



УДК 547.455.566'118.455.522'854.81.057+579.222.7'124.5

## СИНТЕЗ ЦИТИДИНДИФОСФАТ-3,6-ДИДЕЗОКСИГЕКСОЗ — ДОНОРОВ ГЛИКОЗИЛЬНЫХ ОСТАТКОВ ПРИ БИОСИНТЕЗЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ САЛМОНЕЛЛ СЕРОГРУПП А, В И С

Уткина Н.С., Данилов Л.Л., Дружинина Т.Н.,  
Шибанов В.Н.

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

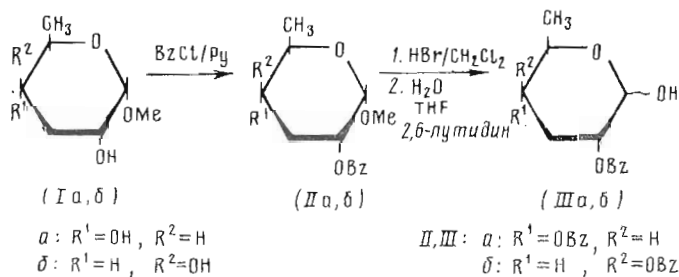
Взаимодействием этиловых алкоколятов 2,4-дибензоатов паратозы и абеквозы с тетрабензилпирофосфатом осуществлен синтез  $\alpha$ -фосфатов указанных 3,6-дидезоксигексоз, фосфаты переведены далее в цитидин-5'-пирофосфатные производные, для которых продемонстрирована способность участвовать в биосинтезе О-специфических полисахаридов *Salmonella typhimurium* и *S. nitra*.

В состав антигенных детерминант целого ряда О-специфических полисахаридов бактерий кишечной группы входят 3,6-дидезоксигексозы — характерные компоненты полимеров салмонеллы серологических групп А, В, С и D. Проводимые в нашей лаборатории исследования по химико-ферментативному синтезу антигенных полисахаридов делают актуальной задачу химического синтеза соответствующих цитидиндифосфатдидезоксигексоз, служащих донорами остатков 3,6-дидезоксигексоз в процессе биосинтеза О-специфических полисахаридов [1]. Некоторое время назад мы кратко сообщали о получении предшественника О-специфических полисахаридов салмонелл серогруппы В цитидиндифосфат-3,6-дидезокси- $\alpha$ -D-ксило-гексозы (абеквозы) — первом примере синтеза представителя этого класса нуклеотидсахаров [2].

Настоящая работа посвящена описанию синтеза другого соединения этого ряда — производного 3,6-дидезокси-D-рибо-гексозы (паратозы), характерного для микроорганизмов серогруппы А, к которой принадлежат и некоторые высокопатогенные штаммы. В работу включены также экспериментальные детали синтеза CDP-Abе, опущенные в предварительном сообщении [2], и описание биохимических экспериментов, демонстрирующих способность CDP-Abе и CDP-Par участвовать в биосинтезе соответствующих О-специфических полисахаридов.

Ключевые промежуточные соединения при синтезе CDP-3,6-дидезоксигексоз — соответствующие  $\alpha$ -гликозилфосфаты, для получения которых исходными веществами служили дибензоаты (Ia) и (Iб) (схема 1).

Схема 1



Использованы сокращения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC — IUB, а также следующие: Abc — абеквоза (3,6-дидезокси-D-ксило-гексоза); Par — паратоза (3,6-дидезокси-D-рибо-гексоза); THF — тетрагидрофуран; TBPP — тетрабензилпирофосфат; Bn — бензил; DMF — диметилформамид.

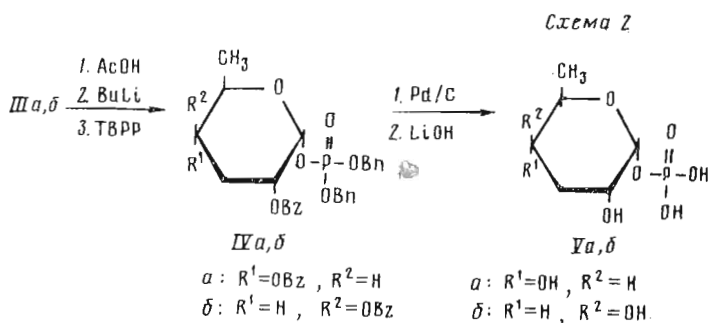
<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры производных парагозы и абеквозы (в CDCl<sub>3</sub>)

