



УДК 547.458.34.057

ИСКУССТВЕННЫЕ УГЛЕВОДНЫЕ АНТИГЕНЫ.
КОНЪЮГАЦИЯ ТРИСАХАРИДА Le^a С ПОЛИМЕРАМИ ПО СХЕМЕ:
ОЛИГОСАХАРИД → ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫЙ СПЕЙСЕР → АНТИГЕН

Бовин Н. В., Иванова И. А., Хорлин А. Я.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

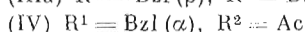
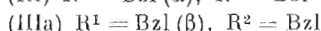
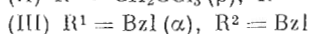
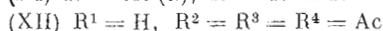
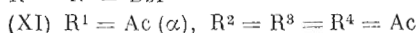
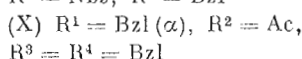
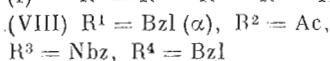
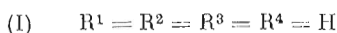
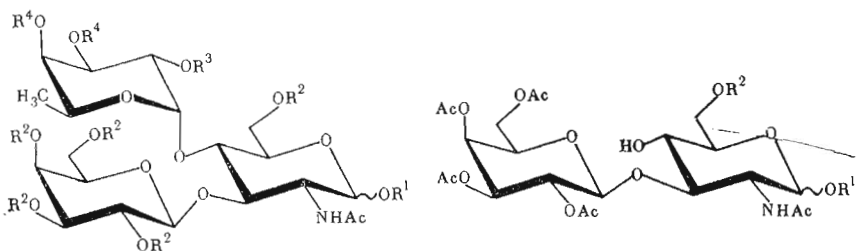
Осуществлен синтез трисахарида Le^a, Fuc α 1-4(Gal β 1-3)GlcNAc, проведена его иммобилизация на полимерах. Избирательным β -галактозиллированием бензил-2-ацетамидо-6-О-ацетил-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид ацетобромгалактозой с выходом 69% получен бензил-2-ацетамидо-6-О-ацетил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)-2-дезоксид- α -D-глюкопиранозид, α -фукозиллирование которого в условиях дифенилциклопропенилового метода и галоид-ионного катализа дало защищенный трисахарид Le^a (в обоих случаях выход 60%). Полученный после удаления защитных групп и ацетилирования полный ацетат трисахарида Le^a превращен далее в ацетилированное оксазолиновое производное, гликозиллирование которым 3-(трифторацетамидо)пропанола и последующее дезацетилирование продукта реакции привели к β -[3-(трифторацетамидо)пропил]триозиду. Последний превращен в гликозиды, в которых трисахарид Le^a присоединен к спейсерам, содержащим аминогруппу, азидокарбонильную и акрилоильную группировки. Конъюгация первых двух гликозидов с белками или сополимеризация последнего с акриламидом привели к макромолекулам, несущим углеводные детерминанты с групповой специфичностью Le^a.

Синтетические конъюгаты сахаридов с полимерами широко используются в качестве антигенов, аффинных сорбентов, при изучении процессов углевод-белкового узнавания [1-3]. Конъюгаты сложных олигосахаридов с белками, неогликопротеины, обычно получают по следующей схеме (см., например, [4]): моносахаридом гликозилируется подходящий спейсер, затем связанный со спейсером моносахарид (спейсерированный моносахарид) дотраивается до спейсерированного олигосахарида, после чего последний конъюгируется с белком. Более привлекательным представляется альтернативный подход, а именно гликозиллирование спейсера уже готовым олигосахаридом. При наличии эффективного метода гликозиллирования второй подход имеет ряд преимуществ. Во-первых, он позволяет использовать не только синтезированные, но и выделенные из природных источников олигосахариды. Во-вторых, он оставляет возможность варьировать природу спейсера на последних, а не на первых стадиях синтеза. Наконец, второй путь исключает необходимость дублировать синтез спейсерированного олигосахарида синтезом свободного олигосахарида, который помимо использования для характеристики специфичности антител может найти самостоятельное применение в энзимологии, в структурном анализе сложных углеводов, в блок-синтезе более сложных олигосахаридов. В данной работе на примере синтеза трисахарида Le^a и его конъюгации с полимерами реализован второй подход.

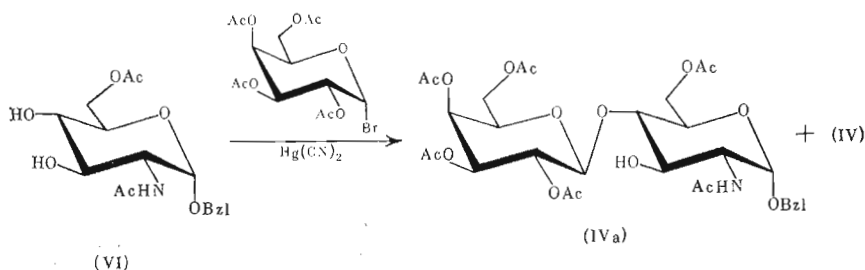
Предложено несколько синтезов [5-9] детерминантного трисахарида группы крови Le^a (I), впервые выделенного [10] в 1964 г. из группового вещества крови. В названных работах [5-9] стратегия синтеза была одинакова: сначала получение защищенного дисахарида Gal β 1-3GlcNAc, затем α -фукозиллирование последнего. Обратная последовательность синтеза, т. е. β -галактозиллирование дисахарида Fuc α 1-3GlcNAc, успеха не имела [6, 7]. Значительно различались как методы синтеза дисахаридного звена

