

ФИО соискателя Орехова Мария Вячеславовна

Название диссертации «Синтез олигосахаридов, отвечающих α -(1-3)-
глюкану *Aspergillus fumigatus*»

Шифр специальности 02.00.03 – химические науки

Химические науки

Шифр диссертационного совета Д 002 222 01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

Е-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института
<http://zioc.ru/>

8 апреля 2016 года

Дата приема к защите

14 апреля 2016 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК vak2.ed.gov.ru

20 апреля 2016 года

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н.Д. ЗЕЛИНСКОГО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи

ОРЕХОВА МАРИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА

**СИНТЕЗ ОЛИГОСАХАРИДОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ α -(1-3)-
ГЛЮКАНУ ASPERGILLUS FUMIGATUS**

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

МОСКВА – 2016

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

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Комарова Божена Сергеевна
кандидат химических наук, научный сотрудник
лаборатории химии гликоконъюгатов №52 ИОХ РАН

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

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

Формановский Андрей Альфредович
доктор химических наук, заведующий лабораторией
органического синтеза Института биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

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

Защита диссертации состоится 21 июня 2016 года в 11 часов 00 минут на заседании
Диссертационного совета Д 002.222.01 при Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской
академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН и на сайте <http://zioc.ru>

Автореферат разослан __ апреля 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.222.01
доктор химических наук



Родиновская Л.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Группа заболеваний, объединяемых общим названием аспергиллез, относится к разряду самых значимых среди болезней, вызываемых патогенными грибами. Основные возбудители аспергиллеза, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, рассматриваются в настоящее время как важные мишени для вакцин. Однако грибки рода *Aspergillus* поражают в основном людей, страдающих частичным или полным поражением иммунной системы. Из-за поражения иммунной системы больные аспергиллезом теоретически не подлежат вакцинации и входят в группу больных с высоким риском летального исхода.

Поиск способа лечения аспергиллеза сводится к изучению различных аспектов взаимодействия иммунной системы с данным патогеном. С этой точки зрения наибольший интерес представляет α -(1 $\rightarrow$ 3)-связанный глюкан, являющийся основным компонентом клеточной стенки многих грибковых патогенов. В контексте изучения *Aspergillus fumigatus*, наиболее частого возбудителя инвазивного аспергиллеза, для α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана известно, что он активно вовлечен в процесс агрегации и прорастания конидий, а также, как было показано на примере моделей аспергиллеза у мышей, он снижает выделение интерлейкинов лейкоцитами, воздействуя на TLR2 и TLR4 пути, и модулируя тем самым иммунный ответ.

Нерастворимость бактериального α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана, а также невозможность получить охарактеризованные фрагменты определенной длины гидролизом его экстракта, затрудняют исследование его роли в патогенезе заболевания. Химический синтез фрагментов α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана фиксированной длины позволит ответить на ряд важных для лечения инвазивного аспергиллеза вопросов.

Целью работы является синтез α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкоолигосахаридов с длиной цепи 3, 5, 7, 9, 11 глюкозных остатков, снабженных аминопропильным спейсером, необходимым для конъюгации с носителями – биотином и бычьим сывороточным альбумином (БСА), а также синтез соответствующих конъюгатов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые синтезирована представительная серия спейсированных α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкоолигосахаридов с длиной цепи 3, 5, 7, 9 и 11 глюкозных остатков, а также конъюгаты с бычьим сывороточным альбумином и биотином на их основе.

Изучено влияние ацильных и бензилиденовой защитных групп в структуре глюкозил-донора на α -стереоселективность гликозилирования первичного и вторичного глюкозил-акцепторов и установлено, что наибольшая стереоселективность достигается при использовании 6-О-моно и 3,6-ди-О-ацилированных глюкозил-доноров. Исследованы *N*-фенилтрифторацетимидоильная и сульфоксидная уходящие группы и найдено, что в

сочетании со всеми изученными типами защитных групп *N*-фенилтрифторацетимидоильная группа обеспечивает наилучшие выходы продуктов гликозилирования.

На основании результатов исследования влияния защитных групп и уходящей группы в глюкозил-донорах разработана эффективная конвергентная блочная схема стереоселективного синтеза α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкоолигосахаридов с аминопропильным спейсером и оптимизированы методы получения донорных и акцепторных блоков.

Оптимизированы условия деблокирования защищенных α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкоолигосахаридов. Предложены два типа условий, позволяющих эффективно удалять защитные группы как в относительно коротких олигосахаридах, включающих от 3 до 7 моносахаридов, так и в более длинных олигомерах, состоящих из 9 и 11 глюкозных остатков.

Полученные олигосахариды и гликоконъюгаты используются для изучения биологических функций α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана в клеточной стенке грибка *Aspergillus fumigatus*.

Публикация и апробация работы. По результатам диссертации опубликованы 2 статьи и 1 обзор. Отдельные части работы были представлены на кластере конференций ОригХим-2013 (Репино, 2013 г.), IV Всероссийской конференции по органической химии (Москва, 2015).

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

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, посвященного вкладу химии углеводов в исследование биологической роли природных α -глюкозидов, обсуждения результатов, экспериментальной части, приложения и списка цитированной литературы. Общий объем диссертации составляет 204 страницы, библиографический список включает 254 наименования.

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Целевые соединения и стратегия их синтеза. Для иммунологических исследований целесообразно синтезировать ряд α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкоолигосахаридов, содержащих от 3 до 11 глюкозных остатков. При этом для конъюгирования полученных структур с метками различных типов, белками-носителями или через биотин со

специальными полимерами к восстанавливающему моносахаридному остатку необходимо присоединить спейсер со свободной аминогруппой.

Главная особенность структуры α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкоолигосахаридов заключается в стереохимии гликозидных связей. Построение 1,2-*цис*-гликопиранозидных связей, осложнено образованием диастереомерных смесей. В настоящее время не существует универсального надежного метода контроля стереоселективности образования 1,2-*цис*-гликозидной связи, хотя гликопиранозиды с 1,2-*транс*-связями могут быть достаточно уверенно получены.

Таким образом, в процессе разработки подхода к синтезу олигосахаридных фрагментов α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана предстоит решить три основных задачи. Во-первых, необходимо оптимизировать условия стереоселективного α -глюкозилирования. Во-вторых, определить, какой набор защитных групп позволяет проводить необходимые манипуляции в процессе построения цепи. В третьих, осуществить выбор между двумя возможными способами получения олигосахаридов – линейным и конвергентным синтезом.

2. Исследование влияния защитных групп глюкозил-донора на стереоселективность α -глюкозилирования. Первой задачей на пути синтеза фрагментов α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана был выбор и оптимизация метода стереоселективного построения α -связей между глюкозными остатками.

Одним из основных факторов, влияющих на стереоселективность гликозилирования, являются защитные группы в структуре глюкозил-донора. Необходимым условием для направленного синтеза α -глюкопиранозидов является наличие несодействующей защитной группы при О-2. Как правило, если стереоконтроль обеспечивается только этим фактором, образуется смесь α - и β -изомеров вследствие действия аномерного эффекта. Однако в большинстве случаев для препаративных целей достигаемая селективность недостаточно высока. Наиболее удобным и эффективным из методов стереоконтроля, на наш взгляд, является использование удаленных ацильных групп при О-3, О-4 и О-6. Наличие в структуре донора этих групп способствует образованию продукта с *транс*-селективностью по отношению к ацильной группе. Одним из вероятных механизмов стереонаправляющего влияния удаленных ацильных групп является анхимерное содействие.

Усилия по синтезу донора с набором защитных групп, обеспечивающих удаленное анхимерное содействие, не всегда соответствуют полученному результату с точки зрения эффективности контроля стереохимии. Поэтому для стереоселективного построения α -(1 $\rightarrow$ 3)-гликозидной связи при помощи доноров, несущих удаленные содействующие заместители, проводилась оптимизация состава защитных групп глюкозил-донора таким образом, чтобы обеспечивалось образование максимально возможной доли α -продукта.

Эффективность контроля стереохимии за счет удаленного анхимерного содействия в качестве альтернативы сравнивали с эффективностью другой стереонаправляющей защитной группы — бензилиденовой, α -стереонаправляющий эффект которой в глюкозных донорах описан в литературе.

Таким образом, перед тем, как выбрать способ построения α -(1 $\rightarrow$ 3)-связи, были синтезированы и изучены доноры с двумя типами стереонаправляющих защит, а также доноры, имеющий гибридный состав стереонаправляющих групп (Рис. 1). Доноры **1** и **3** имеют содействующую группу при О-3, в доноре **3** содействующий эффект ацильной группы при О-3 усилен добавлением в его структуру содействующей группы при О-6. Донор **2** необходим для сравнения эффектов ацильных групп при О-3 и О-6. Так как, согласно наиболее вероятной схеме синтеза α -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных олигосахаридов, будут использоваться ди- и тетрасахаридные доноры (для которых наличие ацильной группы при О-3 в гликозилирующем моносахариде невозможно), важно сравнить эффективность α -стереонаправляющего влияния одиночной ацильной группы при О-6 с ди-О-ацелированными донорами типа **3**.

Донор **4** несет бензилиденовую стереонаправляющую группу. Донор **5** позволит определить, сможет ли комбинация двух защитных групп с различными принципами стереоконтролирующего влияния, 3-О-ацетильной и 4,6-О-бензилиденовой, повысить выход α -изомера. Соединение **6**, не содержащее стереоконтролирующих групп, послужит в качестве стандарта стереоселективности гликозилирования.

Зачастую каждый конкретный набор защитных групп гликозил-доноров требует оптимизации уходящей группы и условий ее активации. В данном случае выбор уходящей группы обусловлен тем, что в практике нашей лаборатории *N*-фенилтрифторацетимидатная группа часто используется в глюкозных донорах, несущих удаленные содействующие группы. Это связано с тем, что она одна из многих изученных обеспечивает почти количественный выход гликозилирований с таким набором защитных групп.

