

# Необычные моносахариды — компоненты О-антигенных полисахаридов микроорганизмов

Н.К.Кочетков

*Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук  
117913 Москва, Ленинский просп., 47, факс (095) 135–5328*

Представлены данные о новых и малоизученных моносахаридах, обнаруженных в качестве мономеров в составе О-антигенных полисахаридов грамотрицательных бактерий. Систематизированы результаты выделения, определения структуры, идентификации, а также изучения химических свойств этих необычных моносахаридов. Показана перспективность применения спектроскопии ЯМР для определения строения О-антигенных полисахаридов. Информация о тонкой структуре моносахаридов, составляющих основу важного класса микробных полисахаридов, играет первостепенную роль в решении прикладных задач, прежде всего это относится к дизайну и синтезу биологически активных веществ нового поколения.

Библиография — 216 ссылок.

## Оглавление

I. Введение	799
II. Общие замечания о выделении, установлении строения и идентификации моносахаридов и их производных, входящих в состав О-антигенных ПС	800
III. Необычные моносахариды, входящие в состав О-антигенных ПС	803
IV. Неуглеводные заместители в моносахаридных звеньях	821
V. Заключение	832

## I. Введение

Углеводсодержащие биополимеры являются одним из основных компонентов живой клетки, где они играют роль конструкционного материала, источника энергии и обеспечивают протекание ряда высокоспецифичных биологических процессов, связанных со свойствами клеточной поверхности. Из этих биополимеров наиболее широко распространены полисахариды (ПС), построенные из мономерных единиц — моносахаридов. Биологические функции ПС вполне определенным образом коррелируются с их структурой. Особенно отчетливо взаимосвязь функция–структура прослеживается на примере ПС, находящихся на поверхности клеток грамотрицательных бактерий. Такие ПС определяют специфичность взаимодействия клеток с внешней средой, что находит свое выражение в тонкой иммунохимической характеристике бактерии (серологические реакции), специфичности взаимодействия клетки с бактериофагами (фаговая трансформация микробной клетки) и с тканями хозяина, а также в других высокоспецифичных биологических актах.

Биологическая специфичность ПС определяется особенностями молекулярной структуры этих биополимеров, а она, в свою очередь, определяется строением мономеров (моносахаридов), входящих в состав биополимера, их последова-

тельностью в полимерной цепи и типом связи между мономерными звеньями. Если первые два фактора — мономерный состав и последовательность мономерных звеньев — характеризуют не только структуру ПС, но и структуру белков и нуклеиновых кислот, то последний — тип межмономерной связи — свойствен только ПС. Он обусловлен полифункциональностью остатков моносахаридов, содержащих несколько гидроксильных групп у хиральных атомов углерода. Наличие нескольких гидроксильных групп определяет образование нескольких стерически однозначных межмономерных гликозидных связей, что ведет к формированию сложной (часто разветвленной) полимерной цепи и во много раз увеличивает возможные вариации структуры ПС, состоящего из одного и того же набора мономеров.

Другим обстоятельством, в огромной степени способствующим существованию в природе богатого ассортимента полисахаридных структур, является разнообразие мономерных единиц, из которых может быть построена цепь полимерного углевода. В то время как все многообразие нуклеиновых кислот обеспечивается четырьмя нуклеотидами, а количество аминокислот, входящих в состав большинства белков, не превышает 12–15, то многообразие ПС обеспечивается более чем сотней моносахаридов и их производных.

Среди огромного количества ПС, выделенных из природных источников, особым разнообразием структуры и моносахаридного состава отличаются ПС внешней клеточной мембраны грамотрицательных бактерий, которые исследованы наиболее тщательно. Для многих из них в настоящее время установлена первичная структура. Они являются составной частью сложных биополимеров, так называемых липополисахаридов (ЛПС),<sup>1</sup> локализованных на поверхности клетки грамотрицательной бактерии. Липополисахариды состоят из липидной части (липида А), входящей в состав

**Н.К.Кочетков.** Доктор химических наук, профессор, академик РАН. Телефон (095)137–6148

Область научных интересов: химия углеводов, новые синтетические методы, выделение, синтез и химические свойства олиго- и полисахаридов, синтез биологически активных веществ и антибиотиков.

Дата поступления 14 февраля 1996 г.

внешней мембраны микробной клетки, и полисахаридной цепи, которая через короткий олигосахарид (так называемый «кор») присоединена к липиду. Полисахаридная цепь выходит на поверхность клетки и непосредственно соприкасается с внешней средой, образуя вместе с белками уникальный рисунок «мембранной мозаики», что в конечном счете и определяет специфическую характеристику поверхности микроорганизма.

Полисахариды внешней клеточной мембраны являются соматическими антигенами бактерии и обычно носят название *O*-антигенных полисахаридов. Они представляют собой регулярно построенные блок-полимеры, которые лишь в редких случаях являются гомополимерами, а обычно состоят из повторяющихся олиго-сахаридных звеньев, каждое из которых содержит от 2 до 8 моносахаридных единиц.<sup>2</sup> Может показаться, что количество возможных структур *O*-антигенных ПС при такой блочной структуре биополимера довольно ограничено. Однако в действительности, благодаря упомянутым выше особенностям — многообразию межмономерных гликозидных связей, возможности образования разветвленных цепей и большому набору различных по структуре моносахаридов — количество возможных структур олигосахаридных звеньев (и, следовательно, соответствующих ПС) огромно и составляет десятки тысяч (даже в том случае, когда звенья полимера построены только из трех-четырёх моносахаридов).

Нужно подчеркнуть, что в отличие от ПС растительной и животной клетки, построенных, как правило, из ограниченного набора наиболее распространенных моносахаридов, ПС микробного происхождения содержат большое количество редко встречающихся моносахаридов, которые часто обнаруживаются только в этих биополимерах. Пожалуй, с таким их разнообразием могут конкурировать только антибиотики, многие из которых также содержат ряд необычных моносахаридов.

Биосинтез моносахаридов, входящих в состав ПС, в том числе и необычных по своей структуре, в настоящее время достаточно подробно изучен. Выявлены пути образования различных моносахаридных структур из первичных продуктов фотосинтеза, что во многом прояснило разнообразие мономеров, находящихся в распоряжении микроорганизма при синтезе цепи *O*-антигенного ПС. Эти данные рассмотрены в обзоре Шибаява.<sup>3</sup>

Необычные по строению моносахариды или их производные во многих случаях играют роль иммунохимической доминантной группировки, т.е. компоненты, которая вносит главный вклад в биологическую специфичность ПС. Особенно четко это проявляется, когда необычный компонент занимает место бокового заместителя в основной линейной цепи биополимера.

Таким редким или даже уникальным мономером микробного ПС может быть моносахарид, включающий нестандартные структурные фрагменты. В *O*-антигенных полисахаридах это чаще всего дезоксигексозы, дезоксигептозы, аминодезоксисахара, аминуроновые кислоты, нонулозоновые кислоты, содержащие аминогруппы. Наряду с хорошо известными *O*- и *N*-ацетильными производными моносахаридов, а также их простейшими *O*-метилловыми эфирами, в *O*-антигенных ПС найдены особенно характерные для этого класса биополимеров *O*- или *N*-ацильные производные, полученные в результате ацилирования моносахаридов гидрокси- или дигидроксикислотами, а также аминокислотами. Другим типом редких производных являются, например, амиды уроновых кислот, в том числе и образованные за счет аминогрупп остатка аминокислоты. В литературе подобные фрагменты обычно называются «углеводными заместителями». Мономеры, содержащие

такие необычные *O*- и *N*-заместители, были обнаружены главным образом в последние 10–15 лет, и число их быстро растет. Их идентификация и локализация в полимерной цепи является существенным элементом современной структурной химии полисахаридов.

Следует особенно подчеркнуть, что обширный материал, полученный при исследовании строения, химических свойств и путей синтеза новых представителей моносахаридов (и их углеводных заместителей), входящих в состав *O*-антигенных ПС, оказался чрезвычайно важен не только для понимания основ биологической специфичности углеводных полимеров, но и для развития химии углеводов в целом. Данные о новых необычных сочетаниях функциональных групп в молекуле моносахаридов привели к существенному расширению наших представлений о реакционной способности и стереохимии моносахаридов, а также к открытию ряда новых реакций, что стимулировало разработку новых методов органического синтеза. Доступность большого количества углеводов различной структуры в значительной мере способствовала обогащению методического арсенала ЯМР-спектроскопии, для которой эти производные служили прекрасными модельными соединениями.

Настоящий обзор посвящен главным образом рассмотрению химических аспектов проблемы; он касается выделения, установления строения, идентификации и химических свойств новых редких моносахаридов или их необычных производных, входящих в качестве мономерных единиц в *O*-антигенные ПС. В отдельных случаях приведены данные об аналогичных или близких по строению моносахаридах, которые были найдены в микробных ПС, не относящихся к *O*-антигенным ПС грамотрицательных бактерий. Приводятся также данные о синтезе некоторых моносахаридов. Такой синтез предпринимался с целью подтверждения их строения или получения соответствующего малодоступного моносахарида или его производного в более значительных количествах, необходимых для дальнейшего изучения и использования при решении научных или практических задач. При этом из обширного синтетического материала выбраны лишь имеющие принципиальное значение или новые наиболее эффективные, практически удобные синтезы.

Сведения о строении самих ПС, в которые входят эти моносахариды, суммированы в одном из последних обзоров<sup>2</sup>, где рассматривается и вопрос определения местоположения и типа связи такого мономера в полисахаридной цепи.

В ранее опубликованных обзорных статьях<sup>4–6</sup>, посвященных *O*-антигенным ПС, рассматривались главным образом биологические и, в частности, микробиологические аспекты.

## **II. Общие замечания о выделении, установлении строения и идентификации моносахаридов и их производных, входящих в состав *O*-антигенных ПС**

Для установления строения или идентификации необычного компонента полисахаридной цепи сравнением с известным образцом данный компонент выделяют в ряде случаев в индивидуальном состоянии (как таковой), в виде одного из его стандартных производных (например, ацетата) или в модифицированном виде (например, в виде соответствующего полиола). Однако современные физико-химические методы и прежде всего ЯМР-спектроскопия часто позволяют делать заключение о структуре необычного мономера непосредственно в процессе установления строения самого ПС бездеструктивным методом. При спектральном исследовании ПС идентификацию уже известного компонента ПС в последнее время часто проводят по характеристическим сигналам спектра ЯМР.

## 1. Выделение редких моносахаридов или их производных

Исходный O-антигенный полисахарид получают избирательной деградацией ЛПС, который обычно выделяют экстракцией микробной массы водным фенолом. Затем проводят мягкий кислотный гидролиз ЛПС разбавленной уксусной кислотой, после чего полисахарид выделяют стандартным, подходящим для данного типа ПС методом (так, например, для ПС, содержащих кислые группы, успешно используется ионообменная хроматография)<sup>7</sup>.

После того как с помощью стандартного анализа моносахаридного состава ПС или предварительного рассматривания его ЯМР-спектра установлено присутствие нестандартного компонента, для его выделения в индивидуальном состоянии ПС подвергается кислотному гидролизу с последующим хроматографическим разделением образовавшейся смеси. Для успешного решения этой задачи необходимо выполнение двух, часто взаимоисключающих, условий: 1) разрыв гликозидной связи выделяемого мономера при отщеплении его от полисахаридной цепи и 2) избежание частичной или даже полной деградации мономера в условиях гидролиза. Хорошо известно, например, что моносахариды, содержащие одно или несколько дезоксизвеньев, отличаются неустойчивостью в кислой среде и, хотя гликозидные связи этих моносахаридов разрываются легко, выделение соответствующих мономеров может представить серьезные затруднения. В то же время гликозидные связи урановых кислот или аminosахаров с неацелированной аминогруппой отличаются повышенной устойчивостью к гидролизу, что в значительной мере препятствует получению нативного мономера соответствующей структуры в индивидуальном состоянии.

Задача осложняется еще сильнее, когда требуется выделить сложный мономер — производное моносахарида, содержащее неуглеводный заместитель. В этом случае, естественно, гидролиз не должен сопровождаться отщеплением, модификацией, деструкцией или перегруппировкой замещающей группы. Если же сам неуглеводный заместитель удастся выделить после гидролиза в неизменном виде и идентифицировать, то возникает новая задача — определить к какому из моносахаридов, входящих в полимерную цепь, и как он был присоединен.

В зависимости от решаемой задачи условия гидролиза, применяемые для выделения новых компонентов ПС, могут очень широко варьироваться. Это относится к выбору кислоты (применяются соляная, серная, трифторуксусная кислоты), ее концентрации, а также температурного режима и продолжительности процесса гидролиза. Чаще всего условия гидролиза подбирают опытным путем, исходя из имеющихся предварительных сведений о моносахаридном составе биополимера. Иногда для целенаправленного выделения искомого необычного компонента используют специальные условия, которые могут и не подходить для осуществления полного гидролитического распада полисахарида. Вместо кислотного гидролиза иногда применяют ацетоллиз — обработку ПС смесью уксусного ангидрида и уксусной кислоты в присутствии серной или иной сильной кислоты (например, хлорной); в этом случае моносахариды выделяют в виде полных ацетатов.

В последнее время для деполимеризации полисахаридов часто применяют сольволиз безводным HF при пониженной или комнатной температуре.<sup>8</sup> Этот метод отличается тем, что приводит к деструкции гликозидных связей, но не затра-

гивает связи, разрушающиеся при гидролизе, например, амидные. Он, в частности, успешно используется при выделении сложных производных моносахаридов с сохранением некоторых неуглеводных заместителей.

В тех случаях, когда не удается выделить редкийномерный компонент, выделяют короткий олигосахаридный фрагмент (обычно дисахарид или трисахарид), включающий этот моносахарид. Для этой цели наряду с избирательным кислотным гидролизом применяют и другие известные методы частичной деструкции полисахаридной цепи: окисление иодной кислотой (периодатное окисление) с последующим распадом по Смитсу,<sup>9</sup> а в ряде случаев реакцию дезаминирования аminosахара, входящего в цепь ПС.<sup>10</sup> Расшифровка структуры редкого компонента в составе короткого олигосахарида значительно упрощается по сравнению с его определением в ПС, причем существенную помощь при этом оказывают масс-спектрометрический анализ и ЯМР-спектроскопия.

Для выделения моносахаридов, их производных и коротких олигосахаридных фрагментов из гидролизатов в настоящее время почти исключительно используется хроматографическая техника. Предварительная качественная оценка состава гидролизата и идентификация в нем необычного компонента осуществляется с помощью бумажной (БХ) или тонкослойной хроматографии (ТСХ), а также с помощью различных вариантов жидкостной или газожидкостной хроматографии. На основании этих предварительных данных выбирается наиболее подходящий метод для препаративного выделения искомого компонента — в виде мономера или олигосахарида.

## 2. Химические методы установления строения

Классические химические методы установления строения моносахаридов и их производных постепенно теряют свое значение по мере развития физико-химических подходов, хотя некоторые из них сохранили свое значение до сих пор. В том случае, когда неизвестный ранее моносахарид удалось выделить в индивидуальном состоянии, его структуру можно установить посредством обычных принятых в моносахаридной химии приемов, таких как метод метилирования и окисления периодатом, которые особенно широко использовались в начальный период изучения микробных ПС. Первый из них (см. руководство по практическому использованию<sup>11</sup>) основан на превращении свободных гидроксильных групп моно-, олиго- или полисахаридов в O-метильные. Установление их положения в полученном производном с помощью масс-спектрометрического метода позволяет определить положение других заместителей, дезоксизвеньев и детали структуры моносахарида.

При окислении моносахарида периодатом<sup>9</sup> происходит разрыв углерод-углеродных связей между соседними атомами, несущими гидроксильные группы, что позволяет сделать заключение о их месте и наличии дезоксизвеньев в моносахариде. Этот метод широко применяется в настоящее время для избирательного расщепления цепи ПС с целью получения коротких фрагментов, после чего окисленный ПС подвергается мягкому кислотному гидролизу и восстановлению (распад по Смитсу).<sup>9</sup>

Из других химических превращений, используемых для установления строения моносахаридов, применяется дезаминирование аminosахаридов, для чего аминогруппа предварительно дезацетируется и образующийся аminosахар подвергается действию азотистой кислоты (см. обзор<sup>10</sup>). Эта реакция применяется также для избирательной деградации цепи ПС.<sup>12,13</sup> Иногда оказываются полезными и другие реакции моносахаридов, например, превращение их в ангидросахара, лактонизация урановых кислот и др.

<sup>†</sup> Примеры стандартных методик выделения и очистки ПС различного типа можно найти в многотомной монографии «*Methods in Carbohydrate Chemistry*». Vols I–IX, Academic Press, New York, 1965–1993.

Для идентификации моносахарида сравнением его с аутентичным образцом исследуемый моносахарид иногда превращают в какое-либо производное, например, в *O*-ацетат или *O*-триметилсилиловый эфир. Особенно часто используется восстановление моносахарида  $\text{NaBH}_4$  в соответствующий полиол. Последний переводят в ацетат и идентифицируют либо непосредственным сравнением с известным образцом, либо с применением масс-спектрометрического анализа.

Для установления абсолютной конфигурации моносахарида его переводят в гликозид, действуя на него одним из оптически активных спиртов (чаще всего бутан-2-олом или октан-2-олом). Определяя его хроматографическую подвижность, делают заключение об абсолютной конфигурации исходного моносахарида.

Химические методы, используемые для установления строения необычных производных моносахаридов, чаще всего сводятся к расщеплению их на составляющие — моносахарид и неуглеводный заместитель. Так, например, проводят гидролитическое отщепление гидроксид- или аминокислоты, ацилирующей одну из гидроксильных групп моносахарида, выделяют эту кислоту для последующей идентификации, при этом место замещения в моносахариде определяют одним из стандартных химических или физико-химических методов.

Следует отметить, что в настоящее время подобные задачи, как, впрочем, и установление строения новых моносахаридов, проще и гораздо более эффективно решаются с использованием только физико-химических методов, а химические методы применяются для встречного синтеза новых моносахаридов или их необычных производных для однозначной и окончательной идентификации. Синтез новых моносахаридов осуществляется обычно посредством регио- и стереоизбирательной трансформации одного из доступных моносахаридов известными методами химии углеводов. Примеры таких синтезов, достаточно различных по характеру, будут приведены далее.

### 3. Масс-спектрометрический анализ

Одним из физико-химических методов, применяемых для изучения структуры сахаров, является масс-спектрометрический анализ. После того как были установлены принципы фрагментации молекул моносахаридов<sup>14, 15</sup> и получаемых их восстановлением полиолов<sup>16, 17</sup> под действием электронного удара, стало возможным использовать масс-спектрометрию для эффективного установления их строения. В настоящее время чаще применяется масс-спектрометрия полиолов, для которых характерна более простая и однозначная фрагментация молекулы.

С этой целью моносахарид или его производное подвергают восстановлению борогидридом или, иногда, бородейтеридом натрия. При этом образуется полиол, в котором альдегидной группе исходной молекулы соответствует первично-спиртовая (часто в нее включают дейтерий,  $\text{CHD}-\text{OH}$ , этим достигается «метка» группы, важная для дальнейшей расшифровки структуры по масс-спектру). Полученный полиол переводят затем в полный ацетат, который и подвергается масс-спектрометрии. Следует подчеркнуть, что такой метод позволяет в большинстве случаев сохранить присутствующие в моносахариде неуглеводные заместители, что дает возможность использовать масс-спектрометрический метод для анализа сложных производных моносахаридов.

Фрагментация полиолов под действием электронного удара досконально исследована.<sup>18</sup> В частности, установлены корреляции относительной легкости разрыва углерод-углеродных связей в полиолах в зависимости от природы заместителя при углеродном атоме. На основании этих данных

созданы стандартные методики установления строения моносахаридных компонентов ПС (см. обзоры<sup>19, 20</sup>).

Характер распада углерод-углеродных связей в полиолах под действием электронного удара особенно информативен при анализе структуры дезокси- и аминодезоксисахаров, а также моносахаридов, содержащих неуглеводные заместители. Такие заместители (например, остаток гидроксикислоты или аминокислоты) также подвергаются фрагментации по хорошо известным путям и легко идентифицируются, при этом фрагментация скелета полиола указывает на положение неуглеводного заместителя.

К сожалению, масс-спектрометрический анализ не позволяет сделать заключение о стереохимии моносахарида, так как пространственное расположение заместителей у хиральных углеродных атомов моносахаридного скелета не оказывает заметного влияния на разрыв углерод-углеродных связей. Многочисленные попытки использования масс-спектрометрии для определения конфигурации моносахаридов не дали положительных результатов, поэтому в настоящее время для определения строения полисахаридов все чаще применяется спектроскопия ЯМР.

### 4. Спектроскопия ЯМР

Спектроскопия ЯМР является основным методом установления строения углеводов и необычных по структуре мономерных компонентов, входящих в состав ПС. Использование метода ЯМР позволяет в ряде случаев решать эту задачу, не выделяя моносахариды в индивидуальном состоянии, непосредственно на основании спектра ЯМР полисахарида, а также устанавливать полную структуру ПС только исходя из спектральных данных, т.е. бездеструктивным методом.

В настоящее время в полисахаридной химии применяются практически все известные разновидности спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , причем использование того или иного варианта определяется характером поставленной задачи (см. обзоры<sup>21–26</sup>). Особое значение в последнее время приобрели методики, основанные на измерении ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$ , позволяющие непосредственно определять взаимное расположение протонов моносахаридной молекулы в пространстве.

Среди новых подходов, разработанных специально для решения структурных задач полисахаридной химии, нужно особо отметить компьютерный анализ спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$ .<sup>24, 27</sup> Этот подход предназначен, в первую очередь, для определения типов связи и последовательности моносахаридных звеньев в полисахаридной цепи, однако в ряде случаев он оказался очень полезным и для выяснения строения входящих в ПС моносахаридов, в частности, для определения их конфигурации. Так, данный метод широко используется для определения абсолютной конфигурации моносахарида (без его выделения) непосредственно в составе полисахаридной цепи.<sup>24</sup> Метод основан на определении величины так называемых «эффектов гликозилирования», т.е. величины изменения химического сдвига данного углеродного атома в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  в зависимости от стереохимических особенностей (в том числе и абсолютной конфигурации) соседнего моносахаридного звена полимерной цепи.

### 5. Другие физико-химические методы

Очень существенной физико-химической константой, используемой в структурном анализе производных сахаров, является величина оптического вращения. Она легко определяется с высокой точностью и воспроизводимостью и служит не только важным критерием чистоты полученного препарата, но постоянно применяется при идентификации изучаемого соединения сравнением с заведомо известным

образцом. По величине оптического вращения можно также судить об абсолютной конфигурации исследуемого моносахарида, а также олигосахаридов и других производных, включающих звено этого моносахарида; при этом часто используется сравнение экспериментально определенной величины оптического вращения с теоретически вычисленной для данного моносахарида или его производного по правилу Кляйна.<sup>28</sup>

Далее при описании отдельных представителей моносахаридов и их производных, входящих в состав О-антигенных ПС, будут приведены конкретные данные по использованию упомянутых физико-химических методов, при этом рассматриваются в краткой форме лишь наиболее важные спектральные характеристики моносахарида, которые были необходимы (и достаточны) при решении вопроса о его строении.

### III. Необычные моносахариды, входящие в состав О-антигенных ПС

#### 1. Пентозы и гексозы

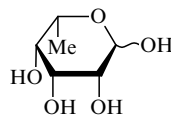
Большинство широко распространенных в природе альдопентоз и альдогексоз являются стандартными компонентами микробных ПС. Из гексоз наиболее часто встречаются D-глюкоза, D-галактоза и D-манноза, из пентоз — D-рибоза. Значительно реже встречаются D-ксилоза и D-арабиноза.<sup>2</sup>

Альдозы L-ряда редко присутствуют в микробных ПС. Так, в ПС двух видов *Pseudomonas* была найдена L-ксилоза.<sup>29,30</sup> Она была идентифицирована стандартными методами углеводного анализа (в виде ацетата соответствующего полиола).<sup>29</sup> Методом ГЖХ была определена абсолютная конфигурация (–)-2-октилгликозидного производного L-ксилозы.<sup>30</sup>

#### 2. Дезоксигексозы

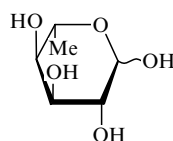
В отличие от гексоз, которые входят в состав полисахаридов в основном в виде D-изомеров, дезоксигексозы чаще встречаются в виде L-изомеров. Так, 6-дезоксигексозы — L-рамноза и L-фукоза — являются обычными компонентами О-антигенных ПС,<sup>2</sup> в то время как D-изомеры этих моносахаридов встречаются редко. Последние были выделены в индивидуальном состоянии после кислотного гидролиза ПС вида *Pseudomonas ceracia* или в виде О-метилловых эфиров при гидролизе метилированных ПС и идентифицированы стандартными методами. Их абсолютная конфигурация устанавливалась либо расчетным путем по Кляйну (см., например, методику, описанную в работе<sup>31</sup>), либо методом ГЖХ алкилгликозидных производных с оптически активными спиртами (см., например, методику, описанную в работе<sup>32</sup>); в отдельных случаях абсолютная конфигурация определялась на основе компьютерного анализа структуры ПС по их спектрам ЯМР <sup>13</sup>С (см., например, работу<sup>27</sup>).

В некоторых ПС обнаружены представители более редких 6-дезоксигексоз. Так, 6-дезоксигексозы L-типа была найдена в ПС нескольких видов псевдомонад (*P. fluorescens*,<sup>33</sup> *P. maltophilia*,<sup>34</sup> *P. pseudomallei*<sup>35</sup>) и в ПС одного из штаммов *Escherichia coli*.<sup>36</sup> Она была выделена в индивидуальном состоянии из кислого гидролизата ПС и идентифицирована с использованием БХ и ТСХ сравнением с известным образцом, полученным из гликозидов терпенового ряда.<sup>37</sup> Ее структура была подтверждена масс-спектрами, спектрами ЯМР <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С, а L-конфигурация следовала из величины оптического вращения.



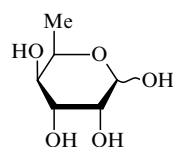
1

6-Дезокси-L-альтроза (2) была обнаружена в *Yersinia enterocolitica*,<sup>38,39</sup> где она входит в состав гомополисахарида, состоящего из пиранозных звеньев, а также в ПС *Y. pseudotuberculosis*, серовар VB, где она входит в фуранозной форме в боковое ответвление.<sup>40</sup> Моносахарид был идентифицирован прямым сравнением с образцом, выделенным ранее из терпеновых гликозидов.<sup>37</sup> Его строение как 6-дезоксигексозы подтверждено данными масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР,<sup>38</sup> а его L-конфигурация была установлена по величине оптического вращения.



2

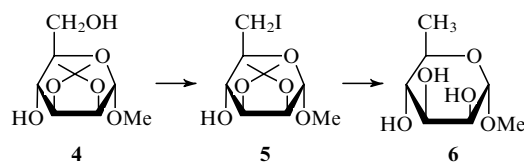
Имеются сведения<sup>41</sup> о наличии в составе ПС *Y. enterocolitica* 6-дезоксигексозы (3), которую, к сожалению, не удалось выделить в достаточно чистом виде. Заключение о ее строении сделано на основании сравнения с известным образцом<sup>37</sup> по данным электрофореза в боратном буфере. Данные о стереохимии 6-дезоксигексозы получены путем анализа спектра ЯМР <sup>1</sup>Н не полностью очищенного образца. В спектре присутствовали сигналы, отвечающие CH<sub>3</sub>-группе 6-дезоксигексозы, а величины КССВ ( $J_{2,3} = 3.5$ ,  $J_{3,4} = 1.5$ ,  $J_{4,5} = 2.25$  Гц) соответствовали гуло-конфигурации. Абсолютная конфигурация установлена на основании спектра ЯМР <sup>13</sup>С данного полисахарида.



3

Синтез 6-дезоксигексоз может быть легко осуществлен стандартными методами — путем введения 6-дезоксигексозы в соответствующие альдозы. Примером может служить синтез редко встречающейся D-рамнозы из D-маннозы<sup>42</sup> (схема 1).

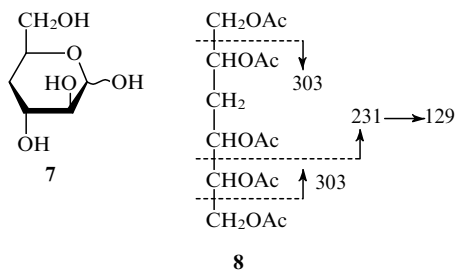
Схема 1



α-Метил-2,3-О-изопропилиден-D-маннопиранозид (4) избирательным тозилрованием первичной гидроксильной группы и последующей обработкой NaI переводился в 6-иодопроизводное 5. Гидрирование последнего над никелем Ренея и последующее снятие изопропилиденовой группы приводило к метилгликозиду D-рамнозы 6.

Монодезоксигексозы другого типа пока не найдены в О-антигенных ПС. Особенно интересно, что 2-дезоксигексозы, широко представленные во многих природных гликозидах, вовсе не обнаружены в ПС бактерий. Нет никаких данных и о присутствии в ПС 3-дезоксигексоз. Единственным представителем 4-дезоксигексоз, найденным в О-антигенных ПС, является 4-дезоксигексоза (7), обнаруженная

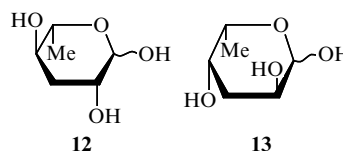
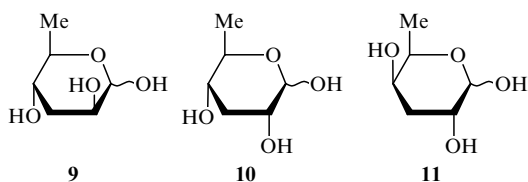
в некоторых штаммах *Citrobacter* (например, в *Citrobacter* O36 она в виде пиранозных звеньев образует гомополисахарид,<sup>43</sup> а в *Citrobacter* РСМ 1487 входит в боковую цепь O-антигенного ПС<sup>44</sup>). Моносахарид **7** отличается очень высокой лабильностью, и выделить его после кислотного гидролиза ПС в чистом виде не удалось, хотя после восстановления гидролизата был обнаружен полиол, масс-спектр ацетата **8** которого содержал сигналы фрагментов  $m/Z$  303 и 231 и соответствующих вторичных фрагментов, что четко указывает на наличие С(4)-дезоксизвена. Стереохимия моносахарида **7** определена на основании спектра ЯМР <sup>1</sup>H самого полисахарида, причем наличие двух сигналов атома Н(4) при 1.751(а) и 1.528(е) м.д. также подтверждает его строение. D-Конфигурация приписана моносахариду **7** на основании величины оптического вращения.



### 3. 3,6-Дидезоксигексозы

Этот тип дезоксисахаров широко распространен в ПС грамотрицательных бактерий и является типичным для ПС бактерий рода *Salmonella*.<sup>2</sup> 3,6-Дидезоксигексозы были обнаружены как компоненты ПС еще на заре исследований O-антигенных ПС микроорганизмов. Идентификация и определение строения 3,6-дидезоксигексоз, выделенных из различных сальмонелл, позволили продемонстрировать прямую связь между строением O-антигенных ПС определенной бактерии и ее иммунохимическими характеристиками. Эти исследования, относящиеся к 50-м годам, имели большое историческое значение. Они фактически положили начало широкому и систематическому химическому исследованию микробных O-антигенных ПС.

К настоящему времени известны пять представителей 3,6-дидезоксигексоз различной конфигурации, входящие в состав ПС достаточно большого количества грамотрицательных бактерий — D-арабино-гексоза (тивелоза, **9**), D-рибо-гексоза (паратоза, **10**), D-ксило-гексоза (абеквоза, **11**), L-арабино-гексоза (аскарилоза, **12**) и L-ксило-гексоза (колитоза, **13**). Наиболее часто встречаются первые три моносахарида, которые и были впервые обнаружены Вестфалем и Людерицем при исследовании ПС сальмонелл.<sup>45</sup> Они занимают место боковых ответвлений в основной цепи биополимера и являются иммунодоминантными группами, т.е. определяют иммунохимическую характеристику данного микроорганизма (см. обзор<sup>46</sup>). Так, например, ПС *S. paratyphi* содержит паратозу, *S. typhimurium* — абеквозу, *S. typhi* — тивелозу.<sup>2,47</sup> В сальмонеллах серогрупп А–D обязательно присутствует одна из этих трех 3,6-дидезоксигексоз.



В двух видах сальмонелл была обнаружена также колитоза,<sup>48</sup> впервые найденная в ПС *Escherichia coli* O111.<sup>49</sup> Позднее 3,6-дидезоксигексозы были найдены в ПС других грамотрицательных бактерий. Так, все пять представителей были обнаружены в ПС различных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*,<sup>50–57</sup> аскарилоза — в ПС *Vibrio cholerae* O3,<sup>58</sup> абеквоза — в ПС *Citrobacter freundii*,<sup>59,60</sup> тивелоза — в ПС *Eubacterium saburreum*,<sup>61</sup> † колитоза — в ПС одного из штаммов *Escherichia coli*.<sup>62</sup>

Все перечисленные 3,6-дидезоксигексозы могут быть выделены в индивидуальном состоянии после кислотного гидролиза соответствующего ПС. Их гликозидная связь, как и у других дезоксисахаров, гидролизуеться значительно легче, чем обычные гликозидные связи, что делает возможным их избирательное отщепление. Однако они отличаются повышенной лабильностью к кислотам, и их выделение связано с некоторыми трудностями.