Использованы сокращения в соответствии с рекомендациями номенклатурной комиссии IUPAC - IUB. Остатки Gal и GlcNAc - D-конфигурации, а Fuc - L-конфигурации. Nbz - *n*-нитробензил, -ONSu(SuNO-) - N-сукцинимидоокси-

Gal β 1-3GlcNAc, так и методы α -фукозилрования. В работах Лемье [5], Синаи [6] и Матта [9], а также в нашей работе [7] защищенные дисахариды со свободной гидроксильной группой при С-4 *N*-ацетил-*D*-глюкозамина (соединения (II), (III), (IIIa) и (IV) соответственно) получали в результате многостадийных синтезов.



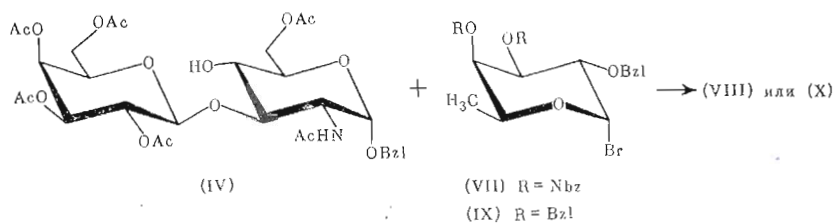
В кратком сообщении [8] нами описан более простой путь синтеза защищенного дисахарида (IV) в две стадии, исходя из бензил- α -*D*-глюкозамина (V). Избирательным ацетилированием уксусным ангидридом в пиридине при $-30^\circ C$ стандартный синтои (V) был с высоким выходом превращен в моно-*O*-ацетат (VI). Гликозилрование диола (VI)



1 эквивалентом ацетобромгалактозы в условиях реакции Гельфериха протекало с высоким выходом и регоселективно: выходы (1 \rightarrow 3)- и (1 \rightarrow 4)-связанных дисахаридов (IV) и (IVa) составили соответственно 69 и 7%. Около половины чистого изомера (IV) удается выделить из реакционной смеси кристаллизацией, а оставшаяся его часть легко отделяется от (1 \rightarrow 4)-связанного дисахарида (IVa) хроматографически. Строение дисахаридов (IV) и (IVa) подтверждено сравнением их с известными образцами, синтезированными структурно однозначно из соответствующих монохлорацетильных производных α -бензилглюкозамина [7].

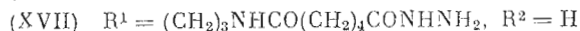
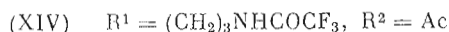
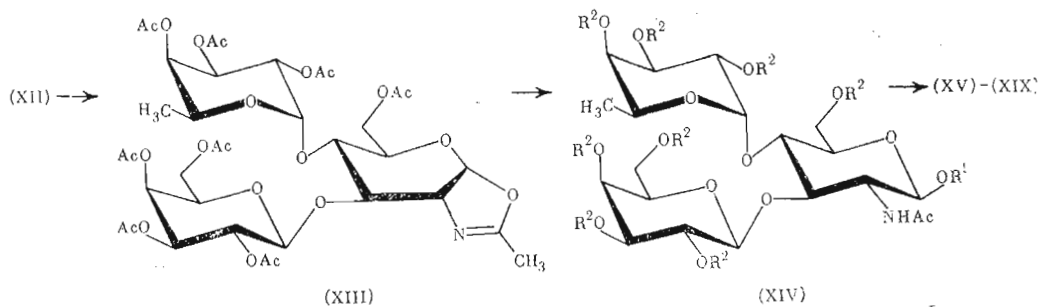
В практике олигосахаридного синтеза в последние годы сложилась традиция введения α -фукозильного остатка путем гликозилрования в условиях галоид-ионного катализа, предложенного Лемье (см., например, обзор [11]), в то время как дифенилциклопропениловый метод [12] или имидатный метод, предложенный Синаи [13], используются редко. Поэтому нами для сравнения эффективности дифенилциклопропенилового метода и метода Лемье [14] проведено фукозилрование дисахарида (IV) двумя методами. α -Фукозилрование дисахарида (IV) фукозилбромидом (VII), взятым с небольшим (20%) избытком в условиях дифенилциклопропенилового метода при $20^\circ C$, проходило стереоспецифично с получением защищенного трисахарида Le^a (VIII), причем выход последнего

прямо зависел от абсолютных количеств взятых реагентов. Так, в одинаковых условиях из 0,6 ммоль дисахарида (IV) трисахарид (VIII) получен с выходом 34%, из 2 ммоль — 43%, а из 4 ммоль — 60%.



Гликозилирование дисахарида (IV) фукозилбромидом (IX) в условиях галлоид-понного катализа [14] при пятикратном избытке фукозилбромида приводило к α -связанному трисахариду (X) с выходом 60%. Фукозилбромид (IX) был получен из 2,3,4-три-*O*-бензил-*L*-фукопиранозы действием реактива Вильсмейера (бромокись фосфора + диметилформамид) в присутствии *симм*-коллидина и тетраэтиламмонийбромида. Предлагаемый синтез бромида (IX) в отличие от синтезов, основанных на взаимодействии бромистого водорода с 1-*O*-ацилпроизводными, исключает побочную реакцию дебензилирования. Спектр полученного бромида (ПМР) не отличается от описанного в литературе [15].

