

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



На правах рукописи

Григорук

КРЫЛОВ ВАДИМ БОРИСОВИЧ

**СИНТЕЗ СПОЛНА СУЛЬФАТИРОВАННЫХ
ОЛИГОСАХАРИДОВ, РОДСТВЕННЫХ ПРИРОДНЫМ
ПОЛИСАХАРИДАМ ФУКОИДАНАМ**

02.00.03 – органическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва

2010

- 2 ДЕК 2010

Работа выполнена в лаборатории химии гликоконъюгатов (№52)

Института органической химии имени Н.Д. Зелинского

Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук Устюжанина Надежда Евгеньевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук Яков Васильевич Возный

доктор химических наук Евгения Николаевна Олсуфьева

Ведущая организация:

Химический факультет Московского государственного университета

им. М.В. Ломоносова

Защита состоится 30 ноября 2010 года в 11 часов 30 минут 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 «20» октября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного

совета Д 002.222.01

доктор химических наук



Родиновская Л. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Сульфатированные полисахариды играют важную роль в организме млекопитающих благодаря их способности образовывать прочные ионные контакты с различными белковыми рецепторами. Например, полианионные гликозаминогликаны (ГАГ) участвуют в таких физиологических процессах, как свертывание крови, развитие воспаления, ангиогенез, адгезия клеток, распознавание вирусами клеток хозяина и других.

Среди практически доступных природных полисахаридов значительный интерес вызывают фукоиданы из бурых водорослей благодаря их способности воздействовать на широкий ряд физиологических процессов в организме млекопитающих. По-видимому, отдельные участки полисульфатированных цепей фукоиданов способны выступать в качестве миметиков природных лигандов белковых рецепторов (в том числе лигандов относящихся к ГАГ), обуславливая тем самым, например, противовоспалительную активность, оказывая антикоагулянтное и антиангиогенное действие, блокируя бактериальную и вирусную адгезию.

Цепи фукоиданов построены преимущественно из остатков α -L-фукопиранозы и могут содержать сульфатные и ацетильные группы, а также различные углеводные заместители (остатки глюкуроновой кислоты, ксилозы, маннозы). Важнейшей характеристикой фукоиданов, определяющей спектр проявляемой биологической активности, является степень сульфатирования, среднее значение которой чаще всего лежит в пределах от 0,5 до 1,5 сульфатных групп на фукозный остаток. Показано, что фукоиданы с высокой степенью сульфатирования проявляют антикоагулянтную активность, по величине сравнимую с действием гепарина. В связи с этим разработка эффективных схем синтеза олигосахаридов, отвечающих крупным высокосульфатированным фрагментам фукоиданов, представляется актуальной задачей. Синтетические олигосахариды являются ценными модельными соединениями для выявления взаимосвязи структуры и свойств этих полисахаридов. Кроме того, их спектральные (ЯМР) данные необходимы для конформационного анализа углеводных цепей фукоиданов, а биохимические исследования позволят определить структурные мотивы, ответственные за физиологическую активность. Химический синтез крупных высокосульфатированных фрагментов фукоиданов является нетривиальной задачей. Так, исчерпывающее сульфатирование олигофукозидов, содержащих более двух углеводных остатков, весьма затруднительно, что связано с недостаточной полнотой прохождения реакции при использовании стандартных методов сульфатирования.

Целью работы является разработка эффективного метода исчерпывающего сульфатирования полигидроксильных соединений и его применение для синтеза серии крупных сполна сульфатированных олигофукозидов, включающих основные структурные типы природных цепей фукоиданов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые проведен синтез 10 сполна сульфатированных олигосахаридов, соответствующих основным структурным типам природных цепей фукоиданов. Данные соединения являются ценными моделями для структурных, конформационных и биохимических исследований. Для их получения разработана эффективная схема блочного синтеза с использованием тиоэтильных гликозил-доноров, позволившая впервые синтезировать такие крупные фрагменты фукоиданов, как додека- и гексадекасахариды.

Разработан метод исчерпывающего сульфатирования полиолов в присутствии сильных протонных кислот и продемонстрирована его эффективность на примере превращения широкого ряда олигофукозидов (от ди- до гексадекасахаридов). Изучено влияние природы промотирующей кислоты, а также исследована неизвестная ранее реакция изомеризации пиранозидов в фуранозиды.

Публикация и апробация работы. По результатам диссертации опубликованы 3 статьи, 1 обзор. Отдельные части работы были представлены на 4-ой Балтийской конференции по бактериальным углеводам «4-th ВММС» (Финляндия, Хинтиээле), всероссийской конференции по органической химии, посвященной 75-летию со дня основания Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, 2009), 15-ом Европейском углеводном симпозиуме «EuroCarb2009» (Австрия, Вена, 2009), VII-ом Всероссийской научной конференции «Химия и медицина, Орхимед-2009» (Уфа, 2009), VI Международном конгрессе молодых ученых «YoungChem 2009» (Польша, Краков, 2008).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, посвященного синтезу низкомолекулярных углеводных миметиков гепарина, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитированной литературы. Общий объем диссертации 119 страниц, библиография 97 ссылок.

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. Целевые соединения. В данной диссертационной работе выбор целевых соединений основывался на литературных данных о структуре фукоиданов. Различают несколько типов главных цепей этих полисахаридов. Так, например, в фукоиданах из водорослей *Laminaria saccharina*, *Chorda filum*, *Cladosiphon okamuranus* главная цепь построена из (1→3)-связанных α -L-фукопиранозных остатков (Рис. 1, тип I). Для фукоиданов из водорослей *Fucus vesiculosus*, *F. evanescens*, *F. distichus*, *Ascophyllum nodosum* характерна цепь, состоящая из чередующихся (1→3)- и (1→4)-связанных α -L-фукопиранозных остатков (тип II). Углеводная цепь, построенная из γ -гомо-(1→4)-связанных α -L-фукопиранозных остатков (тип III), была установлена для фукансульфата из морского ежа *Arbacia lixula*. Также сообщалось об обнаружении такого структурного мотива в фукоидане из *L. cichorioides*.

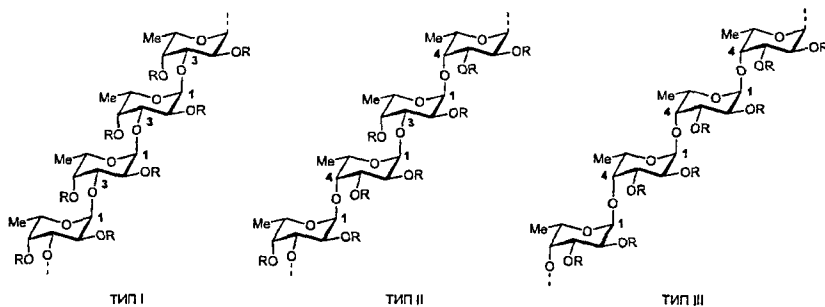


Рисунок 1. Основные типы главных цепей фукоиданов из бурых водорослей.
R = H, SO₃⁻; Ac; Fuc, GlcA, Man, Xyl, Gal.

Наличие заместителей у атомов кислорода главной цепи существенно увеличивает разнообразие структурных мотивов фукоиданов, маскируя при этом ее регулярность. Заместители могут быть как неуглеводные (в основном, сульфат и ацетат), так и углеводные. Это, например, (1→2)-связанные остатки фукозы, как в фукоидане из *L. saccharina* (Рис. 2 А), (1→2)-связанные остатки глюкуроновой кислоты, как в фукоидане из *C. okamuranus* (Рис. 2 Б), а также остатки маннозы, ксилозы, галактозы и другие.

