



УДК 547.458'118'363.07 : 579.842.14

## ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА САЛМОНЕЛЛ СЕРОГРУППЫ E<sub>1</sub>

Шибаяев В. Н., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А.,  
Мальцев С. Д., Данилов Л. Л., Торгов В. И.,  
Бочетков Н. К.

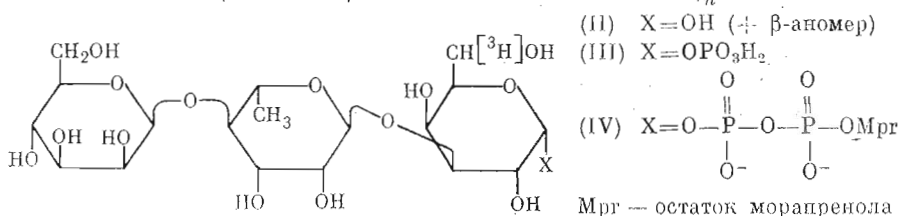
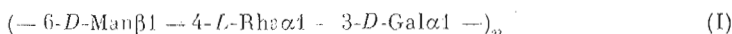
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР,  
Москва

Рожнова С. Ш., Кулессо В. А.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии  
Минздрава СССР, Москва

Принцип химико-ферментативного синтеза антигенных бактериальных полисахаридов, одного из перспективных подходов к получению этих биологически важных полимеров [1], состоит в химическом синтезе полипренилпирофосфатолigosахаридов, промежуточных соединений при биосинтезе полисахарида, и последующей ферментативной полимеризации повторяющихся олигосахаридных звеньев. При этом ферментативные методы могут быть использованы и для введения одного или нескольких моносахаридных остатков при сборке олигосахаридного повторяющегося звена. В получаемом полимере часть гликозидных связей образуется в результате химического синтеза, а часть — в результате ферментативных реакций.

Недавно мы сообщили о химико-ферментативном синтезе ряда модифицированных производных O-специфических полисахаридов салмонелл [2] с широким использованием ферментативных методов создания гликозидных связей. Цель настоящего сообщения — описание подхода к химико-ферментативному синтезу O-специфических полисахаридов на примере полимера салмонелл серогруппы E<sub>1</sub> (I), при котором ферментативные методы применяются лишь для образования гликозидных связей между трисахаридными повторяющимися звеньями, а обе гликозидные связи внутри повторяющегося звена — продукт химического синтеза.



Поскольку существующие методы контроля за реакцией ферментативной полимеризации основаны на использовании изотопных методов, первой задачей был синтез радиоактивного субстрата реакции. Получение трисахарида (II), содержащего радиоактивную метку в остатке галактозы, было ранее описано [3]; его превращение в фосфат (III) и затем в морепренилпирофосфаттрисахарид (IV) было осуществлено аналогично тому, как это было сделано ранее для соответствующих нерадиоактивных соединений [4, 5].

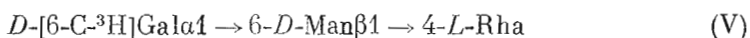
Трисахарид (II) был подвергнут ацетилированию действием Ac<sub>2</sub>O в пиридине, образовавшийся ацетат был введен в реакцию с безводной H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> и после обычной обработки [4] фосфат (III) был выделен препа-

ративным электрофорезом на бумаге (ТЕАВ, рН 7,5). Выход 47%, удельная радиоактивность 48 Ки/моль. Взаимодействие триэтиламмониевой соли (III) с мораренилфосфоимидазолидом [5] в смеси тетрагидрофуран — DMSO (1 : 1) в течение 48 ч при 37°С привело к производному (IV) с выходом 32% (после очистки хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе); его строение было подтверждено результатами специфической деградации под действием водного фенола или аммиака (см. [5]).

Ферментативная полимеризация олигосахаридного фрагмента (IV) была проведена в ранее описанных условиях [2, 6] с использованием препарата бактериальных мембран *Salmonella anatum*. После отщепления полипренилпирофосфатного фрагмента мягким кислотным гидролизом (0,5 М АсОН, 30 мин, 100°С) продукты были разделены гель-фильтрацией на сефадексе G-15 (см. [2]). Выход полимерной фракции составил 80%.

