



Учреждение Российской академии наук  
Институт органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН

На правах рукописи

ГЕНИНГ МАРИНА ЛЕОНИДОВНА

СТЕРЕОНАПРАВЛЕННЫЙ СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ  
ВНЕКЛЕТОЧНОГО ПОЛИСАХАРИДНОГО АДГЕЗИНА

*Staphylococcus aureus*



02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва  
2008

05 ДЕК 2008

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

**Научный руководитель:**

кандидат химических наук **Юрий Евгеньевич Цветков**

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук, профессор **Анатолий Иванович Усов**  
доктор химических наук, профессор **Мария Николаевна Преображенская**

**Ведущая организация:**

Химический факультет Московского государственного университета  
имени М. В. Ломоносова

Защита состоится «19» декабря 2008 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.222.01 по химическим наукам при Институт органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН по адресу 119991, Москва Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН

Автореферат разослан «17» ноября 2008 года

Ученый секретарь диссертационного  
совета Д 002.222.01  
доктор химических наук

 Л. А. Родиновская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Бактерии *Staphylococcus aureus* – один из наиболее часто выявляемых «госпитальных» патогенов, вызывающий большое число заболеваний с высоким уровнем смертности. Именно этот возбудитель является причиной заболеваний у пациентов с медицинскими имплантатами, при которых колонии *S. aureus* покрывают поверхности имплантатов биопленками, защищающими бактерии от взаимодействия с компонентами иммунной системы. Основным структурным элементом этих биопленок и одним из факторов вирулентности *S. aureus* является поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-N-ацетилглюкозамин (ПНАГ). При щелочном гидролизе ПНАГ был получен его дезацетилированный аналог (Д-ПНАГ), содержащий лишь около 15% N-ацетильных групп. В опытах на животных было показано, что иммунизация с использованием Д-ПНАГ, приводит к образованию гораздо большего количества защитных антител по сравнению с нативным ПНАГ. В этих экспериментах антитела к Д-ПНАГ эффективно инициировали уничтожение различных штаммов *S. aureus*. Появление защитных антител, способных связываться с Д-ПНАГ, было также обнаружено у пациентов, выздоравливающих после заболеваний, связанных с инфекцией *S. aureus*. Таким образом, антистафилококковая активность антител против поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-глюкозаминов напрямую связана со степенью N-ацетилирования последних. Однако при получении Д-ПНАГ из нативного ПНАГ с помощью щелочного гидролиза образуется гетерогенная смесь полисахаридов, и истинная структура активных эпитопов, то есть фрагментов полисахаридной цепи, ответственных за образование защитных антител, остается неизвестной.

Для установления структуры эпитопов ПНАГ-антигенов, способных инициировать развитие защитного иммунитета, необходимы синтетические олиго- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-глюкозамины различной длины, содержащие N-ацетильные группы в заданных остатках глюкозамина.

**Целью работы** является разработка эффективного метода синтеза олиго- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-глюкозаминов, различающихся длиной цепи (от пента- до ундекасахаридов), степенью N-ацетилирования и расстановкой остатков N-ацетилглюкозамина, а также проведение иммунохимических исследований, для выявления олигосахаридов, способных наилучшим образом связываться с антителами, направленными на Д-ПНАГ.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Впервые осуществлен направленный синтез большой группы спейсерированных олиго- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-глюкозаминов, отличающихся длиной, степенью N-ацетилирования и расположением N-ацетильных групп. Использование оптимально защищенных моно-, ди-, три- и тетрасахаридных блоков позволило осуществить эффективный конвергентный синтез целевых углеводных цепей. Также в ходе работы была изучена возможность применения реакции терминированной олигомеризации для получения гомолигосахаридов исследованного типа.

Полученные олигосахариды являются ценными модельными соединениями для изучения специфичности антител, направленных на природные ПНАГ-антигены. Исследование взаимодействия этих антител и синтетических олигоглюкозаминов с помощью метода иммуноферментного анализа позволило сделать важные выводы о структуре активных эпитопов.

**Публикация и апробация работы.** По результатам диссертации опубликованы 2 статьи. Отдельные части работы были представлены на симпозиуме по бактериальным полисахаридам (Вроцлав, 2004), VII молодежной научной школе-конференции по органической химии (Казань, 2005), международном симпозиуме по гликоконъюгатам (Флоренция, 2005), конференции по гликобиологии (Бостон, 2005), молодежной конференции ИОХ РАН (Москва, 2006), XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007), XXIV Международном симпозиуме по углеводам (Осло, 2008).

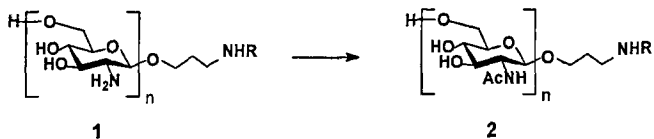
**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на \_\_\_\_\_ страницах и состоит из введения, литературного обзора, посвященного поиску оптимальных олигосахаридных антигенов при конструировании конъюгированных углеводных вакцин третьего поколения, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитированной литературы.

*Автор выражает глубокую благодарность заведующему лабораторией химии гликоконъюгатов ИОХ РАН доктору химических наук, профессору Николаю Эдуардовичу Нифантьеву за внимание и помощь, оказанные при выполнении работы.*

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

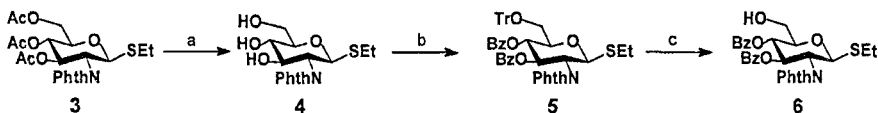
### 1. Синтез гомоолигосахаридов. Исследование реакции терминированной олигомеризации.

Известно, что выделенный из природных источников ПНАГ содержит до 10% остатков глюкозамина со свободными аминогруппами, а при его химическом дез-N-ацетилировании не удается достичь полного удаления N-ацетатов (их остаточное содержание в Д-ПНАГ составляет около 15%). По этой причине при изучении взаимодействия этих гетерогенных полисахаридов с антителами нельзя сделать однозначного заключения о том, какие именно остатки участвуют в связывании. Так, например, было показано, что антитела, которые способны связываться как с ПНАГ, так и с Д-ПНАГ обладают гораздо большей антистафилококковой активностью, чем антитела, которые способны узнавать только ПНАГ. Возможно, активные антитела связываются со свободными аминогруппами, количество которых гораздо больше в Д-ПНАГ. Однако подтвердить или опровергнуть эту гипотезу можно лишь с использованием синтетических соединений, содержащих в составе одной молекулы остатки глюкозамина, несущие либо все свободные (общая формула 1), либо все N-ацетилированные аминогруппы (общая формула 2). Поэтому на первом этапе работы необходимо было синтезировать эти две серии гомоолигосахаридов. В этом случае олигоглюкозамины различной длины необходимы для определения размера олигосахарида, корректно моделирующего фрагменты природных полисахаридов при взаимодействии с ПНАГ-специфичными антителами. Дальнейшие объекты для синтеза были определены на основе результатов иммунологических испытаний с участием первой серии соединений.