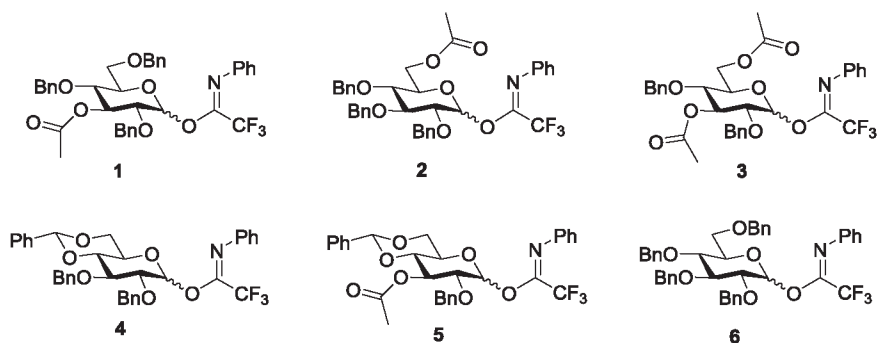


Рисунок 1. Глюкозные доноры, несущие α -стереонаправляющие защитные группы.

Кроме совместимости с определенным набором защитных групп *N*-фенилтрифторацетимидатная группа удобна для осуществления конвергентной сборки α -

(1→3)-связанных олигосахаридов. Временной защитной группой аномерного центра в случае использования N-фенилтрифторацетимидатов может быть п-метоксифенильная, поскольку конвергентная схема синтеза подразумевает, что защитная группа аномерного центра одновременно должна выдерживать условия гликозилирования и позволять в одну-две стадии замещать ее на уходящую группу.

С учетом всех этих соображений был синтезирован и изучен набор N-фенилтрифторацетимидатных гликозил-доноров **1-6** (Рис. 1). Диол **7** является исходным соединением для получения N-фенилтрифторацетимидоильных доноров **3-5** (Схема 1). Сложность в этой схеме представляет только необходимость региоселективного введения 3-О-ацетата и 2-О-бензила. Для осуществления этого была использована методика, описанная в литературе для 4,6-бензилиден-защищенного β-метилглюкозида. Бензильная группа в диол **7** была введена посредством бензилирования промежуточно образующегося *in situ* станнилиденового ацетала бензилбромидом. Поскольку не существует метода региоселективного введения бензильной группы в диол такой структуры, выход продукта **8**, составивший 58%, мы сочли оптимальным.

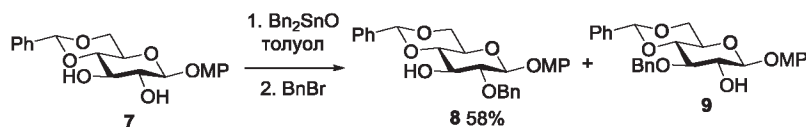


Схема 1. Синтез предшественников доноров **3-5**.

Доказательство структуры полученных соединений **8** и **9** основывалось на величинах хим. сдвигов атомов C-2 и C-3 в спектрах ^{13}C -ЯМР. Сигналы атомов C-2 и C-3, атомы кислорода при которых несут бензильную группу, находятся в области 80-82 м.д., тогда как для C-2 и C-3, несущих небензилированные гидроксильные группы – в области 73.0-74.3 м.д. Кроме того, положение бензильной группы соединения **8** подтвердилось на последующих стадиях после ацилирования свободной ОН-3, когда сигнал протона Н-3 в результате 3-О-ацилирования смещался в слабое поле (см. ниже).

Из 2-О-бензилированного п-метоксифенилглюкозида **8** были синтезированы трифторацетимиданые доноры **3** и **5** (Схема 2). Для этого раскрытием бензилидена в присутствии триметилсилилтрифлорометансульфоната (TMSOTf) в соединении **8** получили **10** с выходом 90%.

Подтверждение селективности раскрытия бензилидена в субстрате **8** и других бензилиден-защищенных моносахаридах, использованных далее в синтезе, базировалось на рассмотрении хим. сдвигов атомов углерода C-4 и C-6. В спектре ^{13}C ЯМР диола **10** C-4 имеет характерный для наличия бензильной группы при О-4 хим. сдвиг 77.1 м.д. Одновременно с этим значение хим. сдвига сигнала C-6 (62.2 м.д.) соответствует тому, что C-6 в **10** связан с неалкилированным атомом О-6.¹⁹ В спектре ^{13}C ЯМР п-метоксифенил-2,6-ди-О-бензил-β-глюкозида, полученного в качестве побочного продукта в одном из

экспериментов в процессе оптимизации условий раскрытия, хим. сдвиги сигналов атомов С-4 и С-6 имели значения 71.3 м.д. и 70.1 м.д.

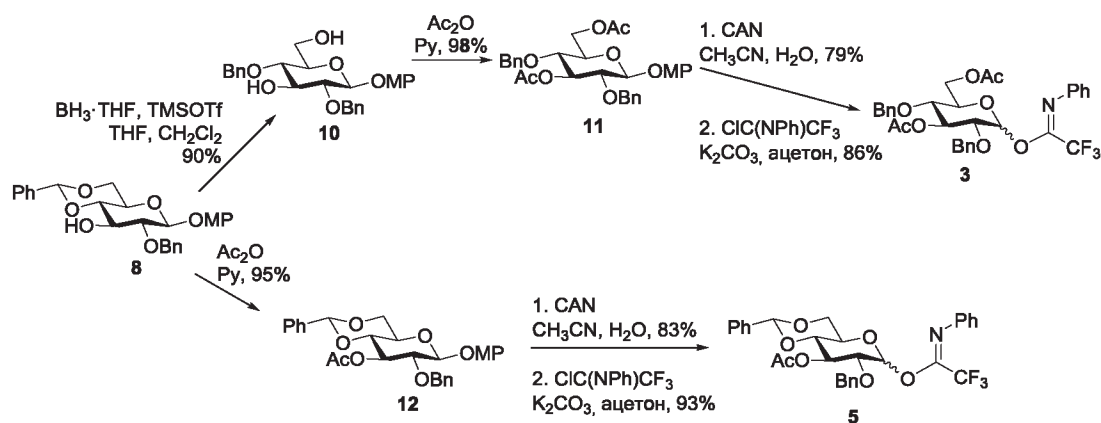


Схема 2. Синтез доноров 3 и 5.

Ацетилирование диола **10**, прошедшее с почти количественным выходом, позволило получить диацетат **11**. Данные его спектров дополнительно подтвердили региоселективность стадий получения 2-О-бензилированного п-метоксифенилглюкозида **8** и диола **10**. Слабополюный сдвиг сигнала Н-3 в спектре ^1H -ЯМР со значения 3.75 м.д. в исходном диоле **10** до 5.33 м.д. в продукте его ацилирования свидетельствует о том, что ацетильная группа связана именно с О-3. Такое же изменение произошло с сигналами, соответствующими Н-6: в исходном диоле **10** хим. сдвиги Н-6 составляли 3.83 и 3.66 м.д., тогда как после ацетилирования — 4.36 и 4.25 м.д..

Удаление п-метоксифенильной группы проводили действием аммоний-церий (IV) нитрата (CAN) в смеси ацетонитрил-вода, выход полуацетала составил 79%. Об удалении п-метоксифенильной группы свидетельствовало исчезновение в спектре ^1H -ЯМР двух дублетов 7.02 и 6.84, соответствующих фенильному фрагменту метоксифенильной группы, и синглета 3.78, принадлежащего метоксильной группе. Образование смеси полуацеталей подтвердилось появлением в спектре ^1H -ЯМР двух дублетов 5.25 м.д. и 4.83 м.д. с константами $J_{1,2}$ 3.4 Гц и 7.7 Гц, соответственно, являющихся сигналами аномерных протонов. В углеродном спектре аномерным атомам углерода этой смеси соответствовали сигналы 90.7 и 97.3 м.д. В ходе дальнейшего синтеза фрагментов α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана каждое удаление п-метоксифенильной защиты аномерного центра подтверждалось аналогичными изменениями в ЯМР спектрах.

Донор **3** был получен из полуацетала действием *N*-фенилтрифторацетилимидоилхлорида. ЯМР спектры синтезированного таким образом донора **3** были идентичными спектрам этого соединения, описанным ранее. Этот факт дополнительно подтверждает строение всех соединений на синтетическом пути от диола **7** до донора **3**.

Схема синтеза бензилиден-защищенного донора **5**, несущего ацетильную группу при О-3, из 2-О-бензилированного **8** имеет принципиально те же стадии, что и синтез

донора **3** (Схема 2). Свободная гидроксильная группа при С-3 2-О-бензилированного метоксифенилгликозида **8** была защищена ацетильной группой. В две стадии, удалением п-метоксифенильной и введением уходящей группы, получали донор **5**.

Для получения дибензилированного донора **4**, был использован 3-О-бензилированный п-метоксифенилгликозид **9** (Схема 3), являвшийся побочным продуктом синтеза **8**. Бензилирование свободной ОН-2, удаление п-метоксифенильной группы и введение уходящей группы в три стадии привели к донору **4**.

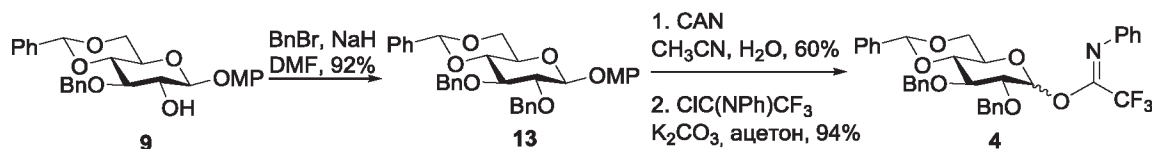


Схема 3. Синтез дибензилированного донора **4**.

