

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

На правах рукописи



КОМАРОВА БОЖЕНА СЕРГЕЕВНА

**СИНТЕЗ α -МЕТИЛГЛИКОЗИДОВ ПЕНТАСАХАРИДОВ
ВНЕШНЕЙ ОБЛАСТИ КОРА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

02.00.03 – органическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва

2010

Работа выполнена в лаборатории химии гликоконъюгатов

Института органической химии им. Н.Д. Зелинского

Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук **Цветков Юрий Евгеньевич**

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор **Леон Владимирович Бакиновский**

доктор химических наук **Дмитрий Владимирович Яшунский**

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии Российской академии наук

им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Защита состоится 30 ноября 2010 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.222.01 при Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН по адресу 119991, Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН

Автореферат разослан «__» октября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного

совета Д 002.222.01

доктор химических наук



Родиновская Л. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Муковисцидоз представляет собой врожденное генетическое заболевание, которое среди представителей европеоидной расы встречается с частотой 1:2500. Самой серьезной патологией у больных муковисцидозом является воспалительный процесс, сопровождающий хроническое заражение легких бактериальным патогеном *Pseudomonas aeruginosa*. Мутантный ген, вызывающий муковисцидоз, находится в части ДНК, кодирующей трансмембранный белок, называемый CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), который экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток дыхательных путей.

Одной из важных составляющих механизма противодействия бактериальному заражению у здоровых людей является поглощение (интернализация) бактерий эпителиальными клетками дыхательных путей. Согласно многочисленным данным на первом этапе этого процесса происходит специфическое распознавание бактерий рецептором CFTR на поверхности эпителиальных клеток. Бактериальным лигандом, ответственным за взаимодействие с этим рецептором, является олигосахарид внешней области кора липополисахарида (ЛПС). Он в различных штаммах *P. aeruginosa*, инфицирующих легкие, представлен двумя изомерными гликоформами (Рис. 1).

Эпителиальные клетки, несущие ген мутантного CFTR, не способны поглощать *P. aeruginosa*. Однако в результате предшествующей заражению обработки таких клеток выделенным фрагментом бактериального липополисахарида они приобретают свойства клеток здоровых людей.

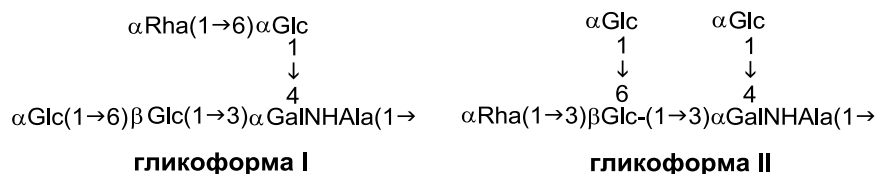


Рис. 1. Структура гликоформ I и II внешней области кора ЛПС *P. Aeruginosa*.

Чтобы выяснить роль гликоформ I и II и аминокислотной группы аланильного остатка, связанного с галактозамином, во взаимодействии CFTR с бактерией, а также изучить влияние этих гликоформ на свойства клеток, несущих мутантный CFTR, необходимо синтезировать пентасахариды, отвечающие гликоформам I и II.

Целью работы является синтез пентасахаридов, отвечающих гликоформам I и II, в виде α -метилгликозидов 1 и 2 (Рис. 2). α -Конфигурация остатка галактозамина в олигосахаридах 1 и 2 соответствует конфигурации гликозидной связи между внешней и

внутренней областью кора природного ЛПС. Для выявления влияния остатка аланина и его аминогруппы на специфичность взаимодействия внешней области кора ЛПС с белком CFTR планировалось синтезировать каждую из гликоформ в виде трех соединений, несущих на атоме азота галактозамина ацетильную, аланильную и *N*-ацетилаланильную группы.

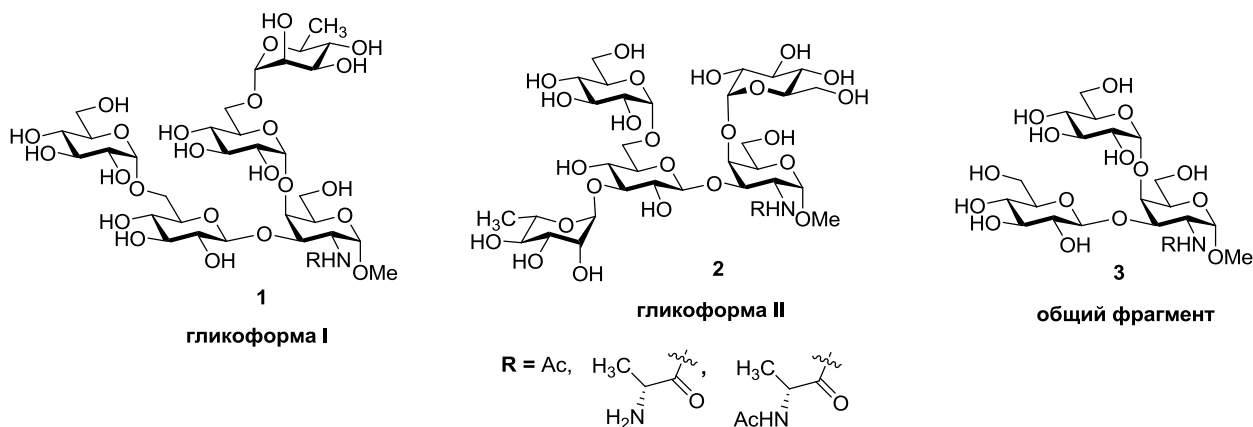


Рис. 2. Структура целевых соединений.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые синтезированы пентасахаридные α -метилгликозиды, соответствующие гликоформам **I** и **II** внешней области кора липополисахарида *P. aeruginosa* и несущие аланильный, ацетильный или *N*-ацетилаланильный заместители на атоме азота галактозаминового остатка.

Исследованы схемы синтеза целевых соединений, различающиеся последовательностью присоединения углеводных остатков к вицинальным гидроксильным группам при C-3 и C-4 α -метил-2-азидо-2-дезоксигалактозида. Показано, что для эффективного синтеза олигосахаридов с вицинальным 3,4-разветвлением в остатке 2-азидо-2-дезоксигалактозы необходимо первоначальное β -(1 \rightarrow 3)-глюкозилирование с последующим построением α -(1 \rightarrow 4)-гликозидной связи.

Найдено, что *O*-глюкопиранозил-*N*-фенилтрифторацетимидаты, несущие ацильные заместители при O-3 и O-6, являются эффективными гликозилирующими агентами, позволяющими с высокими выходами и высокой α -стереоселективностью глюкозировать первичные и вторичные спирты. Исследовано влияние ацильных заместителей при O-3 и O-6 в глюкозил-донорах различных типов на α -стереоизбирательность реакций гликозилирования.

Найдены условия эффективного восстановления азидной группы дитиотреитолом в сложных олигосахаридных субстратах, несущих бензильные защитные группы.

Публикация и апробация работы. По результатам диссертации опубликовано 3 статьи. Отдельные части работы были представлены на Международной конференции “Carbohydrate Workshop” (Борстель, Германия, 2004), Международном симпозиуме “International Symposium on Glycoconjugates” (Флоренция, Италия, 2005), в докладе на Российско-индийском симпозиуме по органической химии, проводившемся в рамках XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии (Москва, 2007). Часть работы представлялась на конкурсе научных работ ИОХ РАН (Москва, 2008), где была удостоена первой премии. В полном объеме результаты работы докладывались на “4th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates” (Hyttiälä Forestry Field Station, Финляндия, 2010).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на _____ страницах и состоит из введения, литературного обзора, посвященного исследованию влияния заместителей в пиранозном цикле на α -стереоселективность гликозилирования, а также 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 ОБЩЕГО ТРИСАХАРИДНОГО ФРАГМЕНТА ГЛИКОФОРМ I И II

1.1. Синтез гликозил-акцепторов 7 α и 8 на основе 2-азидо-2-дезоксигалактозы

Целевые пентасахариды **1** и **2** имеют в своем составе общий структурный элемент – разветвленный трисахарид **3**, на примере получения которого были отработаны принципиальные моменты синтеза целевых пентасахаридов, в частности, выбор 2-азидопроизводных в качестве предшественников галактозаминового звена в пентасахаридах, а также порядок построения гликозидных связей в 3,4-разветвленном фрагменте и выбор условий для стереоселективного α -гликозилирования.

Введение различных ацильных заместителей по аминогруппе галактозамина целесообразно проводить на заключительных стадиях синтеза после сборки олигосахаридного скелета. В этом случае на всех предыдущих стадиях аминогруппа

должна присутствовать в защищенной форме либо в форме некоторой функции-предшественника. В качестве такого предшественника была выбрана азидогруппа. Решающим фактором в таком выборе явилось то, что производные α -связанных 2-аминосахаров удобнее всего получать с использованием 2-азидо-2-дезоксисахаров. При этом несодействующая 2-азидная группа обеспечивает α -стереоселективность гликозилирования при синтезе метилгликозидов.

Как упоминалось выше, обе гликоформы содержат вицинальное 3,4-разветвление в остатке галактозамина. Возможность присоединения двух углеводных остатков к вицинальным гидроксильным группам моносахарида, несущего также электроноакцепторный азидный заместитель при С-2, потребовала специального изучения. При построении вицинального разветвления представлялось обоснованным присоединить в первую очередь α -глюкозный остаток к гидроксильной группе при С-4, так как в этом случае стадия создания одной из двух α -глюкозных связей, присутствующих в структуре целевых пентасахаридов, переносится на начальный этап синтеза. Для того чтобы получить α -(1 \rightarrow 4)-связанный дисахарид, необходим соответствующий гликозил-акцептор со свободным гидроксилом при С-4, в качестве которого был выбран гликозид **8** (Схема 1).