В структурах гомоолигосахаридов 1 и 2 был предусмотрен спейсерный агликон, так как в дальнейшем мы предполагали получать на основе этих соединений конъюгаты, необходимые для иммунологических исследований. Для синтеза такого рода олигосахаридов возможны два различных подхода. Первый из них – это блочный синтез, в ходе которого происходит постепенное наращивание углеводной цепи. Второй – реакция олигомеризации, для которой

используют бифункциональные мономеры, содержащие одновременно как гликозил-донорную, так и гликозил-акцепторную функции, и в процессе которой возможно образование набора олигосахаридов различной длины. В нашем случае для получения спейсерированных олигосахаридов необходимо проводить реакцию олигомеризации в присутствии спейсерированного блока, который фиксируется на восстанавливающем конце растущей олигосахаридной цепи и тем самым обрывает её рост (так называемая «терминированная олигомеризация»). Селективно удаляемая N-защитная группа в агликоне позволяет освобождать аминогруппу, с помощью которой методом ионообменной хроматографии можно отделять терминированные (спейсерированные) олигомеры от нетерминированных перед их дальнейшим разделением на индивидуальные олигосахариды. Подход с применением терминированной олигомеризации представлялся нам наиболее технологичным, и в первую очередь мы планировали исследовать возможности применения этого метода.



**Схема 1.** а: AcCl, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; б: 1) TrCl, пиридин, 2) BzCl, пиридин; в: 90% водн. CF<sub>3</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

В качестве первого мономера для олигомеризации был синтезирован моносахаридный блок **6** (Схема 1), содержащий свободную гидроксильную группу при С-6 и тиоэтильную группу. Выбор N- и O-защитных групп был основан на эффективности их постановки и удаления, устойчивости в условиях реакций гликозилирования и способности обеспечивать необходимую стереоселективность образования β-(1→6)-гликозидных связей. Так, для защиты аминогруппы была выбрана фталоильная группа, а в качестве постоянных защитных групп для ОН-групп при С-3 и С-4 были выбраны бензоильные группы, так как они менее склонны к миграции, чем ацетильные.

Для использования в качестве терминирующего соединения первоначально было выбрано производное 3-аминопропанола **7**, N-защитная группа которого может быть селективно удалена в присутствии фталимидной защиты. Модельная реакция гликозилирования показала, что выбранный нами

блок является хорошим гликозилирующим агентом и позволяет получить спейсерированный моносахарид **8** с высоким выходом (Схема 2).

Однако основным продуктом реакции терминированной олигомеризации тиогликозида **6** в присутствии терминатора **7** (Схема 2, соотношение мономер: «терминатор» во всех опытах составляло 5:1) оказалось 1,6-ангидро производное **9**, (выход 50%), наряду с которым с выходом 20% был выделен циклический дисахарид **10**. Этот результат был довольно неожиданным, так как концентрация мономера в реакционной смеси была достаточно высока, то есть, сравнима с приводимыми в литературе условиями аналогичных успешных олигомеризаций.

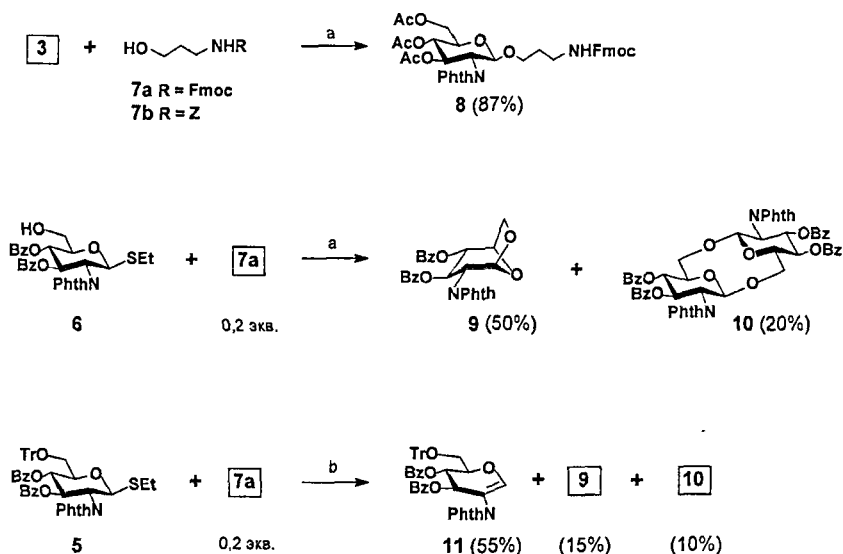
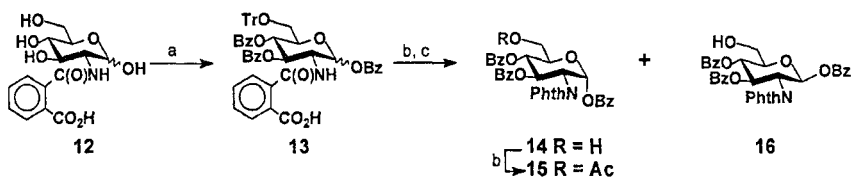


Схема 2. а: NIS, TfOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MS 4Å; б: MeOTf,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MS 4Å.

Мы предположили, что образование 1,6-ангидропроизводного **9** может быть следствием пространственного сближения С-1 и ОН-группы при С-6 в мономере **6**. Поэтому следующим шагом была олигомеризация производного **5**, содержащего тритильную группу (Схема 2), которая, как известно, не препятствует гликозилированию, но может создать стерический барьер для внутримолекулярной циклизации. В этом случае реакция привела к преимущественному образованию гликала **11** наряду с циклическими продуктами **9** и **10**.

Для изучения возможности олигомеризации более длинных мономеров, был осуществлен синтез ди- и трисахаридных производных. В их синтезе использовали моносахаридные блоки 14-16, полученные по альтернативной схеме (Схема 3), которая представлялась менее трудоемкой, чем схема синтеза тиогликозида 6. Производное глюкозамина 12 было последовательно подвергнуто тритилированию и бензоилированию с образованием аномерной смеси 13. Замыкание фталимидного цикла при нагревании в уксусном ангидриде и пиридине с последующим удалением тритильной группы привело к аномерной смеси бензоатов 14 и 16. Чистые  $\alpha$ -изомер 14 и  $\beta$ -изомер 16 были выделены с помощью колоночной хроматографии. Ацетилированием гидроксипроизводного 14 был получен б-ацетат 15, который далее превращали в бромид 17, дальнейшее гликозилирование которым акцептора 6 привело к дисахариду 18 (Схема 4). Селективное удаление ацетильной группы в 18 кислотным метанолизом привело к 6'-ОН-производному 19, из которого далее получали бромид 20.



**Схема 3.** а: 1) TrCl, пиридин, 2) BzCl, пиридин; б: Ac<sub>2</sub>O, пиридин; с: 90% водн. CF<sub>3</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

С участием полученных мономеров 19 и 20 и терминатора 7а была проведена серия реакций терминированной олигомеризации, в которых мы варьировали концентрацию мономеров, температуру, растворитель, уходящую группу и промотирующую систему. Все реакции с участием тиогликозида 19, а также реакции бромида 20 в присутствии трифлата серебра, приводили к практически количественному образованию цикла 10. Лишь в случае олигомеризации бромида 20 в условиях реакции Гельфериха образование цикла 10 не являлось основным направлением реакции, и был проведен анализ образующихся продуктов. Для этого циклический продукт 10 был отделен с помощью колоночной хроматографии (его выход составил 30%). В оставшейся смеси, содержащей терминированные продукты 27а, селективно удаляли Fmoc-защитную группу в присутствии каталитического количества DBU. Мы столкнулись со сложностью контролирования протекания данной реакции в



случае олигомерной смеси и поэтому в следующих экспериментах перешли к Z-замещенным производным, что не привело к изменению реакционной способности (Таблица 1). Терминированные олигосахариды, содержащие в агликоне незащищенную аминогруппу **28**, отделяли от нетерминированных с помощью ионообменной хроматографии. Далее смесь подвергали исчерпывающему гидразиолизу с образованием полностью деблокированных спейсерированных олигосахаридов **29**, которые разделяли при помощи гелехроматографии.

