

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО РАН

---



На правах рукописи



ПОДВАЛЬНЫЙ  
Никита Михайлович

СИНТЕЗ СПЕЙСЕРИРОВАННЫХ  
ГЕКСААРАБИНОФУРАНОЗИДОВ, РОДСТВЕННЫХ  
ТЕРМИНАЛЬНОМУ УЧАСТКУ АРАБИНОГАЛАКТАНА И  
ЛИПОАРАБИНОМАННАНА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ  
МИКОБАКТЕРИЙ

02.00.03 — Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва — 2011

16 ИЮН 2011

Работа выполнена в лаборатории химии углеводов Учреждения Российской академии наук Института органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН

**НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:** кандидат химических наук  
**Кононов Леопид Олегович**

**ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:** доктор химических наук  
**Возный Яков Васильевич**

доктор химических наук, профессор  
**Бовин Николай Владимирович**

**ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:** ГОУ ВПО «Московский педагогический  
государственный университет»,  
химический факультет

Защита состоится 28 июня 2011 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.222.01 при Институте органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН.

Автореферат разослан "27" мая 2011 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
доктор химических наук



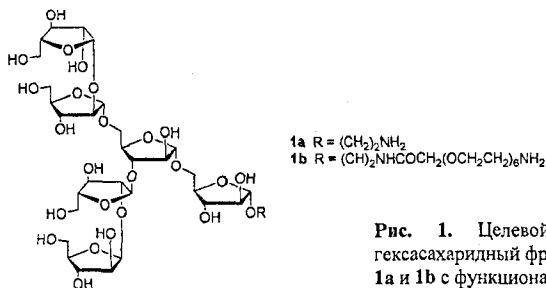
**В.В. Веселовский**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Основным возбудителем туберкулеза у людей является микроорганизм *Mycobacterium tuberculosis*, относящийся к микобактериям. Его носителями является около одной трети человечества, туберкулез уносит миллионы жизней ежегодно. В связи с этим разработка новых подходов к диагностике, профилактике и лечению этого заболевания является актуальной задачей.

В состав клеточной стенки микобактерий входят гликополимеры двух видов – арабиногалактан (АГ) и липоарабиноманнан (ЛАМ). АГ с присоединенными к нему остатками миколовых кислот служит каркасом клеточной стенки и вместе с нековалентно связанными липидами и гликолипидами образует гидрофобный барьер, малопроницаемый для антибиотиков и отвечающий за выживание микобактерий в макрофагах человека. ЛАМ, находящийся на внешней стороне клеточной стенки, взаимодействует с иммунной системой хозяина и является главным антигеном микобактерий.

Арабиановые области АГ и ЛАМ имеют общий концевой гексасахаридный фрагмент, являющийся их минимальным эпитопом. Это разветвленный олигосахарид, содержащий два 1,2-*цис*-связанных остатка D-арабинофуранозы. Неогликоконъюгаты (НГК) на его основе могут служить компонентами новых средств диагностики туберкулеза. Актуальность их создания определяется недостатками современных коммерчески доступных средства диагностики, показывающих высокую эффективность только для определенных человеческих популяций. Хотя в последнее время опубликован целый ряд работ по синтезу олигосахаридных фрагментов АГ и ЛАМ, их получение и превращение в НГК остается непростой задачей.



**Рис. 1.** Целевой объект синтеза – концевой гексасахаридный фрагмент АГ и ЛАМ в виде гликозидов **1a** и **1b** с функционализированными агликонами.

**Цель диссертационной работы.** Настоящая диссертация посвящена разработке новых подходов к синтезу гексасахарида, родственного концевому фрагменту арабианов микобактерий – структуры, узнаваемой специфическими антителами

против *M. tuberculosis*. Целью работы являлось также получение на основе этого гексасахарид неогликоконъюгатов – новых потенциальных агентов для серодиагностики туберкулеза. Для достижения этой цели гексасахарид синтезировали в виде гликозидов с агликонами-спейсерами разной длины (рис. 1), позволяющими проводить конъюгацию с носителями различных типов.

**Научная повизна работы.** Осуществлен новый синтез гексасахарид, родственного терминальному фрагменту АГ и ЛАМ, в виде гликозидов с функционализированными агликонами-спейсерами, необходимыми для получения НГК на его основе. Реализованный рациональный путь синтеза включает две стадии бисгликозилирования по схеме (2+1+1) и (4+1+1) и отличается использованием ортогональных ацильных защитных групп – *O*-бензоильной в качестве постоянной и *O*-хлорацетильной в качестве временной. Впервые для синтеза олигоарабинофуранозидов с функционализированным агликоном применен преспейсерный подход, позволяющий получать из одного предшественника набор олигосахаридов с агликонами различной природы и длины.

Предложен новый подход к избирательному деблокированию (дифференциации) различных гидроксильных групп в производных арабинофуранозы для ее гликозилирования в заданное положение. Он основан а) на реакции нуклеофильного раскрытия трициклических 3-*O*-ацильных производных 1,2,5-ортобензоата арабинофуранозы, открывающей путь для получения 2-*O*-бензоильных производных арабинофуранозы с гидроксильными группами при С-3 и С-5, и б) на образовании и последующем селективном гидролизе 1,2-*O*-бензилиденового производного арабинофуранозы для получения производных с гидроксильной группой при С-2.

Предложен новый способ циклизации 1,2-*O*-( $\alpha$ -метокси)бензилиден- $\beta$ -D-арабинофуранозы в 1,2,5-ортобензоат  $\beta$ -D-арабинофуранозы с использованием  $MgBr_2$  в качестве кислоты Льюиса. Изучены реакции раскрытия 3-*O*-ацильных производных 1,2,5-ортобензоата  $\beta$ -D-арабинофуранозы под действием *O*- и *S*-нуклеофилов в различных условиях, и на основе их реакции с тиолами разработан метод синтеза тиогликозидов арабинофуранозы как со свободной гидроксильной группой при С-5, так и с двумя гидроксильными группами при С-3 и С-5. Впервые обнаружено образование в этой реакции также  $\alpha$ -1,5-связанных дисахаридных тиогликозидов со свободной гидроксильной группой при С-5' – ценных блоков для синтеза линейных  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-связанных олигоарабинофуранозных цепей.

Впервые обнаружено образование олигоарабинофуранозидов с ортоэфирно-связанными моносахаридными остатками в условиях гликозилирования 3,5-диолов тиогликозидами 2-О-хлорацетиларабинофуранозы. Найден способ перегруппировки олигосахаридных ортоэфиров в изомерные олигосахариды с 1,2-*транс*-гликозидными связями между моносахаридами.

Выявлена зависимость стереоселективности бисгликозилирования дигидроксипроизводных тетрасахаридов с образованием соответствующих гексасахаридов от типа агликона-преспейсера и структуры гликозил-донора.

**Практическая значимость.** Предложен подход к дифференциации гидроксильных групп арабинофуранозы, который позволяет получать практически любые структурные блоки на основе этого моносахарида за малое число синтетических стадий без использования дорогостоящих кремниевых реагентов. Это делает данный подход особенно привлекательным для крупномасштабных синтезов.

Предложенный преспейсерный подход, ранее не использовавшийся для синтеза олигоарабинофуранозидов, позволяет получать из одного предшественника набор гликозидов олигосахаридов с различными агликонами-спейсерами. Такой подход может быть использован для получения как целевого спейсерированного гексаарабинофуранозида – концевого фрагмента арабинанов микобактерий, так и родственных ему олигосахаридов с набором спейсеров различной природы и длины.

На основе гексасахарида **1** получены НГК, которые переданы в ГИЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (п. Оболенск, Московская обл.) для проведения биологических испытаний в качестве диагностических агентов для серодиагностики туберкулеза.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и 9 тезисов в сборниках докладов научных конференций. Результаты работы доложены на 3 отечественных и 6 международных конференциях (4 устных и 5 стендовых докладов).

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 178 страницах и состоит из введения, литературного обзора на тему «Аспекты синтеза разветвленных олигоарабинофуранозидов», обсуждения результатов, экспериментальной части и выводов. Список цитируемой литературы состоит из 142 наименований.

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## 1. Разработка стратегии синтеза

### 1.1. Структура арабиносов микобактерий

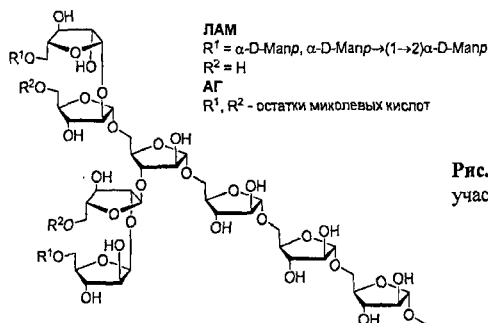


Рис. 2. Структура терминального арабианового участка, общего для АГ и ЛАМ *M. tuberculosis*.