Целевые олигосахариды 1-6, построенные из 2, 4, 6, 8, 12 и 16-ти (1→3)-связанных α -L-фукопиранозных остатков, соответствуют типу I главных цепей фукоиданов (Рис. 3). Известно, что биологические свойства полианионных олигосахаридов существенно зависят от длины цепи. Например, способность синтетических фрагментов гепарина

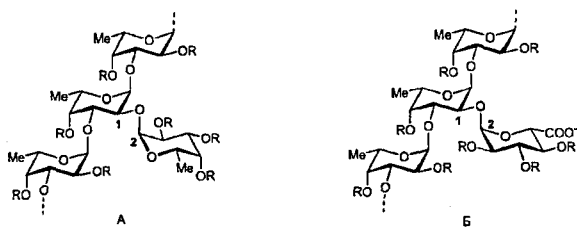


Рисунок 2. Примеры (1→2)-разветвленных цепей: фукоиданов: А, фукоидан из *L. saccharina*; Б, фукоидан из *C. okamuranus*. R = H, SO₃Na и др.

ингибировать действие фактора свертывания крови IIa начинает проявляться только с 14-сахарида, благодаря образованию тройного комплекса антитромбин III – фактор II – фрагмент гепарина. В то же время, для ингибирования действия фактора свертывания крови Ха требуется только пентасахаридный фрагмент, который специфично связывается с антитромбином III. Именно поэтому в рамках данной диссертационной работы была синтезирована серия олигофукозидов с широким диапазоном размеров и строения цепей.

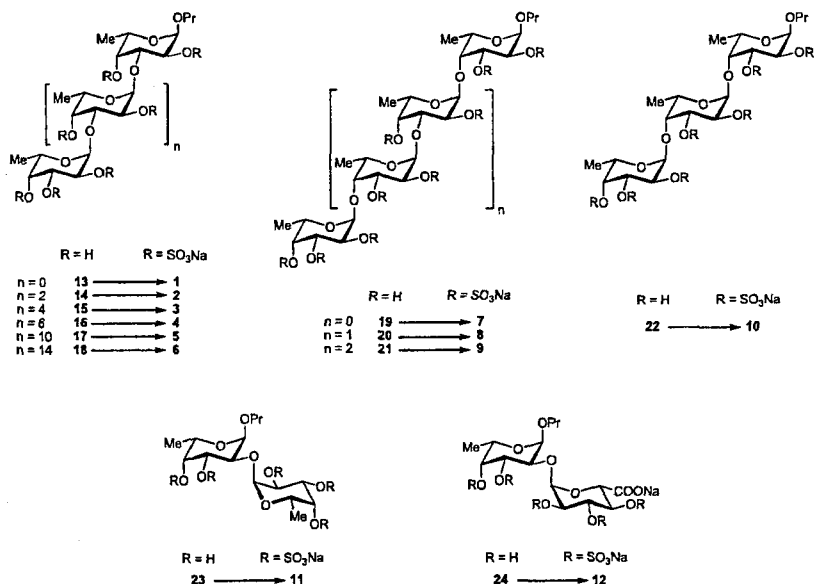


Рисунок 3. Целевые соединения 1-12 и их несulfатированные предшественники 13-24.

Целевые соединения 7-9 соответствуют типу II главных цепей фукоиданов, а трисахарид 10 - типу III. Дисахариды 11 и 12, содержащие (1→2)-α-связанные боковые остатки фукозы и глюкуроновой кислоты соответственно, отвечают разветвлениям

главной цепи, встречающимся в фукоиданах из водорослей *L. saccharina* и *S. okamuranus* (Рис. 2 А,Б).

2. Синтез несulfатированных предшественников 13-22. Ранее в нашей лаборатории был проведен синтез серии олигофукозидов, построенных из (1→3)-связанных α-L-фукопиранозных остатков, с использованием в качестве гликозил-доноров трихлорацетонимидатных производных, которые получали из соответствующих аллил-гликозидов. В настоящей работе предложена новая стратегия синтеза, заключающаяся в использовании блоков, содержащих в аномерном положении тиозтильную группу, которая в зависимости от условий гликозилирования может выступать либо в качестве защитной группы в гликозил-акцепторных блоках, либо легко уходящей группы в гликозил-донорах. Применение такой ортогональной стратегии синтеза при удлинении цепи позволяет избежать стадий, связанных с переводом аномерной защитной группы (например, аллильной) в легко уходящую при гликозилировании.

Тиофукозид **25**, являющийся основным моносахаридным исходным соединением, был получен по разработанной ранее методике. Далее в этом соединении монохлорацетилювали свободную гидроксильную группу при С-3, а затем тиозтильную группу при С-1 заменяли либо на трихлорацетонимидатную (смесь α- и β-изомеров **27**), либо на атом брома (α-бромид **28** использовался далее без дополнительной очистки) (Схема 1).

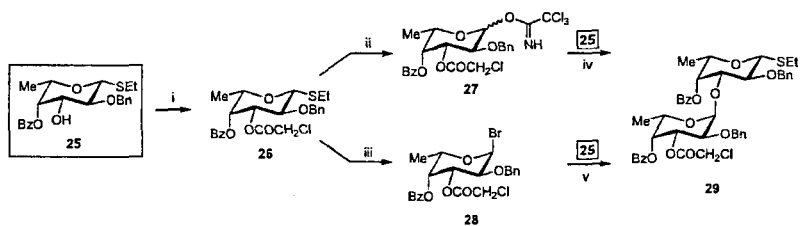


Схема 1. i: ClCH_2COCl , Py, CH_2Cl_2 , 95%; ii: 1) NBS, ацетон-вода, 2) CCl_3CN , ДБУ, CH_2Cl_2 , 76%; iii: Br_2 , CH_2Cl_2 ; iv: TMSOTf, CH_2Cl_2 , -90°C , 1 ч, 66%; v: $\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgBr_2 , CH_2Cl_2 , 20°C , 3 ч, 46%.

Сочетание доноров **27** и **28** с акцептором **25** было изучено в различных условиях (Таблица 1). Практически во всех случаях гликозилирование было осложнено побочной реакцией переноса тиозтильного заместителя на гликозил-донор. Гликозилирование трихлорацетонимидатом **27** при промотировании TMSOTf при -40°C приводило к необходимому продукту **29** лишь с выходом 38%, однако снижение температуры до -90°C , позволило увеличить его выход до 66%. Промотирование бромидом **28** солями ртути при

комнатной температуре позволило получить дисахарид **29** с выходом 46%. Аналогичный результат был получен и при использовании AgOTf при -30°C (выход 44%). Гликозилирование бромидом **28** в присутствии Bu_4NBr при комнатной температуре проходило очень медленно, за 7 дней конверсия не превышала 20%. Таким образом, условия опыта 2 оказались наиболее успешными, реакция протекала стереоспецифично с образованием α -изомера **29**. α -Конфигурация вновь созданной гликозидной связи в этом соединении подтверждалась характеристической величиной КССВ $J_{1,2}$, составляющей 3,5 Гц.

Таблица 1. Результаты гликозилирования донорами **27** и **28** акцептора **25**.

Опыт	Донор	Уходящая группа	Условия гликозилирования	Выход 29 , %
1	27	$\text{OC}(\text{NH})\text{CCl}_3$	TMSOTf , CH_2Cl_2 , -40°C , 1 ч.	38
2	27	$\text{OC}(\text{NH})\text{CCl}_3$	TMSOTf , CH_2Cl_2 , -90°C , 1 ч.	66
3	28	Br	$\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgBr_2 , CH_2Cl_2 , rt, 3 ч.	46
4	28	Br	AgOTf , CH_2Cl_2 , -30°C , 1 ч.	44
5	28	Br	Bu_4NBr , CH_2Cl_2 , ДМФА, 20°C , 7 д.	~20 (TCX)

Для синтеза крупных олигосахаридов помимо дисахаридного тиозильного предшественника **29** потребовался и тетрасахаридный тиогликозид **32**. Для его получения в дисахариде **29** хлорацетильную группу удаляли с образованием акцептора **30** при обработке тиомочевинной и 2,4,6-коллиндином с выходом 94% (Схема 2). Гликозилированием этого соединения дисахаридным трихлорацетонмидатом **31**, описанным ранее, в условиях, разработанных для получения дисахарида **29**, был синтезирован тетрасахарид **32** с выходом 57%.

