



УДК 547.458.34.057

СИНТЕЗ НЕОГЛИКОПРОТЕИНОВ, НЕСУЩИХ ГАПТЕНУ
(Gal β 1-3GalNAc α 1-)Ser, Gal β 1-3GalNAc α 1,
Gal β 1-3GalNAc β 1, (GalNAc α 1-)Ser

Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Хорлин А. Я.

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

Синтезированы следующие соединения, пригодные для иммобилизации на белках: Gal β 1-3GalNAc α 1-OCH₂CH(CONHCH₃)NHCO(CH₂)₄COOEt, Gal β 1-3GalNAc α 1-O(CH₂)₃NH₂, Gal β 1-3GalNAc β 1-O(CH₂)₃NH₂, GalNAc α 1-OCH₂CH(CONHCH₃)NHCO(CH₂)₄COOEt. Ковьюгацией с белками (БСА и цитохром с) получены соответствующие неогликопротеины.

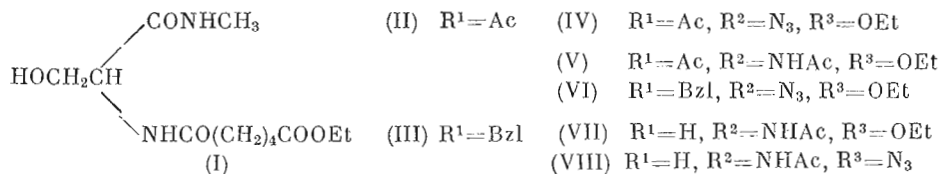
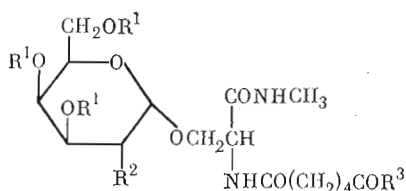
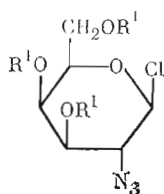
Фрагмент (Gal β 1-3GalNAc α 1-)Ser/Thr — структурная единица, наиболее типичная для O-целей гликопротеинов [1]. Дисахарид Gal β 1-3GalNAc α 1, соединенный в гликопротеинах эритроцитов человека O-гликозидной связью с остатками серина или треонина, является углеводной детерминантой антигена Томсена — Фриденрейха (T-антигена) — одного из важных маркеров процессов онкотрансформации [2] и дифференцировки [3, 4] клеток. Целью данной работы был синтез искусственных антигенов (неогликопротеинов), несущих дисахаридный фрагмент Gal β 1-3GalNAc. Неогликопротеины, включающие α -биозид Gal β 1-3GalNAc α 1, предназначались для получения анти-T-антител и, далее, для идентификации T-антигена на поверхности кортикальных тимоцитов [5]. Неогликопротеин, несущий β -биозид Gal β 1-3GalNAc β 1, был необходим для изучения специфичности антител, так как существовала опасность, что они могут узнавать также и этот дисахаридный фрагмент, встречающийся в ганглиозидах (например, в GM₁ [6]). Наконец, неогликопротеин с серинсодержащим гаптеном синтезирован с двойной целью: 1) для уточнения специфичности антител и 2) при необходимости, для получения анти-T-антител.

Поставленные задачи определили выбор химических структур гаптепов и соответственно методов их синтеза. Известно несколько синтезов T-гаптена и антигенов, его несущих [7–17], тем не менее в данной работе предлагается иная схема синтеза, что вызвано жесткими структурными требованиями к *serin* гаптепов, необходимых для получения с характеристикой специфичности антител [5]. Гаптены синтезированы из имевшихся в нашем распоряжении стандартных синтепов, которые ранее уже использовались для получения искусственных группоспецифических антигенов. Результаты биологических испытаний синтезированных соединений обсуждаются в работе [5].

I. Гаптен (Gal β 1-3GalNAc α 1-)Ser

Ключевой стадией синтеза этого фрагмента была стадия создания α -гликозидной связи между защищенным серипом (I) и производными 2-азидо-2-дезоксид-D-галактозы (II, III). Производное серина (I) синтезировано из хлоргидрата этилового эфира L-серина последовательной обработкой метиламином в метаноле и N-оксисукцинимидным эфиром моноэтилового эфира адипиновой кислоты в этаноле (выход 62%).

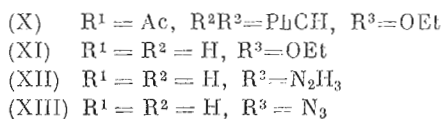
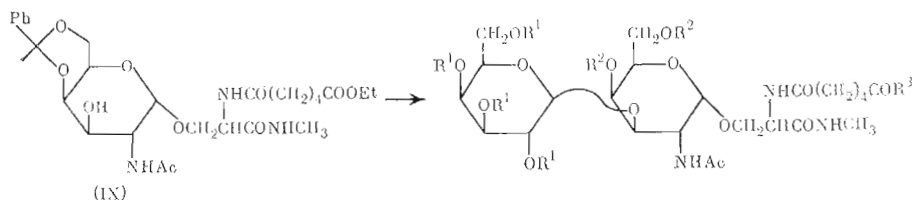
Гликозилирование производного (I) β -хлоридом (II) [18, 19] в присутствии цианида ртути в смеси бензол — нитрометан при 60°С проходило с низким выходом (14%) даже при использовании вакуумной техники подготовки реагентов [20]. Гликозилирование соединения (I) тем же



хлоридом в присутствии карбоната и перхлората серебра привело к α -гликозиду (IV) с еще меньшим выходом (10%). Использование в качестве катализатора гликозилирования трифлата серебра (трифторметансульфоната) повысило выход (IV) до 25%. Во всех случаях большую часть соединения (I) выделяли в неизменном виде.