АГ представляет собой структуру, в которой к линейной цепи, состоящей из чередующихся  $\beta$ -(1→5)- и  $\beta$ -(1→6)-связанных остатков D-галактофуранозы, присоединены разветвленные олигосахариды, состоящие из 22 остатков D-арабинофуранозы. Они включают два концевых гексасахаридных фрагмента, каждый из которых содержит два  $\beta$ -1,2-связанных остатка арабинофуранозы, а их первичные гидроксильные группы замещены остатками миколовых кислот (рис. 2).

В ЛАМ к основной цепи, состоящей из  $\alpha$ -(1→5)-связанных остатков D-арабинофуранозы, присоединены разветвленные олигосахариды арабинофуранозы. Боковые ответвления кончаются гексаарабинофуранозными участками, содержащими два  $\beta$ -(1→2)-связанных остатка D-арабинофуранозы. Первичные гидроксильные группы  $\beta$ -D-арабинофуранозы в различных штаммах либо замещены маннопиранозными или фосфоинозитольными остатками, либо остаются свободными (рис. 2).

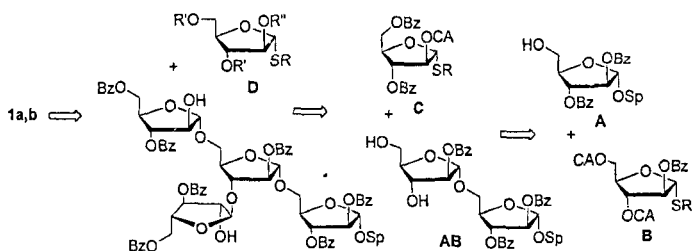
### 1.2. Ретросинтетический анализ целевых структур

Ретросинтетический анализ целевого гексасахаридного блока 1 (рис. 1) приводит к моносахаридным структурным блокам А, В, С и D (схема 1). Рациональная схема его сборки (см. ниже) включает получение дисахаридного блока из блоков А и В и две стадии бисгликозилирования (2+1+1) и (4+1+1).

Блок А (схема 1) с агликоном-преспейсером имеет свободную гидроксильную группу при С-5 и служит гликозил-акцептором при построении  $\alpha$ -(1→5)-связанного дисахаридного блока АВ. Блок В служит гликозил-донором при построении АВ и

несет селективно удаляемые хлорацетильные группы при O-3 и O-5. После их удаления дисахаридный блок **AB** может быть подвергнут бисгликозилированию по освободившейся 3',5'-диолевой группировке. Блок **C** является гликозил-донором для бисгликозилирования, в результате которого создается разветвленный тетрасахарид. Блок **C** несет селективно удаляемую хлорацетильную группу при O-2, что необходимо для последующего введения двух концевых  $\beta$ -связанных звеньев арабинофуранозы в результате бисгликозилирования с помощью гликозил-донора **D**.

В качестве постоянных защитных групп использовали *O*-бензоильные. Гидроксильные группы, подлежащие дальнейшему гликозилированию, защищали *O*-хлорацетильными группами, которые могли быть селективно удалены в присутствии *O*-бензоильных групп.



**Схема 1.** Стратегия сборки целевого гексасахарида. CA = ClCH<sub>2</sub>CO, Bz = PhCO, Sp – агликон-спейсер, R = Et, Ph, R', R'' – защитные группы.

Для синтеза блоков **A–D** необходимо было осуществить дифференциацию гидроксильной группы при C-2 и 3,5-диолевой группировки, а также селективно деблокировать O-5. Эти вопросы подробно рассмотрены в разделе 2.

Для биологических испытаний нужны спейсерированные олигоарабинофуранозиды, пригодные для иммобилизации на носителях (синтетических полимерах или белках). В связи с этим целевой гексасахарид необходимо было синтезировать в виде гликозидов как с коротким агликоном-спейсером (**1a**) для получения конъюгата с полиакриламидом, так и с длинным (**1b**) для конъюгации с белками. Поэтому в качестве начального агликона-спейсера целесообразно было использовать короткий C<sub>2</sub>-агликон и удлинять его на последних этапах синтеза гексасахарида (так называемый преспейсерный подход).

В агликон блока **A** следовало ввести такую группу, которая была бы инертна в условиях сборки олигосахарида и превращений защитных групп и которую можно было бы легко модифицировать для последующего удлинения спейсера. В качестве

такого преспейсера была выбрана 2-хлорэтильная группа, поскольку она достаточно стабильна, а атом хлора впоследствии может быть заменен на азидную группу, которая в свою очередь может быть восстановлена в аминогруппу. Такая модификация агликона возможна на разных этапах сборки целевой молекулы, включая стадии как тетрасахарида, так и гексасахарида.

## 2. Новый подход к дифференциации гидроксильных групп арабинофуранозы. Синтез моносахаридных структурных блоков

### 2.1. Избирательная защита гидроксильных групп в арабинофуранозном цикле

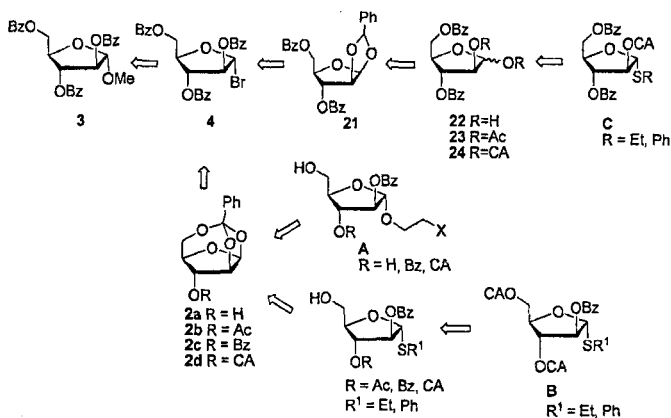


Схема 2. Новый подход к селективной защите гидроксильных групп арабинофуранозы ацильными группами. X – фрагмент агликона или функциональная группа.

Селективная защита и деблокирование первичной гидроксильной группы при C-5 хорошо разработаны и не представляют проблем. Для этого обычно используют тритильную или различные силильные группы. В то же время дифференциация гидроксильной группы при C-2 и 3,5-диольной группировки арабинофуранозы является более сложной задачей. В настоящее время для избирательной защиты 3,5-диольной группировки применяют кремнийорганические (ди-*трет*-бутилсилиленовый и (1,1,3,3-тетраизопропил)дисилоксан-1,3-диильный) заместители. Реагенты для их введения дорогостоящие, что стимулирует поиск более экономичных способов дифференциации гидроксильных групп. В настоящей работе мы предлагаем новый подход к селективной защите гидроксильных групп производных арабинофуранозы, основанный на использовании 1,2-*O*-ортобензоильной и 1,2-*O*-бензилиденовой защитных групп в сочетании с различными *O*-ацильными



защитными группами. Применение этого подхода позволило получить структурные блоки А–С, необходимые для сборки целевого гексаарабинофуранозида (схема 2).

## 2.2. Синтез 1,2,5-ортобензоата β-D-арабинофуранозы (2а) и его 3-О-ацильных производных

1,2,5-Ортобензоат β-D-арабинофуранозы (2а) служит универсальным предшественником блоков А и В (схема 2). Известно несколько методов синтеза 2а, все они основаны на циклизации 1,2-О-(α-метокси)бензилиден-β-D-арабинофуранозы (6), катализируемой различными кислотами (схема 3). Мы сравнили различные существующие методы синтеза 2а, а также предложили свой метод – циклизацию 6 с помощью MgBr<sub>2</sub> при нагревании в тетрагидрофуране (выход 2а составляет 78%). Однако наилучшей среди испробованных нами оказалась методика, предложенная уже около 35 лет назад в лаборатории химии углеводов ИОХ АН СССР (схема 3, iv). Она основана на поглощении образующимся в реакции MeOH молекулярными ситами, не контактирующими с реакционной смесью, при кипячении раствора 6 и TsOH в 1,2-дихлорэтаноле (выход 2а 90%). Взяв ее за основу, мы разработали дешевую, быструю и простую в исполнении «сквозную» методику синтеза 2а из легко доступного метил-2,3,5-три-О-бензоил-α-D-арабинофуранозида (3).

