

Винницкий Дмитрий Зиновьевич

«Синтез и изучение антикоагулянтной активности олигосахаридов, родственных разветвленным фрагментам фукоидана из водоросли *Chordaria flagelliformis*»

Шифр специальности 02.00.03, 02.00.10

Химические науки

Шифр диссертационного совета Д 002.222.01

Федеральное государственное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института
zioc.ru 22 июля 2015 года

Дата приема к защите 7 сентября 2015 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК
vak2.ed.gov.ru 11 сентября 2015 года

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

НАУКИ

ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н. Д. ЗЕЛИНСКОГО РАН

На правах рукописи

ВИННИЦКИЙ ДМИТРИЙ ЗИНОВЬЕВИЧ



**СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ
АКТИВНОСТИ ОЛИГОСАХАРИДОВ, РОДСТВЕННЫХ
РАЗВЕТВЛЕННЫМ ФРАГМЕНТАМ ФУКОИДАНА ИЗ
ВОДОРОСЛИ *CHORDARIA FLAGELLIFORMIS***

02.00.03 – органическая химия

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

МОСКВА – 2015

Работа выполнена в лаборатории химии гликоконъюгатов (№52)
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической
химии имени Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

Устюжанина Надежда Евгеньевна
кандидат химических наук, старший научный сотрудник
лаборатории химии гликоконъюгатов №52 ИОХ РАН

Крылов Вадим Борисович
кандидат химических наук, научный сотрудник
лаборатории химии гликоконъюгатов №52 ИОХ РАН

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Михайлов Сергей Николаевич
доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией
дизайна и синтеза биологически активных соединений Института
молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН

Тевяшова Анна Николаевна
кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории
химической трансформации антибиотиков Научно-исследовательского
института по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАН

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Химический факультет Московского
государственного университета им. М. В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 17 ноября 2015 года в 11 часов 00 минут на
заседании Диссертационного совета Д 002.222.01 при Федеральном государственном
бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН
по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН и на сайте <http://zioc.ru>
Автореферат разослан 29 сентября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.222.01
доктор химических наук

Родиновская Л. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Установление взаимосвязи между структурой и свойствами природных соединений является важнейшей задачей современной биоорганической химии. Результаты таких исследований дают ценную информацию для понимания механизмов многих биологических процессов. Кроме того, на основе активных соединений известного строения могут быть разработаны фармацевтические препараты для лечения целого ряда заболеваний.

Среди исследуемых в последнее время биополимеров возрастающий интерес вызывают полисахариды фукоиданы, выделяемые из бурых водорослей и некоторых видов беспозвоночных. Наглядной иллюстрацией этого служит рост публикаций по данной тематике: от единичных статей в начале 80-х до более чем 200 статей только за 2014 год (по данным SciFinder CAS). Причина же подобного интереса заключается в широком спектре биологических свойств, проявляемых этими полисахаридами. В частности, было показано, что фукоиданы эффективно ингибируют процессы воспаления, опосредованные L- и P-селектинами, обладают антикоагулянтным и антиангиогенным действием, блокируют бактериальную адгезию на клетках млекопитающих. Такой уровень биологической активности делает фукоиданы не только чрезвычайно интересными объектами для дальнейших исследований, но и позволяет рассматривать их в качестве основы для создания новых эффективных лекарственных препаратов.

Фукоиданы построены преимущественно из сульфатированных остатков α -L-фукопиранозы. Наиболее часто встречаются два типа главных цепей фукоиданов: одни построены из повторяющихся (1 \rightarrow 3)-связанных фукозных остатков, для других характерно чередование (1 \rightarrow 3)- и (1 \rightarrow 4)-связанных фукозных звеньев. Однако основное влияние на тип физиологической активности, проявляемый тем или иным фукоиданом, оказывают другие, более тонкие детали строения, а именно: степень сульфатирования, положение сульфатных групп, наличие разветвлений (остатков фукозы, глюкозы, галактозы, глюкуроновой кислоты, маннозы), молекулярный вес. Указанные детали структуры определяются биологическим источником и условиями его роста, а также зависят от времени сбора и методов выделения полисахаридов. Для выявления фармакофорных группировок фукоиданов наиболее перспективным является подход, включающий в себя направленный синтез и исследование биологической активности олигосахаридов, родственных различным участкам цепей этих полисахаридов.

Целью работы является синтез и изучение антикоагулянтной активности олигосахаридов, родственных разветвлённым фрагментам фукоидана из водоросли *Chordaria flagelliformis*.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые осуществлен синтез олигосахаридных производных, отвечающих разветвленным фрагментам фукоидана из водоросли *Chordaria flagelliformis*, включая несультатированные, а также избирательно и полностью сульфатированные тетра- и пентасахариды.

Разработан эффективный препаративный метод синтеза фукофуранозил-доноров из L-фукозы с использованием недавно открытой пиранозид-фуранозидной перегруппировки.

Для построения 1,2-*цис*-гликозидных связей показана эффективность использования гликозил-доноров, содержащих удаленные от аномерного центра соучаствующие ацильные группы. Впервые показано стереоконтролирующее влияние ацильных заместителей при O-3 в фукофуранозил-донорах на результат реакции гликозилирования.

Исследование антикоагулянтной активности полученных соединений, а также серии природных и химически модифицированных высокосультатированных фукоиданов показало, что увеличению эффекта способствует высокая степень сульфатирования сахаридов и наличие боковых α -L-фукофуранозных заместителей.

Публикация и апробация работы. По результатам диссертации опубликованы 2 статьи и 1 обзор. Отдельные части работы были представлены на 1-ой Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Казань, 2012 г.), 17-ом Европейском углеводном симпозиуме «EuroCarb2013» (Израиль, Тель-Авив, 2013 г.), 27-ом Международном углеводном симпозиуме «ICS 2014» (Индия, Бангалор, 2014 г.), Международной конференции «Молекулярная сложность в органической химии МСМС-2014» (Москва, 2014 г.).

Личный вклад соискателя. Соискатель участвовал в постановке задач, решаемых в рамках диссертационной работы, самостоятельно проводил все описанные эксперименты, а также анализ и интерпретацию данных физико-химических методов исследования полученных веществ (ЯМР-спектры, масс-спектры). Все статьи, опубликованные по материалам работы, подготовлены автором лично или при его непосредственном участии.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, посвященного природным соединениям бактериального и растительного происхождения, содержащим остатки α -D-глюкуроновой кислоты,

обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитированной литературы. Общий объем диссертации составляет 170 страниц, библиографический список включает 301 наименование.

Автор выражает глубокую благодарность член.-корр. РАН Н.Э. Нифантьеву за плодотворное обсуждение работы, к.х.н. А.С. Дмитренку и к.х.н. Р.А. Новикову за регистрацию спектров ЯМР, к.х.н. А.О. Чижову за регистрацию масс-спектров, к.х.н. А.Г. Гербсту за выполнение расчетов энергий стабилизации карбокатионов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Целевые соединения. Структура фукоидана из водоросли *C. flagelliformis* представляется наиболее сложной из тех, что были установлены к настоящему времени. Основная цепь этого полисахарида построена из частично сульфатированных (1→3)-связанных остатков α -L-фукопиранозы. При O-2 некоторых звеньев основной цепи присутствуют как незамещенные остатки α -D-глюкуроновой кислоты, так и более сложные фрагменты, состоящие из остатков α -D-глюкуроновой кислоты, несущей при O-4 сульфатированный остаток α -L-фукофуранозы (Рисунок 1). Указанный фукоидан обладает значимой антикоагулянтной активностью, блокирует ангиогенез и оказывает иммуностимулирующее действие.

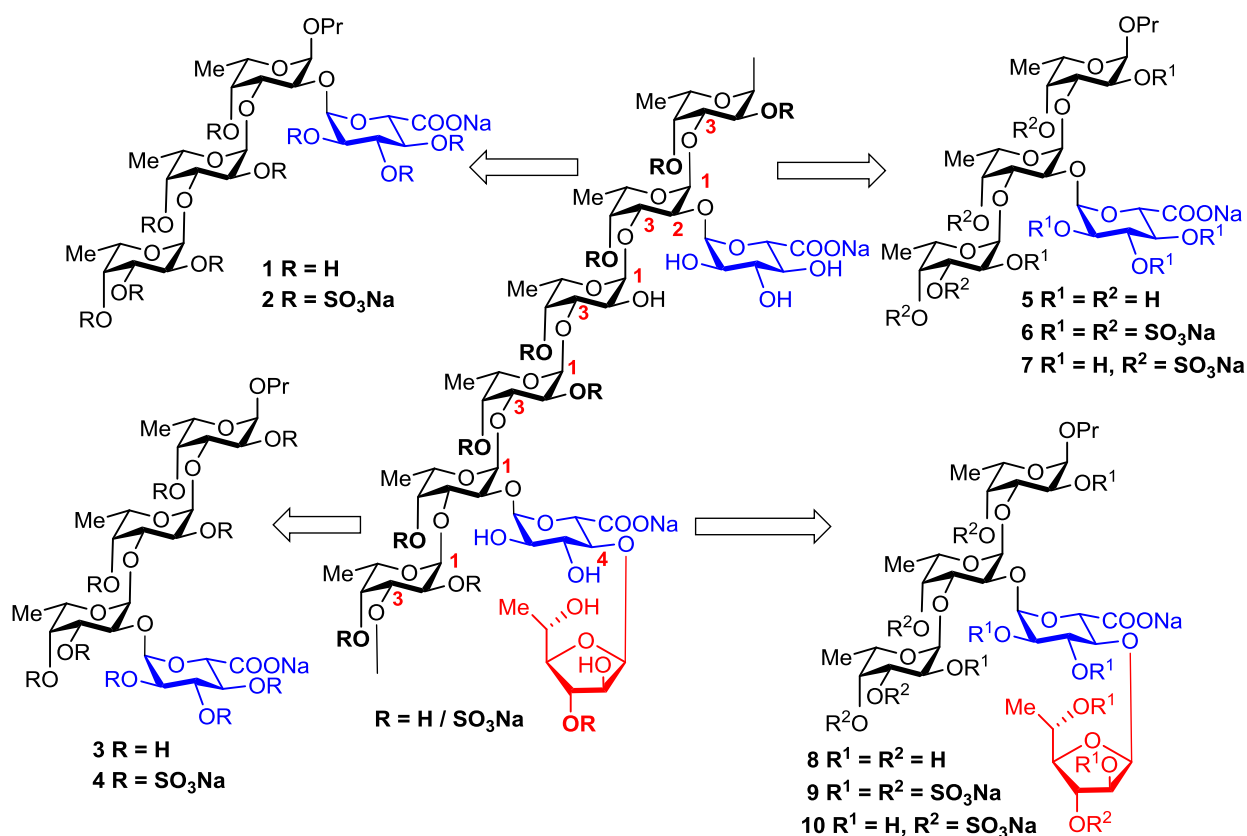


Рис. 1. Фрагмент фукоидана из водоросли *C. flagelliformis* и целевые олигосахариды 1-10.