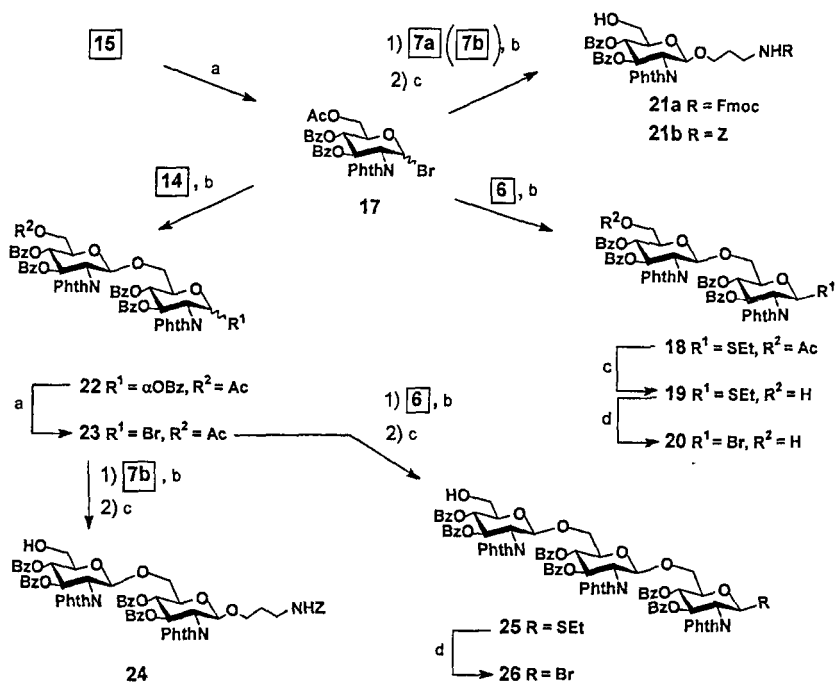


Схема 4. а: HBr, AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; б: HgBr<sub>2</sub>, Hg(CN)<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN; с: AcCl, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; д: Br<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

В опыте с бромидом **20** и Fmoc-замещенным аминпропанолом **7a**, анализ которого был проведен согласно приведенной выше схеме, выход терминированных олигомеров составил 10% (Таблица 1, опыт №1). В результате гелехроматографии был получен лишь спейсерированный дисахарид **29** (n=1). Столь низкое вовлечение в реакцию терминатора, возможно, является следствием различной реакционной способности

гидроксильных групп в терминаторе и мономере. Чтобы приблизить реакционную способность акцепторной ОН-группы терминирующей молекулы к ОН-группе мономера, мы перешли к использованию терминаторов на основе моносахаридов **21a** и **21b** (Схема 4). Модельная реакция между дисахаридным бромидом **23** и терминатором **21a** привела к образованию целевого трисахарида с выходом 85% (не представлена на схеме). Однако в ходе олигомеризации соединения **20** (Таблица 1, опыт №2) выход терминированных продуктов составил 12%. При этом 50% введенного в реакцию терминатора **21a** были выделены из реакционной смеси в неизменном виде.

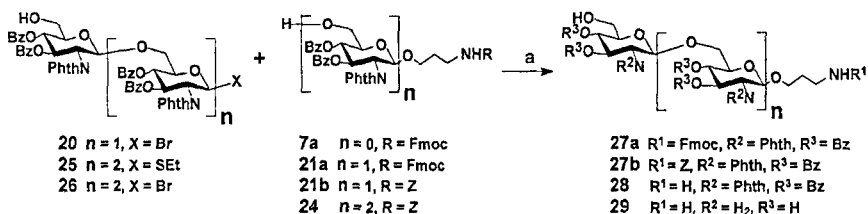


Схема 5. а: для X = Br: HgBr<sub>2</sub>, Hg(CN)<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN; для X = SEt: NIS, TfOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> MS 4Å

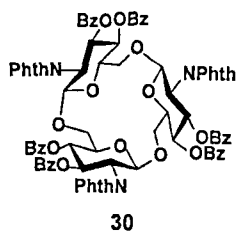
Таблица 1. Результаты реакций терминированной олигомеризации.

№	Мономер	Терминатор	Продукты реакции
1	<b>20*</b>	<b>7a</b>	<b>10</b> (30%), <b>29</b> $n=1$ (10%)
2	<b>20*</b>	<b>21a</b>	<b>10</b> (30%), <b>29</b> $n=2$ (12%)
3	<b>20**</b>	<b>21a</b>	<b>10</b> (25%), <b>29</b> $n=2$ (15%), <b>29</b> $n=4$
4	<b>20**</b>	<b>21b</b>	<b>10</b> (25%), <b>29</b> $n=2$ (12%), <b>29</b> $n=4$
5	<b>20**</b>	<b>24</b>	<b>10</b> (25%), <b>29</b> (14%)
6	<b>25**</b>	<b>24</b>	<b>30</b> (95%)
7	<b>26**</b>	<b>24</b>	<b>30</b> (50%)

\*Единовременное добавление мономера. \*\*Мономер был добавлен пятью равными порциями.

С целью увеличения конверсии терминатора в следующем опыте (Таблица 1, опыт №3) мономер прибавляли к терминатору порциями по одному эквиваленту через равные промежутки времени, достаточные для полного

расходования мономерного бромида **20**. В этом случае конверсия терминатора увеличилась до 75%, а выход терминированных олигомеров составил 15% (Таблица 1, опыт №3). В последующих экспериментах мы придерживались именно такого порядка добавления. Дальнейшее удлинение терминирующего остатка до дисахарида **24** не привело к изменению выхода



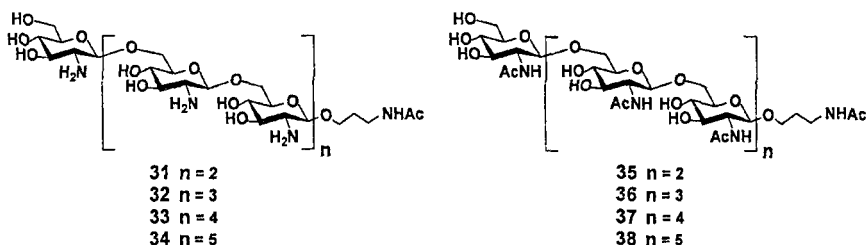
терминированных олигосахаридов (Таблица 1, опыт №5). В большинстве опытов с низкими выходами были получены продукты однократного гликозилирования терминатора мономером, и лишь в некоторых случаях среди выделенных терминированных олигомеров методом масс-спектрометрии были обнаружены незначительные количества продукта двукратного гликозилирования (**29**  $n=4$ ).

Были также проведены опыты с трисахаридными мономерами **25** и **26** и терминатором **24** (Таблица 1, опыты №6 и №7). Выход циклического трисахарида **30** при олигомеризации тиоэтилгликозида **25** составил 95%, а в случае бромида **26** это соединение было получено с выходом 50%. Возможно, большая склонность трисахарида **26** к циклизации по сравнению с дисахаридом **20** может быть объяснена тем фактом, что напряжение в циклическом трисахариде гораздо меньше.

Таким образом, в рассмотренных условиях реакция терминированной олигомеризации не позволяет получить олигогликозамины достаточно большого молекулярного веса.