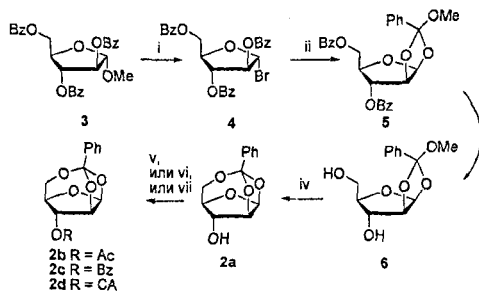


Схема 3. i: HBr, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. ii: MeOH, 2,6-лутидин или 2,4,6-коллидин. iii: MeONa, MeOH, хроматография на силикагеле. iv: TsOH, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>, кипячение с насадкой Сокслета, содержащей молекулярные сита 4 Å, кристаллизация (выход 2а 70% на 4 стадии). v: Ac<sub>2</sub>O, Py (выход 2b 97%). vi: BzCl, Py (выход 2c 94%). vii: (ClCH<sub>2</sub>CO)<sub>2</sub>O, 2,4,6-коллидин, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (выход 2d 94%).

Метилгликозид 3 действием HBr в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> превращали в гликозилбромид 4, который без очистки вводили в реакцию с метанолом и 2,6-лутидином или 2,4,6-коллидином (схема 3). Образовавшийся бициклический ортоэфир 5 подвергали основному метанолизу с образованием диола 6, который после хроматографической очистки подвергали кипячению в 1,2-дихлорэтаноле с TsOH и получали 1,2,5-ортобензоат β-D-арабинофуранозы 2а с выходом 70% на 4 стадии.

Далее 2а был превращен с высокими выходами (94–97%) в различные 3-О-ацильные производные: ацетильное (2b), бензоильное (2c) и хлорацетильное (2d) (схема 3). Ацетилирование и бензоилирование проводились в обычных условиях

(пиридин, избыток  $As_2O$  или  $BzCl$ ). Хлорацетилирование хлоруксусным ангидридом проводили в мягких условиях при  $0\text{ }^\circ\text{C}$  в  $CH_2Cl_2$ , используя как основание стерически затрудненный 2,4,6-коллидин (хлорацетилирование с использованием пиридина в качестве растворителя приводило к снижению выхода целевого продукта, по-видимому, вследствие реакции пиридина с хлорацетильной группой как хлоруксусного ангидрида, так и продукта реакции **2d**).

### 2.3. Раскрытие 1,2,5-ортобензоатов $\beta$ -D-арабинофуранозы 2-хлорэтанолом. Синтез блока А

Нуклеофильное раскрытие ортобензоатных производных арабинофуранозы **2** спиртами при катализе кислотами Льюиса приводит к соответствующим 2-О-бензоиларабинофуранозидам со свободной гидроксильной группой при С-5.

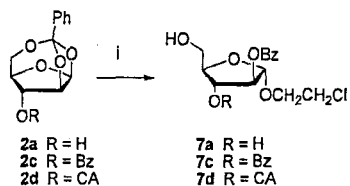


Схема 4. i:  $Cl(CH_2)_2OH$ ,  $SnCl_4$   
(76% для **7a**, 96% для **7c** и 78% для **7d**).

Блок А (соединение **7c**) был синтезирован в одну стадию из 3-О-бензоильного производного **2c** (схема 4). При проведении реакции в  $CH_2Cl_2$  и катализе  $BF_3 \cdot Et_2O$  образовывалась смесь аномерных (2-хлорэтил)гликозидов в соотношении  $\sim 1:1$ . Используя 2-хлорэтанол в качестве растворителя и  $SnCl_4$  в качестве кислоты Льюиса, удалось получить чистый  $\alpha$ -изомер с выходом, близким к количественному. Были также проведены реакции раскрытия производных **2a** и **2d** 2-хлорэтанолом в условиях катализа  $SnCl_4$  с образованием производных **7a** и **7d** соответственно.

### 2.4. Исследование реакций нуклеофильного раскрытия 1,2,5-ортобензоатов 3-О-ацил- $\beta$ -D-арабинофуранозы этантиолом и тиофенолом. Синтез блока В

При реакции 3-О-замещенных 1,2,5-ортобензоатов арабинофуранозы с тиолами в условиях катализа  $SnCl_4$  образуются тиогликозиды – ближайшие предшественники гликозил-доноров, необходимых для сборки целевого гексасахарида. Для поиска оптимальных условий раскрытия 3-О-ацильных производных **2b-d** тиолами были изучены реакции ортоэфиров **2b-d** с этантиолом и тиофенолом (схема 5, табл. 1).

Наряду с основными продуктами раскрытия (моносахаридами **8a,b-10a,b**) в большинстве случаев наблюдается образование побочных дисахаридных продуктов

11a,b-13a,b соответственно (схема 5), что объясняется нуклеофильной активностью 5-OH-группы основного продукта реакции, конкурирующей с тиолом.

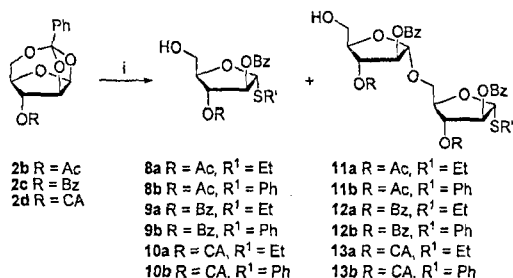


Схема 5. i: R'SH, SnCl<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Таблица 1. Реакции производных 2b-d с этантиолом и тиофенолом.

№	Ортоэфир	R	R <sup>1</sup>	SnCl <sub>4</sub> (экв.)	Температура (°C) <sup>a</sup>	R'SH (экв.)	Выход <sup>b</sup> , %	
							моносахарид	дисахарид
1	2b	Ac	Et	0.14	-15	1.2 <sup>c</sup>	8a (70)	11a (27)
2	2b	Ac	Et	0.3	-25	5.0 <sup>d</sup>	8a (62)	11a (12)
3	2b	Ac	Ph	0.2	-15	1.2 <sup>c</sup>	8b (66)	11b (30)
4	2b	Ac	Ph	0.3	-25	5.0 <sup>d</sup>	8b (60)	11b (27)
5	2c	Bz	Et	0.27	-25	5.0 <sup>d</sup>	9a (85)	12a (12)
6	2c	Bz	Ph	0.3	-25	5.0 <sup>d</sup>	9b (72)	12b (11)
7	2d	CA	Et	0.1	-25	2.4 <sup>c</sup>	10a (76)	13a (16)
8	2d	CA	Et	0.1	-25	5.0 <sup>c</sup>	10a (94)	н.в. <sup>e</sup>
9	2d	CA	Ph	0.35	-28	4.5 <sup>c</sup>	10b (62)	13b (25)
10	2d	CA	Ph	0.26	-28	4.5 <sup>d</sup>	10b (68)	13b (17)
11	2d	CA	Ph	0.25	-28 → -4	4.5 <sup>d</sup>	10b (62)	13b (23)
12	2d	CA	Ph	0.3	-28	18.3 <sup>d</sup>	10b (67)	н.в. <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Температура бани. <sup>b</sup>Выходы после хроматографии на силикагеле. <sup>c</sup>Реакцию проводили в присутствии молекулярных сит 3 Å. <sup>d</sup>Реакцию проводили без молекулярных сит. <sup>e</sup>Реакцию проводили в присутствии молекулярных сит 4 Å. <sup>f</sup>Дисахарид не выделен.

При реакциях ортобензоатов 2b и 2c с незначительным (1.2 экв.) избытком EtSH или PhSH моносахаридные тиогликозиды образуются с выходом 66–70%, а соответствующие дисахариды – с выходом 27–30%. Использование избытка тиола (2.4–5.0 экв.) не приводило к существенному изменению соотношения продуктов. Хлорацетильное производное 2d в реакциях с PhSH ведет себя подобным образом (табл. 1), однако соотношение моно- и дисахаридного продуктов его реакции с EtSH существенно зависит от количества тиола. Так, при использовании 2.4 экв. EtSH образуется 76% моносахаридного и 16% дисахаридного продукта, тогда как с 5 экв. EtSH моносахаридный тиогликозид был выделен с выходом 94%, а образования дисахариды не наблюдалось (табл. 1).

Селективно защищенные дисахариды **11a–13b**, побочно образующиеся в этих реакциях, являются ценными исходными продуктами для синтеза  $\alpha$ -(1→5)-связанных линейных олигоарабинофуранозных фрагментов АГ и ЛАМ.

Бис(хлорацетильное) производное **14a** (блок В) было получено в две стадии из 3-*O*-хлорацетильного производного 1,2,5-ортоэфира **2d**. После раскрытия ортобензоата этилмеркаптаном освободившаяся гидроксильная группа при С-5 образовавшегося соединения **10a** была защищена хлорацетильной группой (схема б).

