



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

На правах рукописи

СУХОВА ЕЛЕНА ВИКТОРОВНА

СИНТЕЗ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ
АНТИГЕНОВ HNK-1



02.00.03 – органическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

05 ДЕК 2008

Москва
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 **Дмитрий Владимирович Яшунский**
доктор химических наук **Яков Васильевич Возный**

Ведущая организация:

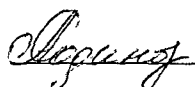
Химический факультет Московского государственного университета
имени М. В. Ломоносова

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

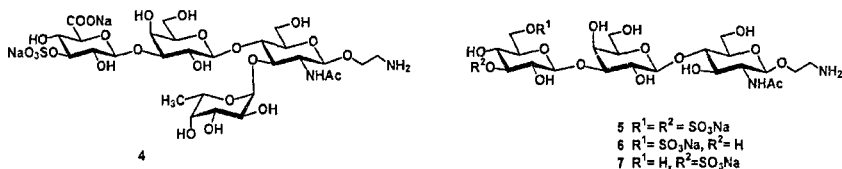
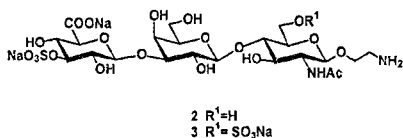
Актуальность данной работы: Биомолекулы, несущие углеводные цепи, – гликолипиды и гликопротеины – определяют адгезию нервных клеток, играют важную роль в процессах роста и развития нервных тканей и передачи нервного импульса. Углеводные структуры опосредуют многие процессы межклеточного распознавания и, следовательно, играют важную роль в формировании сложных молекулярных событий на клеточной поверхности и во внеклеточном матриксе. Большое структурное разнообразие углеводных цепей допускает огромные комбинаторные возможности, которые могут лежать в основе тонкой «настройки» межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий. Особое место среди углеводных структур занимают олигосахариды, распознаваемые антителами HNK-1. Эти олигосахариды относятся к так называемым углеводным антигенам HNK-1, получившим свое название от антител против поверхностных антигенов лимфоцитов человека – натуральных киллеров. Общим структурным элементом олигосахаридных цепей, распознающихся антителами HNK-1, является трисахаридная последовательность $\text{SO}_3\text{-3GlcA}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)-Gal}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)GlcNAc (1)}$.

Содержание таких углеводов на клеточных поверхностях очень мало, что делает их доступность из природных источников весьма ограниченной. Поэтому синтетические олигосахариды этой группы являются незаменимыми инструментами при изучении роли углеводных структур в природных процессах. Поскольку для медико-биологических исследований наиболее полезны не только сами олигосахариды, но и их моно- и поливалентные конъюгаты, то особенно актуально получение олигосахаридов, несущих функционализированную спейсерную группу, с помощью которой возможно ковалентное связывание углеводов с метками или носителями. Необходимость исследования роли отдельных элементов структуры олигосахаридов **1** в биологических процессах делают актуальной разработку эффективного метода стерео- и регионаправленного синтеза не только самой трисахаридной последовательности **1**, но и родственных ей структур, в частности, миметиков, где остаток глюкуроновой кислоты заменен остатком глюкозы, несущим при

О-6 сульфогруппу, мимикрирующую карбоксильную группу в остатке глюкуроновой кислоты.

Цель работы: Диссертация посвящена синтезу 2-аминоэтилгликозида трисахарида **1** (**2**), его дисульфатированному аналогу **3** и производному, несущему фукозный остаток в положении 3 глюкозамина **4**, а также синтезу сульфо-миметика **5** антигенного трисахарида HNK-1 **1** и соответствующих ему моносульфатированных производных **6** и **7**.

Все перечисленные сульфатированные олигосахариды необходимо было получить в виде 2-аминоэтилгликозидов, то есть в форме, позволяющей их дальнейшую конъюгацию с различными метками и носителями.



Научная новизна и практическая ценность работы: В настоящей работе осуществлен синтез природного антигенного трисахарида HNK-1; впервые синтезированы его дисульфатированное производное и производное, несущее фукозный остаток в третьем положении глюкозаминового блока, а также сульфо-миметик и соответствующих ему моносульфатированных производных. Все целевые соединения получены в спейсерированной форме, то есть в виде 2-аминоэтилгликозидов.

Усовершенствован метод селективной защиты гидроксильной группы при О-3 глюкуроновой кислоты, основанный на использовании производных глюкопирануроно-6,3-лактонов. Впервые показана возможность получения 3,6-сульфатированного глюкозного блока из левоглюкозана. Найдены условия селективного гидрогенолиза бензильных групп в сульфатированных

олигосахаридах, позволяющие минимизировать побочную реакцию десульфатирования.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе 3 статьи и тезисы 2 докладов на конференциях.

Объем диссертации и ее структура: Диссертация состоит из введения, литературного обзора, посвященного особенностям гликозилирования гидроксильной группы при С-4 глюкозамина, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитированной литературы. Общий объем диссертации страниц.

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

Ретросинтетический анализ целевых структур: При ретросинтетическом анализе (схема 1) целевых продуктов 2-7 во внимание принимались их ключевые структурные особенности, а именно: последовательность моносахаридных блоков в углеводном скелете, конфигурация межмоносахаридных связей, наличие сульфогруппы при О-3 остатка глюкуроновой кислоты (для олигосахаридов 2, 3, 4) и О-6 глюкозаминового блока (для олигосахарида 3), необходимость сульфатирования по О-3 и О-6 глюкопиранозного остатка (для олигосахарида 5) и наличие аминогруппы в агликоне.