Для выяснения влияния отдельных структурных элементов этого фукоидана на величину биологического эффекта нами был проведен синтез и исследование антикоагулянтной активности 10 родственных олигосахаридов. В качестве объектов синтеза были выбраны несulfатированные **1, 3, 5, 8**, избирательно sulfатированные **7, 10** и полностью sulfатированные **2, 4, 6, 9** тетра- и пентасахариды (Рисунок 1), построенные из остатков α -L-фукопиранозы, α -D-глюкуроновой кислоты и α -L-фукофуранозы. Целевые соединения соответствуют разветвленным участкам природного фукоидана.

2. Ретросинтетический анализ целевых соединений. На первом этапе работы нами был проведен ретросинтетический анализ целевых олигосахаридов, в результате чего были выделены две синтетические группы соединений, исходя из общности путей их получения. В первую группу вошли тетрасахариды **1-4**, которые планировалось получать методом блочного синтеза по схемам [2+2] (Рисунок 2). В случае тетрасахаридов **1, 2** в качестве дисахаридных блоков были выбраны гликозил-донор **11** и гликозил-акцептор **12**, а сборку углеводного скелета тетрасахаридов **3, 4** планировалось провести с использованием дисахаридов **13** и **14**. При этом (1→3)-связанный дисахаридный донор **11** мог быть получен из дифукозидного акцептора **13**, а (1→2)-связанный дисахаридный донор **14** планировалось получать из гликозил-акцептора **12**.

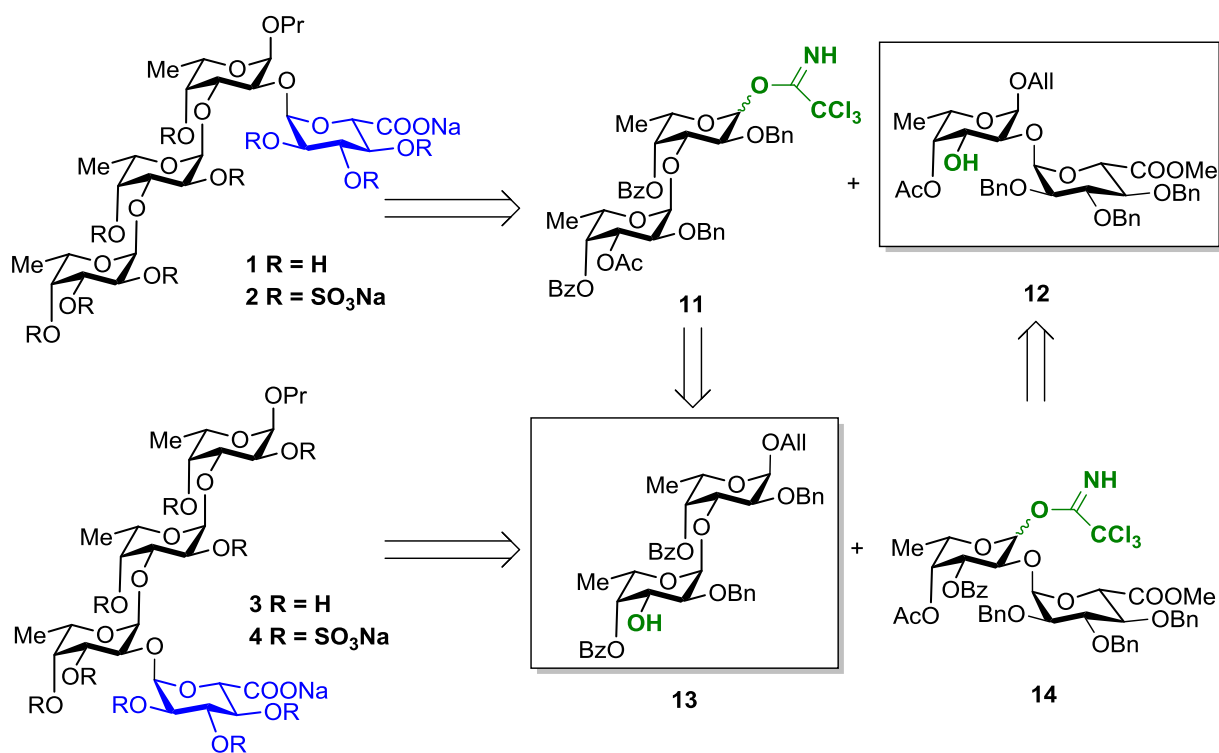


Рисунок 2. Ретросинтетический анализ целевых тетрасахаридов **1-4**.

Таким образом, число исходных структур было сокращено до двух (соединения **12** и **13**), при этом методы их синтеза были ранее отработаны в нашей лаборатории.

Во вторую группу вошли тетрасахариды **5-7** и пентасахариды **8-10** (Рисунок 3). Для получения соединений этой группы планировалось использовать дифукозид **15**, содержащий две ортогональные защитные группы: *para*-метоксибензильную (MBn) при *O*-2' и хлорацетильную (CA) при *O*-3'. Такая расстановка защитных групп позволяет избирательно высвобождать гидроксильные группы и последовательно вводить гликозильные остатки. В случае тетрасахаридов **5-7** планировалось сначала ввести остаток глюкуроновой кислоты с использованием гликозил-донора **16**, а затем остаток фукопиранозы с использованием фукозил-донора **17**.

В ходе синтеза пентасахаридов **8-10** в качестве глюкуронил-донора планировалось использовать трихлорацетимидат **18**, содержащий *tert*-бутил-диметилсилильную защитную группу при *O*-4. Это позволяет избирательно ввести остаток фукофуранозы с использованием гликозил-донора **19**. Введение фукопиранозного заместителя в третье положение центрального фукозного остатка происходит на завершающей стадии сборки углеводного скелета с использованием фукозил-донора **17**.

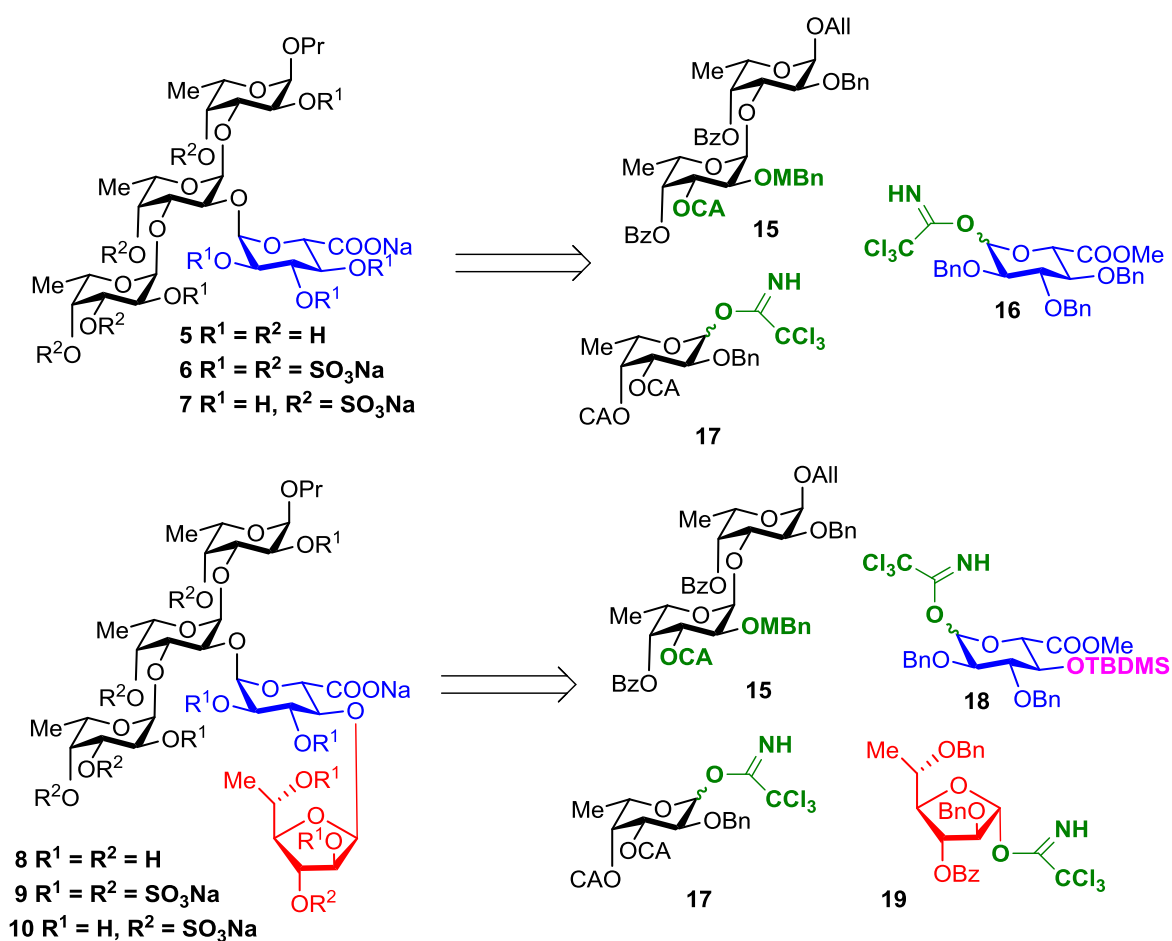


Рисунок 3. Ретросинтетический анализ целевых сахаридов **5-10**.

Важно отметить, что все моносахаридные остатки в олигосахаридах **1-10** соединены 1,2-*цис*-(α)-гликозидными связями, поэтому для их сборки необходимо было использовать блоки, содержащие несоучаствующие защитные группы при *O*-2. Кроме того, для стереоизбирательного построения α -гликозидных связей планировалось использовать эффект соучастия ацильных заместителей, удаленных от аномерного центра гликозил-донора. На Рисунке 4 представлены примеры нестабилизированного (**I**) и стабилизированных (**II** и **III**) гликозил-катионов. Видно, что нуклеофильная атака катионов **II** и **III** возможна только с α -стороны. Для каждого конкретного гликозил-катиона методом молекулярной механики (ММ+) выполнен расчет величины энергии стабилизации ($E_{\text{стаб.}}$), которая представляет собой разность энергий нестабилизированного и стабилизированного катионов (все расчёты проведены к.х.н. А.Г. Гербстом).

