н-5), 4,05–4,15 (м, 1Н, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 4,33–4,42 (м, 1Н, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 4,56 (д, 1Н, $J_{1,2}$ 7,5, Н-1), 4,93 (дд, 1Н, $J_{2,1}$ 7,5, $J_{2,3}$ 9, Н-2), 5,14 (т, 1Н, $J_{4,5} = J_{4,3} = 9,5$, Н-4), 5,16–5,34 (м, 2Н, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$), 5,77–5,93 (м, 1Н, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{O}$).

Аллил-β-целлобиозидуруновая кислота (IX). 0,9 г аллил-2,3,6,2',3'-пента-О-ацетил-β-целлобиозида (VIII) [2] растворяли в 15 мл ацетона и добавляли по каплям 2 мл раствора реагента Диконса (2 г CrO_3 , 5,85 мл воды и 1,7 мл конц. H_2SO_4). Смесь перемешивали 1 ч и добавляли еще 1 мл окислителя. Через 40 мин избыток окислителя разлагали 2 мл этанола, смесь нейтрализовали твердым NaHCO_3 , фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в 3 мл этанола, добавляли раствор 200 мг NaOH в 3 мл воды. Через 10 мин добавляли еще 6 мл такого же раствора NaOH . Смесь выдерживали 1 ч, обрабатывали катионитом КУ-2 (H^+) и наносили на колонку ($20 \times 1,5$ см) с дауэксом 1×8 (AcO^-), элюировали водой (100 мл) и 20% уксусной кислотой (300 мл). При упаривании кислых элюатов и лиофилизации выделили 400 мг (66%) электрофоретически и хроматографически чистой кислоты (IX), $[\alpha]_D -37^\circ$ (с 1,5, вода), E_{GlcA} 0,7, R_{GlcA} 1,3, идентичной с описанным ранее [1, 2] образцом по данным спектра ^{13}C -ЯМР (см. таблицу).

Аллил - 2,3,6 - три - О - ацетил - 4 - О - (2,4 - ди - О - ацетил - β - D - глюкопиранозил - урано - 6,3 - лактон) - β - D - глюкопиранозид (X). Суспензию 530 мг кислоты (IX) и 600 мг безводного ацетата натрия в 20 мл ацетангирида перемешивали 22 ч при 20°C . Добавляли в смесь 20 мл пиридина и нагревали 30 мин при 100°C , смесь упаривали, остаток растворяли в хлороформе, фильтровали, фильтрат упаривали. Остаток хроматографировали, элюируя смесью 15% ацетона в бензоле. Выделили 350 мг (45%) лактона (X) в виде твердой пены. $[\alpha]_D -85^\circ$ (с 1,1, CHCl_3). R_f 0,5 (А). Спектр ^1H -ЯМР: 2,0–2,2 (5с, 15Н, 5AcO), 3,6 (дт, 1Н, $J_{5,4}$ 9,5, $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 3$, Н-5), 3,85 (дд, 1Н, $J_{4,5}$ 9,5, $J_{4,3}$ 9, Н-4), 4,05–4,17 (м, 2Н, $J_{6,5}$ 3, Н-6, $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{O}$), 4,27–4,35 (м, 3Н, $J_{5',4'}$ 3, $J_{6,5}$ 3, Н-6, Н-5', $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{O}$), 4,55 (д, 1Н, $J_{1,2}$ 7,5, Н-1), 4,82–4,92 (м, 3Н, $J_{1',2'}$ <1, $J_{2,1}$ 7,5, $J_{2,3}$ 9, $J_{4',3'}$ 3, Н-1', Н-2, Н-4'), 4,98–5,03 (м, 2Н, Н-3', Н-2'), 5,15 (т, 1Н, $J_{3,4} = J_{3,2} = 9$, Н-3) — частично перекрывается с группой сигналов в области 5,15–5,3 (м, 2Н, $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{O}$), 5,75–5,90 (м, 1Н, $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{O}$).

Этанолом с колонки смывают еще 400 мг вещества, которое после омыления 0,2 М NaOMe в метаноле дает 200 мг исходной кислоты (IX) (возврат 38%).