Предшественником аминогруппы в трисахаридах 2-7 (схема 1) была выбрана азидная группа, поскольку она является устойчивой в условиях реакций планируемого синтеза.

Предшественниками целевого природного антигенного трисахарида HNK-1 2 и его сульфатированного или фукозилированного аналогов 3 и 4 являются моногидроксильное производное 8, дигидроксильное производное 9 и фукозилированное производное 10 соответственно. Предшественником

соединения **8** является дибензиловый эфир **11**, а производные **9** и **10** могут быть получены из общего предшественника **12**, в котором защитные группы при О-3 и О-6 глюкозамина ортогональны как между собой, так и защитным группам в остальной части трисахаридной молекулы.

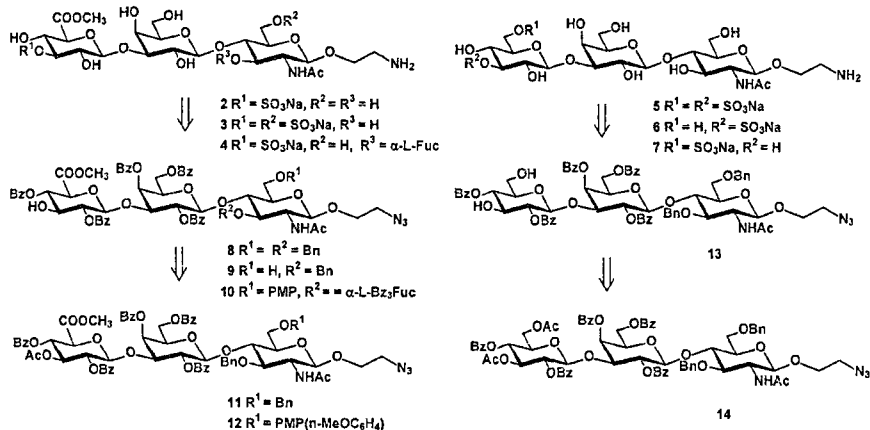


Схема 1.

Общим предшественником целевых соединений **5-7** является диол **13**, который планировалось получить из трисахарида **14**, содержащего временные ацетильные защитные группы при С-3 и С-6 глюкозного остатка.

Представив трисахариды **11**, **12** и **14** в виде обобщенной структуры **15** (схема 2), рассмотрим ретросинтез трисахаридного скелета.

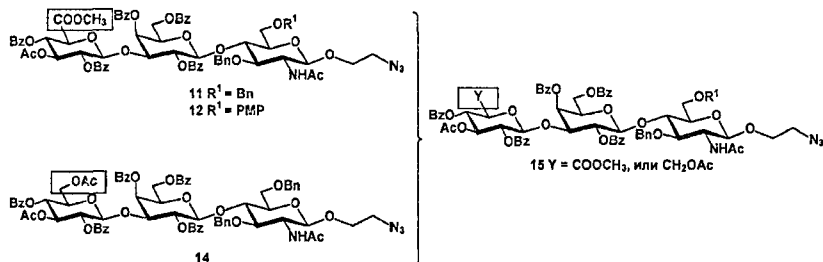


Схема 2.

Синтез трисахаридной последовательности **15** предполагалось осуществить либо по схеме [1+2], либо по схеме [2+1] (схема 3). Лактозаминный блок **17** и

дисахаридный блок **21** предполагалось синтезировать из моносахаридных предшественников **16** ($Y = \text{COOCH}_3$ или CH_2OAc), **20** и **19**. Их, в свою очередь, можно получить из γ -лактона глюкуроновой кислоты (или левоглюкозана в случае $Y = \text{CH}_2\text{OAc}$), β -пентаацетата D-галактозы и N-ацетил-D-глюкозамина соответственно.

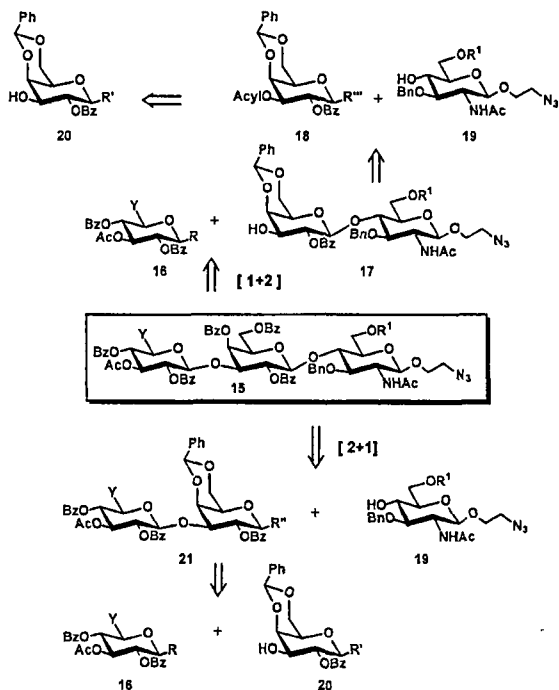


Схема 3. Ретросинтетический анализ трисахаридной последовательности **15**.

Синтез глюкуронил-доноров **27 и **30**:** Для получения целевого природного антигенного трисахарида HNK-1 **2** и его аналогов **3** и **4**, необходимо использовать глюкуронил-доноры с временной защитной группой при O-3. Селективное удаление такой защиты позволяет получить моногидроксильные производные для последующего сульфатирования.

Первой задачей настоящей работы была оптимизация условий получения селективно защищенных моногидроксильных производных по схеме, включающей 6,3-лактонизацию производного уруновой кислоты, ацилирование

образующегося лактона и раскрытие лактонового кольца в условиях мягкого основного метанолиза.