Для изучения стереонаправляющего влияния различных наборов защитных групп доноры **1**, **2**, **3-6** вводили в реакцию гликозилирования с вторичным и первичным акцепторами **14** и **16** (Таблица 1). Эксперименты с двумя различными типами акцепторов необходимы, чтобы выявить достижимый предел α -стереоселективности. Вторичный акцептор **14**, синтез которого описан в литературе, содержит ОН-3 группу, α -гликозилирование которой является центральной проблемой планируемого синтеза. Гликозилирование первичного акцептора **16** вследствие его высокой реакционной способности должно отражать наихудшую стереоселективность. Акцептор **16**, необходимый для этого исследования, был получен в две стадии из 2-О-бензилированного п-метоксифенилгликозида **8** (Схема 4).

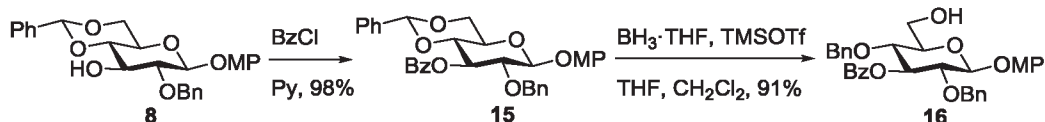


Схема 4. Синтез первичного акцептора **16** из 2-О-бензилированного п-метоксифенилгликозида **8**.

Обе стадии синтеза **16** повторяли некоторые реакции, которые проводились с целью синтеза *N*-фенилтрифторацетимидоильных доноров **3** и **5** (Схема 2).

Проводя эксперименты по гликозилированию донорами **1**, **2**, **3-6**, при доказательстве аномерной конфигурации образовавшихся продуктов мы ориентировались на константу $J_{1,2}$, которая для α -гликозидов имеет значение 3.0–4.0 Гц, а для β -гликозидов — 7.0–8.0 Гц. Везде, где было возможно, аномеры выделялись из смеси продуктов гликозилирования в индивидуальном виде, и соотношение аномеров определялось по их количеству. В тех случаях, когда выделение аномеров в индивидуальном виде не представлялось возможным, соотношение $\alpha:\beta$ определялось на основании данных ЯМР и аналитической ВЭЖХ.

Для активации *N*-фенилтрифторацетимидоильных доноров **1-6** использовали MeOTf. Как показало гликозилирование полностью бензилированным донором **6** (Таблица

1, строка 1), в отсутствии стереонаправляющих групп при гликозилировании вторичного акцептора **14** образуются аномерные дисахариды в соотношении $\alpha:\beta = 1.5:1$. Это соотношение осталось практически без изменений при введении в структуру глюкозил-донора ацетильной группы при О-3 (донор **2**, строка 2). В доноре **1** присутствуют одновременно две удаленные стереонаправляющие группы, при О-3 и О-6, и конденсация этого донора с акцептором **14** происходит с образованием смеси аномеров с пятикратным преобладанием α -изомера. Конденсация донора **3**, несущего только одну удаленную сложноэфирную группу при О-6, приводит к смеси аномеров в соотношении $\alpha:\beta = 16:1$ (Строка 4).

Таблица 1. Гликозилирование донорами **6**, **2**, **1** и **3** вторичного и первичного акцепторов **14**, **22** и **16**. Условия реакции: MeOTf, CH₂Cl₂, AW-300, -35°C → -0°C.

№	Донор	Акцептор	Продукт реакции
1	6 R ¹ , R ² = Bn		17 R ¹ , R ² = Bn, $\alpha:\beta = 1.5:1$ (90%)
2	2 R ¹ = Bn, R ² = Ac		18 R ¹ = Bn, R ² = Ac, $\alpha:\beta = 1.4:1$ (98%)
3	1 R ¹ , R ² = Ac		19 R ¹ , R ² = Ac, $\alpha:\beta = 5.3:1$ (89%)
4	3 R ¹ = Ac, R ² = Bn		20 R ¹ = Ac, R ² = Bn, $\alpha:\beta = 16:1$ (77%)
5			23 $\alpha:\beta = 16.4:1$ (93%)
5	6 R ¹ , R ² = Bn		24 R ¹ , R ² = Bn, $\alpha:\beta = 1:3.3$ (99%)
6	2 R ¹ = Bn, R ² = Ac		25 R ¹ = Bn, R ² = Ac, $\alpha:\beta = 1:2.3$ (94%)
7	1 R ¹ , R ² = Ac		26 R ¹ , R ² = Ac, $\alpha:\beta = 11.2:1$ (93%)
8	3 R ¹ = Ac, R ² = Bn		27 R ¹ = Ac, R ² = Bn, $\alpha:\beta = 4:1$ (97%)

Почему 3,6-ди-О-ацетилированный донор **1** продемонстрировал более низкую α -селективность, чем донор **3**, несущий лишь одну ацетильную группу при О-6, частично объяснилось несколько позже (см. ниже), когда исследовалась стереохимия конденсации 3,6-ди-О-ацелированного донора **21** с акцептором **22** со свободной ОН-3 (Строка 5). В

смеси продуктов этой реакции преобладание α -аномера над β -аномером такое же, как и при гликозилировании донором **1**. По нашему мнению, разница в стереохимическом результате реакций донора **1** с акцептором **14** (Строка 3) и донора **21** с акцептором **22** может быть объяснена разницей защитных групп в акцепторах **14** и **22** в большей мере, чем в донорах **1** и **21**. Как нам кажется, замена при О-6 ацетильной группы в **1** на бензоильную **21** не должна была оказать столь большого влияния. Поэтому, скорее всего, уменьшение α -селективности при гликозилировании 3,6-ди-О-ацелированным донором **1** акцептора **14** (по сравнению с реакцией **3** и **14**) связано именно со структурой акцептора.

Эта предположение подтверждается также серией гликозилирований первичного акцептора **16** (Строки 5-9, Таблица 1). Из этой серии экспериментов видно, что реакция с 3-О-ацелированным донором **2** чуть более α -селективна (Строка 6), чем с донором **6** (Строка 5), не имеющим ни одной стереонаправляющей ацетильной группы. При этом ди-О-ацелированный донор **1** с акцептором **16** проявляет самую высокую α -стереоселективность, давая соотношение $\alpha:\beta = 11.2:1$. Также гликозилирование с 6-О-ацелированным донором **3**, приводящее к соотношению $\alpha:\beta = 4:1$, оказывается более селективным (Строка 7), чем гликозилирование 3-О-ацелированным **2** (Строка 6) и полностью бензилированным **6** (Строка 5), но менее селективным, чем ди-О-ацелированным **1**. В итоге, в ряду гликозилирования первичного акцептора **16** прослеживается обычная для частично ацелированных глюкозных доноров тенденция, когда α -селективность нарастает в ряду: нет ацетильной группы < 3-О-ацелированный донор < 6-О-ацелированный донор < 3,6-ди-О-ацелированный донор.

Подытоживая исследование частично ацелированных *N*-фенилтрифторацетимидатов **2-3**, можно сделать вывод, что при гликозилировании вторичной гидроксильной группы при С-3 в глюкозных акцепторах 3,6-ди-О-ацелированным глюкозным донором типа **1** или 6-О-ацелированным донором типа **3** можно ожидать стереоселективность в диапазоне соотношений $\alpha:\beta$ от 5:1 (4:1 для 6-О-ацелированного) до 16:1.

Способность 4,6-О-бензилиденовой защитной группы оказывать α -стереонаправляющий эффект была отмечена в литературе. Кроме того, интересно, какой эффект имеет ацетильная группа при О-3 в конформационно жестких 4,6-О-бензилиден-защищенных донорах. Эти типы защит были исследованы с использованием 4,6-О-бензилиден-защищенных глюкозил-доноров **4** и **5**. В общем, гликозилирование ими оказалось менее α -селективным (Таблица 2) чем гликозилирование частично ацелированными донорами **1-3**.

Кроме того, оказалось, что конденсация 3-О-ацелированного производного **5** (Строка 2) приводит к смеси продуктов, в которой содержится меньше α -изомера ($\alpha:\beta =$

1:1.4, Строка 2, Таблица 2), чем в результате реакции с донором **4** ($\alpha:\beta = 2.2:1$, Строка 1, Таблица 1), не имеющим ацильных групп. Такое неожиданное возникновение β -стереоселективности может быть связано с тем, что подобно фтору в 2-О-бензил-3-фтор-3-дезоксиглюкозил-донорах, электроноакцепторная 3-О-ацетильная группа делает механизм реакции более похожим на S_N2 , в результате чего промежуточно образующийся α -трифлат замещается с образованием β -продукта.

Также на стереохимию обеих реакций оказывает влияние температура. Тогда как при стандартном режиме проведения гликозилирования (когда донор активируется при -50°C ; Строки 1 и 2, Таблица 2) соотношение $\alpha:\beta$ изомеров составило 2.2:1 для дибензилированного донора **4** и 1:1.4 для 3-О-ацетилированного донора **5**, при комнатной температуре обе реакции привели к повышенному содержанию α -изомера с соотношением 3.8:1. Для донора **5** такой стереохимический результат подтвердился при попытке увеличить выход этой реакции за счет смены промотора с MeOTf на AgOTf (Строка 5).

Таблица 2. Гликозилирование донорами **4** и **5** вторичного и первичного акцепторов **14** и **16**.

№	Донор	Акцептор/температура/ условия реакции*	Продукт реакции
1	4 R = Bn	$-50^\circ\text{C} \rightarrow -5^\circ\text{C}$	28 R = Bn, $\alpha:\beta = 2.2:1$ (95%)
2	5 R = Ac		29 R = Ac, $\alpha:\beta = 1:1.4$ (92%)
3	4 R = Bn	20°C	28 R = Bn, $\alpha:\beta = 3.8:1$ (78%)
4	5 R = Ac		29 R = Ac, $\alpha:\beta = 3.8:1$ (64%)
5	5 R = Ac	AgOTf, CH_2Cl_2 , AW-300, 20°C	29 R = Ac, $\alpha:\beta = 3:1$ (71%)
6	4 R = Bn	$-35^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}$	30 R = Bn, $\alpha:\beta = 5.2:1$ (96%)
7	5 R = Ac	20°C	31 R = Ac, $\alpha:\beta = 5.9:1$ (96%)

*Условия реакции: MeOTf, CH_2Cl_2 , AW-300, где не обозначено иное

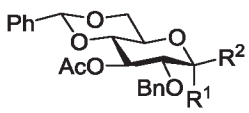
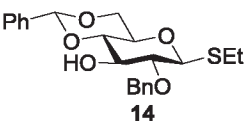
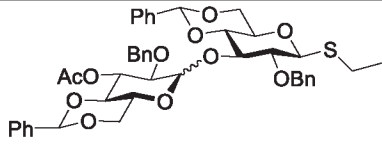
Чтобы убедиться в том, что повышение температуры не приводит к аномеризации уже образовавшегося β -продукта, был проведен эксперимент по выдерживанию соответствующих дисахаридов **29 α** и **29 β** в условиях реакции в присутствии трифторметансульфоновой кислоты. В течение четырех часов не наблюдалось образования

даже незначительного количества второго изомера, что подтверждает отсутствие явления аномеризации в данных условиях.