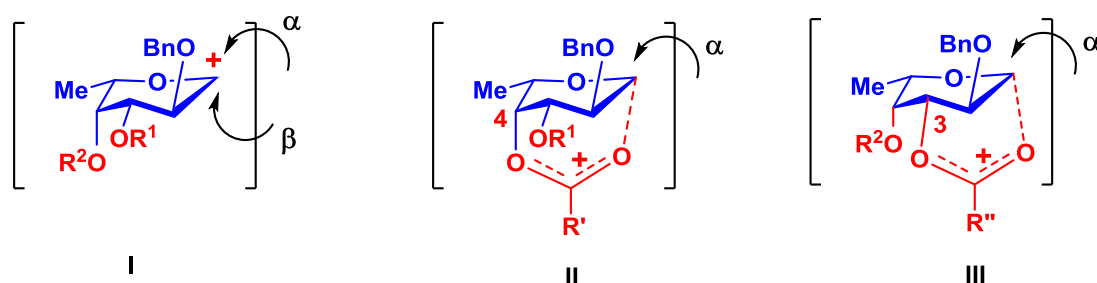


Рисунок 4. Нестабилizированный (**I**) и стабилизированные (**II** и **III**) гликозил-катионы.

3. Синтез целевых тетрасахаридов 1-4. Дисахаридные предшественники **12** и **13** были синтезированы по отработанным ранее схемам исходя из аллил- α -L-фукопиранозида. Далее для получения гликозил-донора **11** проводили ацетилирование дисахарида **13** с образованием дифукозида **20**, в котором затем была удалена аллильная группа с аномерного центра действием PdCl_2 в метаноле, после чего образовавшийся полуацеталь переводили в соответствующий трихлорацетимидат **11** обработкой CCl_3CN в присутствии Cs_2CO_3 (Схема 1).

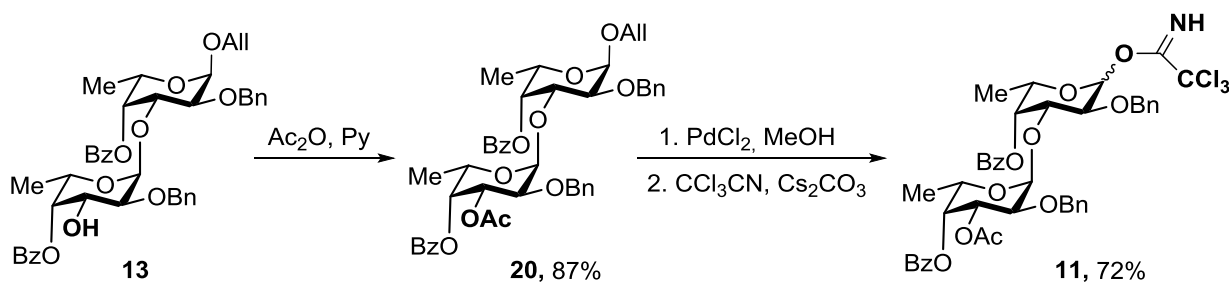


Схема 1.

Гликозилирование дисахаридного акцептора **12** донором **11** в присутствии TMSOTf привело к образованию тетрасахарида **21** с выходом 82% (Схема 2). α -Конфигурация образованной гликозидной связи была подтверждена характеристичной величиной константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $J_{1-2} = 3.6$ Гц в ^1H -ЯМР спектре. Необходимо отметить, что в результате реакции не было зафиксировано следов β -изомерного продукта. Стереохимический результат реакции объясняется стабилизацией гликозил-катиона за счет анхимерного содействия бензоильного заместителя при *O*-4. Аналогичные эффекты были отмечены ранее для моно- и дисахаридных фукозил-доноров, использованных в ходе синтеза гомофукозидов. Величина $E_{\text{стаб.}}$ для катиона типа **II** (см. Рисунок 2) составила 5,8 ккал/моль.

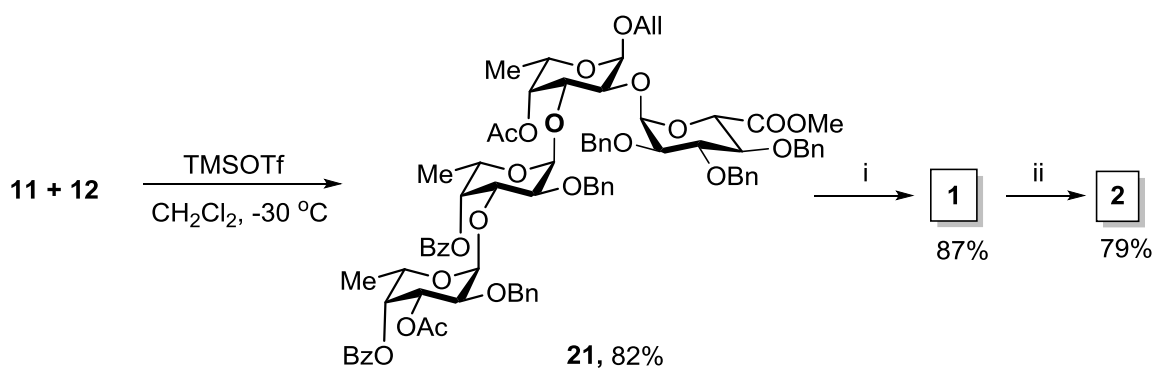


Схема 2. (i): 1. H_2 , Pd/C, 2. 0.2 M NaOH, MeOH; (ii): $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$, HSO_3Cl , DMF.

Гидрогенолиз полученного тетрасахарида **21** с последующим омылением приводили к целевому тетрасахариду **1** с выходом 87% (Схема 2). Для получения полностью сульфатированного производного **2** были использованы условия реакции кислотно-промотируемого сульфатирования, разработанной в нашей лаборатории ранее. В результате действия комплекса $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$ в присутствии HSO_3Cl тетрасахарид **1** был переведен в соединение **2** с выходом 79%.

Для получения гликозил-донора **14** проводили бензоилирование синтезированного ранее дисахарида **12** с образованием дифукозида **22**, в котором затем была удалена аллильная группа действием PdCl_2 в метаноле, после чего полученный полуацеталь переводили в соответствующий трихлорацетимидат **14** (Схема 3).

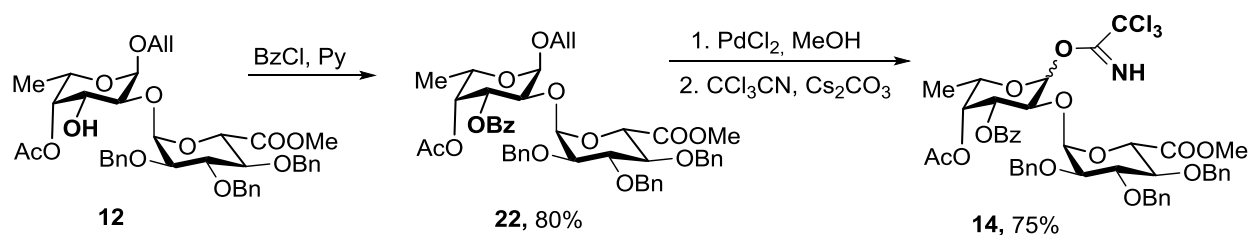


Схема 3.

Сочетанием дисахаридов **13** и **14** в присутствии TMSOTf был получен тетрасахарид **23** с выходом 75% (Схема 4). Как и в случае синтеза тетрасахарида **21**, в ходе реакции образовывался только необходимый α -изомер. Величины энергии стабилизации для катионов типов **II** и **III** составили 11,2 ккал/моль и 4,8 ккал/моль, соответственно. Гидрогенолиз тетрасахарида **23** с последующим омылением приводили к целевому тетрасахариду **3** с выходом 86%. Сульфатированием соединения **3** в присутствии хлорсульфоновой кислоты был получен полностью сульфатированный продукт **4** с выходом 82%.

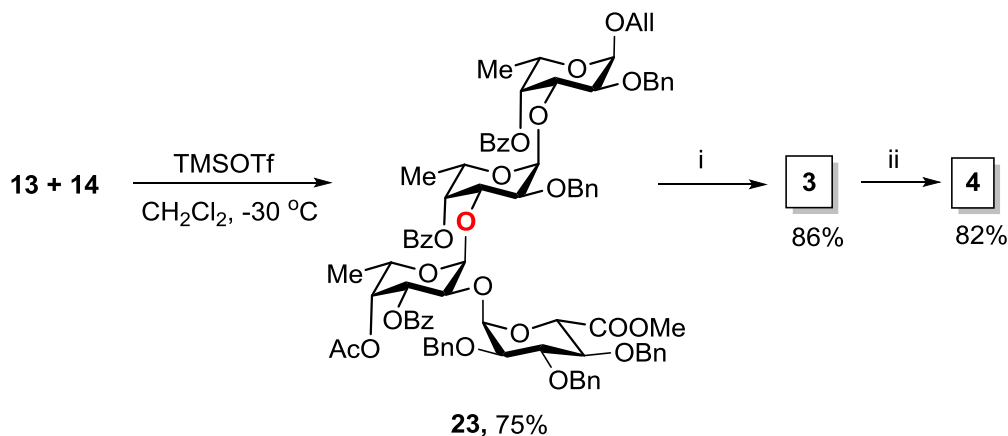


Схема 4. (i): 1. H₂, Pd/C, 2. 0.2 M NaOH, MeOH; (ii): Py·SO₃, HSO₃Cl, DMF.

4. Синтез дисахаридного блока 15 и глюкуронил-доноров 16 и 18. Для синтеза ключевого дисахаридного блока **15** был использован доступный аллил- α -L-фукопиранозид **24**. Из этого соединения были получены моносахаридные гликозил-акцепторный **25** (в одну операционную стадию, выход 85%) и гликозил-донорный **27** (3 операционные стадии, общий выход 60%) блоки (Схема 5).