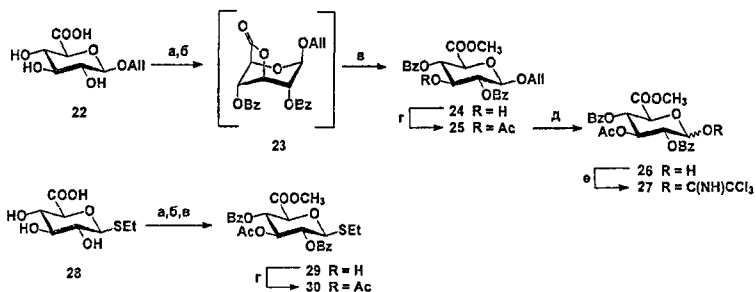


Схема 4. Реагенты и условия: а) Bz_2O (25-30 эквив.), ДМФА, 85°C , 4ч; б) Bz_2O , Py, 4-(диметиламино)пиридин, ДМФА, 36ч, 20°C ; в) MeOH, AcONa, ДМФА; г) Ac_2O , Py; д) PdCl_2 , MeOH, 2ч; е) CCl_3CN , K_2CO_3 , CH_2Cl_2 , -5°C .

Исходные соединения **22** и **28** были получены омылением их полных ацетатов обработкой LiOH в водном ТГФ. Для получения 2,4-диацилированных производных была разработана методика, включающая: (1) лактонизацию уруновых кислот под действием бензойного ангидрида (20-30 экв.) в ДМФА при температуре $80-85^\circ\text{C}$; (2) О-бензоилирование 6,3-лактона типа **23** в Py в присутствии 4-(диметиламино)пиридина (DMAP); (3) метанолиз лактона в присутствии безводного ацетата натрия (AcONa).

Так, исходные кислоты **22** и **28** переводили через промежуточное образование лактонов в целевые моногидроксильные производные **24** и **29** с выходом 64 и 62% соответственно. Наличие свободных OH-групп при С-3 в соединениях **24** и **29** подтверждалось сильнополюсными расположениями сигналов протонов H-3 в спектрах ^1H -ЯМР. Ацетилирование единственной OH-группы в соединениях **24** и **29** позволило получить производные уруновой кислоты **25** и **30**, содержащие временную ацетильную защитную группу при О-3, что обеспечивает возможность дальнейшего 3-О-сульфатирования.

Гликозид **25** деаллилировали под действием хлорида палладия (PdCl_2) в метаноле, полученный полуацеталь **26** переводили в трихлорацетимидатный донор **27**.

Таким образом, были получены глюкононил-доноры **27** и **30** с временной защитной группой при О-3.

Синтез галактозных блоков 32 и 33: 4,6-О-Бензилиденовые производные этилтио- и аллил-галактозида **32** и **33**, отвечающие обобщенной структуре **20** (схема 3), были синтезированы по известным методикам из пентаацетата галактозы **31** (схема 5).

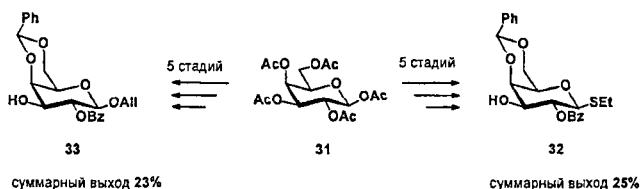


Схема 5.

Использование тиогалактозида **32** в качестве гликозил-акцептора приводит непосредственно к дисахаридным гликозил-донорам типа **21** (схема 3, $R'' = \text{SEt}$) без каких-либо дополнительных превращений. С другой стороны, соединение **32** может быть превращено в гликозил-донор общей формулы **18** простым ацилированием по О-3. Наличие аномерной аллильной группы в галактозиде **33** позволяет не только осуществлять все необходимые трансформации защитных групп, но и легко переходить от аллилгликозидов к восстанавливающим производным сахаров, а от них – к гликозил-донорам для последующего роста углеводной цепи.

Синтез глюкозаминных блоков 36 и 39: Синтез 2-азидоэтилгликозидов глюкозамина типа **19** представлен на схеме 6. Бензиловый эфир **35** был получен в шесть стадий по известным методикам исходя из *N*-ацетилглюкозамина. Далее соединение **35** переводили в 3,6-ди-О-бензильное производное **36** (выход 84%) с помощью региоизбирательного восстановительного раскрытия бензилиденового цикла под действием комплекса $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{BH}_3$ и AlCl_3 в присутствии 2 экв. воды. Положение свободной гидроксильной группы в

соединении **36** подтверждалось на основе корреляции в спектре NOESY между протонами Н-3 и Н-6 глюкозамина и метиленовыми протонами бензильных групп, а также наличием корреляции между протонами Н-4 и 4-OH.

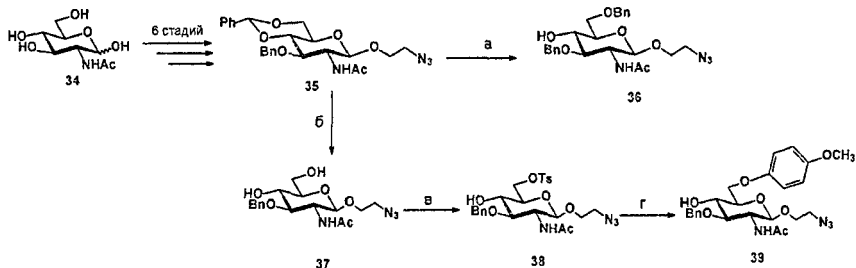


Схема 6. Реагенты и условия: а) $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{BNH}_3$, AlCl_3 , H_2O , ТГФ, $4^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$; б) AcOH , 40°C , 36с; в) TsCl , Py , 0°C ; г) $p\text{-MeOC}_6\text{H}_4\text{OH}$, NaN , ДМФА, 60°C .