Характеристики	IIa	IIб		IIIa		IIIб		IVб
		α-аномер	β-аномер	α-аномер	β-аномер	α-аномер	β-аномер	
δ <sub>H-1</sub>	4,97 д	5,5 д	4,89 д	5,6 д	4,88 д	6,02 дд *		
δ <sub>H-2</sub>	5,15 ддд	5,17 ддд	5,07 ддд	5,4 ддд	5,24 ддд	5,4 ддд		
δ <sub>H-3a</sub>	2,24 псевдо-к	2,3 ддд	1,92 ддд	2,5 ддд	2,1 ддд	2,29-2,42 м		
δ <sub>H-3e</sub>	2,49 ддд	2,5 ддд	2,75 ддд	2,57 ддд	2,3 ддд			
δ <sub>H-4</sub>	4,9 ддд	4,9 м	3,85 дд	5,29 ддд	5,32 ддд	5,3 м		
δ <sub>H-5</sub>	4,02 дк	4,3 дд	1,35 д	4,45 дк	4,40 дк	4,29 дк		
δ <sub>H-6</sub>	1,28 д	1,26 д	1,35 д	1,22 д	1,32 д	1,18 д		
J <sub>1,2</sub>	3,5	3,5	8	3,6	7,9	3,1		
J <sub>2,3a</sub>	12	12	12	12	11,7	12		
J <sub>2,3e</sub>	5	5	5	4,75	4,8	7		
J <sub>3a, 3e</sub>	12	12	12	13,6	13,8			
J <sub>3a, 4</sub>	12	12	12	2,8	3,0			
J <sub>3e, 4</sub>	5	5	5	2,9	3,6			
J <sub>4,5</sub>	9,8	9,5	9,5	1,3	1,3	1,5		
J <sub>5,6</sub>	6,0	6,0	6,0	6,2	6,2	6		

\* J<sub>1</sub>, p = 6 Гц.

Полученные известными методами метилгликозиды (Ia) [3] и (Iб) [4] бензоилировали действием хлористого бензоила в пиридине и после хроматографии на силикагеле выделяли с высокими выходами дибензоаты (IIa) и (IIб). Кратковременная обработка последних бромистым водородом в дихлорметане приводила к соответствующим гликозилбромидам, которые без очистки с высоким выходом превращали далее действием 10 экв. воды в присутствии 2,6-лутидина в производные (IIIa) и (IIIб), выделенные после хроматографии на силикагеле в виде смеси приблизительно равных количеств  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров. Упомянутые соединения охарактеризованы спектрами  $^1\text{H-NMR}$  (таблица), которые могут быть легко интерпретированы и однозначно подтверждают их структуру и аномерную конфигурацию.

Для превращения дибензоатов (IIIa, б) в гликозилфосфаты был использован недавно разработанный нами метод [5] — взаимодействие Li-алкоголятов моносахаридов со свободной HO-группой при C1 и тетрабензилпирофосфата. Как было показано в предварительном сообщении [2], применение этого реагента, дающего в случае производных гексоз смесь производных  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозилфосфатов с преобладанием последних, при реакции с производным абеквоты (IIIб) позволяет получить чистый  $\alpha$ -аномер фосфотриэфира (IVб), который может быть переведен далее в гликозилфосфат (Vб) (схема 2).



Для синтеза гликозилфосфатов в ряду абеквоты первоначально были использованы условия, аналогичные описанным в работе [5] для производного D-галактозы. Соединение (IIIб) было обработано уксусной кислотой (это приводит к некоторому увеличению содержания  $\alpha$ -аномера в смеси [5]), переведено в алкогольат действием 3 экв. бутиллития (2 мин,  $-78^\circ\text{C}$ ) и введено в реакцию с 1,3 экв. тетрабензилпирофосфата (16 ч,  $20^\circ\text{C}$ ). Фосфотриэфир (IVб), чрезвычайно неустойчивый в слабокислой среде и разлагающийся при попытках хроматографии на силикагеле, был выделен с выходом 34% после колоночной хроматографии на окиси алюминия. Его структура и аномерная конфигурация однозначно подтверждаются данными  $^1\text{H-NMR}$  (таблица), особенно характерны химический сдвиг и расщепление сигналов H1 и H5. Гидрогенолиз бензильных защитных групп в фосфотриэфире (IVб) и последующее дебензоилирование водной щелочью приводят к гликозилфосфату (Vб), который был выделен в виде аммониевой соли с выходом 24% (на IIIб) после ионообменной хроматографии на анионите AG1×8 (бикарбонатная форма).