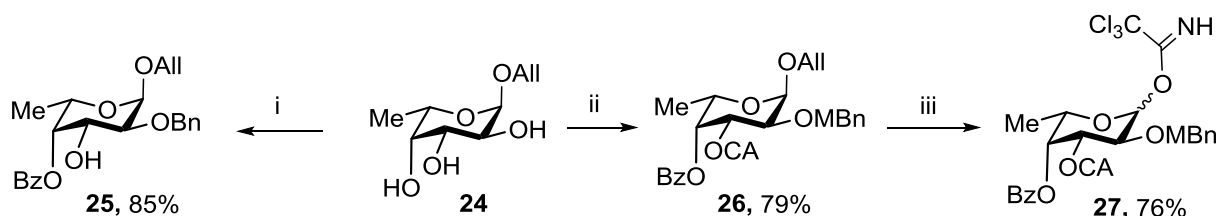


Схема 5. (i): 1. PhC(OMe)₃, CSA, DMF 2. NaH (60%), BnBr 3. AcOH (80% водн.); (ii): 1. PhC(OMe)₃, CSA, DMF, 2. NaH (60%), MBnCl, Bu₄NI 3. AcOH (80% водн.) 4. CaCl₂, Py; (iii): 1. PdCl₂, MeOH, 2. CCl₃CN, Cs₂CO₃.

Гликозилирование моносахаридного акцептора **25** фукозил-донором **27** в присутствии TMSOTf приводило к образованию необходимого α-изомера **28** с выходом 95% (Схема 6), что подтверждалось величиной соответствующей КССВ J_{1-2} (3,6 Гц). Как и в случае описанных выше реакций гликозилирования, стереохимический результат данной реакции обусловлен анхимерным содействием ацильных групп при O-3 и O-4 в гликозил-доноре **27**. Величины энергии стабилизации для катионов типов **II** и **III** составили 4,3 ккал/моль и 12,4 ккал/моль, соответственно.

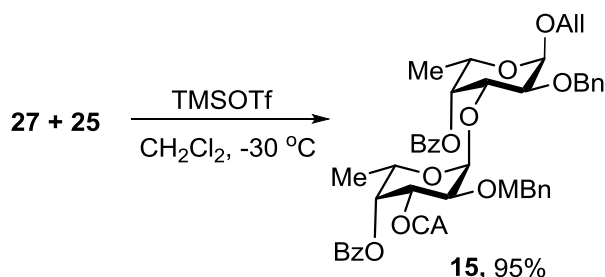


Схема 6.

Исходным соединением для получения бензилированных глюкуронил-доноров **16** и **18** был доступный пентаацетат β-D-глюкозы **28**. Действием аллилового спирта в присутствии эфира трехфтористого бора с последующим дезацелированием действием метилата натрия в метаноле с выходом 75% был получен тетраол **29**. Далее первичная гидроксильная группа была защищена тритильной группой, после чего следовали стадии исчерпывающего бензилирования и детритилирования с образованием моногидроксильного производного **30** с выходом 78%. Окисление гидроксильной группы в соединении **30** было проведено с использованием мягкой окислительной системы: 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилоксил (TEMPO) – бис(ацетокси)йодбензол (BAIB). Последующее метилирование полученной глюкуроновой кислоты действием метилйодида в присутствии карбоната калия приводило к метилглюкурониду **31** с выходом 89% на 2

стадии. Деаллилирование и перевод полученного полуацетала в трихлорацетимидат приводили к глюкоронил-донору **16** с выходом 78% (схема 7).

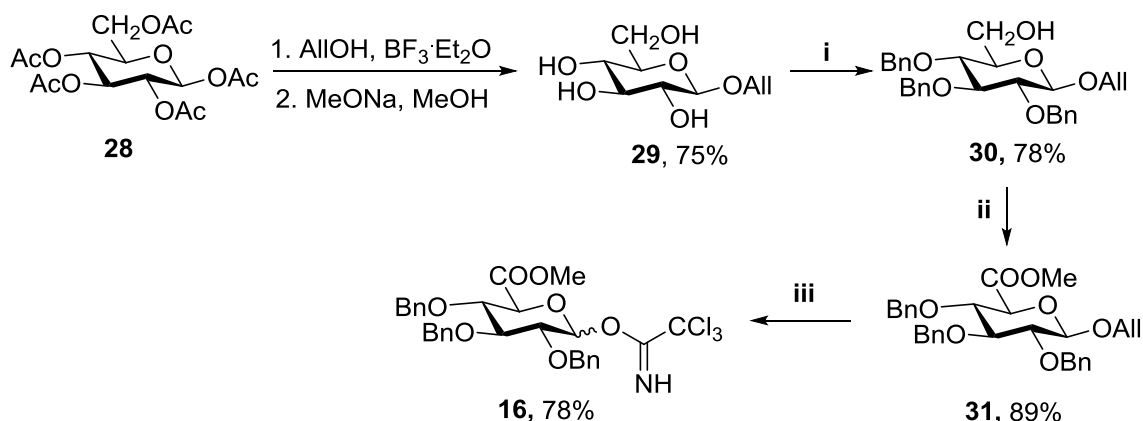


Схема 7. (i): 1. TrCl, Py, DCM 2. NaH (60%), BnBr, DMF 3. TFA (90% водн.), DCM; (ii): 1. ВАИВ, TEMPO, DCM/H₂O, 2. MeI, K₂CO₃, DMF; (iii): 1. PdCl₂, MeOH, 2. CCl₃CN, Cs₂CO₃.

Для получения глюконил-донора **18** тетраол **29** был сначала переведен в 4,6-бензилиденное производное, бензилирование которого с последующим удалением бензилиденной защиты в условиях кислотного гидролиза дало диол **32** с выходом 73% (Схема 8). Региоизбирательное окисление первичной гидроксильной группы в соединении **32** было выполнено с использованием системы TEMPO–ВАИВ. После метилирования карбоксильной группы был выделен метилглюкуронид **33** с выходом 84% на 2 стадии. Далее свободная гидроксильная группа при C-4 была защищена *трет*-бутилдиметилсилильной группой (TBDMS), что приводило к моносахариду **34**, из которого по отработанной схеме был получен глюконил-донор **18** с выходом 72%.

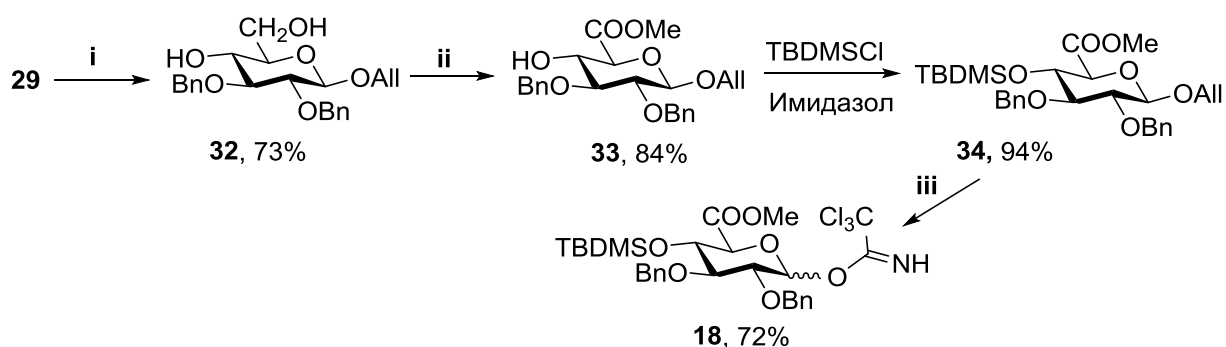


Схема 8. (i): 1. PhCH(OMe)₂, CSA, DMF, 2. NaH (60%), BnBr, 3. TFA (90% водн.); (ii): 1. ВАИВ, TEMPO, DCM/H₂O, 2. MeI, K₂CO₃, DMF; (iii): 1. PdCl₂, MeOH, 2. CCl₃CN, Cs₂CO₃.

5. Синтез целевых тетрасахаридов 5-7. Для получения дисахаридного гликозил-акцептора **35** в соединении **15** была удалена *para*-метоксибензильная группа в условиях кислотного гидролиза (Схема 9). Сочетание дисахарида **35** и глюкононил-донора **16** приводило к смеси изомерных трисахаридов **36** с выходом 78%. Соотношение α : β изомеров в смеси составило 5:1, что было установлено по соотношению величин интегральных интенсивностей сигналов H-1 остатков глюконовой кислоты (сигналы H-1 ^{α GlcA} $J_{1,2} = 3,9$ Hz, H-1 ^{β GlcA} $J_{1,2} = 7,6$ Hz).

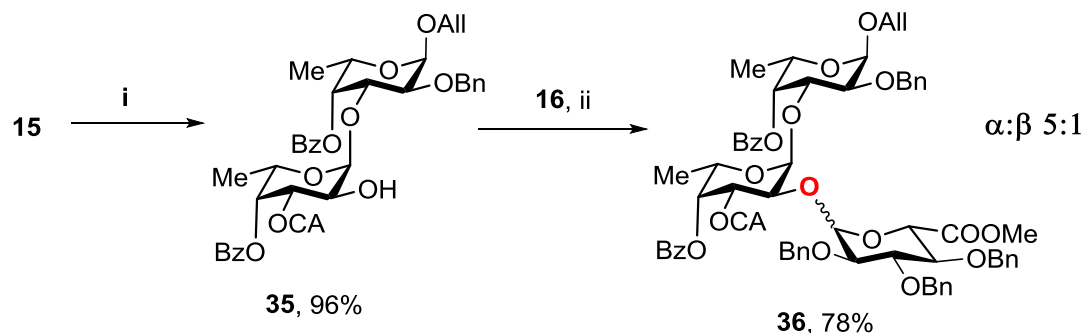


Схема 9. (i): TFA (90% водн.), DCM; (ii): TMSOTf, DCM, -30 °C.

Преимущественное образование α -изомера в ходе реакции глюкононирования объяснялось стабилизацией гликозил-катиона карбометоксильной группой (Рисунок 5). Величина энергии стабилизации катиона составила 6,5 ккал/моль.

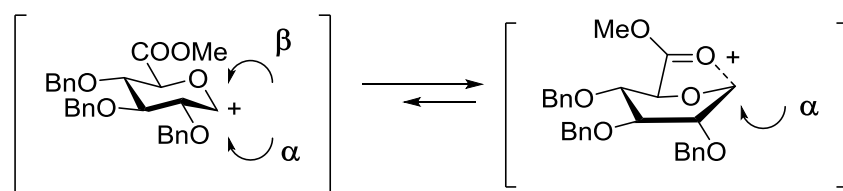


Рисунок 5.