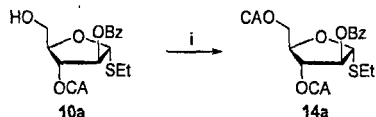


Схема 6. i:  $(\text{ClCH}_2\text{CO})_2\text{O}$ , 2,4,6-коллиндин,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ~100%.

## 2.5. Использование 1,2-*O*-бензилиденовых производных арабинофуранозы. Синтез блока С

Как следует из ретросинтетического анализа гексасахарида **1**, моносахаридный блок С должен содержать селективно удаляемую хлорацетильную группу при О-2 и бензоильные группы при О-3 и О-5. Для дифференцирования гидроксильных групп при С-3 и С-5 пентофуранозных остатков с одной стороны и при С-2 с другой стороны в качестве временной защиты используется 3,5-*O*-(1,1,3,3-тетраизопропил)-дисилоксан-1,3-диильная группа (TIPDS). Реагент для ее введения (TIPDS-Cl) дорог, и к тому же присутствие TIPDS в готовом блоке С в нашем случае не требуется.

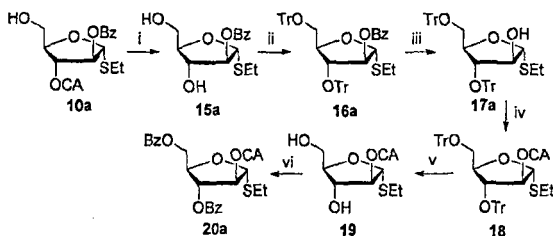


Схема 7. i:  $\text{Py-H}_2\text{O}$  (2:1), 86%. ii:  $\text{TrClO}_4$ ,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 90%. iii:  $\text{MeONa}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 84%. iv:  $(\text{ClCH}_2\text{CO})_2\text{O}$ , 2,4,6-коллиндин,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 89%. v:  $\text{AcOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 80 °С, 52%. vi:  $\text{BzCl}$ ,  $\text{Py}$ , 98%.

Чтобы избежать использования дорогостоящих защитных групп на промежуточных стадиях, нами был разработан альтернативный путь синтеза (схема 7). Для временной защиты гидроксильных групп при С-3 и С-5 использовали трифенилметильные группы. Хлорацетильную группу в **10a** удаляли обработкой водным пиридином, гидроксильные группы при С-3 и С-5 в соединении **15a** тритилировали с помощью тритилперхлората, бензоильную группу при О-2 в соединении **16a** удаляли основным метанолизом, освободившуюся гидроксильную

группу соединения **17a** защищали хлорацетиловой группой, соединение **18** детритилировали обработкой  $\text{AcOH-H}_2\text{O}$ . После бензонилирования гидроксильных групп при C-3 и C-5 в соединении **19** получали целсовой гликозил-донор **20a** (блок С).

Однако такой путь трудоемок и дорог. В связи с этим для дифференцирования гидроксильных групп в арабинофуранозе была выбрана 1,2-*O*-бензилиденная группа. В то время как 1,2-*O*-бензилиденные производные пираноз (например, глюкозы и маннозы) хорошо изучены (в лаборатории химии углеводов ИОХ АН СССР был разработан метод их получения), 1,2-*O*-бензилиденные производные арабинофуранозы практически неизвестны: родственное им 1,2-*O*-(4-метил)-бензилиденное производное L-арабинофуранозы было получено единожды как побочный продукт в ходе синтеза 2-дезоксид-рибозы. Мы впервые синтезировали 1,2-*O*-бензилиден-3,5-ди-*O*-бензоил- $\beta$ -D-арабинофуранозу (**21**) и применили ее в более короткой и рациональной схеме синтеза блока С (схема 8). 1,2-*O*-Бензилиденная группа предпочтительна для функционализации гидроксильных групп при C-1 и C-2, так как может быть получена не ацетализацией 1,2-диола, а восстановлением уже присутствующей 2-*O*-бензоильной группы. В то же время для региоселективного введения 1,2-*O*-изопропилиденной защитной группы пришлось бы сначала защитить 5-ОН арабинозы (такой подход известен в литературе).

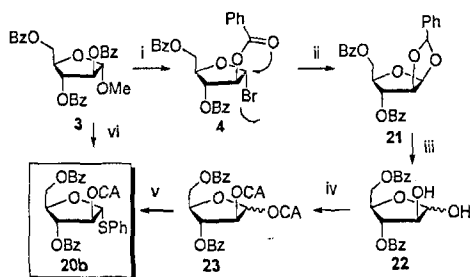


Схема 8. i:  $\text{HBr}$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $0^\circ\text{C}$ . ii:  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeCN}$ , 90% на 2 стадии. iii:  $\text{TFA}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . iv:  $(\text{ClCH}_2\text{CO})_2\text{O}$ , 2,4,6-коллиндин,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 96% на 2 стадии. v:  $\text{PhSH}$ ,  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$ , 83%. vi: 1.  $\text{HBr}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ . 2.  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeCN}$ . 3.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{TFA-H}_2\text{O}$  100:10:1. 4.  $(\text{ClCH}_2\text{CO})_2\text{O}$ , 2,4,6-коллиндин,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ . 5.  $\text{PhSH}$ ,  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$ , хроматография на силикагеле, 64% на 5 стадий (масштаб  $>10\text{ г}$ ).

Гликозилбромид **4**, полученный из метилгликозида **3**, немедленно превращали действием  $\text{NaBH}_4$  в бензилиденное производное **21**. 1,2-*O*-Бензилиденную группу удаляли кислотным гидролизом, хлорацетиловали освободившиеся гидроксильные группы при C-1 и C-2 в соединении **22** и полученную смесь аномеров **23** реакцией с  $\text{PhSH}$  и  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  превратили в гликозил-донор **20b**.

Для этой последовательности реакций мы разработали также простую и быструю в исполнении «сквозную» методику (схема 8, vi), позволяющую синтезировать большие количества моносахаридного блока С, причем вещество

подвергается хроматографической очистке лишь однажды на заключительном этапе. Суммарный выход при получении >10 г соединения **20b** (блока **C**) после колоночной хроматографии составлял 64% (в расчете на метилгликозид **3**).

## 2.6. Синтез блока **D**

Блок **D** необходим для введения  $\beta$ -связанных арабинофуранозидных остатков целевого гексасахарида **1**, и его строение должно обеспечивать 1,2-*цис*-стереоселективное гликозилирование. Известно несколько подходов к созданию 1,2-*цис*-арабинофуранозидной связи. Выбранный нами подход предполагает наличие в гликозил-доноре мостиковой группы при O-3 и O-5 (см. раздел 3.4) и несоучаствующей защитной группы при O-2. Чтобы отложить с предпоследней на последнюю стадию введение ди-*трет*-бутилсилиленовой или (1,1,3,3-тетраизопропил)дисилоксан-1,3-диильной группы, требующее дорогостоящих реагентов, мы разработали новый метод синтеза блока **D** (схема 9, табл. 2).

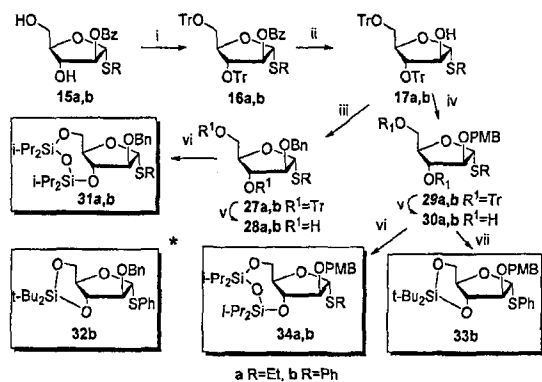


Таблица 2. Синтез блока **D** (условия, соединения, выходы; см. схему 9).

R	i	ii	iii	iv	v	vi	vii
Et (a)	16a, 90%	17a, 84%	27a, 82%	29a, 68%	28a, 78%	31a, 73%	—
					30a, 72%	34a, 73%	—
Ph (b)	16b, 73%	17b, 91%	27b, 92%	29b, 98%	28b, 79%	31b, 93%	—
					30b, 65%	34b, 90%	33b, 89%

Соединения **10a,b** (получены путем нуклеофильного раскрытия 1,2,5-ортобензоата **2d** этангиолом и тиофенолом соответственно, см. раздел 2.4) обработали водным пиридином для удаления хлорацетильной группы (см. схему 7 в разделе 2.5 для соединения **15a**). Образовавшиеся 3,5-диоли **15a,b** подвергли бистритилированию тритилперхлоратом, и затем 2-*O*-бензоильная группа полученных производных **16a,b** была удалена основным метанолизом.