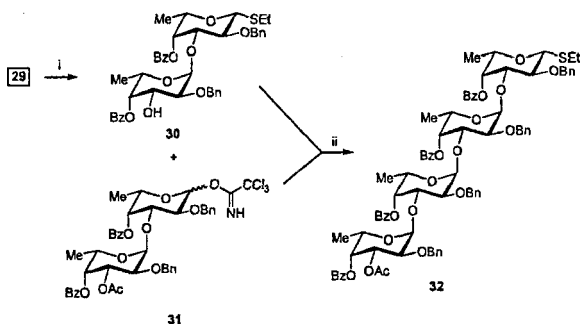


Схема 2. i: NH_2CSNH_2 , 2,4,6-коллиндин, MeOH , 60°C , 24 ч, 94%; ii: TMSOTf , CH_2Cl_2 , -90°C , 1 ч, 57%.

В качестве исходного соединения для синтеза крупных олигосахаридов был использован дисахарид **35**, полученный гликозилированием аллил-фукозида **33** тиогликозидом **26** в присутствии NIS и TfOH. Реакция проходила стереоизбирательно и приводила к образованию только α -изомера **34** (КССВ $J_{1,2} = 3,5$ Гц) (Схема 3). Избирательное удаление хлорацетильной группы приводило к акцептору **35** практически с количественным выходом. Каталитическим гидрогенолизом дисахарид **34** и последующим дезацетилированием был также получен незащищенный дисахарид **13**.

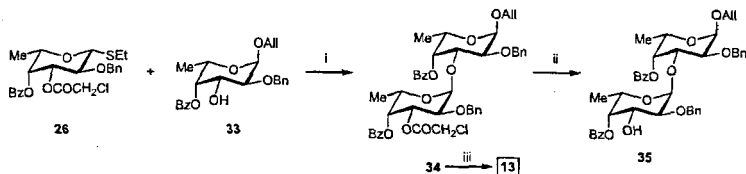


Схема 3. i: NIS, TfOH, CH_2Cl_2 , -30 °С, 1 ч, 82%; ii: NH_2CSNH_2 , 2,4,6-коллиндин, MeOH, 60°С, 24 ч, 95%, iii: 1) H_2 , Pd/C, MeOH-EtOAc, 20°С, 5 ч, 2) NaOH, MeOH- H_2O , 20°С, 24 ч, 81%.

Для синтеза крупных линейных олигофукозидов **14-18**, построенных из (1 \rightarrow 3)-связанных α -L-фукопиранозных остатков, нами далее проводилось гликозилирование дисахаридного акцептора **35** дисахаридным донором **29**. В результате стереоспецифично с выходом 84% образовывался тетрасахарид **36** (КССВ $J_{1,2} = 3,5$ Гц) (Схема 4). В этом

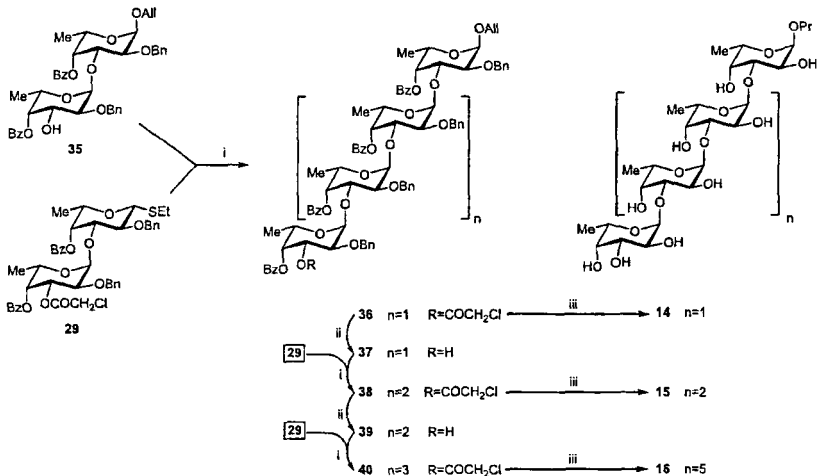


Схема 4. i: NIS, TfOH, CH_2Cl_2 , -30 °С, 1 ч, 79-84%; ii: NH_2CSNH_2 , 2,4,6-коллиндин, MeOH, 60°С, 24 ч, 93-95%; iii: 1) H_2 , Pd/C, MeOH-EtOAc, 20°С, 5 ч, 2) NaOH, MeOH- H_2O , 20 °С, 24 ч, 65-81%.

соединении избирательно удаляли хлорацетильную группу при О-3 концевого остатка, что приводило к тетрасахаридному акцептору **37**. Полученный тетрасахарид **37** далее гликозилировали дисахаридом **29** с образованием гексасахарида **38** (выход 80%) и переводили в моногидроксильное производное **39**. Его последующее гликозилирование донором **29** позволило получить октасахарид **40** с выходом 79% (КССВ $J_{1,2} = 3,5$ Гц). Каталитический гидрогенолиз и дезацелирование соединений **36**, **38** и **40** приводили к незащищенным олигосахаридам **14-16**.

Додека- и гексадекасахариды **17** и **18** были получены по схемам [4+8] и [4+12] соответственно с использованием тетрасахаридного донора **32** (Схема 5). Удаление хлорацетильной группы в октасахариде **40** и последующее гликозилирование соединения **41** донором **32** приводило к додекасахариду **42** с выходом 69% (КССВ $J_{1,2} = 3,5$ Гц). Удаление ацетильной группы в **42** и последующее гликозилирование донором **32** позволили получить гексадекасахарид **44** с выходом 52% на 2 стадии.

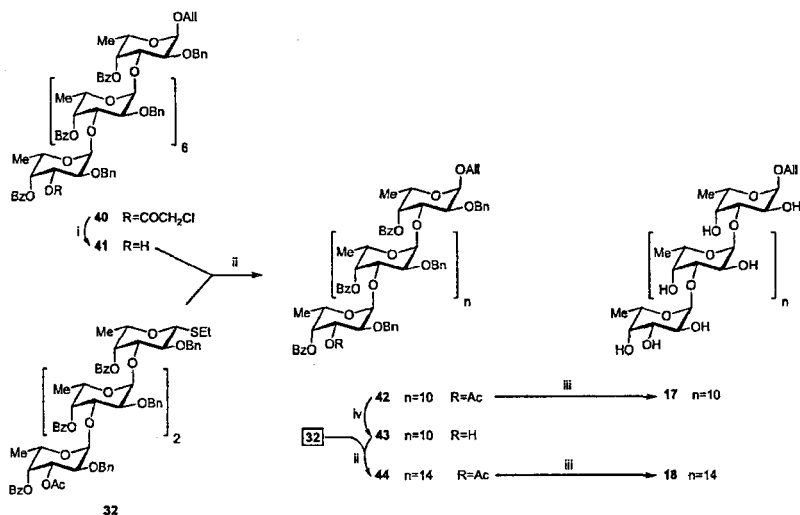


Схема 5. i: NH₂CSNH₂, 2,4,6-коллиндин, MeOH, 60°C, 24 ч, 95%, ii: NIS, TfOH, CH₂Cl₂, -30 °C, 1 ч, 69% для **42**, 74% для **44**, iv: HCl, MeOH, 20°C, 6 ч, 72%, iii: 1) H₂, Pd/C, ТГФ-EtOH-CH₃COOH, 20 °C, 5 ч, 2) NaOH, CH₂Cl₂-EtOH-H₂O, 40 °C, 12 ч, 3) H₂, Pd/C, MeOH-AcOH, 20 °C, 5 ч, 61% для **17**, 54% для **18**.

Следует отметить, что в случае таких крупных олигосахаридов, как додека- и гексадекасахариды, удалить все защитные группы при однократном гидрогенолизе и омылении по стандартным методикам не удалось из-за низкой растворимости частично

защищенных интермедиатов реакции. В этих случаях полное удаление защитных групп было достигнуто после повторного гидрогенолиза.