Удалением бензилиденовой защитной группы в соединении **35** водной AcOH был получен диол **37**, который избирательно 6-О-тозилировали действием TsCl в Py . Полученный тозилат **38** затем был превращен в *p*-метоксифенильное производное **39** реакцией с *p*-метоксифенолом в присутствии NaN . Таким образом, был получен глюкозаминовый акцептор **39** с ортогональными защитными группами при О-3 и О-6, которые позволяют дальнейшую функционализацию остатка глюкозамина в составе трисахаридов.

Синтез трисахаридов по схеме [1+2]: Согласно ретросинтетической схеме 3, синтез общего дисахаридного блока $\text{Gal}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc}$ предполагалось провести с использованием 3-О-хлорацетилированного этилтиогликозида **40** и глюкозаминового акцептора **36** (схема 7).

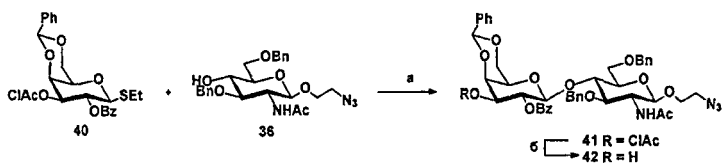


Схема 7. Реагенты и условия: а) NIS , TfOH , $\text{MS } 4\text{A}$, CH_2Cl_2 , -30°C ; б) тиомочевина, *сим*-коллиндин.

В результате гликозилирования в присутствии промотирующей системы N-йодосукцинимид (NIS) – трифторметансульфокислота (TfOH) и молекулярных сит 4Å был получен дисахарид 41 с выходом 70%. β-Конфигурация вновь образованной гликозидной связи в этом соединении подтверждалась характерным значением КССВ ($J_{1,2}=8.2$) Гц аномерного протона остатка галактозы в спектре $^1\text{H-NMR}$. После удаления хлорацетатной группы в дисахариде 41 под действием тиомочевины в присутствии *сим*-коллидина был получен целевой лактозаминный акцептор 42 с выходом 90%.

Для получения трисахарида 43 по схеме [1+2] лактозаминный акцептор 42 необходимо подвергнуть глюкуронилрованию с использованием доноров 27 или 30. При попытке гликозилирования акцептора 42 этилтиогликозидом 30 в присутствии NIS и TfOH не происходило образования трисахарида 43 (схема 8). При использовании же в качестве глюкуронил-донора трихлорацетимидата 27 трисахарид 43 был получен с выходом лишь 10%.

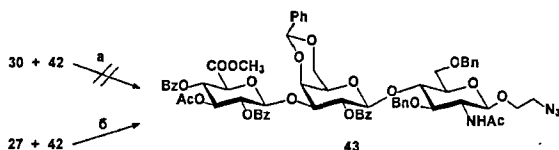


Схема 8. Реагенты и условия: а) NIS, TfOH, MS 4Å, CH_2Cl_2 , -30°C ; б) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, MS AW300, CH_2Cl_2 , 0°C .

Таким образом, неприемлемо низкий выход на стадии получения трисахарида заставил нас отказаться от схемы [1+2] и исследовать альтернативную схему сборки [2+1].

Синтез трисахаридов 11 и 12 по схеме [2+1]: При сборке трисахаридной цепи по этой схеме на первом этапе было необходимо получить дисахаридный блок типа 21 (схема 3). Все попытки гликозилирования тиогалактозида 32 различными глюкуронил-донорами не дали положительного результата. Напротив, реакция трихлорацетимидата 27 с аллилгалактозидом 33 в толуоле в

присутствии $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ и молекулярных сит AW300 привела к дисахаридному продукту **44** с хорошим выходом 64% (схема 9).

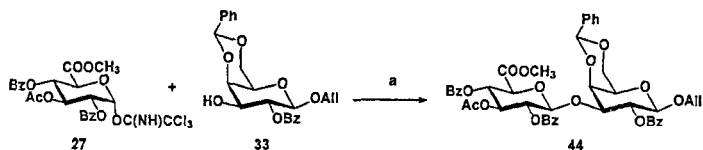


Схема 9. Реагенты и условия: а) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, MS AW300, толуол, $0^\circ\text{C} \rightarrow 10^\circ\text{C}$.

Для превращения гликозида **44** в дисахаридный донор кислотолabileная 4,6-О-бензилиденная группа была заменена на устойчивые в кислых условиях бензоильные остатки (схема 10). Удаление аллильной группы в полученном производном **46** взаимодействием с PdCl_2 в присутствии AcONa в 95% уксусной кислоте был получен восстанавливающий дисахарид **47**, который реакцией с CCl_3CN в присутствии DBU превращали в трихлорацетимидат **48** с выходом 85%.

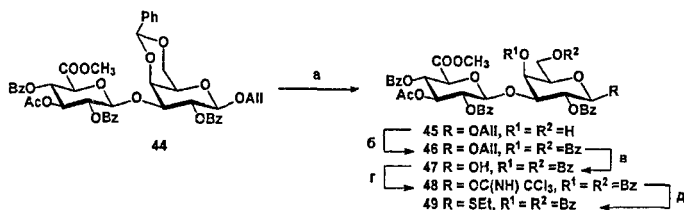


Схема 10. Реагенты и условия: а) *p*-толуолсульфонат пиридиния, 90% водный CH_3CN , 80°C ; б) BzCl , Py , -10°C ; в) PdCl_2 , AcONa , AcOH 95%, 80°C ; г) CCl_3CN , DBU, CH_2Cl_2 , 4°C ; д) EtSH , TMSOTf , MS 4A, CH_2Cl_2 .