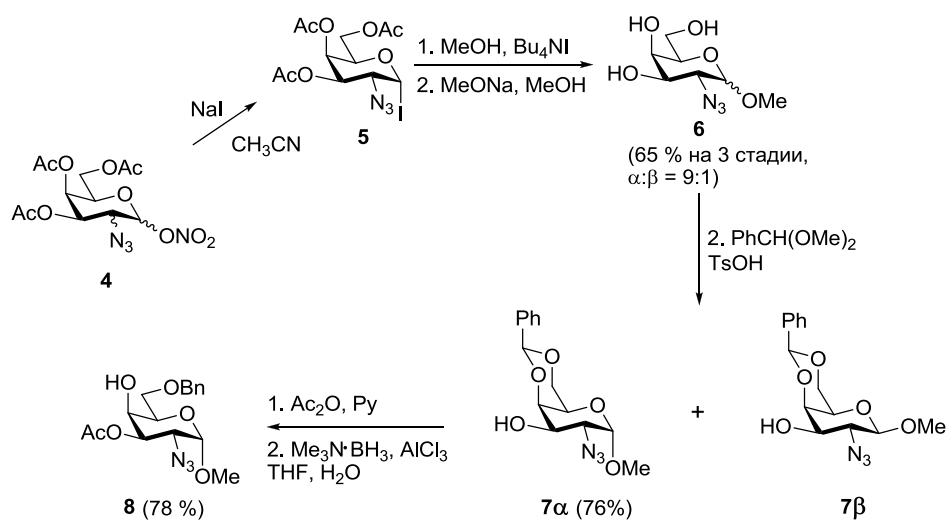


Схема 1. Синтез α -метил-2-азидо-2-дезоксигалактозидов **7a** и **8**.

Исходным соединением в синтезе такого акцептора была смесь изомеров азидонитратов **4** (Схема 1), полученная по методу Лемье из триацетилгалактала. Поскольку способа прямого стереоселективного превращения смеси азидонитратов в α -метилгликозид не существует, продукт **4** сначала переводили в α -гликозилиодид **5**. Последний обрабатывали метанолом в присутствии Bu₄NI, что приводило к смеси α - и

β -метилгликозидов в соотношении 9:1. Эту смесь без разделения аномеров омыляли и получали аномерную смесь триолов **6**.

Смесь триолов **6** переводили в изомерные 4,6-*O*-бензилиденные производные **7 α** и **7 β** . Индивидуальный α -аномер **7 α** получили с общим выходом 76% в расчете на триол.

Гликозил-акцептор **8** со свободной OH-группой при C-4 был получен из **7 α** (Схема 1) последовательным 3-*O*-ацетилированием и региоизбирательным восстановительным раскрытием бензилиденного цикла под действием комплекса $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{BH}_3$ в присутствии AlCl_3 с общим выходом 78%.

1.2. Исследование стереоконтролирующего влияния ацильных заместителей при *O*-3 и *O*-6 в гликозил-донорах

Исходя из того, что α -гликозилирование малореакционноспособных вторичных спиртов часто протекает с низкой стереоизбирательностью, целесообразно было провести оптимизацию метода построения α -гликозидных связей на примере модельного гликозил-акцептора **8**. Оптимизация базировалась на гипотезе о возможности анхимерного содействия ацильных заместителей из удаленных от аномерного центра положений (Схема 2). В случае *глюко*-конфигурации α -стереонаправляющее содействие могут оказывать ацильные заместители при *O*-3 и *O*-6. Согласно этой гипотезе, после отрыва уходящей группы оксокарбениевый ион может как атаковаться нуклеофилом, так и образовать стабилизированные карбокатионы **B** и/или **C**, нуклеофильная атака которых может происходить только с α -стороны.

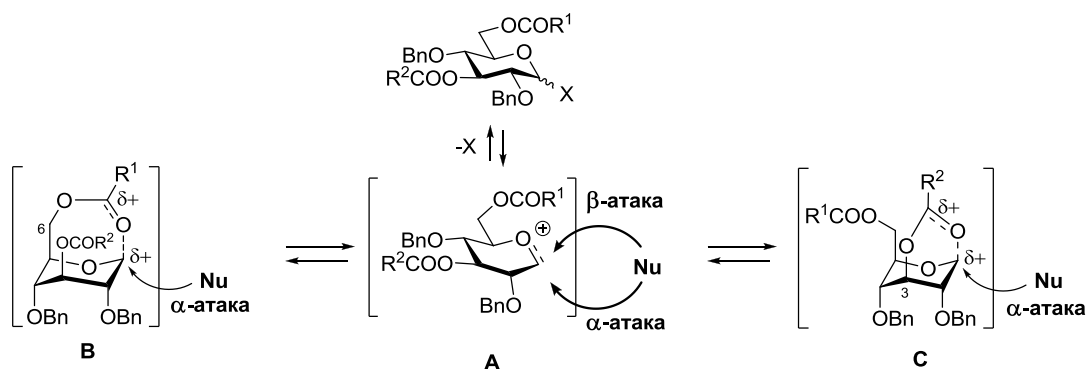


Схема 2. Стабилизация оксокарбениевого иона **A** за счет анхимерного содействия ацильных заместителей при *O*-3 и *O*-6. Nu – нуклеофил.

Прямых доказательств удаленного анхимерного содействия пока не получено. Но опубликовано множество примеров для моносахаридов различной конфигурации,

которые показывают, что реализация механизма с содействием удаленных ацильных заместителей вполне возможна.

Для глюкозы, однако, такие данные немногочисленны и относятся главным образом к влиянию заместителей при О-6. Нами было исследовано гликозилирование акцептора **8** девятью глюкозными донорами, различающимися как типом уходящей группы, так и природой защитных групп (Таблица 1, Схема 3). Так, сполна бензилированный тиогликозид **9a** обеспечивает общий высокий выход продуктов гликозилирования, однако преобладающим является образование β -аномера (опыт 1). При замене бензильной защитной группы при О-6 на бензоильную (донор **9b**, опыт 2) произошло снижение эффективности гликозилирования, хотя реакция протекала α -стереоспецифично. Замена этилтиогруппы в качестве уходящей группы на трихлорацетимидатную (доноры **9c** и **9d**, опыты 3, 4) позволила повысить эффективность расходования гликозил-донора (ср. с результатом опыта 2) при неплохой α -стереоселективности, однако достигнутые выходы $\sim 50\%$ были неудовлетворительными.

Наилучшая эффективность гликозилирования наблюдалась в случае *N*-фенилтрифторацетимидатов, использование которых позволило повысить выходы гликозилирования до $\sim 90\%$. В дальнейшем влияние ацильных защитных групп на стереоселективность гликозилирования изучалось на примере *N*-фенилтрифторацетимидатов. В результате конденсации донора **9f**, несущего ацетильную группу при О-6, образуется аномерная смесь с соотношением $\alpha:\beta=5:1$ (опыт 6), тогда как при использовании полностью бензилированного донора **9e** (опыт 5) образуется смесь со слабым преобладанием α -аномера ($\alpha:\beta=2:1$). При гликозилировании 3-*O*-ацетилованным донором **9h** (опыт 8) α -стереоизбирательность оказалась несколько ниже ($\alpha:\beta=4:1$), чем в случае 6-*O*-ацетилованного донора **9f** ($\alpha:\beta=5:1$). Замена 6-*O*-ацетильной группы на 6-*O*-бензоильную (**9f** \rightarrow **9g**, опыты 6 и 7) повышает α -селективность до 6:1. Наиболее эффективным донором как с точки зрения выхода продуктов гликозилирования, так и α -стереоизбирательности оказался 3,6-диацетат **9i** (опыт 9, $\alpha:\beta=8:1$). Кроме того, как будет видно из дальнейшего изложения, выход реакций гликозилирования с диацелированными донорами в целом выше, чем с 6-*O*-ацелированными производными.

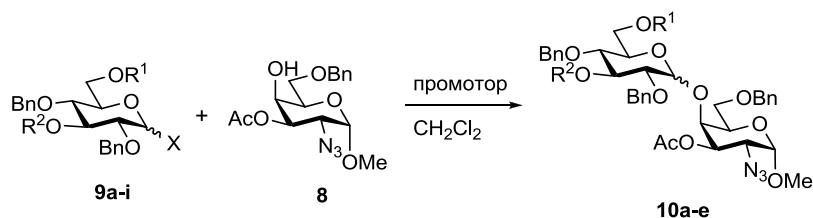


Схема 3. Гликозилирование акцептора **8** донорами **9a-i**.

Таблица 1. Исследование влияния уходящей группы X и ацильных заместителей при O-3 и O-6 в глюкозил-донорах **9a-i** на эффективность и стереоселективность гликозилирования акцептора **8**.

Опыт	Донор (эквив.)	R ¹	R ²	X	Продукт	α:β	Выход (%)
1	9a (1,2)	Bn	Bn	SEt*	10a	2:3	90
2	9b (1,5)	Bz	Bn	SEt*	10b	только α	47**
3	9c (1,1)	Ac	Bn		10c	4:1	48
4	9d (1,1)	Bz	Bn		10b	α>β	50
5	9e (1,4)	Bn	Bn		10a	2:1	95
6	9f (1,1)	Ac	Bn		10c	5:1	90
7	9g (1,1)	Bz	Bn		10b	6:1	84
8	9h (2,0)	Bn	Ac		10d	4:1	90
9	9i (1,2)	Ac	Ac		10e	8:1	96

*В качестве промотора в реакциях с донорами **9a** и **9b** использовался NIS/TfOH во всех остальных случаях AgOTf в присутствии сит AW-300.

** Выход может достигать 74% при добавлении 3-х кратного избытка донора **9b**.

1.3. Исследование порядка построения гликозидных связей в 3,4-разветвлении

Проведя исследование стереоконтролирующего влияния ацильных заместителей, мы вернулись к синтезу 3,4-разветвленного трисахарида, начав со стереоселективного построения α-(1→4)-связи в дисахариде α-**10b**. Это соединение получали гликозилированием акцептора **8** донорами **9b** или **9g** (Схема 4).