Аллил - 2,3,6 - три - О - ацетил - 4 - О - [метил(2,3 - ди - О - ацетил - β - D - глюкопиранозил)уронат] - β - D - глюкопиранозид (XI). 350 мг лактона (X) выдерживали 1,5 ч в растворе 30 мг безводного ацетата натрия в 25 мл абс. метанола. Смесь деионизовали катионитом КУ-2 (H^+), фильтровали, фильтрат упаривали, остаток кристаллизовали из этанола. Выделили 240 мг (60%) уроната (XI). Т. пл. $206-208^\circ \text{C}$, $[\alpha]_D -39^\circ$ (с 1, CHCl_3), R_f 0,3 (А). Найдено, %: С 50,52; Н 5,70. $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{17}$. Вычислено, %: С 50,32; Н 5,84. Спектр ^1H -ЯМР: 1,98–2,21 (5с, 15Н, 5AcO), 3,69 (с, 3Н, COOMe), 3,75–3,92 (м, 3Н, $J_{4,5}$ 9,4, $J_{5,6a}$ 5, $J_{5,6b}$ 1,8, Н-3', Н-4, Н-5), 4,05–4,17 (м, 2Н, $J_{4',5'}$ 9,8, Н-5', $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{O}$), 4,17–4,33 (м, 2Н, $J_{6a,6b}$ 11,6, $J_{6a,5}$ 5, Н-6a, $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{O}$), 4,49 (дд, 1Н, $J_{6b,6a}$ 11,6, $J_{6b,5}$ 1,8, Н-6b), 4,71 и 4,73 (2д, 2Н, $J_{1,2}$ 7,8, $J_{1',2'}$ 7,8, Н-1, Н-1'), 4,83 (дд, 2Н, $J_{2,1}$ 7,8, $J_{2,3}$ 9,4, $J_{2',1'}$ 7,8, $J_{2',3'}$ 9,4, Н-2, Н-2'), 4,92 (дд, 1Н, $J_{4',5'}$ 9,8, $J_{4',3'}$ 9,8, Н-4'), 5,12–5,30 (м, 3Н, $J_{3,2} = J_{3,4} = 9,5$, Н-3, $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{O}$), 5,8–5,98 (м, 1Н, $\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{O}$).

Метил(2,3,6,2',3',4' - гекса - О - ацетил - α - целлобиозилбромид)уронат (XIII). 1,1 г метил(метил-2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил-β-целлобиозид)уроната [1] суспендировали в 20 мл ацетангирида и при охлаждении по каплям прибавляли 200 мкл конц. H_2SO_4 . После полного растворения раствор выдерживали 2–3 ч при 20°C и затем 12 ч при 5°C . Смесь выливали на лед, экстрагировали хлороформом, экстракт промывали холодным насыщенным раствором NaHCO_3 , водой, сушили и упаривали. При кристаллизации остатка из этанола выделяли 850 мг (74%) 1,2,3,6-тетра-О-ацетил - 4 - О - [метил(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-α-D-

глюкопиранозы (XII). Т. пл. 252–254° С, $[\alpha]_D +36^\circ$ (с 2,5, СНСl₃). Лит. данные [9]: т. пл. 251–252° С, $[\alpha]_D +44^\circ$ (СНСl₃).

К раствору 290 мг гептаацетата (XII) в минимальном объеме хлороформа добавляли 2 мл ледяной уксусной кислоты и охлажденный до 0° С раствор бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте (4 мл АсВг, 7,2 мл АсОН, 1 мл воды и 0,5 мл Ас₂О). Смесь выдерживали 12 ч при 0–5° С, выливали на лед, экстрагировали хлороформом, экстракт промывали холодным насыщенным раствором NaHCO₃, водой, сушили и упаривали. Остаток перекристаллизовывали из смеси дихлорметан – эфир. Выделили 230 мг (80%) гликозилбромид (XIII). Т. пл. 203–205° С, $[\alpha]_D +100^\circ$ (с 0,7, СН₂Cl₂). Лит. данные [8]: т. пл. 200° С, $[\alpha]_D +99,4^\circ$ (с 0,8, СНСl₃). Найдено, %: С 43,69; Н 4,86; Вг 11,98. С₂₅Н₃₃О₁₇Вг. Вычислено, %: С 43,82; Н 4,85; Вг 11,63. Спектр ¹Н-ЯМР: 2,0–2,15 (6с, 18Н, 6АсО), 3,75 (с, 3Н, СООМе), 3,87 (т, 1Н, J_{4,3}=J_{4,5}=9,5, Н-4), 3,99 (д, 1Н, J_{5',4'} 9,5, Н-5'), 4,12–4,23 (м, 2Н, Н-5, Н-6а), 4,51–4,63 (м, 2Н, J_{1',2'} 7,8, Н-1', Н-6b), 4,76 (дд, 1Н, J_{1,2} 4, J_{2,3} 10, Н-2), 4,95 (дд, 1Н, J_{2',1'} 7,8, J_{2',3'} 9,2, Н-2'), 5,14–5,26 (2т, 2Н, J_{3',4'}, J_{3',2'} 9,2, J_{4',3'}=J_{4',5'}=9,5, Н-3', Н-4'), 5,55 (дд, 1Н, J_{3,4} 9,5, J_{3,2} 10, Н-3), 6,52 (д, 1Н, J_{1,2} 4, Н-1).