## 2. Синтез гомоолигосахаридов. Блочный синтез.

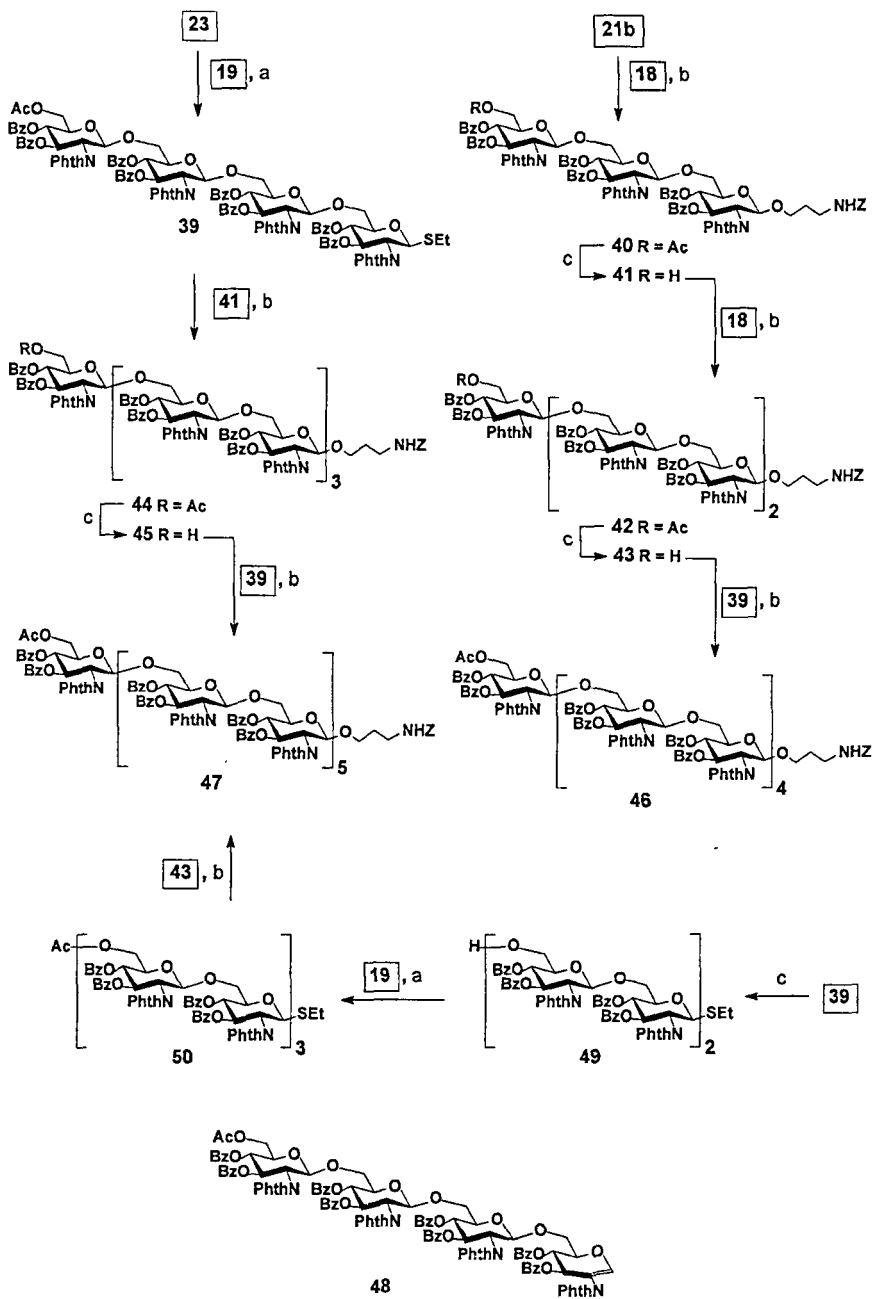
Следующим возможным подходом для синтеза необходимых гомоолигосахаридов является блочный синтез. В ходе работы над терминированной олигомеризацией были синтезированы основные необходимые блоки и разработаны эффективные методы построения  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидной связи, в том числе ортогональное гликозилирование для получения тиогликозидных доноров различной длины.



В качестве целевых соединений были определены две серии олигосахаридов, содержащих все свободные (31-34) или все ацетилированные (35-38) аминогруппы; каждая из серий включала пента-, гепта-, нона- и ундекасахариды. Такие размеры по предварительным оценкам должны были обеспечить эффективное взаимодействие с антителами.

Для синтеза олигосахаридов 31-38 мы применили конвергентную схему сборки, основанную на использовании минимального количества относительно крупных синтетических блоков. Такой подход позволял существенно сократить количество стадий, необходимых для получения целевых олигосахаридов. Кроме того, поскольку исходные и продукты реакций гликозилирования существенно отличались по молекулярному весу, для их разделения можно использовать гель-проникающую хроматографию. Это существенно облегчает выделение целевых соединений, так как обычная колоночная хроматография на  $\text{SiO}_2$  в случае достаточно крупных олигосахаридов становится малоэффективной из-за близости подвижностей исходных и продуктов. Тетрасахарид 39 был выбран в качестве основного гликозилирующего агента. Он был получен с выходом 76% при гликозилировании тиогликозида 19 дисахаридным бромидом 23 в условиях реакции Гельфериха (Схема 6).

Для синтеза спейсированных акцепторных блоков в качестве исходного соединения мы использовали полученный ранее моносахарид 21b. Реакция 21b с дисахаридом 18 привела к образованию трисахарида 40 с выходом 94%. Селективное удаление ацетильной группы позволило получить акцептор 41 с практически количественным выходом. В ходе следующей реакции между тиогликозидом 18 и трисахаридным акцептором 41 с выходом 90% было получено одно из целевых соединений, пентасахарид 42, которое было дезацетилировано аналогичным образом с образованием блока 43. Стоит отметить, что сигналы для каждого типа протонов (атомов углерода) в спектрах ЯМР пентасахариды 43 и высших олигомеров имеют вид сложных мультиплетов, являющихся результатом наложения сигналов очень близких, но



**Cxema 6.** a: HgBr<sub>2</sub>, Hg(CN)<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN; b: NIS, TfOH, MS 4Å, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; c: AcCl, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

не абсолютно эквивалентных протонов (атомов углерода), принадлежащих индивидуальным остаткам глюкозамина. Поэтому длину олигосахаридной цепи определяли по соотношению интенсивностей между протонами спейсерной группы и отдельно стоящей объединенной группой протонов при C-3.

По реакции тетрасахарида **39** с акцептором **41** был получен целевой спейсерированный гептасахарид **44** с выходом 74%. Селективное дезацетилирование с образованием продукта **45** прошло избирательно, однако время реакции увеличилось (два дня по сравнению с 16 часами для соединения **40**). Аналогичным образом при гликозилировании пентасахаридов **43** тетрасахаридом **39** с выходом 60% был получен нонасахарид **46**.