При попытке гликозилирования донором **48** производного глюкозамина **36** наблюдалась только деструкция донора, а акцептор **36** выделялся в неизменном виде. Поэтому трихлорацетимидат **48** взаимодействием с этантиолом в присутствии триметилсилилтрифлата (TMSOTf) был превращен в тиогликозид **49** (выход количественный). Последующее гликозилирование глюкозаминных

акцепторов **36** и **39** тиогликозидом **49** в присутствии NIS, TfOH и молекулярных сит AW300 приводило к трисахаридам **11** и **12** с выходами **52** и **60%** соответственно (схема 11).

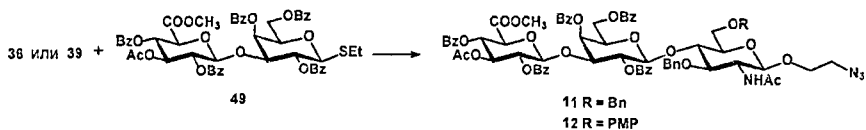


Схема 11. Реагенты и условия: а) NIS, TfOH, MS AW300, CH_2Cl_2 , $-23^\circ\text{C} \rightarrow 10^\circ\text{C}$.

Получение сульфатированных трисахаридов 51 и 53: Для введения сульфатной группы, единственную ацетильную группу в остатке глюконовой кислоты в трисахариде **11** удаляли действием HCl в метаноле. Полученное моногидроксильное производное **50** (схема 12) сульфатировали комплексом $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ с образованием моносульфата **51** с выходом **86%**.

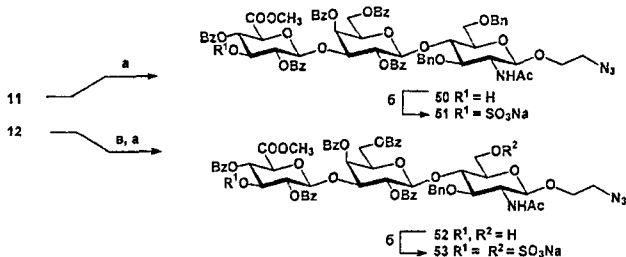


Схема 12. Реагенты и условия: а) 6% HCl, MeOH, 4°C ; б) $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$, ДМФА, 20°C ; в) $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_2)_6$, 90% водный CH_3CN , 0°C .

Для получения дисульфатированного трисахарида **53** в исходном соединении **12** сначала удаляли *p*-метоксифенильную группу в остатке глюкозамина, а затем кислотным метанолизом высвобождали гидроксильную группу в положении 3 остатка уроновой кислоты. Далее диол **52** обрабатывали $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ и получали дисульфатированное производное **53** с выходом **81%** (схема 12).

Получение трисахаридных производных **2** и **3**: В сульфатированных трисахаридах **51** и **53** было необходимо восстановить азидную группу в агликоне и удалить бензильные и ацильные защитные группы. Попытки одновременного восстановления азидной группы и удаления бензильных защит каталитическим гидрогенолизом над палладиевым катализатором не привели к успеху, вероятно, из-за отравления катализатора образующимся свободным амином. Поэтому восстановление азидной группы и удаление бензильных групп проводили в два этапа (схема 13). На первом из них после восстановления азидогруппы в трисахаридах **51** и **53** образующийся амин превращали в трифторацетамид обработкой этилтрифторацетатом. Далее N-защищенные продукты подвергали дальнейшему гидрогенолизу. В случае дисульфатированного производного гидрогенолиз единственной бензильной группы протекал без осложнений и гладко приводил к дебензилированному продукту **55**. Однако в случае моносульфатированного трисахарида гидрогенолиз сопровождался значительным десульфатированием, что приводило к существенному снижению выхода производного **54**. Мы обнаружили, что проведение дебензилирования в присутствии каталитического количества ацетата натрия хотя и замедляет реакцию, но практически полностью подавляет реакцию десульфатирования, что позволяет получить диол **54** с приемлемым выходом.

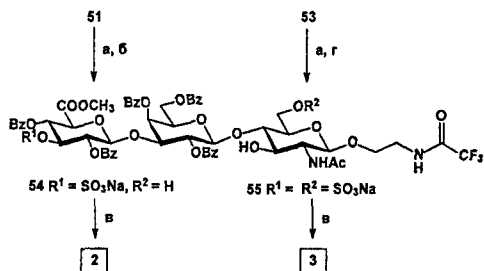


Схема 13. Реагенты и условия: а) H_2 , PdO/C , MeOH-AcOH , 2ч; затем CF_3COOEt , Et_3N , MeOH ; б) H_2 , PdO/C , MeOH , AcONa (кат), 72ч; в) LiOH в водном ТГФ, -10°C ; затем NaOH в водном MeOH ; г) H_2 , PdO/C , MeOH .

В полученных производных **54** и **55** в условиях мягкого щелочного гидролиза сначала омыляли сложноэфирную группу уроновой кислоты, а затем удаляли бензоильные и N-трифторацетильную группы в более жестких щелочных условиях. В результате были получены 2-аминоэтилгликозиды **2** и **3** с выходом 72 и 83% соответственно.

Получение тетрасахарида 4: Для введения в трисахарид **12** остатка α -L-фукозы необходимо было освободить гидроксильную группу при C-3 в остатке глюкозамина. С этой целью соединение **12** подвергли каталитическому гидрированию в присутствии PdO/C, образующийся амин трифторацетилировали и повторным гидрированием удаляли единственную бензильную группу (схема 14). Гликозилирование полученного таким образом акцептора **56** этилтиофукозидом **57** в присутствии NIS и TfOH приводило к тетрасахариду **58** с выходом 52%.