Структура полученного гликозилфосфата (Vб) подтверждена данными спектра  $^1\text{H-NMR}$ , указывающего на  $\alpha$ -конфигурацию у аномерного центра (H1:  $\delta$  5,42 дд,  $J_{1,2}$  3,6 Гц,  $J_{1,p}$  7,5 Гц). Этот вывод подтверждается результатами измерения оптического вращения: найденное молярное вращение для соединения (Vб) ( $+237^\circ$ ) хорошо согласуется с величиной  $+225 \pm 6^\circ$ , рассчитанной по эмпирической формуле [6], связывающей молярные вращения гликозилфосфатов и метилгликозидов моносахаридов. Электрофоретическая подвижность полученного вещества соответствует поведению фосфомоноэфира, продукт легко гидролизуеться до неорганического фосфата в слабокислой среде, причем константа скорости гидролиза в стандартных условиях [7] приблизительно в 13 раз выше, чем

для  $\alpha$ -D-галактопирапозилфосфата, что соответствует ожидаемым свойствам производного дидезоксисахара.

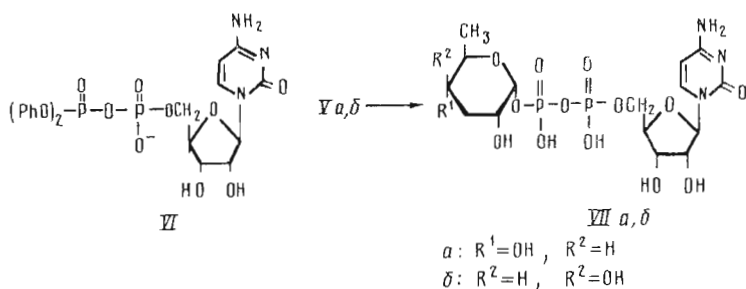
Низкий выход желаемого гликозилфосфата при описанной схеме проведения реакции связан прежде всего с крайней неустойчивостью промежуточного фосфотриэфира (IVб): отказ от его хроматографической очистки и быстрое проведение гидрогенолиза (Pd/C, 2 ч, 20° С) позволили получить гликозилфосфат (Vб) с выходом 50% (считая на (IIIб)). И в этом случае в продукте реакции не было обнаружено заметной примеси  $\beta$ -аномера.

При проведении фосфорилирования производного паратозы (IIIа) описанные выше условия реакции оказались непригодными, так как гликозилфосфат образовывался лишь с очень низким выходом. Это побудило нас более детально исследовать процесс фосфорилирования на примере реакции с соединением (IIIб). Было найдено, что для анализа состава реакционной смеси удобна спектроскопия  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. По мере протекания реакции в спектре убывает сигнал, соответствующий тетрабензилпирофосфату ( $\delta -11,5$  м.д.), и появляются сигналы, отвечающие триэфирам — производным гликозилфосфатов: интенсивный сигнал при  $-0,6$  м.д., характерный для (IVб), и более слабый сигнал при  $-1,3$  м.д., отвечающий, по-видимому, его  $\beta$ -аномеру. Помимо указанных сигналов в спектре реакционной смеси присутствуют сигналы при  $+0,6$  и  $+1,2$  м.д.: они возникают при обработке тетрабензилпирофосфата бутиллитием в отсутствие субстрата фосфорилирования и соответствуют дибензилфосфату лития и, по-видимому, монобензилфосфату лития.

Проведение ряда опытов с производными (IIIб) с контролем состава реакционной смеси с помощью спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР позволило найти оптимальные условия для фосфорилирования. Оказалось, что реакция гладко протекает при использовании меньшего количества основания (1,3 экв. бутиллития на 1 экв. субстрата) и полностью завершается за 2 ч при  $\sim 20^\circ\text{C}$ . После реакции с дибензоатом (IIIб) в этих условиях хроматографически очищенный триэфир (IVб) содержит небольшую примесь  $\beta$ -аномера (отношение характерных сигналов в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР составляет 7 : 1), в гликозилфосфате, полученном из этого препарата после гидрогенолиза, дебензоилирования и хроматографической очистки, примесь  $\beta$ -аномера не обнаруживается. Было найдено, что обработка соединения (IIIб) кислотой существенна для получения  $\alpha$ -аномера гликозилфосфата; при отсутствии такой обработки в реакционной смеси присутствуют заметные количества  $\beta$ -аномера фосфотриэфира, и после превращения фосфотриэфира в гликозилфосфат при разделении ионообменной хроматографией найдены фракции, в которых преобладает  $\beta$ -аномер соединения (Vб); они легко могут быть идентифицированы по значительно меньшей величине оптического вращения и приблизительно в 1,5 раза большей, чем у  $\alpha$ -аномера, константе скорости кислотного гидролиза.