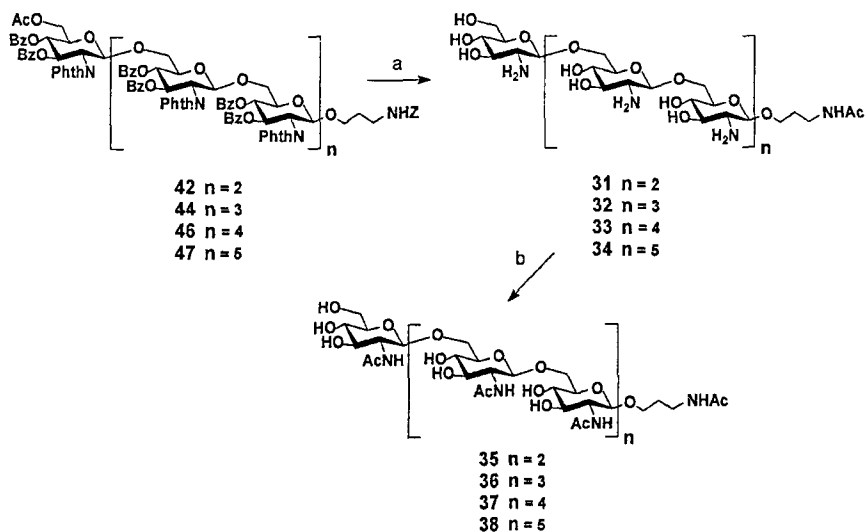
Гликозилирование гептасахаридного акцептора **45** донором **39** проводили в тех же условиях, что и все предыдущие реакции с этим гликозил-донором, однако ундекасахарид **47** был получен лишь с выходом 50%. При этом из реакционной смеси выделили 40% введенного в реакцию акцептора **45**, а основным побочным продуктом был тетрасахаридный гликаль **48**. Для предотвращения образования гликаля был проведен эксперимент с использованием неосновных молекулярных сит AW-300, однако выход гликаля **48** по-прежнему был очень высок (70%), а выход целевого продукта **47** в этих условиях снизился до 35%. Разложение активированного донора (в данном случае с образованием гликаля) можно объяснить низкой реакционной способностью гептасахаридного акцептора **45**, обусловленной пространственно затрудненным подходом к ОН-группе. Как уже было отмечено в случае тритилированного производного **5**, стерические затруднения в акцепторе приводят к тому, что активированный донор превращается в соответствующий гликаль **11**.

Нами также исследовано получение ундекасахарида по схеме [6+5] при взаимодействии соединений **50** и **43**, однако выход продукта **47** в этой реакции составил лишь 30%. По-видимому, в этом случае определяющим фактором является пространственно затрудненный гексасахаридный донор **50**, так как достаточно хорошая реакционная способность пентасахарид-акцептора **43** была продемонстрирована на примере получения нонасахарида.

Совокупность данных молекулярно-динамических расчетов (выполнены к.х.н. А. Г. Гербстом) и специальных ЯМР-экспериментов (проведены к.х.н. А. А. Грачевым) свидетельствует о том, что с увеличением длины олигосахаридной цепи олиго- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-глюкозаминов все более энергетически выгодной становится конформация в форме правой спирали, полный виток

которой составляют четыре остатка глюкозамина. Поэтому соединения с длиной цепи более четырех моносахаридных звеньев могут принимать конформацию, в которой концы молекулы сближены и, следовательно, способны экранировать друг друга, что, возможно, является объяснением низких выходов при получении ундекасахарида 47.

На следующем этапе в полученных спейсированных олигосахаридах 42, 44, 46 и 47 гидрированием в присутствии  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  селективно удаляли бензилоксикарбонильную группу с образованием соединений с единственной свободной аминогруппой в спейсере (общая формула 28). После этой стадии олигосахарид при необходимости можно модифицировать с помощью линкерных реагентов или меток. Однако для первой серии предполагаемых иммунологических экспериментов конъюгаты не требовались, поэтому аминогруппу спейсера ацетилировали во избежание нежелательных взаимодействий. Далее все соединения были полностью деблокированы кипячением со спиртовым раствором гидразин-гидрата, что привело к серии олигосахаридов 31-34 с высокими выходами (~85%). ЯМР спектры полученных свободных олигосахаридов также достаточно сложны, и лишь некоторые сигналы могут быть отнесены однозначно. Длина олигосахаридной цепи подтверждается соотношением интегральных интенсивностей протонов спейсера и, например, протонов при C-2, а также данными масс-спектропии высокого разрешения с ионизацией методом электроспрея.



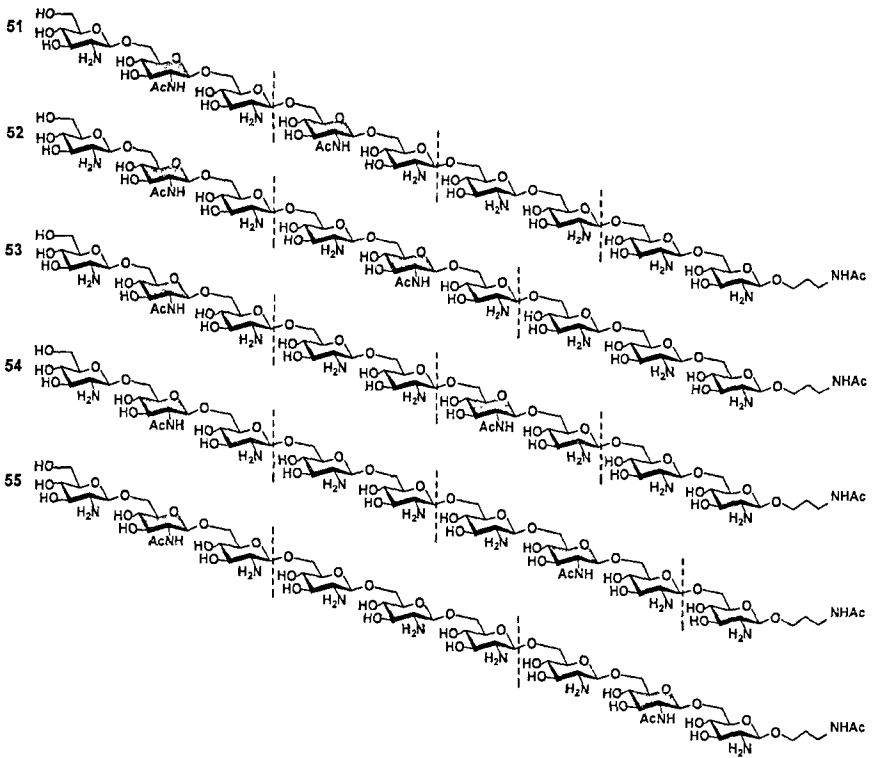
**Схема 7.** а) 1)  $H_2$ ,  $Pd(OH)_2/C$ ,  $MeOH-THF-H_2O$ ; 2)  $Ac_2O/Py$ ; 3)  $N_2H_4 \cdot H_2O$ ,  $EtOH$ ; б)  $Ac_2O$ ,  $MeOH/H_2O$

Пентасахарид **31** исчерпывающе N-ацетилировали избытком уксусного ангидрида в водном метаноле. Продукт **35** был выделен с практически количественным выходом. В случае гептасахаридов **32** проведение реакции в аналогичных условиях не привело к полному ацетилированию, и для завершения реакции понадобилась дополнительная обработка  $NaHCO_3$  для полного удаления остатков уксусной кислоты с последующей повторной обработкой уксусным ангидридом. Олигосахариды **37** и **38** были получены тем же способом. Следует отметить, что N-ацетилированные олигосахариды полностью растворимы в воде при концентрации 0.5 мг/мл, за исключением ундекасахарида **38**, который растворяется заметно хуже и образует опалесцирующий раствор, из которого в дальнейшем происходит выпадение осадка.