Освободившаяся гидроксильная группа при С-2 производных **17a,b** была защищена как бензильной (с образованием **27a,b**), так и *para*-метоксибензильной (с образованием **29a,b**) группами. Каждое из соединений **27a,b** и **29a,b** детритилировали водной трифторуксусной кислотой. Полученные 3,5-диоли **28a,b** и **30a,b** превращали в ди-*трет*-бутилсилиленовое (**33b**) и (1,1,3,3-тетраизопропил)дисилоксан-1,3-диильные (**31a,b** и **34a,b**) производные.

Предложенный подход позволил синтезировать набор гликозил-доноров **31–34** (схема 9). Однако их более крупномасштабный синтез по этому пути потребовал бы больших усилий, чем другие методики получения родственных соединений. Поэтому граммовые количества гликозил-донора **32b** с 2-*O*-бензильным заместителем были получены по известной методике из тетраацетата D-арабинофуранозы.

### 3. Сборка олигосахарида

Получив все моносахаридные предшественники, необходимые для синтеза целевого гексаарабинофуранозида **1**, мы приступили к сборке защищенного олигосахарида из структурных блоков **A**, **B**, **C** и **D** (схема 1).

#### 3.1. Синтез дисахаридного гликозил-акцептора

Из гликозил-акцептора **7c** (блок **A**) и гликозил-донора **14a** (блок **B**) был синтезирован дисахарид **37** (схема 10). Гликозилирование проводили в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при  $-40^\circ\text{C}$  и промотировании NIS и триэтилсилилтрифлатом (TESOTf) (использование в этой реакции триметилсилилтрифлата (TMSOTf) давало низкие выходы). Хлорацетильные защитные группы были затем селективно удалены нагреванием в водном пиридине с образованием диола **38**.

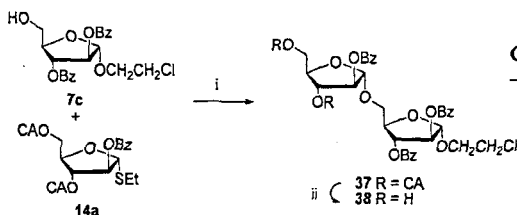
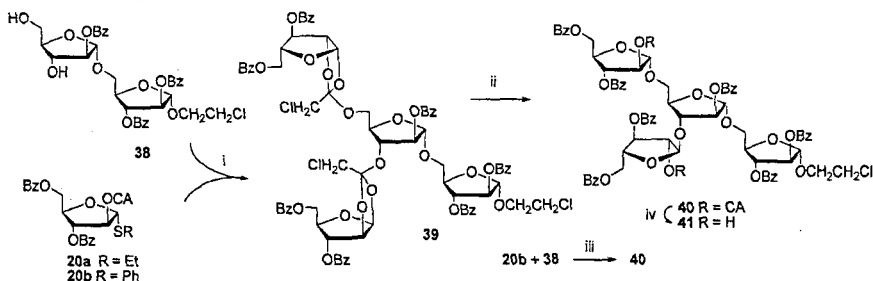


Схема 10. i: NIS, TESOTf,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-40^\circ\text{C}$ , 85%. ii:  $\text{Py}-\text{H}_2\text{O}$  (2:1),  $60^\circ\text{C}$ , 94%.

#### 3.2. Синтез тетрасахарида

В результате гликозилирования диола **38** гликозил-донором **20a** при промотировании NIS и  $\text{AgOTf}$  в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при  $-40^\circ\text{C} \rightarrow +10^\circ\text{C}$  в течение 1 ч вместо ожидаемого тетрасахарида **40** был получен изомерный ортоэфир **39**. Образование таких ортохлорацетатов для производных арабинофуранозы обнаружено впервые.

Полученный ортоэфир **39** удалось перегруппировать в целевой продукт **40** с выходом 80%, обрабатывая его TMSOTf в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при -40 °C → +10 °C.



**Схема 11.** i: NIS, AgOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, молекулярные сита 4 Å, -40 °C → +10 °C, 1 ч, 90%. ii: TMSOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, молекулярные сита 4 Å, -40 °C → +10 °C, 80%. iii: NIS, AgOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, молекулярные сита 4 Å, -40 °C → 0 °C, 4 ч, 84%. iv: Py-H<sub>2</sub>O (2:1), 65 °C, 85%.

При проведении гликозилирования диола **38** гликозил-донором **20b** при -40 °C → +10 °C в течение 4 ч оказалось возможным получить тетрасахарид **40** напрямую с выходом 84% (по видимому, через стадию промежуточного образования ортоэфира **39**, изомеризующегося в этих условиях в целевой продукт **40**).

При гликозилировании больших количеств (нескольких граммов) диола **38** фенилтиогликозидом **20b** при -40 °C → +10 °C с выходом 79% образовалась сложная смесь ортоэфиров и продуктов их перегруппировки. Ее обработка TMSOTf привела к тетрасахариду **40** с выходом 76%. Хлорэтильные группы тетрасахарида **40** были селективно удалены нагреванием в водном пиридине с образованием тетрасахаридного гликозил-акцептора **41**.

### 3.3. Модификация преспейсера тетрасахарида

Для изучения влияния природы агликона на стереоселективность арабинофуранозилирования тетрасахаридного гликозил-акцептора, а также для сравнения двух возможных подходов к синтезу спейсерированного гексасахарида (модификация агликона на стадии тетра- или гексасахарида) был получен набор тетрасахаридов **42–44** с различными агликонами. Модификация преспейсера на возможно более ранних этапах синтеза позволяет существенно сократить число стадий модификации защитных групп уже собранного гексасахарида. В свою очередь, сохранение 2-хлорэтильного агликона вплоть до окончания сборки олигосахарида позволяет получать набор гексасахаридных производных с агликонами различной



природы из единого (в нашем случае 2-хлорэтильного) предшественника, не осуществляя сборку гексахарида каждый раз заново.

2-Хлорэтильная группа тетрасахарида **41** была превращена в 2-азидоэтильную группу соединения **42**, которая была восстановлена в амин. Последний без выделения из реакционной смеси ацилировали трифторуксусным ангидридом в присутствии  $\text{NEt}_3$  (в этих условиях наряду с N-трифторацетилированием происходило также O-трифторацетилирование). O-Трифторацетильные группы были селективно удалены при последующей водной экстракции, что привело к образованию (2-трифторацетиламиноэтил)гликозида **43**. Тетрасахарид **42** с 2-азидоэтильной группой в агликоне был в одну стадию превращен в производное **44с** удлиненным спейсером, содержащее гексаэтиленгликолевый участок.

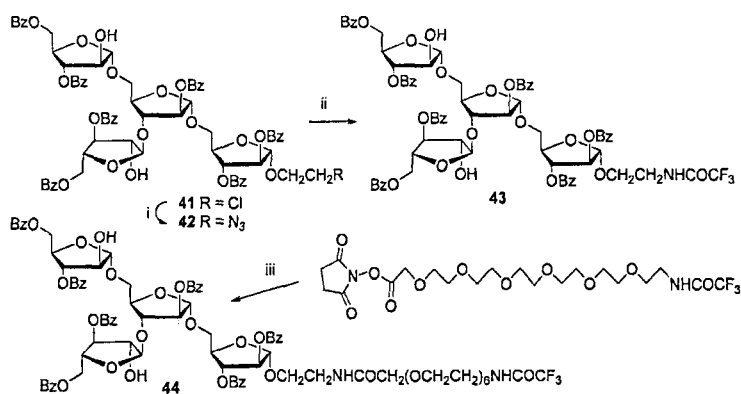


Схема 12. i:  $\text{NaN}_3$ , 18-краун-6, DMF, 70 °C, 76%. ii: 1.  $\text{Ph}_3\text{P}$ , THF,  $\text{H}_2\text{O}$ ; 2.  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{NEt}_3$ , THF; 3. Водная обработка, 75%. iii: **42**,  $\text{Bu}_3\text{P}$ , THF, 51%.

### 3.4. Подходы к созданию 1,2-цис-арабинофуранозидной связи

Как и любое 1,2-цис-гликозилирование, введение  $\beta$ -арабинофуранозных остатков (а тем более бисгликозилирование с введением двух таких остатков) в олигосахарид является непростой задачей.

Один из известных подходов к созданию 1,2-цис-арабинофуранозидной связи предполагает присутствие в гликозил-доноре мостиковой группы (3,5-O-ди-*трет*-бутилсилиленовой, как в **32b**, или 3,5-O-(1,1,3,3-тетраизопропил)дисилоксан-1,3-диильной, как в **31a,b**), которая фиксирует конформацию фуранозного цикла гликозил-катиона, способствующую атаке гликозил-акцептора с  $\beta$ -стороны. Необходимым является также использование несоучаствующей защитной группы при O-2 (например, бензильной, как в **31** и **32**).