Упомянутые выше условия проведения реакции использовали для синтеза гликозилфосфата из производного (IIIа). Реакционная смесь, по данным спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, содержала смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров триэфира (IVа) в соотношении 6 : 1. Хроматографическая очистка триэфира не проводилась, и  $\alpha$ -паратозилфосфат (Va) был выделен с выходом 41% после гидрогенолиза, дебензоилирования и ионообменной хроматографии. Структура полученного соединения однозначно следует из его поведения при электрофорезе на бумаге, данных спектра  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\delta +2,97$  м.д. при pH 8 в  $\text{D}_2\text{O}$ ) и лабильности в слабокислой среде (константа скорости кислотного гидролиза в стандартных условиях [7] в 1,4 раза меньше, чем для  $\alpha$ -абеквонилфосфата (Vб)). Аномерная конфигурация фосфата (Va) подтверждается данными спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР (H1:  $\delta$  5,27 дд,  $J_{1,2}$  3,5 Гц,  $J_{1,p}$  7,5 Гц) и оптического вращения (молярное вращение найдено равным  $+235^\circ$ , вычислено по формуле, предложенной в работе [6]:  $+243 \pm 6^\circ$ ).

Для превращения гликозилфосфатов (Va) и (Vб) в целевые нуклеозиддифосфатсахара был использован дифенилпирофосфатный метод с P<sup>1</sup>-(цитидин-5'), P<sup>2</sup>-дифенилпирофосфатом (VI) [8] в качестве активированного производного нуклеотида (схема 3).



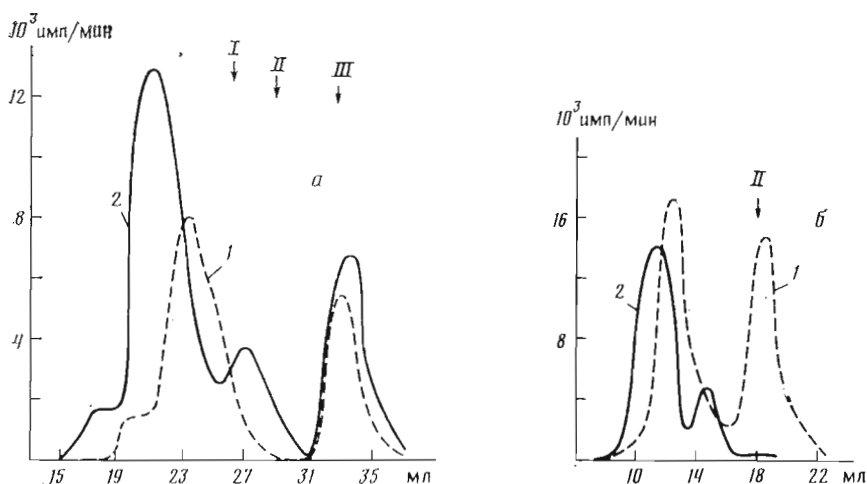
Гликозилфосфаты вводили в реакцию в виде бис (триэтиламмониевых) солей, пирофосфатный синтез выполняли в смеси DMF — пиридин в течение 16 ч при 20° С. Для разделения продуктов была использована ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе с элюцией растворами ацетата аммония в метаноле (эта хроматографическая система чрезвычайно удобна и обеспечивает хорошее разделение всех компонентов смеси) и последующим удалением соли гель-фильтрацией на TSK HW-40S.

Цитидиндифосфатпаратозы (VIIa) была получена с выходом 30%, для цитидиндифосфатабеквотозы (VIIб), выделение которой значительно облегчалось осаждением большей части нуклеотидсахара из реакционной смеси, выход достигал 53%. Полученные нуклеотидсахара были охарактеризованы УФ-спектром, хроматографической и электрофоретической подвижностью и определением отношения цитидин — общий фосфат — кислототабильный фосфат — 3,6-дидезоксигексоза (по реакции с периодатом и тиобарбитуровой кислотой (9) после мягкого кислотного гидролиза, об определении фосфата — см. [6, 7]). Эти данные однозначно подтверждают структуру синтезированных соединений, которые ранее были получены лишь с помощью ферментативного синтеза [10].