Защищенные трисахариды (VIII) и (X) были превращены в свободный трисахарид Le^a (I) путем последовательных *O*-деацелирования и гидрогенолиза. Получение спейсеризованных олигосахаридов осуществлено следующим образом. Свободный олигосахарид (I) ацетилировали, нонацетат (XI) избирательно 1-*O*-деацетилировали гидрацинацетатом. Образующийся в результате с практически количественным выходом октаацетат (XII) переводился далее в оксазолиновое производное (XIII) по методу [16].



По данным ТСХ, вещество было достаточно чистым и использовалось для гликозилирования без дополнительной очистки. Этот метод превращения сахаров в их оксазолиновые производные дает более высокие выходы в случае олигосахаридов, чем моносахаридов. По-видимому, это объясняется потерями производных моносахаридов, более растворимых в воде, на стадиях отмывки реакционной смеси водой (см. «Экспериментальную часть»).

Гликозилированием 3-(трифторацетиламино)пропанола оксазолином (XIII) был получен ацетилированный β -гликозид (XIV) — ключевое

соединение в синтезах производных (XV), (XVIII) и (XIX). Деацетилирование ацетата (XIV) и последующая обработка анионом (OH⁻) привели к β-(амилопропил)триозиду (XV). Спейсерированный трисахарид (XV) со свободной аминогруппой сам по себе может быть применен для конъюгации с белками или другими полимерами, содержащими активированные карбоксильные группы. Кроме того, амилопропильная группировка может быть использована в качестве «преспейсера», т. е. может быть превращена в различные функциональные производные, такие, как азид (XVIII) (через сложный эфир (XVI) и далее гидразид (XVII)), а также акрилоильное производное (XIX), пригодное для сополимеризации с акриламидом. При таком подходе появляется дополнительная возможность варьировать длину и природу спейсера. Поэтому можно говорить об универсальности аминоалкильного преспейсера типа $-(\text{CH}_2)_n\text{NHCOCF}_3$. Аналогичный принцип использования преспейсера описан в работах [17, 18].

Производные (XVI) и (XIX) получали ацилированием амина (XV): N-оксисукцинимидным эфиром моноэтилового эфира адипиновой кислоты в этаноле и акриловым ангидридом в метаноле соответственно. Ацилирование избытком акрилового ангидрида в метаноле проходит практически количественно. Такой подход препаративно более удобен, чем ацилирование акрилоилхлоридом в воде в присутствии гидроксида кальция [2], включающее длительную процедуру выделения.

Конъюгация амилопропилгликозида (XV) с бычьим сывороточным альбумином (БСА) осуществлялась при мольном соотношении БСА и амина (XV) 1:50. Использовались различные водорастворимые карбодимиды, такие, как N-циклогексил-N'-(N-метил-2-морфолиноэтил)карбодимид 4-толуолсульфонат, N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимид хлоргидрат, а также реактив Вудварда в следующих условиях: 4° С, pH 4,0–8,0, время конъюгации 24–72 ч. При этом получить удовлетворительной степени ковалентной пришивки нам не удалось: содержание углеводов в полученных конъюгатах не превышало 0,5% по весу. Этот результат, вероятно, можно объяснить недостаточно высоким избытком амина (XV) по отношению к БСА; обычно удовлетворительные степени привязки аминокомпонентов к белкам получают при использовании аминов в количестве, в 10–100 раз большем, чем в нашем случае (см., например, [19]). Напротив, хорошие результаты были получены в азидном методе конъюгации в варианте [20]. В этом случае не потребовалось избытка азидокомпонента (XVIII), степень привязки Le^a -гаптена к БСА составляла 24–53%, считая на эфир (XVI), причем варьированием соотношения БСА – азид (XVIII) были получены конъюгаты с содержанием углеводов от 3 до 10% по весу, т. е. от 4 до 13 моль трисахарида на 1 моль БСА. Аналогичная привязка к цитохрому с привела к неогликопротеину с 17% содержанием углеводов.

Акрилоильный гликозид (XIX) вводили в реакцию радикальной сополимеризации с акриламидом. При мольном соотношении акриламида и мономера (XIX) 74:1 был получен сополимер, содержащий 9,1% углеводов по весу, что соответствует соотношению мономерных звеньев в сополимере 73:1. Аналогичные сополимеры описаны ранее в ряде работ: водорастворимые сополимеры были получены при сополимеризации акриламида с гликозидами, содержащими аллильную группу [21–23]. Однако разница в реакционной способности акриламида и аллильных мономеров сильно усложняет управление сополимеризацией. Более привлекательно использование в сополимеризации замещенного и незамещенного акриламидов, близких или одинаковых по реакционной способности в реакции радикальной сополимеризации. Этот путь реализован при получении полиакриламидных пленок [3], предназначенных для изучения лектинов поверхности кластек. Недавно на примере сополимеризации акриламида с N¹-(N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутаминил)-N⁶-акрилоилгексаметилендиаминном показано, что соотношение мономеров в сополимерах может быть задано их исходным соотношением [24] (см. также работу по получению поперечно сшитых сополимеров [25]). Более детальному изучению сопо-

лимеризация гликозида (XIX) с акриламидом и встраиванию в сополимер адьюванта посвящена самостоятельная публикация [26].