Замена ацетилированного хлорида (II) на бензилированный (III) [21, 22], являющийся более мощным гликозилирующим агентом [19], позволила получить кристаллический α -гликозид (VI) с выходом 85%. Восстановление азидогруппы трифенилфосфином [23], N-ацетилирование и последующий гидрогенолиз позволили получить производное N-ацетил- α -D-галактозамина (VII) с суммарным выходом 91%. То же соединение (VII) было получено из гликозида (IV) последовательным гидрогенолизом, N-ацетилированием и дез-O-ацетилированием; перэтерификации этоксикарбонильной группы на последней стадии не происходило.

Реакцией триола (VII) с бензальдегидом в присутствии хлорида цинка получен ацеталь (IX), который далее гликозилировали ацетобромгалактозой по Гельфериху, получая дисахарид (X) с выходом 57%.

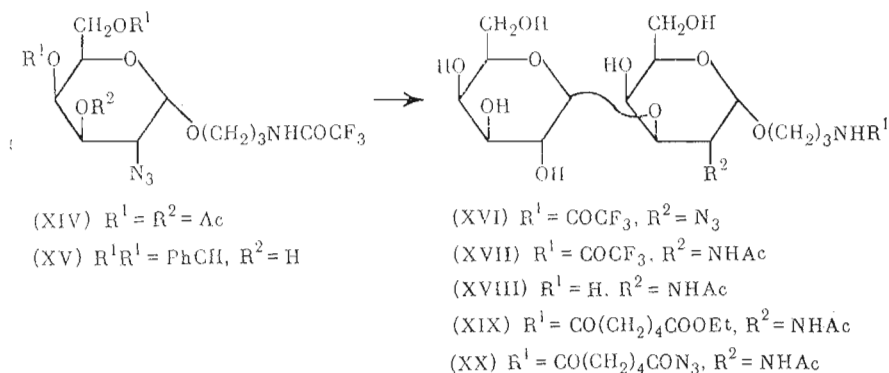


Снятие бензильденовой защиты и последующее дез-O-ацетилирование привели к целевому гликозилсерину (XI), имеющему в составе спейсерной группировки сложноэфирную группу. Из соединения (XI) далее были получены гидразид (XII) и азид (XIII) по методу [24]. Полученный конъюгацией азиды (XIII) с бычьим сывороточным альбумином (БСА) неогликопротеин (см. ниже) был предназначен для иммунизации *in vitro*, требующей минимальное количество вещества. Поэтому синтезы проводились в полумикромасштабе, а промежуточные соединения охарактеризованы только данными ПМР- и масс-спектров.

II. Другие гаптены, включающие фрагмент Gal β 1-3GalNAc α 1

Не содержащий серина аналог описанного в предыдущем разделе гаптена синтезирован следующим образом. 3-(Трифторацетамидо)пропанол [25] гликозилировали β -хлоридом (II) по Гельфериху; полученный с выходом 80% α -гликозид (XIV) дезацетилировали, затем обработали бензальдегидом и хлористым цинком. Бензильденное производное (XV)

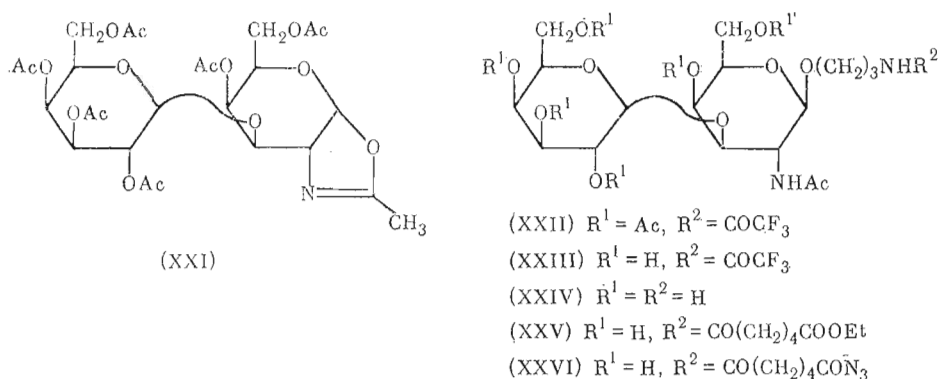
далее гликозилировали ацетобромгалактозой по Гельфериху, дисахарид деструктурировали (сначала уксусной кислотой при 100°С, затем метилатом натрия), получая соединение (XVI).



Последовательные гидролиз и N-ацетилирование привели к Т-гаптenu (XVII), выход которого составил 42%, считая на исходный гликозид (XIV) (7 стадий). Далее N-трифторацетильную защиту количественно снимали анионитом в OH⁻-форме и амин (XVIII) ацилировали N-оксисукцинимидным эфиром моноэтилового эфира адипиновой кислоты. Полученный гликозид (XIX) далее превращали по описанной выше схеме в азидопроизводное (XX).