Как известно (11), главная цепь O-специфических полисахаридов сальмонелл серогрупп А и В построена из повторяющихся трисахаридных звеньев *D*Man(α1-4)*LR*ha(α1-3)*D*Gal, соединенных α1→2-гликозидными связями. Остатки 3,6-дидезоксисахаров, находящиеся в разветвлениях, присоединены α1→3-гликозидными связями к остатку маннозы. Биосинтез этих полимеров включает сборку олигосахаридного звена на полипренилпирофосфатном акцепторе путем последовательного переноса моносахаридных остатков с соответствующих нуклеотидсахаров и ферментативную поликонденсацию олигосахаридов; ферменты, катализирующие эти процессы, локализованы в бактериальных мембранах.

Для исследования биологической активности синтетических CDP-3,6-дидезоксигексоз была проведена инкубация UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-[<sup>14</sup>C]Man и синтезированных нуклеотидсахаров с препаратами бактериальных мембран. В одной серии опытов были использованы CDP-Abe (VIIб) и препарат мембран из микроорганизма *Salmonella typhimurium* (серогруппа В), биосинтез O-специфического полисахарида для которого хорошо изучен, в другой — CDP-Par (VIIa) и мембраны из *S. nitra* (серогруппа А, данные о биосинтезе O-специфического полисахарида в этом штамме будут опубликованы отдельно). Контрольные пробы не содержали CDP-3,6-дидезоксигексоз.

Условия проведения реакции и методы анализа продуктов были аналогичны использованным нами при исследовании введения остатка [<sup>14</sup>C]абеквотозы в O-специфические полисахариды из CDP-[<sup>14</sup>C]Abe [12]. Как было ранее показано, присутствие в инкубационной смеси донора остатка 3,6-дидезоксисахара приводит к заметному увеличению выхода полимерных продуктов и смещению положения максимума его элюции при гель-фильтрации в сторону более высоких масс. Аналогичная картина была получена и при опытах с синтетическими CDP-3,6-дидезоксигексозами (рисунок). Прямое доказательство включения остатков паратозы или абеквотозы в полимерные продукты было получено их определением



Распределение радиоактивности при гель-хроматографии продуктов ферментативного синтеза полисахаридов в присутствии препарата мембран из *S. nitra* (а; колонка 1×42 см, сефадекс G-15) и *S. typhimurium* (б; колонка 1×50 см, TSK HW 40): I — смесь содержит UDP-Gal, dTDP-Rha и GDP-[<sup>14</sup>C]Man, 2 — дополнительно присутствует CDP-Par (а) или CDP-Abe (б). Стрелками указано место выхода гекса- (I), три- (II) и моносахаридов (III)

с помощью тиобарбитурового метода [9]: количество 3,6-дидезоксисахара, включенного в полимер в присутствии синтетической CDP-Par или CDP-Abe, было приблизительно эквивалентно количеству [<sup>14</sup>C]маннозы, вошедшей в его состав.

Эти результаты указывают на способность синтетических соединений (VIIa) и (VIIб) выступать в качестве доноров остатков соответствующих 3,6-дидезоксигексоз при биосинтезе O-специфических полисахаридов салмонелл.

### Экспериментальная часть

Упаривание всех растворов проводили в вакууме при температуре не выше 40°С. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР снимали на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) с рабочей частотой 250 МГц (внутренний стандарт — Me<sub>4</sub>Si), спектры <sup>31</sup>P-ЯМР — на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) с рабочей частотой 121,5 МГц (стандарт — H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Величины химических сдвигов приведены в шкале δ, м.д., константы спин-спинового взаимодействия — в герцах. Ультрафиолетовые спектры снимали на спектрофотометре Spccord UV-VIS (ГДР). Общий фосфат (P<sub>общ</sub>) и кислотолабильный фосфат (P<sub>кл</sub>) определяли как указано в работах [6, 7] соответственно, константы кислотного гидролиза (k) — согласно методике [7].