Гликозилирование гликозил-акцептора **41** гликозил-донором **31a**, содержащим мостиговую (1,1,3,3-тетраизопропил)дисулфон-1,3-диальную защитную группу при О-3 и О-5, проводили при активации NIS-AgOTf в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> при -70 °C → -50 °C. Выход гексасахаридной фракции, выделенной с помощью хроматографии на геле Bio-Beads Sx1 в толуоле, составил 70%. Пары изомеров **45a** (α,α, α,β и β,α, β,β) разделили препаративной ТСХ на силикагеле, их соотношение составило 1.7 : 1. Соотношение изомеров во второй (целевой) фракции, определенное путем интегрирования сигналов Н-1β (δ 4.95–5.00 и 5.02–5.05 м.д. для β-связанных остатков арабинофуранозы) в спектрах ЯМР <sup>1</sup>H, составило ~1 : 2 в пользу β,β-изомера. Таким образом, выход целевого β,β-изомера составил ~25%.

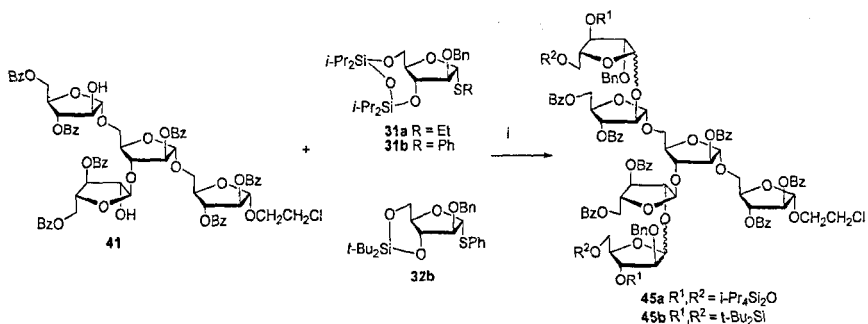


Схема 13. *i*: NIS, AgOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

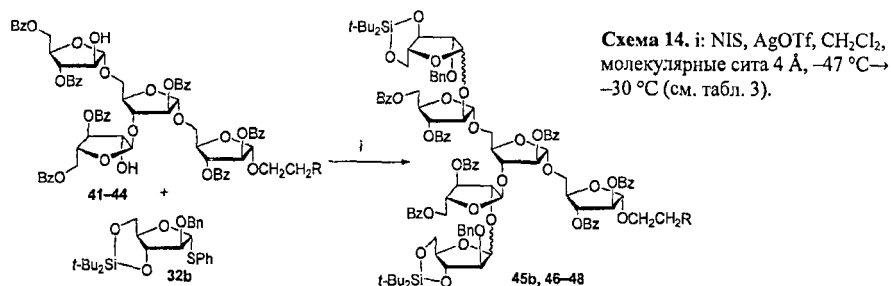
Гликозилирование акцептора **41** гликозил-донором **31b** проводили при -40 °C. Выход гексасахаридной фракции составил 74%, изомерные гексасахариды не разделяли. Соотношение пар изомеров **45a** (α,α, α,β и β,α, β,β) по данным ТСХ составляло ~1 : 1. Как и в первом случае, такая стереоселективность для стоящей перед нами задачи синтеза сотен миллиграммов защищенного гексасахариды была неудовлетворительной, и поэтому гликозил-доноры с TIPDS-защитной группой далее не использовали.

Наилучшие результаты гликозилирования тетрасахаридного бисгликозил-акцептора **41** были достигнуты с использованием гликозил-донора **32b** (NIS-AgOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -47 °C → -30 °C). Суммарный выход изомерных гексасахаридов **45b** превышал 95%, стереоселективность была высока: доля β,β-изомера достигала 61% по данным аналитической ВЭЖХ на силикагеле (см. также раздел 3.5). Это позволило

выбрать гликозил-донор **32b** для дальнейшего использования в синтезе препаративных количеств защищенных гексахаридов **45b–48** (см. раздел 3.5).

### 3.5. Синтез гексахарида

В соответствии с планом (см. раздел 3.3) был проведен ряд реакций гликозилирования тетрасахаридов **41–44**, отличающихся природой агликона, гликозил-донором **32b** (схема 14) (см. также раздел 3.4). Соотношение изомеров в гексахаридной фракции, полученной с помощью хроматографии на геле Bio-Beads Sx1 в толуоле, было определено с помощью аналитической ВЭЖХ на силикагеле.



Выход гексахаридной фракции во всех случаях превышал 95%, содержание  $\beta,\beta$ -изомера для соединений **45b–47** было близким и колебалось от 56% до 64% по данным ВЭЖХ (табл. 3). Смесь изомерных гексахаридов **48** с удлиненным агликоном разделить не удалось, поэтому для оценки ее состава использовали интегрирование сигналов в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$ . По этим данным доля  $\beta,\beta$ -изомера **48** была значительно меньше и составила ~40%. Чистые  $\beta,\beta$ -изомеры гексахаридов **45b** и **47** были выделены с помощью препаративной ВЭЖХ с выходом 42%, считая на гликозил-акцептор, и использованы далее для синтеза целевых гексахаридов **1a,b**.

Таблица 3. Результаты гликозилирования бистгликозил-акцепторов **41–44** гликозил-донором **32b**.

Гликозил-акцептор	R	Продукт	Доля $\beta,\beta$ -изомера, %	Выход $\beta,\beta$ -изомера, %	Выход гексахаридной фракции, %
<b>41</b>	Cl	<b>45b</b>	61 <sup>a</sup>	42	97
<b>42</b>	$\text{N}_3$	<b>46</b>	56 <sup>a</sup>	–	~100
<b>43</b>	NHTFA	<b>47</b>	64 <sup>a</sup>	42	95
<b>44</b>	$\text{NHCOCH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{NHTFA}$	<b>48</b>	~40 <sup>b</sup>	–	95

<sup>a</sup>По данным ВЭЖХ. Разделение методом ВЭЖХ выполнено Н.Н. Кондаковым.

<sup>b</sup>По данным  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра. Разделить изомеры с помощью ВЭЖХ не удалось.

Таким образом, природа функциональной группы в  $\text{C}_2$ -агликоне не оказывает существенного влияния на выход и стереоселективность гликозилирования, и

поэтому с препаративной точки зрения можно использовать любой из гликозил-акцепторов 41–43. В то же время стереоселективность гликозилирования тетрасахаридного гликозил-акцептора 44 с олигоэтиленгликолевым агликоном значительно ниже, и, что самое важное, соответствующие изомерные гексасахариды 48 разделить не удастся. По этим причинам последний вариант не имеет препаративного значения.

#### 4. Удаление защитных групп и модификация спейсера

##### 4.1. Удаление защитных групп и модификация спейсера гексасахарида 45b с 2-хлорэтильным агликоном

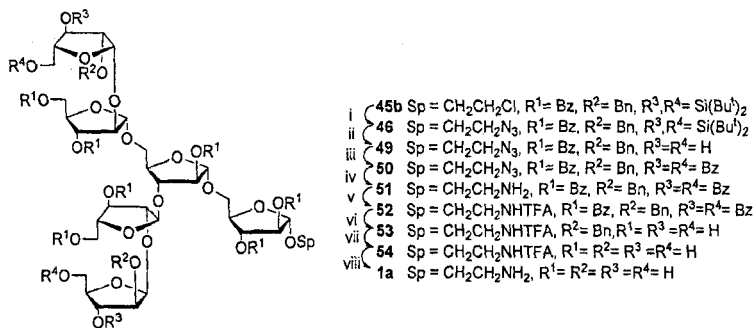


Схема 15. i: NaN<sub>3</sub>, ДМФА, 70 °С, 97 %. ii: n-Bu<sub>4</sub>NF, AcOH, ТГФ, хроматография на силикагеле (ВЭЖХ), 77%. iii: BzCl, Py, хроматография на силикагеле, 80%. iv: PPh<sub>3</sub>, ТГФ–H<sub>2</sub>O, 0 °С → 20 °С. v: (CF<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, NEt<sub>3</sub>, ТГФ, хроматография на геле Bio-Beads S×3 (толуол), хроматография на силикагеле, 73% на две стадии. vi: NaOMe, MeOH, хроматография на геле Sephadex LH-20 (MeOH). vii: H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>/C, MeOH–H<sub>2</sub>O, 28 °С, хроматография на геле Sephadex LH-20 (MeOH), 41% на две стадии. viii: NaOH, MeOH, хроматография на геле Sephadex LH-20 (MeOH).