Удалением хлорацетильной группы в **36** был получен α -изомерный трисахарид **37**, содержащий свободную гидроксильную группу при C-3' (Схема 10). Из аллил-фукозида **24** в 2 операционные стадии был получен фукозил-донор **17**. Сочетание трисахариды **37** и моносахарида **17** приводило исключительно к α -связанному тетрасахариду **39** с выходом 91% (КССВ $J_{1,2} = 3,7$ Гц). Стереохимический результат данной реакции обусловлен анхимерным содействием ацильных групп при O-3 и O-4 в гликозил-доноре **17**. Величины энергии стабилизации для катионов типов II и III составили 6,2 ккал/моль и 11,1 ккал/моль, соответственно.

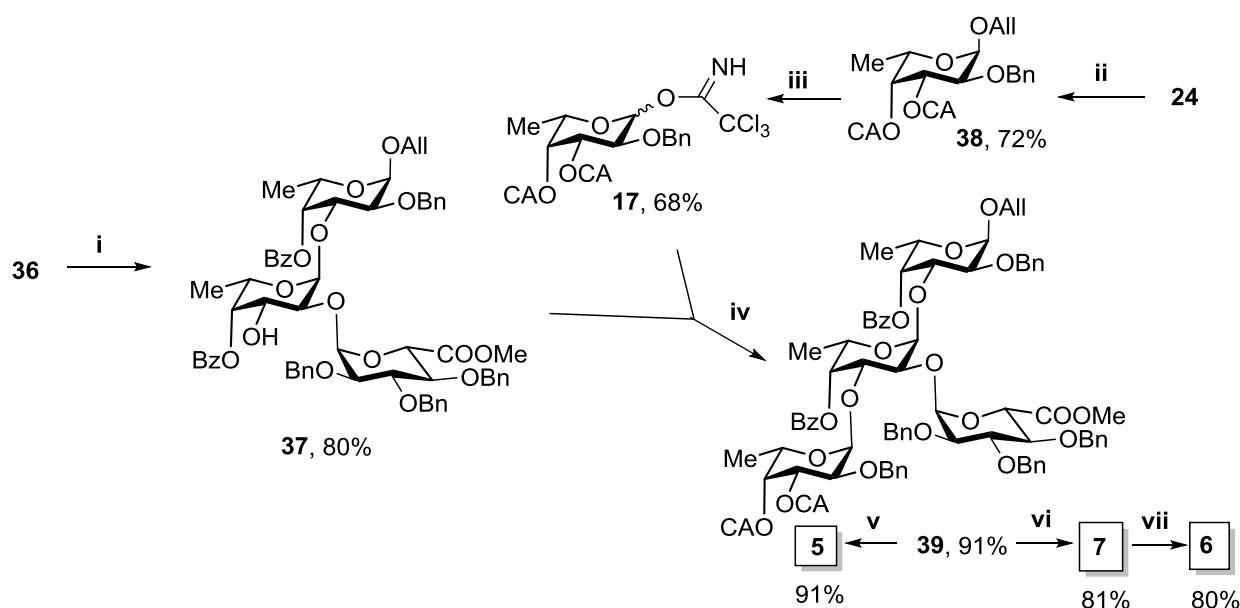


Схема 10. (i): $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, 2,4,6-коллидин, MeOH, (ii): 1. $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$, CSA, DMF, 2. NaH (60%), BnBr, 3. TFA (90% водн.), 4. CAlCl , Py; (iii): 1. PdCl_2 , MeOH, 2. CCl_3CN , Cs_2CO_3 ; (iv): TMSOTf, DCM, $-30\text{ }^\circ\text{C}$; (v): 1. H_2 , Pd/C, 2. 0.2 M NaOH, MeOH; (vi): 1. 0.2 M NaOH, THF, MeOH, 2. $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$, DMF, 3. H_2 , Pd/C; (vii): $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$, DMF.

Из соединения **39** были получены целевые тетрасахариды **5-7**. Удаление всех ацильных групп в **39**, сульфатирование свободных гидроксильных групп в полученном продукте и последующий гидрогенолиз приводили к избирательно сульфатированному тетрасахариду **7** с выходом 81%. Удалением всех защитных групп в **39** был получен нессульфатированный тетрасахарид **5** с выходом 91%. Однако введение данного тетрасахарида в реакцию кислотно-прототируемого сульфатирования, в отличие от тетрасахаридов **1**, **3**, сопровождалось изомеризацией восстанавливающего фукопиранозидного остатка в фукофуранозидный. В результате нами была выделена смесь, состоящая из целевого тетрасахарида **6** и изомерного ему продукта **6f** (Рисунок 6).

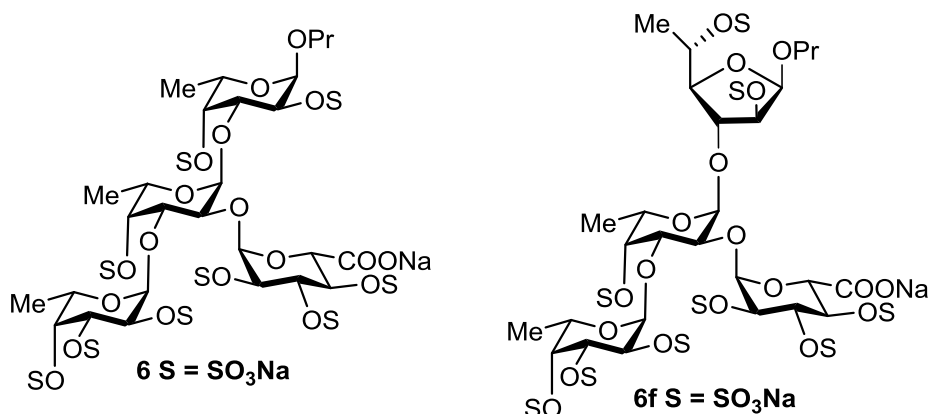


Рисунок 6.

Мониторинг указанной реакции с использованием методов ЯМР спектроскопии показал, что изомеризация начинает протекать еще на стадии частично сульфатированного продукта. Для ингибирования изомеризации нами была проведена реакция сульфатирования без кислоты, но она привела лишь к смеси частично сульфатированных продуктов. Анализ ЯМР-спектров продуктов показал, что несульфатированными остаются стерически затрудненные гидроксильные группы при *O*-4 центрального и восстанавливающего остатков фукозы. Поэтому нами была предпринята попытка досульфатирования частично сульфатированного тетрасахарида **7**. Действительно, обработка тетрасахарида **7** комплексом $\text{Py}\cdot\text{SO}_3$ в отсутствие кислоты приводила к целевому сполна сульфатированному продукту **6** с выходом 80% (Схема 10).

6. Получение фукофуранозных синтетических блоков. Целевые пентасахариды **8-10** содержат α -L-фукофуранозный остаток при *O*-4 глюконовой кислоты. В связи с этим, для их синтеза необходимо было разработать эффективный метод получения фукофуранозного блока. Следует отметить, что для фукозы термодинамически более выгодной является пиранозная форма, а перевод ее в фуранозную форму представляется нетривиальной задачей.

Ранее в данной работе нами наблюдалась изомеризация фукопиранозы в фукофуранозу при кислотнo-промотируемом сульфатировании тетрасахарида **5**. Подобные побочные реакции в присутствии кислот наблюдались в нашей лаборатории и ранее при изучении реакций сульфатирования других олигосахаридов (см. пример на Схеме 11). С учетом полученных результатов, было решено разработать препаративный метод синтеза фукофуранозидных производных, основанный на реакции кислотнo-промотируемого сульфатирования.

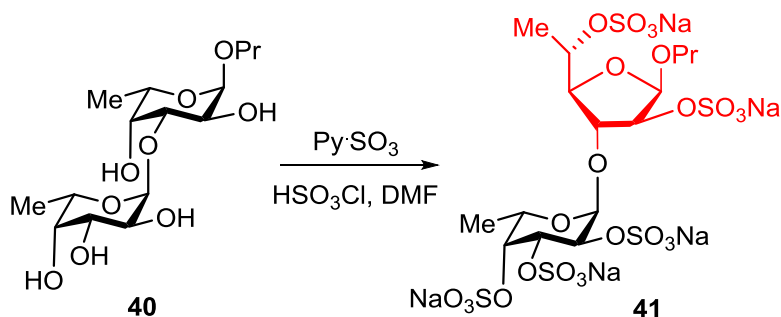


Схема 11.

Первоначально возможность проведения пиранозид-фуранозидной перегруппировки была изучена на примере доступного аллил- α -L-фукопиранозида **24**.

Однако кислотнo-промотируемое сульфатирование **24** в присутствии хлорсульфоновой кислоты приводило только к полностью сульфатированному фукопиранозиду **42** (Схема 12). Повышение температуры до 50 °С и увеличение времени реакции с 1 до 3 суток также не позволили получить желаемый фуранозидный продукт.

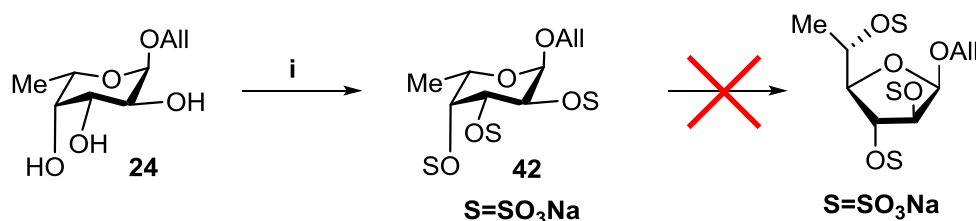


Схема 12. (i): Py·SO₃, HSO₃Cl, DMF

Неудачный результат, полученный при попытке проведения перегруппировки аллил- α -L-фукопиранозидов, вынудил нас рассмотреть возможность синтеза фукофуранозидов исходя из аллил- β -L-фукопиранозидов **47**. Было реализовано два пути получения аллил- β -L-фукопиранозидов **47** из L-фукозы **48** (Схема 13). Первый путь включал 4 последовательных стадии, а общий выход превращения, исходя из L-фукозы, составил 21%. Второй путь включал 5 стадий, его общий выход составил 25%. Помимо аллил- β -L-фукопиранозидов **47**, было синтезировано его производное **52**, содержащее бензоильную группу при O-3.