ТСХ проводили на пластинках (6×2,5 см) с силикагелем (Silica Gel 60, Merck, ФРГ) в системах растворителей: бензол — этилацетат, 9:1 (А), хлороформ — метанол — 1 М ацетат аммония, 10:10:3 (Б), фосфорные эфиры обнаруживали с помощью реактива, предложенного в работе [13]. Колоночную хроматографию осуществляли на колонке (1,5×15 см) с силикагелем (Silpearl, Cavalier, ЧССР), анионообменную — на колонке (1×20 см) со смолой AG 1×8 (-400 меш, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Bio-Rad, США) в линейном градиенте концентрации (0→0,3 М, по 200 мл) бикарбоната аммония. Электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN-16 в 0,05 М TEAB, обнаруживая фосфаты как описано в работе [14].

Культуры штаммов *S. typhimurium* (0:1,4,5,12,Н:i2) и *S. nitra* (0:2,12,Н:g,m) получены из музея Государственного института контроля и стандартизации медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Использованные методы описаны в работе [12].

Метил-2,4-ди-О-бензоил-3,6-дидезокси-α-D-рибо-гексопиранозид (IIa). Раствор 65 мг (0,4 ммоль) α-метилпаратозида (Ia) [3] в 2 мл абс. пиридина охлаждали до -78°С и добавляли 0,2 мл (1,6 ммоль) бензилхло-

рида. Смесь выдерживали 16 ч при 20°С. Осадок хлоргидрата пиридина отфильтровывали, пиридин упаривали. Реакционную смесь растворяли в 3 мл хлороформа, экстрагировали водой (3×1 мл), хлороформный раствор упаривали, хроматографировали на колонке с силикагелем в линейном градиенте бензол→(бензол—этилацетат, 97:3), по 150 мл. Выход соединения (IIa) 128 мг (87%),  $R_f$  0,8 (А). Спектр ПМР—см. таблицу.

*Метил-2,4-ди-О-бензоил-3,6-дидезокси- $\alpha$ -D-ксило-гексопиранозид (IIб)* получали аналогично соединению (IIa) из 137 мг (0,845 ммоль)  $\alpha$ -метилабеквозида (IIIб) [4]. Выход (IIб) 304 мг (98%),  $R_f$  0,8 (А). Спектр ПМР—см. таблицу.

*2,4-Ди-О-бензоил-3,6-дидезокси-D-рибо-гексопираноза (IIIa)*. Раствор 84 мг (0,23 ммоль) соединения (IIa) в 2 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и 0,36 мл (11,5 ммоль) абс. MeOH охлаждали до 0°С и по каплям при перемешивании в течение 30 мин добавляли 0,83 мл (11,5 ммоль)  $\text{CH}_3\text{COBr}$  в 3 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при 0°С. Реакционную смесь выдерживали 30 мин при 20°С, упаривали, HBr отгоняли с  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2×3 мл). Остаток растворяли в 2 мл абс. THF, добавляли 0,27 мл (2,7 ммоль) 2,6-лутидина и 27 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ . Через 18 ч при 20°С осадок бромгидрата лутидина отделяли декантацией, промывали THF (3×1 мл), раствор упаривали и разделяли на колонке с силикагелем в линейном градиенте бензол→(бензол—этилацетат, 2:1), по 150 мл. Выход соединения (IIIa) 62 мг (77%),  $R_f$  0,38 (А), спектр ПМР—см. таблицу.

*2,4-Ди-О-бензоил-3,6-дидезокси-D-ксило-гексопиранозу (IIIб)* получали аналогично соединению (IIIa) из 304 мг (0,84 ммоль) (IIб). Выход (IIIб) 220 мг (73,5%),  $R_f$  0,38 (А), спектр ПМР—см. таблицу.

*Взаимодействие литиевой соли соединения (IIIб) с тетрабензилпирофосфатом*. К раствору  $\text{Li}^+$  (100 мкмоль) дибензоата (IIIб) в 1 мл абс. диоксана и 1 мл ледяной уксусной кислоты через 48 ч выдерживания при 20°С прибавляли 5 мл абс. диоксана и упаривали досуха в вакууме масляного насоса. Остаток растворяли в абс. бензоле и лиофильно высушивали (2×2 мл). Лиофилизат растворяли в 1 мл абс. THF, охлаждали до -78°С и добавляли 300 мкмоль бутиллития (раствор в абс. гексане), встряхивали и через 2 мин прибавляли 70 мг (130 мкмоль) тетрабензилпирофосфата. Реакционную смесь выдерживали 16 ч при 20°С. Выпавший осадок дибензилфосфата лития отделяли центрифугированием, промывали абс. THF (2×1 мл). Раствор в THF (3 мл) разделяли на две части.