Общая методика гликозирования. На вакуумной установке лиофилизировали из абс. бензола и затем сушили при (5–6)·10⁻³ торр находящиеся в одной колбе агликон и гликозилбромид (1,2–1,5-кратный мольный избыток по отношению к агликону). В отдельной колбе, присоединенной к вакуумной установке через небольшую воронку, аналогичным образом сушили трифторметансульфонат (трифлат) серебра [10] (1,5–2-кратный мольный избыток по отношению к бромиду). Растворители предварительно высушивали дегазацией над СаН₂ на той же установке. В обе колбы перегоняли в вакууме по 4–6 мл дихлорметана, заполняли колбы аргоном и после прибавления к трифлату серебра коллидина (0,8–0,9 моль на 1 моль агликона) соединяли колбы через капельную воронку. Раствор трифлата серебра прибавляли к раствору агликона и бромида по каплям в течение 0,5 ч при –40÷–45° С и выдерживали смесь при этой температуре около 1 ч. Смеси давали нагреться до 20° С, фильтровали, фильтрат промывали холодным насыщенным раствором NaHCO₃, раствором тиосульфата натрия, водой. Сушили и упаривали. Остаток хроматографировали на силикагеле.

Метил[аллил - 2,4-ди-О-ацетил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-β-D-глюкопиранозид]уронат (XIV) получен из 65 мг спирта (V), 100 мг ацетобромглюкозы, 80 мг трифлата серебра и 25 мкл коллидина. После хроматографии при градиентном элюировании смесью бензол – ацетон (0→20%) выделили 90 мг (70%) дисахарида (XIV). Т. пл. 217–218° С (из этанола), $[\alpha]_D -51^\circ$ (с 2, СНСl₃), R, 0,5 (Б), идентичного ранее полученному образцу [2].

Метил{аллил - 2,4-ди-О-ацетил-3-О-[метил(2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил-β-целлобиозил)уронат]-β-D-глюкопиранозид}уронат (XVI) получен из 133 мг спирта (V), 300 мг гликозилбромид (XIII), 130 мг трифлата серебра и 50 мкл коллидина. После хроматографии при элюировании системой В выделили 270 мг (75%) трисахарида (XVI). Т. пл. 202–204° С (из этанола), $[\alpha]_D =26^\circ$ (с 1, СПСl₃), R, 0,5 (А). Найдено, %: С 50,09, Н 6,00. С₃₉Н₅₂О₂₆. Вычислено, %: С 50,00; Н 5,59.

Метил[аллил - 2,3,6,2',4' - пента - О - ацетил - 3' - О - (2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)-β-целлобиозид]уронат (XVIII) получен из 200 мг агликона (XI), 170 мг ацетобромглюкозы, 120 мг трифлата серебра и 35 мкл коллидина. После хроматографии при элюировании системой Г выделили 100 мг (30%) трисахарида (XVIII). Т. пл. 224–226° С (из этанола), $[\alpha]_D -40^\circ$ (с 0,8, СНСl₃), R, 0,44 (А). Найдено, %: С 49,53; Н 5,56. С₃₈Н₅₀О₂₆. Вычислено, %: С 49,46; Н 5,46.

Метил{аллил - 2,3,6,2',4' - пента - О - ацетил - 3' - О - [метил(2,3,6,2',3',4'-гекса-О-ацетил-β-целлобиозил)уронат]-β-целлобиозид}уронат (XX) получен из 100 мг спирта (XI), 130 мг гликозилбромид (XIII), 70 мг трифлата серебра и 20 мкл коллидина. После хроматографии при элюировании системой Б выделили 160 мг (80%) тетрасахарида (XX). Т. пл.