Синтез олигосахаридов **19-21**, построенных из чередующихся (1→3)- и (1→4)-связанных α -L-фукопиранозных остатков, был осуществлен аналогично рассмотренным выше схемам. В качестве основного предшественника был использован дисахарид **45** (Схема б). Удаление всех защитных групп и восстановление аллильной группы до пропильной в этом соединении приводили к незащищенному дифукозиду **19**, а избирательное удаление ацетильной защиты с помощью мягкого кислотного метанолиза позволило получить акцептор **46**, содержащий свободную гидроксильную группу при С-3 невосстанавливающего остатка. Для синтеза трихлорацетоимидата **47** в дисахариде **45** первоначально удаляли аллильную защиту действием PdCl_2 в метаноле, а затем полученную смесь полуацеталей переводили в трихлорацетоимидаты в присутствии CCl_3CN и ДБУ. Сочетание дисахаридных блоков **46** и **47** осуществлялось в присутствии TMSOTf и приводило к образованию тетрасахарида **48** с выходом 81%. Удаление всех защитных групп в **48**, сопровождающееся восстановлением аллильной группы в пропильную, приводило к незащищенному тетрасахариду **20**.

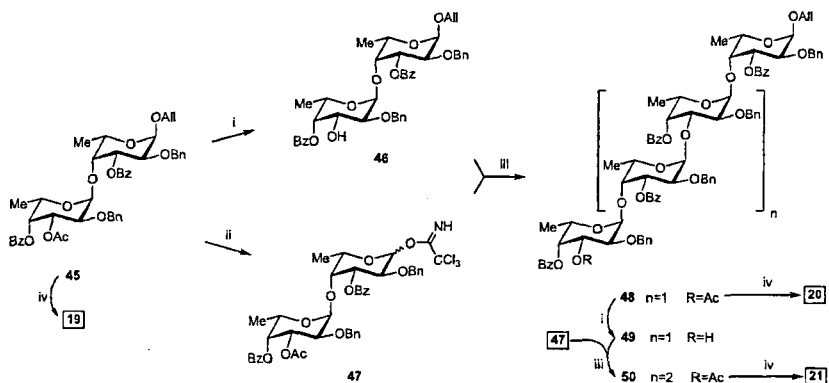


Схема б. i: 2% HCl в MeOH , 70-75%; ii: 1) PdCl_2 , MeOH , 2 ч; 2) CCl_3CN , ДБУ, 64-70% на 2 стадии; iii: 0,1M TMSOTf в CH_2Cl_2 , -30 °С, 81% для **48**, 82% для **50**; iv: 1) H_2 , Pd/C , MeOH-EtOAc ; 2) 0,5M NaOH , 20 °С, $\text{H}_2\text{O-MeOH}$, 70-73% на две стадии.

Для синтеза гексасахариды **21** в соединении **48** первоначально удаляли ацетильную защиту, а потом полученный тетрасахаридный акцептор **49** гликозилировали трихлорацетоимидатом **47** с образованием гексасахариды **50**. Выход соединения **50** составил 81%. Деблокирование **50** приводило к гексасахариды **21** с выходом 70%.

Синтез трисахарида **22**, незащищенного предшественника гептасульфата **10**, был осуществлен гликозилированием аллил-фукозида **51** дисахаридным трихлорацетонимидатом **47** в присутствии TMSOTf. Эта реакция приводила к образованию трисахарида **52** с выходом 77% (Схема 7), который далее с помощью гидрогенолиза и деацетилирования переводили в требуемый трифукозид **22**.

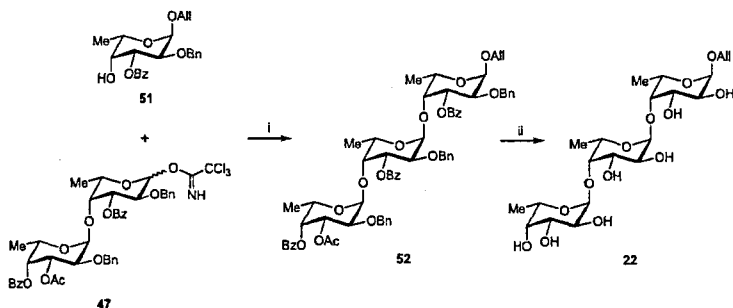


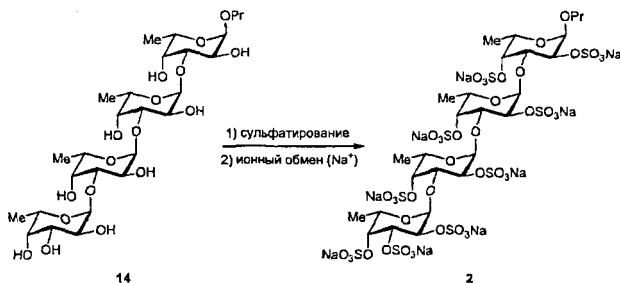
Схема 7. i: TMSOTf, -40°C , 3 ч, 77%; ii: 1) H_2 , Pd/C, MeOH-EtOAc, 20°C , 5 ч, 2) NaOH, MeOH- H_2O , 20°C , 24 ч, 75%.

3. Исследование исчерпывающего сульфатирования свободных олигофукозидов комплексом SO_3 в присутствии трифторметансульфоновой кислоты (ТfOH). Наиболее широко используемый в настоящее время метод сульфатирования олигосахаридов заключается в обработке полиола комплексом $\text{Ru}\cdot\text{SO}_3$ в апротонном растворителе при комнатной или повышенной температуре. Этот метод был нами успешно использован для синтеза сполна сульфатированных дисахаридов **1** и **11**. Однако для получения более крупных соединений этот метод оказался неэффективным. Так, сульфатирование тетрасахарида **14** указанным выше способом приводило лишь к смеси частично сульфатированных производных (Таблица 2, опыт 1). Достичь исчерпывающего сульфатирования также не удалось и при проведении реакции при повышенной температуре в течение 3 суток (опыты 2-5) с использованием различных сульфатирующих реагентов и растворителей. При обработке тетрасахарида **14** хлорсульфоновой кислотой (5,0 экв. на OH-группу, пиридин, 20°C , 24 ч.), которая используется в качестве сульфатирующего агента, также наблюдалось неполное сульфатирование (опыт 6), прежде всего, пространственно затрудненных гидроксильных групп при C-4.

Мы предположили, что добавление сильной кислоты в реакционную смесь при сульфатировании комплексом SO_3 приведет к высвобождению свободной частицы SO_3 из комплекса с амином, что увеличит эффективность сульфатирования. Нами было

исследовано действие комплекса $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (5,0 экв. на OH -группу) в ДМФА на тетрасахарид **14** в присутствии трифторметансульфоновой кислоты (TfOH) (0,3-1,0 экв. на OH -группу) при 0°C . Так, при использовании TfOH в количестве 1,0 экв. на OH -группу нам удалось получить сполна сульфатированное производное **2** (опыт 7), с выходом 77%.

Таблица 2. Результаты сульфатирования тетрасахарида **14** в различных условиях.



Опыт	T ($^\circ\text{C}$)	Время (ч)	Сульфатирующий реагент	Результат реакции
1	20	1	$\text{Pu}\cdot\text{SO}_3$, ДМФА	частичное сульфатирование
2	55	72	$\text{Pu}\cdot\text{SO}_3$, пиридин	частичное сульфатирование
3	55	72	$\text{Pu}\cdot\text{SO}_3$, ДМФА-пиридин (3:1)	частичное сульфатирование
4	55	72	$\text{Pu}\cdot\text{SO}_3$, ДМФА	деструкция гликозидных связей
5	55	72	$\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, ДМФА	частичное сульфатирование
6	20	24	ClSO_3H , пиридин	частичное сульфатирование
7	0	24	$\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, ДМФА, + TfOH	продукт 2

Все целые соединения были получены в виде натриевых солей, для этого реакционную смесь обрабатывали водным раствором NaOH при pH 11. Выделение высокосульфатированных углеводов осуществлялось методом гель-проникающей хроматографии на геле G-15 в воде.