В случае **9b** образуется только α-связанный продукт α-**10b**, но реакция протекает малоэффективно и для ее завершения требуется большой избыток исходного **9b**. В то же время, гликозилирование донором **9g** хотя и приводит к смеси α- и β-продуктов, однако расход донора при этом составляет всего 1,1 эквивалента по отношению к

акцептору **8**. В дисахариде **α -10b** удаляли обе ацильные группы, проводили региоселективное бензоилирование первичного гидроксила и получали соединение **11** со свободной OH-группой при C-3. Попытки β -гликозилирования акцептора **11** сполна ацелированными тиоглюкозидом **12a**, бромидом **12b** и трихлорацетимидатом **12c** с использованием различных промотирующих систем не привели к образованию целевого трисахарида **14**. В некоторых случаях был получен ортоэфир **13**, попытка кислотно-катализируемой трансформации которого в целевой трисахарид **14** также не увенчалась успехом.

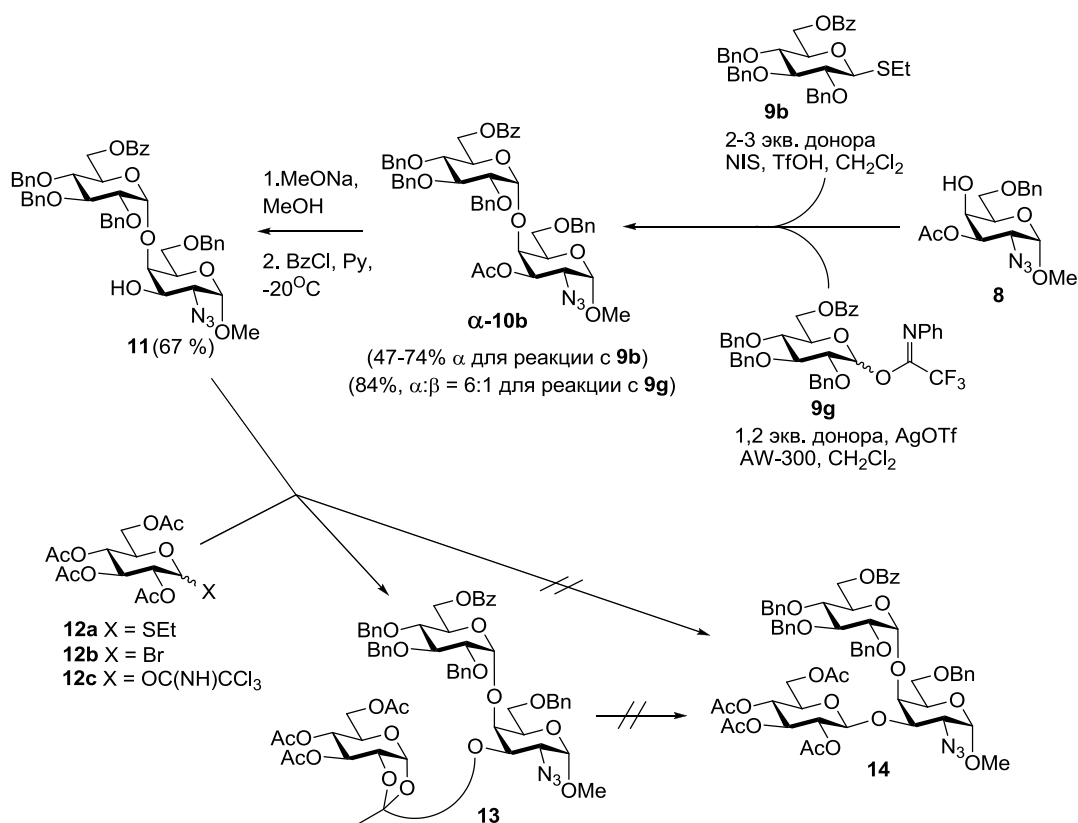


Схема 4. Гликозилирование α -(1 \rightarrow 4)-связанного дисахаридного акцептора **11**.

Итак, схема синтеза вицинально 3,4-разветвленного трисахарида с первоначальным построением α -(1 \rightarrow 4)-связи оказалась неудачной. Вероятно, это связано с присутствием в дисахариде **11** азидной группы при C-2, которая может снижать реакционную способность гидроксильной группы при C-3, а также со стерическими затруднениями, вызванными наличием объемного α -(1 \rightarrow 4)-связанного глюкозного остатка. Поэтому нами была изучена альтернативная схема синтеза трисахарида, включавшая получение β -(1 \rightarrow 3)-связанного дисахаридного акцептора **16** (Схема 5) и последующее α -(1 \rightarrow 4)-гликозилирование. Соединение **16** было получено гликозилированием метилгликозида **7a** имидатом **12c** с последующим

региоселективным раскрытием бензилиденового кольца в полученном дисахариде **15** (82%). Дальнейшее 4-О-гликозилирование дисахарида **16** *N*-фенилтрифторацетимидатом **9i**, содержащим стереонаправляющие ацетильные заместители при О-3 и О-6, при промотировании AgOTf приводило к трисахариду **17** с хорошим выходом (62%). Важно отметить, что донор **9b** оказался неэффективным, так как не образовывал трисахарида **14** при гликозилировании соединения **16**. Учитывая этот результат, в дальнейших синтезах целевых пентасахаридов мы использовали в качестве α -гликозилирующих агентов только *O*-гликозил-*N*-фенилтрифторацетимидаты.

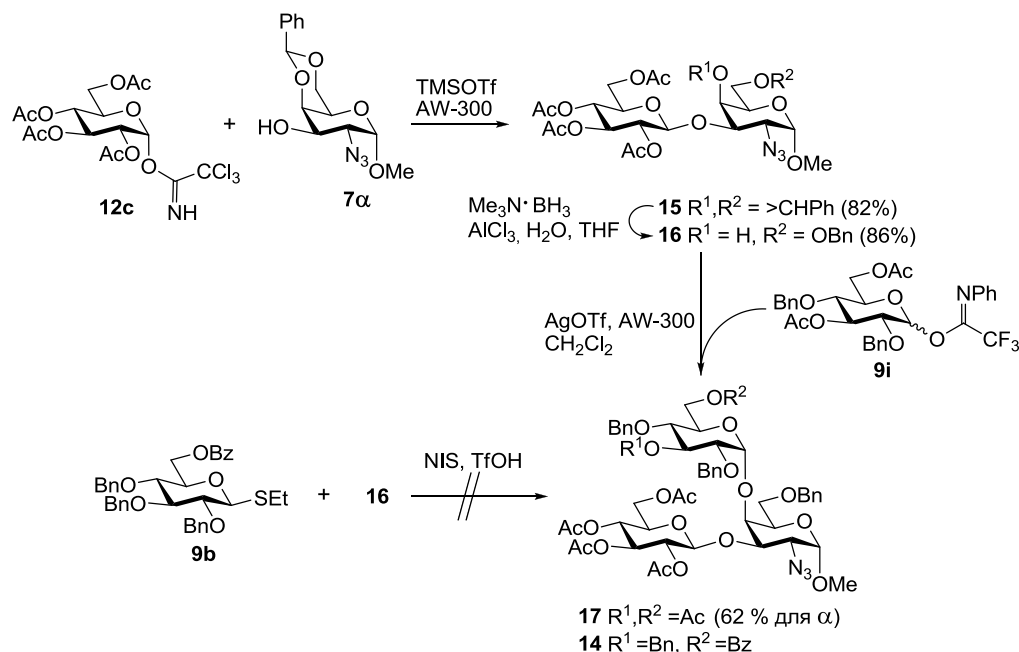


Схема 5. Получение защищенного трисахарида **17**.

Таким образом, на примере получения трисахарида **17** был определен порядок построения гликозидных связей при синтезе 3,4-разветвленного 2-азидо-2-дезоксигалактозного фрагмента, а именно, β -(1 \rightarrow 3)-гликозилирование предшествует α -(1 \rightarrow 4)-гликозилированию.

На следующем этапе работы защищенный трисахарид **17** был превращен в трисахаридные производные **3a-c**, несущие при аминогруппе остатка галактозамина тот же набор ацильных заместителей, что и в целевых пентасахаридах **1** и **2** (Рис. 2). Соединения **3a-c** являются моделями для запланированного исследования углеводной специфичности белка CFTR. При их получении моделировались реакционные условия для трансформации защищенных форм пентасахаридов в целевые структуры **1** и **2**.

Для получения соединений **3a-c** защищенный трисахарид **17** сначала

дезацетилировали, затем образующийся полиол **18** подвергали гидрогенолизу на палладиевом катализаторе с тем, чтобы одновременно восстановить азидную группу и удалить три бензильные группы (Схема 6). Выход трисахарида **19**, содержащего свободную аминогруппу, составил 64%.