Получив β,β-изомеры полностью защищенных гексасахаридов 45b и 47, мы приступили к удалению защитных групп. Последовательность их удаления в соединении 45b такова (схема 15): атом хлора в 2-хлорэтильном аглиционе гексасахарида 45b был замещен на азидную группу действием NaN<sub>3</sub> в DMF с образованием 46, затем силиленовые защитные группы были удалены обработкой фторидом тетрабутиламмония (ТВАФ) в тетрагидрофуране. Освободившиеся гидроксильные группы соединения 49 защищали бензоилированием. Действием PPh<sub>3</sub> в THF–H<sub>2</sub>O азидную группу в аглиционе 50 восстановили до аминогруппы, которую ацилировали трифтороуксусным ангидридом. После дезацилирования соединения 52 в основных условиях и гидрогенолиза (H<sub>2</sub> над Pd(OH)<sub>2</sub>/C) образовавшегося продукта 53 получали гексасахарид 54 со свободными гидроксильными группами и 2-трифторацетиламиноэтильным агликоном с суммарным выходом 18%, считая на

защищенный гексасахарид **45b**. Обработкой NaOH в метаноле и хроматографией на геле Sephadex LH-20 (MeOH) из **54** получили готовый для конъюгации амин **1a**.

#### 4.2. Удаление защитных групп из гексасахаридов **47** с 2-трифторацетиловым агликоном

Преспейсер соединения **47** был подвергнут модификациям заранее, на стадии тетрасахарида, что позволило значительно сократить число необходимых превращений уже собранного гексасахаридов. Как и в предыдущем случае, силиленовые защитные группы соединения **47** были удалены обработкой TBAF в тетрагидрофуране с образованием **55**. Гидрогенолизом ( $H_2$  над  $Pd(OH)_2/C$ ) **55** с последующим омылением образовавшегося продукта **56** получили готовый для конъюгации незащищенный гексасахарид с 2-аминоэтильным агликоном **1a** (суммарный выход 19% в расчете на защищенный гексасахарид **47**, схема 16).

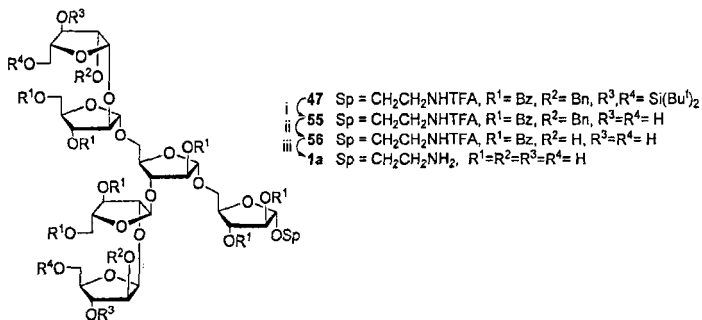


Схема 16. i: TBAF, AcOH, THF, хроматография на силикагеле (бензол-ацетон), 95%. ii:  $H_2$ ,  $Pd(OH)_2/C$ , MeOH, хроматография на силикагеле (бензол-ацетон), 40%. iii: NaOH, MeOH, хроматография на геле Sephadex LH-20 (MeOH), 50%.

#### 4.3. Удлинение спейсера

В то время как для получения конъюгатов с полиакриламидом олигосахарид может иметь короткий спейсер, для конъюгации с белком он должен быть снабжен длинным, гибким и гидрофильным спейсером. Этим требованиям удовлетворяют спейсеры, содержащие олигоэтиленгликолевые участки.

Для удлинения спейсера 2-аминоэтил-гексаарабинофуранозидов **1a** была выбрана аминокислота **57**, содержащая гексаэтиленгликолевый фрагмент (схема 17). Конъюгацию амина **1a** с кислотой **57** проводили в метаноле с помощью хлорида 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина (DMT-ММ) в качестве конденсирующего агента и *N*-метилморфолина в качестве основания. После хроматографии на геле Sephadex LH-20 (MeOH) был получен продукт с удлиненным

спейсером **58** – пригодный для хранения прямой предшественник целевого спейсированного гексасахарид **1b**. Этот гексасахарид **1b** со свободной аминогруппой в терминальном положении агликона-спейсера получали из *N*-трифторацетамидного производного **58** действием NaOH в воде непосредственно перед конъюгацией с белковыми носителями.

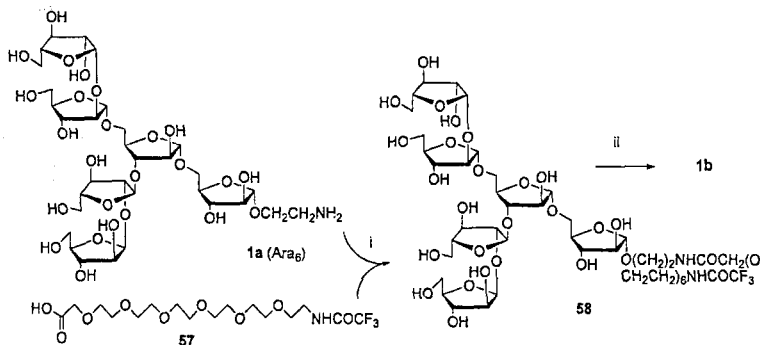


Схема 17. i: 1. DMT-MM, *N*-метилморфолин, MeOH, 2. хроматография на геле Sephadex LH-20 (MeOH), 57%. ii. NaOH, H<sub>2</sub>O.

## 5. Получение неогликоконъюгатов

### 5.1. Конъюгат с полиакриламидом

Конъюгат гексасахарид **1**, родственного концевому фрагменту арабианов микобактерий, с полиакриламидом получали реакцией (2-аминоэтил)гликозида **1a** с поли(4-нитрофенил)акрилатом (**59**) в ДМСО в присутствии триэтиламина (схема 18).

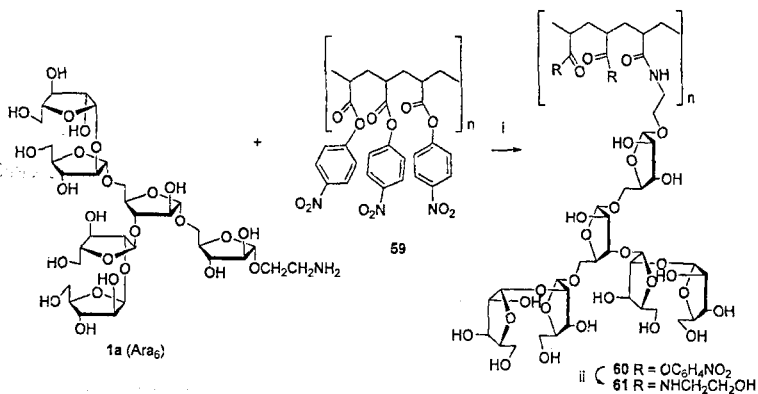


Схема 18. i: NEt<sub>3</sub>, DMSO. ii: NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, DMSO.

Для конъюгирования использовали 0.2 экв. гексасахарид **1a**, содержащего 2-аминоэтильный спейсер, по отношению к *para*-нитрофенильным группам полимера-носителя. Непрореагировавшие нитрофенильные группы были превращены в  $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ -группы обработкой полученного полимера **60** этаноламином. После хроматографии на геле Sephadex LH-20 (MeCN–вода, 1:1) был получен конъюгат  $(\text{Ara}_6)$ -РАА (**61**) гексасахарид **1a** с полиакриламидом.

## 5.2. Конъюгаты с рекомбинантными белками *M. tuberculosis*

Для конъюгации со спейсерированным гексасахаридом **1b** были выбраны рекомбинантные белки MPB-64 и Rv0934 *M. tuberculosis* (схема 19). Конъюгацию проводили двухстадийно: на первом этапе реакцией с диэтилсваратом в нейтральных условиях активировали аминогруппу в агликоне с образованием амидозфира квадратной кислоты **62**, который на втором этапе после очистки обращенно-фазовой хроматографией вводили в реакцию с белком в слабощелочных условиях. Конъюгаты **63a** и **63b** ( $\text{Ara}_6$ -MPB-64 и  $\text{Ara}_6$ -Rv0934) выделяли диализом, охарактеризовали УФ-спектрами и хранили в замороженном виде.