Также было исключено влияние аномерной конфигурации глюкозил-донора **5** на выход α -продукта. Для этого было проведено гликозилирование индивидуальными α - и β -аномерами донора **5** — **5 α** и **5 β** (Таблица 3). Реакция с β -донором **5 β** привела лишь к незначительно большему количеству β -изомера в смеси продуктов **29** (α : β 1:1.5), чем в случае α -донора **5 α** (α : β 1:1.2) (Строки 1 и 2, таблица 3).

Наконец, гликозилирование первичного акцептора **16** донорами **4** и **5** привело к стереохимическому результату (Строки 6 и 7, таблица 3), в котором α -изомер по количеству превышал β -изомер более чем в 5 раз. Вероятно, такие доноры можно использовать для гликозилирования первичных гидроксильных групп, что, однако, не входило в задачу нашего синтеза.

Таблица 3. Исследование влияния аномерной конфигурации глюкозил-донора на стереохимический результат гликозилирования. Условия реакции: MeOTf, CH₂Cl₂, AW-300, -35°C → -15°C.

№	Донор	Акцептор	Продукт реакции
			
1	5α R ¹ = OC(N=Ph)CF ₃ , R ₂ = H		29 α : β = 1:1.2 (91%)
2	5β R ¹ = H, R ₂ = OC(N=Ph)CF ₃		29 α : β = 1:1.5 (91%)

Полученные данные позволили сделать несколько ключевых для синтеза фрагментов α -(1→3)-глюкана выводов.

Во-первых, среди исследованных наборов защитных групп со стереонаправляющим эффектом наилучшая α -стереоселективность достигается, когда при О-3 и О-6 есть потенциально содействующие ацильные группы. Во-вторых, наличие только одной ацильной группы при О-6 также способно обеспечить приемлемую для синтетических целей α -стереоселективность. Этот факт является определяющим в выборе типа стереонаправляющей защиты, поскольку в случае использования (1→3)-связанных ди- и олигосахаридных доноров О-3 участвует в образовании гликозидной связи и доступной для введения ацильной стереонаправляющей группы остается только О-6. Выбор типа защиты глюкозил-донора, согласно которому при О-3 и О-6 присутствуют ацильные группы, определяет также и тип гликозил-акцептора, в котором в соответствии с выбранным типом защиты донора при О-4 и О-6 должны быть бензильная и ацильная группа соответственно.

3. Синтез спейсированных олигосахаридов. Результаты исследования влияния стереонаправляющих заместителей в глюкозил-донорах и условий реакции на эффективность и α -селективность гликозилирования сделали возможным сборку

олигосахаридных цепей фрагментов α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана по сходящейся (конвергентной) схеме. Кроме сокращения количества стадий (в расчете на каждую ветвь синтеза), у конвергентной схемы (в сравнении с линейной) есть еще одно преимущество, которое имеет прямое отношение к конкретной задаче стереоселективного синтеза фрагментов α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана. В конвергентной схеме сокращается количество стадий, на которых образуются α -глюкозидные связи, а следовательно, уменьшается и количество разделений аномерных смесей продуктов.

Важным элементом структуры синтезируемых фрагментов α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана является аминогруппа спейсера, необходимая для их конъюгации с биотином или белком-носителем. От типа защитной группы на этой аминогруппе или предшествующей ей функциональной группы зависит выбор типа защитных групп для гидроксильных углеводных остатков. В практике углеводного синтеза распространены всего несколько вариантов. В данной работе в качестве спейсерного фрагмента, являющегося предшественником спейсера с концевой аминогруппой, был выбран 3-трифторацетамидопропанол. Трифторацетамидная защита устойчива в реакциях, применяемых для сборки олигосахаридных цепей, и совместима с условиями удаления бензильных защитных групп.

3.1. Синтез три- и пентасахаридов.

С целью проверки стратегии конвергентного синтеза была осуществлена сборка трисахаридной цепи с использованием ацетильной группы при О-3 в качестве временной ацильной группы, имеющей стереонаправляющий эффект.

При попытке дезацетилирования обнаружилось, что ацетильная группа при О-3 как спейсированного моносахаридного блока, так и спейсированного трисахарида выдерживает гораздо более жесткие условия, как кислые, так и щелочные, чем обычно. Это приводило к тому, что в процессе удаления ацетильной защиты также происходило снятие трифторацетамидной защиты в спейсере. Следовательно, ацетильную группу, которая не подошла на роль временной защитной группы при О-3, необходимо было заменить на другую селективно удаляемую защиту.

На роль временной и стереонаправляющей ацильной защиты при О-3 вместо ацетильной группы была выбрана левулиноильная группа (Схема 5). Из литературных источников известно, что она может быть легко введена в структуру с выходами, близкими к количественным, а ее удаление происходит в мягких условиях обработкой моноацетатом гидразина ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{AcOH}$). В таких условиях бензоильная и N-трифторацетильная группа инертны.

Левулиновую группу ввели в моносахарид **8** обработкой левулиновой кислотой и сшивающим реагентом N,N'-дициклогексилкарбодиимидом (DCC). В ^1H ЯМР спектре продукта **31**, полученного с почти количественным выходом, хим. сдвиг триплета протона Н-3 кольца сместился почти на 1.5 м.д. в слабое поле относительно сигнала этого же

протона в исходном **8**. Этот признак ацилирования ранее наблюдали также при ацетилировании или бензоилировании О-3. Кроме того, появились сигналы, соответствующие левулиноильной группе.

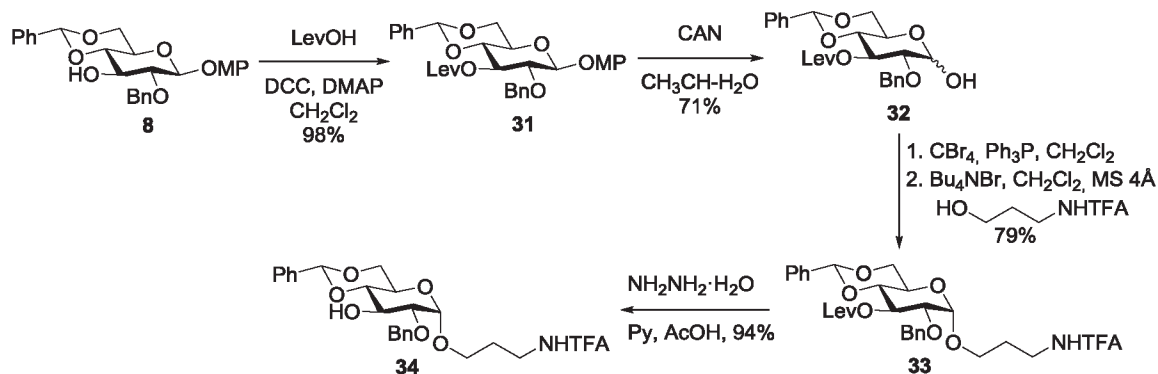


Схема 5. Синтез спейсерированного моносахаридного акцептора **34** с использованием.

Полуацеталь **32** получали из п-метоксифенилглюкозида **31** удалением п-метоксифенильной группы действием CAN. Спейсерированный глюкозид **33** был получен из полуацетала **32** с выходом 79% по реакции Лемье. Эта реакция протекает по механизму, который обеспечивает, за редкими исключениями, образование чистых α -изомеров. Реакция позволила получить стереохимически чистый спейсерированный α -глюкозид **33** с выходом 79% на две стадии, считая от полуацетала **32**. О α -стереохимии образовавшейся глюкозидной связи в продукте **33** судили по константе $J_{1,2} = 3.8$ Гц аномерного протона с хим. сдвигом δ 4.70 м.д. Удаление левулиноильной группы в спейсерированном глюкозиде **33** действием моноацетата гидразина прошло без каких-либо затруднений, приводя к спейсерированному акцептору **34** с выходом 94%. Удаление левулиноильной группы при О-3 сопровождалось в спектрах ^1H -ЯМР кроме исчезновения сигналов, отвечающих левулиновой группе, изменением положения сигнала Н-3 с δ 5.50 м.д. до 4.08 м.д.

Синтез акцептора **34** с использованием левулиноильной группы в качестве временной ацильной группы доказал ее совместимость с трифторацетамидом. С учетом этого результата был синтезирован дисахаридный донор **40** с использованием моносахаридного донора **37**, несущего кроме 6-О-бензоильной α -стереонаправляющую левулиноильную группу при О-3 (Схема 6).

На первой стадии диол **10** был региоселективно бензоилирован, в результате чего был получен глюкозил-акцептор **22**.

Соединение **22** со свободной гидроксильной группой при С-3 и п-метоксифенильной группой при аномерном центре являлось одновременно и предшественником донора **37**, и глюкозил-акцептором. Первой реакцией на пути к донору **37** было ацилирование гидроксила при С-3, которое протекало с практически количественным выходом при обработке **22** левулиновой кислотой и DCC.