Иммуногенность конъюгатов Le^a -BCA и Le^a -цитохром тестировалась в опытах *in vitro*. В системе иммунизации по Мишелю — Даттону [27] оба конъюгата индуцировали биосинтез анти- Le^a -специфических иммуноглобулинов G*.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе Boetius (ГДР). Оптические вращения измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141 (США) при 20—25° С. Спектры ПМР сняты на приборах Varian SC-300 (300 МГц) и Bruker WM-500 (500 МГц) с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта. ТСХ проводили на пластинках с силикагелем 60F-254 (E. Merck) и с нейтральной окисью алюминия 150F-254, тип Т (E. Merck), вещества обнаруживали 5% раствором H_2SO_4 в метаноле при 150° С. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле 40—100 мкм (Chempol, ЧССР). Для определения моносахаридного состава олигосахариды, гликозиды и конъюгаты подвергали кислотному метанолизу и последующим обработкам, как описано в работе [28], после чего проводили ГЖХ триметилсилильных производных (хроматограф Hewlett — Packard 5710A, капиллярная колонка 40 м × 0,25 мм, стационарная фаза SE-30, газ-носитель — гелий (60 мл/мин), детектор пламенно-ионизационный). Температурный режим: 2 мин при 100° С, 100—230° С (4° С/мин) и далее изотерма. Внутренний стандарт — маннит. Цианид ртути, перхлорат серебра, тетраалкиламмонийгалогениды и 4-толуолсульфокислоту высушивали в вакууме 0,5 мм рт. ст. при 20° С в течение 0,5—1 ч непосредственно перед введением в реакцию. Персульфат аммония (Reanal), BCA (Sigma) и цитохром с (Sigma) использовались без дополнительной очистки. Растворители упаривали в вакууме при 30—35° С.

Бензил-2-ацетидамо-6-О-ацетил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (VI). К раствору 12,4 г (40 ммоль) бензил-2-ацетидамо-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (V) [29] в 200 мл пиридина при -30° С прибавили при перемешивании за 60 мин 5,1 г (50 ммоль) уксусного ангидрида. Охлаждение прекратили и через 60 мин упарили при 30° С досуха. Остаток нанесли на колонку с силикагелем (30×6 см) и элюировали смесью хлороформ — ацетон (1:1) 9,9 г (70%) ацетата (VI). Т. пл. 135—136° С, $[\alpha]_D^{+177}$ (с 1, вода), идентичен описанному ранее [30].

Бензил-2-ацетидамо-6-О-ацетил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил)-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (IV). Смесь 3,5 г (10 ммоль) диола (VI), 2,5 г (10 ммоль) цианида ртути и 0,3 г (0,8 ммоль) бромиды ртути с 30 мл бензола и 30 мл нитрометана упарили на 1/3 объема. Затем при 50° С по каплям прибавили раствор 4,1 г (10 ммоль) 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-α-D-галактопиранозилбромиды в 30 мл бензола за 5 ч. Еще 2 ч выдерживали при 50° С, упарили, остаток растворили в 300 мл хлороформа, промыли водой, раствором бикарбоната натрия, снова водой, высушили хлористым кальцием, упарили досуха. Остаток растворили в 10 мл хлороформа и добавили эфир до помутнения, через 2 ч отделили 2,0 г чистого кристаллического дисахарида. Из маточного раствора хроматографией на силикагеле в системе эфир — ацетон (17:3) выделили еще 2,7 г дисахарида (IV). Суммарный выход 69%. Т. пл. 168° С, $[\alpha]_D^{+67}$ (с 1, хлороформ), идентичен описанному ранее [7].

Бензил-2-ацетидамо-6-О-ацетил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил)-4-О-(2-О-бензил-3,4-ди-О-4-нитробензоил-α-L-фукопиранозил)-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (VIII). Высушивали в вакууме (0,1 мм рт. ст., 2 ч при 20° С) 2,7 г (4,0 ммоль) дисахарида (IV) и 1,4 г (4,8 ммоль) перхлората дифенилциклопропенилия [31], затем прибавили 0,58 г (4,8 ммоль) симм-коллинды и 40 мл бензола. Суспензию переме-

* Биологические испытания проведены А. Л. Лиознером и И. В. Виноградовым (Научно-исследовательский институт иммунологии АМН СССР, Москва). Результаты будут опубликованы отдельно.

живали при 25° С в течение 2 ч, затем при 25° С прибавили бромид (VII), полученный из 3,46 г (5 ммоль) 2-О-бензил-1,3,4-три-О-нитробензоил-*L*-фукопиранозы [32], и сразу после этого 1,04 г (5 ммоль) перхлората серебра в 30 мл бензола в течение 10 мин. Через 15 ч смесь профильтровали через слой целита, фильтрат упарили, остаток экстрагировали хлороформом, экстракт промыли водой, 1 н. соляной кислотой, водой и высушили хлористым кальцием. Хроматографией на силикагеле в системе эфир — метанол (39:1) получили 2,9 г (60%) защищенного трисахарид (VIII). Т. пл. 227° С (дихлорметан — эфир), $[\alpha]_D -100^\circ$ С (с 1, хлороформ). ПМР (CD₂Cl₂): 1,35д (3H, J_{5'',6''} 6,5 Гц, СН₃ фукозы), 1,94; 1,98; 2,04; 2,08; 2,14; 2,19с (18H, 6 Ac), 7,22с (5H, Ph), 7,38с (5H, Ph), 8,05AA'BB' (4H, C₆H₄), 8,28AA'BB' (4H, C₆H₄). Найдено, %: С 57,31, Н 5,24, N 3,26. С₅₈H₆₃N₃O₂₆. Вычислено, %: С 57,19, Н 5,21, N 3,45.