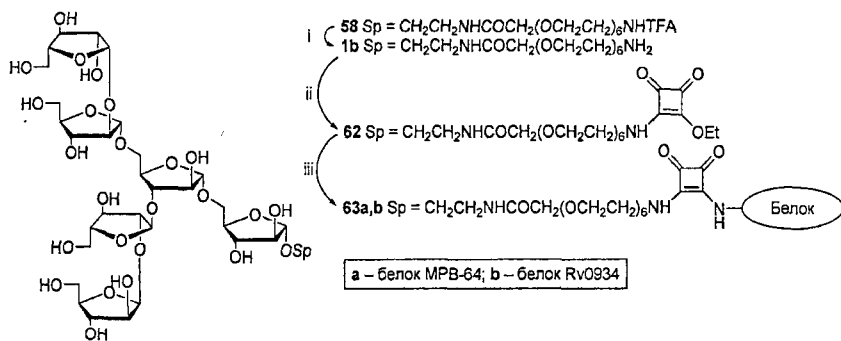


Схема 19. i: NaOH, H<sub>2</sub>O, затем нейтрализация AcOH. ii: диэтилсварат, H<sub>2</sub>O, pH 7.5, затем хроматография на микроколонке с обращенной фазой C18 (H<sub>2</sub>O → MeOH). iii: белок, боратный буферный раствор, pH 9, +4 °C, затем диализ против воды при +4 °C.

Все полученные конъюгаты **61**, **63a,b** переданы в ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (п. Оболенск, Московская обл.) для проведения биологических испытаний в качестве диагностических агентов для серодиагностики туберкулеза.

## ВЫВОДЫ

1. Осуществлен новый рациональный синтез гексасахаридов арабинофуранозы, родственного терминальному фрагменту арабиногалактана и липоарабиноманнана клеточной стенки микобактерий, в том числе возбудителя туберкулеза. Особенностью синтеза является использование ортогональных защитных групп – постоянных *O*-бензоильных и временных *O*-хлорацетильных.

2. Впервые для синтеза олигоарабинофуранозидов с функционализированным агликоном, необходимым для их конъюгации с носителями, применен преспейсерный подход, позволяющий получать из одного предшественника набор олигосахаридов с агликонами различной природы и длины.

3. Предложен новый подход к дифференциации гидроксильных групп в арабинофуранозе, основанный а) на реакции нуклеофильного раскрытия 3-*O*-ацильных производных трициклического 1,2,5-ортобензоата арабинофуранозы, открывающей путь к производным с гидроксильными группами при С-3 и С-5, и б) на образовании и последующем селективном гидролизе 1,2-*O*-бензилиденного производного арабинофуранозы – для получения производных со свободной гидроксильной группой при С-2.

4. На основе реакции нуклеофильного раскрытия тиолами 1,2,5-ортобензоатов 3-*O*-ацил- $\beta$ -D-арабинофуранозы предложен метод синтеза тиогликозидов – предшественников структурных блоков для синтеза целевого гексаарабинофуранозида, а также тиогликозидов селективно защищенных  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-связанных дисахаридов – ценных блоков для получения линейных  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-связанных олигоарабинофуранозных цепей.

5. Впервые в условиях гликозилирования тиогликозидом 2-*O*-хлорацетильного производного арабинофуранозы обнаружено образование олигоарабинофуранозидов с ортоэфирно-связанными моносахаридными остатками. Найден способ перегруппировки тетрасахаридных ортоэфиров в изомерные олигосахариды с 1,2-*транс*-гликозидными связями между моносахаридными звеньями.

6. На основе синтезированного гексаарабинофуранозида, родственного терминальному фрагменту арабианов микобактерий, получены неогликоконъюгаты с полиакриламидом и рекомбинантными белками *Mycobacterium tuberculosis* – новые потенциальные агенты для серодиагностики туберкулеза.



**Основное содержание диссертации изложено в работах:**

1. Н.М. Подвальный, А.И. Зинин, П.И. Абронина, В.И. Торгов, Л.О. Кононов. Циклизация 1,2-(метил)ортобензоата  $\beta$ -D-арабинофуранозы с помощью бромида магния // *Изв. АН, Сер. хим.*, **2009**, с. 472-473.
2. П.И. Абронина, Н.М. Подвальный, Т.М. Мельникова, А.И. Зинин, К.Г. Федина, В.В. Качала, В.И. Торгов, Л.О. Кононов, Е.А. Панферцев, Е.В. Баранова, В.В. Мочалов, В.И. Дятлова, С.Ф. Бикетов. Синтез ковалентных конъюгатов гексаарабинофуранозида с белками и их тестирование в качестве антигенов для серодиагностики туберкулеза // *Изв. АН, Сер. хим.*, **2010**, с. 2276-2280.
3. N.M. Podvalnyy, S.L. Sedinkin, P.I. Abronina, A.I. Zinin, K.G. Fedina, V.I. Torgov, L.O. Kononov. Ring opening of acylated  $\beta$ -D-arabinofuranose 1,2,5-orthobenzoates with nucleophiles allows access to novel selectively protected arabinofuranose building blocks // *Carbohydr. Res.*, **2011**, v. 346, p. 7-15.
4. P.I. Abronina, S.L. Sedinkin, N.M. Podvalnyy, K.G. Fedina, A.I. Zinin, V.I. Torgov, L.O. Kononov. Formation of orthoester-linked D-arabinofuranose oligosaccharides and their isomerization into the corresponding glycosides // *Tetrahedron Lett.*, **2011**, v. 52, p. 1794-1796.
5. С.Л. Сединкин, П.И. Абронина, А.И. Зинин, Н.М. Подвальный, В.И. Торгов, Л.О. Кононов. Нуклеофильное раскрытие 1,2,5-О-ортобензоатов 3-О-ацил- $\beta$ -D-арабинофуранозы. Новый взгляд на старую реакцию // Тезисы докл. X Молодежной конференции по органической химии, Уфа, **2007**, с. 85.
6. P.I. Abronina, L.O. Kononov, N.M. Podvalnyy, V.I. Torgov. Synthesis of highly branched arabinofuranose hexasaccharides from mycobacteria containing  $\beta$ -arabinofuranosyl residues. Comparison of various  $\beta$ -arabinofuranosyl donors // *Abstr. Book XXIV International Carbohydrate Symposium, Oslo, Norway*, **2008**, A-P143.
7. P.I. Abronina, L.O. Kononov, N.M. Podvalnyy, V.I. Torgov.  $\beta$ -D-Arabinofuranosyl-containing branched hexasaccharides from *Mycobacterium tuberculosis*: A convergent approach to the synthesis // *Abstr. Book 3rd Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Sigtuna, Sweden*, **2008**.
8. P.I. Abronina, S.L. Sedinkin, N.M. Podvalnyy, A.I. Zinin, V.V. Kachala, L.O. Kononov, V.I. Torgov. Nucleophilic opening of 3-O-acyl- $\beta$ -D-arabinofuranose 1,2,5-orthobenzoates: a new look at an old reaction // *Abstr. Book 3rd Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Sigtuna, Sweden*, **2008**.

9. С.Л. Сединкин, П.И. Аброна, Н.М. Подвальный, А.И. Зинин, К.Г. Федина, В.И. Торгов, Л.О. Кононов. Синтез 3-О-ацил-1,2,5-ортобензоатов β-D-арабинофуранозы и их реакции с О- и S-нуклеофилами // Тезисы докл. III Молодежной конференции ИОХ РАН, посвященной 75-летию со дня основания ИОХ РАН, 2009, Москва, с. 33, У-10.

10. П.И. Аброна, Л.О. Кононов, Н.М. Подвальный, В.И. Торгов, А.И. Зинин, В.В. Качала, Т.М. Мельникова. Синтез гексасахаридных фрагментов арабианов клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis* в виде гликозидов с функционализированным агликоном и неогликоконъюгатов на их основе // Тезисы докл. Всероссийской конференции по органической химии, посвященной 75-летию со дня основания ИОХ РАН, Москва, 2009, с. 80.

11. P.I. Abronina, L.O. Kononov, N.M. Podvalnyy, V.I. Torgov. Synthesis of a highly branched D-arabinofuranose hexasaccharides from *Mycobacterium tuberculosis* with functionalized aglycons // Abstr. Book XV European Carbohydrate Symposium EUROCARB 15, Vienna, Austria, 2009, p. 341, PA 159.

12. Л.О. Кононов, П.И. Аброна, С.Л. Сединкин, Н.М. Подвальный, К.Г. Федина, А.И. Зинин, В.И. Торгов. Как различить 2-гидроксигруппу и 3,5-диол в арабинофуранозе? Новый подход без использования кремнийорганических защитных групп // Abstr. Book International Symposium "Advanced Science in Organic Chemistry" (ASOC), Мисхор, Украина, 2010, У-01.

13. L.O. Kononov, P.I. Abronina, S.L. Sedinkin, N.M. Podvalnyy, K.G. Fedina, A.I. Zinin, V.I. Torgov. Are silicon-based protective groups required for selective protection of 3,5-diol moiety in arabinofuranose derivatives? An alternative less expensive strategy found // Abstr. Book XXV International Carbohydrate Symposium, 2010, Tokyo, Japan, A-P2-001.

Подписано в печать: 19.05.2011

Заказ № 5561 Тираж - 150 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)