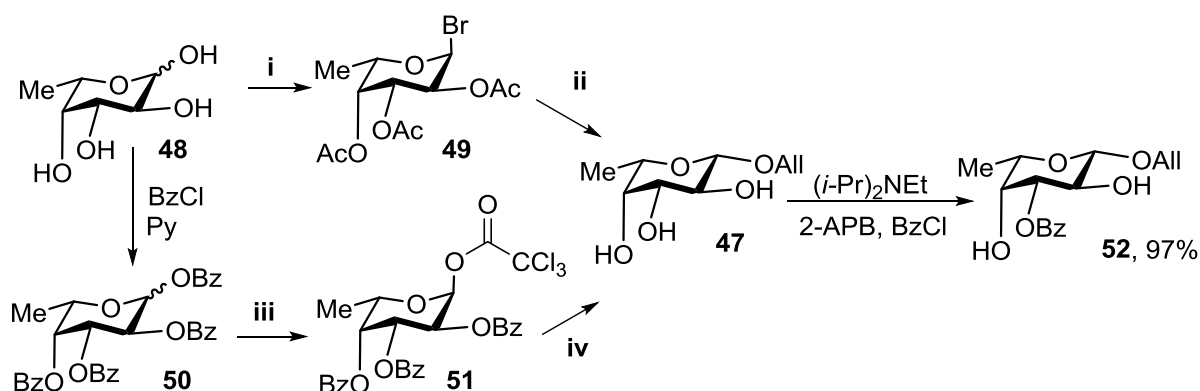


Схема 13. (i): 1. Ac₂O, Py, 2. HBr/AcOH, Ac₂O; (ii): 1. AlOH, TfOAg, 2. MeONa, MeOH; (iii): 1. Морфолин, ацетон, 2. CCl₃CN, Cs₂CO₃; (iv): 1. AlOH, TMSOTf, 2. MeONa, MeOH.

Полученные аллил- β -L-фукопиранозиды **47** и **52** были введены в реакцию кислотнo-промотируемого сульфатирования. По прошествии 24 часов исходные пиранозиды практически нацело перегруппировывались в соответствующие

фукофуранозиды **53** и **54**, конверсия по данным ЯМР превышала 90% (Схема 14). Таким образом, нами впервые была показана возможность проведения перегруппировки $\text{Fucp} \rightarrow \text{Fucf}$ на препаративных количествах вещества. Кроме того, мы выявили факт зависимости между конфигурацией аномерного центра углевода и возможностью перегруппировки в условиях кислотного-прототируемого сульфатирования, что является важным наблюдением для дальнейшего изучения механизма данной реакции.

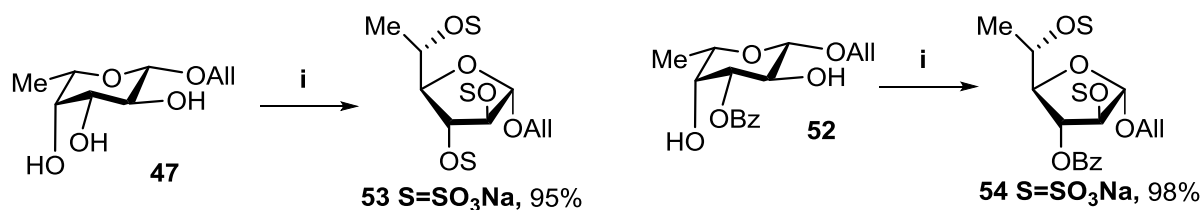


Схема 14. (i): $\text{Py} \cdot \text{SO}_3$, HSO_3Cl , DMF, 24 ч.

Для успешного применения данной реакции в препаративном синтезе фукофуранозидных блоков необходимо было разработать эффективный метод десульфатирования. Нами был использован метод сольволитического десульфатирования, заключающийся в обработке сульфатированного производного слабой кислотой в диоксане или диметилсульфоксиде при нагревании. Было показано, что выдерживание реакционной смеси в течение 30 минут при 50°C в смеси растворителей диоксан:ДМФА (5:1) в присутствии ионообменной смолы IR-120 (H^+) приводит к удалению всех сульфатных групп и образованию требуемого моносахарида **55** с выходом 82% (Схема 15). Таким образом, впервые было показано, что последовательное проведение реакций кислотного-прототируемого сульфатирования и десульфатирования в указанных условиях позволяет получать фукофуранозные блоки в высокими выходами из соответствующих фукопиранозных предшественников.

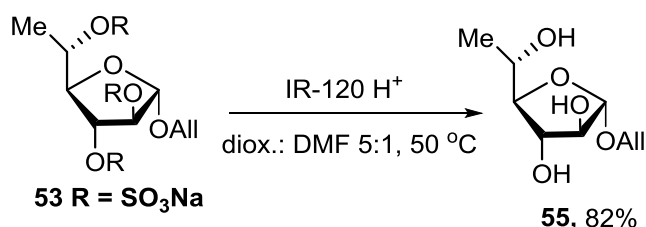


Схема 15.

Описанные выше два метода получения аллил- β -L-фукопиранозида **47** (Схема 13) довольно трудоемки, требуют проведения нескольких стадий и характеризуются

недостаточно высоким общим выходом целевого продукта. Для упрощения синтетической схемы нами была использована одностадийная процедура прямого аллилирования фукозы **48** в водном растворе под действием аллилбромид в присутствии гидроксида натрия (Схема 16). Продуктом такой реакции является смесь α - и β -аллилфукопиранозидов **58** в соотношении 1:5. Данная смесь не разделяется методами колоночной хроматографии и ВЭЖХ. Смесь изомеров **58** была введена в реакцию селективного 3-*O*-бензоилирования, что позволило нам получить производное **59** с выходом 97%. Соединения **58** и **59** были введены в пиранозид-фуранозидную перегруппировку. В обоих случаях была получена смесь α -изомерного пиранозида и β -изомерного фуранозида, которые легко разделялись методом колоночной хроматографии. В результате из смесей нами были выделены чистые аллил- β -фукопиранозид **55** и аллил-3-*O*-бензоил- β -фукопиранозид **60**, которые затем были введены в реакцию бензилирования в присутствии оксида серебра. После этого в обоих соединениях были удалены аллильные защитные группы, а затем полученные полуацетали переводили в трихлорацетоимидаты **19** и **61** (Схема 16).

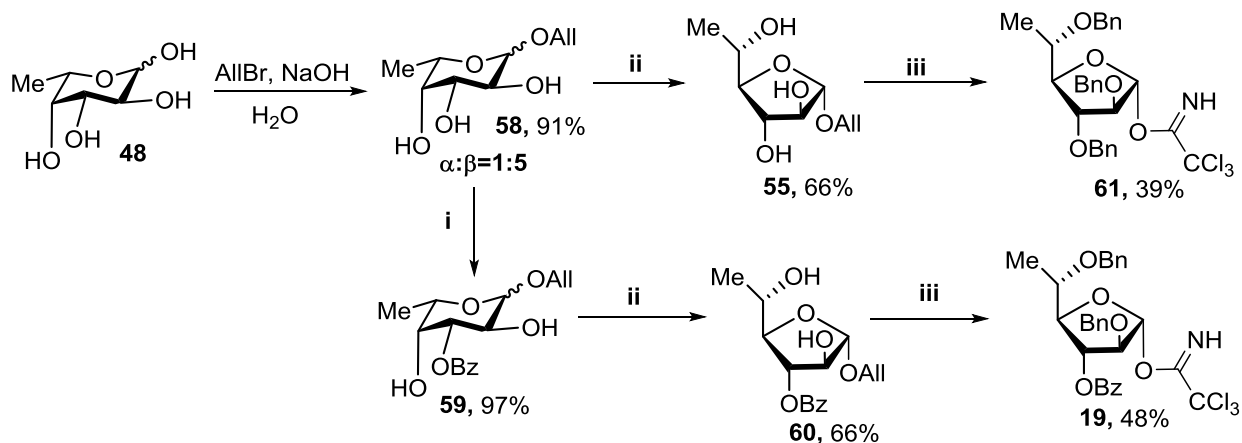


Схема 16. (i): BzCl , $(i\text{-Pr})_2\text{NEt}$, 2-APB; (ii): 1. PySO_3 , HSO_3Cl , DMF, 2. NaHCO_3 , 3. IR-120 (H^+), DMF-Диоксан; (iii): 1. BnBr , Ag_2O , 2. PdCl_2 , MeOH , 3. CCl_3CN , Cs_2CO_3 .

На следующем этапе мы приступили к изучению реакции фукофуранозилирования, причем в качестве модельного акцептора мы использовали глюкуронат **33**, полученный нами ранее, а в качестве доноров трихлорацетимидаты **19**, **61** (Схема 17). При сочетании трибензилированного донора **61** и акцептора **33** в результате реакции образовывалась смесь изомеров в соотношении $\alpha:\beta$ 1:2. В случае же использования донора **19**, содержащего соучаствующую бензоильную группу при *O*-3, результат реакции менялся кардинальным образом: соотношение $\alpha:\beta$ составило 6:1.

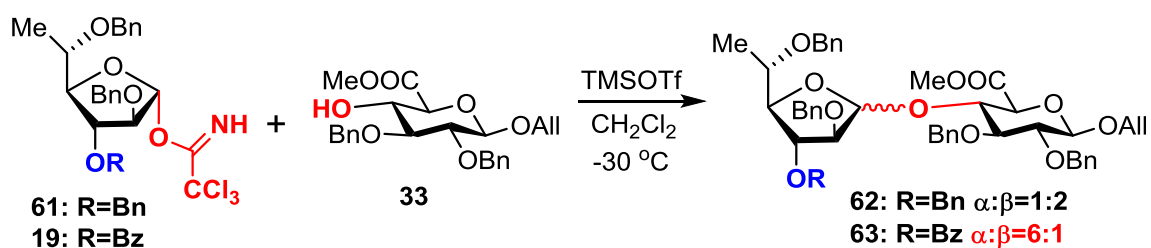


Схема 17.

Соотношение изомеров в данном эксперименте определялось с помощью ¹H-ЯМР спектроскопии по соотношению интегралов интенсивности пиков аномерных протонов фукофуранозного кольца *H*-1 Фус. Для α-изомера это дуплет с константой спин-спинового взаимодействия $J_{1,2} \sim 4$ Гц (δ 5.20-5.35 м.д.), а для β-изомера это синглет (δ 5.50-5.60 м.д.).