Из-за проблем с растворимостью исходного субстрата полуацеталь **36** не мог быть получен из п-метоксифенилгликозида **35** действием CAN в смеси $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$. Для устранения затруднений, вызванных нерастворимостью **35**, реакцию удаления п-метоксифенильной группы проводили в двухфазной системе толуол – ацетонитрил – вода, в результате чего полуацеталь **36** был получен с выходом 67%. Позже мы показали, что замена толуола на бензол позволяет поднять выход реакции удаления п-метоксифенила в **35** до 80%.

Из полуацетала **36** был синтезирован 3-О-левулинированный донор **37**. Препаративное получение дисахарида **38a** проводили гликозилированием донором **37**

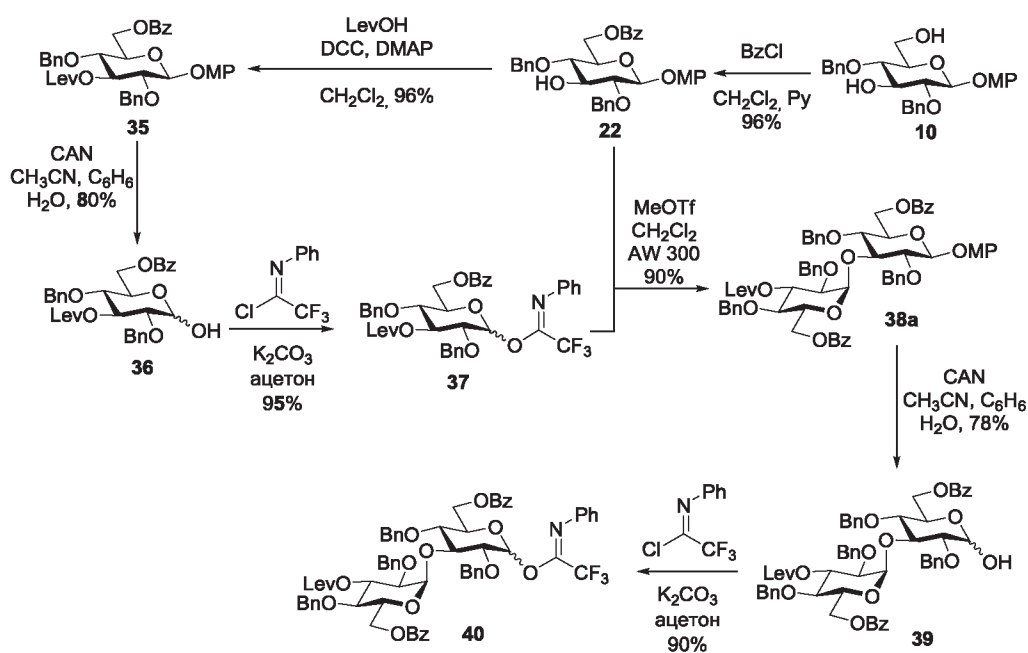


Схема 6. Синтез дисахаридного донора **40**, несущего бензоильную стереонаправляющую группу при О-6. акцептора **22**. Используя эту реакцию как модель, был проведен поиск условий гликозилирования, с помощью которых планировалось обеспечить максимальную эффективность гликозилирования блоками длиной более двух моносахаридных остатков. Была проведена серия опытов в различных растворителях (дихлорметан, диэтиловый эфир, дихлорэтан) и с различными промоторами (MeOTf , TfOH , AgOTf). В результате обнаружили, что промотирование реакции MeOTf в дихлорметане, позволяют добиться наилучшего результата, если медленно повышать температуру реакционной смеси после добавление промотора. Таким методом смесь дисахаридов **38** получили с выходом 94% и соотношением изомеров $\alpha:\beta = 27:1$.

Очистку α -аномера **38a** от примеси побочного β -изомера **38b** проводили методом ВЭЖХ. Стереохимия α -изомера **38a** подтверждалась на основании величины $J_{1,2} = 3.5$ Гц сигнала при δ 5.61 м.д., соответствующего протону при аномерном центре новой гликозидной связи, и хим. сдвига сигнала С-1 (δ 96.9 м.д.) в углеродном спектре. β -Конфигурацию новообразованной гликозидной связи β -продукта **38b** подтверждали,

основываясь на присутствии в протонном спектре сигнала δ 5.19 с характерной константой $J_{1,2} = 7.6$ Гц.

Дисахаридный полуацеталь **39**, так же как и моносахаридный полуацеталь **36**, является основным синтетическим блоком на протяжении всего процесса сборки α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкановых фрагментов. Поэтому к синтезу дисахаридного полуацетала **39** возвращались много раз. Удаление *n*-метоксифенильной группы обработкой дисахарида **38a** CAN сначала проводили в водном CH_3CN , а позже — в системе бензол – ацетонитрил – вода, как наилучшей. По первой методике полуацеталь **39** получался с выходом 64%, тогда как при использовании двухфазной системы с бензолом его выход возрос до 78%. Воспроизводимый выход удаления *n*-метоксифенильной группы, достигающий почти 80% на стадии дисахарида, выглядит более надежным, чем процедура удаления другой распространенной защиты аномерного центра – аллильной группы. Таким образом, использование *n*-метоксифенильной группы для временной защиты аномерного центра и левулиноильной группы – для защиты гидроксила при С-3 представляется оптимальным.

Дисахаридный донор **40**, несущий бензоильную группу при О-6 в восстанавливающем остатке получали с выходом 90% из полуацетала **39**.

Гликозилирование дисахаридным донором **40** моносахаридного акцептора **34**, проведенное в условиях, оптимизированных на примере применения моносахаридного донора **37**, привело к аномерной смеси спейсированных трисахаридов с высокими выходами и α -стереоизбирательностью (Схема 7). В результате разделения этой аномерной смеси были выделены α -изомер **41** с выходом 72% и побочный β -изомер в количестве 5%. На наличие трех α -глюкозидных связей в структуре полученного трисахарида **41** указывали сигналы аномерных протонов при δ 5.69, 5.63 и 4.87 м.д. с характерными величинами констант $J_{1,2} = 3.5$ -3.8 Гц. Сигнал аномерного протона побочного β -изомера находился в протонном спектре при δ 5.03 м.д. и имел свидетельствующую о β -конфигурации аномерного центра константу $J_{1,2} = 7.3$ Гц.

Высокая стереоселективность получения **41** показывает, что одной бензоильной группы при О-6 достаточно для обеспечения α -стереоселективности (Строки 4 и 8, Таблицы 1), а выход 72% подтверждает возможность проведения конвергентной схемы синтеза фрагментов α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюканов с использованием олигосахаридных доноров.

Удаление левулиноильной группы в **41** моноацетатом гидразина привело к трисахаридному акцептору **42** с выходом 96%.

Конденсация дисахаридного донора **40** и трисахаридного спейсированного акцептора **42** при промотировании MeOTf позволила получить после очистки методом ВЭЖХ чистый α -изомер пентасахарида **43** с выходом 68%. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР полученного пентасахарида **43** проводили при помощи различных методик

двумерной корреляционной спектроскопии, наиболее информативным из которых оказался спектр НМВС. Этот спектр позволил приписать сигналы протонов и углеродов к каждому конкретному моносахаридному остатку, благодаря чему сигналы аномерных протона и углерода новообразованной гликозидной связи удалось распознать отдельно. Константа $J_{1,2} = 3.7$ Гц для аномерного протона (δ 5.67 м.д.) этой связи соответствовала α -конфигурации. Удаление левулиноильной группы в пентасахариде **43** привело к пентасахриднему акцептору **44** с выходом 96%. Свободная 3-ОН группа в конечном остатке глюкозы пентасахарида **44** делает возможным дальнейшее удлинение олигосахаридной цепи.

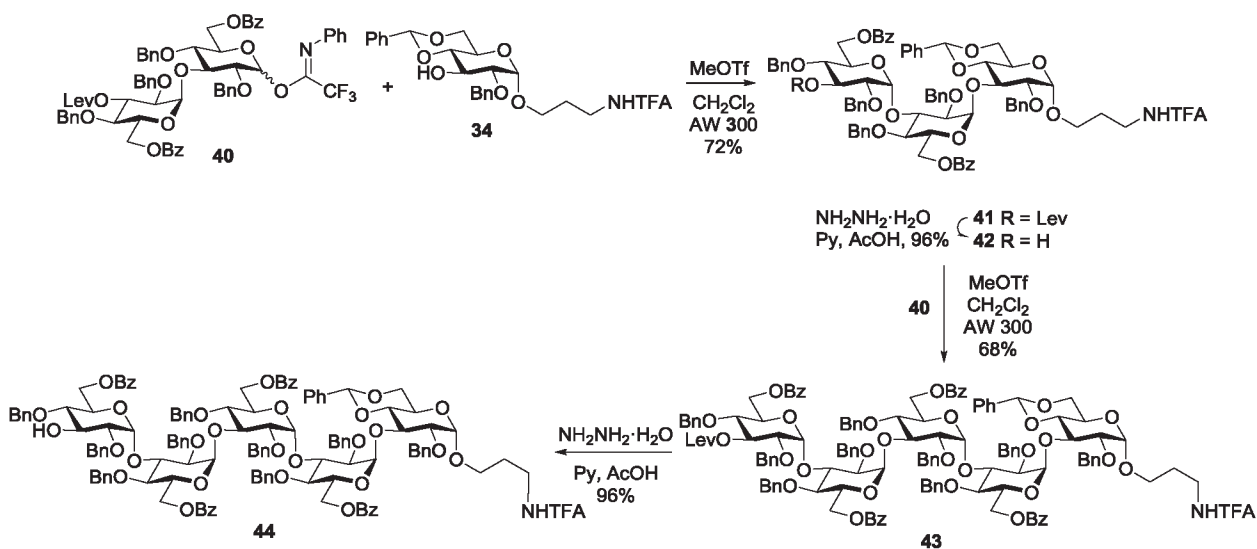


Схема 7. Синтез пентасахарида **43** и пентасахридного акцептора **44**.