2,3,4-Три-О-бензил-α-D-фукопиранозилбромид (IX). К 0,88 г диметилформамида в 20 мл дихлорметана прибавили 3,44 г (12 ммоль) бромокси фосфора, охладили до 0° С и прибавили раствор 1,74 г (4 ммоль) 2,3,4-три-О-бензил-*L*-фукопиранозы [15], 2,52 г (12 ммоль) тетраэтиламмонийбромид и 1,45 г (12 ммоль) *симм*-коллидина в 30 мл дихлорметана. Через 15 ч быстро промыли холодными растворами 1 н. соляной кислоты, насыщенными при 0° С растворами бикарбоната калия и тиосульфата натрия, водой, высушили хлористым кальцием. Упарили, остаток растворили в 50 мл бензола и профильтровали через 2-см слой высушенной при 100° С в течение 30 мин окиси алюминия (нейтральная, активность II по Брокману), раствор упарили при 20° С, получили 1,79 г (90%) бромида (IX), спектр ПМР которого совпадает с описанным [15], по ТСХ (нейтральная окись алюминия, бензол — ацетат, 19:1) вещество индивидуально.

Бензил-2-ацетамидо-6-О-ацетил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил)-4-О-(2,3,4-три-О-бензил-α-L-фукопиранозил)-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (X). Раствор 300 мг (0,44 ммоль) дисахарид (IV), 185 мг (0,88 ммоль) тетраэтиламмонийбромида, 115 мг (0,88 ммоль) диизопропилэтиламина в 10 мл дихлорметана выдерживали 24 ч с 2 г молекулярных сит 4 Å в атмосфере сухого аргона. Затем прибавили раствор бромида (IX), полученного из 1,0 ммоль 2,3,4-три-О-бензилфукозы, в смеси 8 мл дихлорметана и 8 мл диметилформамида. Через 72 ч прибавили еще одну порцию бромида (IX) (из 0,6 ммоль 2,3,4-три-О-бензилфукозы) в 2 мл дихлорметана и через 72 ч еще такую же порцию. Выдерживали смесь 48 ч, профильтровали через слой целита, добавили равный объем хлороформа, раствор дважды промыли водой, высушили хлористым кальцием, упарили, остаток хроматографировали на силикагеле в системе этилацетат — толуол (3:2). Выход трисахарид (X) 290 мг (60%). Т. пл. 202—203° С (хлороформ — гексан), $[\alpha]_D +14^\circ$ (с 1, хлороформ), ПМР (CDCl₃): 1,30д (3H, J_{5'',6''} 7 Гц, СН₃ фукозы), 1,79; 1,94; 1,94; 2,04; 2,09; 2,09с (18H, 6Ac), 5,47д (1H, J_{1'',2''} 2,2 Гц, H''-1), 5,60д (1H, J_{2,3} 8,5 Гц, NH), 7,32м (20H, 4Ph). Найдено, %: С 63,33, Н 6,29, N 1,25. С₅₈H₆₉N₁O₂₀. Вычислено, %: С 63,30, Н 6,33, N 1,27.

2-Ацетамидо-3-О-(β-D-галактопиранозил)-2-дезоксид-4-О-(α-L-фукопиранозил)-D-глюкоза (I). А. 2,8 г трисахарид (VIII) растворили в смеси 10 мл дихлорметана и 40 мл метанола, добавили 0,5 мл 1 М раствора метилата натрия в метаноле, выдерживали 48 ч при 25° С, нейтрализовали 0,1 мл уксусной кислоты, упарили досуха, остаток растворили в 15 мл воды, водный раствор промыли толуолом (2×15 мл), затем обработали 3 мл катионита IR-120 (H⁺) и упарили досуха. Остаток (1,58 г) подвергли гидрогенолизу в течение 48 ч в 100 мл метанола в присутствии 1 г 10% Pd/C при 25° С, раствор профильтровали, упарили, остаток нанесли на колонку с биогеом P-2 (160×3 см) и элюировали водой трисахарид (I). Выход 0,98 г (80%), $[\alpha]_D -43^\circ$ (с 1, вода). Лит. данные [5]: $[\alpha]_D -45,1^\circ$ (вода). Спектр ПМР совпадает с литературным [5].

В. 1,1 г трисахарид (X) растворили в смеси 10 мл дихлорметана и 40 мл метанола, добавили 0,5 мл смолы Amberlyst A-26 (OH⁻) (Fluka), выдерживали 48 ч при 25° С, смолу отфильтровали, раствор упарили досуха и остаток подвергли гидрогенолизу в течение 96 ч в 80 мл 80%

уксусной кислоты в присутствии 0,25 г 10% Pd/C при 25° С. Раствор профильтровали, упарили, остаток нанесли на колонку с биогеом Р-2 (160×3 см) и элюировали водой 460 мг (87%) трисахарид (I), $[\alpha]_D -43^\circ$ (вода) (состав фракций контролировали при помощи ТСХ в системе этанол — бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 100 : 10 : 10 : 3 : 10).