III. Гаптен, содержащий фрагмент Galβ1-3GalNAcβ1

β-Связанный аналог описанного в предыдущем разделе гаптена синтезирован из дисахарида Galβ1-3GalNAc [26], последний ацетилировали и ацетат превращали в оксазолиновое производное (XXI) по методу [27]



Гликозилирование 3-(трифторацетамидо)пропанола оксазолином (XXI) с выходом 76% дало β-гликозид (XXII), который дез-О-ацетилировали, затем снимали N-трифторацетильную защиту анионитом в OH⁻-форме, получая амин (XXIV). Ацилирование последнего N-оксисукцинимидным эфиром моноэтилового эфира адипиновой кислоты привело к производному (XXV), которое далее превращали в азид (XXVI), готовый для конъюгации с белком.

IV. Иммунизация гаптенос на белках

Неогликопротеины получали конъюгацией азидов (VIII), (XIII), (XX) и (XXVI) с БСА и цитохромом c по методу [24]; БСА — конъюгаты использовались в качестве антигенов для иммунизации, цитохромовые конъюгаты — для тестирования антител к углеводным гаптенам. Иммунизацию

проводили 20 ч при pH 8,9–9,3 и температуре 4° С. Полученные неогликопротеины содержали 1,0–17% (по весу) углеводов (см. «Экспериментальную часть»). Кроме дисахаридных антигенов получен также так называемый T_N-антиген, представляющий собой α-связанный с серином или треонином N-ацетилгалактозамин [28]; для этого производное (VII) обычным способом превратили в соответствующий азид (VIII), который затем конъюгировали с белками.

Качественный и количественный углеводный состав неогликопротеинов устанавливали, подвергая образцы кислотному метанолизу [29] и анализируя метилгликозиды в виде триметилсилильных производных (ГЖХ): соотношение моносахаридов в дисахаридных конъюгатах было близким к эквимольному; содержание углеводов, определенное в конъюгатах, приведено в «Экспериментальной части».

Схема иммунизации неогликопротеином Galβ1-3GalNAcα1-O(CH₂)₃-NHCO(CH₂)₄CO-BCA, а также характеристика специфичности полученных моноспецифических антител описаны в работе [5].

Экспериментальная часть

Температуру плавления определяли на приборе Voetius (ГДР). Оптическое вращение 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. Масс-спектры (метод химической ионизации аммиаком и метод электронного удара) записывались на приборе Varian MAT-44S. ТСХ проводили на пластинках с силикагелем 60F-254 (E. Merck), вещества обнаруживали 5% раствором H₂SO₄ в метаноле при 150° С. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле 40–100 мкм (Chemapol, СССР). ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5710A с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке (50 м × 0,24 мм) с фазой SE-30 при 140–220° С (2°/мин), газ-носитель – гелий. Цианид ртути, перхлорат, трифлат (получен как описано в работе [30]) и карбонат серебра высушивали 30–60 мин в вакууме при 0,1 мм рт. ст. непосредственно перед введением в реакцию. Растворители упаривали в вакууме при 30–35° С.

N-(5-Этоксикарбонилпентаноил)-L-серин, метиламид (I). К охлажденному до 5° С раствору 16 г (0,52 моль) метиламина в 100 мл метанола прибавили 10 г (64 ммоль) хлоргидрата метилового эфира L-серина (Reanal), после полного растворения выдерживали при 5° С еще 24 ч, затем прибавили 100 мл водного раствора 7 г (70 ммоль) KНСО₃ и раствор упарили в вакууме досуха. Остаток трижды экстрагировали по 100 мл теплого метанола, объединенные экстракты упарили и остаток суспендировали в 100 мл абс. этанола (смесь А).

К раствору 13,5 г (75 ммоль) моноэтилового эфира адипиновой кислоты в 100 мл дихлорметана прибавили при перемешивании сначала 8,6 г (75 ммоль) N-оксисукцинимида, затем 15,5 г (75 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Выпавший осадок дициклогексилмочевины через 15 мин отделили, раствор упарили и полученный сироп прибавили к смеси А при 5° С. Раствор выдерживали при 5° С еще 24 ч, выпавший осадок N-оксисукцинимида отделили, раствор упарили и полученный сироп нанесли на колонку (10 × 6 см) с окисью алюминия (нейтральная, активность II по Брокману) и элюировали смесью хлороформ – этанол (9 : 1) соединение (I), которое перекристаллизовали из этилацетата. Выход 10,8 г (62%), т. пл. 124° С [α]_D –64° (с 0,9, хлороформ). ПМР (CDCl₃): 1,24т (3H, J 7 Гц, MeCH₂), 1,64м (4H, CH₂CH₂), 2,29м (4H, 2CH₂CO), 2,78д (3H, J 5 Гц, NMe), 3,64м и 3,94м (2H, CH₂OH), 4,10кв (2H, J 7 Гц, CH₂Me), 4,46м (1H, CH), 7,00д (1H, J 7,5 Гц, NH), 7,13м (1H, NH). Найдено, %: С 52,58, Н 8,04, N 10,24. C₁₂H₂₂N₂O₅. Вычислено, %: С 52,54, Н 8,08, N 10,21.