Принципиальная разница в стереоизбирательности реакций гликозилирования донорами **19** и **61** объяснялась удаленным соучастием бензоильной группы из третьего положения (Рисунок 8). В фукофуранозе, так же как и в фукопиранозе, ацильная защитная группа при *O*-3 может стабилизировать карбокатион, образующийся в процессе реакции гликозилирования. Рассчитанная величина энергии стабилизации составила 5,4 ккал/моль. Таким образом, была впервые показана возможность удаленного соучастия ацильного заместителя в структуре фукофуранозного донора.

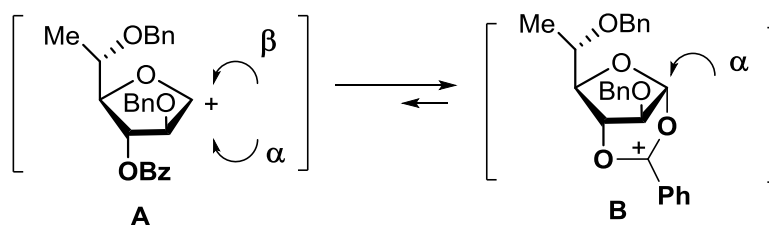


Рисунок 8.

7. Синтез пентасахаридов 8-10. Полученный ранее при сборке целевых тетрасахаридов **5-7** акцептор **35** был введен в реакцию гликозилирования с глюкуроныльным донором **18**, содержащим ортогональную защитную группу (TBDMS). В результате этой реакции с выходом 87% образовывалась смесь изомерных трисахаридов **64** в соотношении α:β=4:1, которое было установлено по соотношению интегральных интенсивностей сигналов *H*-1 остатков глюкуроновой кислоты (сигналы *H*-1^{αGlcA} $J_{1,2} = 3,9$ Hz, *H*-1^{βGlcA} $J_{1,2} = 8,7$ Hz) (Схема 18).

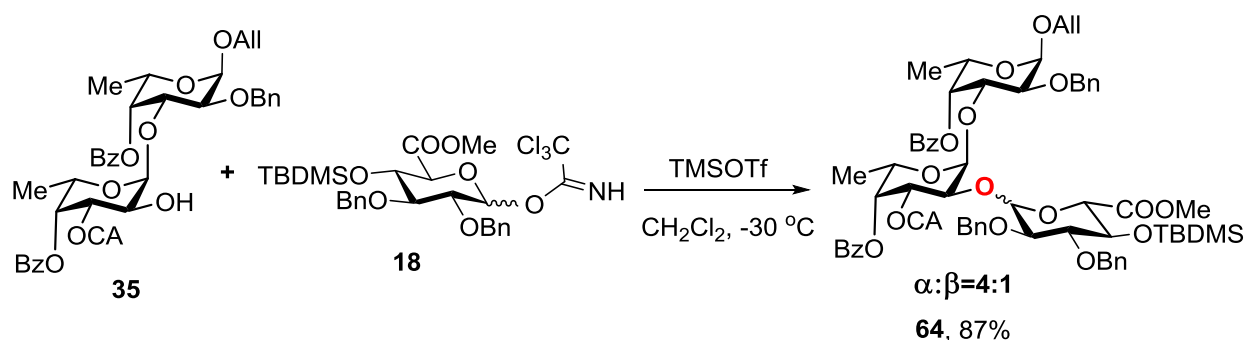


Схема 18.

Преимущественное образование α -изомера в ходе реакции гликоурилирования, как и в случае донора **16**, объяснялось стабилизацией гликозил-катиона карбометоксильной группой (Рисунок 9). Величина энергии стабилизации в данном случае составила 6,2 ккал/моль.

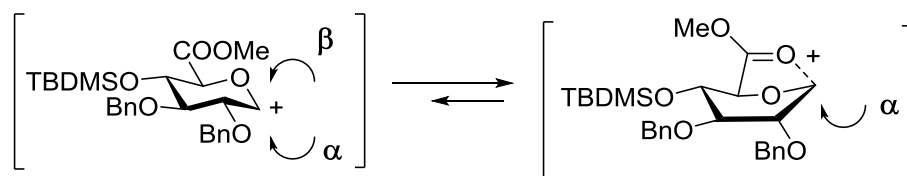


Рисунок 9.

В полученном трисахариде **64** действием плавиковой кислоты была селективно удалена TBDMSO защитная группа с образованием трисахаридного акцептора **65** с выходом 77% (схема 19). Полученный трисахарид **65** был введен в реакцию гликозилирования с фукофуранозным донором **19**. В результате этой реакции образовалась смесь α - и β -изомеров, причем стереоселективность в данном случае оказалась выше, чем при гликозилировании модельного акцептора **33**, и достигла соотношения 10:1 в пользу α -изомера. С помощью колоночной хроматографии α -продукт **66** был выделен в чистом виде с выходом 89% (КССВ $J_{1-2} = 4,2$ Гц). Затем в полученном тетрасахариде **66** была удалена хлорацетильная защитная группа, что приводило к акцептору **67** с выходом 80% (Схема 19).

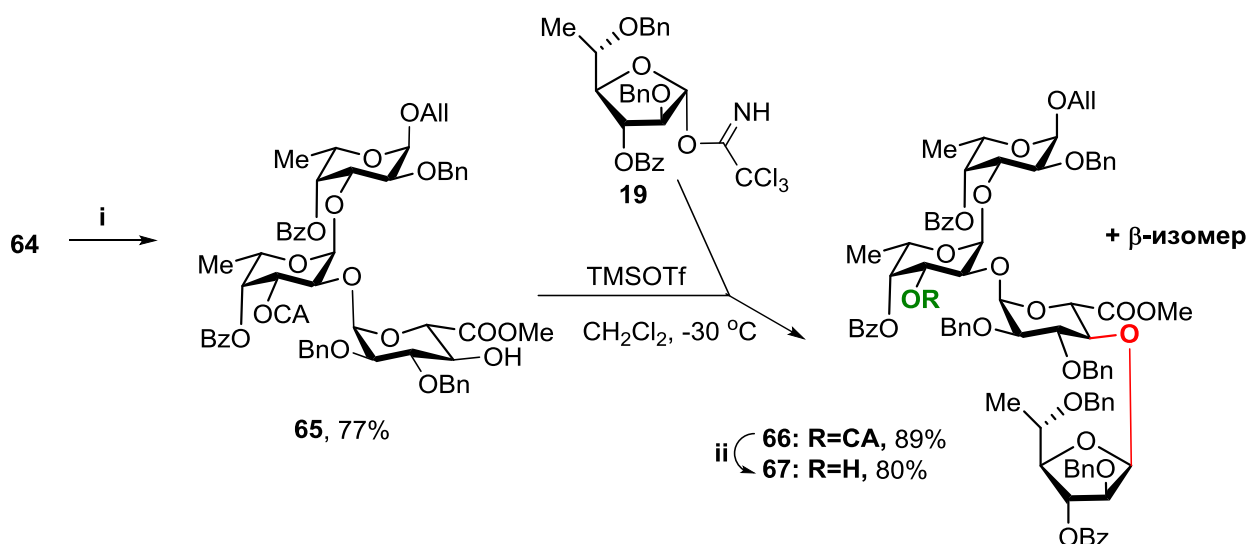


Схема 19. (i): HF (40% водн.), CH₃CN; (ii): SC(NH₂)₂, 2,4,6-коллидин, MeOH.

На последнем этапе сборки пентасахаридного скелета акцептор **67** был введен в реакцию гликозилирования с донором **17** (Схема 20). В результате данной реакции нами был получен исключительно α -связанный пентасахарид **68** с выходом 86% (КССВ J_{1-2} = 3,9 Гц). Как и в случае описанных выше реакций гликозилирования, стереохимический результат данной реакции обусловлен анхимерным содействием ацильных групп при *O*-3 и *O*-4 в гликозил-доноре **17**.

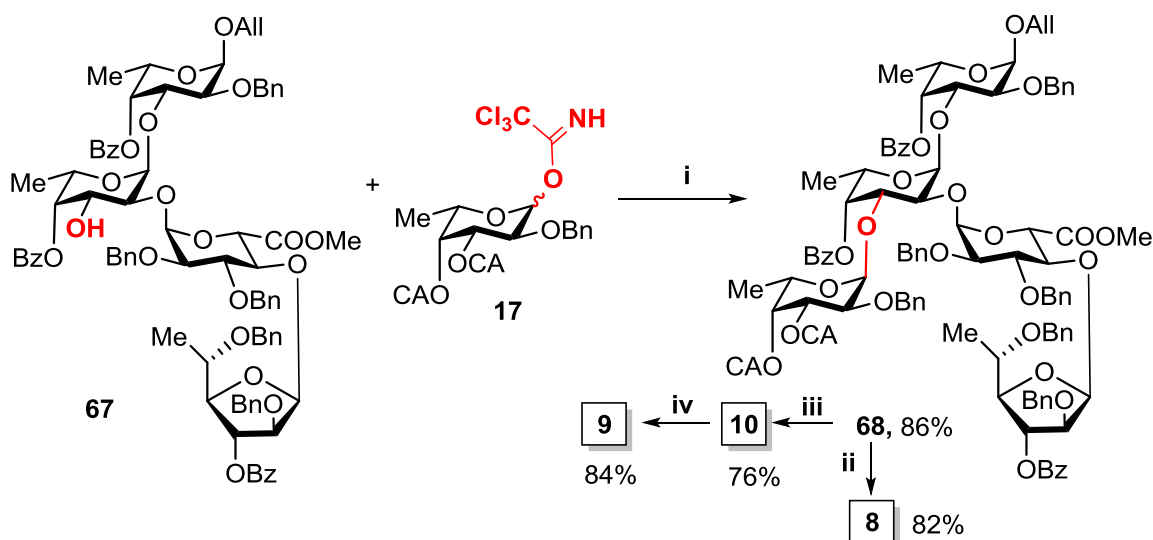


Схема 20. (i): TMSOTf, DCM, -30 °C; (ii): 1. H₂, Pd/C, 2. 0.2 M NaOH, MeOH; (iii): 1. 0.2 M LiOH, Bu₄NOH, THF, 2. Py·SO₃, DMF, 3. H₂, Pd/C; (iv): Py·SO₃, DMF.