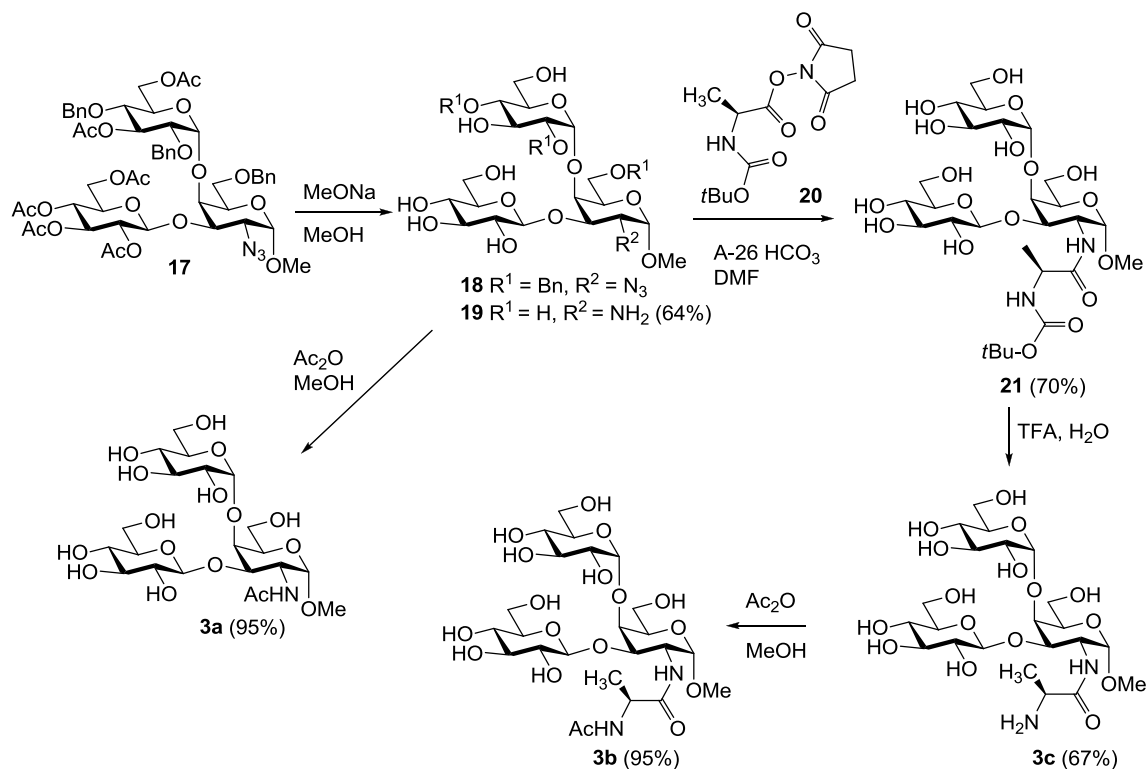


Схема 6. Получение серии N-ацелированных производных **3a-c** амина **19**.

Ацелированием амина **19** уксусным ангидридом в метаноле был получен ацетамид **3a**, а взаимодействие **19** с активированным эфиром *N*-Вос-аланина (**20**) в ДМФА в присутствии ионообменной смолы Amberlyst A-26 (HCO_3^-), использованной в качестве основания, приводило к аланильному производному **21**. *N*-Вос-защитную группу впоследствии удаляли действием водной трифторуксусной кислоты и выделяли аланильное производное **3b** (60% на две стадии). *N*-Ацелированием последнего получали **3b**.

Таким образом, были синтезированы трисахариды **3a-c**, структурно родственные общему разветвленному трисахаридному фрагменту гликоформ **I** и **II**.

2. СИНТЕЗ ПЕНТАСАХАРИДОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ГЛИКОФОРМЕ I

2.1. Ретросинтез

Выбор схемы синтеза пентасахаридных производных гликоформы **I** основывался на результатах ретросинтетического анализа структур соединений **1a-c** (Схема 7). α -

Рамнозилирование является одним из самых надежных видов гликозилирования, поэтому пентасахарид **22** ретросинтетически сводится к тетрасахариду **23** и рамнозилбромиду **24**. Дальнейшее разбиение структуры **23** по α -гликозидным связям приводит к трисахариду **25** и дисахариду **27**.

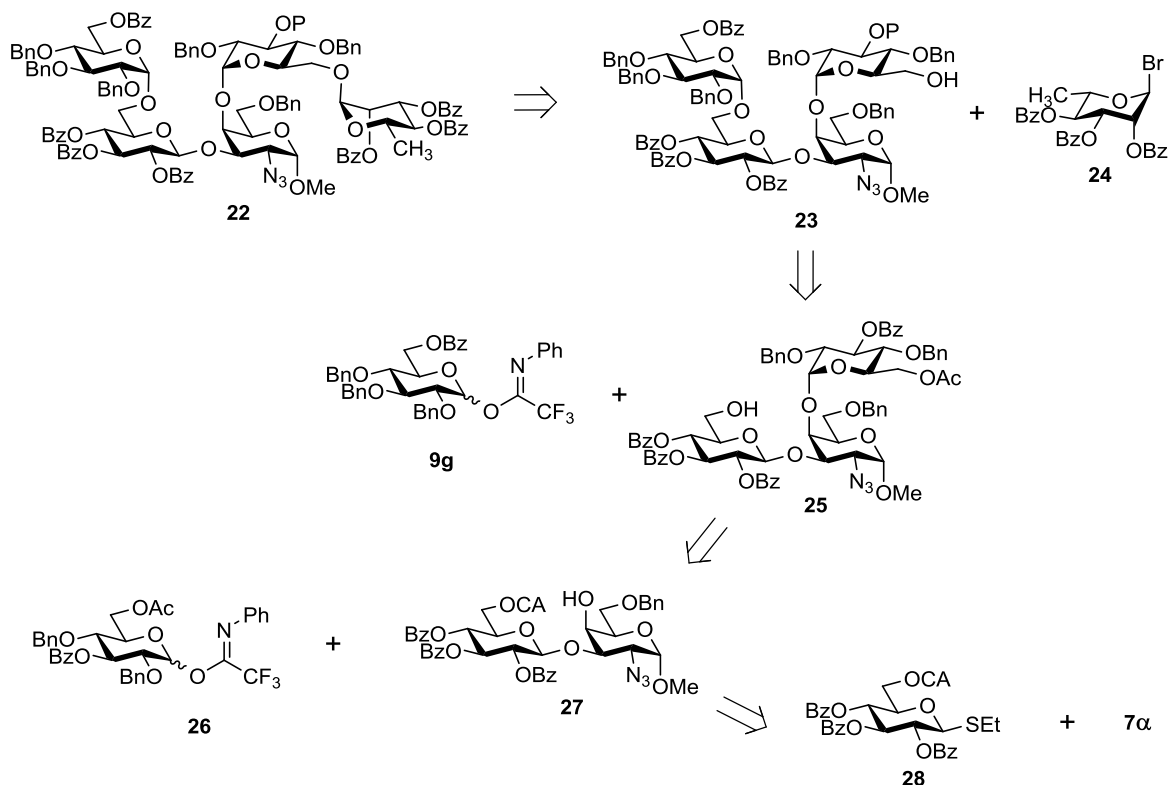


Схема 7. Ретросинтетический анализ гликоформы I.

Важнейшую роль в схеме синтеза пентасахариды **22** играет выбор ацильных защитных групп. С одной стороны, ацильные группы в α -гликозил-донорах являются стереоконтролирующими заместителями, с другой – часть ацильных групп выступает в роли временных защитных групп, которые должны обеспечить своевременное региоселективное высвобождение гидроксильных групп, подлежащих гликозилированию. Чтобы удовлетворить этим требованиям, в синтезе гликоформы I применялись три ацильные защитные группы: бензоильная, ацетильная и монохлорацетильная.

2.2. Синтез α -гликозил-доноров

Синтез различных α -гликозил-доноров, использовавшихся для получения пентасахаридов **1** и **2**, а также в модельных экспериментах по стереоселективному α -гликозилированию (см. раздел 1.2), осуществлялся исходя из 2,3,4,6-тетра- и 2,3,6-три-*O*-бензилированных α -метилгликозидов.

Ацетолизом соединения **29** получали аномерную смесь 1,6-диацетатов **30** (Схема 8). Применение HBF_4 при $+4\text{ }^\circ\text{C}$ для ацетолиза **29** вместо обычно используемого в этой реакции ZnCl_2 позволило увеличить выход продукта **30** до 90%. Полученная смесь диацетатов **30** служила исходным материалом для получения глюкозных доноров **9f** и **9g**.

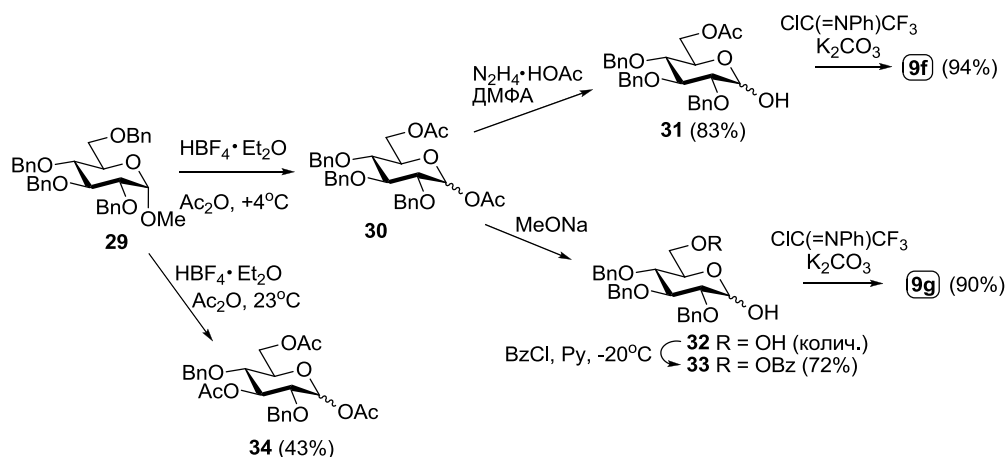


Схема 8. Синтез глюкозил-доноров **9f** и **9g** из метил-2,3,4,6-тетра-*O*-бензил- α -D-глюкопиранозида **29**.