[3-(Трифторацетиамидо)пропил]-2-ацетиамидо-6-О-ацетил-4-О-(2,3,4-три-О-ацетил- α -L-фукопиранозил)-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (XIV). К раствору 0,53 г (1 ммоль) трисахарид (I) в 20 мл пиридина добавили 10 мл уксусного ангидрида. Через 16 ч при 20° С упарили, дважды упарили с толуолом. Получили хроматографически индивидуальный (ацетон — толуол, 3 : 2) перацетат; аналитический образец α -ацетата получен кристаллизацией из этанола на холоде. Т. пл. 145–148° С, $[\alpha]_D -59^\circ$ (с 1, хлороформ). Лит. данные [6]: т. пл. 142–144° С (CCl₄), $[\alpha]_D -52^\circ$ (хлороформ). ПМР (CD₂Cl₂): 1,26д (3H, J_{5',6'} 6,4 Гц, Me фукозы), 1,94–2,19 10с (30 H, 10 Ac), 5,44д (1H, J_{1',2'} 3,5 Гц, H-1''), 4,69д (1H, J_{1',2'} 8 Гц, H-1'), 5,49д (1H, J_{2,3} 10 Гц, NH), 5,91д (1H, J_{1,2} 4 Гц, H-1). Перацетат (XI) растворили в 80 мл диметилформамида, прибавили 100 мг (1,1 ммоль) гидразинацетата, перемешивали до полного растворения гидразинацетата и еще 5 ч при 20° С. Разбавили 300 мл хлороформа, промыли водой (2×200 мл), упарили, упарили с толуолом досуха при 40° С. Полученный октаацетат (XII) растворили в 120 мл дихлорметана, прибавили 30 мг триэтилбензиламмонийхлорида, 0,6 мл 2,6-лутидина и 0,2 мл мезилхлорида. Через 72 ч (20° С, темнота) исходный ацетат (XII) отсутствует (контроль ТСХ), наблюдается образование одного вещества с R_(XII) 1,2 (ацетон — толуол, 3 : 2). Смесь разбавили вдвое дихлорметаном, промыли холодной водой, насыщенным раствором бикарбоната калия, высушили хлористым кальцием и упарили. Оставшийся в смеси 2,6-лутидин удалили упариванием с толуолом (40° С, 3–4 раза). Полученный оксазолин (XIII) растворили в 100 мл 1,2-дихлорэтана, прибавили 0,8 мл 3-(трифторацетиамидо)пропанола*, отогнали при атмосферном давлении 20 мл дихлорэтана, после чего прибавили 30 мг безводной толуолсульфокислоты и выдерживали 60 мин при 60–70° С. Раствор упарили, нанесли на колонку с силикагелем и элюировали смесью хлороформ — метанол (19 : 1) 0,72 г (71%) гликозида (XIV). Т. пл. 166–167° С (хлороформ — гексан), $[\alpha]_D -56^\circ$ (с 1, хлороформ). ПМР (CDCl₃): 1,33д (3H, J_{5',6'} 6,6 Гц, CH₃ фукозы), 1,98–2,18 9с (27H, 9 Ac), 5,16д (1H, J_{1,2} 8 Гц, H-1). Найдено, %: С 48,28, Н 5,65, N 2,70, F 5,52. C₄₁H₅₇F₃N₂O₂₄. Вычислено, %: С 48,33, Н 5,64, N 2,75, F 5,59.

3-(5-Этоксикарбонилпентаоксиламидо)пропил)-2-ацетиамидо-4-О-(α -L-фукопиранозил)-3-О-(β -D-галактопиранозил)-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозид (XVI). К раствору 204 мг (0,2 ммоль) гликозида (XIV) в 20 мл метанола прибавили 0,05 мл 1 М раствора метилата натрия в метаноле. Через 48 ч разбавили вдвое водой, обработали 1 мл катионита IR-120(H⁺), затем 4 мл анионита Amberlyst A-26(OH⁻) в течение 15 ч. ТСХ в системе этанол — бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 100 : 10 : 10 : 3 : 10, показывает единственное нингидринположительное пятно (и в то же время обугливающаяся серной кислотой). Полученный раствор амина (XV) упарили, остаток растворили в 10 мл абс. этанола и прибавили раствор 0,3 ммоль EtOCO(CH₂)₂COONSu** в 3 мл оксолана. Через 15 ч вылили в 200 мл эфира, осадок отделили и несколько раз промыли оксоланом. Получено 132 мг (88%, считая на гликозид (XIV)) аморфного соединения (XVI). ПМР (D₂O): 1,18т (3H, J 7,2 Гц, CH₃CH₂), 1,23д (3H, J_{5',6'} 6,6 Гц, CH₃ фукозы), 1,54м (4H, CCH₂CH₂C), 1,70м (2H, CCH₂C), 1,98с

* Получили из 3-аминопропанола и трифторуксусного ангидрида (1,5 экв.) в метаноле при 0° С, трехкратно перегоняли в вакууме, т. кип. 127° С/1 мм; ПМР (ацетон-d₆): 1,77 м (2H, CH₂CH₂CH₂), 3,45 м (2H, CH₂), 3,66 м (2H, CH₂), 3,88 с (уширенный, 1H, OH), 8,52 с (уширенный, 1H, NH). Найдено, %: С 35,10, Н 4,69, F 33,68, N 8,10. C₅H₈F₃N₁O₂. Вычислено, %: С 35,10, Н 4,71, F 33,33, N 8,19.