### 3. Синтез нонасахаридов с различным расположением N-ацетильных групп.

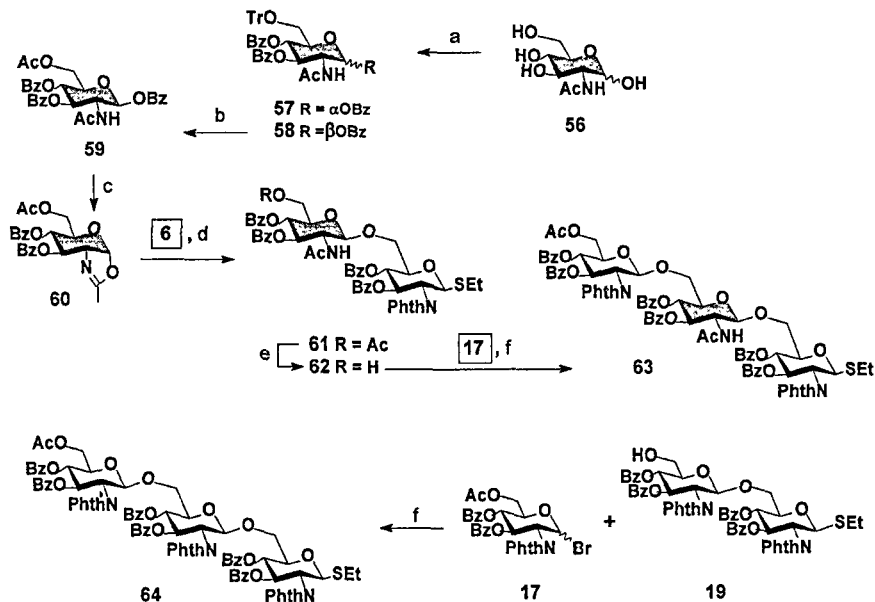
Предварительные иммунологические исследования (Раздел 4) показали, что полученные олигосахариды **31-38** способны взаимодействовать с ПНАГ- и Д-ПНАГ-специфичными антителами, при этом в большинстве случаев эффективность связывания возрастает с увеличением длины олигосахаридной цепи, однако различие между нонасахаридами (**33** и **37**) и ундекасахаридами (**34** и **38**) относительно невелико. Принимая во внимание тот факт, что синтез нонасахарида **46** проходит с более высоким выходом, чем ундекасахарида **47**, и его получение требует меньшего числа стадий, было принято решение синтезировать ряд селективно N-ацетилированных нонасахаридов. Серия целевых структур **51-55** содержит пять нонасахаридов, в каждом из которых присутствуют два остатка N-ацетилглюкозамина, разделенные между собой разным количеством глюкозаминовых звеньев со свободной аминогруппой. Такое соотношение звеньев примерно соответствует содержанию N-ацетильных групп в Д-ПНАГ (около 15%  $GlcNAc$ ). С помощью этих соединений мы планировали изучить влияние пространственного расположения N-ацетильных групп на эффективность связывания с антителами, что должно было приблизить нас к определению структуры активных эпитопов.





Ключевым этапом синтеза этих соединений был выбор синтетического блока, являющегося предшественником остатка глюкозамина с N-ацетильной группой. Одним из возможных вариантов решения этой задачи было использование производного глюкозамина, содержащего селективно удаляемую N-защитную группу. Однако поиск такой группы был осложнён тем, что в разработанной схеме синтеза уже используются фталимидная группа в основном глюкозаминовом блоке и N-бензилоксикарбонильная группа в агликоне. Поэтому было решено использовать блок на основе N-ацетилглюкозамина (Схема 8), так как в этом случае не требуются дополнительные стадии замены N-защитной группы на N-ацетильную. В качестве гликозил-донора в этом случае может быть использован соответствующий оксазолин **60**. Известно, что гликозилирование оксазолинами проходит с хорошими выходами лишь в случае достаточно реакционноспособных гликозил-акцепторов, таких, например, как моносахаридный блок **6**. Схема синтеза была спланирована таким образом, что реакция гликозилирования оксазолином проводится только при получении

дисахаридного блока **61**, который в дальнейшем используется в ходе блочного синтеза нонасахаридов **51-55**. В этом случае гликозилирующим является остаток глюкозамина, содержащий фталимидную группу.



**Схема 8.** а) 1)TlCl, пиридин, 2) Bz<sub>2</sub>O, пиридин, 60 °С 3) BzCl, пиридин; б) 1)90% водн. CF<sub>3</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2) Ac<sub>2</sub>O, пиридин; в) FeCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; д) TfOH, Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MS AW300, 50 °С; е) AcCl, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; ф) HgBr<sub>2</sub>, Hg(CN)<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN.

Оксазолиновый блок **60**, содержащий необходимые функциональные группы был получен из N-ацетилглюкозамина **56** с общим выходом 30%. После выделения шестого положения с помощью тритильной группы, бензоилирование проводили в две стадии с применением бензойного ангидрида и бензоилхлорида, что позволило избежать побочной реакции N-бензоилирования и привело к преимущественному образованию β-бензоата **58**, необходимого для получения оксазолина **60**. Реакция гликозилирования этим оксазолином с образованием дисахаридного блока **61**, содержащего остатки с различными N-защитными группами, прошла с выходом 79%. На основе дисахариды **62**, полученного 6'-O-деацетилированием дисахариды **61**, с выходом 91% был синтезирован ключевой трисахарид **63**. Другой необходимый трисахарид **64** был получен по уже известной схеме из бромиды **17** и дисахариды **19** с выходом 85%.

Для синтеза нонасахаридов была разработана конвергентная схема, предполагающая использование наибольшего количества общих синтетических блоков (разбиение показано пунктирными линиями на формулах 51-55). Так, окончательную сборку всех нонасахаридов по схеме «3+6» с использованием трисахаридного блока 63, так как данный структурный фрагмент присутствует на невозстанавливаемом конце всех нонасахаридов нашей серии. Этот трисахаридный блок 63 был также использован на более ранних этапах синтеза нонасахаридов 52, 54 и 55.

На *Схеме 9* более подробно представлен синтез олигосахаридов 51. Первоначально на основе полученных ранее дисахаридов 18 и 24 по схеме «2+2» с выходом 71% был синтезирован спейсерированный тетрасахарид 65. Гексасахарид 66 был получен с выходом 50% в результате реакции гликозилирования акцептора 65 дисахаридом 61, содержащим остаток N-ацетилглюкозамина. Заключительная стадия сборки по схеме «3+6» прошла с выходом лишь 40%. К сожалению, выход всех реакций гликозилирования в тех случаях, когда остаток N-ацетилглюкозамина присутствовал и в гликозил-донорном и в гликозил-акцепторном блоке, был достаточно низким (20-40%), что соответствует многим примерам синтезов олигосахаридов с N-ацетилглюкозаминовыми звеньями. Варьирование условий, в том числе разбавление реакционной смеси и использование ацетонитрила в качестве растворителя не привело к улучшению выходов. Получение свободных олигосахаридов 51-55 проводилось аналогично описанному для гомоолигосахаридов и включало гидрогенолиз Z-группы в спейсере, N-ацетилирование и последующее удаление фталоильных и бензоильных групп гидразиолизом. Нонасахариды 52-55 были получены подобным образом с применением блоков 18, 61, 63 и 64 согласно реакционным последовательностям, приведённым на *Схеме 9*.

Следует отметить, что характеристика как конечных нонасахаридов, так и промежуточных олигосахаридов была осложнена тем, что все соединения, по сути, являются изомерами и их ЯМР-спектры практически идентичны. На основе данных ЯМР можно сделать лишь вывод о длине олигосахаридов и о количестве остатков N-ацетилглюкозамина, присутствующих в его составе. Все конечные соединения (51-55) были охарактеризованы также масс-спектрами высокого разрешения, которые, как это и должно быть, одинаковы для всех пяти нонасахаридов.