N-(5-Этоксикарбонилпентаноил) - O - (2-азидо-3,4,6-три - O - ацетил-2-дезоксид-α-D-галактопиранозил)-L-серин, метиламид (IV).

А. 300 мг (1,1 ммоль) соединения (I), 460 мг (1,8 ммоль) цианида ртути, 1 г сит 4 Å, 3 мл бензола и 3 мл нитрометана выдерживали 30 мин при 20° С, затем прибавили при 50–60° С за 2 ч раствор 620 мг (1,8 ммоль) хлорида (II) [18, 19] в 3 мл смеси тех же растворителей в атмосфере азота. Выдерживали при 50–60° С 18 ч и еще 24 ч при 20° С. Разбавили реакционную смесь 25 мл хлороформа, профильтровали и промыли насыщенным раствором NaHCO₃ (10 мл), водой (20 мл), высушили Na₂SO₄. Хроматографией на силикагеле (колонка 25×2,5 см, толуол – этилацетат, 10 : 1 → 1 : 1 (300 мл), затем хлороформ – этанол, 9 : 1 (300 мл)) выделили 90 мг (14%) гликозида (IV). Сироп, $[\alpha]_D^{25} + 69^\circ$ (с 1,8, хлороформ). ИК: 2100 см⁻¹. ПМР (CDCl₃): 1,26т, 3Н, $\overline{\text{MeCH}_2}$, 1,68м (4Н, CH₂CH₂), 2,06с, 2,08с, 2,17с (9Н, 3Ac), 2,32м (4Н, $\overline{2\text{CH}_2\text{CO}}$), 2,86д (3Н, J 5 Гц, MeN), 5,20д (1Н, J_{1,2} 3,5 Гц, Н-1), 6,58д (1Н, J 9 Гц, NH), 6,68м (1Н, NH); m/z 588 (M+1), электронный удар.

Б. 55 мг (0,2 ммоль) соединения (I), 110 мг Ag₂CO₃, 0,5 г сит 4 Å, 2 мл толуола и 1 мл дихлорметана выдерживали 30 мин при –7° С в токе азота, после чего добавили 11 мг (0,05 ммоль) AgClO₄, затем раствор 55 мг (0,16 ммоль) хлорида (II) в смеси 0,5 мл толуола и 1,6 мл дихлорметана при –7° С. Реакционную смесь выдерживали 33 ч в токе азота при –7° С, затем разбавили 10 мл дихлорметана и обработали, как в методе А. Выход α-гликозида (IV) 10 мг (10%).

В. 55 мг (0,2 ммоль) соединения (I), 0,5 г сит 4 Å, 35 мкл (0,3 ммоль) тетраметилмочевины и 57 мг (0,22 ммоль) трифлата серебра в 7 мл дихлорметана выдерживали 0,5 ч при 20° С в токе азота. Смесь охладили и при 0° С прибавили за 4 ч 105 мг (0,3 ммоль) хлорида (II) в 2 мл дихлорметана. Смесь выдерживали 32 ч при 0° С, затем прибавили еще 20 мг (0,07 ммоль) трифлата серебра и раствор 50 мг (0,16 ммоль) хлорида (II) в 1 мл дихлорметана. Выдерживали 24 ч при 0° С и 15 ч при 20° С, затем обработали, как в методе А. Выход α-гликозида (IV) 30 мг (25%).

N-(5-Этоксикарбонилпентаноил) - *O* - (2-ацетиамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозил)-*L*-серин, метиламид (V). 71 мг (0,12 ммоль) азид (IV) гидрировали 25 ч в 10 мл этанола над 20 мг 5% Pd/C, прибавили 0,1 мл уксусного ангидрида и выдерживали 24 ч при 5° С, катализатор отделили и раствор упарили. Остаток хроматографировали на силикагеле (колонка 10×1 см, хлороформ – метанол, 19 : 1), получили 49 мг (67%) производного (V). Аморфное, $[\alpha]_D^{25} + 82^\circ$ (с 0,84, хлороформ), ПМР (CDCl₃): 1,24т (3Н, MeCH₂), 1,67м (4Н, CH₂CH₂), 1,95с, 1,97с, 2,05с, 2,16с (12Н, 4Ac), 2,32м (4Н, 2CH₂CO), 2,82д (3Н, J 5 Гц, MeN), 4,86д (1Н, J_{1,2} 3,5 Гц, Н-1), 6,27м (1Н, NH), 6,66м (1Н, NH), 6,72м (1Н, NH); m/z 604 (M+1), электронный удар.