А) 1,5 мл раствора упарили в вакууме масляного насоса, напесли на колонку (1,5×15 см) с  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Хроматографировали в линейном градиенте бензол→(бензол—этилацетат, 3:2) по 200 мл. Выход фосфотриэфира (IVб) 9 мг (34%),  $R_f$  0,68 (А), спектр ПМР—см. таблицу. 9 мг триэфира (IVб) растворили в 1 мл абс. THF, гидрировали над Pd/C 2 ч при 20°С. Добавили 1 н. LiOH до pH ~11. Через 18 ч при 20°С осадок отфильтровали, фильтрат нейтрализовали дауэксом 50W×8 ( $\text{H}^+$ ) до pH ~8. После анионообменной хроматографии и удаления бикарбоната аммония отгонкой воды (5×2 мл) и этанола (5×2 мл) получена аммониевая соль  $\alpha$ -фосфата абеквобы (Vб) с выходом 12 мкмоль (24%),  $R_f$  0,42 (В),  $E_{\text{G1C1P}}$  1,0,  $k$   $68 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ,  $[\alpha]_D^{20} +103^\circ$  (с 0,077,  $\text{H}_2\text{O}$ ),  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5,42 (дд, 1H, H-1,  $J_{1,2}$  3,6 Гц,  $J_{1,\text{P}}$  7,5 Гц).

В) 1,5 мл раствора реакционной смеси в THF гидрировали над Pd/C 2 ч при 20°С. Добавили 1 н. LiOH до pH ~11, через 18 ч осадок отфильтровали, фильтрат нейтрализовали дауэксом 50W×8 ( $\text{H}^+$ ) до pH ~8. После анионообменной хроматографии в градиенте концентрации бикарбоната аммония и удаления солей получен фосфат абеквобы (Vб), аммониевая соль, с выходом 25 мкмоль (50%), который был идентичен по всем характеристикам вышеописанному.

*Взаимодействие литиевой соли соединения (IIIa) с тетрабензилпирофосфатом*. 10 мг (28,6 мкмоль) 2,4-ди-О-бензоилпаратозы (IIIa) обрабатывали уксусной кислотой как указано выше. Лиофилизат растворяли в 0,2 мл абс. THF, охлаждали до -78°С и добавляли 37 мкмоль бутиллития (раствор в гексане), встряхивали и через 2 мин прибавляли раствор

20 мг (37,1 мкмоль) тетрабензилпирофосфата в 0,2 мл абс. THF. Реакционную смесь выдерживали 2 ч при 20°С. Осадок дибензилфосфата лития удаляли центрифугированием. <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр реакционной смеси (THF): -0,58, -1,41 м.д.

Гидрогенолиз проводили над Pd/C в течение 2 ч при 20°С, пропуская водород через колонку с силикагелем. Добавляли 1 н. LiOH до pH ~11, выдерживали 18 ч при 20°С, осадок отфильтровали, фильтрат нейтрализовали дауэксом 50W×8 (H<sup>+</sup>) до pH ~8. После анионообменной хроматографии и удаления бикарбоната аммония отгонкой воды (5×2 мл) и этанола (5×2 мл) получена аммониевая соль α-фосфата паратозы (Va) (11,8 мкмоль, 41,3%), R<sub>f</sub> 0,42 (B), E<sub>G1C1P</sub> 1,0, k 5·10<sup>-3</sup> с<sup>-1</sup>, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +101,5° (с 0,27, H<sub>2</sub>O), <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 5,27 (дд, 1H, H-1, J<sub>1,2</sub> 3,5 Гц, J<sub>1,p</sub> 7,5 Гц), <sup>31</sup>P-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 2,97.

Для получения триэтиламмониевых солей соединений (Va) и (Vб) растворы аммониевых солей перемешивали 30 мин с дауэксом 50W×8 (Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), ионообменник отфильтровывали, фильтрат упаривали, сушили отгонкой со спиртом и лиофилизировали из бензола.