Первоначально структура 3,6-дидезоксигексоз определялась классическими методами. В качестве примера можно привести установление строения абеквозы (схема 2). Расположение дезоксизвеньев устанавливали с помощью периодатного окисления полиола **14**, полученного восстановлением абеквозы **11** LiAlH<sub>4</sub>. В результате окисления полиола **14** были получены формальдегид, ацетальдегид и малоновый альдегид, что и доказывало положение дезоксизвеньев у атомов С(6) и С(3) скелета гексозы.<sup>46</sup> Установление абсолютной и относительной конфигурации абеквозы, как и других 3,6-дидезоксигексоз, в то время было возможно только посредством сравнения с заведомыми образцами. С этой целью был осуществлен синтез некоторых представителей 3,6-дидезоксигексоз.

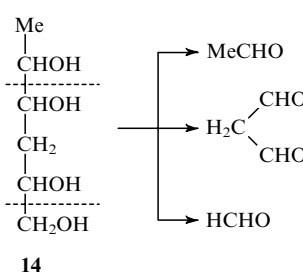
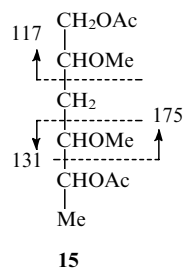


Схема 2

Позднее для установления строения скелета 3,6-дидезоксигексоз стала применяться масс-спектрометрия ацетатов полиолов, полученных при их восстановлении. Эти производные имеют характерную фрагментацию, указывающую на расположение дезоксизвеньев. Так, например, в масс-спектре ацетата полиола **15**, который был получен



† *Eubacterium saburreum* не относится к грамотрицательным бактериям.

восстановлением *O*-метилового эфира абеквозы, выделенного из гидролизата метилированного ПС *S. typhimurium*, содержатся фрагменты с *m/z* 175, 131 и 117, указывающие на наличие дезоксизвеньев у атомов C(6) и C(3).<sup>63</sup>

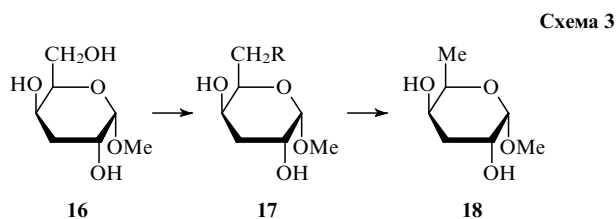
Однако проще всего положение дезоксизвеньев в моносахариде можно выявить с помощью спектроскопии ЯМР <sup>13</sup>C. В настоящее время все спектроскопические характеристики 3,6-дидезоксигексоз хорошо известны, и их наличие легко идентифицируют непосредственно по данным спектров ЯМР соответствующего ПС: сигнал в области 16.0–18.0 м.д. указывает на присутствие метильной группы у атома C(6), а сигнал в области 33–40 м.д. — на наличие дезоксизвена у атома C(3).<sup>64</sup>

Конфигурация 3,6-дидезоксигексоз, а именно стереохимия атомов C(2) и C(4), может быть четко установлена из данных спектров ЯМР <sup>1</sup>H, причем наиболее характерными являются величины КССВ между протонами C(3)H<sub>2</sub>-группы и протонами у атомов C(2) и C(4). В соответствии с общими закономерностями эти константы имеют большие значения (11–12 Гц) для *a,a*-протонов и небольшие (3–5 Гц) для *e,e*- и *e,e*-протонов. Так, для паратозы<sup>10</sup> они составляют  $J_{3a,4} \approx J_{2,3a} \approx 11$  Гц и  $J_{3e,4} \approx J_{2,3e} \approx 4$  Гц соответственно; для абеквозы  $J_{2,3e} \approx 4.5$ ,  $J_{2,3a} \approx 12$ ,  $J_{3a,4} \approx 3$  Гц. В настоящее время идентификацию 3,6-дидезоксигексоз производят непосредственно по данным спектров ЯМР самих ПС.

Приведенные выше данные относятся к пиранозной форме 3,6-дидезоксигексоз, в которой эти дезоксисахара находятся практически во всех бактериальных ПС. Единственным исключением является ПС из *Yersinia pseudotuberculosis* IV, где зафиксировано наличие 3,6-дидезоксигексозы в фуранозной форме.<sup>52</sup>

Описано несколько методов синтеза 3,6-дидезоксигексоз. Все они основаны на введении дезоксизвеньев классическими методами в гексозы нормального строения. Первоначально такой синтез предпринимался для доказательства строения дидезоксигексоз, выделенных из природных ПС.

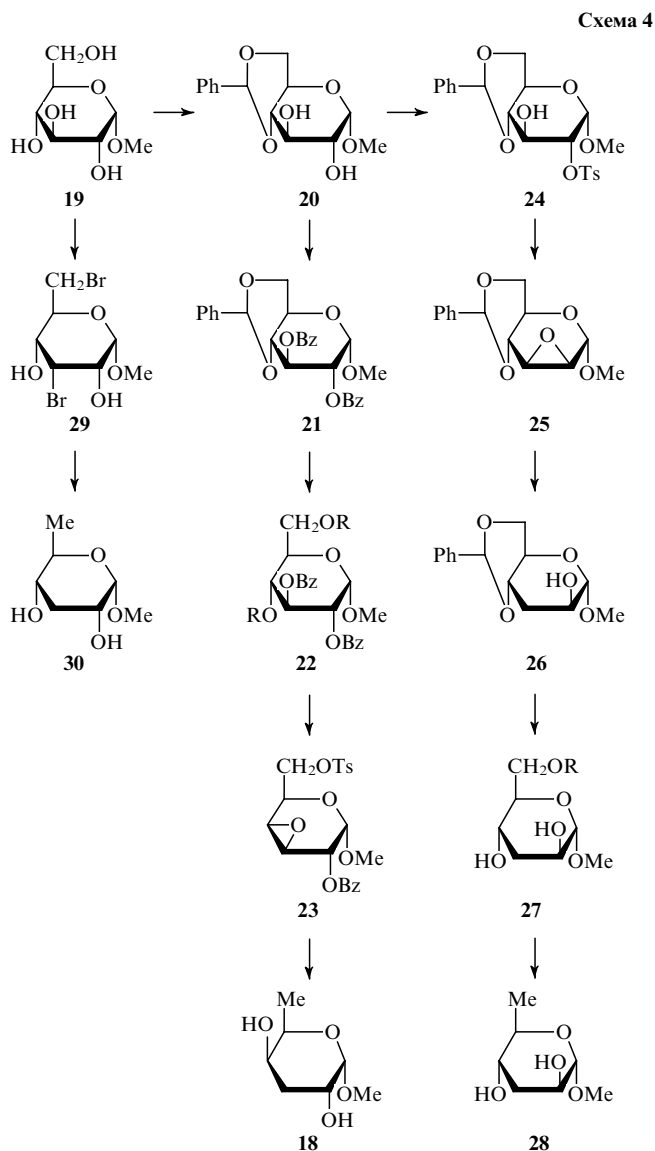
Исторически важным является синтез производного абеквозы (11) из метил-3-дезоксигалактозида 16 (схема 3).<sup>65</sup> Последний избирательно тозилитировали по первичной гидроксильной группе, тозилат (17, R = OTs) превращали в иодид (17, R = I), восстановлением которого получали метилабеквозид 18.



Метилабеквозид может быть получен и прямым восстановлением тозилата 17 под действием LiAlH<sub>4</sub>. Аналогично были синтезированы производные тивелозы (9) из 3-дезоксиманнозида и паратозы (10) из 3-дезоксиглюкозида.<sup>66</sup> Позже синтез паратозы осуществляли прямым введением атома галогена по атому C(6) 3-дезоксигликозида.<sup>67</sup>

В последнее время появилась потребность в препаративных методах синтеза 3,6-дидезоксигексоз, которые позволяли бы получать их в более значительных количествах (для создания искусственных антигенов и диагностических препаратов). Ниже представлены схемы синтеза трех наиболее важных 3,6-дидезоксигексоз<sup>68</sup> — метильных производных тивелозы, паратозы и абеквозы — из наиболее доступного материала — метилглюкозида 19 (схема 4).

С целью синтеза абеквозы метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид 19 переводили в 4,6-*O*-бензилиденное производное 20 и далее в его дибензоат 21. После снятия бензилиденной группы диол (22, R = H) превращали в 4,6-ди-*O*-тозилат (22, R = Ts),



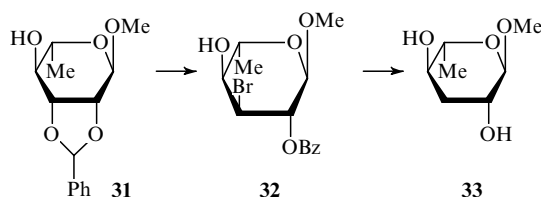
обработка которого основанием давала 6-*O*-тозилат 3,4-ангидросахара 23. Восстановление ангидросахара LiAlH<sub>4</sub> протекало с регио- и стереоспецифическим раскрытием эпиксидного кольца и сопровождалось гидрогенолизом *O*-тозильной группы. В результате было получено метильное производное абеквозы 18.

В синтезе тивелозы бензилиденное производное 20 подвергалось тозилитированию, которое проходило избирательно, давая 2-*O*-тозилат 24. Последний переводили в 2,3-ангидропроизводное 25, которое под действием LiAlH<sub>4</sub> превращалось в 3-деоксипроизводное 26. После снятия бензилиденной группы и избирательного тозилитирования гидроксильной группы при атоме C(6) триола (27, R = H), соответствующий тозилат (27, R = Ts) восстанавливали и выделяли производное тивелозы 28.

Наконец, метильное производное паратозы 30 было получено посредством обработки глюкопиранозид 19 трибромимидазолом в присутствии трифенилфосфина (ср.<sup>69</sup>) и последующим восстановлением дибромид 29 гидрогенолизом над никелем Ренея или под действием Bu<sub>3</sub>SnH в присутствии азо-*N,N'*-бисизобутиронитрила.

Известен также достаточно простой синтез<sup>70</sup> производного аскариллозы 33 из L-рамнозы (схема 5). Метил-2,3-*O*-бензилиден- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 31 (легко получаемый обработкой метилрамнозида диметилацеталем бензальдегида в присутствии толуолсульфокислоты) взаимодействует

Схема 5

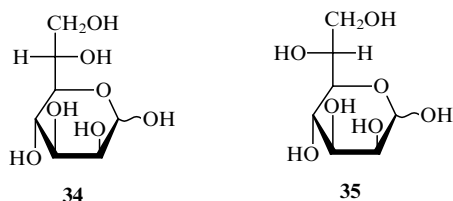


с *N*-бромсукцинимидом с региоспецифичным раскрытием бензилиденового цикла, давая 3-бромпроизводное **32**, которое восстанавливается  $\text{LiAlH}_4$  в метилгликозид 3,6-дидезокси-*L*-арабино-гексозы (аскарилозы) **33**. По аналогичной схеме из 3,4-*O*-бензилиденового производного  $\alpha$ -*L*-фукозы была синтезирована колитоза.<sup>71</sup>

#### 4. Гептозы

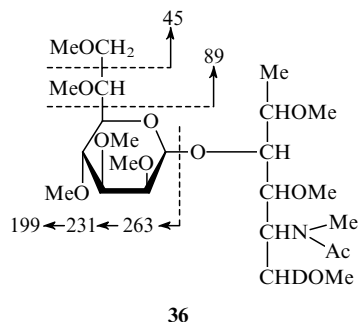
К настоящему времени как компоненты *O*-антигенных ПС обнаружены только три гептозы — *L*-глицеро-*D*-манно-гептоза, *D*-глицеро-*D*-манно-гептоза и *D*-глицеро-*D*-альтро-гептоза. Первая из них является также обычным компонентом кора ЛПС грамотрицательных бактерий (см. обзор<sup>72</sup>).

*L*-Глицеро-*D*-манно-гептоза **34** была выделена<sup>73</sup> после кислотного гидролиза ПС *Pseudomonas ceracia* ИМВ 673/2 ионообменной хроматографией в боратном буфере. Ее строение определяли следующим образом. Окисляли ПС рассчитанным количеством периодата натрия и затем восстанавливали  $\text{NaBH}_4$ . Среди продуктов гидролиза модифицированного таким образом ПС была обнаружена манноза, возникшая в результате расщепления связи C(7)–C(6) гептопиранозного звена. Это доказывало манно-конфигурацию C(2)–C(5) фрагмента моносахарида. Полученные данные подтверждаются также данными спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  исходного ПС. Время удерживания гептозы в углеводном анализаторе, а также ее спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  полностью совпадали с данными для энантиомерного сахара *D*-глицеро-*L*-манно-гептозы и отличались от этих характеристик для *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы, что доказывало относительную конфигурацию моносахарида в целом. Абсолютная конфигурация следовала из величины оптического вращения ( $[\alpha]_D = +4.8^\circ$ ), она была подтверждена анализом эффектов гликозирования по данным спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  полисахарида.



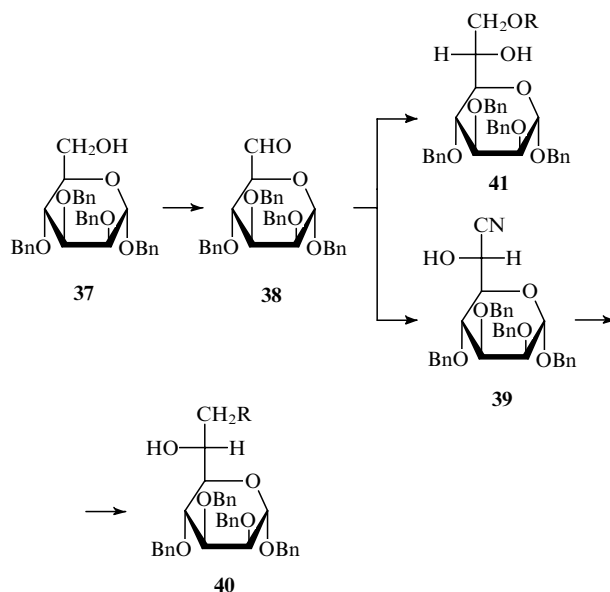
*D*-Глицеро-*D*-манно-гептоза **35** была обнаружена в ПС *Vibrio cholerae* O21, где она входила в состав основной цепи.<sup>74</sup> Моносахарид **35** был выделен в индивидуальном состоянии из кислотного гидролизата ПС. В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  пентаацетата метилгептозида химические сдвиги сигналов и КССВ протонов, находящихся у атомов C(2)–C(5), практически совпали с таковыми для тетраацетата метил- $\alpha$ -*D*-маннозида, что доказывало конфигурацию C(2)–C(5)-фрагмента гептозы. Подвижность полученного из нее ацетата гептитола при ГЖХ-анализе отличалась от подвижности гептитола, полученного из *L*-глицеро-*D*-манно-гептозы, а величина оптического вращения ( $[\alpha]_D = +74^\circ$ ) свидетельствовала о *D*-конфигурации.

Позднее *D*-глицеро-*D*-манно-гептоза была выделена также из ПС *Vibrio cholerae* O3.<sup>58</sup> Ее присутствие обнаружено при стандартном моносахаридном анализе ПС, а строение подтверждено данными спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  самого полисахарида и масс-спектрометрическим анализом дисахаридного фрагмента **36** (выделенного после кислотного гидролиза метилированного ПС с последующим восстановлением  $\text{NaBD}_4$ ), который содержал остаток гептозы и связанный с ним остаток аминодезоксиполиола. Присутствие в масс-спектре фрагмента с  $m/Z$  263 и соответствующих вторичных ионов с  $m/Z$  231 и 199, а также фрагментов с  $m/Z$  45 и 89 свидетельствовало в пользу *O*-метилового эфира гептозы. Окончательно строение *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы подтверждено встречным синтезом.



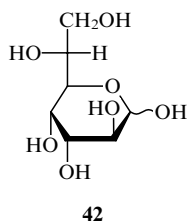
Известно несколько методов синтеза глицеро-манно-гептоз, основанных на общепринятых методах синтеза высших сахаров. Наиболее удобный из них приведен на схеме 6.<sup>75</sup> Так, бензил-2,3,4-три-*O*-бензил- $\alpha$ -*D*-маннопиранозид **37** окислялся по Сверну в альдегид **38**, который при взаимодействии с HCN давал смесь изомеров. Циангидрин **39** с *D*-глицеро-*D*-манно-конфигурацией выделяли хроматографически и восстанавливали в аминсахар (**40**, R =  $\text{NH}_2$ ), который действием азотистой кислоты переводили в производное *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы (**40**, R = OH). Для получения *L*-глицеро-изомера альдегид **38** конденсировали с аллилоксиметилмагнийбромидом, из полученной смеси изомерных спиртов хроматографически выделяли основную, имеющую *L*-глицеро-конфигурацию (**41**, R = All), деаллилирование которого давало производное *L*-глицеро-*D*-манно-гептозы (**41**, R = H).

Схема 6



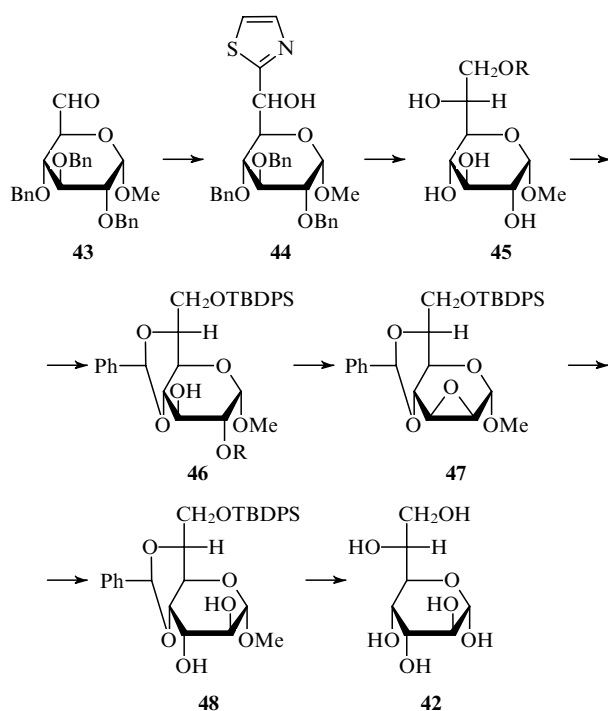


*D*-Глицеро-*D*-альтро-гептоза **42** была найдена в составе ПС *Campylobacter jejuni* O23 вместе с 6-дезоксид-альтро-гептозой и их 3-*O*-метильными эфирами, причем относительное количество этих моносахаридов, входящих в состав *O*-антигенного ПС, зависит как от штамма бактерии, так и, по-видимому, от условий ее выращивания.<sup>76</sup> Гептоза **42**, входящая в состав основной цепи ПС, была выделена после кислотного гидролиза ПС в смеси со своими 1,6- и 1,7-ангидропроизводными. Наличие в моносахариде гептозного скелета было подтверждено масс-спектром полученного при восстановлении полиола. Для установления конфигурации гептозы полисахарид был последовательно подвергнут окислению рассчитанным количеством периодата (при этом первой окисляется гликольная система C(6)–C(7)-фрагмента), восстановлению NaBH<sub>4</sub> и метанолизу. В результате был выделен и идентифицирован метил-*D*-альтрозид, что доказывало конфигурацию фрагмента C(2)–C(5) гептозы; конфигурация атома C(6) была установлена прямым сравнением соответствующего ацетата полиола с заводским образцом, полученным из синтетической *D*-глицеро-*D*-альтро-гептозы. Аналогично было установлено строение 3-*O*-метилового эфира гептозы **42**, входящего в состав того же ПС.<sup>76</sup>



Синтез *D*-глицеро-*D*-альтро-гептозы был осуществлен<sup>77</sup> посредством стереоспецифического наращивания углеродной цепи по атому C(6) производного глюкозы **43** по методу Донадони<sup>78</sup> с последующим обращением конфигурации у атомов C(2) и C(3) (схема 7). Альдегид **43**, полученный окислением по Сверну метил-2,3,4-три-*O*-бензил- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозид, в результате реакции с 2-триметилсилилтиазолом превращали в тиазольное производное **44**. Обработка

Схема 7

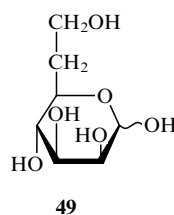


последнего муравьиной кислотой и дебензилирование привели к смеси эпимерных по атому C(6) гептоз, из которых был выделен изомер с *D*-глицеро-конфигурацией (**45**, R = H). Он был превращен в 7-*O*-трет-бутилдифенилсилиловый эфир (**45**, R = TBDPS) и далее в 4,6-*O*-бензилиденное производное (**46**, R = H), переведенное затем в соответствующий 2-*O*-тозилат (**46**, R = Ts). Последний превращался обычным путем в 2,3-эпоксипроизводное **47**, которое при обработке NaOH в результате *транс*-диаксиального раскрытия окисного цикла давало производное моносахарида **48** с *альтро*-конфигурацией. Удаление защитных групп привело к *D*-глицеро-*D*-альтро-гептозе **42**, конфигурация которой подтверждена данными ЯМР-спектроскопии. Синтетический и выделенный из природного ПС моносахариды оказались идентичными.<sup>76</sup>

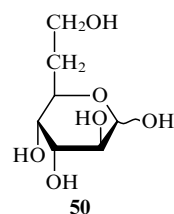
## 5. Дезоксигептозы

Среди моносахаридов этого класса в составе *O*-антигенных ПС найдены пока лишь два представителя. Оба они относятся к 6-дезоксигептозам.

6-Дезокси-*D*-манно-гептоза **49** была обнаружена в составе ПС *Yersinia pseudotuberculosis* IA, где она находится в разветвлении основной цепи.<sup>54</sup> Наличие 6-дезоксигептозы в ПС было вначале констатировано по данным спектра ЯМР <sup>13</sup>C, который содержит характерные для дезоксиальдоз сигналы при 34.1 м.д. (метиленовая группа дезоксиальдоз) и 59.0 м.д. (CH<sub>2</sub>OH-группа дезоксиальдоз). Присутствие 6-дезоксигептозы **49** в ПС подтверждено также данными масс-спектрометрического анализа *O*-метилового эфира гликозида дезоксигептозы, полученного в индивидуальном виде после метанолиза метилированного ПС.<sup>54</sup> Эта гептоза была также найдена в *Pseudomonas pseudomallei*, где она входит в состав гомополисахарида.<sup>35</sup> Ее строение и стереохимия были подтверждены данными спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H: в частности, величины КССВ соответствовали *манно*-конфигурации ( $J_{2,3} = 3.5$ ,  $J_{3,4} = 9.1$ ,  $J_{4,5} = 9.5$  Гц). Абсолютная конфигурация **49** была установлена по величине оптического вращения. Строение моносахарида **49** подтверждено также встречным синтезом.



6-Дезокси-*D*-альтро-гептоза **50** найдена в ПС *Campylobacter jejuni* O23A и O23B.<sup>76</sup> Она была выделена в смеси со своим ангидропроизводным после кислотного гидролиза ПС. Строение моносахарида **50** подтверждено прямым сравнением с синтетическим образцом соответствующего гексаацетата полиола, а его *D*-конфигурация установлена анализом ГЖХ гликозидов с (*R*-) и (*S*-)бутан-2-олами.



Синтез 6-дезоксид-альтро-гептозы<sup>79</sup> осуществлен в соответствии со схемой 8.

Метил-2,3,4-три-*O*-бензил- $\alpha$ -*D*-альтропиранозид (**51**, R = H), через 6-*O*-трифлат (**51**, R = CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>) превращали в нитрил (**52**, R = CN), который последовательным восстановлением

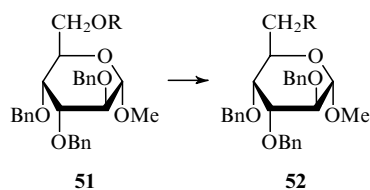


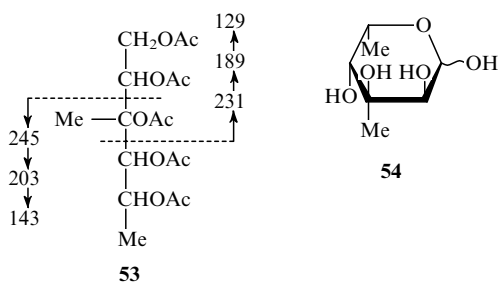
Схема 8

DIBАН, гидролизом полученного имина и восстановлением соответствующего альдегида  $\text{NaBH}_4$  переводили в производное 6-дезоксид-*D*-альтро-гептозы (**52**,  $\text{R} = \text{CH}_2\text{OH}$ ). По аналогичной схеме, исходя из производного маннозы, было получено производное 6-дезоксид-*D*-манно-гептозы.<sup>79</sup>

## 6. Моносахариды с разветвленной цепью

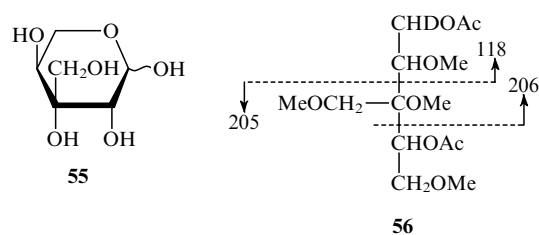
Моносахариды, содержащие разветвленную углеродную цепь, — редкий класс сахаров. Такие моносахариды иногда встречаются в составе антибиотиков, хотя в последнее время несколько их представителей найдены и в составе *O*-антигенных ПС, где они могут занимать место как в основной цепи биополимера, так и в разветвлениях.

Два представителя этого класса моносахаридов были выделены в индивидуальном состоянии после кислотного гидролиза ПС грамотрицательной бактерии *Coxiella burnetii* фаза I.<sup>80</sup> Один из них оказался по своим хроматографическим характеристикам идентичным 6-дезоксид-3-*C*-метилгулозе (виренозе), найденной ранее в антибиотике виреномицине.<sup>81</sup> Структура моносахарида, выделенного из *O*-антигенного ПС, была подтверждена также масс-спектрометрией полного ацетата полиола **53**. Фрагментация последнего соответствовала структуре родоначального моносахарида, в частности, наличие фрагментов с  $m/Z$  231 и 245 и соответствующих вторичных фрагментов указывало на характер и место разветвления цепи. Прямое сравнение моносахарида с образцами соответствующих моносахаридов *манно*-, *тало*- и *гуло*-рядов, выделенных из других природных продуктов, показало, что ему соответствует *гуло*-конфигурация. Однако величина его оптического вращения отличалась от найденной для виренозы, для которой была установлена *D*-конфигурация.<sup>81</sup> На этом основании для моносахарида, выделенного из ПС *Coxiella burnetii*, принято строение 6-дезоксид-3-*C*-метил-*L*-гулозы **54**.

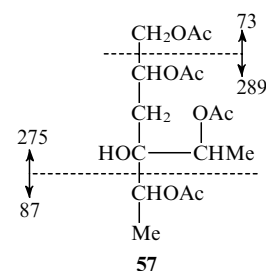


Второму моносахариду, выделенному из *O*-антигенного ПС *Coxiella burnetii*, было приписано строение 3-*C*-гидроксиметил-*L*-ликсозы **55**. Последовательным метилированием ПС, кислотным гидролизом метилированного ПС, восстановлением образующейся при этом смеси метилированных моносахаридов  $\text{NaBD}_4$  и их ацелированием получали смесь ацетатов полиолов, из которой был выделен ацетат частично метилированного полиола **56**, соответствующий разветвленному моносахариду. Его фрагментация при масс-спектрометрическом анализе полностью доказывала строение скелета и расположение гидроксильных групп в моносахариде, о чем, в частности, свидетельствуют фрагменты с  $m/Z$  205, 206 и 118. Определение конфигурации моносахарида

**55** и отнесение его к ряду *L*-ликсозы было сделано авторами на основании его синтеза.

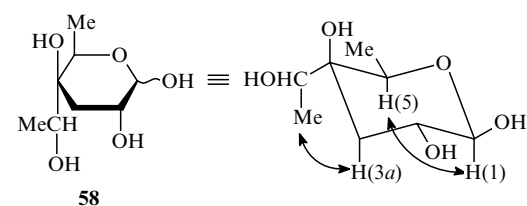


Еще два сложных по строению моносахарида, относящиеся к разветвленным октозам, были найдены в составе *O*-антигенных ПС нескольких серотипов *Yersinia*. Они были выделены в индивидуальном состоянии после кислотного гидролиза ПС и имели сходные структуры, которые различались лишь конфигурацией одного из хиральных центров. Один из них — иерсиниоза А — был выделен из *Y. pseudotuberculosis*, серовар VI,<sup>82</sup> другой — иерсиниоза В — из *Y. enterocolitica*, серовар O4,32.<sup>83</sup> При восстановлении иерсиниоз А и В  $\text{NaBH}_4$  и последующем ацелировании были получены тетраацетаты соответствующих полиолов **57**, в этом случае одна из имеющихся гидроксильных групп в стандартных условиях не ацелировалась, что указывало на ее положение при третичном углеродном атоме. Масс-спектры обоих тетраацетатов полиолов оказались одинаковыми, и их фрагментация свидетельствовала о том, что обе иерсиниозы идентичны по строению углеродного скелета и расположению гидроксильных групп и являются 3,6-дидезокси-4-*C*-(1'-гидроксилэтил)гексозами. Такой же результат дала и масс-спектрометрия метилгликозидов обоих моносахаридов.



Спектры ЯМР иерсиниоз А и В также оказались практически одинаковыми. Так, спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  иерсиниозы А содержал сигналы при 13.4 и 16.4 м.д. (две  $\text{CH}_3$ -группы), 35.9 м.д. ( $\text{CH}_2$ -группа), 75.8 м.д. (третичный углеродный атом). Сигнал атома  $\text{C}(1)$  со слабополольным химическим сдвигом указывал на *D*-конфигурацию моносахарида. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  иерсиниозы А содержал сигналы в области 4.71 м.д. ( $J_{1,2} = 8.25$  Гц,  $\text{H}(1)$ ), 3.80 м.д. ( $J_{2,3e} = 5.22$  и  $J_{2,3a} = 11.82$  Гц,  $\text{H}(2)$ ), 1.85 м.д. ( $J_{3a,3e} = 13.86$  Гц,  $\text{H}(3)$ ), 4.18 м.д. ( $J_{5,6} = 6.63$  Гц,  $\text{H}(5)$ ) и 1.30 м.д. ( $\text{H}(6)$ ).

Большие значения констант  $J_{1,2}$  и  $J_{2,3a}$  для иерсиниозы В, находящейся в  $\beta$ -форме, свидетельствуют об аксиальной ориентации атома  $\text{H}(2)$ , а данные ЯЭО указывают на взаимодействие протонов  $\text{H}(1)$  и  $\text{H}(5)$  (т.е. на аксиальное положение атома  $\text{H}(5)$ ) и сближенность протона  $\text{H}(3a)$  и протонов  $\text{CH}_3$ -группы боковой цепи (указывающую на экваториальное положение боковой цепи при атоме  $\text{C}(4)$ ). Из этих данных



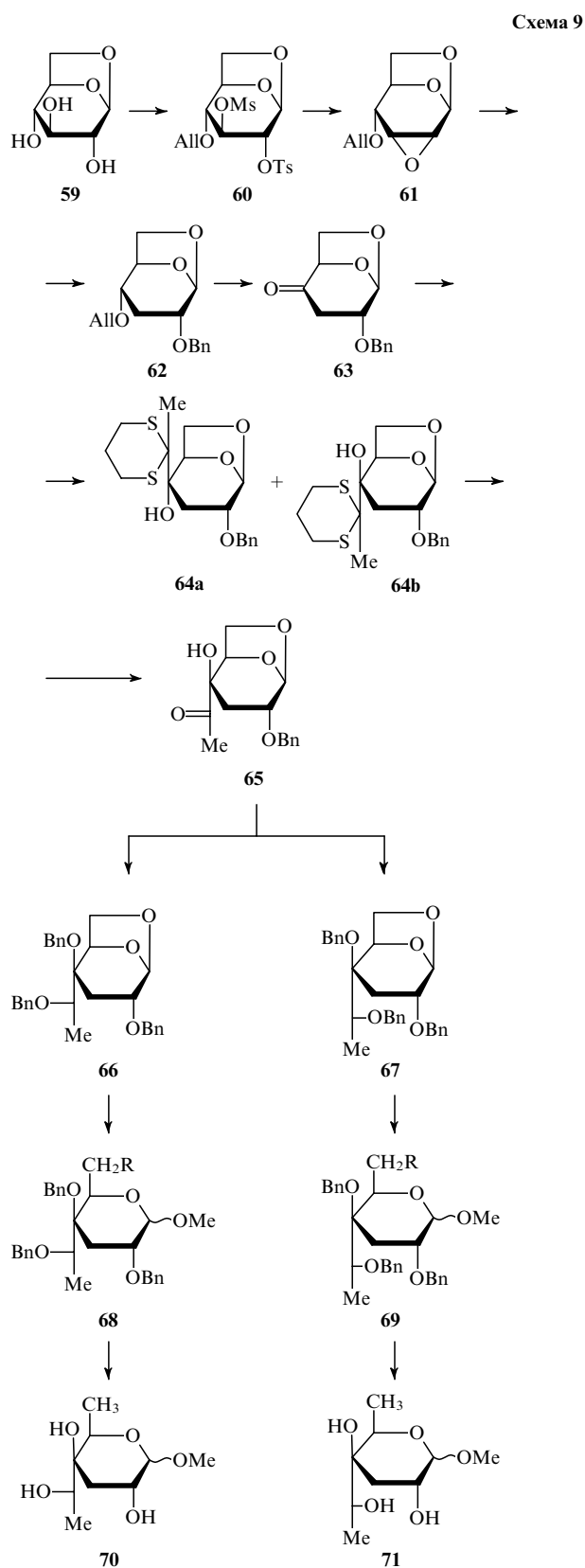
следует, что иерсиниоза В имеет *ксило*-конфигурацию. Сравнение спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  иерсиниоз А и В показало, что обе иерсиниозы являются 3,6-дидезокси-4-*C*-(1'-гидроксиэтил)-*D*-*ксило*-гексопиранозами **58**. Различие их заключалось лишь в стереохимии асимметрического центра *C*(7), находящегося в боковой цепи. Этот вопрос был решен встречным синтезом иерсиниоз.