N-(5-Этоксикарбонилпентаноил) - *O* - (2-азидо-3,4,6-три-*O*-бензил-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозил)-*L*-серин, метиламид (VI). 0,55 г (2 ммоль) соединения (I), 5 г Ag₂CO₃, 100 мг перхлората серебра и 5 г сит 4 Å в 50 мл дихлорметана выдерживали 3 ч при 20° С; затем прибавили β-хлорид (III), полученный из 1,15 г (2,1 ммоль) соответствующего α-бромид [21, 22], в 10 мл дихлорметана при 20° С за 20 мин. Выдерживали 15 ч при 20° С, профильтровали, раствор упарили и остаток напесли на колонку с силикагелем (30×2 см) и элюировали смесью толуол – ацетон (3 : 2) 1,24 г (85%) соединения (VI). Т. пл. 120–122° С (эфир – гексан), $[\alpha]_D^{25} + 90^\circ$ (с 1, хлороформ). ПМР (CDCl₃): 1,25т (3Н, J 7 Гц, MeCH₂), 1,65м (4Н, CCH₂CH₂C), 2,22м (2Н, CH₂CO), 2,32м (2Н, CH₂CO), 2,71д (3Н, J 4,5 Гц, MeNH), 3,88дд (1Н, J_{1,2} 3,5 Гц, J_{2,3} 10,8 Гц, Н-2), 5,04д (1Н, J_{1,2} 3,5 Гц, Н-1), 6,61м (1Н, NH), 6,71д (1Н, J 7 Гц, NH), 7,30–7,44м (15Н, 3Ph). Найдено, %: С 64,10, Н 6,62, N 9,59. C₃₃H₄₉N₃O₉. Вычислено, %: С 64,01, Н 6,75, N 9,57.

N-(5-Этоксикарбонилпентаноил)-*O*-(2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозил)-*L*-серин, метиламид (VII). К раствору 73 мг (0,1 ммоль) азид (VI) в 3 мл оксолана прибавили 31 мг (0,12 ммоль) трифенилфосфина и выдерживали 15 ч при 20° С, затем прибавили 0,1 мл воды.

Через 2 ч упарили, растворили в 2 мл пиридина, прибавили 0,5 мл уксусного ангидрида и через 2 ч упарили досуха. Остаток нанесли на колонку с силикагелем (20×1 см) и элюировали смесью хлороформ — метанол (24 : 1) 70 мг 2-ННАс-производного, которое растворили в 10 мл этанола и подвергли гидрогенолизу над 30 мг Pd/C (10%-ного) при 20° С в течение 72 ч. Катализатор отделили, этанол упарили и получили 43 мг (91%) соединения (VII). Аморфное, идентифицировано в виде перацетата (V): 10 мг соединения (VII) выдерживали 15 ч в смеси 1 мл пиридина и 0,3 мл уксусного ангидрида, упарили досуха; удельное вращение и спектр ПМР продукта ацетилирования идентичны полученным ранее для соединения (V).

N-(5-Этоксикарбонилпентаноил) - *O* - [2-ацетиамидо-3-*O*-(β-*D*-галактопиранозил)-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозил]-*L*-серин, метиламид (XI). В 15 мл метанола растворили 48 мг (0,08 ммоль) соединения (V), прибавили 0,2 мл смолы Amberlyst A-26 (OH⁻) (Fluka) и перемешивали 12 ч при 20° С, смолу отделили, раствор упарили. Остаток (триол (VII)) растворили в 0,5 мл бензальдегида и прибавили 30 мг хлористого цинка. перемешивали 24 ч при 20° С, затем прибавили 10 мл эфира. Через 1 ч эфир декантировали, осадок на стенках колбы дважды промыли эфиром и растворили в 25 мл хлороформа, промыли хлороформный раствор насыщенными растворами NH₄Cl, NaHCO₃, водой, высушили Na₂SO₄ и упарили. Остаток перекристаллизовали из этанола, получили 10 мг производного (IX). ПМР (DMSO-*d*₆): 1,18т (3H, J 7 Гц, MeCH₂), 1,51 м (4H, CH₂CH₂), 1,85с (3H, NAc), 2,16м (2H, CH₂CO), 2,28м (2H, CH₂CO), 2,60д (3H, J 5 Гц, MeN), 4,77д (1H, J_{1,2} 3,5 Гц, H-1), 5,34с (1H, PhCH), 7,32—7,40м (5H, Ph), 7,49д (1H, J 7,5 Гц, NH), 7,79м (1H, NH), 7,95д (1H, J 9 Гц, NH). Полученное соединение (IX) (10 мг, 18 мкмоль), 9 мг (36 мкмоль) цианида ртути, 2 мг (4 мкмоль) бромида ртути и 100 мг сит 4 А в 3 мл смеси нитрометан — бензол (2 : 1) перемешивали 1 ч при 20° С в токе азота, затем при 50° С прибавили 15 мг (36 мкмоль) ацетобромгалактозы в 0,5 мл смеси тех же растворителей. Выдерживали 5 ч при 50° С, затем 15 ч при 20° С, затем прибавили еще одну порцию ацетобромгалактозы в тех же условиях. Смесь прибавили 20 мл хлороформа, промыли насыщенным раствором NaHCO₃, водой, высушили MgSO₄. Хроматографией на силикагеле (хлороформ — метанол, 19 : 1) получили 6 мг дисахарида (X). Аморфный, [α]_D +22° (с 0,2, хлороформ), ПМР (CDCl₃): 1,27т (3H, J 7 Гц, MeCH₂), 1,68м (4H, CH₂CH₂), 1,99с, 2,02с, 2,05с, 2,06с, 2,17с (15H, 5Ac), 2,29м (2H, CH₂CO), 2,35м (2H, CH₂CO), 2,77д (3H, J 5 Гц, MeN), 4,78д (1H, J_{1,2} 8 Гц, H-1'), 4,94д (1H, J_{1,2} 3,2 Гц, H-1), 5,55с (1H, PhCH), 6,14д (1H, J 9 Гц, NH), 6,77м (1H, NH), 7,3—7,4м (5H, Ph), 7,55д (1H, J 6 Гц, NH); *m/z* 895 (*M*), электронный удар; *m/z* 896 (*M*+1), химическая ионизация. Полученное производное (X) (6 мг) выдерживали 1 ч с 1 мл 60% уксусной кислоты при 80° С, затем упарили досуха. Остаток растворили в 1 мл метанола и прибавили 15 мкл 1 М раствора MeONa в метаноле, выдерживали 12 ч при 20° С, прибавили 5 мкл уксусной кислоты и упарили. Остаток экстрагировали горячим этанолом, этанол упарили, получили 2 мг соединения (XI). Аморфное, [α]_D +47° (с 0,4, DMSO), ПМР (DMSO-*d*₆): 1,17т (3H, MeCH₂, J 7 Гц), 1,50м (4H, CH₂CH₂), 1,84с (3H, NAc), 2,16м (2H, CH₂CO), 2,22м (2H, CH₂CO), 2,60д (3H, J 4,5 Гц, MeN), 4,30д (1H, J_{1,2} 7,5 Гц, H-1'), 4,69д (1H, J_{1,2} 3,0 Гц, H-1), 7,26д (1H, J 8,5 Гц, NH), 7,83м (1H, NH), 7,99д (1H, J 8,0 Гц, NH); *m/z* 640 (*M*+1), химическая ионизация.