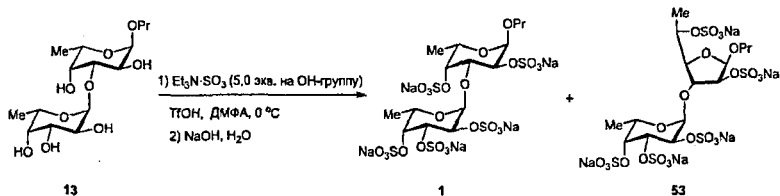
Строение соединения **2** подтверждалось данными ЯМР и масс-спектрометрии. Так, спектр ^1H ЯМР соединения **2** содержал только один набор сигналов, причем все сигналы H-2 и H-4 располагались в более слабом поле, чем в исходном тетрасахариде **14** (H-2 : 3,79-3,95 м.д. для **14**, 4,51-4,61 м.д. для **2**; H-4 : 3,82-4,06 м.д. для **14**, 4,89-4,97 м.д. для **2**). Сильный слабопольный сдвиг, связанный с введением сульфогруппы, наблюдался и для H-3 конечного остатка фукозы (3,93 м.д. для **14**, 4,82 м.д. для **2**), в то время как сдвиги H-3 , находящихся при межзвеньевых связях, оказались незначительными (3,93-4,10 м.д. для **14**, 4,28-4,37 м.д. для **2**). Максимальный сигнал в масс-спектре соединения **2**, при регистрации отрицательно заряженных частиц, соответствовал двухзарядному

молекулярному иону $([M-2Na])^2$: найдено – 757,8814, вычислено – 757,8792), соответствующему ожидаемой структуре нонасульфата 2.

4. Изомеризация терминального фукопиранозного остатка в фуранозный – побочная реакция сульфатирования. Условия, использованные для синтеза сульфатированного тетрасахарида 2, оказались непригодными для получения более крупных полисульфатированных олигофукозидов. Это было показано на примере гексасахаридов 3 и октасахаридов 4. Так, при сульфатировании соответствующих предшественников 15 и 16 в присутствии TfOH образовывалась сложная смесь продуктов, а увеличение количества кислоты лишь способствовало изменению соотношения продуктов реакции. Это потребовало более детального изучения процесса исчерпывающего сульфатирования олигофукозидов, которое было выполнено на примере дисахаридов 13 (Таблица 3).

Сульфатирование соединения 13 комплексом $Et_3N \cdot SO_3$ (5,0 экв. на OH-группу) в присутствии TfOH (1,0 экв. на OH-группу) в безводном ДМФА при 0 °С протекало гладко с образованием только одного пентасульфата 1 с выходом 77% (опыт 1). Однако увеличение количества кислоты (2,0 экв. на OH-группу) приводило к образованию смеси соединений 1 и 53 в соотношении 3,1 : 1 (опыт 2), которое устанавливалось интегрированием соответствующих сигналов пропильной группы в спектре 1H ЯМР. Увеличение времени реакции до 7 дней способствовало увеличению образования неожиданного продукта 53, соотношение 1 : 53 составляло 1 : 2,3. В этом случае

Таблица 3. Результат сульфатирования дисахаридов 13 в присутствии различных количеств TfOH.



Опыт	Количество TfOH (экв. на OH-группу)	Время (ч)	Продукты	Выход 1+53 (%)
1	1.0	24	1	77
2	2.0	24	1 : 53 = 3,1 : 1	82
3	2.0	186	1 : 53 = 1 : 2,3 + распад	

наблюдалось также образование продуктов частичной деградации дисахаридов (опыт 3). Сульфатирование при комнатной температуре сопровождалось разрушением гликозидных связей и удалением пропильной группы.

Сигналы ^1H и ^{13}C ЯМР, относящиеся к терминальному остатку дисахарида **53**, имели характерные для 2,5-дисульфатированного фукофуранозного звена химические сдвиги и КССВ. Подробное обсуждение спектральных данных и структуры терминального остатка приведено ниже для гомологичного тетрасахарида **54**.

Образование побочного продукта **54** протекало более легко в случае сульфатирования тетрасахарида **14** (Схема 8). Так, при обработке олигофукозида **14** с $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (5,0 экв. на OH-группу) и ТЮН (2,0 экв. на OH-группу) в течение 48 часов образовывался только **54** (выход 71%).

Соединение **54** было детально изучено методами ЯМР и масс-спектрометрии. Было установлено, что терминальное звено олигосахаридной цепи представляет собой 2,5-дисульфатированный α -L-фукофуранозный остаток. Это подтверждалось характерными для фукофуранозы сигналами Н-4 (4,02 м.д., т) и С-4 (83,9 м.д.) в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР (см. Таблицу 4). Кроме того, наличие 5-членного цикла подтверждалось корреляцией между сигналами Н-1 и С-4, а также С-1 и Н-4 в эксперименте НМВС ЯМР. Пространственная близость Н-4 и Н-2 подтверждалась в экспериментах по ЯЭО. Сигнал молекулярного иона в ESI-MS так же соответствовал формуле **54**.

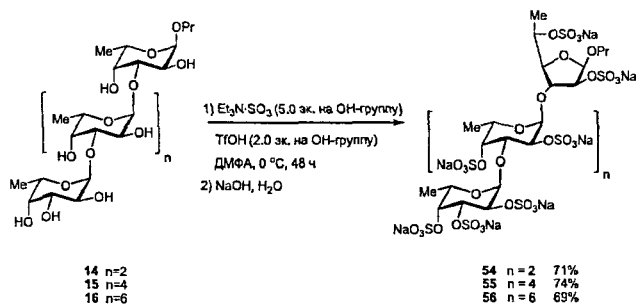
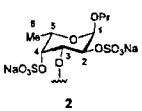
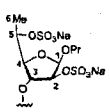


Схема 8. Продукты **54-56**, образующиеся при сульфатировании **14-16** в присутствии ТЮН.

Гексасахарид **15** и октасахарид **16** были полностью переведены в соответствующие сполна сульфатированные производные **55** и **56**, содержащие фуранозный остаток, под действием $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (5,0 экв. на OH-группу) и ТЮН (2,0 экв. на OH-группу) в течение 48 часов. Их спектры были аналогичны спектру тетрасахарида **54** и содержали сигналы,

характерные для терминального 2,5-дисульфатированного α -L-фукофуранозного остатка (см. Таблицу 4), а также сигналы невосстанавливающих фукопиранозных остатков.

Таблица 4. Избранные данные ЯМР-спектров для тетрасахаридов 2 и 54.

Структура	Избранные данные ЯМР-спектров						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	O-CH ₂ -Et
 <p>2</p>	5,21	4,52	4,28	4,90	4,22	1,30	3,55; 3,63
	C-1	C-2	C-3	C-3	C-5	C-6	O-CH ₂ -Et
	97,4	76,2	76,1	81,3	68,3	17,0	71,9
	$J_{H-1, H-2}$	$J_{H-4, H-5}$	$J_{C-4, H-1}$	$J_{C-1, H-4}$	$J_{C-5, H-1}$	$J_{C-1, H-5}$	
	3,4 Hz	~ 1 Hz	-	-	6,9 Hz	-	
 <p>54</p>	5,23	4,77	4,43	4,02	4,61	1,45	3,47; 3,82
	C-1	C-2	C-3	C-3	C-5	C-6	O-CH ₂ -Et
	101,2	81,6	81,2	83,9	78,6	18,0	71,8
	$J_{H-1, H-2}$	$J_{H-4, H-5}$	$J_{C-4, H-1}$	$J_{C-1, H-4}$	$J_{C-5, H-1}$	$J_{C-1, H-5}$	
	4,4 Hz	6,0 Hz	7,0 Hz	3,2 Hz	-	-	

Наблюдаемая необычная перегруппировка фукопиранозного остатка в фукофуранозный с сохранением конфигурации пропильного агликона относится к тем немногочисленным реакциям в химии углеводов, где эндо-циклическая связь C(1)-O(5) разрывается, а последующая рециклизация приводит к образованию новой O(4)-C(1) связи. Обычно кислотно-катализуемые трансформации пиранозного цикла протекают неселективно и сопровождаются как разрывом эндо-циклической связи C(1)-O(5), так и экзо-циклической C(1)-O(1), что приводит к образованию сложной смеси продуктов. В настоящее время данная реакция исследуется нами более детально на примере других углеводов соединений.