249–251° С (из этанола), $[\alpha]_D -33^\circ$ (с 1, CHCl_3), R_f 0,6 (хлороформ–ацетон, 7:3). Найдено, %: С 50,32; Н 5,72. $\text{C}_{51}\text{H}_{88}\text{O}_{34}$. Вычислено, %: С 50,00; Н 5,59.

Общая методика омыления. Олигосахариды (XVI), (XVIII) и (XX) суспендировали в 4–6 мл абс. метанола и добавляли 0,4–0,6 мл 1 М NaOMe в метаноле, суспензию перемешивали до полного растворения исходного (10–20 мин). Смесь деионизовали катионитом КУ-2 (H^+), фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в 5–7 мл 3% водного KOH. Смесь выдерживали 1 ч при 20° С (полноту омыления контролировали электрофоретически), деионизовали катионитом КУ-2 (H^+), фильтровали, фильтрат упаривали. Свободные уроновые кислоты (в виде аллилгликозидов) дополнительно очищали ионообменной хроматографией на дауэксе 1×8 (AcO^-) как описано выше. Данные спектров ^{13}C -ЯМР приведены в таблице.

Аллил-3-О-(β-целлобиозилуруновая кислота)-β-D-глюкопиранозидуруновая кислота (XVII). После омыления 200 мг метилуруната (XVI) выделили 100 мг (83%) уроновой кислоты (XVII) в виде твердой пены. $[\alpha]_D -21^\circ$ (с 4,3, вода), $E_{\text{GICA}} 1,15$; $R_{\text{GICA}} 0,7$.

Аллил-3'-О-(β-D-глюкопиранозил)-β-целлобиозидуруновая кислота (XIX). После омыления 100 мг метилуруната (XVIII) выделили 50 мг (83%) кислоты (XIX). $[\alpha]_D -19^\circ$ (с 3,6, вода), $E_{\text{GICA}} 0,5$; $R_{\text{GICA}} 0,7$.

Аллил-3'-О-(β-целлобиозилуруновая кислота)-β-целлобиозидуруновая кислота (XXI). После омыления 150 мг метилуруната (XX) выделили 60 мг (66%) уроновой кислоты (XXI) в виде твердой пены. $[\alpha]_D -18^\circ$ (с 1,1, вода), $E_{\text{GICA}} 0,92$; $R_{\text{GICA}} 0,2$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черняк А. Я., Антонов К. В., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Падиюков Л. Н., Цветкова И. В. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 10. С. 1376–1383.
2. Chernyuk A. Ya., Antonov K. V., Kochetkov N. K., Padyukov L. N., Tsvetkova N. V. // Carbohydr. Res. 1985. V. 141. P. 199–212.
3. Kinoshita T., Ishidate M., Tamura Z. // Chem. Pharm. Bull. 1966. V. 14. № 9. P. 986–990.
4. Литвак М. М., Бетанели В. И., Бакиновский Л. В., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 8. С. 1133–1142.
5. Шашков А. С., Чижов О. С. // Биооргани. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437–497.
6. Wagner H., Aurnhammer G., Danninger H., Seligmann O., Pallos L., Farkas L. // Chem. Ber. 1972. V. 105. P. 257–261.
7. Matsunaga I., Tamura Z. // Chem. Pharm. Bull. 1969. V. 17. № 7. P. 1383–1389.
8. Goebel W. F., Reeves R. F. // J. Biol. Chem. 1938. V. 124. № 1. P. 207–219.
9. Lindberg B., Selleby L. // Acta chem. scand. 1960. V. 14. № 5. P. 1051–1053.
10. Russel D. G., Senior J. B. // Can. J. Chem. 1980. V. 58. № 1. P. 22–29.

Поступила в редакцию
11.XI.1986

SYNTHESIS OF OLIGOSACCHARIDE FRAGMENTS OF THE CAPSULAR POLYSACCHARIDE OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* TYPE 3

CHERNYAK A. Ya., ANTONOV K. V., KOCHETKOV N. K.

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

Di-, tri- and tetrasaccharide fragments of the linear chain of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3 consisting of glucose and glucuronic acid residues connected with $\beta 1 \rightarrow 3$ - and $\beta 1 \rightarrow 4$ -glycosidic linkage have been synthesised. A new method for selective deprotection of C3-hydroxyl group in the glucopyranuronic acid moiety is proposed.