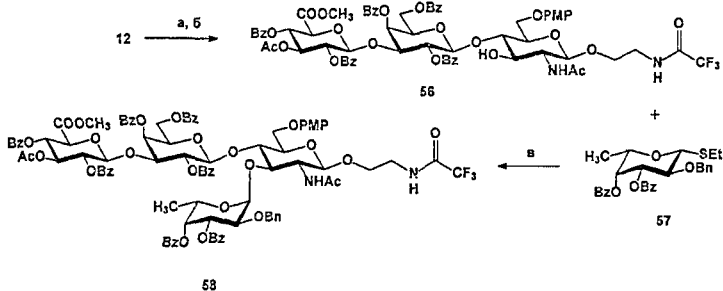


Схема 14. Реагенты и условия: а) H₂, PdO/C, MeOH-AcOH, 2ч; затем CF₃COOEt, Et₃N, MeOH; б) H₂, PdO/C, MeOH; в) NIS, TfOH, MS 4Å, CH₂Cl₂.

Удаление *p*-метоксифенильной и бензильной групп в O-сульфатированных соединениях может осложняться конкурентным десульфатированием (см. выше), поэтому в проведенном синтезе тетрасахарида **4** удаление этих групп проводилось перед сульфатированием (схема 15). Так гидрогенолиз тетрасахарида **58** и последующая обработка церийаммонийнитратом гладко приводят к диолу **59**, который далее бензоилировали с образованием соединения **60**. Селективным удалением

единственной ацетильной группы в положении 3 остатка уроновой кислоты было получено моногидроксильное производное **61**, взаимодействие которого $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ приводило к сульфату **62**.

Сульфатированный тетрасахарид **62** содержит только ацильные O- и N-защитные группы, которые без осложнений были удалены двухстадийным щелочным гидролизом (см. получение трисахаридов **2** и **3**), в результате чего целевой тетрасахарид **4** был получен с выходом 92%.

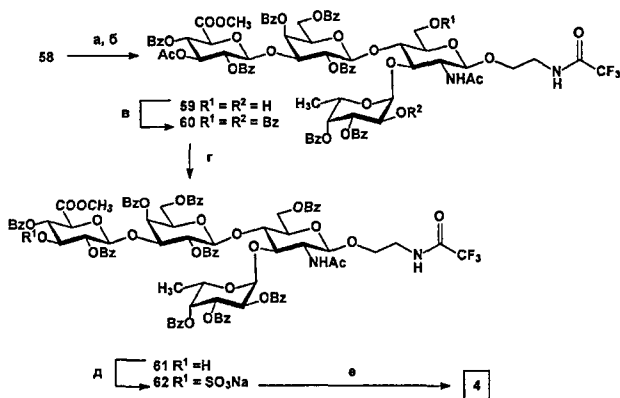


Схема 15. Реагенты и условия: а) H_2 , PdO/C, MeOH; б) $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_2)_6$, 90% водный CH_3CN , 0°C; в) BzCl , Py, -10°C; г) 6% HCl, MeOH, 4°C; д) $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$, ДМФА-Py 3:1, 20°C, 42ч; е) LiOH в водном ТГФ, затем NaOH в водном MeOH.

Синтез миметика **5** антигенного трисахарида **2** и его аналогов **6** и **7**:

Заключительная часть работы посвящена синтезу дисульфатированного миметика трисахаридной последовательности **2**, в котором сульфогруппа при O-6 глюкозного остатка имитирует карбоксильную группу глюкуроновой кислоты, а также двух моносульфатированных аналогов **5** – соединений **6** и **7**. Эти производные необходимы для выяснения роли анионных групп в положениях 3 и 6 уроновой кислоты в процессах биологического распознавания антигенов HNK-1.

Для синтеза указанных соединений необходимо было располагать глюкозил-донорами, содержащими временные защитные группы при O-3 и O-6.

Как и ранее, в качестве временных защитных групп мы использовали ацетильные группы, а в качестве постоянных – бензоильные. Синтез 2,4-ди-О-бензоилированных производных глюкопиранозы из предшественников с 4C_1 конформацией пиранозного цикла является нетривиальной задачей, тогда как при использовании левоглюкозана **63** с инвертированной конформацией цикла возможно достаточно эффективное проведение одностадийного 2,4-дидензоилирования с образованием дидензоата **64** (схема 16).

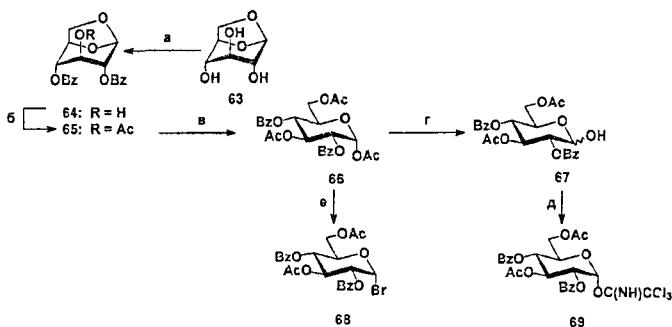


Схема 16. Реагенты и условия: а) $BzCl$, Py , $4^\circ C$; б) Ac_2O , Py , $4^\circ C$; в) Ac_2O , H_2SO_4 (кат), $4^\circ C$; г) $N_2H_4 \cdot HOAc$, ДМФА; д) CCl_3CN , DBU , CH_2Cl_2 , е) 33% HBr в $AcOH$, Ac_2O , CH_2Cl_2 .