(3-Трифторацетиамидопропил)-2-азидо-3,4,6-три - *O* - ацетил-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозид (XIV). 3,5 г (10 ммоль) β-хлорида (II), 5 г сит 4 А, 2,5 г (10 ммоль) цианида ртути и 3,4 г (20 ммоль) 3-(трифторацетиамидо)пропанола [25] в 50 мл смеси бензол — нитрометан (1 : 1) выдерживали 3 ч при 20° С в токе азота, затем 10 ч при 55—60° С. Смесь прибавили 100 мл хлороформа, профильтровали, промыли 100 мл насыщенного раствора NaHCO₃, высушили CaCl₂. Хроматографией на силикагеле (колонка 30×2,5 см, хлороформ — ацетон, 9 : 1) выделили 3,86 г

(80%) α -гликозида (XIV). Т. пл. 104° С (эфир — гексан), $[\alpha]_D^{20} +89^\circ$ (с 1,1, хлороформ). ПМР (CDCl₃): 1,94м (2H, CCH₂C), 2,06с, 2,08с, 2,18с (9H, 3Ac), 5,01д (1H, J_{1,2} 3,6 Гц, H-1). Найдено, %: С 42,09, Н 4,78, N 11,40. C₁₇H₂₃F₃N₄O₆. Вычислено, %: С 42,15, Н 4,75, N 11,57.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-3-О-(β -D-галактопиранозил)-2-дезоксид- α -D-галактопиранозид (XVII). К раствору 650 мг (1,34 ммоль) гликозида (XIV) в смеси 50 мл метанола и 10 мл дихлорметана прибавили 30 мкл 1 М раствора MeONa в метаноле, выдерживали 15 ч при 20° С, упарили. Остаток растворили в 10 мл бензальдегида, прибавили 1 г хлористого цинка и перемешивали 24 ч при 20° С. Смесь разбавили 100 мл хлороформа, промыли водой (2×100 мл), упарили. К остатку прибавили 100 мл гексана, через 30 мин гексан декантировали, а оставшийся сироп еще раз промыли гексаном, затем хроматографировали на силикагеле (колонка 20×2 см, хлороформ — метанол, 14 : 1), получили 570 г бензилиденового производного (XV), т. пл. 129° С (хлороформ — эфир), $[\alpha]_D^{20} +155^\circ$ (с 1, хлороформ). Полученное вещество растворили в 30 мл смеси бензол — штрOMETAN (1 : 1), прибавили 1 г сит 4 А, 560 мг цианида ртути и 40 мг бромиды ртути. Через 1 ч прибавили при 20° С 0,93 г ацетобромгалактозы и выдерживали смесь 4 ч при 60° С. Разбавили 100 мл хлороформа, промыли водой (50 мл), насыщенным раствором NaHCO₃ (50 мл), высушили CaCl₂. Растворители упарили и остаток выдерживали 2 ч при 100° С с 20 мл 60% уксусной кислоты, затем упарили досуха и остаток хроматографировали на силикагеле (колонка 20×1,5 см, 5→10% метанола в хлороформе); полученные 600 мг вещества дезацетилировали по Земплеру, обработали катионитом IR-120 (H⁺), в метанольный раствор (30 мл) соединения (XVI) прибавили 300 мг 10% Pd/C и гидрировали 15 ч при 20° С. Катализатор отфильтровали и к раствору прибавили 1 мл уксусного ангидрида. Через 4 ч упарили, упарили с этанолом и перекристаллизовали из этанола, получили 300 мг соединения (XVII) (42%, в пересчете на гликозид (XIV)). Т. пл. 205—208° С, $[\alpha]_D^{20} +82^\circ$ (с 1, вода). ПМР (D₂O): 1,87м (2H, CCH₂C), 1,99с (3H, Ac), 3,46м (2H, CH₂), 3,60м (2H, CH₂), 4,42д (1H, J_{1,2} 8 Гц, H-1). Найдено, %: С 42,55, Н 5,83, N 5,16. C₁₈H₂₁F₃N₂O₁₂. Вычислено, %: С 42,54, Н 5,78, N 5,22.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-4,6-ди-О-ацетил-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)-2-дезоксид- β -D-галактопиранозид (XXII). Раствор 383 мг (1 ммоль) 2-ацетамидо-3-О-(β -D-галактопиранозил)-2-дезоксид- β -D-галактопиранозиды [26] в 5 мл пиридина и 2 мл уксусного ангидрида выдерживали 5 ч при 20° С, упарили досуха, остаток растворили в 30 мл DMF и прибавили 120 мг (1,2 ммоль) гидразинаацетата, перемешивали при 20° С до полного растворения гидразинаацетата и еще 6 ч при 20° С. Смесь разбавили 150 мл хлороформа, промыли 50 мл насыщенного раствора NaCl, высушили MgSO₄, упарили, еще раз упарили с толуолом. Остаток растворили в 20 мл дихлорметана, прибавили 430 мг (4 ммоль) 2,6-лутидина и 230 мг (2 ммоль) мезилхлорида. Выдерживали 48 ч при 20° С, разбавили 40 мл дихлорметана, промыли холодной водой (20 мл), насыщенным раствором NaHCO₃ (20 мл), высушили CaCl₂, упарили, снова упарили с толуолом. Остаток (оксазолин (XXI), 530 мг, 86%) гомогенизируют по ТСХ и имеет R_a* 1,1 (хлороформ — метанол, 9 : 1). Полученный оксазолин (XXI) растворили в 15 мл дихлорэтана, прибавили 510 мг (3 ммоль) 3-(трифторацетамидо)пропанола, 15 мг 4-толуолсульфокислоты и выдерживали 15 мин при 70° С. Хроматографией на силикагеле (колонка 20×2 см, 3→5% метанола в хлороформе) выделили 500 мг (76%) гликозида (XXII). Т. пл. 101—103° С (хлороформ — эфир — гексан), $[\alpha]_D^{20} +33^\circ$ (с 0,54, хлороформ), ПМР (CDCl₃): 1,88м (2H, CCH₂C), 1,99с, 2,00с, 2,07с, 2,08с, 2,13с, 2,16с (21H, 7Ac), 5,01д (1H, J_{1,2} 8,5 Гц, H-1), 5,97д (1H, J_{2,нн} 8 Гц, NH). Найдено, %: С 47,31, Н 5,46, N 3,50. C₃₁H₄₃F₃N₂O₁₈. Вычислено, %: С 47,21, Н 5,46, N 3,55.