С этой целью был разработан общий метод синтеза 3,6-дидезокси-4-*C*-(1'-гидроксиэтил)гексоз, который в принципе позволяет получать любые разветвленные октозы данного типа. Оставляя в стороне обсуждение соотношений конфигурации хиральных центров в изомерных октозах этого ряда (см. работу<sup>84</sup>), подчеркнем лишь, что для решения конкретной задачи — установления абсолютной конфигурации хирального центра *C*(7) изомерных иерсиниоз — потребовалось осуществить стереоспецифический синтез соединений, имеющих *D*-*ксило*-конфигурацию и различающихся лишь геометрией хирального центра, находящегося в боковой цепи.

Этот довольно сложный синтез<sup>84,85</sup> представлен на схеме 9. В качестве исходного соединения была взята 1,6-ангидро- $\beta$ -*D*-глюкопираноза (левоглюкозан, **59**), которая стандартной последовательностью реакций превращалась в 4-*O*-аллил-3-*O*-мезил-2-*O*-тозиллевоглюкозан (**60**) и затем в 1,6:2,3-диангидро-4-*O*-аллил- $\beta$ -*D*-аллопиранозу (**61**). Восстановлением эпоксида **61** и последующим *O*-бензилированием была получена 1,6-ангидро-4-*O*-аллил-2-*O*-бензил-3-дезокси- $\beta$ -*D*-рибо-гексоза (**62**). Снятие аллильной защиты и окисление освободившегося гидроксила по Сверну дало ключевой интермедиат синтеза — производное кетосахара **63**. Его реакция с 2-литий-2-метил-1,3-дитианом привела к смеси двух эпимерных по атому *C*(4) спиртов **64a** и **64b**, которые были разделены хроматографически. Строение изомеров, различающихся только конфигурацией атома *C*(4), было установлено с помощью спектроскопии ЯМР (включая измерение ЯЭО), причем оказалось, что спирт **64** имеет *D*-*ксило*-конфигурацию пиранозного цикла; он и был использован для дальнейшего синтеза.

Обработкой смесью  $\text{HgCl}_2$  и  $\text{CdCO}_3$  спирт **64** превращался в кетон **65**, который после восстановления  $\text{NaBH}_4$  и последующего бензилирования давал пару эпимерных по возникшему хиральному центру боковой цепи спиртов **66** и **67** в соотношения 2:1. Абсолютная конфигурация нового хирального центра *C*(7) в спиртах **66** и **67** была установлена спектроскопическим исследованием и измерением ЯЭО в изопропилиденных производных, полученных дебензилированием исходных спиртов **66** и **67**. Оказалось, что боковая цепь производного моносахарида **67** имеет *D*-*глицеро*-конфигурацию, а **66** — *L*-*глицеро*-конфигурацию.

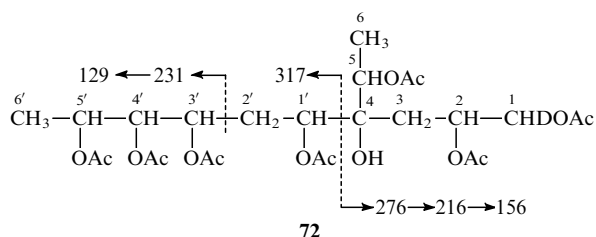
Для перевода спиртов **66** и **67** в соответствующие иерсиниозы они были подвергнуты очень мягкому ацетилизу с последующим метанолизом, что позволило раскрыть 1,6-ангидроцикл без обычно сопутствующего снятия *O*-бензильных групп (что могло привести к сложной смеси пиранозных и фуранозных форм иерсиниоз). В результате были получены соответственно гликозиды **68** и **69** ( $\text{R} = \text{OH}$ ) со свободной гидроксильной группой при атоме *C*(6). Последняя заменялась на атом брома действием  $\text{Ph}_3\text{P}-\text{CBr}_4$  в пиридине. Полученные бромиды **68** и **69** ( $\text{R} = \text{Br}$ ) после их разделения и каталитического гидрогенолиза, проходящего с одновременным снятием бензильных групп, превращались в гликозиды синтетических иерсиниоз **70** и **71**. Сравнение их с соответствующими производными выделенных из ПС природных иерсиниоз с помощью различных вариантов спектроскопии ЯМР (из которых наиболее важным было изучение ЯЭО) позволило определить конфигурацию хирального центра *C*(7) в обоих моносахаридах. Оказалось, что иерсиниоза А представляет собой 3,6-дидезокси-4-*C*-(*L*-*глицеро*-1'-гидроксиэтил)-*D*-*ксило*-гексопиранозу, а иерсиниоза В — 3,6-



дидезокси-4-*C*-(*D*-*глицеро*-1'-гидроксиэтил)-*D*-*ксило*-гексопиранозу.

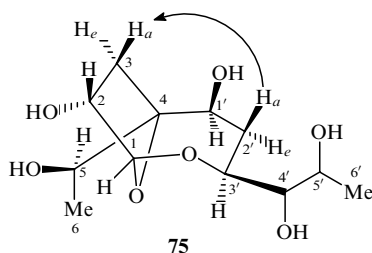
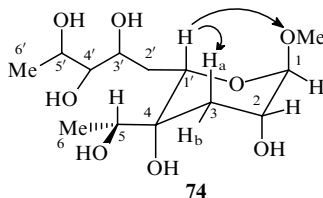
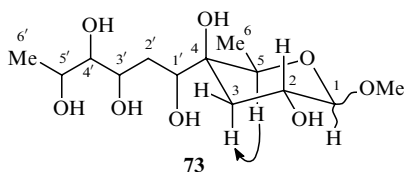
Недавно в составе ПС *Pseudomonas caryophylli* был обнаружен уникальный по структуре моносахарид с разветвленной цепью, относящийся к высшим сахарам.<sup>86,87</sup> Он был выделен в индивидуальном состоянии после кислотного гидролиза ПС и назван кариофиллозой. Его спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  указывал на присутствие в нем шести СОН-групп

(сигналы в области 68–78 м.д.), двух  $\text{CH}_3$ -групп (сигналы в области 16–17 м.д.), двух метиленовых групп (сигналы в области 29–32 м.д.) и одного третичного атома С, несущего гидроксильную группу (сигнал в области 74 м.д.). При восстановлении кариофиллозы  $\text{NaBD}_4$  был получен полиол разветвленной структуры, который при ацетилировании дал гептаацетат **72**, причем одна из гидроксильных групп не ацетилировалась, что свидетельствовало о ее связи с третичным углеродным атомом. Характер фрагментации в масс-спектре ацетата **72**, а также данные спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  указывали на то, что кариофиллоза содержит 12 углеродных атомов, две метильные группы, два метиленовых звена, имеет разветвленную цепь и является 3,6-дидезокси-4-С-(1',3',4',5'-тетрагидроксигексил)гексозой.



Установление стереохимии кариофиллозы представляло сложную задачу, которая была решена с помощью спектроскопии ЯМР (включая регистрацию ЯЭО).

Вкратце суть этого сложного исследования сводилась к следующему. При кислотном метанолизе моносахарида было получено два изомерных метилгликозида кариофиллозы **73** и **74** и один внутренний гликозид **75**.



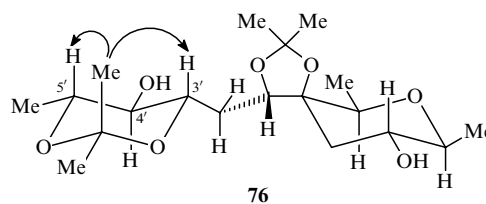
Гликозид **73**, образовавшийся при замыкании пиранозного кольца через гидроксильную группу, находящуюся у атома С(5), и выделенный в виде смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров, согласно данным спектроскопии ЯМР имел  $^4\text{C}_1$ -конформацию пиранозного цикла, причем его спектр ЯМР  $^1\text{H}$  указывал на отсутствие протонов у атома С(4), подтверждая тем самым место разветвления углеродной цепи, которое следовало из масс-спектра полиола **72**. Исследование ЯЭО показало, что в гликозиде **73** имеет место взаимодействие протонов  $\text{H}(5)$  и  $\text{H}(3a)$ , что указывало на аксиальное положение  $\text{H}(5)$ . Экваториальное положение алифатической цепи  $\text{C}(1')\text{--C}(6')$  следовало из пространственной близости протонов  $\text{H}(5)$  и  $\text{H}(1')$  боковой цепи. На основании этих данных

пиранозному циклу и, следовательно, фрагменту  $\text{C}(1)\text{--C}(6)$  кариофиллозы, была приписана *ксило*-конфигурация. Значительно сложнее было определить пространственное строение алифатического фрагмента кариофиллозы, что удалось сделать на основании комплексного анализа спектров ЯМР гликозидов **74** и **75** и некоторых других производных.

Гликозид **74**, изомерный гликозиду **73**, образовался при замыкании пиранозного кольца через гидроксильную группу, находящуюся у атома  $\text{C}(1')$  кариофиллозы (при этом стереоспецифически образуется лишь  $\beta$ -гликозид). Согласно данным спектра ЯМР  $^1\text{H}$  гликозид **74** находится в конформации  $^1\text{C}_4$ . Измерения ЯЭО для гликозида **74** и его *O*-ацетата указывают на то, что протон  $\text{H}(1')$  сближен с аксиальной метоксильной группой и, следовательно, сам занимает аксиальное положение. Из этого следует, что атом  $\text{C}(1')$  цепи  $\text{C}(1')\text{--C}(6')$  имеет (*S*)-конфигурацию.

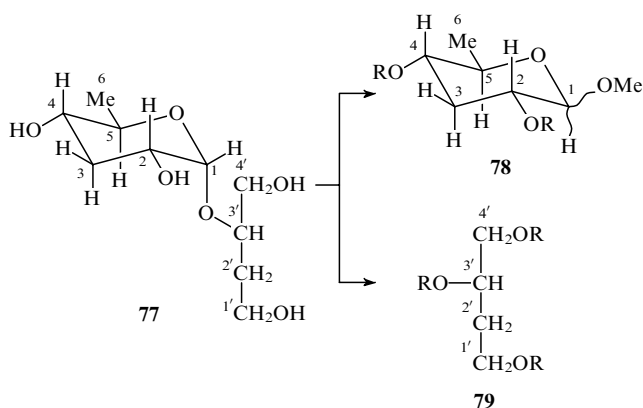
Гликозид **75**, выделенный при кислотном метанолизе кариофиллозы, образуется за счет внутримолекулярного гликозилирования, в котором принимает участие гидроксильная группа находящаяся у атома  $\text{C}(3')$ . В результате гликозилирования образуется бициклическая система, содержащая фуранозное кольцо.

Строение гликозида **75** было строго доказано: соединение имеет состав  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_7$  (по данным FAB-масс-спектра); его спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  полностью соответствует структуре **75**. В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  ацетата **75** сигнал протона, находящегося у атома  $\text{C}(3')$  (3.88 м.д.), не имел характерного сдвига, возникающего при наличии геминальной ацетоксильной группы, следовательно, атом  $\text{C}(3')$  связан ацетальной (т.е. гликозидной) связью, что подтверждало принятую структуру гликозида **75**. Конформация гликозида **75** установлена измерением величин ЯЭО протонов, связанных с атомами  $\text{C}(2)$  и  $\text{C}(3)$  и с  $\text{C}(1')$ ,  $\text{C}(2')$  и  $\text{C}(3')$  в самом гликозиде **75** и его *O*-ацетате, из которых, в частности, следует, что атом  $\text{C}(3')$  имеет (*S*)-конфигурацию. Для установления относительной конфигурации при атомах  $\text{C}(4')$  и  $\text{C}(5')$  кариофиллозы из гликозида **73** было получено его 4,1':3',5'-ди-*O*-изопропилиденовое производное **76**. Измерение ЯЭО протонов  $\text{H}(3')$  и  $\text{H}(5')$ , входящих в 3',5'-*O*-изопропилиденовую группировку, которая образует 1,3-диоксанный цикл, имеющий конформацию кресла, указывает на их *cis*-диаксиальную ориентацию и *trans*-диаксиальное расположение по отношению к протону  $\text{H}(4')$ . Из этого был сделан вывод о том, что атомы  $\text{C}(4')$  и  $\text{C}(5')$  имеют (*R*)-конфигурацию.

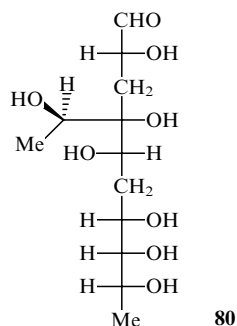


Абсолютная конфигурация фрагментов  $\text{C}(1)\text{--C}(6)$  и  $\text{C}(1')\text{--C}(6')$  кариофиллозы была установлена главным образом на основании измерения циркулярного дихроизма для каждого из этих фрагментов.<sup>88</sup> Методом метилирования было показано, что в цепи ПС соседние остатки кариофиллозы связаны гликозидными связями гидроксильной группы, находящейся у атома  $\text{C}(3')$ . Поэтому при окислении исходного ПС периодатом разрываются связи между атомами  $\text{C}(4')$  и  $\text{C}(5')$ , а также  $\text{C}(1')$  и  $\text{C}(4)$ , в результате чего после восстановления продукта окисления образуется соединение **77**, которое является гликозидом 3,6-дидезокси- $\alpha$ -рибо-гексозы (паратозы) и 1,4-дигидроксибутан-3-ола. Строение этого соединения было подтверждено спектрами ЯМР. При метанолизе гликозида **77** образуются  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозиды паратозы (**78**,  $\text{R} = \text{H}$ ) и 1,3,4-тригидроксибутан (**79**,  $\text{R} = \text{H}$ ). Для их *n*-бромбензоатов (**78** и **79**,  $\text{R} = p\text{-BrC}_6\text{H}_4\text{CO}$ ) был изучен циркулярный дихроизм по методу Наканиши.<sup>88</sup> Изме-

нение эффекта Коттона в зависимости от длины волны указывает на то, что атому C(2) в гликозиде **78** соответствует (*R*)-конфигурация, а атому C(3') в **79** — (*S*)-конфигурация.



Таким образом кариофиллозе, входящей в состав ПС, отвечает структура 3,6-дидезокси-4-*C*-(*D*-альтро-тетрагидроксигексил)-*D*-ксило-гексопиранозы **73**, которая является циклической формой высшего разветвленного сахара — 3,6,10-тридезокси-4-*C*-[(*R*)-1'-гидроксиэтил]-*D*-эритро-*D*-гулодекаозы **80**.



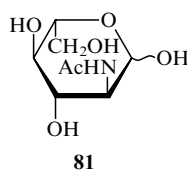
## 7. Аминосакхара

Моносахариды, содержащие аминогруппы, (аминосакхара) различной структуры очень широко распространены в бактериальных ПС. Среди них найдено значительное количество представителей, содержащих по несколько дезоксизвеньев и аминогрупп в различных сочетаниях, что в значительной мере разнообразит известные природные аminosакхара.

### а. Аминодидезоксигексозы

Производные 2-амино-2-дидезоксигексоз с *D*-глюко-, *D*-галакто- и *D*-манно-конфигурациями (глюкозамина, галактозамина и маннозамина) — одни из самых распространенных компонентов ПС микроорганизмов. Чаще всего они входят в состав полисахаридной цепи в виде *N*-ацетильных производных, хотя известны и *N*-ацильные производные, включающие остатки иных органических кислот (см. раздел IV.4).

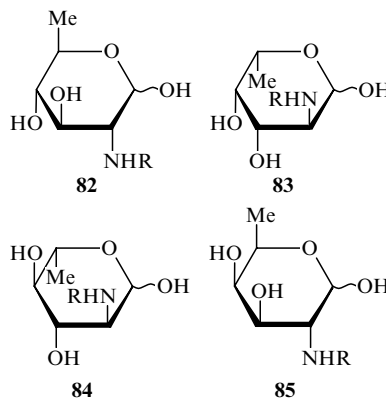
В то же время в *O*-антигенных ПС найден пока лишь один представитель 2-амино-2-дидезоксигексоз с *L*-конфигурацией — 2-ацетиламино-2-дидезокси-*L*-глюкоза **81**, которая была обнаружена в ПС *Pseudomonas cepacia* O1.<sup>89</sup>



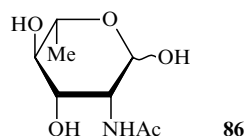
Моносахарид **81** давал качественные реакции на аminosакхара; масс-спектр приготовленного из него ацетата аминодидезоксиполиола был аналогичен хорошо известному производному, полученному из *D*-изомера; наблюдаемая фрагментация свидетельствовала о присутствии ацетиламиногруппы у атома C(2). Это подтверждалось также данными спектроскопии ЯМР <sup>13</sup>C: спектр полисахарида содержал сигнал атома C(2) при 54.23 м.д. Наконец, строение этого аminosакхара было доказано также исследованием дисахаридного фрагмента, полученного после распада ПС по Смитту. Необычная *L*-конфигурация моносахарида установлена на основании данных ГЖХ его гликозидов с оптически активным бутан-2-олом и октан-2-олом, по величине оптического вращения,<sup>80</sup> а также сравнением кривой циркулярного дихроизма полученного из него аминодидезоксиполиола с соответствующим *D*-изомером.

### б. Аминодидезоксигексозы

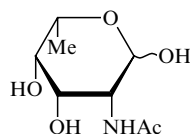
Производные 2-амино-2,6-дидезоксигексоз широко распространены в *O*-антигенных ПС. Два из них — 2-амино-2,6-дидезокси-*D*-глюкоза (*D*-хиновозамин, **82**) и 2-амино-2,6-дидезокси-*L*-галактоза (*L*-фукозамин, **83**) — являются обычными компонентами *O*-антигенных ПС.<sup>2</sup> Реже встречаются их энантиомеры — *L*-хиновозамин (**84**) и *D*-фукозамин (**85**). *L*-Хиновозамин был найден в ПС *Shigella boydii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* и др.<sup>2</sup>, а *D*-фукозамин — в *Pseudomonas fluorescens*, а также в некоторых видах *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>2</sup> Данные 2-амино-2,6-дидезоксигексозы входят в состав полисахаридных цепей в виде различных *N*-ацильных, чаще всего *N*-ацетильных производных. Они могут быть выделены из кислых гидролизатов ПС или после сольволиза ПС жидким HF в индивидуальном состоянии. В настоящее время присутствие этих моносахаридов идентифицируется непосредственно по спектрам ЯМР самих ПС.



Из более редких аminosакхарах этого типа в микробных ПС найдена также 2-ацетиламино-2,6-дидезокси-*L*-манноза (*L*-рамнозамин, **86**), которая обнаружена в *Escherichia coli* O3.<sup>90</sup> Моносахарид был выделен в индивидуальном состоянии после кислотного гидролиза. Его структура установлена классическими методами: при периодатном окислении был идентифицирован ацетальдегид — свидетельство присутствия метильной группы (6-дидезоксиэно), а на основании отличия поведения данного моносахарида при ионообменной хроматографии от поведения производных других 2-амино-2,6-дидезоксисахаров ему была приписана структура производного *L*-рамнозы.

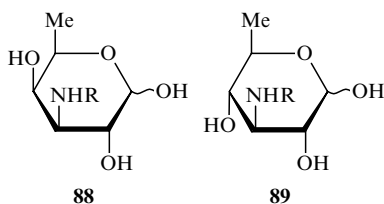


Интересно отметить, что другой, очень редкий моносахарид этого класса — 2-ацетиламино-2,6-дидезокси-L-галактоза (пневмозамин, **87**) — был уже давно найден в составе капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* тип 5; однако его структура не была строго доказана.<sup>91</sup>



87

Из других моноаминодидезоксигексоз в О-антигенных ПС встречаются производные 3-амино-3,6-дидезоксигексоз, которые входят в цепь ПС в виде N-ацильных производных (чаще всего, в виде ацетильных, но нередко в виде производных гидрокси- и аминокислот, см. раздел IV.4). Среди моносахаридов этого типа производные 3-амино-3,6-дидезокси-D-галактозы (3-амино-3-дезоксид-фукозы, **88**) являются достаточно обычными компонентами многих ПС.<sup>2</sup> Аналог 3-амино-3,6-дидезокси-D-галактозы — 3-амино-3,6-дидезокси-D-глюкоза (3-амино-3-дезоксид-хиновоза, **89**) — найдена в О-антигенных ПС нескольких видов грамотрицательных бактерий: в *Escherichia coli*,<sup>92</sup> *Hafnia alvei*,<sup>93</sup> *Proteus penneri*,<sup>94</sup> *Pseudomonas fluorescens*,<sup>33</sup> *Vibrio mimicus*.<sup>95</sup> Из О-антигенного ПС *Vibrio anguillarum* был выделен L-изомер — 3-амино-3,6-дидезокси-L-глюкоза.<sup>96</sup> Это единственный пример 3-амино-3,6-дидезоксигексоз с L-конфигурацией, найденных в О-антигенных ПС. Этот сахар был ранее обнаружен в составе кора ЛПС<sup>97</sup> *Aeromonas hydrophila* III.

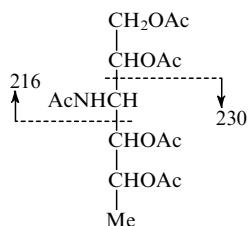


88

89

Производные этих аминоксидексоз, в том числе и глюкозы с L-конфигурацией, были выделены в индивидуальном состоянии из ПС после кислотного гидролиза или сольволиза жидким HF и переведены для упрощения исследования их строения в N-ацетаты, для чего они дезацелировались (удалялся N-ацильный заместитель) и далее N-ацелировались обычным способом. Строение полученных таким образом 3-ацетиламино-3,6-дидезоксигексоз было установлено физико-химическими методами и подтверждено встречным синтезом.

В качестве примера можно привести установление строения 3-ацетиламино-3,6-дидезокси-D-глюкозы.<sup>95,98</sup> Масс-спектр полного ацетата аминоксидеполиола **90**, полученного восстановлением аминоксидеполиола с последующим ацелированием, содержал фрагменты с  $m/Z$  230 и 216, что однозначно указывало на нахождение ацетиламиногруппы у атома С(3) и дезоксизвена ( $\text{CH}_3$ -группа) у атома С(6). Это доказывало, что исходный сахар имеет строение 3-ацетиламино-3,6-дидезоксигексозы.



90

Последнее подтверждалось также спектром ЯМР <sup>13</sup>C, содержащим сигналы в области 18 м.д. ( $\text{CH}_3$ -группа) и 55–58 м.д. (NHAc-заместитель у атома С(3)). В спектре ЯМР <sup>1</sup>H полного ацетата гликозида аминоксидеполиола КССВ  $J_{2,3}$ ,  $J_{3,4}$  и  $J_{4,5}$  превышали значение 10 Гц, что указывало на глюко-конфигурацию моносахарида. Наконец, величина оптического вращения ( $[\alpha]_D = +26^\circ$ ) свидетельствовала о его принадлежности к D-ряду.

Строение 3-ацетиламино-3,6-дидезокси-D-галактозы<sup>99</sup> было подтверждено масс-спектром ацетата соответствующего аминоксидеполиола, показавшего характерную фрагментацию. Спектр ЯМР <sup>13</sup>C этого соединения содержал сигналы при 17 и 52 м.д., а спектр ЯМР <sup>1</sup>H свидетельствовал о галакто-конфигурации (КССВ  $J_{2,3} = 10$ ,  $J_{3,4} = 4$ ,  $J_{4,5} = 1$  Гц); D-конфигурация устанавливалась сравнением с синтетическим образцом и следовала из величины оптического вращения. Интересно, что первоначально этому моносахариду была ошибочно приписана D-глюко-конфигурация,<sup>100</sup> что позже было исправлено.<sup>98</sup>

Строение единственного моносахарида этой группы с L-конфигурацией — 3-ацетиламино-3,6-дидезокси-L-глюкозы<sup>96,97</sup> — было установлено теми же методами, а его абсолютная конфигурация определена с помощью метода циркулярного дихроизма.

Известно несколько способов синтеза 3-амино-3,6-дидезоксиальдоз. Они были получены классическим методом Фишера–Баера — конденсацией диальдегидов, приготовленных окислением гликозидов 6-дезоксигексоз, с нитрометаном и последующим восстановлением нитрогруппы. В качестве примера можно привести синтез производного 3-ацетиламино-3,6-дидезокси-L-глюкозы (схема 10).<sup>101</sup>

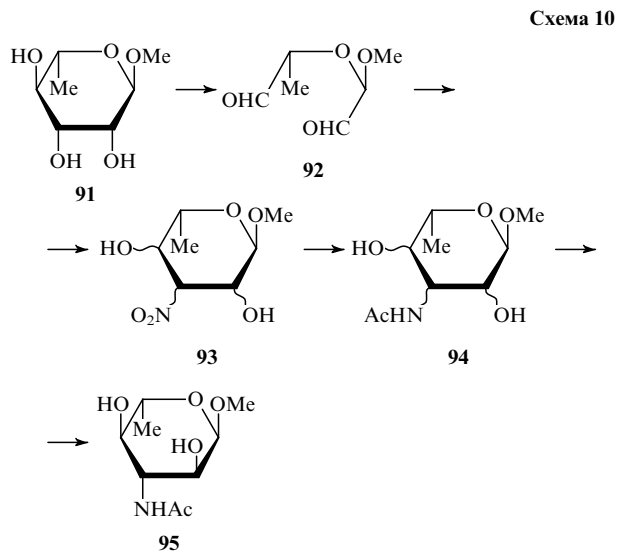


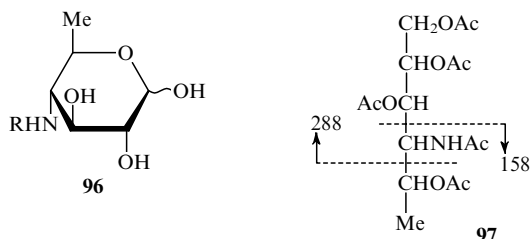
Схема 10

Метил- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (**91**) окисляли периодатом, образовавшийся диальдегид **92** подвергали конденсации с нитрометаном в присутствии метилата натрия. Образующиеся при этом изомерные 3-нитрогексозы **93** восстанавливали никелем Ренея, соответствующие аминоксидеполиола N-ацелировали, и из полученной смеси аминоксидеполиола хроматографией выделяли с выходом 26% метил-3-ацетиламино-3,6-дидезокси- $\alpha$ -L-глюкопиранозид (**95**). Другие аминоксидеполиола могут быть синтезированы обращением конфигурации у отдельных углеродных атомов известными методами (см., например, работу<sup>102</sup>).

Третьей группой аминоксидеполиола, представленных в О-антигенных ПС, являются производные 4-амино-4,6-дидезоксигексоз, хотя они, по-видимому, встречаются реже, чем их 3-аминоаналоги. К настоящему времени обнаружены три гексозы этого типа с D-глюко-, D-манно- и D-галакто-

конфигурациями. Аминогруппы в этих моносахаридах ацилированы (чаще ацетилированы).

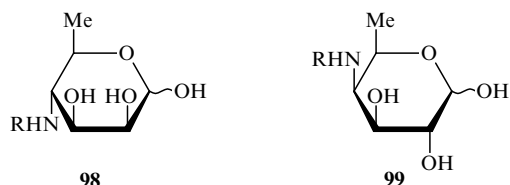
4-Амино-4,6-дидезокси-D-глюкоза (4-амино-4-дезоксид-хиновоза, виозамин, **96**) была впервые обнаружена в виде *N*-ацетильного производного в ПС *Escherichia coli* O7, где она входит в состав основной цепи.<sup>103</sup> В виде *N*-ацильного производного, несущего остаток *N*-ацетилглицина, она была также найдена в ПС *Shigella dysenteriae* 7,<sup>104,105</sup> а в виде *N*-формильного производного — в ПС *Francisella tularensis* 15 (возбудитель туляремии).<sup>106</sup> Недавно она была также обнаружена в ПС *Vibrio anguillarum*<sup>107</sup> и в О-антигенном ПС *Hafnia alvei* 1205, имеющем необычную полисахаридную цепь, подобную тейхоевым кислотам.<sup>108</sup>



Моносахарид **96** был выделен в виде *N*-ацилированного производного (кислота сложной структуры) после обработки ПС жидким HF и переведен далее для удобства исследования в *N*-ацетильное производное. Структура его исследовалась физико-химическими методами. В масс-спектре полученного из него полного ацетата аминоксептолиола **97** присутствовали фрагменты с *m/z* 288 и 158 и соответствующие им серии вторичных ионов, что свидетельствовало о присутствии дезоксизвена у атома С(6) и ацетиламиногруппы у атома С(4). Такое строение подтверждалось данными спектроскопии ЯМР <sup>13</sup>С (сигналы при 18.0 м.д. — CH<sub>3</sub>-группа и 58.2 м.д. — атом С(4)). Глюко-конфигурация моносахарида была установлена на основании данных спектра ЯМР <sup>1</sup>Н, а абсолютная конфигурация подтверждается величиной оптического вращения ( $[\alpha]_D = +17^\circ$ ), которая практически совпадает с величиной для синтетического образца (см. ниже).

В настоящее время идентификацию этого аминоксептолиола (также как и его изомеров) проводят почти исключительно по данным спектров ЯМР исходных ПС.

4-Амино-4,6-дидезокси-D-манноза (4-амино-4-дезоксид-рамноза, перозамин, **98**) была впервые обнаружена в виде *N*-ацильного производного 2-дезоксид-L-глицеро-тетроновой кислоты в составе О-антигенного ПС *Vibrio cholerae* O1 (возбудителя азиатской холеры), где она образует гомополисахарид.<sup>109</sup> Позднее она была обнаружена в виде *N*-формильного производного в составе гомополисахарида в О-антигенном ПС *Brucella melitensis* (возбудитель бруцеллеза).<sup>110</sup> В виде других *N*-ацильных производных она содержится в ПС нескольких видов *Salmonella*,<sup>111,112</sup> *Escherichia coli*,<sup>113,114</sup> *Yersinia*<sup>115</sup> и *Xanthomonas*.<sup>116</sup> 4-Амино-4,6-дидезоксигексозы очень неустойчивы в кислой среде и были выделены в виде *N*-ацильных производных только сольволизом ПС жидким HF.



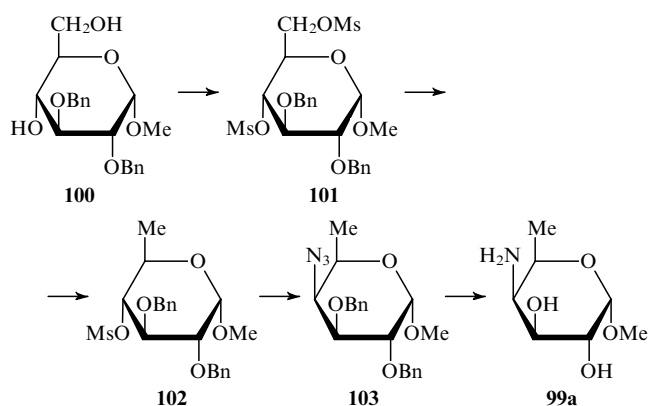
Моносахарид **98** был идентифицирован по масс-спектру ацетата соответствующего аминоксептолиола, который оказался идентичным таковому для полиола, полученного из глюко-аналога. Принадлежность этого моносахарида к манно-ряду была первоначально доказана результатами дезаминирования под действием азотистой кислоты предварительно дез-

ацелированного ПС: гидролиз дезаминированного ПС показал наличие D-рамнозы и 6-дезоксид-D-аллозы, которые могли образоваться только в том случае, если исходный моносахарид содержал NH<sub>2</sub>-группу у атома С(4) и имел манно-конфигурацию.<sup>109</sup> Позднее принадлежность моносахарида к манно-ряду была подтверждена данными спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>Н самого ПС (КССВ  $J_{2,3} = 4.5$ ,  $J_{3,4} = 10$ ,  $J_{4,5} = 10$  Гц). Абсолютная конфигурация моносахарида установлена превращением его в гликозид с (-)-бутан-2-олом.