** Реагент приготавливали из 20 ммоль моноэтилового эфира адипиновой кислоты, 20 ммоль N-оксисукцинимида и 20 ммоль дициклогексилкарбодимида в 100 мл оксолана. Через 15 ч раствор профильтровали и промыли осадок дициклогексилмочевины 100 мл оксолана.

(3Н, Ас), 2,19_м (2Н, СН₂СО), 2,34_м (2Н, СН₂СО), 3,72_м (2Н, СН₂), 4,09_{кв} (2Н, J 7,2 Гц, СН₃СН₂), 4,37_д (1Н, J_{1,2} 9,6 Гц, Н-1). Найдено, %: С 50,13, Н 7,25, N 3,70. С₃₁Н₅₄N₂O₁₈. Вычислено, %: С 50,13, Н 7,33, N 3,77.

(3-(5-Азидокарбонилпентаноиламидо)пропил)-2-ацетамидо-4-О - (α-L-фукопиранозил)-3-О-(β-D-галактопиранозил)-2-дезоксид - β - D-глюкопиранозид (XVIII). К раствору 74 мг (100 мкмоль) этилового эфира (XVI) в 15 абс. этанола прибавили 1 мл гидразингидрата и выдерживали 24 ч при 0° С. Этанол удалили в вакууме при 20° С, затем избыток гидразингидрата — в вакуум-эксикаторе при 4° С над пятиокисью фосфора при 0,1 мм рт. ст. Остаток (соединение (XVII)) растворили в 1 мл диметилформамида, охладили до 0° С и прибавили 100 мкл 4 н. раствора хлористого водорода в диоксане (свежеприготовленного). Охладили до -25° С и при перемешивании прибавили 15 мкл *трет*-бутилнитрата в 135 мкл диметилформамида, перемешивали 30 мин при -25° С, затем прибавили 150 мкл 0,5 М раствора сульфаминовой кислоты в диметилформамиде и выдерживали 20 мин при -30° С, после чего дали температуре подняться до 0° С и раствор азиды (XVIII) непосредственно вводили в конъюгацию (см. ниже).

(3-(Акрилоиламидо)пропил)-2-ацетамидо-4-О-(α - L - фукопиранозил)-3-О-(β-D-галактопиранозил)-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (XIX). К раствору 15 мг (25 мкмоль) амина (XV) в 4 мл метанола прибавили 0,2 мл пиридина, затем при 0° С разом прибавили 30 мкл ангидрида акриловой кислоты. Через 2 ч добавили еще 30 мкл ангидрида и выдерживали смесь еще 2 ч при 0° С. Раствор упарили в вакууме при 20° С, остаток 15 мин высушивали в вакууме при 0,1 мм рт. ст., затем вещество на стенках колбы 5 раз промыли этилацетатом, каждый раз выдерживая с растворителем 2—3 мин. Продукт ацилирования (XIX) индивидуален по данным ТСХ (этанол — бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 100 : 10 : 10 : 3 : 10, R_(XV) 3,0; обнаружение зон нагреванием, а также перманганат-периодатным раствором).

Конъюгация азиды (XVIII) с белками. А. С БСА. Раствор азиды (XVIII) полученного из 74 мг эфира (XVI), порциями по 50 мкл при 0° С прибавляли к 5 мл раствора 134 мг (2 мкмоль) БСА в буферном растворе, рН 8,5—9,0 (0,08 М тетраборат натрия — 0,35 М бикарбонат калия), поддерживая значение рН в данном интервале. После окончания прибавления рН практически не менялся. Раствор выдерживали 20 ч при 4° С, диализовали против дистиллированной воды при 4° С, лиофилизовали. Выход конъюгата 127 мг, содержание углеводов (Fuc:Gal:GlcNAc=1:1:1) 10% (по весу), т. е. к белку привязалось 24% эфира (XVI). Аналогично из 134 мг БСА и азиды, полученного из 18,5 мг эфира (XVI), синтезировали 121 мг конъюгата, содержащего 3% (по весу) углеводов, т. е. к белку привязалось 53% эфира (XVI).

В. С цитохромом с. Конъюгацию проводили как описано выше для БСА. Азид (XVIII), полученный из 74 мг (100 мкмоль) эфира (XVI), прибавляли к 100 мг (8 мкмоль) цитохрома с, через 20 ч смесь нанесли на колонку с сефадексом G-25 (160×3 см) и элюировали при 4° С водой белковую фракцию. После лиофилизации получили 110 мг конъюгата, содержащего 17% (по весу) углеводов, т. е. привязалось 35% эфира (XVI).