5. Промотирование реакции сульфатирования различными кислотами. Получение сполна сульфатированного гексасахарида 3 с неизменным терминальным остатком при промотируемом TfOH сульфатировании олигофукозида 15 было невозможно из-за образования побочного продукта 55. Мы предположили, что варьирование природы промотирующей кислоты и ее количества позволит увеличить выход необходимого продукта 3. Использование хлорсульфоновой кислоты (1,0 экв. на OH-группу) также приводило к практически чистому соединению 55 с выходом 83% (Таблица 5, опыт 1). Использование серной кислоты и эфира трехфтористого бора

($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) в количестве 1,0 экв. на OH -группу было неэффективным и приводило к образованию смесей частично сульфатированных гексасахаридов (опыты 2 и 3). Требуемый продукт **3** удалось получить с использованием более слабой трифторуксусной кислоты (TFA). Так, при добавлении в реакционную смесь TFA в количестве 1,0 экв. на OH -группу образовывалась смесь **3** и **55** в соотношении 5 : 1 (опыт 4). Однако при снижении количества промотирующей кислоты до 0,5 экв. на OH -группу был получен чистый гексасахарид **3** (опыт 5).

Таблица 5. Исследование сульфатирования гексасахаридов **15** комплексом $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{SO}_3$ (5,0 экв. на OH -группу) в ДМФА при промотировании различными кислотами.

Опыт	Кислота	Количество кислоты (экв. на OH -группу)	Продукты	Выход (%)
1	ClSO_3H	1,0	55	83
2	H_2SO_4	1,0	Смесь частично сульфатированных продуктов	
3	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	1,0	Смесь частично сульфатированных продуктов	
4	TFA	1,0	3:55 ~ 5:1	73
5	TFA	0,5	3	76

Условия реакции из опыта 5, разработанные для получения гексасахаридов **3**, были успешно использованы и для получения и более крупных сульфатированных производных - октасахаридов **4** (выход 78%), додекасахаридов **5** (выход 72%) и гексадекасахаридов **6** (выход 78%) (Схема 9).

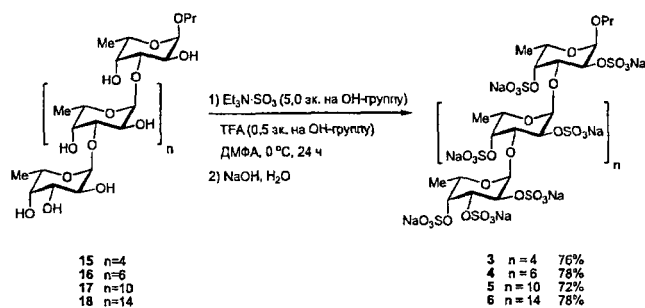
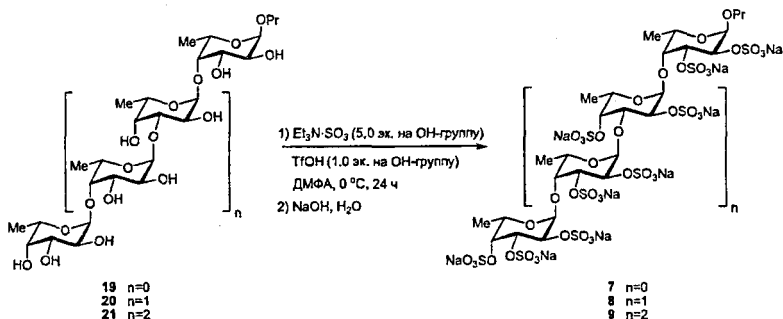


Схема 9. Исчерпывающее сульфатирование олигосахаридов **15-18** в присутствии трифторуксусной кислоты.

6. Сульфатирование олигофукозидов с α -(1→4)- и α -(1→2)-связанными остатками. На следующем этапе работы было изучено исчерпывающее сульфатирование олигофукозидов, построенных из чередующихся α -(1→4)- и α -(1→3)-связанных фукозных

остатков (Таблица 6). Обе описанные выше методики, как с использованием ТfOH, так и TFA, приводили к одинаковым результатам. В обоих случаях при сульфатировании тетрасахарида **19** наблюдалось образование единственного пентасульфата **7** с выходами 80% и 83%, соответственно (опыты 1 и 2). В ходе экспериментов не наблюдалось перегруппировок пиранозных остатков из-за наличия заместителя при О-4 восстанавливающего остатка. Таким образом, для сульфатирования тетрасахарида **20** и гексасахарид **21** были выбраны условия из опыта 2 с ТfOH. Обработка незащищенных олигосахаридов 5-кратным избытком комплекса $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ и ТfOH (1,0 экв. на ОН-группу) приводила к сульфатированным производным **8** и **9** с выходами 84% и 83%, соответственно.

Таблица 6. Исчерпывающее сульфатирование олигосахаридов **19-21** комплексом $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (5,0 экв. на ОН-группу) в ДМФА при протитровании кислотами.



Опыт	Исходный олигосахарид	Кислота	Количество кислоты (5 экв. на ОН-группу)	Продукт	Выход (%)
1	19	TFA	0,5	7	83
2	19	ТfOH	1,0	7	80
3	20	ТfOH	1,0	8	84
4	21	ТfOH	1,0	9	83

Затем было изучено исчерпывающее сульфатирование трисахарид **22**, построенного только из (1→4)- α -связанных фукопиранозных остатков (Схема 10). В этом случае ($\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, 5,0 экв. на ОН-группу и ТfOH, 1,0 экв. на ОН-группу) происходило успешное образование требуемого продукта **10** без побочных реакций. (1→2)-Связанные дисахариды **23** и **24** были также переведены в сполна сульфатированные производные **11** и **12** обработкой комплексом $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (5,0 экв. на ОН-группу) и ТfOH (1,0 экв. на ОН-группу) с выходами 72% и 85% соответственно.

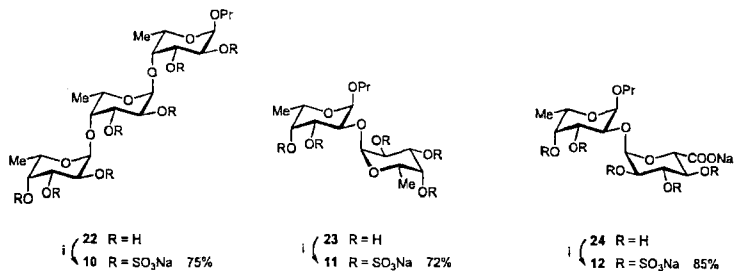


Схема 10. Исчерпывающее сульфатирование олигосахаридов **22-24** в присутствии ТЮН. *i*: 1) $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{SO}_3$ (5,0 экв. на OH-гр.), ТЮН (1,0 экв. на OH-гр.), ДМФА, 0 °С, 24 ч 2) NaOH , H_2O .

7. Исследование антикоагулянтной активности синтезированных соединений.

Как было отмечено выше, фукоиданы проявляют антикоагулянтную активность, то есть обладают способностью влиять на систему гемостаза. Это открывает перспективы создания высокоэффективных антикоагулянтных препаратов, в том числе и на основе синтетических олигосахаридов, родственных фукоидам. Кроме того, учитывая высокую сложность системы свертывания крови, разработка препаратов с другими типами активностей (например, противовоспалительная или антиадгезивная) также требует обязательного определения профиля антикоагулянтных свойств.