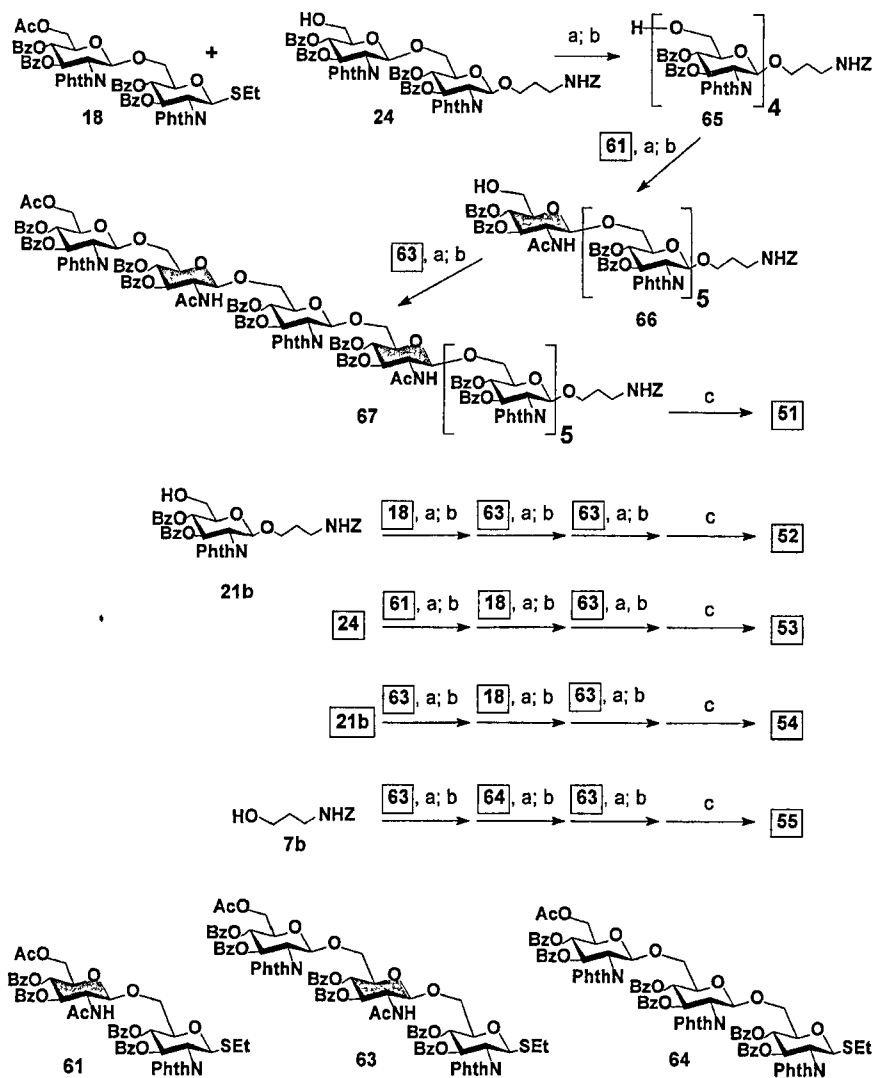


Схема 9. а: NIS, TFOH, MS 4Å, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; б: AcCl, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; в: 1) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>/C, MeOH-THF-H<sub>2</sub>O; 2) Ac<sub>2</sub>O, пиридин; 3) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, EtOH.

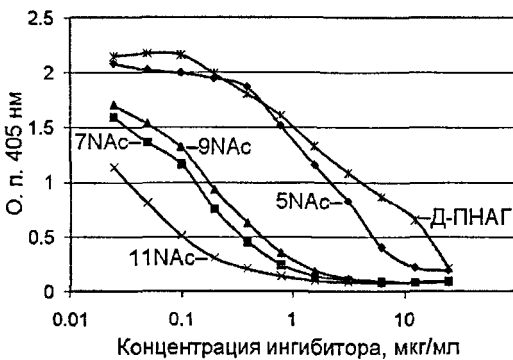
#### 4. Иммунохимические исследования.

Ранее в лаборатории профессора Джеральда Пира в Гарвардской медицинской школе были получены моноклональные антитела со специфичностью к ПНАГ-антигенам. Эти антитела были выделены из сыворотки больных, выздоравливающих после заболеваний, вызванных *S. aureus*. Были получены два основных типа моноклональных антител с различной специфичностью: антитела, распознающие только ПНАГ («анти-ПНАГ» антитела) и антитела, связывающиеся как с нативным ПНАГ, так и с его дез-N-ацетилированным аналогом Д-ПНАГ («анти-Д-ПНАГ» антитела). При этом антитела «анти-Д-ПНАГ» были способны вызывать уничтожение различных вирулентных штаммов *S. aureus in vitro*, в то время как антитела, способные связываться только с ПНАГ («анти-ПНАГ») не обладали антистафилококковой активностью.

На основе различной специфичности этих двух типов антител было сделано предположение, что антитела «анти-ПНАГ» направлены исключительно на N-ацетилированные остатки глюкозамина, в то время как антитела «анти-Д-ПНАГ» распознают общий «углеводный остов» поли-β-(1→6)-глюкозаминов и, возможно, взаимодействуют с остатками глюкозамина, несущими свободную аминогруппу. Для того, чтобы подтвердить или опровергнуть эту гипотезу было изучено взаимодействие синтезированных олигосахаридов 31-38 и 51-55 с моноклональными антителами при помощи иммуноферментного анализа.

Результаты экспериментов по ингибированию взаимодействия данных моноклональных антител с соответствующими им полисахаридными антигенами показали, что соединения, содержащие лишь остатки глюкозамина со всеми свободными аминогруппами (31-34) не способны ингибировать это взаимодействие. В то же время, при использовании соединений со всеми N-ацетилированными аминогруппами (35-38) наблюдалось полное ингибирование, причём его эффективность возрастала с увеличением длины олигосахарида (Рисунок 1). При этом в случае «анти-Д-ПНАГ» антител (Рисунок 1), N-ацетилированные олигосахариды (35-38) ингибировали даже лучше, чем сам Д-ПНАГ. Эти данные свидетельствуют о том, что рассматриваемые моноклональные антитела направлены в первую очередь на N-ацетилированные эпитопы, даже «анти-Д-ПНАГ» антитела взаимодействуют с остатками N-ацетилглюкозамина в составе Д-ПНАГ, но не с остатками

глюкозамина со свободными аминогруппами, преобладающими в составе этого полисахарида. Нет также оснований полагать, что «анти-Д-ПНАГ» антитела распознают общий углеводный остов полиглюкозаминов вне зависимости от степени N-ацетилирования, так как согласно результатам конформационных исследований (были проведены к.х.н. А. Г. Гербстом и к.х.н. А. А. Грачевым, Лаборатория химии гликоконъюгатов, ИОХ РАН), проведённых для олигосахаридов **31-38**, практически нет различий между конформациями олигосахаридов одинаковой длины со свободными или N-ацетилированными аминогруппами.