4-Амино-4,6-дидезокси-D-галактоза (4-амино-4-дезоксид-D-фукоза, томозамин, **99**) встречается более редко и обнаружена пока только в О-антигенных ПС *Escherichia coli* O10<sup>117</sup> и *Pseudomonas fluorescens*.<sup>118</sup> В первом случае аминоксептолиола *N*-ацилирован остатком 3-гидроксимасляной кислоты и находится в боковом ответвлении основной цепи ПС, во втором — *N*-ацетилен. Аминосексептолиола был выделен после сольволиза ПС жидким HF, а его структура определена по данным спектра ЯМР <sup>1</sup>Н: на положение *N*-ацильной группы указывал низкочастотный сдвиг протона Н(4), а галакто-конфигурация вытекала из величин КССВ  $J_{2,3} > 10$ ,  $J_{3,4} \sim 4.5$ ,  $J_{4,5} \sim 1.8$  Гц.<sup>118</sup>

Синтез ряда 4-амино-4,6-дидезоксигексоз был выполнен с использованием хорошо известного в химии сахаров общего подхода — введением аминофункции в нейтральный моносахарид через соответствующий азид. В качестве примера можно привести синтез производных томозамина и виозамина<sup>119</sup> из глюкозы (схема 11).

Схема 11



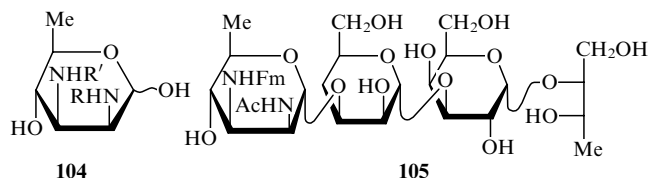
Метил-2,3-ди-*O*-бензил-α-D-глюкопиранозид (**100**) превращали в димезилат **101**, который после взаимодействия с KI, гидрирования соответствующего моноиодида и повторного мезилирования давал 4-*O*-мезилат 6-дезоксиглюкозида **102**. Реакция последнего с азидом натрия протекала с обращением конфигурации и привела к азиду **103**, гидрирование которого проходило с одновременным снятием бензильных групп и привело к гликозиду томозамина **99a**. Для получения глюко-аналога использовали двойную инверсию у атома С(4): мезилат **102** реакцией с бензоатом натрия переводили в производное галактозы, из которого после дебензоилирования, мезилирования, превращения в азид и его восстановления получали производное 4-амино-4,6-дидезоксиглюкозы (**96**, R = H) — виозамин.

## в. Диаминотридезоксигексозы

В составе ПС некоторых грамотрицательных бактерий были найдены представители аминоксептолиола необычного строения, которые относятся к 6-дезоксигексозам, содержащим две аминогруппы у атомов С(2) и С(3) или С(2) и С(4), и единственную гидроксильную группу. Диаминотридезоксигексозы отличаются высокой лабильностью к кислотам. Их практически не удается выделить в индивидуальном состоя-

нии, и строение этих моносахаридов устанавливали главным образом по данным спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии олигосахаридных фрагментов, изолированных после частичной деструкции соответствующего ПС.

Единственным представителем 2,3-диамино-2,3,6-тридезоксигексоз, обнаруженным в О-антигенных ПС, является производное 2,3-диамино-2,3,6-тридезоксид-маннозы (2,3-диамино-2,3-дидезокси-*D*-маннозы, **104**), содержащее *N*-формильный и *N*-ацетильный заместители у аминогрупп, находящихся соответственно у атомов С(3) и С(2).



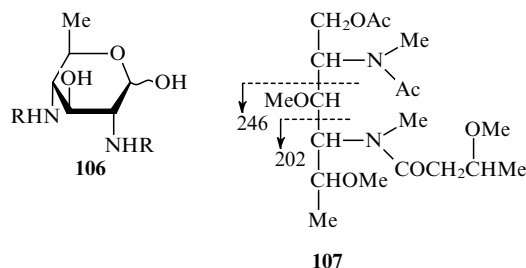
Этот моносахарид входит в состав ПС *Escherichia coli* O119, где он занимает место бокового заместителя в полисахаридной цепи и является иммунохимическим детерминантом.<sup>120</sup> Его строение было установлено на основании следующих данных. После двукратного периодатного окисления ПС и последующего распада по Смитту был выделен олигосахарид **105**, который содержал остаток диаминотридезоксигексозы. Это было подтверждено масс-спектрометрическим анализом ПС; в его ФАВ-масс-спектре был обнаружен фрагмент с  $m/z$  215, свидетельствующий о наличии остатка диаминотридезоксигексозы, несущего *N*-формильный и *N*-ацетильный заместители, а также соответствующие вторичные фрагменты, указывающие на нахождение формильного остатка у аминогруппы при атоме С(3). В сложных спектрах ЯМР тетрасахарида **105** удалось выделить сигналы, относящиеся к остатку диаминотридезоксигексозы. В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  сигналы атомов С(2) и С(3) (52.11 и 53.03 м.д.) свидетельствовали о наличии ациламиногрупп у этих атомов, сигналы в области 165 и 168 м.д. указывали на наличие формиламиногруппы, а сигнал при 176.36 — на наличие ациламиногруппы; сигнал в области 17.86 м.д. доказывал присутствие  $\text{CH}_3$ -группы у атома С(6). Использование методики ИНЕРТ в спектроскопии ЯМР позволило установить местоположение *N*-ацетильной (при атоме С(2)) и *N*-формильной (при атоме С(3)) групп.

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  величины КССВ ( $J_{2,3} = 4.0$ ,  $J_{3,4} = 10.3$ ,  $J_{4,5} = 9.5$  и  $J_{5,6} = 6.1$  Гц) указывали на *манно*-конфигурацию моносахарида.

Абсолютная конфигурация моносахарида **104** следовала из данных ЯЭО: при облучении атома Н(1) этого сахара наблюдался значительный эффект на атоме Н(2) соседнего в цепи олигосахарида **105** остатка маннозы. Это указывало на то, что оба моносахарида имеют одну и ту же абсолютную конфигурацию. Поскольку манноза имела *D*-конфигурацию, новому моносахариду также приписана *D*-конфигурация. Таким образом, новый сахар был идентифицирован как производное 2,3-диамино-2,3,6-тридезоксид-*D*-маннозы.

2,4-Диамино-2,4,6-тридезоксигексозы чаще встречаются в составе ПС. Так, производные 2,4-диамино-2,4,6-тридезоксид-*D*-галактозы (бациллозамина, **106**), впервые обнаруженные в ПС микробной стенки *Bacillus licheniformis*,<sup>121</sup> были затем найдены в О-антигенных ПС нескольких видов *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>122</sup> *Pseudomonas aurantiaca*,<sup>123</sup> *Vibrio cholerae* O3<sup>58,124</sup> и *Fusobacterium necroforum*.<sup>125</sup> Производное этого аminosахара с ацетилированной аминогруппой у атома С(2) и аминогруппой у атома С(4), ацилированной 3-гидроксимасляной кислотой, удалось выделить в индивидуальном состоянии из ПС *P. aeruginosa* O3 только после сольволиза жидким HF.<sup>122</sup> Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  моносахарида указывал на присутствие  $\text{CH}_3$ -группы у атома С(6) (18.3 м.д.) и амино-

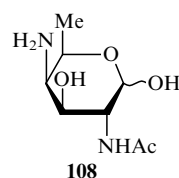
групп у атомов С(2) и С(4) (57.6 и 56.8 м.д.). Большие величины КССВ протонов в цикле ( $J_{2,3}$ ,  $J_{3,4}$  и  $J_{4,5} \approx 10$  Гц) однозначно свидетельствовали о *глюко*-конфигурации этого моносахарида. Абсолютная *D*-конфигурация следует из величины оптического вращения  $[\alpha]_D = +36^\circ$ . Все приведенные характеристические сигналы спектров ЯМР моносахарида **106** были также обнаружены в спектрах самого ПС и его отдельных фрагментов.



Для окончательного определения местоположения аминогрупп и локализации ацильных заместителей посредством стандартной деградации ПС был получен полиол **107** (сольволиз безводным HF, восстановление  $\text{NaBH}_4$  и метилирование, причем метилировались и NH-группы). В масс-спектре полиола **107** были зафиксированы фрагменты с  $m/z$  202 и 246, что подтверждало наличие *N*-ацетильной группы у атома С(2) и *N*-гидроксибутирильной группы у атома С(4).<sup>122</sup>

В последующих работах этот диаминосахар не выделяли, а его идентификацию проводили при помощи спектроскопии ЯМР исходного ПС. С помощью масс-спектрометрии полученных при деструкции фрагментов ПС удалось установить строение и локализовать *N*-ацильные группировки. Так, например, было выяснено, что бациллозамин, входящий в состав ПС *Vibrio cholerae* O3, ацетилирован по аминогруппе у атома С(2) и ацилирован остатком 3,5-дигидроксигексановой кислоты по аминогруппе у атома С(4) (см. раздел IV.4).<sup>58</sup>

Изомерный бациллозамину моносахарид с ацетилированной аминогруппой у атома С(2) — 2,4-диамино-2,4,6-тридезоксид-*D*-галактоза (**108**) — был найден в О-антигенном ПС *Shigella sonnei*.<sup>126</sup> Моносахарид **108** не удалось выделить в индивидуальном состоянии даже при сольволизе HF, и заключение о его строении было сделано на основании спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  полисахарида, который содержал сигналы, аналогичные наблюдаемым для его *глюко*-изомера — при 17.3 м.д. ( $\text{CH}_3$ -группа), 56.6 и 53.0 м.д. (атомы С(2) и С(4), замещенные аминогруппами). *D*-Конфигурация приписана моносахариду на основании результатов дезаминирования ПС и последующего гидролиза. Образование в качестве главного продукта 2-ацетиламино-2,6-дидезокси-*D*-глюкозы и (после восстановления) небольших количеств смеси 2-ацетиламино-2,4,6-тридезоксигексоз позволило заключить, что исследуемому моносахариду соответствует *D*-галакто-конфигурация.



Более однозначного доказательства конфигурации аminosахара не приводится. Присутствие в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  полисахарида (при pH 10) сигнала при 3.15 м.д. с малыми КССВ также говорит в пользу аксиального положения свободной аминогруппы у атома С(4) и, следовательно, о *галакто*-конфигурации моносахарида.



## 8. Гексуроновые кислоты

Очень многие О-антигенные ПС содержат в своем составе кислые моносахариды. Присутствие таких компонентов в ПС, локализованном на поверхности микробной клетки, придает оболочке микроорганизма специфические свойства. В ряде случаев это защищает клетку от внешних агрессивных воздействий и заменяет микробную капсулу, которая выполняет подобную защитную функцию в капсулированных бактериях. В то же время наличие кислых компонентов в О-антигенных полисахаридах существенно сказывается на характере соматического антигена, так как именно кислый моносахарид часто играет роль иммунодоминантного звена.

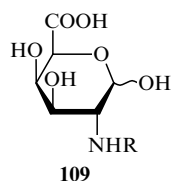
Наиболее часто кислыми моносахаридами, входящими в полисахаридную цепь О-антигенных ПС, являются гексуроновые кислоты. Две из них, D-глюкуроновая и D-галактуроновая кислоты, очень широко распространены в природе и являются также обычными компонентами микробных ПС грамотрицательных бактерий, относящихся к самым различным видам. Их идентификация достаточно хорошо разработана и стандартизована, а химия довольно подробно изучена. Встречаются также уроновые кислоты, несущие одну или две аминогруппы.

### а. 2-Амино-2-дезоксигексуроновые кислоты

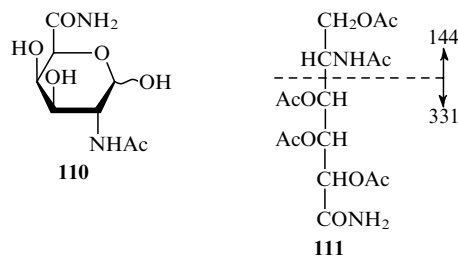
В О-антигенных ПС были обнаружены представители 2-амино-2-дезоксигексуроновых кислот с D-галакто-, D-манно-, L-галакто-, L-гуло- и L-альтро-конфигурацией. Для выделения и установления строения аминуроновых кислот на разных этапах изучения микробных ПС использовались различные приемы в зависимости от уровня развития физико-химических методов в момент проведения конкретного исследования. В последнее время для установления строения аминуроновых кислот используется главным образом спектроскопия ЯМР полисахаридов и их фрагментов, а также масс-спектрометрия полученных при их восстановлении полиолов. Из химических методов очень часто применяется восстановление карбоксильной группы уроновой кислоты, приводящее к соответствующей легко идентифицируемой 2-ацетиламино-2-дезоксигексозе. Это позволяет прямо делать заключение о структуре исходной аминуроновой кислоты, в том числе и об ее абсолютной конфигурации.

2-Амино-2-дезоксид-галактуроновая кислота (**109**) в виде своих производных встречается в О-антигенных ПС чаще других. Она найдена в ПС *Shigella dysenteriae* 7,<sup>105</sup> *Salmonella arizonae*,<sup>127</sup> *Vibrio anguillarum*,<sup>107</sup> нескольких серотипов *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>128–130</sup> а также в составе некоторых капсульных ПС. Гомополисахарид, состоящий из звеньев этой аминуроновой кислоты, давно известен как Vi-антиген грамотрицательных бактерий.<sup>131</sup> Аминогруппа этой кислоты, также как и других аминуроновых кислот, обычно ацилирована (чаще всего ацелилирована), а карбоксильная группа свободна. В ПС некоторых бактерий карбоксильная группа присутствует в виде амида, причем известны случаи, когда в одном и том же ПС в различных соотношениях находятся и свободная кислота, и ее амид. 2-Ацетиламино-2-дезоксид-галактуроновая кислота и ее амид, так же как и другие аминуроновые кислоты, могут быть выделены в индивидуальном состоянии с использованием различных методов деструкции ПС — сольволиза жидким HF, кислотного гидролиза, метанолиза и т.п.<sup>127,128</sup> Для отделения амида N-ацетиламиногалактуроновой кислоты от свободной кислоты и выделения его в индивидуальном состоянии был использован следующий прием: ПС предварительно восстанавливали NaBH<sub>4</sub> в присутствии водорастворимого карбодимида (при этом остаток уроновой кислоты превращался в 2-ацетиламино-2-дезоксигалактозу, а остаток ее

амида не восстанавливался) и подвергли сольволизу жидким HF.

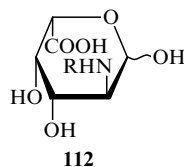


Для определения строения производных аминогалактуроновой кислоты их переводили в ацетаты соответствующих полиолов, а амиды галактуроновой кислоты — в ацетаты амидов альдоновых кислот. После этого определяли их структуру масс-спектрометрически. Существенно, что при этом удавалось сохранить неизменными остатки N-ацильных группировок и определить их строение. Так, например, наличие в масс-спектре ацетата амида 5-ацетиламино-5-дезоксигалактоновой кислоты **111** (полученного восстановлением и ацелированием амида 2-ацетиламино-2-дезоксигалактуроновой кислоты **110**) фрагментов с *m/z* 331 и 144 указывает на наличие N-ацетиламиногруппы в амиде **110** и на ее положение.



Строение 2-амино-2-дезоксигалактуроновой кислоты можно определить по данным спектроскопии ЯМР. Так, спектр ЯМР <sup>13</sup>C содержит сигнал карбоксильной группы в области 173–176 м.д. и сигнал атома C(2), замещенного аминогруппой, в области 49–51 м.д. Отнесение кислоты к галакто-ряду сделано на основании спектра ЯМР <sup>1</sup>H: для протонов цикла наблюдаются КССВ  $J_{2,3} = 11$ ,  $J_{3,4} = 3$  и  $J_{4,5} = 1.5$  Гц. Величина оптического вращения ( $[\alpha]_D = +17.9^\circ$ ) подтверждает абсолютную конфигурацию моносахарида.

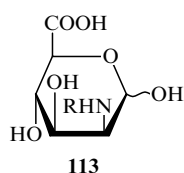
В полисахаридах некоторых других серотипов *Pseudomonas aeruginosa* был обнаружен L-изомер кислоты **109** — 2-ацетиламино-2-дезоксид-L-галактуроновая кислота **112**,<sup>122,132</sup> которая входит, так же как и ее D-изомер, в основную цепь ПС. На присутствие в ПС уроновой кислоты указывали спектральные данные: в ИК-спектре присутствовала полоса поглощения в области 1740 см<sup>-1</sup>, а в спектре ЯМР <sup>13</sup>C — сигнал в области 175 м.д., принадлежащие карбоксильной группе.



При восстановлении ПС по карбоксильным группам и последующем гидролизе была выделена и идентифицирована 2-ацетиламино-2-дезоксид-L-галактоза (N-ацетил-L-галактозамин), что полностью доказывает строение моносахарида **112**, включая и его абсолютную конфигурацию.

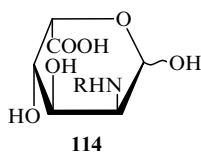
Производное 2-амино-2-дезоксид-маннуроновой кислоты **113** найдено в составе О-антигенного ПС *Vibrio cholerae* O5.<sup>124</sup> Кислота **113** не была выделена в индивидуальном состоянии, и строение ее устанавливалось бездеструктивным методом на основании детального анализа спектров

ЯМР самого ПС. Так, спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  остатка аминорнон-урановой кислоты содержал сигнал карбоксильной группы при 160–170 м.д., кроме того, на наличие карбоксильной группы урановой кислоты указывало отсутствие сигналов протонов Н(6) в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  в сочетании с характерной зависимостью химического сдвига протона Н(5) от величины рН. Для подтверждения строения кислоты **113** полисахарид восстанавливали  $\text{NaBD}_4$  и гидролизывали. В качестве одного из продуктов гидролиза было выделено производное 6- $^{[2}\text{H}_2]$ -маннозамина, идентифицированное масс-спектрометрически в виде ацетата соответствующего полиола. манно-Конфигурация кислоты подтверждена данными спектроскопии ЯМР исходного ПС. Абсолютная конфигурация принята на основании изучения эффектов гликозилирования и сопоставления их с характером замещения в соседнем звене полисахаридной цепи при анализе спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$ .

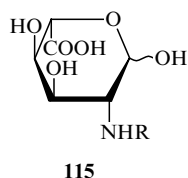


Производные двух других 2-амино-2-дезоксигурановых кислот — 2-ацетиламино-2-дезоксигурановая и 2-ацетиламино-2-дезоксигурановая кислоты — встречаются в природе очень редко и найдены пока только в О-антигенных ПС.

2-Ацетиламино-2-дезоксигурановая кислота (**114**) найдена в ПС *Alteromonas macleodi* 2ММ.<sup>133</sup> Ее строение установлено бездеструктивным методом. В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  полисахарида на остаток аминорнон-урановой кислоты указывают сигналы карбоксильной группы (177.7 м.д.) и атома С(2), замещенного аминорнон-урановой группой (52.4 м.д.), что подтверждается также слабопольным сдвигом сигнала Н(2) в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  (4.38 м.д.). гуло-Конфигурация кислоты следует из спектра ЯМР  $^1\text{H}$  полисахарида, в котором КССВ кольцевых протонов типичны для гуло-ряда ( $J_{2,3} = 9$ ,  $J_{3,4} = 4.0$ ,  $J_{4,5} = 2$  Гц). Абсолютная L-конфигурация кислоты принята на основании изучения ЯЭО полисахаридов и построения молекулярных моделей.



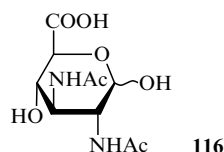
2-Ацетиламино-2-дезоксигурановая кислота (**115**) обнаружена в ПС *Shigella sonnei*, фаза I.<sup>126, 134</sup> Она была выделена в индивидуальном состоянии в результате кислотного метанолиза ПС с последующим N-ацетилированием. При ее восстановлении  $\text{NaBH}_4$  была получена 2-ацетиламино-2-дезоксигураноза, идентифицированная сравнением с заведомым образцом по величине оптического вращения.<sup>134</sup> Позднее<sup>126</sup> был зарегистрирован спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  кислоты **115**, содержащий, в частности, сигналы при 175.6 м.д. (COOH) и 56.8 м.д. (атом С(2)). L-Конфигурация кислоты подтверждена тем, что полученная при ее восстановлении 2-ацетиламино-2-дезоксигураноза при окислении нингидрином дает L-рибозу.<sup>126</sup>



## 6. 2,3-Диамино-2,3-дидезоксигурановые кислоты

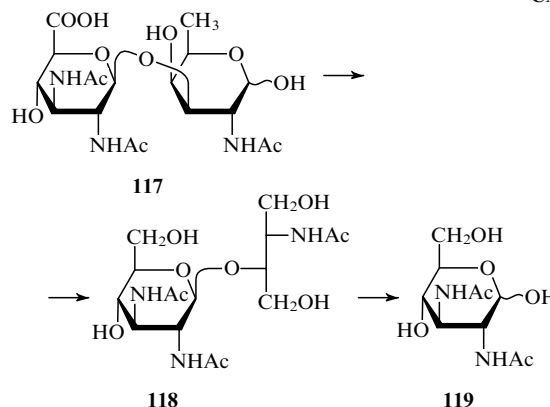
Эти уникальные по структуре моносахариды кислого характера встречаются очень редко и пока обнаружены только в составе О-антигенных ПС нескольких штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, и один представитель найден в ПС *Bordetella*. Они очень неустойчивы в кислой среде, не все из них удалось выделить в индивидуальном состоянии, а при установлении их строения возникли серьезные затруднения, которые удалось преодолеть посредством изучения структуры олигосахаридных фрагментов, полученных при частичной деградации ПС, в сочетании с тщательным анализом спектров ЯМР самих ПС.

В настоящее время известны производные 2,3-диамино-2,3-дидезоксигурановых кислот с D-гуло-, D-манно-, D-галакто- и L-гуло-конфигурациями.

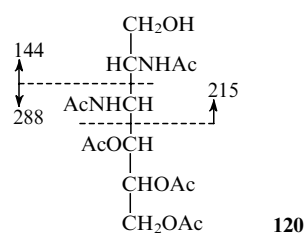


2,3-Диацетиламино-2,3-дидезоксигурановая кислота (**116**) была обнаружена в ПС *P. aeruginosa* О6.<sup>135, 136</sup> На примере этой кислоты была отработана схема изучения структуры этих необычных моносахаридов (схема 12). Наличие в ПС свободной карбоксильной группы подтверждалось присутствием в ИК-спектре полосы в области  $1740\text{ см}^{-1}$ .

Схема 12

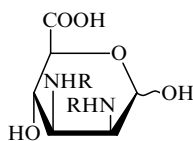


Сольволизом ПС жидким HF при комнатной температуре удалось получить дисахарид **117**, содержащий урановую кислоту. Последовательное восстановление дисахарид  $\text{NaBH}_4$ , окисление  $\text{HIO}_4$ , повторное восстановление  $\text{NaBH}_4$ , и восстановление карбоксильной группы привело к соединению **118**. Жесткий гидролиз **118** с последующим N-ацетилированием дал 2,3-диацетиламино-2,3-дидезоксигуранозу (**119**). Структура кислоты **119** установлена по данным масс-спектрометрии соответствующего ацетата полиола **120**, в который она была превращена. Масс-спектр соединения **120** содержал фрагменты с  $m/Z$  288, 215 и 144; такая фрагментация, типичная для ацетатов 2,3-диацетиламино-2,3-дидезоксигуранозитов, была ранее отмечена у синтетических образцов.<sup>137</sup>



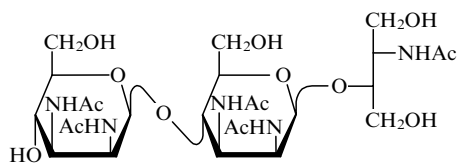
В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  дисахарида **117** содержались сигналы, относящиеся к карбоксильной группе (176 м.д.), и сигналы атомов С(2) и С(3), замещенных аминогруппой (54.9 и 56 м.д.). Большие величины КССВ кольцевых протонов в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  моносахарида **116** ( $J_{2,3} = 11.5$ ,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$  Гц) указывали на его *глюко*-конфигурацию. Кислота **116** была отнесена к D-ряду на основании прямого сравнения полученной из нее при восстановлении диацетилдиаминогексозы **119** с синтетическим образцом 2,3-диацетилдиамино-2,3-дидезокси-D-глюкозы.<sup>138</sup>

Производные 2,3-диамино-2,3-дидезокси-D-маннуроновой кислоты **121** были найдены в ПС нескольких серотипов *Pseudomonas aeruginosa*, где они входят в состав основной цепи в виде одного или двух остатков.<sup>139, 140</sup> Аминогруппы кислоты оказались замещены ацетильной и ацетимидоильной (ацетамидинной) группировками. Следует отметить, что последняя является уникальной для углеводных производных. Она была впервые найдена в O-антигенных ПС. Присутствие ацетимидоильной группировки вызвало затруднение при установлении строения производных диаминоманнуроновой кислоты и первоначально привело даже к ошибочному заключению о присутствии в ПС моносахарида, содержащего конденсированную пирано-имидазольную систему.<sup>139, 140</sup> Позднее эта ошибка была исправлена.<sup>141</sup> По этой причине для упрощения структурного анализа полисахарид или полученные из него фрагменты предварительно обрабатывали триэтиламино, чтобы превратить ацетимидоильную группировку в более «стандартную» ацетильную.



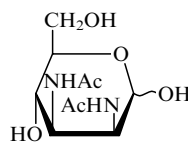
121

Строение кислоты **121** устанавливалось по схеме, описанной выше для *глюко*-аналога. На присутствие карбоксильной группы указывала полоса в области  $1725\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре ПС. Последовательным сольволизом ПС жидким HF, восстановлением  $\text{NaBH}_4$ , окислением  $\text{HNO}_4$ , повторным восстановлением  $\text{NaBH}_4$ , обработкой триэтиламино (превращение *N*-ацетимидоильной группы в *N*-ацетильную) и восстановлением карбоксильных групп было получено производное трисахарида **122**.



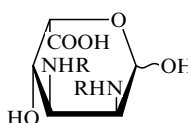
122

Продуктом его жесткого гидролиза и *N*-ацетилирования явилась 2,3-диацетиламино-2,3-дидезокси-D-манноза (**123**), структура которой была подтверждена масс-спектрометрией ацетата соответствующего диацетиламинополиола. Фрагментация последнего идет по тому же пути, что и фрагментация полиола, полученного из *глюко*-аналога. Параметры спектров ЯМР остатка диаминоуроновой кислоты, присутствующего в ацетате трисахарида **122**, подтверждали ее строение: спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  содержал сигналы атомов С(2) и С(3), несущих NH-группы, при 52.3 и 52.5 м.д., а КССВ кольцевых протонов в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  соответствовали *манно*-ряду ( $J_{2,3} = 3.9$ ,  $J_{3,4} \approx J_{4,5} = 9.8$  Гц). Наконец, абсолютная конфигурация полученной из ПС диацетиламинодидезоксигексозы была подтверждена прямым сравнением с синтетическим образцом 2,3-диацетилдиамино-2,3-дидезокси-D-маннозы.<sup>143</sup>



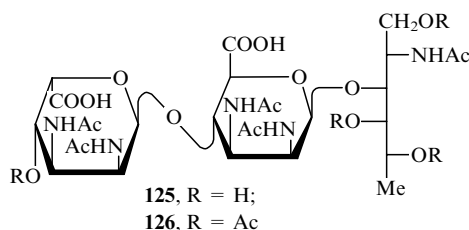
123

Третий изомер диаминоуроновых кислот этого ряда — производное 2,3-диацетиламино-2,3-дидезокси-L-гулурановой кислоты (**124**), содержащее *N*-ацетимидоильную группу, — было обнаружено в составе ПС нескольких подтипов *Pseudomonas aeruginosa* O3<sup>140, 143</sup> и *Pseudomonas aeruginosa* иммунотип 7.<sup>143, 144</sup> В некоторых из этих ПС присутствовал также и остаток 2,3-диамино-2,3-дидезокси-маннуроновой кислоты, что вызывало определенные трудности при установлении строения *гуло*-изомера, так как сильно затрудняло расшифровку спектров ЯМР фрагментов, содержащих обе изомерные диаминоуроновые кислоты.



124

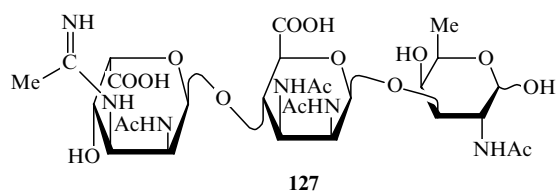
Строение 2,3-диацетиламино-2,3-дидезокси-L-гулурановой кислоты, входящей в состав ПС *Pseudomonas aeruginosa* O3, устанавливали по той же схеме, что и строение ее *глюко*- и *манно*-аналогов. После обнаружения в ИК- и ЯМР-спектрах ПС сигналов карбоксильных групп полисахарид подвергали сольволизу жидким HF с дальнейшей обработкой по схеме, описанной выше. В результате было получено производное трисахарида **125**, содержащее остатки диаминоуроновых кислот с *манно*- и *гуло*-конфигурацией, что было подтверждено при помощи спектроскопии ЯМР.



125, R = H;

126, R = Ac

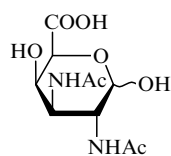
К сожалению, не только производное самой диаминогулурановой кислоты, но и продукт ее восстановления — 2,3-диацетиламино-2,3-дидезокси-L-гулоза — оказались весьма неустойчивыми в кислой среде. Последнюю также не удалось выделить и идентифицировать. По этой причине строение и конфигурацию диаминогулурановой кислоты устанавливали, анализируя сложные спектры ЯМР трисахаридного производного **125** и его ацетата **126** (состав их был подтвержден масс-спектром) с использованием специальных вариантов спектроскопии ЯМР. Было найдено, что наряду с карбоксильной группой в новом моносахариде содержатся две ацетиламиногруппы при атомах С(2) и С(3), и он имеет *гуло*-конфигурацию, на что указывают величины КССВ кольцевых протонов в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  ( $J_{2,3} = 4.5$ ,  $J_{3,4} = 3.0$  и  $J_{4,5} = 3.0$  Гц). Эта конфигурация была окончательно подтверждена сопоставлением сигналов углеродных атомов, относящихся к остатку кислоты **124**, в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  производного **125** со спектральными характеристиками синтетических образцов всех изомерных 2,3-диацетиламино-2,3-дидезоксигексоз.<sup>145</sup> Такая же конфигурация была найдена у олигосахарида **127** — одного из промежуточных продуктов, полученных при избирательной деструкции ПС из *Pseudomonas aeruginosa* иммунотип 7, — при анализе ЯМР-спектров.<sup>144</sup>



127

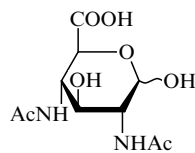
Абсолютная L-конфигурация диаминогулурановой кислоты следовала из величины оптического вращения олигосахарида **125**. Окончательно она была подтверждена анализом спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  трисахарида **127** при рассмотрении зависимости эффектов гликозилирования от абсолютной конфигурации соседних моносахаридных звеньев. Отрицательный  $\beta$ -эффект гликозилирования (0.9 м.д.), возникший на атоме С(3) диаминоманнурановой кислоты (для которой уже была установлена D-конфигурация), связанной с остатком диаминогулурановой кислоты в **127**  $\alpha$ -гликозидной связью в положении С(4), однозначно указывал на L-конфигурацию 2,3-диацетиламино-2,3-дидезоксигулурановой кислоты.

Недавно был найден четвертый изомер диаминодидезоксигексуроновокислот — 2,3-диацетиламино-2,3-дидезокси-D-галактуроновокислота (**128**). Эта кислота входит в состав O-антигенного ПС грамотрицательных бактерий *Bordetella bronchiseptica* и *Bordetella parapertussis*.<sup>146</sup> В обоих случаях ПС является гомополисахаридом, состоящим из звеньев диаминогалактуроновокислоты, причем иммунохимическое различие антигенов в данном случае связано лишь с вариациями в структуре кора соответствующих ЛПС. Строение нового моносахарида было установлено без особых затруднений бездеструктивным методом при помощи спектроскопии ЯМР. Наличие сигналов карбоксильной группы (175 м.д.) и атомов С(2) и С(3), содержащих аминогруппы (46.6 и 49.1 м.д.), в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  и величины КССВ кольцевых протонов в спектре ЯМР  $^1\text{H}$ , типичные для галакто-ряда ( $J_{2,3} = 10.8$ ,  $J_{3,4} = 3.0$  и  $J_{4,5} = 3.0$  Гц), полностью доказывали структуру 2,3-диацетиламино-2,3-дидезоксигалактуроновокислоты. Абсолютная D-конфигурация следовала из величины оптического вращения ПС.



128

Недавно был найден первый представитель 2,4-диамино-2,4-дидезоксиуроновокислот. 2,4-Диацетиламино-2,4-дидезокси-D-глюкуроновокислота (**129**) была обнаружена в составе O-специфического ПС *Thiobacillus* IFO 14570.<sup>147</sup> Строение этого ПС было установлено бездеструктивным методом путем комплексного анализа ПС с помощью нескольких вариантов спектроскопии ЯМР, основанных на изучении ЯЭО. Эта работа представляет блестящий образец современного структурного анализа сложного по структуре ПС с помощью только спектроскопии ЯМР. Сигналы остатка диаминоглюкуроновокислоты, идентифицированные в двумерном спектре гетероядерного  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ -резонанса, доказывали строение скелета молекулы: в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  обнаружен сигнал при 173.0 м.д. (COOH-группа у атома С(6)) и сигналы при 55.3 и 56.5 м.д. (атомы углерода С(2) и С(4), содержащие заместители NHAc); большие величины КССВ кольцевых протонов в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  (9–10 Гц) свидетельствовали о *глоко*-конфигурации кислоты **129**, а данные, полученные при измерении ЯЭО, — о D-конфигурации кислоты.