* R_a — подвижность относительно парацетата исходного дисахарида.

Азиды (VIII) и (XIII). К раствору 5 мкмоль этилового эфира (VII) или (XI) в 2 мл абс. этанола прибавили 100 мкл гидразингидрата и выдерживали 24 ч при 0° С. Этанол удалили в вакууме при 20° С, затем избыток гидразинацетата удалили в вакуум-эксикаторе при 4° С над P₂O₅ при 0,1 мм рт. ст. Остаток растворили в 0,5 мл DMF, охладили до 0° С и прибавили 5 мкл 4 М раствора HCl в диоксане. Охладили до -25° С и при перемешивании прибавили раствор 1 мкл *трет*-бутилнитрита в 7 мкл DMF, перемешивали 30 мин при -25° С, затем прибавили 8 мкл 0,5 М раствора сульфаминовой кислоты в DMF и выдерживали 20 мин при -30° С, после чего дали подняться температуре до 0° С. Полученные азиды (VIII) и (XIII) сразу использовали для присоединения к белкам.

Азиды (XX) и (XXVI). К раствору 0,1 ммоль гликозида (XVII) или (XXIII) (последний получили из ацетата (XXII) O-дезацетилированием по Земплену) в 10 мл смеси этанол — вода (1 : 1) прибавили 2 мл анионита Amberlyst A-26 (OH⁻) и перемешивали 15 ч при 20° С. Смолу отделили, раствор упарили, остаток растворили в 5 мл абс. метанола и прибавили раствор 0,15 ммоль N-оксисукцинимидного эфира моноэтилового эфира адипиновой кислоты в 1,5 мл оксолана (реагент получали из 2 ммоль моноэтилового эфира адипиновой кислоты, 2 ммоль N-оксисукцинимид и 2 ммоль дициклогексилкарбодимид в 10 мл оксолана, 15 ч при 20° С, раствор фильтровали и осадок дициклогексилмочевины промывали 10 мл оксолана). Через 15 ч прибавили 50 мл абс. эфира, раствор декантировали, а осадок на стенках колбы несколько раз промыли оксоланом. Полученные этиловые эфиры (XIX) и (XXV) далее превращали в азиды (XX) и (XXVI) по описанной выше методике.