При удалении защитных групп в трисахариде **42** и пентасахаририде **44** необходимо было соблюсти определенную очередность удаления бензильных, бензоильных и N-трифторацетильной защитных групп, хотя эти реакции в других синтезах могут обычно проводиться в любом порядке. Наиболее распространенный и надежный метод удаления бензильных групп — гидрогенолиз на палладиевом катализаторе замедляется или вовсе останавливается, если в реакционной смеси присутствует свободный амин, который отравляет катализатор. При особо неблагоприятном течении гидрогенолиза часть содержащего аминогруппу вещества может необратимо сорбироваться на поверхности катализатора. Чтобы избежать этого, первой стадией в каскаде превращений, направленных на получения незащищенных три- и пентасахридного фрагментов α -(1→3)-глюканов, должен был быть гидрогенолиз. Проводить дебензоилирование до гидрогенолиза нежелательно, потому что длительное выдерживание соединений **42** и **44** в основной среде, необходимое для исчерпывающего удаления всех бензоильных групп, может привести также и к частичному или даже полному удалению трифторацетильной группы, а, следовательно, к появлению свободной аминогруппы, затрудняющей гидрогенолиз.

Гидрогенолиз трисахарида **42** и пентасахарида **44** в присутствии $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ и последующая обработка дебензилированных продуктов NaOH в смеси метанол – вода позволили получить незащищенные трисахарид **45** и пентасахарид **46** с выходами 85% и 81%, соответственно (Схема 8).

В протонных спектрах ЯМР трисахарида **45** и пентасахарида **46** об удалении бензильных и бензоильных групп свидетельствовало отсутствие сигналов в области ароматических протонов δ 8.15-7.10 м.д. и сигнала δ 5.32-5.20 м.д., отвечающего ацетальному протону бензилиденовой группы. Сигналы аномерных протонов остатков глюкозы восстанавливающего конца, как и в защищенных предшественниках **42** и **44**, по-прежнему расположены правее ($\delta \sim 5.00$ м.д.), чем группа сигналов аномерных протонов остальных остатков глюкозы ($\delta \sim 5.40$ м.д.).

С использованием пентасахарида **46**, несущего свободную аминогруппу в спейсере, получали конъюгаты с биотином (**50**) и бычьим сывороточным альбумином (**48**). Для конъюгации олигосахарида и БСА выбрали сквартный линкер, позволяющий связать между собой аминогруппу спейсера с одной стороны и аминогруппу белка – с другой. Этот линкер устойчив в физиологических условиях и используется чаще, чем другие сшивающие реагенты.

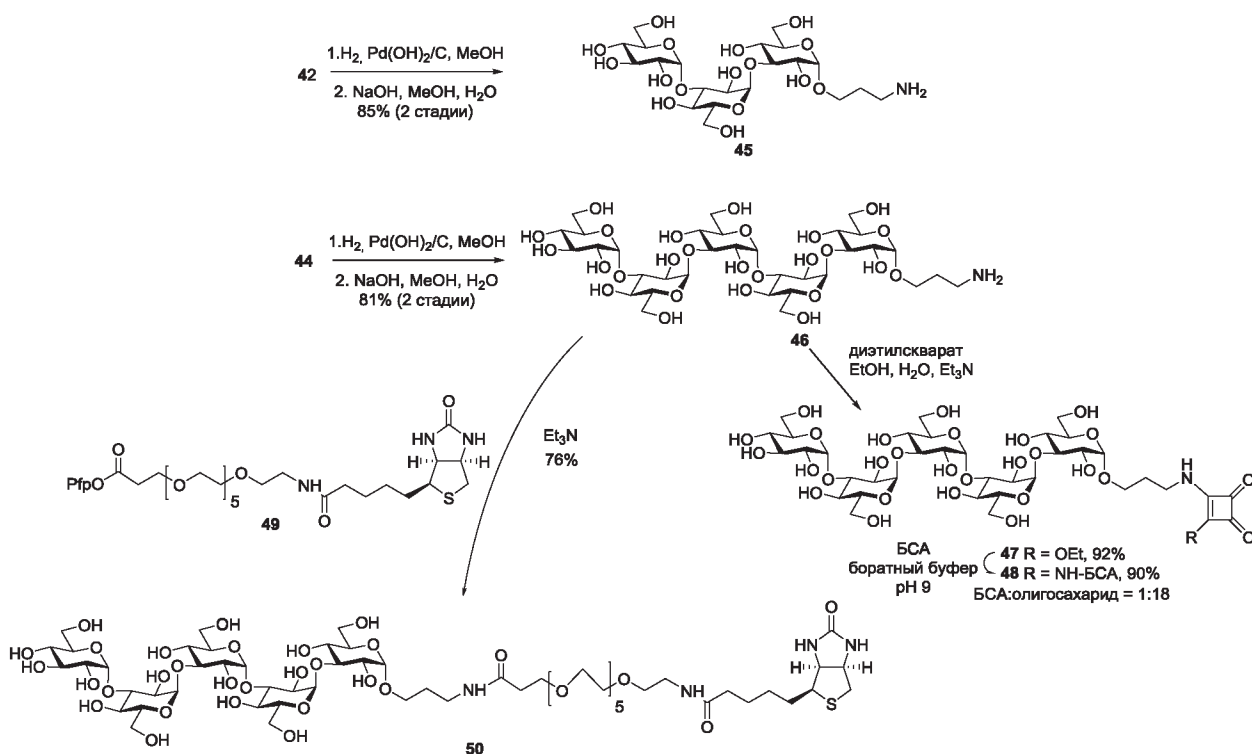


Схема 8. Удаление защитных групп в трисахаридах **52** и пентасахаридах **54** и получение конъюгатов три- и пентасахаридных фрагментов α -(1→3)-глюкоз с биотином и БСА.

На первой стадии конъюгации из соединения **46** получали промежуточный продукт **47**, содержащий сквартный линкер. Для того чтобы вторая этоксильная группа сквартного фрагмента заместила на амин, реакцию присоединения белка к сквартному

фрагменту промежуточного соединения **47** проводили при pH 9. После очистки гель-хроматографией конъюгат **48** был выделен с выходом 90% по белку. Согласно спектру MALDI-TOF, средняя молекулярная масса конъюгата равна 84240. Учитывая массу пентасахаридного фрагмента со скватратным линкером (964) и БСА (66460), средняя степень конъюгации составляет приблизительно 18 пентасахаридных фрагментов на одну молекулу белка.

Конъюгат **50** с биотином был получен обработкой раствора пентасахарида **46** активированным эфиром **49**. Присоединение биотина к пентасахариду было доказано наличием в масс-спектре молекулярного иона, соответствующего продукту **50**. В спектрах ЯМР этого продукта присутствовали сигналы, относящиеся как к олигосахаридной части, так и к биотиновому фрагменту.

3.2. Синтез гепта-, нона- и ундекасахаридов. Поскольку эффективность конвергентной схемы была доказана в ходе предыдущей работы, решено было изучить возможность применения тетрасахаридного донора для синтеза α -(1 $\rightarrow$ 3)-олигоглюкозидных цепей длиной 7 и более моносахаридных остатков. В качестве одного из исходных соединений в этих синтезах использовался трисахаридный спейсированный акцептор **42**.

Из дисахарида **38a** удалением левулиноильной защитной группы (Схема 9) был получен дисахаридный акцептор **51** с выходом 78%. Гликозилированием акцептора **51** донором **40** в условиях, описанных для получения дисахарида **38a** (Схема 6), был синтезирован тетрасахаридный предшественник **52**.

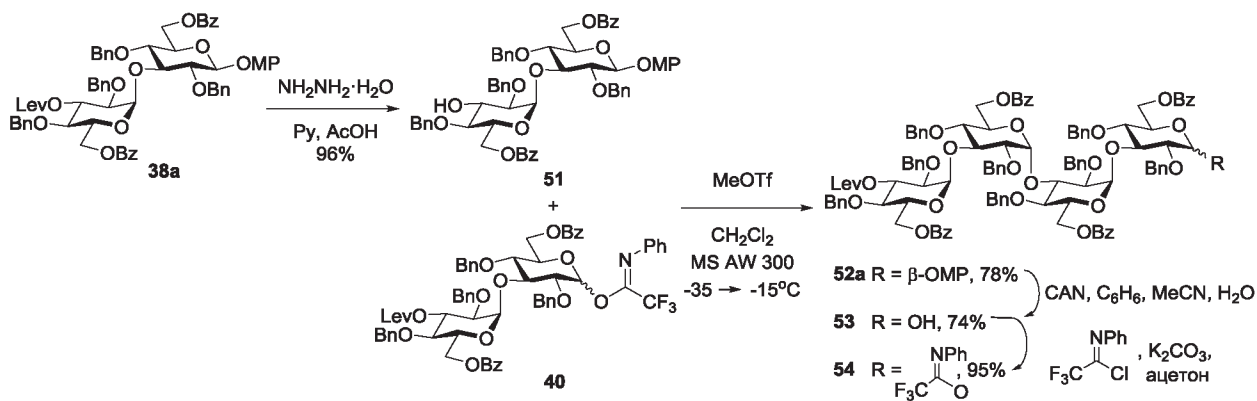


Схема 9. Синтез тетрасахаридного донора **54** из дисахаридного блока **38a**.

Выход чистого α -изомера **52a** после очистки методами ВЭЖХ составил 78%. β -Аномер был также выделен в индивидуальном состоянии с выходом 3%. Три дублета (δ 5.78, 5.66, 5.64 м.д.) с константами $J_{1,2}$ 3.5-3.6 Гц в протонном спектре тетрасахарида **52a** подтвердили, что новая глюкозидная связь имеет α -конфигурацию. На β -конфигурацию новой гликозидной связи в побочном β -изомере указывало, в частности, наличие в его

протонном спектре двух дублетов с константами $J_{1,2}$ 7.6-7.9 Гц, соответствующие β -связям третьего углеводного остатка и восстанавливающего остатка.