129

К сказанному о гексуроновокислотах следует добавить, что эти моносахариды входят в состав ПС иногда в виде амидов. Это обстоятельство может оказать существенное влияние на иммунохимическую специфичность всего биополимера, поскольку амиды, в отличие от родоначальной кислоты, нейтральны и их присутствие изменяет распределение заряженных группировок вдоль полисахаридной цепи. В связи с этим идентификация амида уроновокислоты и его локализация в цепи является неотъемлемой частью структурного анализа O-антигенных ПС.

В настоящее время в составе ПС обнаружены как незамещенные гликуронамиды, так и более сложные соединения этого ряда, в которых карбоксильная группа амидируется, например, аминокислотой (см. раздел IV.5).

Незамещенные амиды уроновокислот были найдены в полисахаридах различных классов. Впервые они были обнаружены в ПС нескольких серотипов *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>128</sup> где было доказано присутствие 2-ацетиламино-2-дезокси-D-галактуроноамида. Позднее тот же гексуроноамид был обнаружен в составе ПС *Shigella dysenteriae* 7<sup>105</sup> и ПС *Vibrio anguillarum*.<sup>107</sup>

Так как идентификация незамещенных гексуроновокислот проводится теперь бездеструктивным методом по их спектрам ЯМР, а спектры кислоты и ее амида мало различаются, то присутствие амидной группировки определяется обычно по зависимости положения сигнала Н(5) в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  от pH раствора: для амида химический сдвиг сигнала не зависит от pH, а для кислоты (из-за влияния соседнего карбоксила) сигнал сдвигается в слабое поле при росте кислотности.<sup>148</sup> Так, например, удалось определить наличие в цепи ПС *Shigella dysenteriae* 7 двух соседних звеньев — 2-ацетиламино-2-дезокси-D-галактуроновокислоты и ее амида: сигнал атома Н(5) кислотного звена сдвигается от 4.40 к 4.63 м.д. при изменении pH от 9 до 1, тогда как химический сдвиг сигнала амида остается прежним.

В заключение нужно отметить, что амидирование звеньев гексуроновокислоты в цепи ПС может быть и нестехиометрическим. В этом случае в одном и том же ПС встречаются как свободная кислота, так и ее амид, при этом количественное соотношение таких звеньев различается для ПС родственных серотипов или подтипов. Это явление было исследовано для ПС нескольких подтипов *Pseudomonas aeruginosa* O4, где имелись звенья как 2-дезокси-2-формиламино-D-галактуроновокислоты, так и ее амида. Используя для разделения трисахаридных фрагментов, полученных из ПС после сольволиза жидким HF, анионообменную хроматографию и хроматографию на обращенной фазе и изучая зависимость спектров ЯМР  $^1\text{H}$  от pH, удалось показать, что степень амидирования указанной уроновокислоты в подгруппах O4a,4b, O4a,4d и O4a,4c составляет соответственно 10, 20 и 0%.<sup>148</sup> Производные более сложных амидов уроновокислот, содержащих «неуглеводные заместители», будут рассмотрены в разделе IV.5.

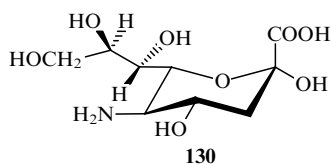
## 9. Гликулозоновокислоты

Гликулозоновокислоты представляют собой  $\alpha$ -кетокислоты углеводного ряда. Этот своеобразный по строению класс кислых моносахаридов встречается в разных ПС микробного происхождения, однако главным источником гликулозоновокислот являются экстрацеллюлярные и капсульные ПС. Природные гликулозоновокислоты могут

содержать в цепи от 5 до 9 углеродных атомов; некоторые их представители включают дезоксиивены и аминогруппы.

Наиболее распространенный в микробном мире представитель гликулозновых кислот — 3-дезоксид-*D*-манно-октулозновая кислота (KDO) — является обязательным компонентом внутренней части кора всех грамотрицательных бактерий.<sup>149</sup> Эта кислота, а также некоторые гексулозновые кислоты обнаружены в составе капсульных ПС *Klebsiella* и некоторых других бактерий (см. обзор<sup>6</sup>).

В настоящем обзоре мы ограничимся только рассмотрением нескольких представителей этого класса кислых моносахаридов, найденных в составе О-антигенных ПС грамотрицательных бактерий. Из них наиболее часто в природе встречается 5-амино-3,5-дидезокси-*D*-глицеро-*D*-галакто-нонулозновая кислота (**130**), известная больше как нейраминная кислота. Производные этой кислоты, объединенные под общим названием сиаловых кислот, особенно широко распространены в углеводсодержащих биополимерах животных тканей, где они входят в состав углеводных цепей гликопротеинов и гликолипидов и играют определяющую роль в специфических биологических свойствах и превращениях этих биополимеров.<sup>150</sup>

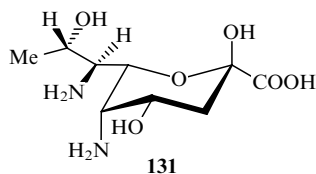


Остаток нейраминной кислоты, как и других гликулозновых кислот, входит в состав цепи ПС в пиранозной форме **130** и содержит дезоксиивено рядом с аномерным центром. Производные нейраминной кислоты отличаются высокой кислотоллабильностью и разрушаются при гидролизе углеводсодержащего биополимера. Видимо, по этой причине производные нейраминной кислоты были идентифицированы в составе О-антигенных ПС лишь относительно недавно.

К настоящему времени *N*-ацетильные производные нейраминной кислоты обнаружены в О-антигенных ПС нескольких бактерий: *Salmonella arizonae*,<sup>151, 152</sup> *Citrobacter freundii*,<sup>152</sup> *Escherichia coli*,<sup>152–156</sup> *Hafnia alvei*,<sup>152, 157</sup> и *Vibrio cholerae*.<sup>158</sup> Они входят также в состав ряда экстрацеллюлярных ПС. Один из таких полисахаридов — давно известная коламинная кислота — является гомополисахаридом, состоящим из звеньев *N*-ацетилнейраминной кислоты.<sup>159</sup>

Благодаря широкому распространению производных нейраминной кислоты в гликопротеинах и гликолипидах их химические свойства и спектроскопические характеристики детально изучены и подробно рассмотрены в обзорах<sup>150, 160</sup>. В связи с этим идентификация остатка нейраминной кислоты (или ее производных) в О-антигенных ПС в настоящее время достигается бездеструктивным методом посредством анализа самого ПС или его олигосахаридных фрагментов при помощи спектроскопии ЯМР.

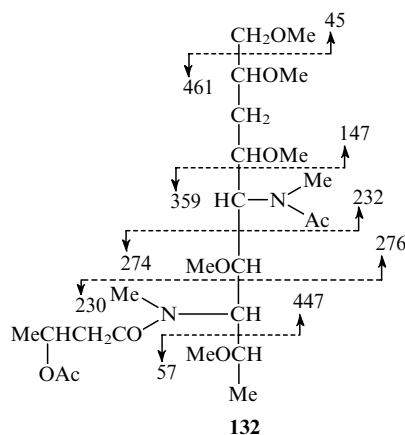
Недавно в составе О-антигенных ПС были найдены еще два уникальных по строению представителями аминокислотных дезоксиивено кислот. Производные одной из них — 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-*L*-глицеро-*L*-манно-нонулозновой кислоты (псевдаминной кислоты, **131**) — были обнаружены в ПС нескольких серотипов *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>161–163</sup> *Shigella boydii*<sup>161, 162, 164</sup> и *Vibrio cholerae* O2.<sup>165</sup>



В моносахаридах указанных ПС (кроме ПС *V. cholerae*) аминогруппа, находящаяся у атома С(5), ацелирована, а аминогруппа у атома С(7) несет формильную группу или остаток 3-гидроксимасляной кислоты. В случае ПС *V. cholerae* моносахарид содержит ацелированную аминогруппу у атома С(7) и ацетимидоильную группировку у аминогруппы при С(5).

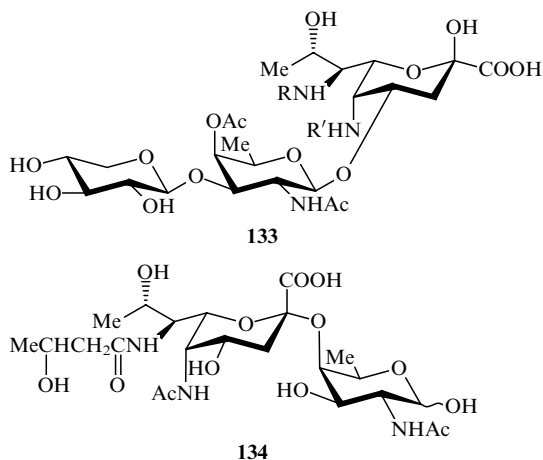
Первоначально присутствие в указанных ПС остатка псевдаминной кислоты было обнаружено качественной реакцией на *N*-ацетилнейраминную кислоту с резорциновым реагентом.<sup>166</sup> Кроме того в спектрах ЯМР <sup>13</sup>С фрагментов, полученных при кислотном гидролизе ПС, присутствовали характерные для 3-деоксиальдулозновой кислоты сигналы.

Ввиду высокой кислотоллабильности производных псевдаминной кислоты установление их строения представляло значительные трудности. Основные приемы,<sup>161, 162, 164</sup> используемые для установления полного строения, вкратце сводятся к следующему. Сначала восстанавливают карбоксильные группы ПС, выделенных из *S. boydii* 7 и *P. aeruginosa* O10, а затем подвергают их гидролизу. При этом происходит разрыв гликозидных связей остатков восстановленной псевдаминной кислоты, однако сами моносахаридные остатки, уже не содержащие карбоксильной группы, не подвергаются деструкции. Затем продукты гидролиза обрабатывают NaBH<sub>4</sub>. После метилирования гидроксильных групп олигосахарид подвергают сольволизу жидким HF. Смесь образовавшихся при этом частично метилированных моносахаридов (в которых *N*-ацелированные аминогруппы также подвергались *N*-метилированию) восстанавливают NaBH<sub>4</sub> и ацелируют. Хромато-масс-спектрометрия смеси ацетатов частично метилированных полиолов, полученных при деградации ПС *P. aeruginosa* O10, показала наличие в ней полиола **132**, содержащего девять углеродных атомов и соответствующего остатку псевдаминной кислоты. Его фрагментация позволяет установить строение скелета и местоположение дезоксиивенов (у атомов С(3) и С(9)) и аминокислотных заместителей (у атомов С(5) и С(7)).

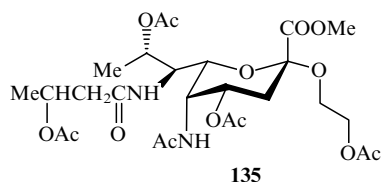


Полученные таким образом данные были подтверждены спектроскопией ЯМР нескольких олигосахаридов, содержащих остатки псевдаминной кислоты, образующихся при деградации ПС. Так, например, в спектре ЯМР <sup>13</sup>С олигосахарида **133**, который удалось получить очень мягким кислотным гидролизом ПС из *P. aeruginosa* O5, содержались сигналы, принадлежащие остатку псевдаминной кислоты, при 99.7 м.д. (атом С(2)) и 34.8 м.д. (дезоксизивено у атома С(3)). В спектре ЯМР <sup>13</sup>С олигосахарида **134**, полученного сольволизом ПС из *P. aeruginosa* O10а жидким HF, содержались сигналы при 37.1 м.д. (дезоксизивено у атома С(3)), 49.1 м.д. (атом С(5), несущий аминокислотный заместитель), 54.7 м.д. (атом С(7), несущий аминокислотный заместитель) и 17.7 м.д. (СН<sub>3</sub>-группа у атома С(9)). Незначительная разница в химических сдвигах в спектрах ЯМР <sup>13</sup>С соединений **133** и

**134** относится за счет различия заместителей у аминогрупп псевдааминовой кислоты во фрагментах, полученных из разных бактерий. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  олигосахаридов **133** и **134** полностью подтверждают описанную выше структуру.



Конфигурация псевдааминовой кислоты была установлена на основании данных спектра ЯМР  $^1\text{H}$  фрагмента **135**, полученного из ПС *S. boydii* 7 тремя последовательными деградациями по Смиту с последующим превращением в метиловый эфир и ацетилированием. Спектр соединения **135** характеризуется следующими значениями КССВ кольцевых протонов:  $J_{3a,4} = 13$ ,  $J_{4,5} = 3.5$ ,  $J_{5,6} = 1.6$  Гц, что указывает на аксиальную ориентацию атома Н(4) и экваториальную ориентацию атома Н(5). Экваториальная ориентация заместителя у атома С(6) была подтверждена измерением ЯЭО, который указывал на близость протона Н(7) и протона NH-группы, находящейся при атоме С(5).

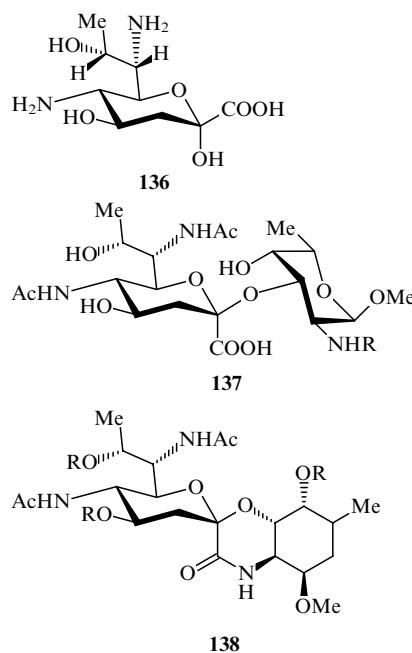


Приведенные данные свидетельствуют о том, что фрагмент С(4)–С(5)–С(6) псевдааминовой кислоты имеет *липсо*-конфигурацию. Большая величина КССВ  $J_{6,7}$  (10 Гц) и значительная величина ЯЭО для атомов Н(5) и Н(6) при преобладании протона NH-группы у атома С(7) говорили о том, что фрагмент С(6)–С(7) имеет *эритро*-конфигурацию. Наконец, *L-эритро*-конфигурация фрагмента С(7)–С(8) псевдааминовой кислоты установлена сравнением эффектов гликозирования на атоме С(9) псевдааминовой кислоты и С(1) остатка глюкозамина (связанного гликозидной связью с атомом С(8) псевдааминовой кислоты в полисахаридной цепи) и данных спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  модельных соединений — гликозильрованных производных D- и L-треонина, D- и L-аллотреонина. Из этих данных следовало, что фрагмент С(7)–С(8)–С(9) псевдааминовой кислоты гомоморфен фрагменту L-аллотреонина, т.е. фрагмент С(7)–С(8) имеет *L-эритро*-конфигурацию. Таким образом, из приведенных выше данных вытекает, что псевдааминовой кислоте соответствует *L-глицеро-L-манно*-конфигурация **131**.<sup>161</sup>

Позднее идентификацию производных псевдааминовой кислоты в ПС проводили, используя спектроскопию ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  (включая измерение ЯЭО), опираясь на приведенные выше данные.<sup>163, 165</sup>

Производные изомера псевдааминовой кислоты — 5,7-диациламино-3,5,7,9-тетрадезоксид-*D-глицеро-L-галакто*-нонулозоновой кислоты (**136**) — были обнаружены в О-антигенных ПС *Salmonella arizonae* O61,<sup>167</sup> *Pseudomonas aeruginosa* O13,<sup>168, 169</sup> *Vibrio alginolyticus*<sup>170</sup> и *Legionella pneumophila* 1.<sup>171</sup>

Аминогруппы этой нонулозоновой кислоты ацилированы различными кислотами. Обнаружено также производное, содержащее ацетиламиногруппировку.<sup>171</sup> Полное строение этой кислоты устанавливалось теми же методами, что и структура псевдааминовой кислоты, как это описано в работах<sup>168, 169</sup>. При сольволизе ПС *P. aeruginosa* O13 раствором HF в метаноле был выделен дисахарид **137**, содержащий остатки нонулозоновой кислоты **136** и фукозамина. После обработки уксусным ангидридом в пиридине дисахарид **137** претерпевал внутримолекулярную циклизацию с образованием лактама **138**.



Состав соединений **137** и **138** был подтвержден определением их молекулярного веса с помощью ФАВ-масс-спектрометрии. В спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  соединений **137** и **138** присутствовали сигналы при 19.7 м.д. ( $\text{CH}_3$ -группа при атоме С(9)), 54.4 и 53.8 м.д. (атомы С(7) и С(5), несущие ациламинные группировки), 42–41 м.д. (дезоксизвено у атома С(3)). Данные, полученные с помощью спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ , полностью соответствовали такому строению скелета нонулозоновой кислоты. Наличие в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  характерных величин КССВ кольцевых протонов ( $J_{3a,3e} = J_{3a,4} = 12$ ,  $J_{3e,4} = 4.2$ ,  $J_{4,5} = J_{5,6} = 10$  Гц), свидетельствовало об аксиальном расположении протонов во фрагменте С(4)–С(5)–С(6) нонулозоновой кислоты и, следовательно, об его *арабино*-конфигурации. Малая КССВ  $J_{6,7}$  (2.5 Гц), близкая к соответствующей константе *N*-ацетилнейраминавой кислоты (1.5 Гц) и отличная от КССВ псевдааминовой кислоты (10 Гц), указывает на *трео*-конфигурацию С(6)–С(7) фрагмента. Наконец, для фрагмента С(7)–С(8) была также установлена *D-трео*-конфигурация с использованием, как и в предыдущем случае, данных по гликозильрованию нонулозоновой кислоты **136** и модельных гликозидов *N*-ацетилгалактозамина, D- и L-треонина, D- и L-аллотреонина.

На основании сказанного выше нонулозоновой кислоте **136** была приписана *D-глицеро-L-галакто*-конфигурация. Позже этот моносахарид, содержащий разные *N*-заместители, был обнаружен в ПС других бактерий.<sup>167, 170, 171</sup> Его идентификация осуществлялась в основном бездеструктивными методами по данным спектров ЯМР, которые частично приведены выше. Исследование олигосахаридных фрагментов, полученных при частичной деструкции ПС, предпринималось лишь в отдельных случаях.

Из биополимеров, содержащих нонулозоновую кислоту **136**, особенно интересен ПС из *Legionella pneumophila* (возбудителя тяжелого легочного заболевания, так называемой «болезни легионеров»).<sup>171</sup> Этот ПС является гомополисахаридом, состоящим из звеньев производного 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-*D*-глицеро-*L*-галакто-нонулозоновой кислоты с ацетиламиновой и *N*-ацетиламиногруппами у атомов C(5) и C(7) соответственно. Он является первым примером полисахаридов такого типа. Следует подчеркнуть, что установление строения этой нонулозоновой кислоты, также как и строения всего ПС, было выполнено бездеструктивным методом только на основании данных спектров ЯМР.

В заключение следует отметить, что для окончательного решения вопроса о структуре и, в особенности, о конфигурации представителей этого нового класса моносахаридов было бы крайне желательно провести встречный синтез обеих 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинонулозоновых кислот **131** и **136**.

#### IV. Неуглеводные заместители в моносахаридных звеньях

Как уже указывалось во Введении, вторым фактором, определяющим дифференциацию мономерных компонентов *O*-антигенных ПС и способствующим разнообразию их структуры, является присутствие в них так называемых «неуглеводных» заместителей. Наличие таких заместителей в заметной степени, а иногда и коренным образом изменяет пространственное строение полисахаридной цепи и общий «рельеф поверхности» полисахаридной молекулы, экспонируя на ней дополнительные полярные и гидрофобные группировки, что в конечном счете и определяет специфичность ее взаимодействия с поверхностью белка (антитела), т.е. иммунологическую специфичность.

Нужно отметить, что присутствие некоторых неуглеводных заместителей в полисахаридах различного происхождения, например, в растительных ПС, было хорошо известно, но именно микробные ПС и особенно *O*-антигенные ПС грамотрицательных бактерий содержат наиболее богатый ассортимент таких заместителей. Эти заместители могут модифицировать как гидроксильные группы моносахаридов, так и аминогруппы аminosахаров и карбоксильные группы кислот углеводного ряда.

Среди *O*-замещенных моносахаридов это могут быть простые или сложные эфиры, причем последние встречаются гораздо чаще. Известны также моносахариды с ацетальной группировкой, связанной с двумя гидроксильными группами моносахаридного звена.

Для аminosахаров характерны только *N*-ацилированные производные, в то время как *N*-алкилированные моносахариды в составе *O*-антигенных ПС практически неизвестны. Карбоксильные группы уроновых кислот чаще всего заменены на амидные, причем известны как незамещенные амиды, так и более сложные производные, включающие, например, остаток аминокислоты. Наконец, к неуглеводным заместителям нужно отнести и остатки фосфорной кислоты и некоторых ее производных, которые также были найдены в *O*-антигенных ПС.

Установление строения и местоположения неуглеводного заместителя в углеводном звене ПС представляет собой самостоятельную и порой непростую задачу. Поскольку количество и многообразие неуглеводных заместителей, найденных в *O*-антигенных ПС, в последние годы быстро растет, то поиск наиболее целесообразных путей решения этой проблемы получает все большее значение в химии *O*-антигенных ПС. Один из них состоит в избирательном отщеплении неуглеводного заместителя с последующим определением его строения обычными методами, однако в этом случае отдельно приходится решать вопрос о его

местонахождении в полисахаридной цепи. Другой путь заключается в выделении соответствующего замещенного моносахарида и его последующем структурном анализе. К сожалению, оба эти пути далеко не всегда осуществимы, так как при попытках отщепления неуглеводного заместителя или выделения замещенного моносахарида очень часто происходят необратимые изменения или даже полная деструкция выделяемых соединений. По этой причине в последнее время задачу определения строения решают с помощью физико-химических методов. В этом случае можно определять природу и место неуглеводного заместителя непосредственно при анализе ПС или олигосахаридных фрагментов, полученных при его специфической дегградации.

#### 1. *O*-Алкильные заместители

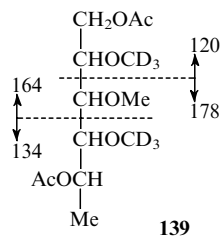
Замещение гидроксильных групп в моносахаридных звеньях *O*-антигенных ПС с образованием простой эфирной связи встречается редко. В настоящее время известны лишь *O*-метилвые и 1-карбокситиловые эфиры.

##### а. *O*-Метилвые эфиры

Частично метилированные моносахариды довольно широко распространены в растительных ПС, а среди микробных ПС они чаще встречаются в экстрацеллюлярных и капсульных ПС, а также в ПС фотосинтезирующих бактерий (см. обзор<sup>6</sup>); в *O*-антигенных ПС они обнаружены лишь в нескольких случаях. Считается, что метилирование гидроксильной группы моносахарида происходит на одной из стадий биосинтеза ПС, причем источником метильной группы является SMe-группа метионина.

3-*O*-Метил-*L*-ксилоза обнаружена в составе ПС *Pseudomonas maltophilia* NCTC 10257,<sup>172</sup> где она занимает терминальное положение в боковых цепях разветвленного ПС. Она была выделена после кислотного гидролиза ПС и идентифицирована стандартными методами — сравнением с аутентичным образцом.

3-*O*-Метил-*L*-рамноза была выделена из *O*-антигенного ПС *Klebsiella* O10<sup>173</sup> в результате кислотного гидролиза. Этот моносахарид занимает терминальное положение на невосстанавливаемом конце полисахаридной цепи. Для установления его строения ПС сначала дейтерометилировали CD<sub>3</sub>I, а затем гидролизовали. После выделения моносахарида был превращен в ацетат полиола **139** и исследован масс-спектрометрически. Масс-спектр содержал пики, отвечающие фрагментам с *m/z* 164, 134, 178 и 120, что однозначно доказывало структуру 3-*O*-метилрамнозы.



Вполне возможно, что присутствие обоих указанных метилированных моносахаридов на концах полисахаридных цепей служит сигналом, определяющим окончание дальнейшего наращивания этой цепи при биосинтезе.

3-*O*-Метил-*D*-глицеро-*D*-альтро-гептоза и 3-*O*-метил-6-дезоксид-*D*-альтро-гептоза найдены в составе некоторых ПС *Campylobacter jejuni*, где они частично замещают гидроксильные группы.<sup>76</sup> Интересно, что соотношение метилированных и неметилированных моносахаридов в ПС зависит от условий выращивания бактерий, хотя причины этого явления остаются невыясненными. Строение обеих метилированных гептоз было установлено с помощью масс-спектрометрии

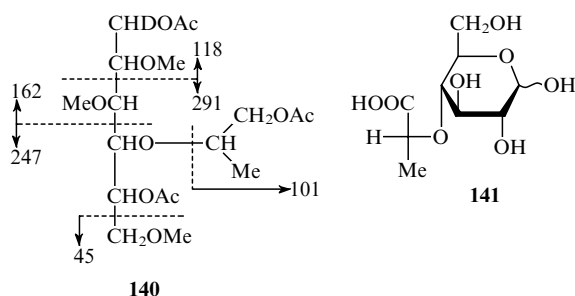
ацетатов частично метилированных полиолов, полученных из ПС после дейтерометилирования, гидролиза и восстановления (как описано выше).

### б. 1-Карбоксиэтиловые эфиры (гликолактиловые кислоты)

Гликолактиловые кислоты, входящие в состав О-антигенных ПС, содержат остаток молочной кислоты, связанный с молекулой сахара простой эфирной связью. Соединения этого типа были впервые обнаружены в составе пептидогликана клеточной стенки бактерий (мурамовая кислота и ее манно-изомер<sup>174,175</sup>). Позднее они были найдены также в О-антигенных ПС и некоторых других микробных ПС (экзоцеллюлярных, капсульных, ПС фотосинтезирующих бактерий). Таким образом, гликолактиловые кислоты составляют довольно значительную группу моносахаридов кислого характера.

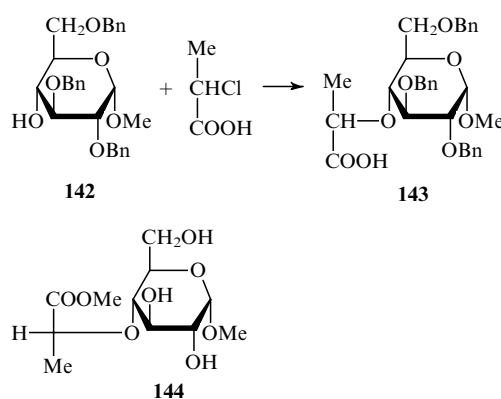
Простая эфирная связь в них устойчива, и поэтому они могут быть выделены в индивидуальном состоянии после кислотного гидролиза ПС с помощью ионообменной хроматографии. Представители этого класса отличаются друг от друга природой родоначального моносахарида, абсолютной конфигурацией остатка молочной кислоты и его локализацией. К настоящему времени из О-антигенных ПС грамотрицательных бактерий выделены следующие представители гликолактиловых кислот: производные D-глюкозы, L-рамнозы и 2-ацетиламино-2-дезоксид-D-глюкозы, содержащие обычно остаток (R)-молочной кислоты, хотя известны и производные (S)-изомера. Кроме того, в составе ПС других микроорганизмов обнаружены производные D-маннозы<sup>176</sup> и D-глюкуроновой кислоты.<sup>177</sup>

Вначале строение гликолактиловых кислот устанавливалось с помощью классических химических методов и масс-спектрометрии, а позднее для этих целей стали применять спектроскопию ЯМР. Иллюстрацией классического подхода может служить установление строения глюколактиловой кислоты, выделенной из ПС *Shigella dysenteriae* 3.<sup>178,179</sup> Замещенный моносахарид был выделен в индивидуальном состоянии из кислотного гидролизата ПС, причем в его спектре ЯМР <sup>1</sup>H присутствовал характерный сигнал метильной группы CH<sub>3</sub>-CH в области 1.4 м.д. (д, J = 6.0 Гц). Обработка моносахарида BCl<sub>3</sub> привела к расщеплению простой эфирной связи и образованию D-глюкозы. Для выяснения места присоединения остатка молочной кислоты к остатку глюкозы полисахарид был прометилирован, восстановлен LiAlH<sub>4</sub> и гидролизован. Смесь полученных моносахаридов была превращена в ацетаты полиолов восстановлением NaBD<sub>4</sub> и ацетилированием. В смеси ацетатов полиолов методом хромато-масс-спектрометрии был обнаружен тетраацетат **140**, фрагментация которого указывала на его строение: фрагмент с m/Z 101 свидетельствовал о наличии остатка пропандиола (образовавшегося при восстановлении карбоксильной группы молочной кислоты), а фрагменты с m/Z 118, 291, 162 и 247 определяли место его присоединения к атому C(4) глюкозы. На основании этого исходному моносахариду была приписана структура 4-O-(1'-карбоксиэтил)-D-глюкозы (**141**).



Абсолютную конфигурацию остатка молочной кислоты устанавливали встречным синтезом глюколактиловой кислоты<sup>179</sup> посредством конденсации метил-2,3,6-три-O-бензил- $\alpha$ -D-глюкопиранозиды **142** с (S)-2-хлорпропионовой кислотой, полученной из L-аланина, в присутствии гидрида натрия (схема 13). После обработки продукта конденсации **143** диазометаном и удаления бензильных групп был получен метилгликозид метилового эфира глюколактиловой кислоты **144**, идентичный по своим физико-химическим характеристикам (в том числе по оптическому вращению) природному продукту. При конденсации глюкопиранозиды **142** с (R)-2-хлорпропионовой кислотой было получено соединение, отличное по физико-химическим характеристикам от природной глюколактиловой кислоты. Таким образом, в природном соединении остаток молочной кислоты имеет (R)-конфигурацию, и эта гликолактиловая кислота является 4-O-[(R)-1'-карбоксиэтил]-D-глюкозой (**141**).

Схема 13

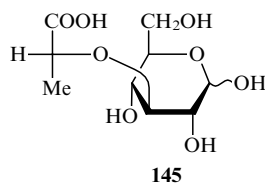


Гликолактиловая кислота **141** была найдена также в ПС иммунохимически сходной с *Shigella dysenteriae* 3 бактерии *Escherichia coli* O124 и идентифицирована тем же путем. Более того, оказалось, что строение ПС обеих бактерий — *S. dysenteriae* 7 и *E. coli* O124 — полностью идентично. Этот факт явился первым экспериментальным доказательством того, что идентичные по своей иммунохимической специфичности бактерии, даже относящиеся к различным по биологической классификации видам, имеют структурно одинаковые ПС.<sup>180</sup> Следует отметить, что из экстрацеллюлярного ПС бактерии *Aerococcus viridans* была выделена глюколактиловая кислота — 4-O-[(S)-1'-карбоксиэтил]-D-глюкоза — изомерная по остатку молочной кислоты глюколактиловой кислоте **141**.<sup>6</sup>

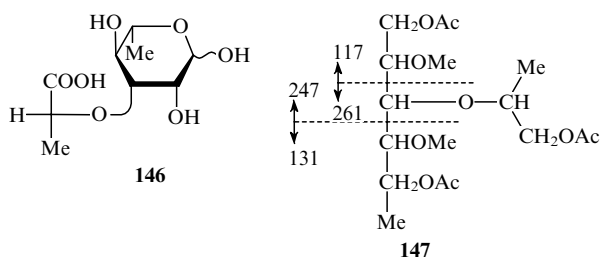
Изомерная глюколактиловая кислота — 3-O-[(R)-1'-карбоксиэтил]-D-глюкоза (**145**) — была недавно выделена из ПС *Aeromonas haloplanktis*<sup>181</sup> в индивидуальном состоянии после кислотного гидролиза ПС трифторуксусной кислотой. Ее строение было установлено методом спектроскопии ЯМР. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H содержал сигналы, типичные для остатка молочной кислоты: 1.45 м.д. (д, 7.0 Гц, CH<sub>3</sub>-группа) и 4.41 м.д. (к, CH-группа) и набор сигналов, характерных для остатка глюкозы. Спектр ЯМР <sup>13</sup>C также имел сигналы, типичные для остатка молочной кислоты: 19.6 м.д. (CH<sub>3</sub>-группа) и 79.5 м.д. (CH-группа). Сигнал атома C(3) остатка глюкозы смещен в слабое поле (83 м.д.) по сравнению с сигналом незамещенной глюкозы, что свидетельствовало о присоединении к этому атому остатка молочной кислоты. В пользу данной структуры говорило и полное совпадение спектров ЯМР кислоты **145** и глюколактиловой кислоты, выделенной из капсульного полисахарида *Pseudomonas fragi*, для которой было установлено такое же строение.<sup>182</sup> D-Конфигурация глюкозного остатка подтверждалась закономерностями эффектов гликозилирования, вытекающими из анализа спектра ЯМР <sup>13</sup>C исходного ПС; (R)-конфигура-



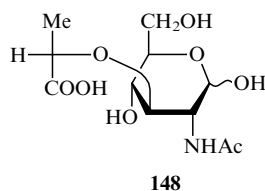
ция остатка молочной кислоты принята на основании величины оптического вращения кислоты **145**.