Способность высокосульфатированных олигосахаридов проявлять антикоагулянтную активность связана с возможностью ингибирования ими ключевых факторов каскада свертывания крови, таких как IIa (тромбин) и Ха. Ингибиторное действие сульфатированных олигосахаридов на эти факторы опосредовано серпинами (например, антитромбином III, гепарин-кофактором II), которые в комплексе с углеводами связываются с факторами коагуляции, замедля тем самым процесс образования фибринового сгустка.

Для выявления профиля антикоагулянтных свойств синтезированных олигосахаридов было изучено их действие на каскад коагуляции, а также специфичное ингибирование факторов IIa и Ха в плазме и в «чистых» системах. На первом этапе влияние синтетических олигосахаридов **2-6**, **8-9**, **54-56** на процесс свертывания крови изучали с использованием общепринятого *in vitro* теста активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) (*Таблица 7*). Этот тест позволяет оценить совокупное влияние антикоагулянта на активность факторов свертывания крови «внутреннего» пути. Реализация этого пути свертывания происходит при контактной активации фактора XII соединениями с отрицательно заряженной поверхностью (в

тестовых системах используют каолин, целлит, эллаговую кислоту и т.д.). Целевые соединения, содержащие менее чем четыре углеводных остатка, не проявляли значительной антикоагулянтной активности в данном тесте, поэтому далее не рассматривались. Ингибирующая активность веществ была выражена величиной 2АЧТВ – эффективной концентрацией соединения, необходимой для увеличения времени образования сгустка в два раза относительно контроля.

Таблица 7. Значения 2АЧТВ (мкг/мл) серии синтетических олигосахаридов 2-6, 8-9, 54-56.*

Тип цепи	4-сахариды	6-сахариды	8-сахариды	12-сахарид	16-сахарид
	2	3	4	5	6
[- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)-]	30,5 \pm 3,5	6,3 \pm 1,1	2,86 \pm 0,10	3,00 \pm 0,47	2,77 \pm 0,32
	54	55	56		
[- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)-]**	22,9 \pm 4,7	5,9 \pm 1,1	2,95 \pm 0,25		
	8	9			
[- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- - α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)-]	14,9 \pm 2,1	4,8 \pm 1,4			

* Значение 2АЧТВ для фукоидана из *L. saccharina* составляет 2,31 \pm 0,43 мкг/мл.

** Содержит α -L-фукофуранозный восстанавливающий остаток

Полученные данные позволяют сделать вывод, что среди рассматриваемых структур антикоагулянтная активность в тесте АЧТВ в первую очередь зависит от длины цепи, в то время как тип цепи и структура терминального остатка влияют незначительно. Это подтверждается близкими величинами 2АЧТВ для изомерных тетрасахаридов 2, 54 и 8, гексасахаридов 3, 55 и 9, октасахаридов 4 и 56. Среди тетрасахаридов наибольшую активность проявлял фукозид 8, построенный из чередующихся (1 \rightarrow 4)- и (1 \rightarrow 3)-связанных фукозных остатков (14,9 \pm 2,1 мкг/мл). Немного менее активным оказался тетрасахарид 54, содержащий терминальный α -L-фукофуранозный остаток (22,9 \pm 4,7 мкг/мл). Еще слабее ингибировал коагуляцию крови тетрасахарид 2 (30,5 \pm 3,5 мкг/мл). Изомерные гексасахариды 3, 55, 9 были в 3-5 раз более активны (4,8 - 6,3 мкг/мл), чем соответствующие тетрасахаридные производные. Следует отметить, что различие в активности среди гексасахаридов 3, 55 и 9 не выходило за пределы статистической достоверности результатов.

Переход от гекса- к октасахаридам также приводил к увеличению активности более чем в 2 раза: для изомерных соединений 4 и 56 величины 2АЧТВ были близки и составляли 2,86 \pm 0,10 и 2,95 \pm 0,25 мкг/мл соответственно. Интересно отметить, что дальнейшее удлинение углеводной цепи не приводило к увеличению активности:

величины 2АЧТВ для октасахаридов 4 и 56, додекасахарида 5 ($3,00 \pm 0,47$ мкг/мл) и гексадекасахарида 6 ($2,77 \pm 0,32$ мкг/мл) были близки, а различие не выходило за пределы доверительного интервала. Отметим, что антикоагулянтная активность, достигнутая для олигосахаридов, содержащих более 8 моносахаридных звеньев, приближалась к активности фукоидана из водоросли *L. saccharina* (2АЧТВ = $2,31 \pm 0,43$ мкг/мл).

Специфическую анти-Ха антикоагулянтную активность образцов определяли *in vitro* по ингибированию фибриногенсвертывающей активности этого фактора в плазме крови человека с использованием стандартного набора реактивов РеаКлот. В качестве стандарта использовался низкомолекулярный гепарин (НМГ, активность - 168 Ед. аХа/мг). Активность синтетических олигосахаридов 2-6, 8-9, 54-56, выраженная в гепариновых единицах, приведена в Таблице 8.

Изучаемые соединения проявляли невысокую анти-Ха активность, которая монотонно возрастала при увеличении молекулярной массы, причем, в отличие от активности в тесте АЧТВ, рост ингибирующей способности не останавливался на октасахариде. Так, изомерные тетрасахариды 2, 54 и 8 проявляли практически одинаковую невысокую активность ($0,26-0,34$ аХа Ед./мг), в то время как гексасахариды 3, 55 и 9 были примерно в 5 раз более активны ($1,42-1,79$ аХа Ед./мг). Дальнейший рост активности был примерно пропорционален молекулярной массе и достигал $5,30 \pm 0,61$ аХа Ед./мг для гексадекасахарида 6, который был в 2 раза менее активен, чем фукоидан из водоросли *L. saccharina* ($9,98 \pm 1,11$ аХа Ед./мг) и в 32 раза менее активнее стандарта низкомолекулярного гепарина (НМГ, 168 Ед. аХа/мг).

Таблица 8. Значения анти-Ха (аХа Ед./мг) серии синтетических олигосахаридов 2-6, 8-9, 54-56, определенные методом РеаКлот.*

Тип цепи	4-сахариды	6-сахариды	8-сахариды	12-сахарид	16-сахарид
	2	3	4	5	6
[-α-L-Fuc-(1→3)-]	$0,25 \pm 0,06$	$1,63 \pm 0,37$	$2,81 \pm 0,60$	$4,15 \pm 0,20$	$5,30 \pm 0,61$
	54	55	56		
[-α-L-Fuc-(1→3)-]**	$0,34 \pm 0,05$	$1,42 \pm 0,35$	$2,30 \pm 0,31$		
	8	9			
[-α-L-Fuc-(1→3)- -α-L-Fuc-(1→4)-]	$0,26 \pm 0,03$	$1,79 \pm 0,11$			

* Значение анти-Ха активности фукоидана из *L. saccharina* составляет $9,98 \pm 1,11$ Ед./мг.

** Содержит α-L-фукофуранозный восстанавливающий остаток.

Анти-IIa антикоагулянтную активность образцов определяли *in vitro* по ингибированию фибриногенсвертывающей активности тромбина (IIa) в плазме крови

человека. При этом использовалась стандартная методика определения тромбинового времени в присутствии различных количеств исследуемых антикоагулянтов. Предварительные эксперименты выявили схожую активность для изомерных олигосахаридов, поэтому в дальнейшем подробно была изучена только серия (1→3)-связанных олигосахаридов 1-6. В качестве стандарта использовался низкомолекулярный гепарин (НМГ, активность - 174 Ед. аПа/мг). Активность синтетических олигосахаридов 2-6, выраженная в гепариновых единицах, приведена в *Таблице 9*.