Донор **9f**, несущий 6-*O*-ацетильную группу, получали из диацетата **30** путем региоселективного аномерного *O*-деацетилирования и последующего взаимодействия полуацетала **31** с *N*-фенилтрифторацетимидоилхлоридом в присутствии карбоната калия. Удалив обе ацетильные группы метанолизом в присутствии MeONa , **30** превращали в диол **32**, в котором селективно бензоилировали первичный гидроксил. В результате получали полуацеталь **33** с выходом 72%; обработка последнего *N*-фенилтрифторацетимидоилхлоридом привела к 6-*O*-бензоилированному донору **9g**. При проведении ацетолиза в присутствии HBF_4 при комнатной температуре с выходом $\sim 45\%$ удастся выделить триацетат **34**, который, однако, может содержать неотделимую примесь продукта более глубокого ацетолиза бензильных групп. Наличие свободного гидроксила при С-3 в известном соединении **35**, получающемся в одну стадию из α -метилглюкозида, дает возможность синтезировать различные 3-*O*-ацилированные глюкозные доноры, в частности, доноры **26**, **9i** и **9h** (Схема 9).

Бензоилирование **35** приводит к соединению **36**, которое по описанной выше реакции ацетолиза в присутствии HBF_4 было превращено 1,6-диацетат **37**. Из последнего в две стадии был получен донор **26**, несущий постоянную бензоильную защитную группу при *O*-3 и временную ацетильную – при *O*-6. С другой стороны, ацетолиз соединения **35** приводит непосредственно к триацетату **34** с высоким выходом

90%. Из триацетата **34** в две стадии получают донор **9i**, несущий две ацетильные стереонаправляющие группы при О-3 и О-6. Как уже упоминалось выше, диацелированные доноры обеспечивают более высокие выходы гликозилирования, чем моноацелированные, поэтому доноры **26** и **9i** являются предпочтительными при синтезе α -гликозидов. Последовательные гидролиз 3-О-ацелированного метилгликозида **40**, ацелирование получившейся смеси продуктов гидролиза, содержащей 3-О-деацелированный полуацеталь, региоселективное удаление аномерного ацетата и ацелирование продукта **41** *N*-фенилтрифторацетимидохлоридом позволили получить 3-О-ацелированный донор **9h**, который использовался в исследованиях стереоконтролирующего влияния ацильных заместителей (раздел 1.2).

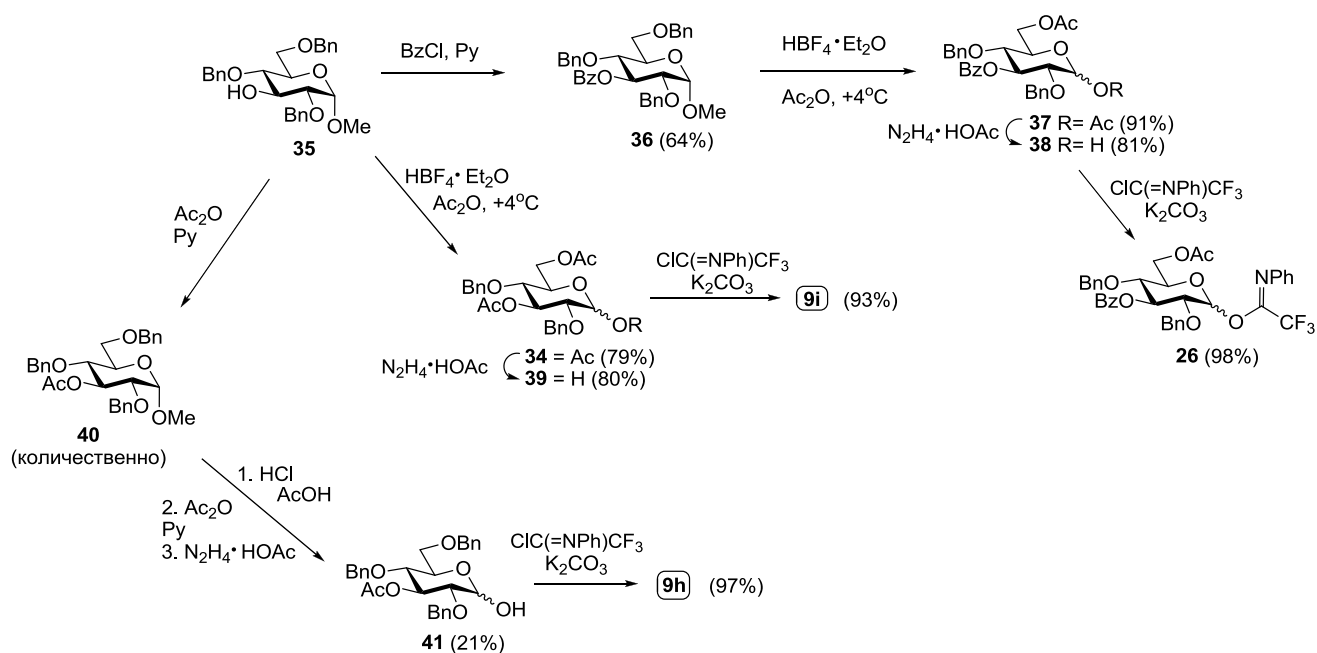


Схема 9. Синтез гликозил-доноров **26**, **9i**, **9h** из метил-2,4,6-три-*O*-бензил- α -D-глюкопиранозида **35**.

2.3. Синтез углеводной цепи гликоформы I

Первой стадией синтеза углеводной цепи гликоформы **I** было гликозилирование 3-ОН-группы акцептора **7a** гликозил-донором **28**, которое проводили, используя в качестве промотора смесь NIS и TfOH (Схема 10). Присутствие монохлорацетильной защитной группы при О-6 глюкозного остатка в полученном дисахариде **42** позволило в дальнейшем региоизбирательно высвободить 6-ОН-группу, не затрагивая другие ацильные группы.

Бензилиденовый цикл в **42** селективно раскрывали действием комплекса $H_3B \cdot NMe_3$ в присутствии $AlCl_3$ и воды с образованием дисахаридного акцептора **27** со

свободной ОН-группой при С-4 в остатке 2-азидогалактозы (76%). Стереозизбирательным α -гликозилированием этого соединения гликозил-донором **26** получали аномерную смесь трисахаридов, из которой требуемый α -изомер **43** был выделен с выходом 75%.

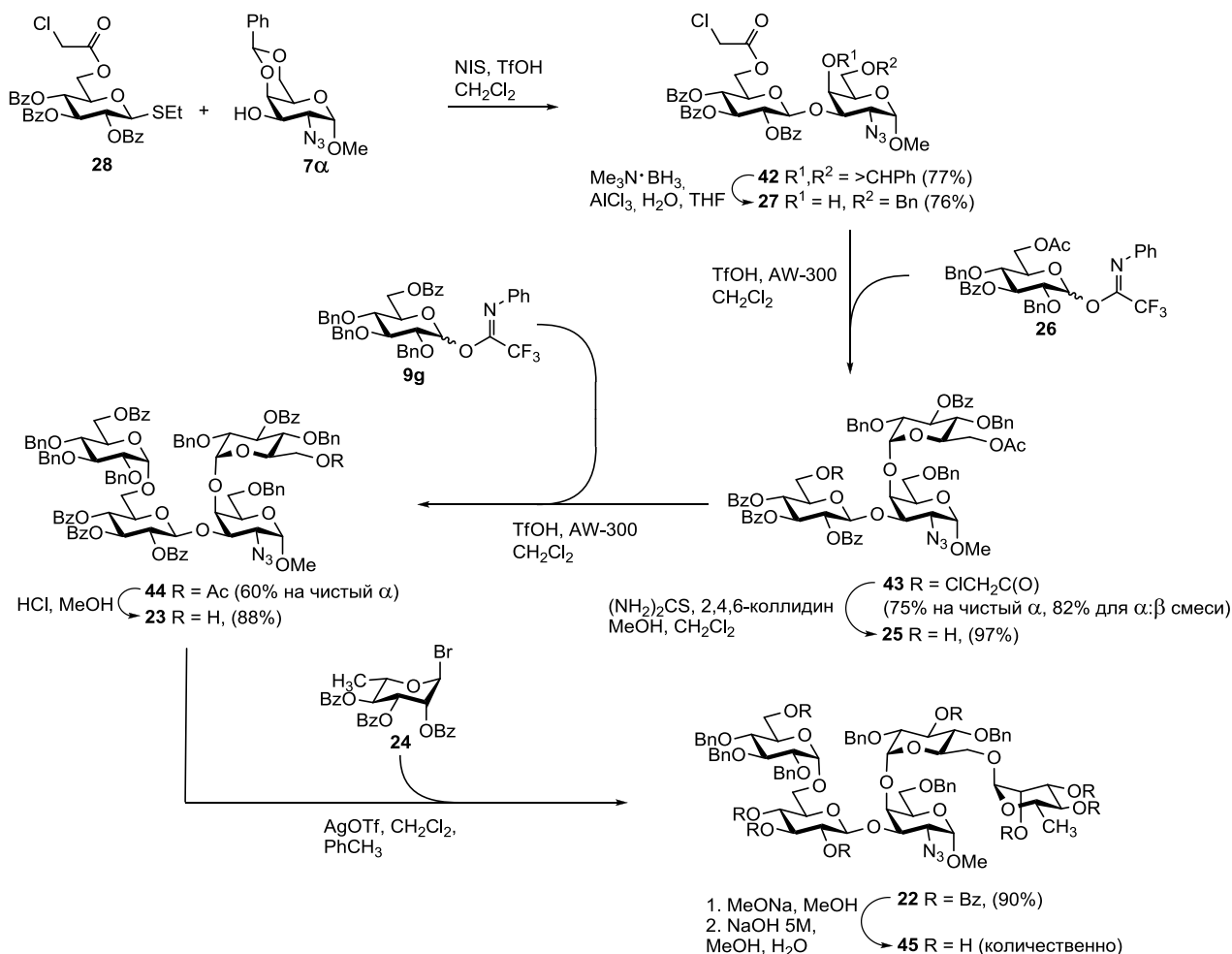


Схема 10. Синтез защищенного пентасахарида **22**, отвечающего гликоформе **I**.