Структуру других гликолактиловых кислот устанавливали теми же путями (с использованием методов, доступных к моменту исследования). Так, 3-*O*-[(*R*)-1'-карбоксиэтил]-L-рамноза (рамнолактиловая кислота, **146**), выделенная из ПС *Shigella dysenteriae* 5,<sup>183</sup> при обработке  $\text{BCl}_3$  дала L-рамнозу, а масс-спектр частично метилированного полиола **147**, полученного из ПС, указывал на то, что вещество содержит остаток молочной кислоты, который связан с атомом C(3) рамнозы. (*R*)-Конфигурация остатка молочной кислоты была установлена встречным синтезом. Позднее эта кислота была выделена из ПС *Vibrio fluvialis*,<sup>184</sup> а ее структура была подтверждена данными спектроскопии ЯМР. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  содержал сигналы в области 1.42 и 4.33 м.д. (остаток молочной кислоты) и набор характерных сигналов остатка рамнозы. Заключение о (*R*)-конфигурации остатка молочной кислоты сделано на основании сравнения хроматографического поведения и оптического вращения изучаемого образца с синтетическими образцами (*R*)- и (*S*)-изомеров этой рамнолактиловой кислоты.<sup>170</sup>



Гликолактиловая кислота — 2-ацетиламино-2-дезоксид-3-*O*-[(*S*)-1'-карбоксиэтил]-D-глюкоза (**148**), являющаяся производным глюкозамина, — найдена в составе O-антигенного ПС *Proteus penneri* 62.<sup>185</sup> Ее строение было установлено по спектральным данным. В спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  полисахарида присутствовали сигналы, характерные для остатка молочной кислоты (1.31 м.д. (д,  $J = 7$  Гц) и 4.05 м.д. (к) (ЯМР  $^1\text{H}$ ) и соответственно 20.3, 80.6 и 182.9 м.д. (ЯМР  $^{13}\text{C}$ )), а также группа сигналов, характерных для остатка глюкозамина, причем в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  наблюдался характерный слабополюсный сдвиг для атома C(3), указывающий на замещение соответствующей гидроксильной группы. Моносахарид был выделен в индивидуальном состоянии после сольволиза ПС жидким HF. Его спектр совпадал со спектром 2-ацетиламино-2-дезоксид-3-*O*-[(*S*)-1'-карбоксиэтил]-D-глюкозы, но отличался от спектра хорошо известной мурамовой кислоты,<sup>174</sup> которая имеет (*R*)-конфигурацию остатка молочной кислоты. На этом основании, а также исходя из величины оптического вращения, резко отличной от этой константы для мурамовой кислоты, новой гликолактиловой кислоте была приписана (*S*)-структура. Она была известна как изокурамовая кислота.

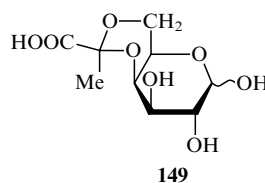


Недавно в ПС другого серотипа этого же вида *Proteus penneri* 35 обнаружен изомер изокурамовой кислоты — 2-ацетиламино-2-дезоксид-4-*O*-[(*S*)-1'-карбоксиэтил]-D-глюкоза, — строение которого было установлено аналогичными методами.<sup>186</sup>

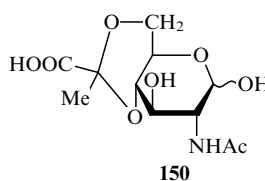
Кроме описанных выше соединений были обнаружены и другие гликолактиловые кислоты. Так, в капсульном ПС *Klebsiella* K 37 найдена 4-*O*-[(*S*)-1'-карбоксиэтил]-D-глюкуроновая кислота,<sup>177</sup> а в экстрацеллюлярном ПС *Mycobacterium lacticolium* 121 — 4-*O*-[(*S*)-1'-карбоксиэтил]-D-манноза,<sup>176</sup> структуры которых были установлены с помощью описанных выше приемов.<sup>187</sup>

## 2. Ацетальные группировки (карбоксиэтилиденные группы)

Моносахариды с ацетальными группировками, замещающими сразу две гидроксильные группы моносахарида остатком пировиноградной кислоты (карбоксиэтилиденные группы), встречаются довольно часто в экзоцеллюлярных и капсульных ПС. Разработаны методы определения строения этих производных моносахаридов в составе ПС. В O-антигенных ПС грамотрицательных бактерий моносахариды с карбоксиэтилиденными группами обнаружены пока лишь в двух случаях — в ПС *Shigella dysenteriae* 9<sup>188</sup> и *Escherichia coli* O149.<sup>189</sup> Для идентификации этой группировки применяется спектроскопия ЯМР в сочетании с химическими методами. Так, в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  ПС *S. dysenteriae* 9 присутствует сигнал в области 1.60 м.д., типичный для метильной группы остатка пировиноградной кислоты, который сохраняется после обработки ПС основаниями, но постепенно исчезает при обработке ПС разбавленной уксусной кислотой, что свидетельствует об ацетальной связи остатка пировиноградной кислоты. Природа моносахаридного звена, несущего этот заместитель, и место замещения в нем устанавливали сравнением результатов метилирования ПС до и после его дезацетализации уксусной кислотой: в первом случае в результате гидролиза метилированного ПС была выделена 2-*O*-метилгалактоза, а во втором — 2,4,6-три-*O*-метилгалактоза. Тем самым было показано, что карбоксиэтилиденной группой были модифицированы гидроксильные группы у атомов C(4) и C(6) галактозы и мономерным звеном ПС является 4,6-*O*-(1'-карбоксиэтилиден)-D-галактоза (**149**).



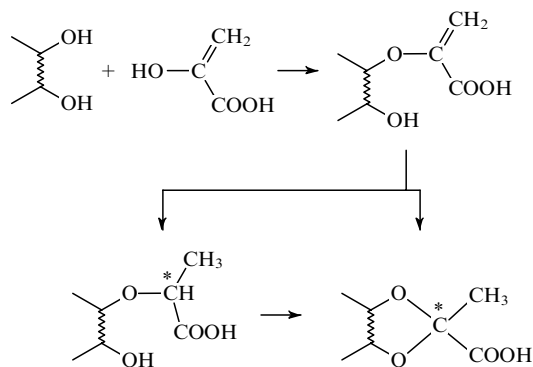
В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  полисахарида *E. coli* также имеется сигнал в области 1.50 м.д., а в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  — сигналы при 25.4 и 101.3 м.д., характерные для остатка пировиноградной кислоты. Как и в предыдущем случае, положение этого остатка было определено сравнением продуктов метилирования нативного и дезацетализированного ПС. Показано, что карбоксиэтилиденная группа связана с атомами C(4) и C(6) *N*-ацетилглюкозамина. Таким образом, замещенный моносахарид имеет строение 2-ацетиламино-2-дезоксид-4,6-*O*-(1'-карбоксиэтилиден)-D-глюкозы (**150**).



При введении карбоксиэтилиденовой группировки в моносахариде появляется новый хиральный центр, конфигурация которого легко может быть установлена по данным спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$ .<sup>190</sup> В зависимости от конформации диоксанового кольца 4,6-ди-*O*-замещенного моносахарида метильная и карбоксильная группы могут занимать соответственно либо аксиальное, либо экваториальное положение, что легко диагностируется по величинам химических сдвигов соответствующих сигналов. При известной конформации диоксанового цикла (заданной структурой родоначального моносахарида) относительное положение в нем  $\text{CH}_3$ - и  $\text{COOH}$ -групп, определяемое из спектра ЯМР, непосредственно указывает на (*R*)- или (*S*)-конфигурацию центрального углеродного атома ацетальной группировки.<sup>190</sup> С использованием этого подхода была установлена (*S*)-конфигурация остатка пировиноградной кислоты в ПС из *E. coli* O149.

Введение ацетальной группировки в ПС, как и остатка молочной кислоты в гликолактиловые кислоты, происходит во время биосинтеза ПС в клетке при реакции соответствующего моносахарида с енольной формой пировиноградной кислоты под действием специфического фермента. Образующийся при этом эфир, по-видимому, восстанавливается с образованием (*R*)- или (*S*)-изомера гликолактиловой кислоты, который далее при удобном пространственном расположении соседнего гидроксильного атома превращается в соответствующие ацетали. Не исключен и альтернативный путь — прямое присоединение гидроксильной группы к двойной связи промежуточного енола (схема 14).

Схема 14



### 3. *O*-Ацильные заместители

Замещение гидроксильных групп в моносахаридных остатках ПС остатками алифатических кислот очень широко представлено в полисахаридах растительного и микробного происхождения. Обычно имеет место *O*-ацетилирование, но известны случаи ацилирования другими алифатическими (в том числе высшими жирными кислотами) и гидроксикислотами. Так, алифатические кислоты  $\text{C}_{12}$ – $\text{C}_{16}$  и гидроксикарбоновые кислоты этого ряда — обязательные компоненты липидной части ЛПС, так называемого липида А, где они ацилируют остатки глюкозамина, обеспечивая высокую липофильность ЛПС, необходимую для закрепления его на внешней мембране клетки грамотрицательной бактерии.<sup>1</sup>

*O*-Ацетилирование отдельных гидроксильных групп в определенных моносахаридных звеньях *O*-антигенной полисахаридной цепи имеет существенное значение для определения иммунохимической специфичности ПС. Для полной характеристики данного эпитопа *O*-антигена необходима точная локализация *O*-ацетильной группы. Отнесение *O*-ацетильной группировки к определенному моносахаридному звену цепи ПС является рутинной задачей и легко решается при помощи спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ .

Сведения о присутствии других *O*-ацильных группировок в *O*-антигенных ПС, по сути дела, отсутствуют. Единственным экспериментально доказанным примером является, по-видимому, присутствие *O*-пропионильной группы в ПС *Vibrio anguillarum*.<sup>96</sup>

Скудость ассортимента *O*-ацильных группировок представляется довольно удивительной, в особенности по сравнению с богатым разнообразием алифатических кислот, ацилирующих аминогруппы моносахаридов, входящих в *O*-антигенные ПС.

### 4. *N*-Ацильные заместители

Моносахариды с ацилированными аминогруппами, входящие в состав различных природных соединений, — широко распространенное явление, но не обязательное, в то время как полисахариды практически всегда содержат звенья аминосоединений с ацилированными аминогруппами. Чаще всего в состав ПС входят *N*-ацетильные производные, тогда как производные других органических кислот встречаются гораздо реже. Исключением являются *O*-антигенные ПС грамотрицательных бактерий, где разнообразие кислот, ацилирующих аминогруппы, достаточно велико и включает простейшие алифатические кислоты, гидрокси-, полигидроксикислоты и аминокислоты. Моносахариды, содержащие две аминогруппы, могут быть ацилированы одной и той же или двумя различными кислотами (это же справедливо и для аминогрупп, находящихся в различных моносахаридных звеньях ПС).

О большом разнообразии кислот, ацилирующих аминогруппы *O*-антигенных ПС, стало известно в последние годы главным образом благодаря быстрому прогрессу спектроскопии ЯМР. В настоящее время природа *N*-ацильных заместителей и их местоположение в ПС устанавливается почти исключительно с помощью спектроскопии ЯМР самих ПС или фрагментов, полученных при их специфической деградации. Для этих целей используется также масс-спектрометрия.

#### а. *N*-Ацилирование алифатическими кислотами

Наиболее обычными заместителями в *O*-антигенных ПС являются *N*-ацетильные группировки. Их идентификация — рутинная задача, которая решается чаще всего при расшифровке спектров ЯМР полисахаридов (по наличию характеристических сигналов  $\text{NHCOCH}_3$ -группы). Так, например, в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  этой группе отвечают сигналы в области 22.0–24.0 м.д. ( $\text{CH}_3$ -группа) и 174–177 м.д. ( $\text{CO}$ -группа).

Местоположение *N*-ацетильной группы следует из характерного сдвига, который вызывает этот заместитель у соседнего атома углерода и протона: в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  — это сигнал в области 45–58 м.д., а в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  — сигнал кольцевого протона в области 3.8–4.3 м.д. Эти данные после должного отнесения сигнала позволяют определить одновременно как моносахаридное звено, в котором находится заместитель, так и положение заместителя в этом звене.

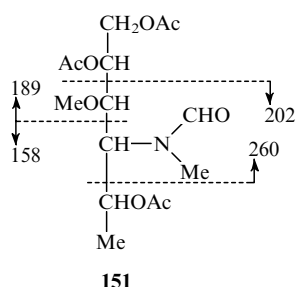
Реже встречается замещение аминогруппы остатком муравьиной кислоты. *N*-Формильные группировки обнаружены в ПС *Escherichia coli* O119,<sup>120</sup> *Yersinia enterocolitica* O9,<sup>115</sup> *Pseudomonas aeruginosa* O4<sup>128</sup> и родственных серотипов и в ПС *Vibrio anguillarum*,<sup>107</sup> *Brucella*,<sup>110,191</sup> *Francisella tularensis*,<sup>106</sup> где они присутствуют в остатках 2,3-диамино-2,3,6-тридезоксид-*D*-маннозы,<sup>120</sup> 4-амино-4,6-дидезокси-*D*-маннозы,<sup>110,115</sup> 2-амино-2-дезоксид-*D*-галактуроновой кислоты,<sup>107,128</sup> 4-амино-4,6-дидезокси-*D*-глюкозы.<sup>106</sup>

Присутствие *N*-формильной группировки легко определяется по сигналу в области 166–169 м.д. в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$ .

Поскольку  $\text{NHCHO}$ -группа, в силу затрудненного вращения вокруг  $\text{CO}-\text{NH}$ -связи, может находиться в устойчивых *cis*- или *trans*-конформациях, то для нее характерно удвое-

ние сигналов протонов. Сравнивая интенсивности этих сигналов, можно сделать заключение о соотношении обоих конформеров.<sup>192</sup> Местоположение *N*-формильной группы в ПС также следует из данных спектров ЯМР. Так, в спектре ЯМР <sup>13</sup>C наблюдается характерный сдвиг сигнала атома С, несущего NHCHO-группу (45–55 м.д.).

В некоторых случаях присутствие и место *N*-формильной группы определяется масс-спектроскопическим анализом. Так, например, из ПС бактерии *Brucella melitensis* после метилирования (при этом метилируется и NH-группа формамидного остатка), сольволиза жидким HF и последующего перевода продуктов деградации в ацетаты частично метилированных полиолов был выделен аминопролиол **151**, масс-спектр которого ясно указывал на наличие *N*-формильной группы и на ее положение у атома С(4) 4,6-дидезокси-4-амино-D-маннозы.<sup>110</sup>



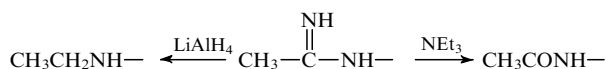
*N*-Формильная группировка полностью отщепляется при мягкой кислотной обработке ПС, в результате чего образуется ПС со свободными аминогруппами. Напротив, она выдерживает сольволиз жидким HF, сохраняясь в составе образующихся при распаде ПС фрагментов, что используется при структурном анализе ПС.

Одной из необычных *N*-ацилирующих групп, найденных пока лишь в О-антигенных ПС, является *N*-ацетимидоильная (амидиновая) группа  $\text{CH}_3\text{C}(=\text{NH})-$ . Ее присутствие впервые было обнаружено в ПС нескольких видов *Pseudomonas*,<sup>143, 144, 193</sup> а позднее в ПС *Vibrio cholerae*,<sup>165</sup> *Salmonella arizonae*<sup>151, 167</sup> и *Legionella pneumophila*,<sup>171</sup> где она ацилирует аминогруппы фукозамина, аминоруновых и аминонулоновых кислот, образуя соответствующие амидины.

*N*-Ацетимидоильная группа имеет основной характер и придает его всему ПС. Ее присутствие легко обнаруживается спектроскопически. Так, в спектре ЯМР <sup>13</sup>C наблюдаются сигналы в области 19.5–21 м.д. ( $\text{CH}_3$ -группа) и 167–169 м.д. ( $\text{N}=\text{C}-\text{N}$ -группа), а сигнал углеродного атома, несущего *N*-ацетимидоильную группировку, имеет химический сдвиг 45–57 м.д.; в спектре ЯМР <sup>1</sup>H наблюдается синглет в области 2.2–2.4 м.д.

Амидиновая группа не расщепляется при обработке жидким HF, однако под действием оснований (например, триэтиламина) она превращается в *N*-ацетиламинную, а при восстановлении  $\text{LiAlH}_4$  переходит в *N*-этиламиногруппу (схема 15). Этим часто пользуются при структурном анализе ПС или их фрагментов, так как превращения амидиновой группы легко контролируются при помощи спектроскопии ЯМР. Так, переход от амидиновой группы к *N*-ацетиламинной сопровождается появлением в спектре ЯМР <sup>1</sup>H сигнала в области 2 м.д., а в спектре ЯМР <sup>13</sup>C сигналов в области 23 и 176 м.д. При восстановлении амидиновой группы в *N*-этиламинную изменения еще более отчетливые — в спектре ЯМР <sup>1</sup>H появляется триплет в области 1.35 м.д. ( $J = 7.5$  Гц,  $\text{CH}_3$ -группа) и кватер в области

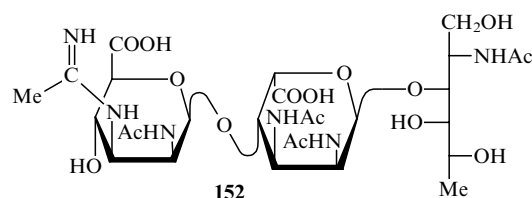
Схема 15



3.2–3.4 м.д. ( $\text{CH}_2$ -группа), а в спектре ЯМР <sup>13</sup>C — сигналы в области 11–13 м.д. ( $\text{CH}_3$ -группа) и 42–45 м.д. ( $\text{CH}_2$ -группа). При этом сигнал соответствующего атома С пиранозного кольца сдвигается в область 62 м.д., а связанного с ним протона — от 3.86 м.д. к 3.62 м.д. В спектрах специально синтезированного модельного соединения — метил-3-ацетимидоиламино-3,6-дидезокси- $\alpha$ -L-глюкопиранозиды — имели место все указанные выше изменения.<sup>194</sup>

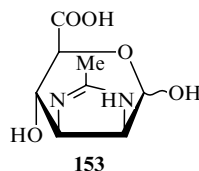
В качестве примера идентификации и локализации ацетимидоильной группировки можно привести исследование ПС, выделенного из *Pseudomonas aeruginosa* O2.<sup>143</sup>

В спектре ЯМР <sup>13</sup>C данного ПС были обнаружены сигналы при 19.9 и 167.3 м.д., указывающие на присутствие ацетимидоильной группы. При сольволизе ПС жидким HF с последующим восстановлением продуктов распада  $\text{NaBH}_4$  было выделено производное трисахарида **152**, содержащее ацетимидоильную группу. Состав трисахарида **152** был подтвержден ФАВ-масс-спектром. В спектре ЯМР <sup>13</sup>C соединения **152** наблюдались сигналы, характерные для ацетимидоильной группы, локализованной в остатке 2,3-диамино-2,3-дидезокси-D-маннурановой кислоты. Сигналы кольцевых атомов С(2) и С(3) при 50.9 и 55.7 м.д. указывали на присутствие двух *N*-содержащих заместителей, из которых один являлся амидиновым. При восстановлении трисахарида **152**  $\text{LiAlH}_4$  амидиновый заместитель превращался в *N*-этиламинную группу, что подтверждалось соответствующими изменениями в спектрах ЯМР (см. выше), при этом сигнал кольцевого атома С(3) сдвигался от 57.7 к 61.4 м.д., а при обработке **152** триэтиламином амидиновая группа превращалась в *N*-ацетиламинную, и сигнал атома С(3) сдвигался в область 54.4 м.д. При этом в обоих случаях положение сигнала атома С(2) не изменялось. Из этих данных однозначно следовало, что в исследуемом ПС амидиновая группа находится у атома С(3) остатка диаминманнурановой кислоты.



Сходными методами было обнаружено присутствие *N*-ацетимидоильного заместителя у аминогруппы 2-амино-2,6-дидезокси-D-галактозы в ПС *S. arizonae* O21,<sup>151</sup> *S. arizonae* O61,<sup>167</sup> *P. aeruginosa* O12, а также у аминогрупп при атоме С(5) 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-L-глицеро-L-маннонулозоновой кислоты в ПС *Vibrio cholerae*<sup>165</sup> и ее D-глицеро-L-галакто-изомера в ПС *Legionella pneumophila*.<sup>171</sup>

Интересно отметить, что моносахариду, входящему в состав ПС нескольких серотипов *P. aeruginosa* и содержащему одновременно *N*-ацетимидоильную и *N*-ацетильную группировки, первоначально, на основании спектральной информации была ошибочно приписана структура **153**, содержащая бициклическую пирано-имидазолиновую систему (что вполне допустимо, поскольку заместители у атомов С(2) и С(3) находились в экваториально-аксиальной позиции).<sup>139, 140</sup> Позднее это заключение было пересмотрено<sup>141</sup> на основании того, что в ФАВ-масс-спектрах фрагментов, полученных при деградации ПС, отсутствовали молекулярные ионы, соответствующие имидазолиновой группировке, а присутствовали ионы, отвечающие ацетимидоильной и ацетиламинной группам, которые и были локализованы методами, указанными выше.



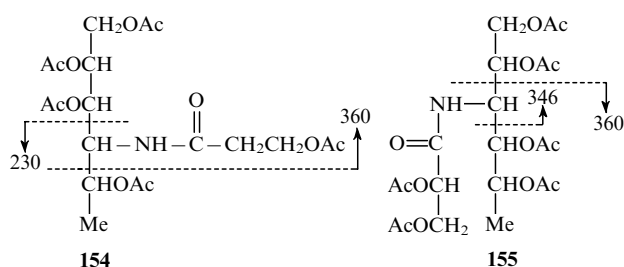
### б. *N*-Ацилирование гидрокси- и полигидроксикислотами

Наряду с аминасахарами, *N*-ацилированными незамещенными алифатическими кислотами, в *O*-антигенных ПС нередко встречаются также производные гидрокси- и полигидроксикислот алифатического ряда — чаще всего это кислоты  $C_2-C_6$ , имеющие одну или две гидроксигруппы (3-гидроксипропионовая, *L*-глицериновая, 3- и 4-гидроксимасляные, 2,4-дигидроксимасляная и 3,5-дигидроксигексановая кислоты). Присутствие остатков гидроксикислот в полисахаридной цепи придает своеобразный характер ее периферийной поверхности, экспонируя на ней одновременно и гидрофобные, и гидрофильные зоны, что в значительной мере увеличивает избирательность ее контактов (например, с поверхностью иммуноглобулина при взаимодействии антиген – антитело).

Установление строения гидроксикислот, ацилирующих аминогруппу моносахаридов, и определение места их присоединения к моносахариду обычно осуществляется одновременно с установлением строения самого моносахарида (чаще всего с использованием физико-химических методов).

Так, в составе ПС *Vibrio cholerae* 1875 была найдена 3-гидроксипропионовая кислота,<sup>195</sup> которая ацилирует аминогруппу 4-амино-4-дезоксид-рамнозы (перозаминна). *N*-Ацилированный моносахарид был выделен после сольволиза полисахарида HF. Его строение, в том числе и присутствие остатка 3-гидроксипропионовой кислоты, было установлено при помощи спектроскопии ЯМР и подтверждено масс-спектрометрически. В частности, в спектре ЯМР <sup>1</sup>H его ацетата наблюдались сигналы при 4.58 м.д. (протон NH-группы), а также при 4.23 и 1.98 м.д. (протоны CH<sub>2</sub>O- и CH<sub>2</sub>-групп гидроксиацильного остатка). Присутствие, а также место присоединения 3-гидроксипропионильного остатка было подтверждено данными масс-спектра ацетата полиола **154**.

*L*-Глицериновая кислота была найдена в ПС *Citrobacter freundii* O32. Этот биополимер может лишь условно считаться полисахаридом, так как его основная цепь содержит альтернирующие гликозидные и амидные связи.<sup>196</sup> Глицериновая кислота ацилирует аминогруппу 3-амино-3,6-дидезокси-*D*-фукозы, C(2')-гидроксильная группа которой связана гликозидной связью со следующим остатком такого же моносахарида, обеспечивая тем самым образование полимерной цепи с альтернирующими связями. При гидролизе биополимера трифторуксусной кислотой и последующем восстановлении и ацелировании смеси образовавшихся фрагментов было выделено производное соответствующего полиола **155**, масс-спектр которого указывал на присутствие моносахарида *N*-ацилированной глицериновой кислотой. Наличие остатка глицериновой кислоты в биополимере полностью подтверждалось характерными сигналами в спектре ЯМР <sup>13</sup>C полимера: в области 173 (C(1)), 80.2 (C(2)) и 62.8 м.д. (C(3)). Глицериновая кислота была выделена из кислого



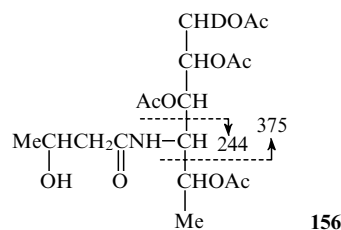
гидролизата полимера с использованием электрофореза на бумаге; величина оптического вращения ( $[\alpha]_D = -5.5^\circ$ ) свидетельствовала о *L*-конфигурации.

(*R*)-3-Гидроксипропионовая ( $\beta$ -гидроксимасляная) кислота была обнаружена в ряде *O*-антигенных ПС: *Escherichia coli* O10 (где она ацилирует аминогруппу 4-амино-4-дидезокси-*D*-фукозы),<sup>117</sup> *Yersinia aldovae*<sup>197</sup> и *Proteus penneri* 16 (ацилирует аминогруппу 3-амино-3-дезоксид-фукозы),<sup>198</sup> в ПС нескольких серотипов *Hafnia alvei* (ацилирует аминогруппу глюкозамина или аминогруппу 3-амино-3-дезоксид-фукозы),<sup>199, 200</sup> в ПС *Pseudomonas aeruginosa* O5 и O10 и *Shigella boydii* O7 (ацилирует аминогруппу у атома C(5) или C(7) 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-*L*-глицеро-*L*-манно-нонуглозидной кислоты),<sup>162, 163</sup> в ПС *Vibrio mimicus* 26768 (ацилирует аминогруппу 3-амино-3-дезоксид-хинозовы).<sup>95</sup>

(*S*)-Изомер 3-гидроксипропионовой кислоты встречается реже, он был найден в составе ПС *P. aeruginosa* O1 (ацилирует аминогруппу у атома C(4) 2,4-диамино-2,4,6-тридезоксид-*D*-глюкозы).<sup>122</sup>

Идентификация остатка 3-гидроксипропионовой кислоты и места ее присоединения к соответствующему моносахариду в полисахаридной цепи обычно производится путем выделения *N*-замещенного моносахарида и его исследования физико-химическими методами. Иногда ПС предварительно метилируют; в этом случае выделяют и исследуют *O*-метильное производное соответствующего *N*-замещенного моносахарида. В качестве типичного примера можно привести идентификацию остатка (*R*)-3-гидроксипропионовой кислоты в ПС *Escherichia coli* O10.<sup>117</sup>

После сольволиза ПС жидким HF с последующим мягким кислотным гидролизом в числе других фрагментов было выделено *N*-ацильное производное 4-амино-4-дезоксид-фукозы. Это производное было восстановлено NaBD<sub>4</sub>, затем проацелировано. Масс-спектр ацетата соответствующего полиола **156** однозначно доказывал наличие и положение остатка 3-гидроксипропионовой кислоты в производном 3-амино-3,6-дидезоксигексозы. Аналогичный результат был получен и при исследовании *O*-метилированного производного этого полиола, образующегося после деградации предварительно метилированного ПС. Абсолютная (*R*)-конфигурация этого остатка установлена на том основании, что он окисляется специфической *D*-3-гидроксипропионатдегидрогеназой в присутствии никотинамидадениндинифосфата.

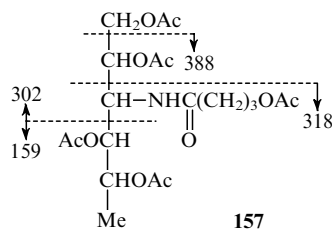


В других случаях, как, например, при исследовании ПС *P. aeruginosa* и *S. boydii* 7,<sup>162</sup> 3-гидроксипропионовая кислота была выделена в индивидуальном состоянии, и ее строение было подтверждено спектроскопическими данными. В спектре ЯМР <sup>1</sup>H 3-гидроксипропионовой кислоты присутствуют сигналы при 4.25 (H(3')), секстет,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 6$  Гц), 2.50 (H(2')), дублет) и 1.27 м.д. (H(4')), дублет), а в спектре ЯМР <sup>13</sup>C — сигналы при 180.0 (C(1')), 44.8 (C(2')), 66.2 (C(3')) и 23.5 м.д. (C(4')). Эти характерные сигналы наблюдаются и в спектрах ЯМР самих ПС, содержащих остатки 3-гидроксипропионовой кислоты, поэтому они используются для прямой спектроскопической идентификации этого остатка. В том случае, когда эта кислота выделена в индивидуальном состоянии, ее принадлежность к (*R*)- или (*S*)-ряду легко устанавливается по величине оптического вращения.

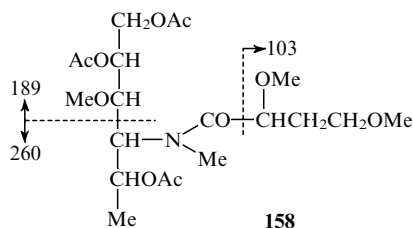
Обычно в повторяющемся звене *O*-антигенного ПС содержится не более одного остатка 3-гидроксипропионовой

кислоты, другие аминогруппы ацилируются другими кислотами, чаще всего уксусной.<sup>162</sup> Известны также случаи, когда одна и та же аминогруппа в ПС частично замещена остатком уксусной, а частично остатком 3-гидроксибутановой кислоты, как, например, в ПС *E. coli* O10, где 60% аминогрупп остатка 4-амино-4-дезоксид-фукозы ацилированы уксусной, а 40% — 3-гидроксибутановой кислотой.<sup>117</sup> Это делает полисахаридную цепь нерегулярной, что сразу видно из ЯМР-спектра. При этом остается открытым вопрос о том, носит ли такое замещение характер гетерогенности, т.е. в одной и той же полисахаридной цепи имеются и тот и другой заместитель, или, напротив, имеются две различные полисахаридные цепи, каждая из которых замещена только одним остатком. Ввиду близости структур обеих цепей и их достаточно высокой молекулярной массы имеющимися сегодня методами разделить их не представляется возможным.

4-Гидроксибутановая ( $\gamma$ -гидроксимасляная) кислота найдена пока только в О-антигенном ПС *Alteromonas macleodii* 2ММ6, где она ацилирует аминогруппу 3-амино-3-дезоксид-фукозы.<sup>133</sup> После гидролиза ПС было выделено *N*-ацильное производное этого моносахарида. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  этого производного наряду с сигналами моносахаридного звена содержит характерные сигналы остатка 4-гидроксибутановой кислоты: при 2.37 (H(2')), триплет,  $J_{2,3} = 8.0$  Гц), 1.85 (H(3')), мультиплет,  $J_{3,4} = 7.0$  Гц) и 3.62 м.д. (H(4')), триплет). В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  присутствовали сигналы при 33.3 (C(2')), 28.7 (C(3')) и 61.8 м.д. (C(4')). Масс-спектр ацетата полиола **157**, полученного из этого моносахарида, подтвердил наличие остатка 4-гидроксибутановой кислоты и ее локализацию у C(3)-аминогруппы моносахарида.

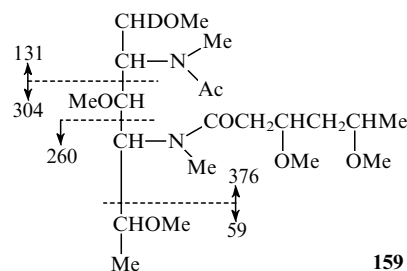


(*S*)-2,4-Дигидроксибутановая (3-дезокситетрановая) кислота найдена в составе О-антигенного ПС *Vibrio cholerae* O1, где она ацилирует аминогруппу 4-амино-4,6-дидезокси-*D*-маннозы (перозамина).<sup>109</sup> Она была выделена в чистом виде после гидролиза ПС разбавленной трифторуксусной кислотой и идентифицирована с помощью спектроскопии ЯМР. Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  этой кислоты содержал сигналы при 182.8 (СО-группа), 71.0 (СНОН-группа), 37.7 (СН<sub>2</sub>-группа) и 59.8 м.д. (СН<sub>2</sub>ОН-группа). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  также отвечал этой структуре. Строение и местоположение остатка (*S*)-2,4-дигидроксибутановой кислоты было установлено по масс-спектру ацетата частично метилированного полиола **158**, полученного сольволизом метилированного ПС жидким HF с последующим восстановлением и ацетилированием соответствующего *N*-ацильного производного перозамина.



(*S*)-Конфигурация (*L*-глицеро-конфигурация) остатка кислоты следовала из величины ее оптического вращения ( $[\alpha]_D = -8^\circ$ ). Она была подтверждена идентичностью ее эфира с (*R*)-октан-2-олом с соответствующим синтетическим образцом.

3,5-Дигидроксигексановая кислота была обнаружена в ПС *Vibrio cholerae* O3, где она ацилирует аминогруппу при атоме C(4) 2,4-диамино-2,4,6-тридезоксид-*D*-глюкозы (бациллозамина).<sup>58</sup> Другая аминогруппа этого моносахарида *N*-ацелирована. Присутствие 3,5-дигидроксигексановой кислоты в ПС было зафиксировано на основании наличия в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  набора сигналов, типичного для фрагмента  $\text{CH}_3\text{—СНОН—СН}_2\text{—СНОН—СН}_2\text{СО}$ . Строение кислотного остатка подтверждалось также спектром ЯМР  $^{13}\text{C}$ , который содержал сигналы при 45.0 (C(2')), 66.7 (C(3')), 46.1 (C(4')), 65.3 (C(5')) и 23.7 м.д. (C(6')). Масс-спектр метилированного полиола **159**, полученного стандартным образом из ПС, также подтверждал присутствие и положение остатка этой кислоты у соответствующей аминогруппы бациллозамина. Эти выводы согласуются с результатами масс-спектрометрии дисахаридных фрагментов, образующихся при частичной деградации ПС.