Удаление *p*-метоксифенильной группы тетрасахарида **52a** с помощью CAN было проведено в системе растворителей толуол – ацетонитрил – вода, а также бензол – ацетонитрил – вода. При использовании первой смеси выход полуацетала **53** составил всего 53%, в то время как при использовании бензола как соразтворителя полуацеталь **53** получили с выходом 74%. Обобщая, можно сказать, что использование системы бензол – ацетонитрил – вода обеспечило наилучший выход полуацеталей также и в случаях синтеза моносахаридного и дисахаридного полуацеталей **36** и **39** (Схема 6).

Из полуацетала **53** был получен *N*-фенилтрифторацетимидатный тетрасахаридный донор **54**. С использованием тетрасахаридного донора **54** и трисахаридного акцептора **42** получали гептасахарид **55** (Схема 10). Чтобы достичь максимального выхода реакции гликозилирования донором **54** акцептора **42**, проводилось изучение влияния порядка и скорости добавления субстратов и реагентов на выход гептасахарид **55**.

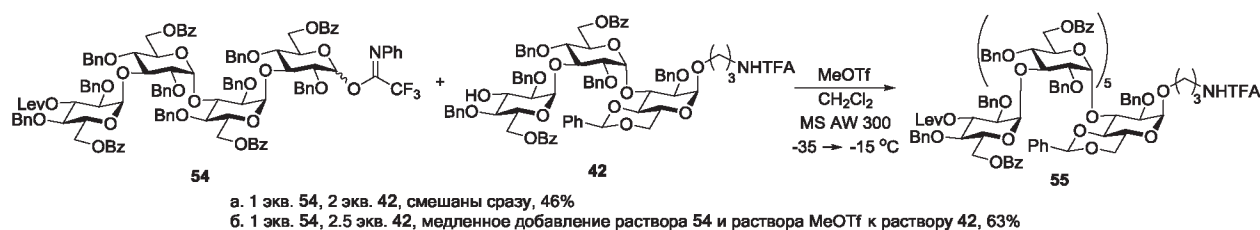


Схема 10. Синтез гептасахарид **55** с использованием тетрасахаридного донора **54**.

Стандартный порядок добавления, согласно которому прежде были смешаны акцептор и донор, а затем был добавлен MeOTf, позволил получить гептасахарид **55** с выходом всего 46%. При этом, чтобы увеличить выход, использовали двукратный избыток трисахаридного акцептора **42**, непрореагировавшую часть которого регенерировали. Исходя из предположения, что выход гликозилирования можно повысить, если активированный донор **54** будет находиться в реакционной смеси в условиях значительного избытка акцептора **42**, провели гликозилирование, медленно добавляя донор **54** и промотор MeOTf, каждый по отдельности, к раствору акцептора. Действительно, такой порядок добавления реагентов позволил повысить выход чистого α -изомера гептасахарид **55** (выделен методом ВЭЖХ) до 63%.

Из того факта, что в углеродном спектре полученного гептасахарид **55** присутствовали сигналы со значениями в интервале δ 97.9-95.3 м.д. и отсутствовали другие сигналы в аномерной области (кроме сигнала бензилиденовой группы), следовало, что образовавшаяся гликозидная связь имеет α -конфигурацию. Более детальное рассмотрение сигналов аномерных атомов и их характеристик, указывающих на структурные особенности полученного гептасахарид **55**, стало возможным благодаря спектру НМВС. С его помощью было сделано отнесение сигналов протонов кольца для

каждого моносахаридного остатка, а также прослежены все шесть гликозидных связей с C-3 предыдущих остатков глюкозы. Все сигналы аномерных протонов имели константы $J_{1,2}$ 3.6-3.7 Гц, подтверждающие α -конфигурацию аномерных центров, с ними связанных.

Гептасахарид **55** превратили в гептасахаридный акцептор **56**, удалив левулиновую группу в концевом глюкозном остатке с выходом 95% (Схема 11). Гликозилирование этого акцептора дисахаридным донором **40** в условиях, оптимизированных для получения **38a**, позволило получить чистый нонасахарид **57** с выходом 49%. В этом синтезе использовался двукратный избыток донора **40**.

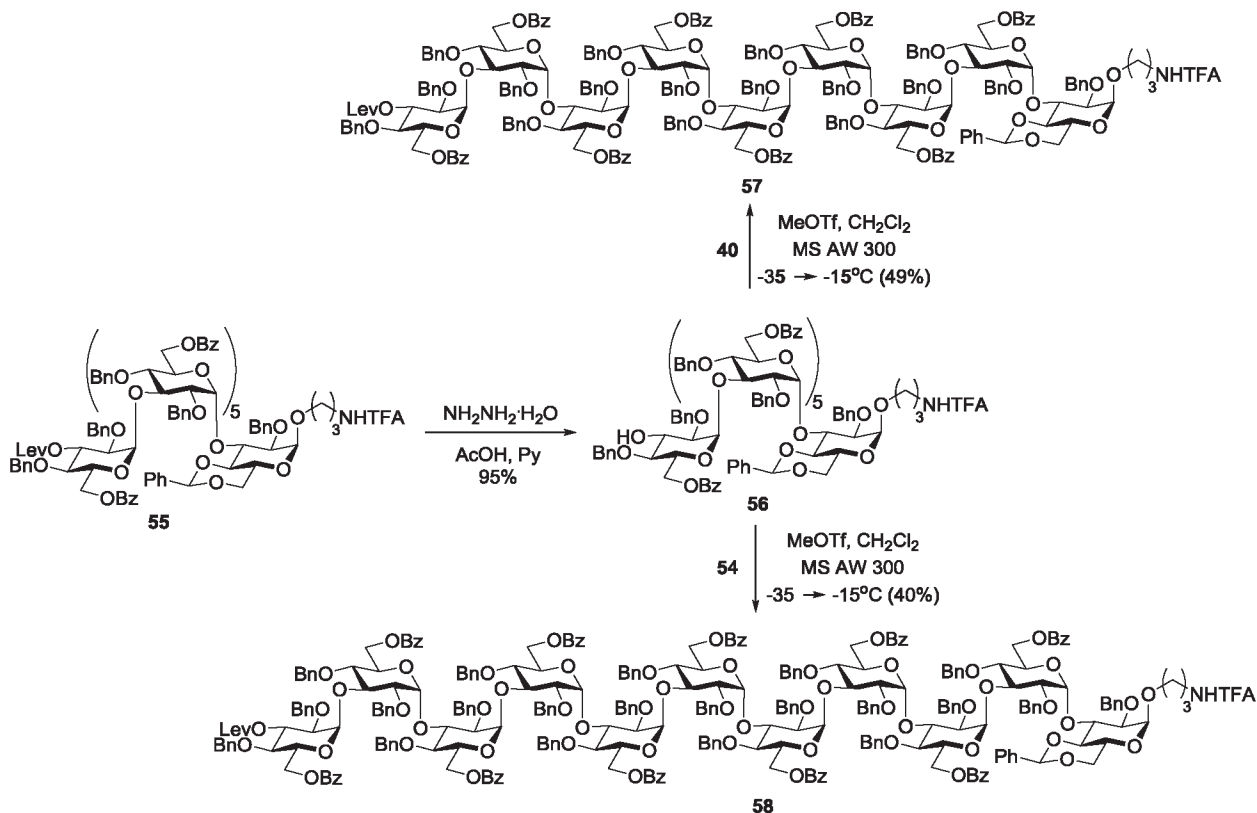


Схема 11. Синтез нонасахарида **57** и ундекасахарида **58** на основе гептасахаридного акцептора **56**.

Учитывая, что измененный порядок добавления субстратов и реагентов ранее помог увеличить выход гептасахаридов **55** в полтора раза (Схема 10), было проведено гликозилирование акцептора **56** в условиях, когда донор **440** и промотор MeOTf медленно добавлялись к его раствору. На этот раз изменение порядка добавления не повлияло на выход нонасахарида. Вероятно, это связано с тем, что в отличие от получения гептасахаридов **55**, когда использовался 2.5 кратный избыток акцептора **42**, акцептор **56** брался без избытка. Использование же избытка более дорогого (чем акцептор **42**) акцептора **56** было невыгодным, принимая во внимание потери при его регенерации.

Сочетание тетрасахаридного донора **54** и гептасахаридного акцептора **56** привело к ундекасахариду **58** с выходом 40%. Донор **54** был также использован в двукратном избытке.

Факт образования нонасахарида **57** и ундекасахарида **58** был подтвержден данными масс-спектров. Стереохимия образовавшейся гликозидной связи и структуры соединений **57** и **58** доказывались по алгоритму, описанному для доказательства структуры гептасахаридов **55** (Схема 10) с тем ограничением, что последовательность углеводных остатков в данном случае не определялась из-за наложения аномерных сигналов.

Для получения спейсерированного гептасахаридов **60** проводили удаление защитных групп согласно процедуре, описанной для получения незащищенного пентасахаридов **46** (Схема 8). Гидрогенолиз бензилиденовой и бензильных групп в гептасахариде **55** над $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ и последующее дезацилирование промежуточного продукта **59** в щелочных условиях приводили к незащищенному спейсерированному гептасахариду **60** с выходом 51% (Схема 12).