Субстрат для второго α -гликозилирования, акцептор **25**, получали с почти количественным выходом из **43** удалением монохлорацетильной защитной группы действием тиомочевины в присутствии 2,4,6-коллидина. Трисахаридный акцептор **25** α -гликозилировали донором **9g**, содержащим бензоильную содействующую группу при О-6. После высокоэффективной жидкостной хроматографии чистый α -тетрасахарид **44** был выделен с выходом 60%. В этом соединении ацетильную группу в α -(1 \rightarrow 4)-связанном глюкозном остатке далее удаляли в помощь мягкого кислотного метанолиза и получали тетрасахаридный акцептор **23**. На заключительной стадии сборки пентасахаридной цепи проводили рамнозилирование **23** бромидом **24** в присутствии трифлата серебра и получали пентасахарид **22** с выходом 90%.

2.4. Восстановление азидной группы и удаление бензильных защитных групп

Для синтеза целевых пентасахаридных производных гликоформы **I** предстояло удалить бензоильные и бензильные защитные группы, а также провести восстановление азидогруппы в амин и его функционализацию.

На первом этапе защищенный пентасахарид **22** дебензоилировали метилатом натрия в метаноле. Часть бензоильных групп, преимущественно в остатке рамнозы, при этой обработке оставалась незатронутой; для завершения дебензоилирования потребовалась более жесткая обработка гидроксидом натрия (Схема 10).

Поскольку на примере получения трисахаридного амина **19** из бензилированного азиды **18** было показано, что каталитический гидрогенолиз позволяет в принципе провести одновременное дебензилирование и восстановление азиды в субстратах синтезируемого типа, мы попытались применить этот подход и для получения конечных соединений с углеводной цепью гликоформы **I**. Пентасахарид **45** содержит по сравнению с трисахаридом **18** (Схема 6) вдвое больше бензильных групп, подлежащих удалению. По-видимому, по этой причине, а также вследствие усложнения структуры субстрата, гидрогенолиз соединения **45** в метаноле в присутствии $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ протекал с образованием смеси продуктов, в которой целевой дебензилированный амин практически отсутствовал. Известно, что образующийся в ходе реакции амин способен отравлять палладиевый катализатор, снижая эффективность дебензилирования. В кислых условиях гидрогенолиз завершился через 7 суток, а единственным выделенным соединением являлся диметиламин **46** (Схема 11). Вероятно, его образование происходило в результате восстановительного метилирования получающегося в ходе гидрогенолиза амина формальдегидом, часто присутствующим в следовых количествах в метаноле. Образование продуктов N-метилирования в результате длительного гидрогенолиза олигосахаридных азидов в метаноле описано в литературе.

Из-за трудностей, связанных с получением дебензилированного амина путем гидрогенолиза азиды **45**, стадии восстановления и дебензилирования было решено проводить последовательно. В качестве реагента для восстановления азидной группы первоначально использовался сероводород. Восстановление соединения **45** сероводородом в пиридине не происходило, вероятно, из-за недостаточной ионизирующей способности этой среды. Для увеличения ионизирующей способности растворителя пиридин был заменен на смесь ТГФ–триэтиламин–вода. В этих условиях

восстановление азидной группы протекало в течение нескольких часов. Однако из-за необходимости постоянного барботирования сероводорода в реакционной смеси за время реакции накапливалось большое количество серосодержащих примесей – вероятно, полисульфидов. Отделить гидрофильный продукт восстановления **47** от этих примесей, также обладавших хорошей растворимостью в воде, не представлялось возможным. При переходе к смеси растворителей ацетонитрил – вода – диизопропиламин время реакции восстановления сокращалось до нескольких минут, результатом чего стало резкое уменьшение количества серосодержащих примесей. Полученный в этих условиях амин **47** без предварительной очистки N-ацетилировали и получали соответствующий ацетамид. Этот продукт все же содержал некоторое количество серосодержащих примесей, которые значительно снижали эффективность последующего гидрогенолитического дебензилирования. По этой причине соединение **1a** с ацетамидной группой при С-2 было выделено с выходом всего 55% на три стадии.

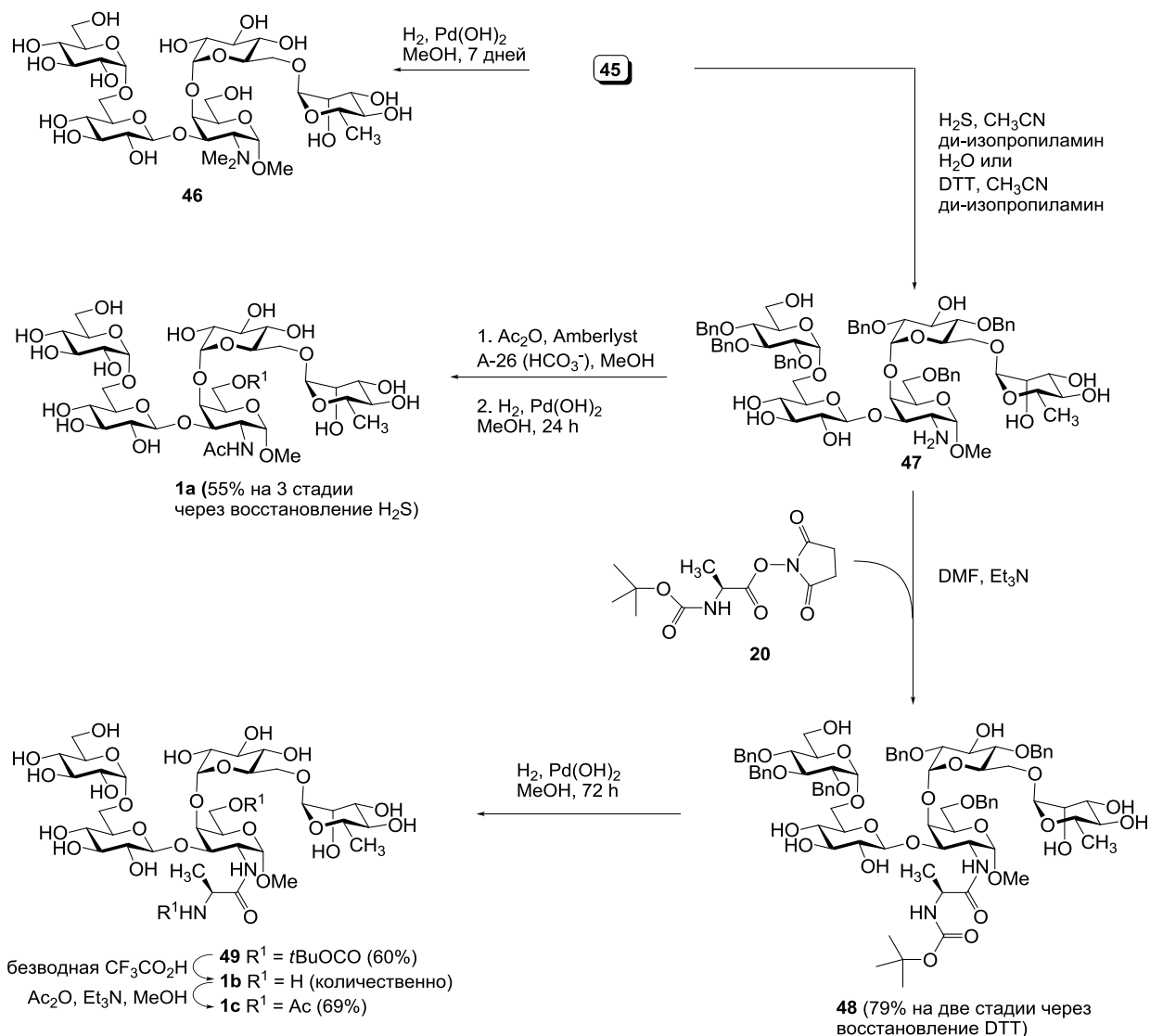


Схема 11. Получение целевых производных пентасахарида, отвечающего гликоформе **I**.

Из-за проблем с очисткой продуктов от полисульфидных примесей, образующихся в реакции восстановления сероводородом, был изучен другой SH-восстановитель, дитиотреитол (DTT). Кроме того, что DTT известен как хороший восстановитель дисульфидных связей, он также применялся для восстановления моно- и дисахаридных азидов в работах по твердофазному синтезу гликопептидов. В дихлорметане в присутствии диизопропилэтиламина как основания, восстановление защищенного азида **22** не происходило. В результате ряда модельных экспериментов выяснилось, что DTT в водном ацетонитриле в присутствии диизопропиламина гладко восстанавливает азидные группы в моно- и олигосахаридах с образованием соответствующих аминов. Кроме того, по сравнению с сероводородом DTT обладает двумя преимуществами в реакциях восстановления: во-первых, он может быть использован в относительно небольшом (100%) избытке (восстановление сероводородом требует постоянного барботирования), во-вторых, как сам DTT, так и его окисленная форма легко идентифицируются в реакционных смесях методом ТСХ и могут быть отделены от целевых продуктов колоночной хроматографией на силикагеле. Оба этих обстоятельства существенно облегчают очистку продуктов восстановления.

Восстановление азида **45** DTT в смеси ацетонитрил–вода в присутствии диизопропиламина без осложнений приводило к амину **47**, который ацилировали активированным эфиром *N*-Вос-аланина **20** и получали *N*-аланильное производное **48** с выходом 79% на две стадии. В результате гидрогенолиза полностью дебензилированный продукт **49** выделяли с выходом 60%. Наилучший выход при удалении *N*-Вос-защитной группы с аминогруппы аланина достигался обработкой тщательно высушенного **49** безводной трифторуксусной кислотой. В результате амин **1b** был получен с количественным выходом. Наконец, взаимодействием **1b** с уксусным ангидридом в метаноле в присутствии триэтиламина был синтезирован ацетамид **1c**. Таким образом, были синтезированы пентасахариды **1a-c**, отвечающие гликоформе **I** внешней области коры *Pseudomonas aeruginosa*.