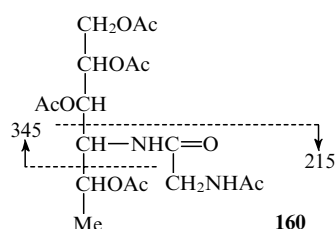


#### в. *N*-Ацилирование аминокислотами

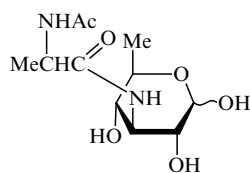
Из аминокислот, ацилирующих аминогруппу аминокислота, известны главным образом  $\alpha$ -аминокислоты, а также несколько более сложных производных пролина. Чаще всего в ПС имеется лишь один аминокислотный остаток на повторяющемся звене.

Обнаружение  $\alpha$ -аминокислот в ПС микробного происхождения представляет значительный интерес, так как демонстрирует связь между двумя важнейшими классами углеводсодержащих биополимеров — гликопротеинами, типичными представителями животного мира, и полисахаридами, классическими биополимерами микроорганизмов. Дальнейшее углубление наших знаний в этом направлении может выявить интересные закономерности в изменении биосинтетических путей в ходе эволюционного процесса.

Одним из примеров *N*-ацелирования цепи О-антигенного ПС аминокислотой является ацилирование аминогруппы 4-амино-4,6-дидезокси-*D*-глюкозы (4-амино-4-дезоксид-хинозовы) глицином, причем аминогруппа самого глицина *N*-ацелирована. Это производное было обнаружено в ПС *Shigella dysenteriae* 7.<sup>105</sup> Остаток *N*-ацетилглицина был первоначально идентифицирован в составе ПС спектроскопически — в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  обнаружен типичный сигнал атома C(2) глицина при 44.1 м.д. После гидролиза ПС разбавленной HCl было выделено производное 4-амино-4-дезоксидхинозовы, при стандартном анализе гидролизата которого на аминокислотном анализаторе был обнаружен глицин. Масс-спектр соответствующего ацетата полиола **160**, полученного обычным путем, однозначно указывал на местоположение остатка глицина.



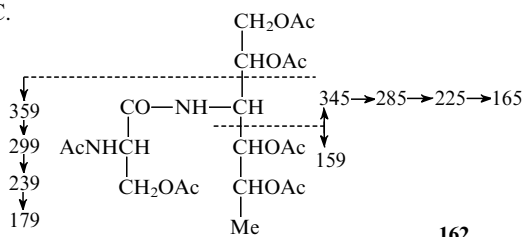
В ПС *Proteus penneri* 14 были обнаружены остатки D- и L-аланина. Первый из них ацилировал аминогруппу 3-амино-3,6-дидезокси-D-глюкозы (3-амино-3-дезоксид-хинозовы), а L-изомер амидировал карбоксильную группу D-галактуроновой кислоты.<sup>94</sup> Это первый случай обнаружения в ПС двух разных остатков аминокислот, связанных различным типом связи с различными моносахаридными остатками. После сольволиза ПС жидким HF было выделено производное **161**, которое содержало остаток N-ацетил-D-аланина, связанный с 3-амино-3-дезоксидхинозой. Структура этого соединения была подтверждена масс-спектром полученного из него ацетата полиола и спектроскопией ЯМР самого ПС. В спектре ЯМР <sup>13</sup>C присутствовали сигналы, типичные для D-аланина (при 18.4 (C(2')), 51.8 (C(3')) и 178.3 м.д. (CO)), а положение сигнала атома C(3) моносахаридного остатка (58.4 м.д.) однозначно указывало на присутствие ациламидной группы у этого атома.



161

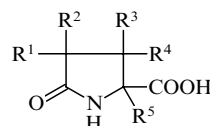
Остаток N-ацетил-L-серина найден в ПС *Escherichia coli* O114,<sup>92,98</sup> где он ацилирует аминогруппу 3-амино-3-дезоксидхинозовы. Соответствующий N-ацилированный моносахарид был получен после сольволиза ПС жидким HF, из которого после кислотного гидролиза был выделен L-серин, идентифицированный стандартным аминокислотным анализом; его L-конфигурация была установлена с помощью ГЖХ на оптической активной неподвижной фазе.

Производное моносахарида было превращено обычным образом в ацетат полиола **162**, масс-спектр которого показал фрагментацию, указывающую на наличие в нем остатка серина и его местоположение в моносахариде (особенно характерны вторичные фрагменты). Строение данного моносахарида было также подтверждено данными спектра ЯМР <sup>13</sup>C.



162

В нескольких O-антигенных ПС найдены более сложные по строению N-ацильные заместители, относящиеся к производным 5-оксопролина типа **163**. Их можно рассматривать как лактамы замещенных глутаминовых кислот. Выяснение их строения потребовало значительных усилий. Оно было выполнено с использованием масс-спектрометрического анализа и спектроскопии ЯМР. Первый заместитель оксопролинового типа обнаружен в ПС *Pseudomonas fluorescens*,<sup>201</sup> где он ацилирует аминогруппу 3-амино-3-дезоксидхинозовы. Производное N-ацилированного моносахара было выделено из кислого гидролизата ПС. Оно имело нейтральный характер. В его ИК-спектре присутствовали полосы при 1660 и 1730 см<sup>-1</sup>, которые указывали на наличие в этом соединении амидной и лактамной группировок. Молекулярный вес N-ацильного заместителя, как следовало из ФАВ-масс-спектра, составлял 156 Д, что соответствовало соединению типа **163**, содержащему две метильные и одну гидроксильную группы.



163

В спектре ЯМР <sup>13</sup>C производного N-ацилированного моносахара были обнаружены сигналы, подтверждающие присутствие двух метильных групп (18.9 и 23.5 м.д.), одной метиленовой группы (45.8 м.д.), двух третичных углеродных атомов (71.6 и 78.2 м.д.) и двух карбонильных групп (175.7 и 179.7 м.д.). В спектре ЯМР <sup>1</sup>H наблюдались сигналы двух изолированных метильных групп (1.37 и 1.49 м.д.) и метиленовой группы с неэквивалентными протонами, находящейся рядом с карбонильной группой (2.45 и 2.65 м.д. (AB-система, J<sub>AB</sub> = 15 Гц)), а также двух NH-групп (7.26 и 7.57 м.д.), одна из которых связана с углеродом, не несущим протонов. Измерения ЯЭО указывали на *транс*-расположение метильных групп. На основании всех этих данных ацилирующей аминокислоте было приписано строение 3-гидрокси-2,3-диметил-5-оксопролина **163** (R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = R<sup>5</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> = OH).

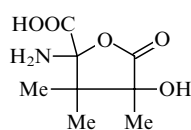
Близкий по строению заместитель (также производное 5-оксопролина) был идентифицирован в ПС *Vibrio cholerae* O5,<sup>124</sup> где он ацилирует аминогруппу 3-амино-3-дезоксидхинозовы. Строение этой аминокислоты было установлено только по данным спектров ЯМР самого ПС. В спектре ЯМР <sup>13</sup>C полисахарида (и полученного из него дисахаридного фрагмента) присутствовали сигналы метильной (23.4 м.д.), метиленовой (69.6 м.д.), метиленовой (45.4 м.д.) и CO-групп (180.2 м.д.). Этому соответствовали сигналы в спектре ЯМР <sup>1</sup>H: 1.37 м.д. (метиленая), 2.38 и 2.64 м.д. (метиленовая, J<sub>HH</sub> = 17.4 Гц) и 4.19 м.д. (метиленовая), а также синглет при 8.62 м.д. (NH-группа). Из этих данных, полностью подтвержденных несколькими корреляциями и измерением ЯЭО, следовало, что аминокислотному остатку соответствовала структура 3-гидрокси-3-метил-5-оксопролина **163** (R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>5</sup> = H, R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup> = OH).

Такое строение N-ацильного заместителя полностью подтверждалось данными ФАВ-масс-спектрометрии некоторых олигосахаридных фрагментов, полученных при деструкции ПС. Конфигурация заместителя была определена измерением ЯЭО: сильное взаимодействие между протоном NH-группы и H(6) моносахаридного остатка указывало на (R)-конфигурацию атома C(2') пролинового цикла, а взаимодействие протонов CH<sub>3</sub>-групп аминокислоты с атомом H(4) соседнего моносахарида (2,4-диамино-2,4-дидезоксидхинозовы) — на (R)-конфигурацию атома C(3') пролинового цикла.

Третий представитель N-ацильных заместителей этого типа — 2,4-дигидрокси-3,3,4-триметил-5-оксопролин — был найден в ПС *Vibrio anguillarum*,<sup>107</sup> где он ацилирует аминогруппу 4-амино-4-дезоксидхинозовы (визамина). Избирательным расщеплением ПС сольволизом жидким HF, а также двумя последовательными деградациями по Смитту было получено несколько олигосахаридных фрагментов. В их спектрах ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C были идентифицированы сигналы, соответствующие остатку замещенного 5-оксопролина, который был присоединен к аминогруппе 4-амино-4-дезоксидхинозовы, что следовало из положения сигнала атома C(4) этого моносахарида (57.4 м.д.).

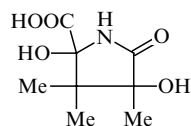
Для установления строения сложного N-ацильного заместителя было предпринято специальное исследование.<sup>202</sup> Из сложной смеси фрагментов, полученной после сольволиза ПС жидким HF и последующего кислотного гидролиза,

было выделено производное этой аминокислоты, которое имело в ИК-спектре полосу при  $1792\text{ см}^{-1}$  и давало положительную реакцию с нингидрином, что соответствовало структуре лактона со свободной аминогруппой. Этому соединению была приписана структура **164**. Его спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  указывал на наличие восьми углеродных атомов, два из которых принадлежали карбонильным группам (171.5 и 172.0 м.д.), три — метильным группам (15.2, 18.0 и 19.7 м.д.) и еще три углеродных атома находились в цикле. На присутствие трех метильных групп указывал спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (сигналы при 1.62, 1.68 и 1.69 м.д.). Этерификация и последующее *N*-ацилирование лактона **164** привели к метиловому эфиру, в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  которого содержались сигналы протонов NH (6.14 м.д.), OH (3.97 м.д.) и метильной группы сложного эфира (3.82 м.д.), а также сигналы протонов трех метильных групп (1.18, 1.59 и 1.75 м.д.). Таким образом, лактон **164** оказался замещенным бутиролактоном, содержащим амино-, гидроксильную, карбоксильную и три метильные группы.



164

При мягкой обработке основаниями бутиролактон **164** превращался в лактам, которому на основании изучения ЯМР- и масс-спектров его *O*-метильного производного была приписана структура **165**. Последняя коррелировала со структурой лактона **164**. Таким образом, *N*-ацильный заместитель, находящийся в цепи ПС, является 2,4-дигидрокси-3,3,4-триметил-5-оксопролином **163** ( $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{CH}_3$ ;  $\text{R}^1 = \text{R}^5 = \text{OH}$ ) (2,4-дигидрокси-3,3,4-триметил-пироглутаминовой кислотой).<sup>202</sup> Stereoхимия этого соединения остается неизвестной.

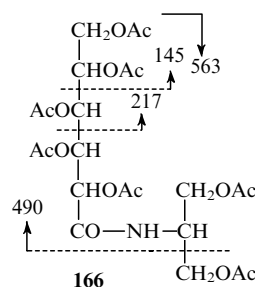


165

### 5. *N*-Заместители амидов гексуроновых кислот

Как уже указывалось, уроновые кислоты иногда входят в состав полисахаридной цепи в виде амидов. Известен лишь один пример амида гликуроновой кислоты, образованный аминокислотой — 2-амино-1,3-дигидроксипропаном. Он был найден в ПС *Shigella boydii* 8<sup>203</sup> и *Vibrio cholerae*.<sup>158</sup> Этот аминокислот был выделен электрофорезом на бумаге после жесткого кислотного гидролиза ПС и идентифицирован масс-спектрометрически в виде *N*-ацетата. Его строение подтверждено встречным синтезом.

Для определения положения *N*-заместителя ПС был подвергнут сольволизу жидким HF, что позволило выделить с небольшим выходом *N*-замещенный амид галактуроновой кислоты, строение которого было установлено масс-спектрометрией соответствующего ацетата полиола **166**, полученного стандартным способом. Пик молекулярного иона с  $m/Z$  563 подтверждал его молекулярный вес, а фрагмент с  $m/Z$  490 — наличие  $\text{CH}_2\text{OH}$ -группы.



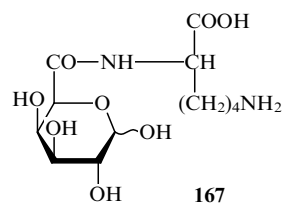
166

$\alpha$ -Аминокислоты, связанные амидной связью с гексуроновыми кислотами (*N*-гликуроноиламинокислоты), встречаются чаще. Они были найдены в бактериях рода *Proteus*.<sup>204</sup>

К настоящему времени в бактериях *Proteus* найдены L-аланин (ПС *P. mirabilis* O27 и *P. penneri* 14), L-серин (ПС *P. mirabilis* O28), L-треонин (ПС *P. penneri* 12)<sup>205</sup> и L-лизин (ПС *P. mirabilis* O28 и *P. mirabilis* 1959), ацилированные D-галактуроновой кислотой, причем последний ацилирован по  $\alpha$ - $\text{NH}_2$ -группе. В ПС *P. mirabilis* O27 остаток L-лизина ацилирован D-глюкуроновой кислотой.

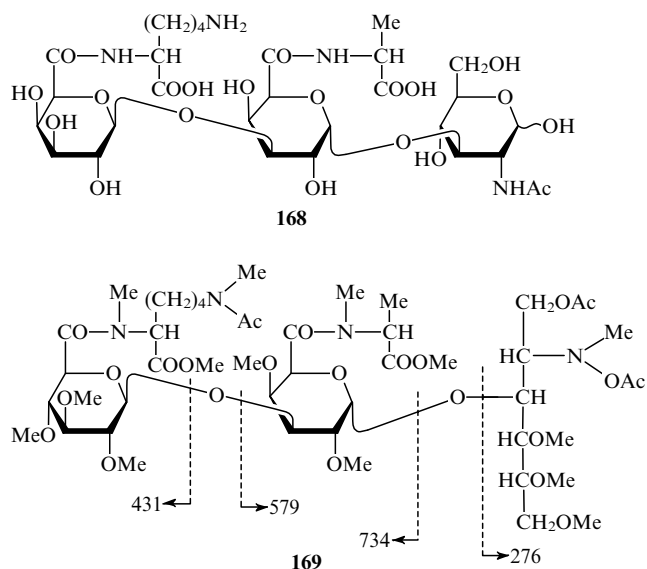
Присутствие амида уроновой кислоты констатируется при первичной расшифровке спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  по характерному сигналу в области 170–172 м.д., принадлежащему атому C(6) уроновой кислоты, а также по сигналам аминокислотного остатка. Наличие аминокислоты подтверждается ее выделением при жестком кислотном гидролизе ПС и стандартным анализом на аминокислотном анализаторе. Ее конфигурация устанавливается обычно по величине оптического вращения или превращением в эфир с (*R*)- или (*S*)-бутан-2-олом.

Для окончательного подтверждения строения амида его выделяли (после сольволиза жидким HF) в индивидуальном виде или в составе короткого олигосахарида и подвергали масс-спектрометрическому и ЯМР-анализу. Так, из ПС *P. mirabilis* 1959<sup>206</sup> с помощью ионообменной хроматографии был выделен гликуронамид **167**, спектр ЯМР  $^1\text{H}$  которого содержал характерные сигналы протонов остатков галактуроновой кислоты и лизина, причем сигнал протона при атоме C(2) последнего был смещен по сравнению с сигналом незамещенного лизина от 3.20 м.д. к 4.35 м.д., что указывало на ацилирование  $\alpha$ - $\text{NH}_2$ -группы аминокислоты.

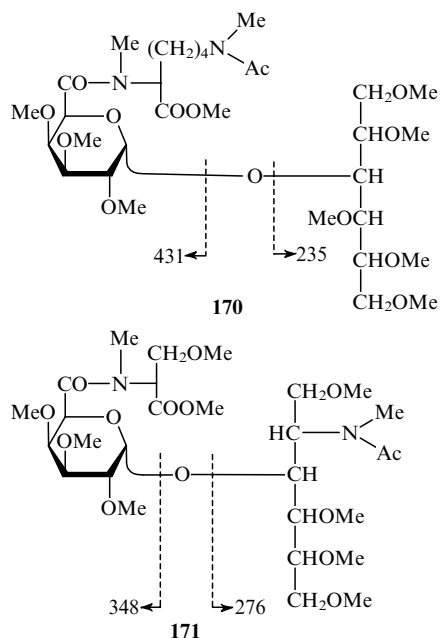


167

Аналогичный подход использован и для решения более сложной задачи — определения строения двух различных аминокислот и места их присоединения к соответствующим моносахаридным звеньям цепи. Так, например, из ПС *P. mirabilis* O27,<sup>207</sup> содержащего остатки L-аланина и L-лизина у звеньев D-галактуроновой и D-глюкуроновой кислот, после сольволиза жидким HF был выделен трисахарид **168**, который после восстановления  $\text{NaBH}_4$  и метилирования дал олигосахарид **169**. Присутствие в его масс-спектре фрагментов с  $m/Z$  431, 579, 734 и 276 однозначно указывало на то, что находящееся на невосстанавливаемом конце олигосахарида **169** звено глюкуроновой кислоты амидировано остатком лизина, а следующее за ним звено галактуроновой кислоты — остатком аланина.



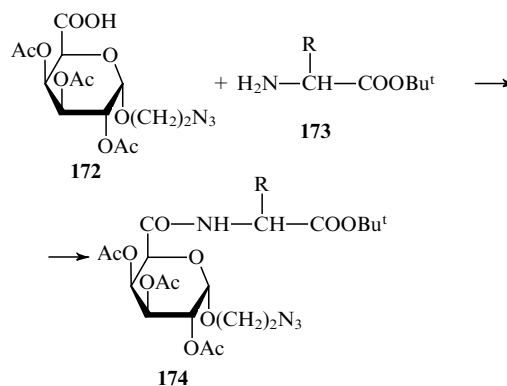
Таким же образом было установлено местоположение остатков L-лизина и L-серина в ПС *P. mirabilis* O28.<sup>208</sup> После мягкого кислотного гидролиза *N*-ацелированного (по аминогруппе лизина) ПС из сложной смеси были выделены два дисахарида, один из которых содержал остаток лизина, а другой — остаток серина. Полученные после восстановления и метилирования ацетаты гликозилполиолов **170** и **171** были подвергнуты масс-спектрометрическому анализу; фрагментация обоих соединений ясно указывала на то, что остаток лизина присоединен к галактурановой кислоте, которая связана с остатком галактозы, а остаток аланина — к галактурановой кислоте, соседствующей в полисахаридной цепи с остатком *N*-ацетилглюкозамина.



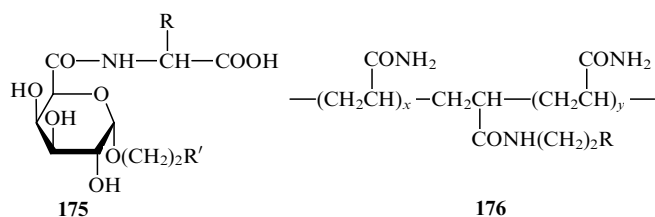
Остатки аминокислот в ПС, находящиеся в боковых ответвлениях полимерной цепи, часто являются иммунодетерминантными группами, т.е. определяют иммунологическую специфичность биополимера. В тех случаях, когда в одном ПС имеются остатки двух различных аминокислот, возникает интересный вопрос: остаток какой именно аминокислоты играет роль детерминанта? Это существенно для создания диагностических препаратов на основе синтетических антигенов. В этой связи был предпринят синтез амидов галактурановой кислоты с различными аминокислотами с

последующим превращением их в синтетические антигены посредством иммобилизации на матрице полиакриламида методом сополимеризации.<sup>209,210</sup> Синтез амидов был осуществлен по схеме 16.<sup>211</sup>

Схема 16



Уроновая кислота предварительно переводилась в гликозид 2-азидоэтанола, остаток которого далее превращался в синтетический антиген. 2'-Азидоэтил-2,3,4-три-*O*-ацетил- $\alpha$ -галактопиранозидуронат **172** вводили в реакцию конденсации с *tert*-бутиловым эфиром аминокислоты **173** ( $R = \text{Me}$ ,  $R = (\text{CH}_2)_4\text{NHCOOBu}^t$ ,  $R = \text{CH}_2\text{OBu}^t$ ,  $R = \text{CH}(\text{Me})\text{OBu}^t$ ) в присутствии этил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин-1-карбоксилата. После депротекции продуктов конденсации **174** были получены соответствующие производные галактураноил-D- и -L-аланина, -L-серина, -L-треонина, -D- и -L-лизина **175** ( $R' = \text{N}_3$ ).



Азиды (**175**,  $R' = \text{N}_3$ ) гидрировали в амины (**175**,  $R' = \text{NH}_2$ ), которые затем *N*-ацелировали акрилоилхлоридом. Полученные производные акриловой кислоты (**175**,  $R' = \text{NHCOCH}=\text{CH}_2$ ) превращали сополимеризацией с акриламидом в синтетические антигены **176** ( $R$  — остаток галактураноиламинокислоты).<sup>211</sup>

Сравнение иммунологической специфичности полученных искусственных антигенов и природного ЛПС, выделенного из бактерии, позволило определить иммунодоминантную группировку.<sup>212</sup> Так, например, в ПС *P. penneri* 12 такой группой является остаток L-треонина, так как из всех синтетических антигенов только антиген, содержащий эту аминокислоту, оказался активным.

## 6. Фосфатные группировки

Особое место среди заместителей, изменяющих общий характер полисахаридной цепи, занимают группировки, содержащие остатки неорганических кислот, такие как сульфатные и фосфатные. Они образуют вдоль цепи биополимера фрагменты, несущие локализованные заряды, что сказывается как на общем характере полимерной цепи, так и на ее детерминантных сайтах. О присутствии сульфатных групп в *O*-антигенных ПС достаточно определенные сведения пока отсутствуют, хотя эти группы широко распространены в других ПС, в особенности в ПС морских организмов, например водорослей, что, несомненно, связано с особенностями минерального состава среды обитания.



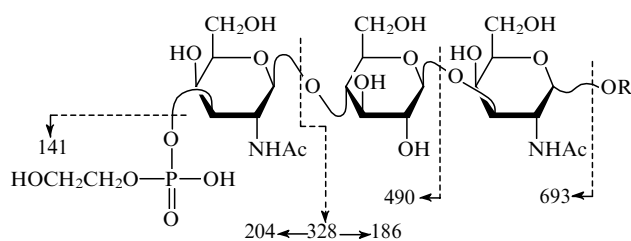
Фосфатные группы обнаружены во многих природных ПС, найдены они и в О-антигенных ПС, причем количество известных фосфорилированных О-антигенных ПС быстро возрастает. Следует различать два случая включения фосфорсодержащих группировок в ПС. Они могут присутствовать как заместители, присоединенные к одной из гидроксильных групп моносахаридных звеньев полисахаридной цепи, или входить в основной скелет полисахарида, соединяя вместо гликозидной связи моносахаридные или олигосахаридные фрагменты основной цепи биополимера. В последнем случае фактически образуется новый тип биополимера, который не является полисахаридом в истинном смысле слова, так как его основная цепь состоит из гликозидных и фосфодиэфирных связей. Фактически он занимает промежуточное место между ПС и тейхоевыми кислотами.

В настоящем обзоре биополимеры этого типа не рассматриваются, также как и липид А, где фосфатные группы входят в состав дисахарида.<sup>1</sup>

Присутствие О-фосфатных заместителей в цепях О-антигенных ПС достаточно хорошо известно. Обычно это фосфодиэфирные группы, этерифицирующие моносахаридное звено и остаток какого-либо спирта или аминок спирта.

Наличие фосфодиэфирной группы в ПС подтверждено (помимо анализа ПС на содержание фосфора) данными спектроскопии ЯМР <sup>31</sup>P. Характер второго неуглеводного заместителя в фосфодиэфирной группировке также часто вытекает из данных спектроскопии ЯМР и окончательно устанавливается при определении положения фосфодиэфирной группировки в цепи ПС, что достигается в каждом конкретном случае различными путями.

В ПС бактерии *Citrobacter* O16<sup>213</sup> была найдена группировка глицеринфосфата, замещающая гидроксильную группу в остатке N-ацетилгалактозамина. Полисахарид содержал 3% фосфора, и в его спектре ЯМР <sup>31</sup>P наблюдался сигнал фосфодиэфирной группы при 0.48 м.д. Присутствие глицерина было констатировано по данным ГЖХ кислого гидролизата ПС. Для локализации глицеринфосфатной группировки ПС был подвергнут распаду по Смитсу с последующим мягким кислотным гидролизом, в результате чего был выделен олигосахарид **177**, содержащий фосфатную группу.



177

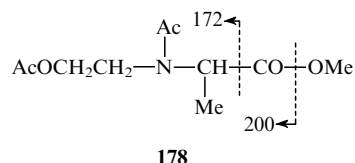
ФАВ-масс-спектр олигосахарида **177** содержал характерный фрагмент с  $m/Z$  328, что свидетельствовало о наличии фосфодиэфирной группы у остатка N-ацетилгалактозамина. Это также подтверждалось присутствием фрагмента с  $m/Z$  141, соответствующего остатку фосфодиэфирной группы, модифицированной окислением  $\text{HIO}_4$  (остаток глицерина превращался в остаток этиленгликоля). Присутствие фрагментов с  $m/Z$  490 и 693 указывало на то, что фосфорилированный моносахарид находился на невосстанавливаемом конце олигосахарида **177**, чем и определялось его положение в цепи ПС, найденное при структурном анализе последнего. Этот результат был подтвержден и данными спектроскопии ЯМР <sup>13</sup>C, из которых также следовало, что глицеринфосфатная группа замещает гидроксильную группу у атома С(3) галактозамина, так как сигнал последнего сдвинут в слабое поле по сравнению с сигналом незамещенного моносахарида (72.4 → 76.4 м.д.).

Глицеринфосфатная группировка была найдена также в ПС *E. coli* O100. Этот ПС исследовался еще классическими методами.<sup>214</sup> Замещение в нем одной из гидроксильных групп моносахаридной цепи доказывалось отщеплением глицеринфосфата при щелочном гидролизе ПС без разрыва полимерной цепи ПС. Присоединение заместителя к одной из гидроксильных групп остатка рамнозы следовало из того, что в нативном ПС остаток этого моносахарида не окислялся периодатом, тогда как в дефосфорилированном ПС он разрушался.

В некоторых ПС фосфодиэфирная группировка содержала остаток этаноламина, как например, в ПС *Proteus mirabilis* O27.<sup>207</sup> В спектре ЯМР <sup>31</sup>P полисахарида, содержащего 2.5% фосфора, имеется сигнал в области 1.33 м.д., свидетельствующий о наличии фосфодиэфирной группировки. Этанолламин был идентифицирован после кислотного гидролиза ПС обычным способом, а его наличие подтверждалось присутствием в спектре ЯМР <sup>13</sup>C сигналов при 63.2 (CH<sub>2</sub>OH) и 41.5 м.д. (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Оба сигнала, так же как и сигналы атомов С(5) и С(6) N-ацетилглюкозамина, входящего в состав ПС, расщеплялись за счет присутствия соседнего атома фосфора, из чего следовало, что фосфодиэфирная группа связана с атомом С(6) N-ацетилглюкозамина. Удаление остатка этаноламина при дефосфорилировании ПС подтвердило его связь с фосфатной группой. Оказалось, что фосфодиэфирная группа замещает в ПС только 80% остатков моносахарида. Это было установлено на основании спектра ЯМР <sup>13</sup>C, который содержал две серии сигналов атомов С(4), С(5) и С(6) глюкозамина, из которых 80% относились к фосфорилированному моносахариду, а 20% — к незамещенному.

2-Аминоэтилфосфатная группа была найдена в ПС *P. penneri* 8, где ее присутствие у атома С(6) N-ацетилглюкозамина доказывалось аналогичными приемами.<sup>205</sup>

Более сложный фосфодиэфирный заместитель, содержащий остаток N-(2-гидроксиэтил)-D-аланина, найден в ПС *P. mirabilis* O3.<sup>215</sup> Полисахарид с 2.5% фосфора дефосфорилировали действием концентрированной водной HF. Образовавшаяся аминокислота была выделена из гидролизата хроматографически и превращена в метиловый эфир N,O-диацетата **178**, масс-спектр которого содержал ионы с  $m/Z$  200 ( $\text{M}-\text{OCH}_3$ )<sup>+</sup> и  $m/Z$  172 ( $\text{M}-\text{CH}_3\text{OOC}$ )<sup>+</sup>, типичные для фрагментации молекулярного иона этого типа.



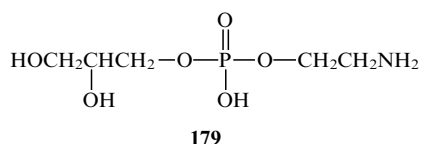
178

Присутствие в спектре ЯМР <sup>13</sup>C аминокислоты сигналов при 15.4 (CH<sub>3</sub>) 48.8 (CH<sub>2</sub>N), 58.2 (CHN), 56.9 (CH<sub>2</sub>O) и 172.5 м.д. (COOH) соответствовало строению, принятому для этой аминокислоты. Ее связь с фосфатной группой подтверждается тем, что сигналы углеродных атомов CH<sub>2</sub>N- и CH<sub>2</sub>O-групп смещены от 48.3 и 54.7 м.д. (в свободной аминокислоте) к 47.5 и 62.3 м.д. (в ПС) и расщеплены за счет С-Р-взаимодействия. Связь этого сложного фосфодиэфирного заместителя с гидроксильной группой при атоме С(6) галактозного звена в цепи ПС вытекает из того, что сигнал атома С(5) этого моносахарида в спектре ЯМР <sup>13</sup>C нативного ПС расщеплен и смещен в сильное поле по сравнению с дефосфорилированным ПС (71.8 → 70.6 м.д.), а сигнал С(6) — в слабое поле (62.2 → 66.0 м.д.).

Известны случаи, когда в одном и том же ПС присутствуют две различные фосфодиэфирные группы, связанные с различными моносахаридными звеньями ПС. Примером может служить ПС *P. mirabilis* D52, содержащий остатки 2-аминоэтилфосфата и рибитфосфата.<sup>216</sup>

Этот ПС был исследован классическими методами. Он содержал наряду с фосфором 14.5% рибита и 2.6% этаноламина, которые после жесткого кислотного гидролиза были выделены и идентифицированы обычными методами. Оба остатка отщеплялись и при щелочном гидролизе без разрушения полисахаридной цепи, что указывало на их присутствие в боковой цепи, а не в составе основного скелета биополимера. Реакция аминогруппы этаноламина с 2,4-динитрофторбензолом свидетельствовала о ее незамещенности и о том, что аминспирт фосфорилирован по гидроксильной группе. Остаток рибита полностью окислялся  $\text{HNO}_4$  с выделением формальдегида и муравьиной кислоты, что доказывало фосфорилирование рибита по одной из первичных спиртовых групп.

Место фосфодиэфирных заместителей в цепи определялось в ходе установления строения ПС, для чего он расщеплялся путем кислотного гидролиза или несколькими распадами по Смитту. Полученные олигосахариды анализировали классическими методами. Так, анализ одного из фрагментов, полученного многоступенчатым распадом ПС по Смитту, показал, что 2-аминоэтилфосфатная группа находится у атома С(6) одного из двух галактозных звеньев. Это следует из строения фрагмента **179**, содержащего 2-аминоэтилфосфатный заместитель у остатка глицерина — конечного продукта распада галактозного звена по Смитту.



Присутствие рибитфосфатной группировки у второго галактозного звена вытекает из того, что в нативном ПС оно не окисляется  $\text{HNO}_4$ , тогда как в дефосфорилированном ПС — окисляется. Это происходит потому, что при дефосфорилировании возникает видоизмененная гликольная группировка. Следовательно, рибитфосфатная группа располагается у атома С(3) галактозы. Поскольку в ходе изучения строения цепи ПС место указанных галактозных звеньев было установлено, то фиксируется и положение в цепи обеих фосфодиэфирных группировок.

Рассматривая этот довольно сложный случай структурного анализа ПС, следует отметить, что использование спектроскопии ЯМР позволяет быстро, просто и однозначно решать подобные задачи.

## V. Заключение

В настоящем обзоре приведены данные о новых малоизвестных моносахаридах, обнаруженных в составе О-антигенных полисахаридов грамотрицательных бактерий, многие из которых найдены пока только в этом классе природных соединений. Эти данные, полученные главным образом в лаборатории химии углеводов ИОХ РАН, свидетельствуют о том, что старое классическое представление о моносахаридах как о небольшой группе близких по структуре органических веществ не соответствует действительности.