Сополимеризация производного (XIX) с акриламидом. 12,8 мг (20 мкмоль) полученного мономера (XIX), 105 мг (1480 мкмоль) акриламида, 4 мг цистеина и 10 мг персульфата аммония в 4 мл воды дегазировали 3 мин в вакууме при перемешивании, затем прибавили 1,2 мкл тетраметилэтилендиамина, снова вакуумировали и затем выдерживали 90 мин при 40° С. После охлаждения раствор нанесли на колонку с сефадексом G-100 (120×2 см) и элюировали 0,1 М уксусной кислотой высокомолекулярную фракцию. Выход лиофильно высушенного полимера 90—100 мг. Содержание углеводов (Fuc + Gal + GlcNAc) 9,1% (по весу), что соответствует соотношению звеньев —СН₂СН(СОНН₂)—/—СН₂СН(СОНН~Le^а)— 73 : 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Stowell C. P., Lee Y. C.* Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1980, v. 37, p. 225–281.
2. *Weigel P. H., Schnaar R. L., Roseman S., Lee Y. C.* Methods in Enzymol., 1982, v. 83, p. 294–299.
3. *Weigel P. H., Schmell E., Lee Y. C., Roseman S. J.* Biol. Chem., 1978, v. 253, № 2, p. 330–333.
4. *Lemieux R. U., Bundle D. R., Baker D. A.* J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 14, p. 4076–4083.
5. *Lemieux R. U., Driguez H. J.* Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 14, p. 4063–4069.
6. *Jacquinet J.-C., Sinaï P. J.* Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1979, p. 319–322.
7. *Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я.* Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 242–249.
8. *Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я.* Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 789–790.
9. *Rana S. S., Matta K. L.* Carbohydr. Res., 1983, v. 117, № 1, p. 101–111.
10. *Rege V. P., Painter T. J., Watkins W. M., Morgan W. T. J.* Nature, 1964, v. 204, № 4958, p. 740–742.
11. *Paulsen H.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1982, v. 21, № 3, p. 155–173.
12. *Khorlin A. Ya., Nesmeyanov V. A., Zurabyan S. É.* Carbohydr. Res., 1975, v. 43, № 1, p. 69–77.
13. *Sinaï P.* Pure and Appl. Chem., 1978, v. 50, p. 1437–1452.
14. *Lemieux R. U., Hendriks K. B., Stick R. V., James K. J.* Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 14, p. 4056–4063.
15. *Dejter-Juszynski M., Flowers H. M.* Carbohydr. Res., 1971, v. 18, № 2, p. 219–226.
16. *Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1981, № 12, с. 2806–2808.
17. *Dahmen J., Frejd T., Magnusson G., Noori G.* Carbohydr. Res., 1982, v. 111, № 1, p. C1–C4.
18. *Weigel P. H., Naoi M., Roseman S., Lee Y. C.* Carbohydr. Res., 1979, v. 70, № 1, p. 83–91.
19. *Hoare D. G., Koshland D. E., Jr.* J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 10, p. 2447–2453.
20. *Inman J. K., Merchant B., Claflin L., Tacey S. E.* Immunochemistry, 1973, v. 10, № 3, p. 165–174.
21. *Бовин Н. В.* Синтез группоспецифических детерминантных олигосахаридов и их иммобилизация на полимерной матрице. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: ИБХ АН СССР, 1982, с. 17–19.
22. *Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я.* Синтез искусственных группоспецифических антигенов. Тез. XII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии (Баку). М.: Наука, 1981, с. 120–121.
23. *Kochethow N. K., Dmitriev B. A., Chernyuk A. Ya., Levinsky A. B.* Carbohydr. Res., 1982, v. 110, № 2, p. C16–C20.
24. *Хорлин А. Я., Абашев Ю. П.* Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 8, с. 1119–1126.
25. *Weigel P. H., Schnaar R. L., Kuhlenschmidt M. S., Schmell E., Lee R. T., Lee Y. C.* J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 21, p. 10830–10838.
26. *Хорлин А. Я., Бовин Н. В.* Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 671–673.
27. *Шрайер Х.* В кн.: Методы исследования в иммунологии. М.: Мир, 1981, с. 337–345.
28. *Pritchard D. J., Todd C. W.* J. Chromatogr., 1977, v. 133, № 1, p. 133–139.
29. *Шульман М. Л., Абрамова Г. В., Пискаева В. Н., Хорлин А. Я.* Изв. АН СССР. Сер. хим., 1971, № 3, с. 630–632.
30. *Зурабян С. Э., Коломеер Г. Г., Хорлин А. Я.* Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 654–663.
31. *Farnum D. G., Burr M. J.* Amer. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 10, p. 2651.
32. *Dejter-Juszynski M., Flowers H. M.* Carbohydr. Res., 1972, v. 23, № 1, p. 41–45.

Поступила в редакцию
23.X.1984

ARTIFICIAL CARBOHYDRATE ANTIGENS. CONJUGATION OF THE Le^a
TRISACCHARIDE BY THE WAY OF: OLIGOSACCHARIDE → GLYCOSYLATED
SPACER → ANTIGEN

BOVIN N. V., IVANOVA I. A., KHORLIN A. Ya.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

The Le^a trisaccharide, Fuc α 1-4(Gal β 1-3)GlcNAc, has been synthesized and immobilized on polymers. Selective β -galactosylation of benzyl 2-acetamido-6-O-acetyl-2-deoxy- α -glucopyranoside with acetobromogalactose afforded benzyl 2-acetamido-6-O-acetyl-3-O-(2-,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-2-deoxy- α -D-glucopyranoside in 69% yield. The disaccharide was further α -fucosylated by diphenylcyclopropenyl method or bromide-ion-catalyzed reaction to give protected Le^a trisaccharide. The deprotected trisaccharide was converted via acetylated oxazoline derivative into 3-(trifluoroacetamido)propyl β -trioside. The latter was transformed into glycosides, in which the Le^a trisaccharide is connected with spacers containing amino-, azidocarbonyl- or N-acryloyl-groups. Conjugation of the spacers trisaccharide with proteins or copolymerization with acrylamide led to artificial Le^a antigens.