3. СИНТЕЗ ПЕНТАСАХАРИДОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ГЛИКОФОРМЕ II

3.1. Ретросинтез

Углеводная цепь гликоформы **II** в дополнение к особенностям строения, присущим гликоформе **I**, имеет еще 3,6-разветвление в β-связанном остатке глюкозы. С

учетом наличия в структуре 3,6-разветвления, а также с учетом определенного ранее порядка гликозилирования вицинальных гидроксильных групп 2-азидо-2-дезоксигалактозида, ретросинтетический анализ показывает, что ключевым соединением в процессе сборки пентасахаридной последовательности является трисахарид α -Rha-(1 \rightarrow 3)- β -Glc-(1 \rightarrow 3)- α -GalN₃ **51** (Схема 12), из которого двумя последовательными α -гликозилированиями донорами **9g** и **9i** можно получить защищенный пентасахаридный предшественник **50** целевых соединений, отвечающих гликоформе **II**.

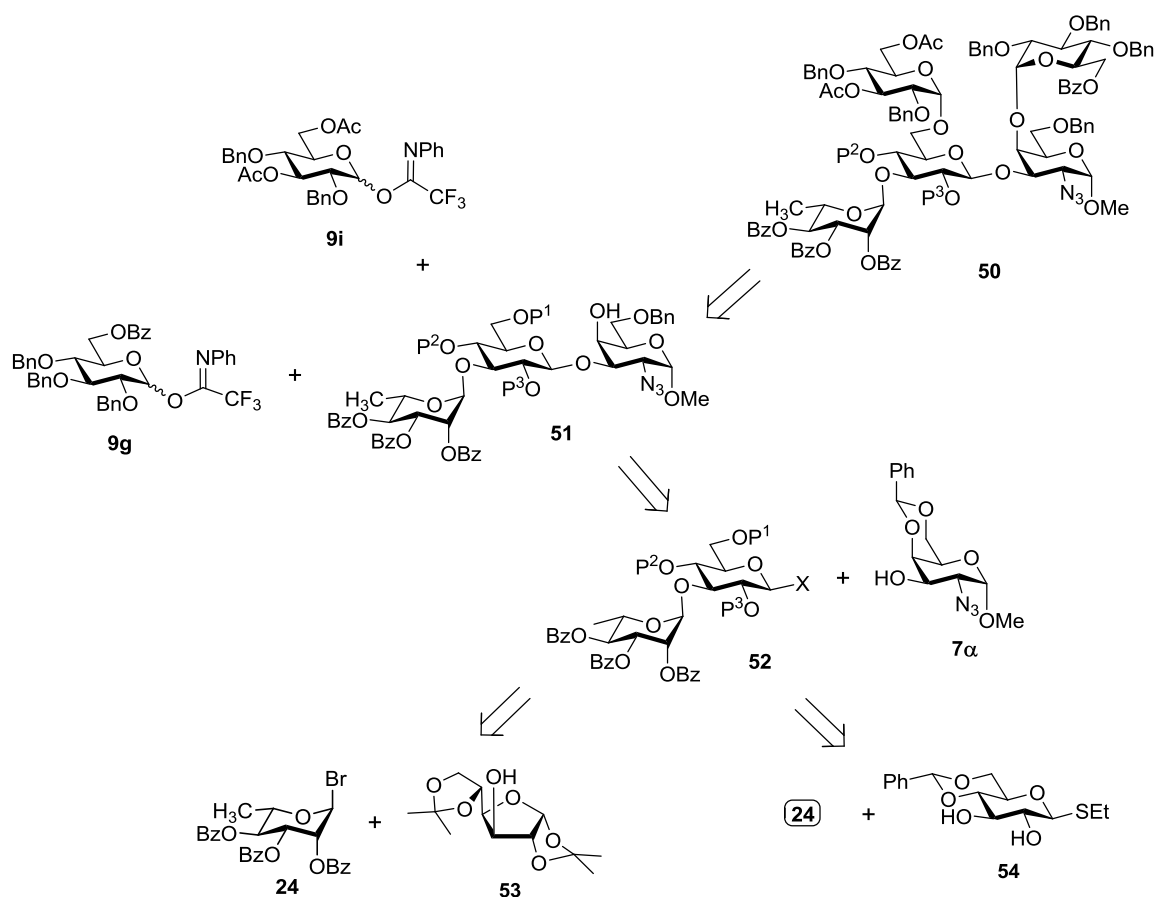


Схема 12. Ретросинтетический анализ гликоформы **II**.

3.2. Синтез олигосахаридов, отвечающих гликоформе **II**

В качестве гликозил-акцептора для создания рамнозил- α -(1 \rightarrow 3)-глюкозного блока **52** первоначально использовалась диацетонглюкоза **53**. Однако полученные таким образом дисахаридные гликозил-доноры **52** давали при гликозилировании акцептора **7 α** трисахаридное производное типа **51** с невысокими выходами.

Гораздо более эффективным оказалось использование вместо диацетонглюкозы диола **54**. Его взаимодействие с бромидом **24** приводит к продукту 3-О-

рамнозилирования **55** с выходом 66%. Чтобы иметь возможность дальнейшего дифференцирования гидроксильных групп при С-2 и С-6, 2-ОН-группу в **55** бензоилировали. Бензилиденновый цикл дисахарида **56** региоселективно раскрывали обработкой $\text{THF}\cdot\text{BH}_3$ и Bu_2BOTf , что приводило к образованию 4-О-бензилированного продукта со свободным гидроксилом при С-6. 6-ОН-группу в соединении **57** защищали временной ацетильной защитной группой и получали необходимый дисахаридный донор **58**. При гликозилировании этим соединением акцептора **7a** был получен трисахарид **59** с выходом 72%. Обработка последнего $\text{H}_3\text{B}\cdot\text{NMe}_3$ и AlCl_3 приводила к региоселективному раскрытию бензилиденнового цикла с образованием акцептора **60**, соответствующего трисахариду **51**. Отметим, что замена реагентов восстановительного раскрытия бензилиденной группы – $\text{THF}\cdot\text{BH}_3$, Bu_2BOTf в случае **56** и $\text{H}_3\text{B}\cdot\text{NMe}_3$, AlCl_3 в случае **59** позволяет практически полностью изменить регионаправленность реакции.

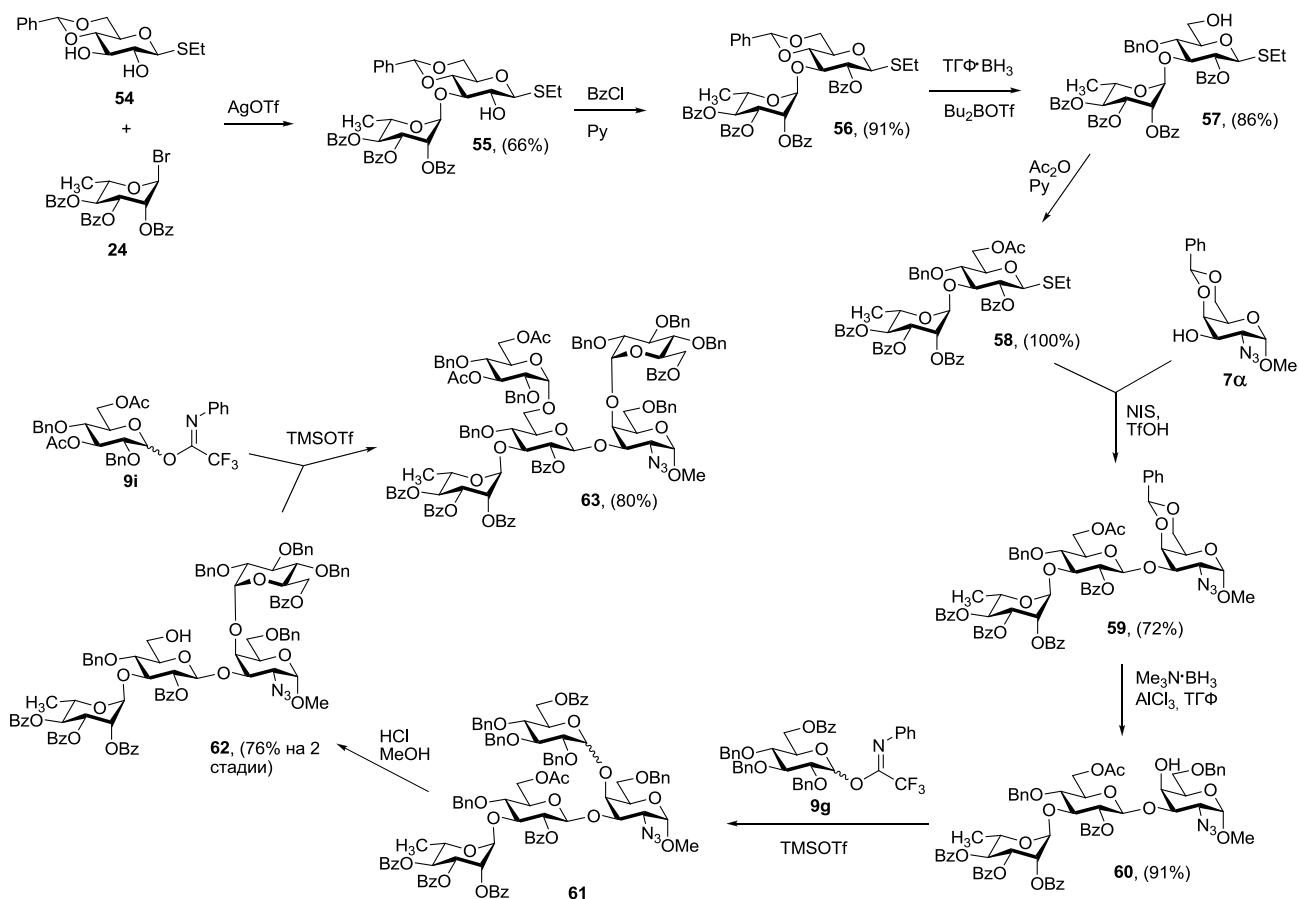


Схема 13. Получение защищенного предшественника **63** гликоформы **II**.