*Цитидин-5'-(3,6-дидезокси-α-D-рибо-гексопиранозил)пирофосфат (VIIa)*. К раствору 6 мкмоль моно(метил-три-*n*-октиламмониевой) соли цитидин-5'-фосфата в 150 мкл абс. DMF прибавляли 2,6 мкл (13 мкмоль) дифенилхлорфосфата, 5 мкл три-*n*-бутиламина и 30 мкл абс. диоксиана. Через 3 ч при 20°С реакционную смесь упаривали в вакууме масляного насоса и добавляли 0,5 мл абс. эфира. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 0°С. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, высушивали в вакууме масляного насоса и прибавляли к нему раствор 10 мкмоль триэтиламмониевой соли 1-фосфата-α-паратозы (Va) в 250 мкл абс. DMF и 250 мкл абс. пиридина. Реакционную смесь выдерживали 16 ч при 20°С, разбавляли метанолом до 20 мл и разделяли на колонке (1×8 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (OAc<sup>-</sup>). Колонку промывали 20 мл метанола и элюировали раствором NH<sub>4</sub>COCH<sub>3</sub> (линейный градиент 0→0,4 М, по 100 мл) в метаноле. Во фракциях (4,5 мл) определяли P<sub>кл</sub>, P<sub>общ</sub> и A<sub>271</sub>. Выход пирофосфата (VIIa) 1,66 мкмоль (30%), E<sub>G1C1P</sub> 0,8, R<sub>CDP-G1C</sub> 1,25 (бумага, EtOH - 1 М NH<sub>4</sub>OAc, pH 7,5; 5:2), цитидин P<sub>общ</sub>-P<sub>кл</sub>-Par = =1,08:2,22:1,09:1. УФ-спектр (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> 271 нм.

*Цитидин-5'-(3,6-дидезокси-α-D-ксило-гексопиранозил)пирофосфат (VIIб)* получали аналогично (VIIa) при взаимодействии 8 мкмоль дифенилпирофосфатного производного (VI) и 11 мкмоль абеквонилфосфата (Vб). Через 16 ч при 20°С выпавший осадок пирофосфата (VIIб) отделяли центрифугированием. Выход 3,3 мкмоль. Надосадочную жидкость разделяли на колонке с DE-52 (OAc<sup>-</sup>). Общий выход пирофосфата (VIIб) 4,2 мкмоль (53%), E<sub>G1C1P</sub> 0,79, R<sub>CDP-G1C</sub> 1,36 (бумага, EtOH - 1 М NH<sub>4</sub>OAc (pH 7,5), 5:2). УФ-спектр (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> 271 нм, цитидин - P<sub>общ</sub> - P<sub>кл</sub> - A<sub>be</sub>, 1,04:2,15:1,15:1.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shibaev V. N. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1986. V. 44. P. 277-339.
2. Уткина Н. С., Данилов Л. Л., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1570-1572.
3. Ekborg G., Svensson S. // Acta chem. scand. 1973. V. 27. № 4. P. 1437-1439.
4. Stewert G., Westphal O. // Liebigs Ann. Chem. 1968. B. 720. S. 171-176.
5. Уткина Н. С., Данилов Л. Л., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 16. С. 1372-1378.
6. Шибает В. Н., Елисеева Г. И., Краевская М. А., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 3. С. 376-380.
7. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 5. С. 780-782.
8. Letters R., Michelson A. M. // Bull. soc. chim. France. 1963. V. 45. № 12. P. 1353-1361.
9. Ashwell G. // Meth. Enzymol. 1966. V. 8. P. 91.
10. Gabriel O. // Meth. Enzymol. 1982. V. 83. P. 332-353.
11. Nikaido H. // Bacterial membranes and walls. /Ed. Leive L. N. Y.: Dekker, 1973. P. 131-208.
12. Дружинина Т. Н., Сизова О. В., Шибает В. Н., Рожнова С. Ш. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1419-1427.



13. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. № 1. P. 129-141.

14. Hanes C. S., Isherwood F. A. // Nature. 1949. V. 164. № 4183. P. 1107-1109.

Поступила в редакцию  
20.III.1989

**SYNTHESIS OF CYTIDINE DIPHOSPHATE 3,6-DIDEOXYHEXOSES,  
GLYCOSYL DONORS IN BIOSYNTHESIS OF O-SPECIFIC  
POLYSACCHARIDES OF *SALMONELLA* SEROGROUPS A, B AND C**

UTKINA N. S., DANILOV L. L., DRUZHINIНА T. N., SHIBAEV V. N.

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

Interaction of lithium alcohulates of 2,4-di-O-benzoates of paratose and albcquose with tetrabenzyl pyrophosphate gave  $\alpha$ -phosphates of the 3,6-dideoxyhexoses, further converted into the corresponding cytidine-5'-diphosphate derivatives. These synthetic nucleotides were shown to participate in the biosynthesis of the O-specific polysaccharides for *Salmonella typhimurium* and *S. nitra*.