Ацетилированием дидензоата **64** был получен ацетат **65**, последующий ацетоллиз которого количественно приводит к 1,3,6-триацетату **66**. Взаимодействием последнего с HBr в $AcOH$ с количественным выходом получали глюкозилбромид **68**. Для получения трихлорацетимидата **69** соединение **66** сначала избирательно дезацетилировали действием ацетата гидразина с образованием полуацетата **67** с выходом 88%. Взаимодействием последнего с CCl_3CN в присутствии DBU с выходом 81% получали трихлорацетимидат **69**.

Сборка трисахарида по схеме [1+2] с использованием общего для двух групп олигосахаридов лактозаминового блока **42** (схема 7) не дала положительных результатов; глюкозилирование дисахарида **42** донорами **68** или **69** приводило к образованию лишь следовых количеств целевого трисахарида.

Альтернативная схема с [2+1] – сборкой цепи предполагает на первом этапе синтез гликозилгалактозного блока. При оптимизации условий гликозилирования было найдено, что наилучший результат (схема 17) достигается при взаимодействии аллилгалктозида **33** с трихлорацетимидатом **69**. Дисахаридный блок **70** в этом случае был получен с выходом 48%.

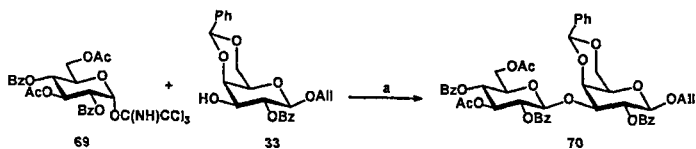


Схема 17. Реагенты и условия: а) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, MS AW300, толуол, $0^\circ\text{C} \rightarrow 10^\circ\text{C}$.

Полученный аллилгликозид **70** был далее превращен в дисахаридный донор. По аналогии с дисахаридным глюкуронилгалактозным блоком **44** соединение **70** было превращено в этилтиогликозид **85**, как показано на схеме 18.

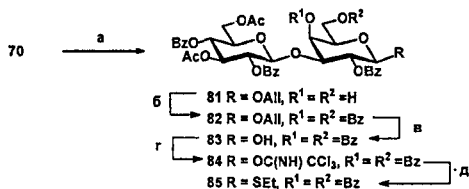


Схема 18. Реагенты и условия: а) *p*-толуолсульфонат пиридиния, 90% водный CH_3CN , 80°C ; б) BzCl , Py , -10°C ; в) PdCl_2 , AcONa , 95% AcOH , 80°C ; г) CCl_3CN , DBU , CH_2Cl_2 , 4°C ; д) EtSH , TMSOTf , MS 4Å, CH_2Cl_2 .

Далее нами был получен трисахарид **14** (выход 50%) гликозилированием глюкозаминового акцептора **36** донором **85** в условиях, аналогичных условиям получения трисахарида **11** с глюкуронильным фрагментом в терминальном положении – активацией NIS в присутствии TfOH и молекулярных сит AW300.

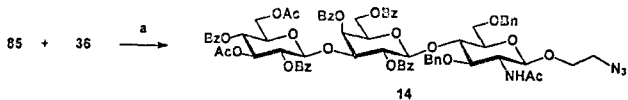


Схема 19. Реагенты и условия: а) NIS, TfOH, MS AW300, CH₂Cl₂, -23°C → 10°C.

Функционализация трисахарида 14: 3,6-Диол **13** был получен с выходом 81% действием раствора HCl в метаноле на 3,6-диацетат **14**. Производное **13** служило исходным соединением в синтезе трех сульфатированных трисахаридов – 3,6-дисульфата **5**, 3-сульфата **6** и 6-сульфата **7** (схема 20).

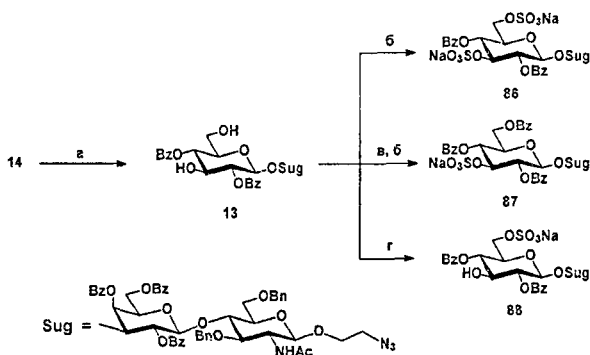


Схема 20. Реагенты и условия: а) 6% HCl, MeOH, 4°C; б) SO₃·Py (10 экв.), ДМФА, 20°C; в) BzCN, Et₃N, 20°C; г) SO₃·Py (3 экв.), Py, 4°C.

Дисульфат **86** был получен с выходом 86% действием большого избытка (10 экв.) сульфатирующего реагента на диол **13** (схема 20). Для получения 6-О-сульфатированного производного **88** диол **13** избирательно сульфатировали при пониженной температуре, используя 3 экв. SO₃·Py. Выход моносульфа **88** составил 80%.

Для получения 3-О-сульфатированного производного **87** необходимо было предварительно защитить в диоле **13** более реакционноспособную первичную гидроксильную группу. Для этого диол **13** обрабатывали 1.2 экв. мягкого бензоилирующего реагента BzCN в присутствии Et₃N при комнатной

температуре. Из-за близких значений R_f продуктов реакции бензоилирования было решено провести дальнейшее сульфатирование реакционной смеси без выделения индивидуальных продуктов (схема 20). Необходимый 3-О-сульфатированный трисахарид **87** был выделен хроматографически с общим выходом на 45% две стадии.