Для завершения сборки углеводной цепи пентасахарида, отвечающего гликоформе **II**, необходимо было присоединить два остатка α -глюкозы к трисахариду **60**. Несмотря на то, что предложенные нами гликозилирующие агенты обеспечивали высокую степень α -стереоселективности, двойное α -глюкозилирование трисахаридного

акцептора с гидроксильными группами при С-4 азидогалактозы и С-6 глюкозы могло бы привести к трудноразделимой смеси четырех стереоизомерных пентасахаридов.

Поэтому стадии α -гликозилирования проводили последовательно. Сначала трисахарид **60** α -гликозилировали 6-*O*-бензоилированным донором **9g**, в результате чего получали аномерную смесь тетрасахаридов **61**. Эту смесь после грубой очистки от побочных продуктов гликозилирования, без разделения аномеров, *O*-дезацетилировали действием HCl в метаноле. Отделение примеси β -изомера на этой стадии позволило получить чистый α -аномер **62** с выходом 76% на две стадии. Завершающее α -гликозилирование **62** проводили с использованием 3,6-ди-*O*-ацетилизованного донора **9i** и получали целевой пентасахарид **63**, отвечающий гликоформе **II**, с выходом 80%.

Удаление защитных групп, восстановление азидной группы и функционализацию аминогруппы проводили (Схема 14) так же как и для соединений **1a-c**, отвечающих структуре гликоформы **I**. Бензоильные группы в защищенном пентасахариде **63** удаляли обработкой метилатом натрия в метаноле и получали полиол **64**, в котором восстанавливали азидную группу действием ДТТ в водном

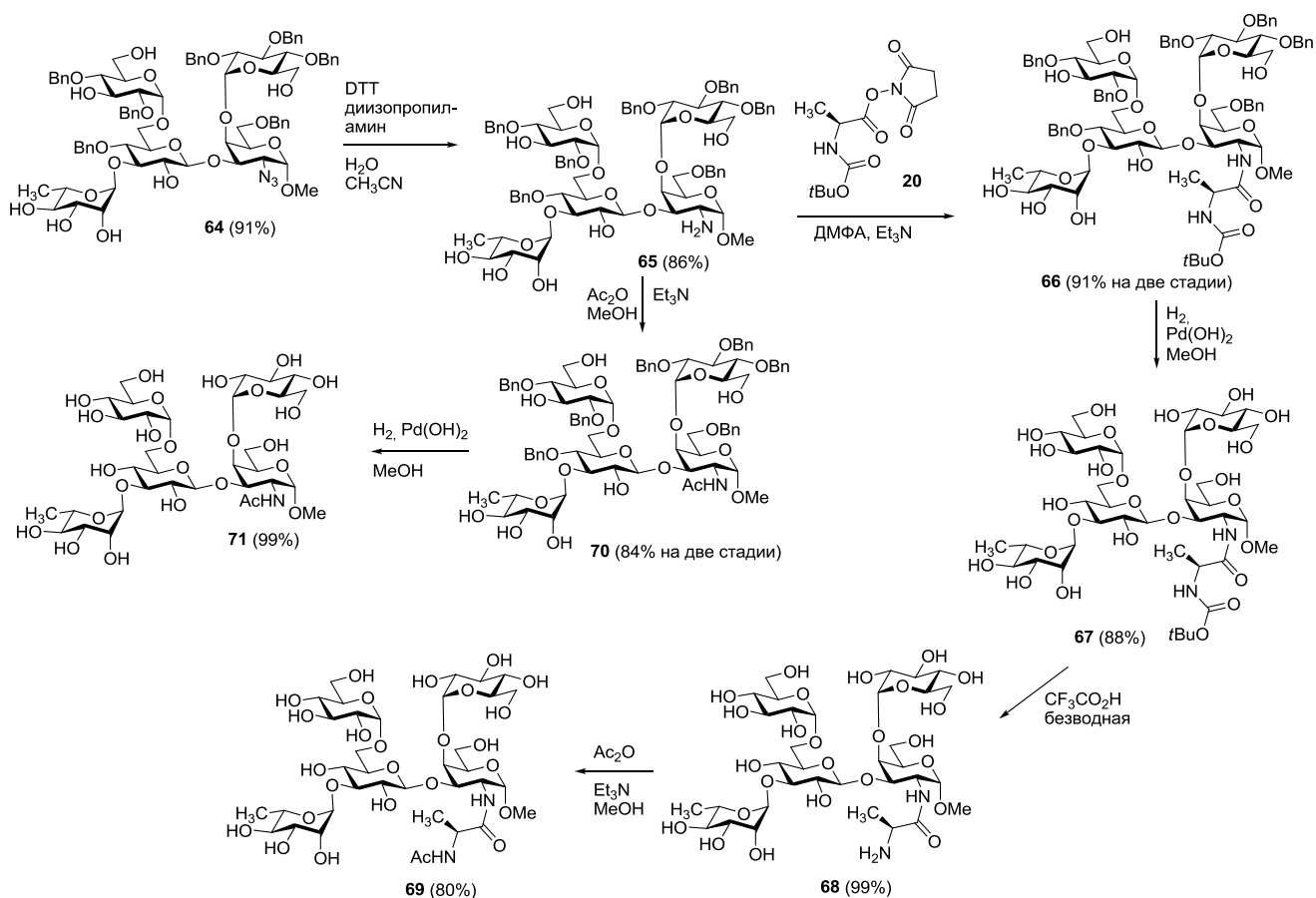


Схема 14. Получение целевых производных пентасахаридов, отвечающего гликоформе **II**.

ацетонитриле в присутствии диизопропиламина. Амин **65** был выделен в индивидуальном состоянии с выходом 86% и охарактеризован, но для практических целей это соединение использовали в последующих стадиях без предварительной очистки. N-Ацетилированием амина **65** получали ацетамид **70** с выходом 84%, считая на азид **64**. Удаление бензильных групп в ацетамиде **70** каталитическим гидрогенолизом количественно приводило к первому целевому соединению **71**. Взаимодействием **65** с активированным эфиром *N*-Вос-аланина **20** получали аланилированное производное **66** с выходом 91% в расчете на азид **64**. Каталитический гидрогенолиз **66** приводил с выходом 88% к дебензилированному пентасахариду **67**, в котором *N*-Вос-защитную группу в остатке аланина удаляли действием безводной трифторуксусной кислоты. Второй целевой пентасахарид **68** был получен с количественным выходом. Часть этого соединения N-ацетилированием превращали в третий целевой пентасахарид **69**.

ВЫВОДЫ

1. Впервые синтезированы α -метилгликозиды пентасахаридов, отвечающие гликоформам **I** и **II** внешней области кора липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa*, и их производные, содержащие *N*-ацетилаланильный и *N*-ацетильный заместители вместо *N*-аланильного остатка.
2. В результате исследования стереоконтролирующих свойств ацильных защитных групп при О-3 и О-6 в глюкозил-донорах различных типов показано, что глюкозил-*N*-фенилтрифторацетимидаты, несущие ацильные заместители при О-3, О-6 или одновременно при О-3 и О-6 позволяют эффективно α -глюкозилировать как вторичные, так и первичные гликозил-акцепторы.
3. Найдены условия эффективного препаративного восстановления азидной группы дитиотреитолом в бензилированных олигосахаридах сложного строения.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. В. Komarova, Yu. Tsvetkov, Yu. Knirel, U. Zähringer, G. Pier, N. Nifantiev. Synthesis of a common trisaccharide fragment of glycoforms of the outer core region of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide // *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, p. 3583–3587.
2. N. Ustuzhanina, В. Komarova, N. Zlotina, V. Krylov, A. Gerbst, Yu. Tsvetkov, N.

- Nifantiev. Stereoselective α -Glycosylation with 3-O-Acylated D-*gluco* Donors // *Synlett*, 2006, p. 921-923.
3. B. Komarova, Yu. Tsvetkov, G. Pier, N. Nifantiev. First Synthesis of Pentasaccharide Glycoform I of the Outer Core Region of the *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide // *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, p. 8411–8421.
 4. B.S. Komarova, Y.E. Tsvetkov, G.B. Pier, Y.A. Knirel, U. Zähringer, N.E. Nifantiev. Investigation of the synthesis of glycoform II of the outer core region of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide // the Carbohydrate Workshop, Borstel, Germany, March, 2004, Book of abstracts, 2004, p. 49.
 5. B. Komarova, Y. Tsvetkov, G. Pier, Y. Knirel, U. Zähringer, N. Nifantiev. Synthesis of the common trisaccharide fragment of two glycoforms of the outer core region of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide // XVIII International Symposium on Glycoconjugates “Glyco XVIII”, Firenze, Italy, September 4-9, 2005, *Glycoconjugate J.*, 2005, Vol. 22, p. 254, P056.
 6. Н. Устюжанина, Б. Комарова, В. Крылов, Н. Злотина, З. Каськова, А. Гербст, Ю. Цветков, Н. Нифантьев. Удаленное содействие как эффективный инструмент стереоконтроля в синтезе олигосахаридов // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Москва, 23-28 сентября 2007. Устный доклад. Сборник тезисов докладов, том V, М., 2007, с. 157.
 7. B. Komarova, Yu. Tsvetkov, G. Pier, N. Nifantiev. Synthesis of Pentasaccharide methyl α -Glycosides of the Outer Core Region of Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* // 4th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates - 4th BMMC, Hyttiäälä, Finland, 19-22 September 2010, Book of Abstracts, 2010, p. 25.