Моносахариды представляют обширный класс органических соединений, объединенных общим свойством — способностью образовывать циклические кислородсодержащие системы, находящиеся в таутомерном равновесии с соответствующими полизамещенными гидроксильными алдехидами или гидроксикетонами. Если к приведенным данным добавить сведения о многочисленных моносахаридах, открытых в составе антибиотиков и некоторых других природных веществ, то следует говорить о большом классе соединений, углеродный скелет которых содержит самые разнообразные функциональные группы и заместители, причем количество отдельных представителей в значительной степени увеличи-

вается благодаря их стереохимическим различиям, обусловленным наличием большого числа хиральных центров. Не следует также забывать, как быстро растет количество новых моносахаридов, содержащих более шести углеродных атомов (в том числе имеющих разветвленную углеродную цепь).

Столь кардинальное расширение класса моносахаридов потребовало новых методов установления их строения и стереоспецифического синтеза и новых концепций о пространственном строении молекул.

Из представленного в настоящем обзоре материала видно, насколько важным оказалось применение новых методов для установления строения и идентификации неизвестных ранее моносахаридов и их производных. При этом особенно ярко видна выдающаяся роль физико-химических исследований, без которых не смогла бы далее развиваться эта сложная область органической химии.

В кратком обзоре, естественно, невозможно, да и не нужно, приводить все детали структурного анализа. Сделана попытка изложить лишь основной путь и общую логику исследования строения, которая значительно различается для моносахаридов различного типа. Приведенные синтезы некоторых представителей моносахаридов демонстрируют особенности стереоспецифического построения достаточно сложных соединений, которые могут оказаться полезными при обсуждении путей синтеза других полихиральных систем.

В заключение нужно еще раз отметить, что данные, приведенные в обзоре, имеют существенное значение для развития молекулярных представлений в сопредельных науках биологического профиля — биохимии, иммунохимии, иммунологии и молекулярной биологии.

Информация о тонкой структуре моносахаридов, составляющих основу важного класса микробных полисахаридов, помимо своего фундаментального естественно-научного значения, играет первостепенную роль в решении прикладных задач, прежде всего в дизайне и синтезе биологически активных веществ нового поколения, в особенности лекарственных препаратов, предназначенных для химиотерапии инфекционных заболеваний, а также для их надежной диагностики.

## Литература

1. Ю.А.Книрель, Н.К.Кочетков. *Биохимия*, **58**, 166 (1993)
2. Ю.А.Книрель, Н.К.Кочетков. *Биохимия*, **59**, 1784 (1994)
3. V.N.Shibaev. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **44**, 277 (1986)
4. K.Jann, O.Westphal. In *The Antigens. Vol.3.* (Ed. M.Sela). Academic Press, New York, 1975. P.1
5. S.G.Wilkinson. *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell.* (Ed. I.M.Sutherland). Academic Press, London, 1977
6. V.Lindberg. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **48**, 279 (1990)
7. О.Вестфаль, К.Янн. В кн. *Методы химии углеводов.* (Под ред. Р.Л.Уистлера, М.Л.Вольфрома). Мир, Москва, 1967. С.325
8. Yu.A.Kniriel, E.V.Vinogradov, A.J.Mort. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **47**, 167 (1989)
9. В кн. *Методы химии углеводов.* (Под ред. Р.Л.Уистлера, М.Л.Вольфрома). Мир, Москва, 1967. С.58; 467
10. M.Williams. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **31**, 9 (1975)
11. P.Jansson, L.Kenne, H.Liedgren, B.Lindberg, G.Lönngren. *Chem. Commun. Univ. Stockholm.*, **8** (1976)
12. B.A.Dmitriev, Yu.A.Kniriel, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **40**, 365 (1975)
13. B.A.Dmitriev, Yu.A.Kniriel, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **44**, 77 (1975)
14. N.K.Kochetkov, O.S.Chizhov. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **21**, 39 (1966)
15. N.K.Kochetkov, O.S.Chizhov, N.V.Molodtsov. *Tetrahedron*, **24**, 5587 (1968)
16. Л.С.Головкина, О.С.Чижов, Н.С.Вульфсон. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1915 (1966)
17. Л.С.Головкина, Н.С.Вульфсон, О.С.Чижов. *Журн. орг. химии*, **14**, 737 (1968)

18. H.Bjorndal, B.Lindberg, S.Svensson. *Carbohydr. Res.*, **5**, 433 (1967)
19. H.Bjorndal, C.Hellerquist, B.Lindberg, S.Svensson. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **9**, 610 (1970)
20. G.Lönngren, S.Svensson. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **29**, 433 (1974)
21. K.Bock, H.Thorgersen. *Annu. Rep. N.M.R. Spectrosc.*, **13**, 1 (1982)
22. J.Dabrowsky. In *Two Dimensional NMR Spectroscopy: Application for Chemists and Biochemists*. VCH, New York, 1987. P.349
23. J.Dabrowsky. *Methods Enzymol.*, **179**, 122 (1989)
24. N.K.Kochetkov, A.S.Shashkov, G.M.Lipkind, Yu.A.Knirel. *Sov. Sci. Rev., Sect. B, Part. 2*, **13**, 1 (1989)
25. K.Bock, C.Pedersen. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41**, 27 (1983)
26. K.Bock, C.Pedersen. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **42**, 193 (1984)
27. G.M.Lipkind, A.S.Shashkov, Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **175**, 75 (1988)
28. W.Klyne. *Biochem. J.*, **47**, Xiii (1950)
29. D.I.Neal, S.G.Wilkinson. *Carbohydr. Res.*, **69**, 191 (1979)
30. N.A.Kocharova, Yu.A.Knirel, A.S.Shashkov, N.E.Nifantiev, N.K.Kochetkov, L.D.Varbanetz, N.V.Moskalenko, O.S.Brovarskaya, V.A.Muras. *Carbohydr. Res.*, **250**, 278 (1993)
31. Ю.А.Книрель, А.С.Шашков, М.А.Солдаткина, Н.А.Парамонов, И.Я.Захарова. *Биоорг. химия*, **14**, 1208 (1988)
32. E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, Yu.A.Knirel, G.M.Zdorovenko, L.P.Solyanik, R.I.Gvosdyak. *Carbohydr. Res.*, **212**, 295 (1991)
33. В.А.Хоменко, Г.А.Набережных, В.В.Исаков, Т.Ф.Соловьева, Ю.С.Оводов, Ю.А.Книрель, Е.В.Виноградов. *Биоорг. химия*, **12**, 1641 (1986)
34. S.G.Wilkinson, L.Galbraith, W.I.Anderton. *Carbohydr. Res.*, **112**, 241 (1983)
35. Yu.A.Knirel, N.A.Paramonov, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov, R.G.Jarullin, S.Farber, V.I.Efremenko. *Carbohydr. Res.*, **233**, 185 (1992)
36. F.Oerskov, J.Oerskov, B.Jann. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **71**, 339 (1967)
37. H.Kaufman, P.Muhlradt, T.Reichstein. *Helv. Chim. Acta.*, **50**, 2287 (1967)
38. J.Hofman, B.Lindberg, R.Brubaker. *Carbohydr. Res.*, **78**, 212 (1980)
39. R.P.Gorshkova, E.N.Kalmykova, V.V.Isakov, Yu.S.Ovodov. *Eur. J. Biochem.*, **150**, 527 (1985)
40. Н.И.Корчагина, Р.П.Горшкова, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **8**, 1666 (1982)
41. Е.Н.Калмыкова, Р.П.Горшкова, В.В.Исаков, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **14**, 652 (1988)
42. Yu.E.Tsvetkov, L.V.Backinowsky, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **193**, 75 (1989)
43. E.Romanowska, A.Romanowska, C.Lugowski, E.Katzenellenbogen. *Eur. J. Biochem.*, **121**, 119 (1981)
44. A.Gamian, E.Romanowska, A.Romanowska, C.Lugowski, J.Dabrowski, K.Trauner. *Eur. J. Biochem.*, **146**, 641 (1985)
45. O.Westphal, O.Lüderitz, I.Fromme, N.Joseph. *Angew. Chem.*, **65**, 555 (1953)
46. O.Westphal, O.Lüderitz. *Angew. Chem.*, **72**, 35 (1960)
47. K.Jann, B.Jann. *Handbook of Endotoxin, Vol.1*. Elsevier, Amsterdam, 1984. P.138
48. L.Kenne, B.Lindberg, E.Söderholm, D.Bundle, D.Griffith. *Carbohydr. Res.*, **111**, 289 (1983)
49. O.Lüderitz. *Biochem. Z.*, **330**, 193 (1958)
50. Р.П.Горшкова, В.А.Зубков, В.В.Исаков, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **9**, 1401 (1983)
51. R.P.Gorshkova, N.I.Korchagina, Yu.S.Ovodov. *Eur. J. Biochem.*, **131**, 345 (1983)
52. В.В.Исаков, Р.П.Горшкова, С.В.Томич, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **7**, 559 (1981)
53. В.В.Исаков, Н.А.Командрова, Р.П.Горшкова, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **9**, 1565 (1983)
54. Н.А.Командрова, Р.П.Горшкова, В.В.Исаков, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **10**, 232 (1984)
55. Р.П.Горшкова, В.В.Исаков, Л.С.Шевченко, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **17**, 252 (1991)
56. Р.П.Горшкова, В.А.Зубков, В.В.Исаков, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **9**, 1068 (1983)
57. Н.А.Командрова, Р.П.Горшкова, В.А.Зубков, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **15**, 104 (1989)
58. T.Chawdhury, P.E.Jansson, B.Lindberg, J.Lindberg, B.Gustafson, T.Holme. *Carbohydr. Res.*, **215**, 303 (1991)
59. N.A.Kocharova, Yu.A.Knirel, E.S.Stanislavsky. In *Abstracts of Reports of the 6th European Symposium on Carbohydrates*. Edinburgh, 1991. A51
60. B.Jann, K.Prehm, K.Jann. *J. Bacteriol.*, **134**, 462 (1978)
61. J.Hofman, B.Lindberg, T.Hofstad, N.Skand. *Carbohydr. Res.*, **66**, 67 (1978)
62. B.Lindberg, F.Lindh, J.Löngren, A.Lindberg, S.Svensson. *Carbohydr. Res.*, **97**, 105 (1981)
63. G.Hellerquist, B.Lindberg, S.Svensson, T.Holme, A.Lindberg. *Carbohydr. Res.*, **8**, 43 (1968)
64. K.Bock, C.Pedersen. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41**, 56 (1983)
65. O.Westphal, S.Stirm. *Liebigs Ann. Chem.*, **620**, 8 (1959)
66. J.Fourquey. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 803 (1959)
67. G.Ekberg, P.Garregg, B.Gothammer. *Acta Chem. Scand., Ser. B*, **29**, 765 (1975)
68. А.Б.Левинский. Дис. канд. хим. наук. ИОХ РАН, Москва, 1993
69. V.Classon, P.Garregg, B.Samuelson. *Can. J. Chem.*, **59**, 339 (1981)
70. I.-C.Florent, C.Monnerat, Q.Kuang-Huu. *Carbohydr. Res.*, **56**, 301 (1977)
71. D.Bundle, S.Josephson. *Can. J. Chem.*, **56**, 2686 (1978)
72. Ю.А.Книрель, Н.К.Кочетков. *Биохимия*, **58**, 182 (1993)
73. Ю.А.Книрель, Н.В.Танатар, М.А.Солдаткина, А.С.Шашков, И.Я.Захарова. *Биоорг. химия*, **14**, 77 (1988)
74. А.А.Ансари, L.Kenne, B.Lindberg, B.Gustafson, T.Holme. *Carbohydr. Res.*, **150**, 213 (1986)
75. K.Dzrewiszek, A.Zamoiski. *Carbohydr. Res.*, **150**, 163 (1986)
76. G.O.Aspinall, A.G.McDonald, H.Pang. *Carbohydr. Res.*, **231**, 13 (1992)
77. N.K.Khare, R.K.Sood, G.O.Aspinall. *Can. J. Chem.*, **72**, 237 (1994)
78. A.Donadoni, G.Fantin, M.Fagagnolo, A.Medici. *Tetrahedron*, **43**, 3533 (1987)
79. G.O.Aspinall, M.G.McDonald, R.S.Sood. *Can. J. Chem.*, **72**, 247 (1994)
80. S.Schramek, I.Radziewska-Lebrecht, H.Mayer. *Eur. J. Biochem.*, **148**, 455 (1985)
81. В.В.Кулаева, М.К.Кудинова, Н.П.Потапова, Л.М.Рубашова, М.Г.Бражникова, Б.В.Розынов, А.Р.Беккер. *Биоорг. химия*, **4**, 1087 (1978)
82. R.P.Gorshkova, V.A.Zubkov, V.V.Isakov, Yu.S.Ovodov. *Carbohydr. Res.*, **126**, 308 (1984)
83. Р.П.Горшкова, В.А.Зубков, В.В.Исаков, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **13**, 1146 (1987)
84. В.А.Зубков, А.Ф.Свиридов, Р.П.Горшкова, А.С.Шашков, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **15**, 192; 538 (1989)
85. V.A.Zubkov, R.P.Gorshkova, Yu.S.Ovodov, A.F.Sviridov, A.S.Shashkov. *Carbohydr. Res.*, **225**, 189 (1992)
86. M.Adinolfi, M.Corsaro, C.DeCastro, L.Lanzetta, M.Parilli, A.Evidente, P.Lavermicoca. *Carbohydr. Res.*, **267**, 307 (1995)
87. M.Adinolfi, M.Corsaro, C.DeCastro, L.Lanzetta, A.Evidente, L.Mangoni, M.Parilli. *Carbohydr. Res.*, **274**, 223 (1995)
88. N.Harada, K.Nakanishi. *Circular Dichroic Spectroscopy-Exiton Coupling in Organic Chemistry*. Oxford University Press, London, 1983
89. A.Cox, S.Wilkinson. *Carbohydr. Res.*, **195**, 295 (1990)
90. B.Jann, K.Jann. *Eur. J. Biochem.*, **5**, 173 (1968)
91. S.A.Barker, I.S.Brimacombe, M.I.How, M.Stacey, J.M.Williams. *Nature (London)*, 303 (1961)
92. В.А.Дмитриев, В.Л.Лвов, Н.В.Тоцтамышева, А.С.Шашков, Н.К.Кочетков, В.А.Зубков, К.А.Зубков. *Eur. J. Biochem.*, **134**, 517 (1983)
93. E.Katzenellenbogen, E.Romanowska, A.S.Shashkov, N.A.Kocharova, Yu.A.Knirel, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **259**, 67 (1994)
94. E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, Yu.A.Knirel, N.K.Kochetkov, Z.Sidorczyk, A.Swierzko. *Carbohydr. Res.*, **219**, C1 (1991)
95. L.Kenne, B.Lindberg, M.Rahman, M.Mosihuzzman. *Carbohydr. Res.*, **243**, 131 (1993)
96. I.Banoub, F.Mishon, H.I.Holder. *Biochem. Cell. Biol.*, **65**, 19 (1987)
97. I.Banoub, D.Shaw. *Carbohydr. Res.*, **98**, 93 (1981)

98. V.L.Lvov, N.V.Tochtamysheva, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, K.Čapek. *Carbohydr. Res.*, **112**, 233 (1983)
99. P.-E.Jansson, B.Lindberg, M.Spellman, T.Hofstad, N.Skaug. *Carbohydr. Res.*, **137**, 197 (1985)
100. W.Kondo, F.Nakazawa, T.Ito. *Carbohydr. Res.*, **83**, 129 (1980)
101. H.Baer, K.Čapek. *Can.J.Chem.*, **47**, 99 (1969)
102. K.Čapek, J.Steffkova, J.Jary. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 1854 (1966)
103. V.L.Lvov, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **126**, 249 (1984)
104. Ю.А.Книрель, В.М.Дашунин, А.С.Шашков, Б.А.Дмитриев, Н.К.Кочетков, И.Л.Гофман. *Биоорг. химия*, **13**, 1002 (1987)
105. Yu.A.Knirel, V.M.Dashunin, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov, B.A.Dmitriev, I.L.Hofman. *Carbohydr. Res.*, **179**, 51 (1988)
106. E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, Yu.A.Knirel, N.K.Kochetkov, N.V.Tochtamysheva, S.F.Averin, O.V.Goncharova, V.S.Khlebnikov. *Carbohydr. Res.*, **214**, 289 (1991)
107. H.Eguichi, Sh.Kaya, Y.Araki, N.Kojima, Sh.Vokata. *Carbohydr. Res.*, **231**, 159 (1992)
108. E.Katzenellenbogen, E.Romanowska, N.A.Kocharova, Yu.A.Knirel, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **231**, 249 (1992)
109. L.Kenne, B.Lindberg, P.Unger, B.Gustafson, T.Holme. *Carbohydr. Res.*, **100**, 341 (1982)
110. В.Л.Львов, В.Е.Маликов, А.С.Шашков, Е.А.Драновская, Б.А.Дмитриев. *Биоорг. химия*, **11**, 963 (1985)
111. D.Bundle, M.Gereken, M.Perry. *Can. J. Chem.*, **64**, 255 (1986)
112. M.Perry, D.Bundle, L.MacLean, J.Perry, D.Griffith. *Carbohydr. Res.*, **156**, 107 (1986)
113. M.Perry, D.Bundle. *Infect. Immunol.*, **58**, 1391 (1990)
114. M.Perry, L.MacLean, D.Griffith. *Biochem. Cell. Biol.*, **64**, 21 (1986)
115. M.Carrof, D.Bundle, M.Perry. *Eur. J. Biochem.*, **139**, 195 (1984)
116. L.DiFabio, M.Perry, D.Bundle. *Biochem. Cell. Biol.*, **65**, 968 (1987)
117. L.Kenne, B.Lindberg, C.Lugowski, S.Svensson. *Carbohydr. Res.*, **151**, 349 (1986)
118. Yu.A.Knirel, N.A.Paramonov, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov, G.M.Zdorovenko, S.N.Veremeychenko, I.Ya.Zakharova. *Carbohydr. Res.*, **243**, 205 (1993)
119. C.I.Stevens, P.Blumbergs, F.Daniher, D.Henbach, K.Taylor. *J. Org. Chem.*, **31**, 2822 (1966)
120. A.Anderson, J.Richards, M.Perry. *Carbohydr. Res.*, **237**, 249 (1992)
121. U.Zehavi, N.Sharon. *J. Biol. Chem.*, **248**, 433 (1973)
122. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, E.Wilkinson, Y.Tahara, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislavsky, G.M.Mashilova. *Eur. J. Biochem.*, **155**, 659 (1986)
123. Ю.А.Книрель, Г.М.Здоровенко, С.Н.Веремейченко, Г.М.Липкинд, А.С.Шашков, И.Я.Захарова, Н.К.Кочетков. *Биоорг. химия*, **14**, 352 (1988)
124. K.Hermanson, P.-E.Janson, T.Holme, B.Gustafson. *Carbohydr. Res.*, **248**, 199 (1993)
125. K.Hermanson, M.B.Perry, E.Altman, J.R.Brisson, M.M.Garcia. *Eur. J. Biochem.*, **212**, 801 (1993)
126. L.Kenne, B.Lindberg, K.Petersen, E.Katzenellenbogen, E.Romanowska. *Carbohydr. Res.*, **78**, 119 (1980)
127. E.V.Vinogradov, Yu.A.Knirel, N.K.Kochetkov, S.Schlecht, H.Mayer. *Carbohydr. Res.*, **253**, 101 (1994)
128. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislavsky, G.M.Mashilova. *Eur. J. Biochem.*, **150**, 541 (1985)
129. Yu.A.Knirel, N.A.Kocharova, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov, E.V.Kholodkova, E.S.Stanislavsky. *Eur. J. Biochem.*, **166**, 189 (1987)
130. Yu.A.Knirel, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **133**, C12 (1984)
131. K.Heyns, G.Kiessling. *Carbohydr. Res.*, **3**, 340 (1967)
132. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislavsky, G.M.Mashilova. *Eur. J. Biochem.*, **125**, 221 (1982)
133. Е.Л.Назаренко, В.А.Зубков, А.С.Шашков, Ю.А.Книрель, Р.П.Горшкова, Е.П.Иванова, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **19**, 740 (1993)
134. T.Kontrohr. *Carbohydr. Res.*, **58**, 498 (1977)
135. Yu.A.Knirel, N.A.Kocharova, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **93**, C12 (1981)
136. B.A.Dmitriev, N.A.Kocharova, Yu.A.Knirel, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislavsky, G.M.Mashilova. *Eur. J. Biochem.*, **125**, 229 (1982)
137. I.Roppel, H.Mayer, I.Weckesser. *Carbohydr. Res.*, **40**, 31 (1975)
138. H.Baer, T.Nelson. *J. Org. Chem.*, **32**, 1068 (1967)
139. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislavsky, G.M.Mashilova. *Eur. J. Biochem.*, **128**, 81 (1982)
140. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislavsky, G.M.Mashilova. *Eur. J. Biochem.*, **134**, 289 (1983)
141. Ю.А.Книрель, Н.А.Парамонов, Е.В.Виноградов, А.С.Шашков, Б.А.Дмитриев, Н.К.Кочетков. *Биоорг. химия*, **12**, 995 (1986)
142. R.D.Guthrie, D.Murry. *J. Chem. Soc.*, 6956 (1965)
143. Yu.A.Knirel, N.A.Paramonov, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov, E.V.Kholodkova, E.S.Stanislavsky. *Eur. J. Biochem.*, **167**, 549 (1987)
144. Ю.А.Книрель, Н.А.Парамонов, Е.В.Виноградов, А.С.Шашков, Н.К.Кочетков. *Биоорг. химия*, **12**, 992 (1986)
145. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, N.A.Kocharova, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **122**, 181 (1983)
146. I.L.DiFabio, M.Caroff, D.Karabian, J.Richards, M.Perry. *FEMS Microbiol. Lett.*, **97**, 275 (1992)
147. A.S.Shashkov, S.Campos-Portuguez, H.Kochanowski, A.Yokata, H.Mayer. *Carbohydr. Res.*, **269**, 157 (1995)
148. E.V.Vinogradov, Yu.A.Knirel, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **170**, C1 (1987)
149. F.M.Unger. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **38**, 323 (1981)
150. R.Schauer. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **40**, 132 (1982)
151. E.V.Vinogradov, N.A.Paramonov, Yu.A.Knirel, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **242**, C11 (1993)
152. A.Gamian, L.Kenne. *J. Bacteriol.*, **175**, 1508 (1993)
153. G.Kogan, B.Jann, K.Jann. *Carbohydr. Res.*, **238**, 335 (1993)
154. G.Kogan, B.Jann, K.Jann. *FEMS Microbiol. Lett.*, **91**, 135 (1992)
155. G.Kogan, A.S.Shashkov, B.Jann, K.Jann. *Carbohydr. Res.*, **238**, 261 (1993)
156. V.I.Torgov, A.S.Shashkov, B.Jann, K.Jann. *Carbohydr. Res.*, **272**, 73 (1995)
157. A.Gamian, E.Romanowska, U.Dabrowski, J.Dabrowski. *Biochemistry*, **30**, 5032 (1991)
158. E.V.Vinogradov, O.Holst, J.Thomas-Oates. *Eur. J. Biochem.*, **210**, 491 (1992)
159. E.I.McGuire, S.B.Binkley. *Biochemistry*, **3**, 247 (1964)
160. I.Vliegenhardt, L.Dorland, J. van Halbeek, J.Havercamp. In *Sialic Acids*. (Ed. R.Shauer). Springer-Verlag, Wien, 1982
161. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, V.L.Lvov, N.A.Kocharova, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov. *Carbohydr. Res.*, **133**, C5 (1984)
162. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov, V.L.Lvov, B.A.Dmitriev. *Carbohydr. Res.*, **141**, C1 (1985)
163. Yu.A.Knirel, N.A.Kocharova, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislavsky, G.M.Mashilova. *Eur. J. Biochem.*, **163**, 639 (1987)
164. В.Л.Львов, А.С.Шашков, Б.А.Дмитриев. *Биоорг. химия*, **13**, 223 (1987)
165. L.Kenne, B.Lindberg, E.Schweda, B.Gustafson, T.Holme. *Carbohydr. Res.*, **180**, 285 (1988)
166. L.Svennerholm. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 604 (1957)
167. E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, Yu.A.Knirel, N.K.Kochetkov, J.Dabrowsky, H.Grosskurth, E.S.Stanislavsky, E.Kholodkova. *Carbohydr. Res.*, **231**, 1 (1992)
168. Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, B.A.Dmitriev, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislavsky, G.M.Mashilova. *Eur. J. Biochem.*, **163**, 627 (1987)
169. Ю.А.Книрель, Е.В.Виноградов, А.С.Шашков, Б.А.Дмитриев, Н.К.Кочетков. *Биоорг. химия*, **12**, 848 (1986)
170. Е.Л.Назаренко, А.С.Шашков, Ю.А.Книрель, Е.П.Иванова, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **16**, 1426 (1990)
171. Yu.A.Knirel, E.T.Rietschel, R.Marre, U.Zähringer. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 239 (1994)
172. J.Brom, K.Neel, G.Williamson. *Biochem. J.*, **163**, 173 (1977)
173. H.Bjorndal, B.Lindberg, W.Nimmich. *Acta Chem. Scand.*, **24**, 3414 (1970)

174. R.Stange, L.Kent. *Biochem. J.*, **71**, 333 (1959)
175. O.Hoshino, U.Zehavi, P.Sinay, R.Jeanloz. *J. Biol. Chem.*, **247**, 381 (1972)
176. N.K.Kochetkov, A.F.Sviridov, Kh.Arifkhodzhaev, O.Chizhov, A.S.Shashkov. *Carbohydr. Res.*, **71**, 193 (1979)
177. B.Lindberg, B.Lindquist, J.Löngren, W.Nimmich. *Carbohydr. Res.*, **49**, 411 (1976)
178. Н.К.Кочетков, Б.А.Дмитриев, Л.В.Бакиновский, В.Л.Львов. *Биоорг. химия*, **1**, 1238 (1975)
179. N.K.Kochetkov, B.A.Dmitriev, V.L.Lvov. *Carbohydr. Res.*, **54**, 253 (1977)
180. B.A.Dmitriev, V.L.Lvov, N.K.Kochetkov, B.Jann, K.Jann. *Eur. J. Biochem.*, **64**, 491 (1976)
181. P.П.Горшкова, Е.Л.Назаренко, В.А.Зубков, Е.П.Иванова, Ю.С.Оводов, А.С.Шашков, Ю.А.Книрель. *Биоорганическая химия*, **19**, 327 (1993)
182. L.Parolis, H.Parolis, G.Dutton, P.Wing, B.Skura. *Carbohydr. Res.*, **216**, 495 (1991)
183. N.K.Kochetkov, B.A.Dmitriev, L.V.Backinowsky. *Carbohydr. Res.*, **51**, 229 (1976)
184. Е.Л.Назаренко, В.А.Зубков, А.С.Шашков, Ю.А.Книрель, Н.А.Командрова, P.П.Горшкова, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **19**, 989 (1993)
185. Yu.A.Knirel, N.A.Paramonov, E.V.Vinogradov, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov, Z.Sidorczyk, A.Swierzko. *Carbohydr. Res.*, **235**, C19 (1992)
186. Yu.A.Knirel, N.A.Paramonov, E.V.Vinogradov, N.K.Kochetkov, Z.Sidorczyk, K.Zych. *Carbohydr. Res.*, **259**, C1 (1994)
187. L.Kenne, B.Lindberg, B.Lindquist, J.Lönnngren, R.Arie, R.Brown, I.Stewart. *Carbohydr. Res.*, **51**, 287 (1976)
188. Б.А.Дмитриев, Ю.А.Книрель, Е.В.Виноградов, Н.К.Кочетков, И.Л.Гофман. *Биоорг. химия*, **4**, 40 (1978)
189. A.Adeyeye, P.-E.Jansson, B.Lindberg, S.Abbas, S.Svensson. *Carbohydr. Res.*, **176**, 231 (1988)
190. P.Garegg, P.-E.Janson, B.Lindberg, F.Lindh, J.Lönnngren, I.Kvärnström, W.Nimmich. *Carbohydr. Res.*, **78**, 127 (1980)
191. M.Caroff, D.Bundle, M.Perry, I.Cherwonogrodzky, I.Duncan. *Infect. Immun.*, **46**, 384 (1984)
192. L.Kenne, P.Unger, T.Weehler. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1183 (1988)
193. Ю.А.Книрель, Е.В.Виноградов, Н.А.Парамонов, А.С.Шашков, Н.К.Кочетков, Е.С.Станиславский, Г.М.Машилова. *Биоорг. химия*, **12**, 1263 (1986)
194. Н.А.Парамонов, Ю.А.Книрель, Н.К.Кочетков. *Биоорг. химия*, **17**, 1111 (1991)
195. S.Kondo, K.Ishida, Y.Isshiki, Y.Haishima, T.Iguchi, K.Hisatsune. *Biochem. J.*, **292**, 531 (1993)
196. N.A.Kocharova, Yu.A.Knirel, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov, E.V.Kholodkova, E.S.Stanislawsky. *Carbohydr. Res.*, **264**, 123 (1994)
197. В.А.Зубков, P.П.Горшкова, Е.Л.Назаренко, А.С.Шашков, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **17**, 831 (1991)
198. E.V.Vinogradov, Z.Sidorczyk, A.Swierzko, A.Rosalski, E.Daeva, A.S.Shashkov, Yu.A.Knirel, N.K.Kochetkov. *Eur. J. Biochem.*, **197**, 93 (1991)
199. A.Gamian, R.Romanowska, H.Offenkuch. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 611 (1989)
200. E.Katrenellenbogen, E.Romanowska, U.Dabrowska, J.Dabrowsky. *Eur. J. Biochem.*, **200**, 410 (1992)
201. Г.А.Набережных, В.А.Хоменко, В.В.Исаков, Ю.Н.Елкин, Т.Ф.Соловьева, Ю.С.Оводов. *Биоорг. химия*, **13**, 1428 (1987)
202. H.Eguchi, Sh.Kaya, Y.Araji. *Carbohydr. Res.*, **231**, 147 (1992)
203. В.Л.Львов, И.В.Тохтамышева, А.С.Шашков, Б.А.Дмитриев, Н.К.Кочетков. *Биоорг. химия*, **9**, 60 (1983)
204. Yu.A.Knirel, Z.Sidorczyk, A.Rosalski, I.Radziwska-Lebrecht, W.Kaca. *J. Carbohydr. Chem.*, **12**, 379 (1993)
205. Z.Sidorczyk, A.Swierzko, Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.Chernyak, L.Kononov, M.Cedzynski, A.Rozalski, W.Kaca, A.S.Shashkov, N.K.Kochetkov. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 713 (1995)
206. Е.В.Виноградов, А.С.Шашков, Ю.А.Книрель, Н.К.Кочетков, Е.В.Холодкова, Е.С.Станиславский. *Биоорг. химия*, **13**, 660 (1987)
207. E.V.Vinogradov, D.Krajewska-Pietrasik, W.Kaca, A.S.Shashkov, Yu.A.Knirel, N.K.Kochetkov. *Eur. J. Biochem.*, **185**, 645 (1989)
208. Е.В.Виноградов, Ю.А.Книрель, Н.К.Кочетков, И.Радзиевска-Лебрехт, В.Каца. *Биоорг. химия*, **19**, 1132 (1993)
209. Н.К.Кочетков, Б.А.Дмитриев, А.Я.Черняк, В.И.Покровский, Ю.Я.Тендетник. *Докл. АН СССР*, **263**, 1277 (1982)
210. N.K.Kochetkov, B.A.Dmitriev, A.Ya.Chernyak, A.B.Levinsky. *Carbohydr. Res.*, **110**, C16 (1982)
211. A.Ya.Chernyak, L.O.Kononov, N.K.Kochetkov. *J. Carbohydr. Chem.*, **13**, 383 (1994)
212. Z.Sidorczyk, A.Swierzko, Yu.A.Knirel, E.V.Vinogradov, A.Ya.Chernyak, L.O.Kononov, M.Cedzynski, A.Rozalski, N.K.Kochetkov. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 713 (1995)
213. N.A.Kocharova, J.Thomas-Oates, Yu.A.Knirel, A.S.Shashkov, U.Dabrowska, N.K.Kochetkov, E.S.Stanislawsky, E.V.Kholodkova. *Eur. J. Biochem.*, **219**, 653 (1994)
214. B.Jann, K.Jann, G.Schmidt. *Eur. J. Biochem.*, **15**, 29 (1970)
215. E.V.Vinogradov, W.Kaca, A.S.Shashkov, D.Krajewska-Petrasik, A.Rosalski, Yu.A.Knirel, N.K.Kochetkov. *Eur. J. Biochem.*, **188**, 645 (1990)
216. J.Gmeiner. *Eur. J. Biochem.*, **74**, 171 (1977)

## UNUSUAL MONOSACCHARIDES: COMPONENTS OF O-ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF MICROORGANISMS

**N.K.Kochetkov**

*N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences  
47, Leninskii prosp., 117913 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)135-5328*

The data on new and scanty studied monosaccharides, detected as monomers in O-antigenic polysaccharides of gram-negative bacteria have been surveyed. The results of isolation, structure determination, identification, as well as of studies of chemical properties of these unusual monosaccharides have been arranged and described systematically. The NMR spectroscopy techniques are shown to be promising for the O-antigenic polysaccharides structure determination. The information about fine structure of monosaccharides which constitute the base of important class of microbial polysaccharides, is of great significance for applied studies, first of all, the design and synthesis of biologically active substances of new generation.

Bibliography — 216 references.

*Received 14th February 1996*