Из соединения **68** были получены целевые пентасахариды **8-10** (схема 20). Удаление всех ацильных групп в **68**, сульфатирование свободных гидроксильных групп в полученном продукте и последующий гидрогенолиз приводили к избирательно

сульфатированному пентасахариду **10** с выходом 76%. Удалением всех защитных групп в **68** был получен несulfатированный пентасахарид **8** с выходом 82%. Введение данного пентасахарида в реакцию кислотно-прототируемого сульфатирования, как и в случае тетрасахарида **5**, привело к смеси целевого продукта и продукта изомеризации восстанавливающего остатка фукопиранозной цепи. Поэтому по аналогии с тетрасахаридом **5** было проведено досульфатирование селективно сульфатированного пентасахарида **10** действием $\text{Pu} \cdot \text{SO}_3$ в ДМФА в отсутствие кислоты, что привело к образованию целевого пентасахарида **9** с выходом 84%.

8. Исследование антикоагулянтной активности. Антикоагулянтная активность синтезированных соединений была исследована в тесте по увеличению активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Наряду с олигосахаридами были изучены природные фукоиданы из водорослей *Cladosiphon okamuranus* (CO) и *C. flagelliformis* (CF) (Рисунок 10), их искусственно досульфатированные производные (CO-S и CF-S), а также применяемые в настоящее время в клинической практике антикоагулянтные препараты Клексан® (низкомолекулярный гепарин) и Арикстра® (синтетический аналог пентасахаридной последовательности гепарина). Результаты тестов представлены на Рисунке 11.

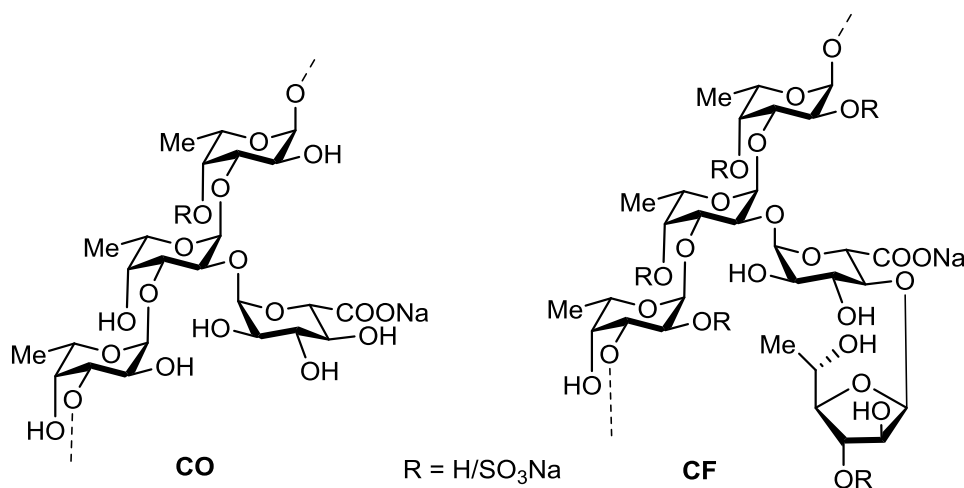


Рисунок 10. Разветвленные участки полисахаридных цепей фукоиданов из водорослей *C. okamuranus* (CO) и *C. flagelliformis* (CF).

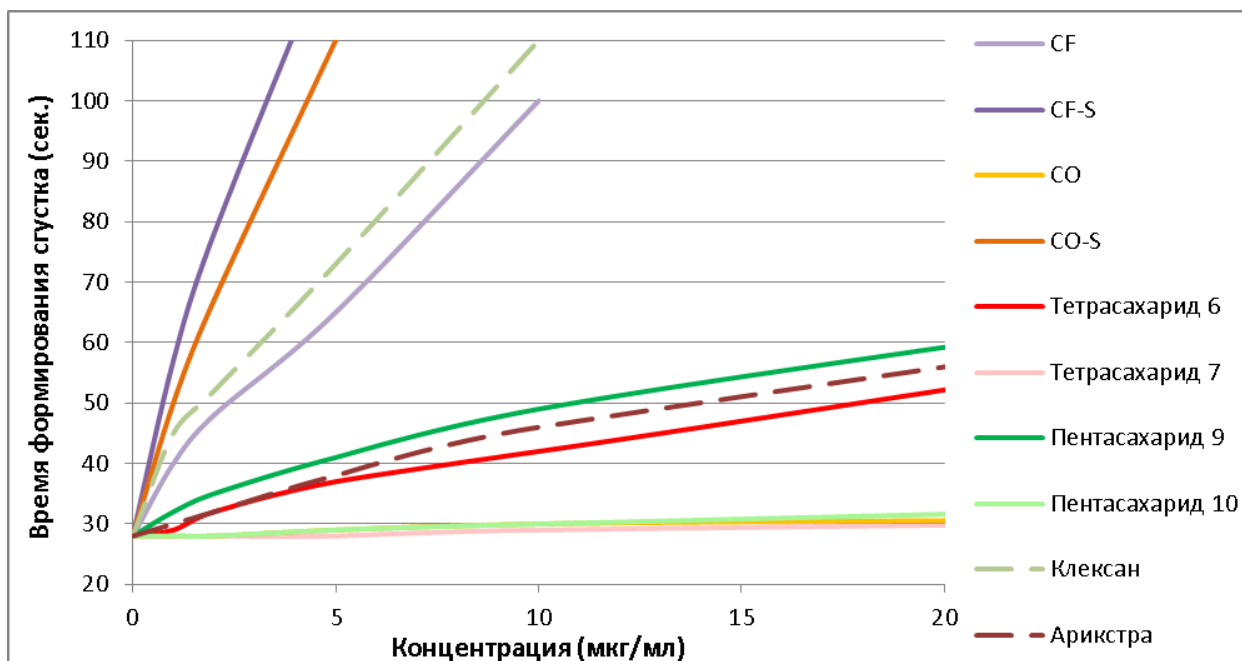


Рисунок 11. Влияние поли- и олигосахаридов на скорость формирования фибринового сгустка в тесте АЧТВ.

Фукоидан из *S. okamuranus*, несulfатированные и избирательно sulfатированные олигосахариды не проявляли активности, тогда как их полностью sulfатированные аналоги оказывали значимое противосвертывающее действие, сравнимое с эффектом препарата Арикстра®. При этом сполна sulfатированный пентасахарид **9** практически в два раза превышал показатели для тетрасахарида **6** и оказался даже более активен, чем пентасахарид Арикстра®. Фукоидан из *S. flagelliformis* проявил уровень активности, сравнимый с низкомолекулярным гепарином (Клексан®), а наиболее активными в данной серии оказались искусственно досульфатированные фукоиданы CF-S и CO-S.

На основании полученных данных можно утверждать, что уровень активности, проявляемой фукоиданами и родственными олигосахаридами, растет с увеличением степени sulfатирования сахаридов. Кроме того, на примере олигосахаридов было показано, что присутствие остатка α -L-фукофуранозы в боковой цепи значительно увеличивает уровень антикоагулянтной активности.

Выводы

1. Впервые осуществлен синтез четырех незащищенных (**1, 3, 5, 8**), четырех сполна сульфатированных (**2, 4, 6, 8**), а также двух избирательно сульфатированных (**7, 10**) олигосахаридов, соответствующих разветвленным фрагментам фукоидана из водоросли *C. flagelliformis*.

2. Разработан эффективный препаративный метод синтеза фукофуранозного донора с применением недавно открытой пиранозид-фуранозидной перегруппировки.

3. Впервые изучено влияние заместителей в структуре фукофуранозных доноров на стереохимию реакции гликозилирования и показано стереоконтролирующее влияние ацильного заместителя при *O*-3.

4. Исследование антикоагулянтной активности полученных соединений, а также серии природных и высокосульфатированных полисахаридов показало, что увеличению эффекта способствует высокая степень сульфатирования сахаридов и наличие боковых сульфатированных α -L-фукофуранозных заместителей.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. V. B. Krylov, Z. M. Kaskova, D. Z. Vinnitskiy, N. E. Ustyuzhanina, A. A. Grachev, A. O. Chizhov, N. E. Nifantiev. Acid-promoted synthesis of per-O-sulfated fucooligosaccharides related to fucoidan fragments // *Carbohydr. Res.*, **2011**, 346, 540-550.
2. V. B. Krylov, D. A. Argunov, D. Z. Vinnitskiy, S. A. Verkhnyatskaya, A. G. Gerbst, N. E. Ustyuzhanina, A. S. Dmitrenok, J. Huebner, O. Holst, H.-C. Siebert, N. E. Nifantiev. Pyranoside-into-Furanoside Rearrangement: New Reaction in Carbohydrate Chemistry and Its Application in Oligosaccharide Synthesis // *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 16516–16522.
3. Д. З. Винницкий, Н. Е. Устюжанина, Н. Э. Нифантьев. Природные соединения бактериального и растительного происхождения, содержащие остатки α -D-глюкуроновой кислоты // *Изв. АН. Сер. Хим.*, **2015**, 6, 1273-1301.
4. В. Б. Крылов, Н. Е. Устюжанина, Д. З. Винницкий, З. М. Каськова, Н. А. Ушакова, М. Е. Преображенская, Н. Э. Нифантьев. Анионные полисахариды из природных источников как основа для разработки фармацевтических препаратов новых типов // 1-ая Всероссийская конференция "Фундаментальная гликобиология" Казань, 20-24 июня, **2012**. Тезисы докладов, стр. 45.
5. D. Z. Vinnitskiy, V. B. Krylov, N. E. Ustyuzhanina, N. E. Nifantiev. Synthesis of disaccharides related to fucoidan from *Chordaria flagelliformis* // 17th European Carbohydrate Symposium, Тель-Авив, Израиль, 7-11 июля, **2013**. Тезисы докладов, стр. 63.
6. N. E. Nifantiev, N. E. Ustyuzhanina, N. A. Ushakova, M. E. Preobrazhenskaya, M. I. Bilan, V. B. Krylov, D. Z. Vinnitskiy, D. O. Croci, A. Cumashi, N. U. Anisimova, A. S. Shashkov, A. I. Usov, S. Iacobelli, G. A. Rabinovich, M. V. Kiselevskiy. Seaweeds fucoidans – a platform for new drug discovery // 27th International Carbohydrate Symposium, Бангалор, Индия, 12-17 января, **2014**. Тезисы докладов, стр. 48.
7. D. Z. Vinnitskiy, N. E. Ustyuzhanina, V. B. Krylov, N. E. Nifantiev. Stereoselective synthesis of the pentasaccharides related to the fucoidan from brown seaweed *Chordaria flagelliformis* // *Molecular Complexity in Modern Chemistry*, Москва, 13-19 сентября, **2014**. Тезисы докладов, стр. 287.