Полимерная фракция была подвергнута обработке  $\text{NaBH}_4$  и последующему кислотному гидролизу (2 н. HCl, 100°С, 4 ч). Отношение [ $^3\text{H}$ ]галактоза — [ $^3\text{H}$ ]дульцит, определенное после их разделения ионообменной хроматографией (Durrum DA×4, 0,5 М борат, рН 8,6; 80°С), оказалось равным 6,08, что соответствует полимеру, построенному из семи трисахаридных звеньев. Контрольный опыт с полипренилпирофосфаттрисахаридом, полученным ферментативным синтезом из мораренилфосфата, UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Gal, dTDP-Rha и GDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Man, дал продукт с той же степенью полимеризации.

Для установления конфигурации гликозидной связи, возникающей при полимеризации, полимерный продукт был подвергнут мягкому кислотному гидролизу (0,2 н. HCl, 95°С, 30 мин). Основным продуктом расщепления при этом является трисахарид (V),  $R_{\text{Gal}}$  0,63 (система А: бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3). Он полностью расщепляется при обработке  $\alpha$ -галактозидазой из кофейных зерен (КФ 3.2.1.22), единственный радиоактивный продукт расщепления — галактоза.



Синтезированный полисахарид был подвергнут также деградации по Смитсу. После мягкого кислотного гидролиза (0,5 н. HCl, 20°С, 20 ч) полиола, образующегося из полимера в результате периодатного окисления и последующего восстановления  $\text{NaBH}_4$ , в смеси был обнаружен радиоактивный галактозилглицерин,  $R_{\text{Gal}}$  1,12 (система А), полностью расщепляющийся при обработке  $\alpha$ -галактозидазой. по устойчивый к действию  $\beta$ -галактозидазы из кишечника цыплят (КФ 3.2.1.23).

Все эти данные однозначно показывают, что при ферментативной полимеризации производного (IV) происходит образование  $\alpha$ -1,6-гликозидной связи между остатками Gal и Man, продукт реакции имеет структуру (I) ( $n=7$ ) и идентичен, таким образом, природному полисахариду.

Авторы глубоко благодарны Ю. Ю. Кусову и В. Н. Чекунчикову за вклад, внесенный ими на начальных этапах разработки химико-ферментативного синтеза полисахаридов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kochetkov N. K. Pure and Appl. Chem., 1975, v. 42, № 3, p. 327—350.
2. Кочетков Н. К., Шибачев В. Н., Дружинина Т. Н., Гоголашвили Л. М., Данилов Л. Л., Торгов В. И., Мальцев С. Д., Уткина Н. С. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 6, с. 1393—1397.
3. Торгов В. И., Чекунчиков В. Н., Шибачев В. Н., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 401—405.
4. Danilov L. L., Troitzky M. F., Utkina N. S., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1980, v. 87, № 1, p. 141—146.
5. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 88, № 2, p. 203—211.
6. Кусов Ю. Ю., Киселева Е. В., Данилов Л. Л., Шибачев В. Н., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1863—1872.

Поступило в редакцию  
26.XI.1982

CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF SALMONELLA SEROGROUP E<sub>1</sub> O-SPECIFIC  
POLYSACCHARIDE

SHIBAEV V. N., DRUZHININA T. N., KALINCHUK N. A., MALTSEV S. D.,  
DANILOV L. L., TORGOV V. I., KOCHETKOV N. K., ROZHNOVA S. Sh.,  
KILESSO V. A.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; Central Research Institute of Epidemiology,  
Ministry of Health of the USSR, Moscow*

Chemical conversion of trisaccharide *D*-Man  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4-*L*-Rha  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3-*D*-[6-C-<sup>3</sup>H]Gal into, its moraprenyl pyrophosphate derivative is described. Treatment of the latter with the cell envelope preparation from *S. anatum* results in the formation of polysaccharide, with the  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6 linkage between the trisaccharide units.