*Рисунок 1.* Кривые ингибирования олигосахаридами **35** (5NAc), **36** (7NAc), **37** (9NAc) и **38** (11NAc) взаимодействия моноклональных антител «анти-Д-ПНАГ» с Д-ПНАГ

Были также проведены эксперименты с участием серии синтезированных нонасахаридов, содержащих два остатка N-ацетилглюкозамина, разделенных различным числом остатков глюкозамина со свободной аминогруппой (**51-55**). В данном случае были проведены эксперименты с использованием олигосахаридных ингибиторов одной длины (нонасахариды), но различной степени N-ацетилирования. Как и ожидалось, селективно N-ацетилированные нонасахариды **51-55**, равно как и нонасахарид со всеми свободными аминогруппами **33** не были способны ингибировать взаимодействие «анти-ПНАГ» антител с ПНАГ. В опытах по ингибированию взаимодействия антител «анти-Д-ПНАГ» с Д-ПНАГ (*Рисунок 2*), нонасахариды **51-55** (условно обозначены на рисунке номерами остатков N-ацетилглюкозамина в нонасахаридах, считая с невозстанавливающего конца) были способны

ингибировать это взаимодействие, в отличие от нонасахарида **33** (9NH<sub>2</sub>), однако менее эффективно, чем полностью N-ацелированный нонасахарид **37** (9NAc). Среди нонасахаридов, содержащих два остатка N-ацетилглюкозамина, не наблюдалось существенных различий в ингибирующей способности (Рисунок 2, для краткости показаны только кривые для нонасахаридов **53** и **55**, кривые ингибирования олигосахаридов **51**, **52** и **54** имели аналогичный вид) и их кривые ингибирования в среднем повторяли профиль кривой ингибирования Д-ПНАГ, в котором, по-видимому, остатки N-ацетилглюкозамина «разбросаны» статистически.

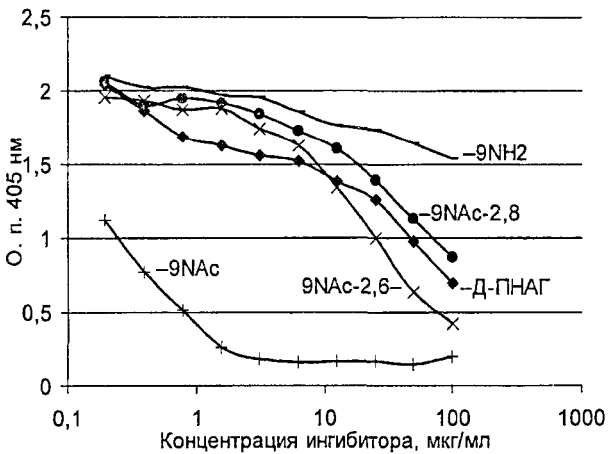


Рисунок 2. Кривые ингибирования олигосахаридами **33** (9NH<sub>2</sub>), **37** (9NAc), **53** (9NAc-2,6), **55** (9NAc-2,8) взаимодействия моноклональных антител «анти-Д-ПНАГ» с Д-ПНАГ

Результаты последних экспериментов дают основания предполагать, что различие между антителами «анти-ПНАГ» и «анти-Д-ПНАГ» основано на количестве остатков N-ацетилглюкозамина, которые взаимодействуют с участками связывания этих антител. Антителам «анти-ПНАГ» для связывания необходимо большее количество остатков N-ацетилглюкозамина, так как из всех исследованных олигосахаридов они были способны взаимодействовать только с полностью N-ацелированными олигосахаридами, в то время как для связывания с антителами «анти-Д-ПНАГ» достаточно присутствия двух остатков N-ацетилглюкозамина в нонасахаридном фрагменте. На основании полученных данных, можно ожидать, что полностью N-ацелированный

нонасахарид 37, а также селективно ацетилированные наонасахариды 51-55 будут способны индуцировать образование антител, обладающих антистафилококковой активностью. Исследованию этого вопроса посвящены дальнейшие работы при сотрудничестве лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН и лаборатории профессора Дж. Пира.

## Выводы

1. Впервые осуществлён конвергентный блочный синтез большой группы олиго- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-глюкозаминов: олигосахаридов, содержащих 5, 7, 9 и 11 остатков глюкозамина со всеми свободными аминогруппами, либо со всеми N-ацетилированными аминогруппами.
2. С помощью блочного синтеза впервые получена серия из пяти наона- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-глюкозаминов, содержащих два остатка N-ацетилглюкозамина в цепи с различным количеством остатков глюкозамина между ними.
3. Показано, что реакция терминированной олигомеризации приводит преимущественно к циклическим продуктам внутримолекулярного гликозилирования бифункциональных мономеров и неприменима для получения олиго- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-глюкозаминов.
4. С помощью иммуноферментного анализа было установлено, что для эффективного взаимодействия с протективными моноклональными антителами, направленными на D-ПНАГ, необходимо присутствие в молекуле олигосахарида остатков N-ацетилглюкозамина.



**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, N.E. Nifantiev, Synthesis of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-linked glucosamine oligosaccharides corresponding to fragments of the bacterial surface polysaccharide poly-N-acetylglucosamine, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342** (3-4), 567-575.
2. М.Л. Генинг, Ю.Е. Цветков, Дж.Б. Пир, Н.Э. Нифантьев, Изучение реакции терминированной олигомеризации в синтезе олиго- $\beta$ -(1-6)-глюкозаминов, *Биоорганическая химия*, 2006, **32**(4), 432-443.
3. M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, Y.A. Knirel, N.E. Nifantiev, Synthesis of oligo- $\beta$ -(1-6)-N-acetylglucosamines, fragments of the polysaccharide intercellular adhesion of *S. aureus* and *S. epidermidis*, *VIII International Symposium on Glycoconjugates (Флоренция, Италия)*, *Glycoconjugate J.*, 2005, **22** (4-6), 259.
4. M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, O.N. Yudina; G.B. Pier, N.E. Nifantiev, Synthesis of oligo- $\beta$ -(1-6)-N-acetylglucosamines, fragments of the polysaccharide intercellular adhesion of staphylococci, *Meeting of the Society for Glycobiology (Бостон, США)*, *Glycobiology*, 2005, **15** (11), 1211.
5. M.L. Gening, Y.E. Tsvetkov, Y.A. Knirel, G.B. Pier, N.E. Nifantiev, Towards the synthesis of oligo- $\beta$ -(1-6)-glucosamines, fragments of polysaccharide intercellular adhesion of *Staphylococcus aureus* by terminated oligomerization, 3<sup>rd</sup> German-Polish-Russian meeting on bacterial carbohydrates (Вроцлав, Польша), 2004, 99.
6. М.Л. Генинг, Ю.Е. Цветков, Н.Э. Нифантьев, Синтез фрагментов внеклеточного полисахаридного адгезина *Staphylococcus aureus*, *Тезисы докладов VIII Молодежной научной школы-конференции по органической химии (Казань)*, 2005, 31.
7. М.Л. Генинг, Д.В. Титов, А.Г. Гербст, А.А. Грачев, Ю.Е. Цветков, Дж.Б. Пир, Н.Э. Нифантьев, Цикло-олиго-бета(1-6)-глюкозамины – новый класс функционализированных циклических олигосахаридов, *Тезисы докладов XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии (Москва)*, 2007, XVIII, 42.

8. M.L. Gening, D.V. Titov, A.G. Gerbst, A.A. Grachev, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, N. E. Nifantiev, First Synthesis of Cyclo-oligo- $\beta(1-6)$ -D-glucosamines - a New Type of Functionalized Cyclic Oligosaccharides, Тезисы докладов XXIV международного симпозиума по углеводам (Осло, Норвегия), 2008, 58.

Подписано в печать 13.11.2008 г.

Печать трафаретная

Заказ № 1173

Тираж: 150 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

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