Конъюгация азидов с БСА с цитохромом с. Раствор азиды, полученный из 5 мкмоль соответствующего этилового эфира, порциями прибавляли при 0° С к раствору 5 мг белка в буферном растворе при pH 8,9–9,3 (0,08 М тетраборат натрия — 0,35 М бикарбонат калия). Раствор выдерживали 20 ч при 4° С, диализовали против дистиллированной воды при 4° С (для конъюгатов БСА) или фильтровали через колонку с сефадексом G-25 (15×1 см, элюция водой при 4° С), лиофилизовали. Результаты углеводного анализа полученных неогликопротеинов (вес. % углеводов) следующие:

БСА+(VIII) — 1,7%; цитохром с+(VIII) — 2,5%;
 БСА+(XIII) — 1,0%; цитохром с+(XIII) — 1,5%;
 БСА+(XX) — 10%; цитохром с+(XX) — 17%;
 БСА+(XXVI) — 4%; цитохром с+(XXVI) — 5%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Strecker G., Montreuil J. *Biochimie*, 1979, v. 61, № 11–12, p. 1199–1246.
2. Springer G. F., Chingsong-Popov R., Schirmacher V., Desai P. R., Tegtmeyer H. *J. Biol. Chem.*, 1983, v. 258, № 9, p. 5702–5706.
3. Springer G. F., Desai P. R. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 61, № 2, p. 420–425.
4. Irle C., Piguat P.-F., Vassali P. *Cell. Immun.*, 1977, v. 31, № 242, p. 32–43.
5. Медведев А. Э., Габриэлян Н. Д., Бовин Н. В., Хорлан А. Я. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 7, с. 908–919.
6. Springer G. F., Cantrell J. L., Desai P. R., Tegtmeyer H. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1982, v. 22, № 1, p. 29–35.
7. Paulsen H., Hölck J.-P. *Carbohydr. Res.*, 1982, v. 109, № 1, p. 89–107.
8. Paulsen H., Paal M. *Carbohydr. Res.*, 1983, v. 113, № 2, p. 203–218.
9. Paulsen H., Paal M., Schultz M. *Tetrahedron Lett.*, 1983, v. 24, № 17, p. 1759–1762.
10. Paulsen H., Jacquinet J.-C., Rust W. *Carbohydr. Res.*, 1982, v. 104, № 2, p. 195–219.
11. Jacquinet J.-C., Paulsen H. *Tetrahedron Lett.*, 1981, v. 22, № 15, p. 1387–1390.
12. Ratcliffe R. M., Baker D. A., Lemieux R. U. *Carbohydr. Res.*, 1981, v. 93, № 1, p. 35–41.
13. Bencomo V. V., Jacquinet J.-C., Sinaj P. *Carbohydr. Res.*, 1982, v. 110, № 2, p. C9–C11.
14. Bencomo V. V., Sinaj P. *Carbohydr. Res.*, 1983, v. 116, № 2, p. C9–C12.
15. Piskorz C. F., Abbas S. A., Matta K. L. *Carbohydr. Res.*, 1984, v. 126, № 1, p. 115–124.
16. Ferrari B., Pavia A. A. *Carbohydr. Res.*, 1980, v. 79, № 1, p. C1–C7.
17. Bencomo V. V., Sinaj P. *Glycoconjugate J.*, 1984, v. 1, № 1, p. 5–8.
18. Lemieux R. U., Ratcliffe R. M. *Can. J. Chem.*, 1979, v. 57, № 10, p. 1244–1251.

19. Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1982, № 5, с. 1148–1156.
20. Бочков А. Ф., Обручников И. В., Кочерков Н. К. Журн. общ. химии, 1974, т. 44, № 5, с. 1197–1203.
21. Bovin N. V., Zurabyan S. E., Khorlin A. Ya. Carbohydr. Res., 1981, v. 98, № 1, p. 25–35.
22. Бовин Н. В., Хорлин А. Я. Биоорганич. химия, 1984, т. 10, № 6, с. 853–860.
23. Vaultier M., Knouzi N., Carrié R. Tetrahedron Lett., 1983, v. 24, № 8, p. 763–764.
24. Inman J. K., Merchant B., Claflin L., Tasey S. E. Immunochemistry, 1973, v. 10, № 3, p. 165–174.
25. Бовин Н. В., Иванова И. А., Хорлин А. Я. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 662–670.
26. Flowers H. M., Shapiro D. J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 6, p. 2041–2043.
27. Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1981, № 12, с. 2806–2808.
28. Springer G. F., Desai P. R., Murthy M. S., Scanlon E. F. In: Glycoproteins and glycolipids in disease processes/Ed. Walborg E. F., Jr. ASC Symp. Ser., 1978, v. 80, p. 311.
29. Pritchard D. J., Todd C. W. J. Chromatogr., 1977, v. 133, № 1, p. 133–139.
30. Gramstad T., Haszeldine R. N. J. Chem. Soc., 1956, № 1, p. 173–180.

Поступила в редакцию
21.III.1985

SYNTHESIS OF NEOGLYCOPROTEINS HAVING HAPTENS
(Gal β 1-3GalNAc α 1-)Ser, Gal β 1-3GalNAc α 1, Gal β 1-3GalNAc β 1,
(GalNAc α 1-)Ser

BOVIN N. V., ZEMLYANUKHINA T. V., KHORLIN A. YA.

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

Glycosides Gal β 1-3GalNAc α 1-OCH₂CH(CONHCH₃)NHCO(CH₂)₄COOEt, Gal β 1-3GalNAc α 1-O(CH₂)₃NH₂, Gal β 1-3GalNAc β 1-O(CH₂)₃NH₂, and GalNAc α 1-OCH₂CH·(CONHCH₃)NHCO(CH₂)₄COOEt were synthesized and coupled with proteins (BSA and cytochrome *c*) to give the corresponding artificial antigens, including T (Thomson – Friedenreich) and T_N-antigens.