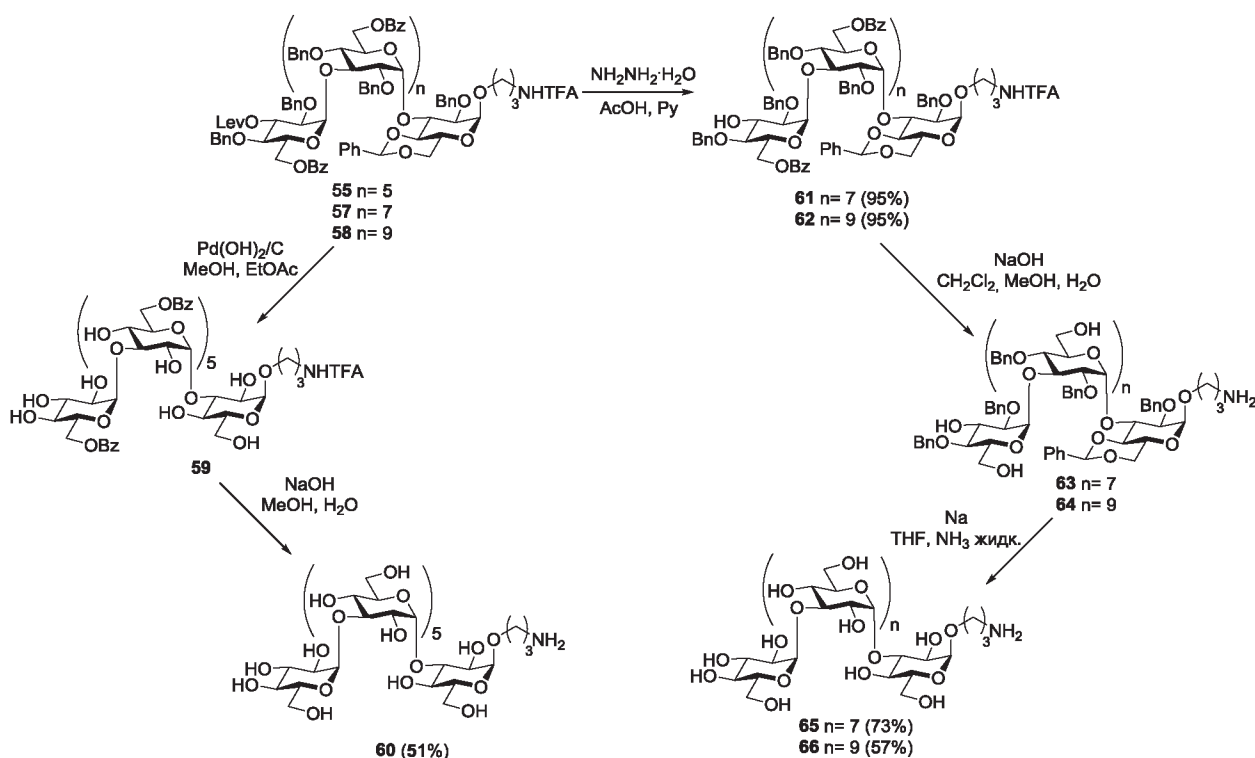


Схема 12. Удаление защитных групп в гепта-, нона- и ундекасахаридах **55**, **57** и **58**.

В результате попытки гидрогенолиза нонасахарида **57** над $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ возникли трудности с выделением продукта из реакционной смеси. Растворимость продуктов частичного дебензилирования нонасахарида **57** падает настолько, что это приводит к необратимой сорбции всего вещества на катализаторе. Нам не удалось выделить продукты гидрогенолиза нонасахарида **57**, даже несмотря на многочисленные попытки варьировать палладиевые катализаторы и растворители, используемые как для проведения реакции, так и для смыва веществ с катализаторов. Из этого следовало, что для проведения дебензилирования необходимо было полностью отказаться от гетерогенных катализаторов.

С учетом запрета использования гетерогенных катализаторов выбор метода для удаления бензильных групп пал на реакцию Бёрча. Перед проведением этой реакции

ацильные группы в ундекасахариде **58** были удалены в две стадии: сначала удалялась левулиноильная группа, и затем проводилось дебензоилирование гидроксидом натрия. Продукт дезацилирования **64** обрабатывали раствором натрия в жидком аммиаке. После очистки продукта получили незащищенный ундекасахарид **66** с выходом 57%. В ЯМР спектре полученного таким способом ундекасахарида **66** не наблюдались сигналы, которые могли бы указывать на присутствие неудаленных бензильных или бензоильных групп. Сигналы аномерных протонов наложились друг на друга, образовав мультиплет при δ 5.40-5.35 м.д., интегральная интенсивность которого была в десять раз больше, чем интенсивность отдельно стоящего дублета при δ 4.96, принадлежащего аномерному протону восстанавливающего остатка глюкозы. Двухпротонные сигналы при δ 3.24-3.10 м.д. и δ 2.06-1.97 м.д., отвечающие протонам метиленовых групп спейсера, указывали на сохранность этого фрагмента в продукте дебензилирования. Масс-спектр подтвердил молекулярную массу продукта **66**.

Превращение нонасахарида **57** в незащищенный нонасахарид **65** было осуществлено посредством такой же последовательности реакций, как и при получении ундекасахарида **66**. В случае получения незащищенного нонасахарида **65** выход был выше, чем при получении ундекасахарида **66**, и составил 73%.

Из нонасахарида **65** и ундекасахарида **66** обработкой активированным эфиром **49** с выходом 84% и 49%, соответственно, были получены конъюгаты **67** и **68** с биотином (Схема 13).

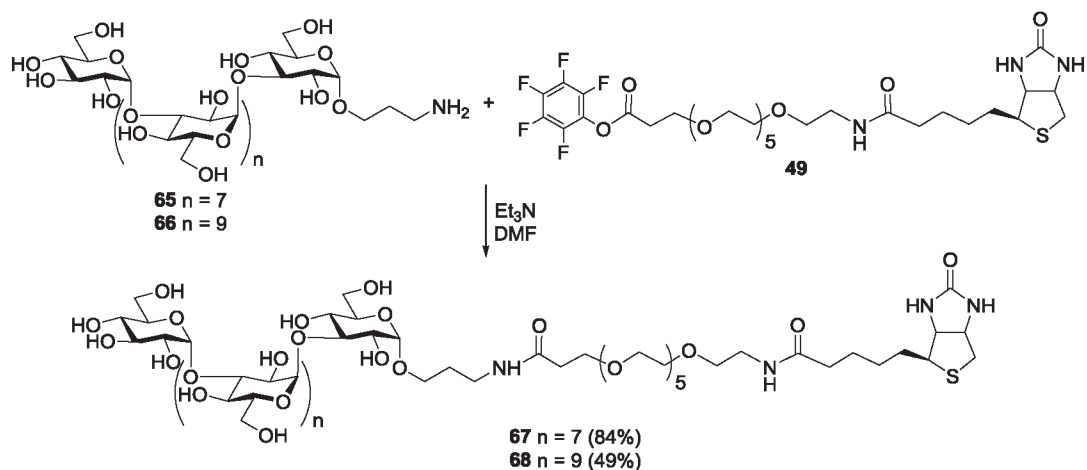


Схема 13. Получение нона- и ундекасахаридных конъюгатов **67** и **68** с биотином.

Выводы

1. Впервые синтезированы спейсированные α -(1 $\rightarrow$ 3)-олигоглюкозиды с длиной цепи 3, 5, 7, 9 и 11 глюкозных остатков, отвечающие фрагментам α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана — полисахаридного компонента клеточной стенки и биопленок *Aspergillus fumigatus*.

2. Проведено сравнение α -стереонаправляющих свойства удаленных потенциально содействующих ацильных групп при О-3 и О-6 и 4,6-О-бензилиденовой группы в глюкозил-донорах. Показано, что доноры несущие ацильные группы при О-6 или при О-3 и О-6 одновременно, обеспечивают наибольшую α -стереоселективность, а в комбинации с *N*-фенилтрифторацетимидоильной уходящей группой — близкие к количественным выходы продуктов гликозилирования.

3. Разработана эффективная и стереоселективная конвергентная схема сборки α -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных олигоглюкозидов с использованием олигосахаридных доноров, несущих бензоильную стереонаправляющую группу при О-6 гликозилирующего остатка.

4. Оптимизированы методы полного удаления защитных групп в защищенных предшественниках α -(1 $\rightarrow$ 3)-олигоглюкозидов с длиной цепи 3, 5, 7, 9 и 11 глюкозных остатков.

5. Из полученных олигосахаридов синтезированы гликоконъюгаты с биотином и БСА

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

Статьи и тезисы конференций:

1. Обзор: Komarova, B.S. Contribution of carbohydrate chemistry to assessment of the biological role of natural α -glucosides / B.S. Komarova, M.V. Orekhova, Y.E. Tsvetkov, N.E. Nifantiev // *Carbohydrate Chemistry*. – **2015**. – Vol. 41. – с. 187 – 237.

2. Komarova, B.S. Is an acyl group at O-3 in glucosyl donors able to control α -stereoselectivity of glycosylation? The role of conformational mobility and the protecting group at O-6 / B.S. Komarova, M.V. Orekhova, Y.E. Tsvetkov, N.E. Nifantiev // *Carbohydr. Res.* – **2014**. – Vol. 384. – с. 70 – 86.

3. Komarova, B.S. Synthesis of a pentasaccharide and neoglycoconjugates related to fungal α -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan and their use in the generation of antibodies to trace *Aspergillus fumigatus* cell wall / B.S. Komarova, M.V. Orekhova, Y.E. Tsvetkov, R.Beau, V. Aïmanianda, J.-P. Latgé, N.E. Nifantiev // *Chem. Eur. J.* – **2015**. – Vol. 21 – с. 1029 – 1035.

4. Орехова, М.В. Стереоселективный синтез спейсированного альфа-(1-3)-D-глюкопентасахарида и его конъюгата с бычьим сывороточным альбумином / М.В. Орехова, Б.С. Комарова, Ю.Е. Цветков, Н.Э. Нифантьев // *ОргХим-201: Тез. докл.* – Санкт-Петербург (пос. Репино). – **2013**. – 17-21 июня. – с. 214-215.

5. Орехова, М.В. Синтез спейсированных α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкоолигосахаридов и конъюгатов на их основе / М. В. Орехова, Б. С. Комарова, Ю. Е. Цветков, Н.Э. Нифантьев // *IV Всероссийская конференция по органической химии: Тез. докл.* – Москва. – **2015**. – 22-27 ноября. – с. 211.

6. Нифантьев, Н.Э. Стереонаправленное 1,2-цис-гликозилирование с использованием удалённого соучастия ацильных защитных групп / Н.Э. Нифантьев, Б.С. Комарова, Н.Е. Устюжанина, Д.З. Винницкий, В.Б. Крылов, М.В. Орехова, А.Г. Гербст, Ю.Е. Цветков // *IV Всероссийская конференция по органической химии: Тез. докл.* - Москва. – **2015**. – 22-27 ноября.– с. 19.