Дальнейшее превращение защищенных производных **86-88** в свободные сульфатированные трисахариды **5-7** проводилось по схеме, аналогичной использовавшейся для получения глюкуронильных трисахаридов **2** и **3**.

Азидную группу в соединениях **86-88** восстанавливали каталитическим гидрированием до аминогруппы, которую временно защищали N-трифторацетилизацией (схема 21). Соответствующие трифторацетамиды были выделены с выходами 62-83%. Последующее удаление бензильных групп с помощью гидрогенолиза сопровождалось частичным десульфатированием, особенно заметным в случае получения моносульфатов **90** и **91**. Оптимизация условий реакций для каждого субстрата позволила получить продукты дебензилирования **89-91** с выходами 44-83%. На заключительной стадии с помощью щелочной обработки удалялись бензоильные и N-трифторацетильная группы, а целевые сульфатированные трисахариды **5-7** далее выделялись гель-хроматографией на Сефадексе G-15.

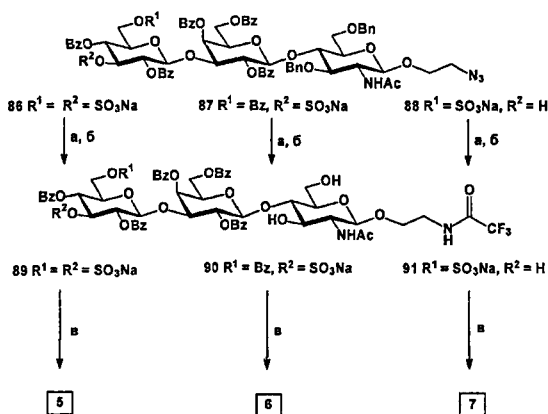


Схема 21. Реагенты и условия: а) H_2 , $Pd(OH)_2/C$, $MeOH$, $AcOH$ (кат); затем CF_3COOEt , Et_3N , $MeOH$; б) H_2 , PdO/C , $MeOH$, $AcOH$ (кат); в) $1M MeONa$, $MeOH$; $1M NaOH$, H_2O .

Строение сульфатированных олигосахаридов 2-7 было подтверждено данными ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектроскопии. Отнесение сигналов в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР проводилось с помощью двумерной гомо- и гетероядерной корреляционной спектроскопии COSY, TOCSY, ROESY и HSQC. В частности, конфигурации аномерных центров доказывались значениями КССВ $J_{1,2}$ соответствующих моносахаридных остатков в спектрах ^1H -ЯМР. Гликозилирование О-3 в остатках галактозы и О-4 в остатках глюкозамина подтверждалось слабопольными химическими сдвигами сигналов соответствующих атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР. Слабопольные химические сдвиги сигналов протонов и атомов углерода в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР в положениях, несущих сульфатные группы, однозначно подтверждали локализацию последних в соединениях 2-7.

ВЫВОДЫ

1. Синтезирован 2-аминоэтилгликозид антигенного трисахарида HNK-1 и его производные, содержащие 6-О-сульфо или 3-О- α -L-фукозильный заместитель в остатке GlcNAc.
2. Синтезирован миметик природных антигенных олигосахаридов HNK-1, содержащий 3,6-О-дисульфоглюкозу вместо 3-О-сульфатированной глюкуроновой кислоты, а также соответствующие ему моносульфатированные производные – целевые соединения получены в виде 2-аминоэтилгликозидов.
3. В ходе получения целевых соединений исследованы различные пути синтеза трисахаридных последовательностей GlcA β -(1 \rightarrow 3)-Gal β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc β и Glc β -(1 \rightarrow 3)-Gal β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc β и показано, что наиболее эффективным является синтез по схеме [2+1].
4. Найдены условия гидрогенолиза бензильных групп в сульфатированных олигосахаридах, позволяющие минимизировать побочную реакцию десульфатирования.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. A.V. Kornilov, E.V. Sukhova, N.E. Nifantiev, Preparative route to glucuronyl donors bearing temporary protecting group at O-3 via 6,3-lactonisation by Bz_2O or Piv_2O . *Carbohydr. Res.*, 2001, **336**, 309-313.
2. A.A. Sherman, O.N. Yudina, Y.V. Mironov, E.V. Sukhova, A.S. Shashkov, V.M. Menshov, N.E. Nifantiev, Study of glycosylation with *N*-trichloroacetyl-D-glucosamin derivatives in the syntheses of the spacer-armed pentasaccharides sialyl lacto-N-neotetraose and lacto-N-tetraose, their fragments, and analogues. *Carbohydr. Res.*, 2001, **336**, 13-46.
3. Е.В. Сухова, А.В. Дубровский, Ю.Е. Цветков, Н.Э. Нифантьев, Синтез олигосахаридов, родственных антигену HNK-1. Сообщение 5. Синтез сульфомиметика антигенного трисахарида HNK-1. *Изв. АН. Сер. хим.*, 2007, 1593-1607.
4. Pervushina E.V., Kornilov A.V., Nifantiev N.E. «Improved preparation of selectively 3'-O-protected GlcA and GlcA(β 1-3) glycosyl donor for the synthesis of carbohydrate chains of HNK-1 antigens», Proceedings of the 20th International Carbohydrate Symposium.- Hamburg. 2000. B306.
5. Сухова Е.В., Дубровский А.В., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э., Синтез HNK-1 антигенного трисахарида и его сульфо-миметиков. XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Москва, 23-28 сентября 2007г. 2007, **1**, 451:

Подписано в печать 13.11.2008 г.

Печать трафаретная

Заказ № 1172

Тираж: 150 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(499) 788-78-56
www.autoreferat.ru