Таблица 9. Значения анти-Па (аПа Ед/мг) серии синтетических олигосахаридов 2-6 и определенная по влиянию ингибиторов на тромбиновое время (ТВ).*

Тип цепи	4-сахарид	6-сахарид	8-сахарид	12-сахарид	16-сахарид
	2	3	4	5	6
[- α -L-Fucp-(1→3)-]	<1,0	<1,0	2,68±0,37	8,64±1,23	12,27±1,71

* Значение анти-Па активности фукоидана из *L. saccharina* составляет 25,43±3,56 Ед./мг.

Анти-Па активность изученных образцов резко возрастала при увеличении длины углеводной цепи. Так тетра- и гексасахариды 2 и 3 практически не оказывали влияния на тромбиновое время, их активность в пересчете на гепариновые единицы составляла менее 1 Ед. аПа. Существенно лучше замедлял сгусткообразование плазмы под действием тромбина октасахарид 4, его активность составила 2,68±0,37 Ед. аПа. В три раза более эффективными ингибиторами оказались додекасахарид 5 (активность анти-Па - 8,64±1,23 Ед. аПа) и гексадекасахарид 6 (активность анти-Па - 12,27±1,71 Ед. аПа). Фукоидан из бурой водоросли *L. saccharina* был приблизительно в два раза более активен, чем гексадекасахарид, и его активность в этом тесте составила 25,43±3,56 Ед. аПа/мг.

Помимо вышеописанных коагулометрических методов, основанных на изменении времени образования фибринового сгустка в плазме крови человека, антикоагулянтная активность синтезированных соединений была изучена в амидолитических тестах без использования такой сложной многокомпонентной смеси, как плазма. Эти методы основаны на способности факторов коагуляции расщеплять синтетический хромогенный субстрат, представляющий собой специфичную олигопептидную последовательность, содержащую на С-конце *n*-нитроанилин. Протеазная активность факторов определяется по скорости высвобождения свободного *n*-нитроанилина, которая фиксируется фотометрически. Определение ферментативной активности факторов Па и Ха осуществлялось в присутствии серпина – антитромбина III. В качестве стандарта использовался низкомолекулярный гепарин (НМГ) с анти-Па активностью 174 Ед. аПа/мг и с анти-Ха активностью 248 Ед. аХа/мг.

Все синтезированные соединения практически не оказывали влияния на активность фактора IIa ($<0,1$ Ед. аIIa/мг), а способность ингибировать фактор Ха была на 1-2 порядка ниже, чем соответствующая величина, измеренная коагулометрическим методом, и не превышала 0,3 Ед. аХа/мг. В случае олигосахаридов 8 и 9, построенных из чередующихся (1→4)- и (1→3)-связанных α -L-фукопиранозных остатков, корректное определение активности было затруднено опалесценцией пробы при высоких концентрациях ингибитора. Существенное отличие амидолитической активности по сравнению с коагулометрическими определениями свидетельствует о том, что изучаемые олигофукозиды осуществляют свою активность посредством не антитромбина III, а с помощью других серпинов, содержащихся в плазме.

Выводы

1. Впервые осуществлен синтез сполна сульфатированных олигосахаридов 2-10 и 12, родственных фрагментам фукоиданов, различающихся типом гликозидных связей и длиной цепи.

2. Разработана эффективная блочная схема синтеза олигофукозидов, построенных из (1→3)-связанных фукопиранозных остатков с использованием ди- и тетрасахаридных тиогликозидных доноров 29 и 32.

3. Разработан эффективный метод исчерпывающего сульфатирования крупных олигосахаридов комплексом $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ в ДМФА в присутствии протонных кислот (TfOH, TFA).

4. При изучении промотируемого кислотой сульфатирования (1→3)-связанных олигофукозидов обнаружена необычная перегруппировка восстанавливающего фукопиранозного остатка в фукофуранозный с сохранением пропильного агликона.

5. Проведено определение базовых антикоагулянтных характеристик синтезированных сполна сульфатированных олигофукозидов 2-6, 8-9, 54-56, и показано, что способность синтетических олигосахаридов ингибировать внутренний путь свертывания крови, а также блокировать действие факторов коагуляции IIa и Ха существенно возрастает при увеличении длины цепи.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях*:

1. N.E. Ustyuzhanina, V.B. Krylov, A.A. Grachev, A.G. Gerbst, N.E. Nifantiev. Synthesis, NMR and conformational studies of fucoidan fragments 8: convergent synthesis of branched and linear oligosaccharides // *Synthesis* 2006, 23, 4017–4031.

2 V.B. Krylov, N.E. Ustyuzhanina, A.A. Grachev, N.E. Nifantiev. Efficient acid-promoted per-O-sulfation of organic polyols // *Tetrahedron Lett.*, 2008, 49, 5877-5879.

3. N.E. Ustyuzhanina, V.B. Krylov, A.I. Usov, N.E. Nifantiev. Synthesis of fucoidan fragments in Progress in the synthesis of complex carbohydrate chains of plant and microbial polysaccharides, N.E. Nifantiev Ed., Research Singpost and TRN, ISBN 978-81-7895-424-0, 2009, 131-154.

4. В.Б. Крылов, Н.А. Ушакова, Н.Е. Устюжанина, М.Е. Преображенская, Д.В. Яшунский, Д.Е. Цветков, В.М. Меньшов, Г.В.М. Шарма, П. Радха Кришна, Н.Э. Нифантьев. Исследование сульфатированных производных полигидроксильных соединений в качестве ингибиторов свертывания крови // *Изв РАН сер. хим.*, 2010, 1, 228-231.

5. V.B. Krylov, N.E. Ustyuzhanina, A.A. Grachev, N.E. Nifantiev. Acid promoted method for per-O-sulfation of organic polyols // *6-th International Congress of Young Students «YoungChem 2008»*, Краков, Польша, 15 – 19 октября, 2008. Сборник тезисов докладов, с. 119.

6. В.Б. Крылов, Н.Е. Устюжанина, Н.А. Ушакова, Н.Н. Дрозд, В.А. Макаров, М.Е. Преображенская, Н.Э. Нифантьев. Синтез и антикоагулянтная активность сполна сульфатированных производных олигофукозидов и природных полифенолов // *VII всероссийская конференция с молодежной научной школой «Химия и медицина, Орхимед-2009»*, Уфа, 1 – 5 июля, 2009. Сборник тезисов докладов, Уфа, 2009, с. 52-53.

7. V.B. Krylov, N.E. Ustyuzhanina, A.A. Grachev, N.E. Nifantiev. Unusual rearrangement of a pyranoside residue into furanoside one under acid-promoted sulfation of large oligofucosides // *15-th European carbohydrate symposium, «EuroCarb»*, Вена, Австрия, 19 – 26 июля, 2009. Сборник тезисов докладов, с. 338.

8. В.Б. Крылов, Н.Е. Устюжанина, Н.Н. Дрозд, Н.А. Ушакова, М.Е. Преображенская, В.А. Макаров, Н.Э. Нифантьев. Синтез и антикоагулянтная активность полисульфатированных линейных олигосахаридов, родственных фукоидану из водоросли *Laminaria saccharina* // *Всероссийская конференции по органической химии, посвященной 75-летию со дня основания Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН*, Москва, 25 – 30 октября, 2009. Сборник тезисов докладов. М., 2009, с. 239.

9. V.B. Krylov, N.E. Ustyuzhanina, A.A. Grachev, N.E. Nifantiev. Synthesis of large fucoidan fragments – potential inhibitors of microbial adhesion // *4-th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates*, Хиттиэле, Финляндия, 19 – 22 сентября, 2010. Сборник тезисов докладов, с. 50.

* V.B. Krylov, Z.M. Kaskova, D.Z. Vinnitskiy, N.E. Ustyuzhanina, A.A. Grachev, A.O. Chizhov, N.E. Nifantiev. Acid-promoted total sulfation of fucoidan fragments // рекомендована для печати в *Carbohydr. Res.*

Подписано в печать: 27.10.2010

Заказ № 4382 Тираж - 150 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru