



УДК 547.455.623' 16.057

УДОБНЫЙ СИНТЕЗ ФЛУОРОГЕННЫХ ГЛИКОЗИДОВ
 α -L-ИДУРОНОВОЙ КИСЛОТЫВозный Я. В., Каличева И. С., Галоян А. А.,
Гусина Н. В.*

Институт биохимии Академии наук АрмССР, Ереван;

* Республиканский центр метаболических болезней, Могилев

Фотохимическим бромированием метил(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-глюкопиранозилфторид)уроната и восстановлением образующегося 5-*C*-Br-производного трибутилстаннанола получен с выходом 67% метил(2,3,4-три-*O*-ацетил- α -*L*-идопиранозилфторид)уронат. Конденсация этого фторида с триметилсилиловыми эфирами 4-метилумбеллиферона и 4-трифторметилумбеллиферона с высоким выходом приводит к гликозидам α -*L*-идурановой кислоты. Осуществлено снятие защитных групп, структура промежуточных и конечных соединений подтверждена спектрами ¹³C-ЯМР. Показано, что 4-трифторметилумбеллиферил- α -*L*-идопиранозидурановая кислота может служить субстратом α -*L*-идуранидазы.

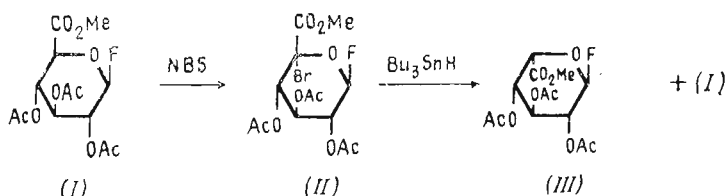
L-Идурановая кислота входит в состав тканей млекопитающих и является важным компонентом таких гетерополисахаридов (гликозаминогликанов), как дерматансульфат, гепарансульфат и гепарин [1]. Отсутствие в организме фермента, расщепляющего гликозиды α -*L*-идурановой кислоты (КФ 3.2.1.76), приводит к тяжелому наследственному заболеванию — мукополисахаридозу типа I (МПС-I) [2]. Существуют три фенотипических варианта МПС-I: синдром Гурлер (МПС-I-H), синдром Шейе (МПС-I-S) и комбинация Гурлер/Шейе (МПС-I-H/S) [2]. Для детекции всех форм заболевания предложен удобный флуорогенный субстрат α -4-метилумбеллиферилгликозид *L*-идурановой кислоты [3, 4], выпуск которого налажен в настоящее время фирмой Calbiochem [5].

Стратегия известных синтезов гликозидов *L*-идурановой кислоты, в том числе и производных 4-метилумбеллиферона, заключается в первоначальном синтезе гликозидов *L*-идопиранозы и последующем окислении гидроксильной группы при *C*-6. Исследовательские работы направлены преимущественно на разработку удобных способов получения труднодоступного моносахарида — *L*-идозы [6, 7].

Цель настоящей работы состоит в создании гликозилирующего реагента на основе *L*-идурановой кислоты, который позволял бы получать различные флуорогенные гликозиды, пригодные для диагностики заболеваний мукополисахаридозом типа I.

Отправной точкой послужил недавно открытый короткий путь к производным *L*-идурановой кислоты исходя из доступной *D*-глюкуроновой кислоты путем радикальной эпитимеризации [8]. Согласно этому подходу, 1-производные метил(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-глюкопиран)уроната подвергаются фотохимическому бромированию *N*-бромсукцинимидом (NBS). Образующийся с хорошим выходом гликозид 5-*C*-Br-глюкуроновой кислоты после восстановления галоната трибутилстаннанола дает смесь *D*-глюко- и *L*-идо-эпимеров, которую удается разделить препаративной хроматографией. Некоторым недостатком является преобладание в образующейся смеси урановых кислот эпимера с *D*-глюко-конфигурацией.

Ранее нами была предпринята попытка использовать указанную эпитимеризацию при *C*-5 для синтеза 4-трифторметилумбеллиферил- α -*L*-идураниды. Опыты по фотохимическому бромированию и восстановлению трибутилстаннанола метил(4-трифторметилумбеллиферил- β -*D*-глюкопиранозид)уроната, синтез которого описан ранее [9], не увенчались успехом вследствие совпадения хроматографической подвижности конечных про-



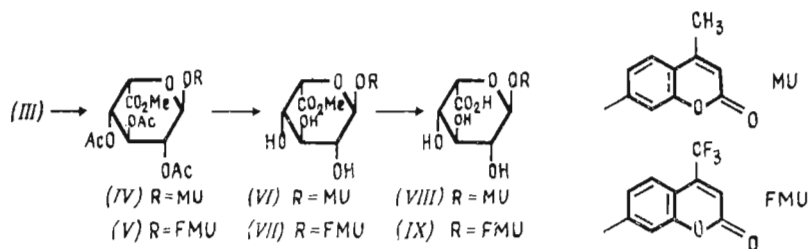
дуктов (*D*-глюко- и *L*-идо-эпимеров). С метил(4-метилумбеллиферил-β-*D*-глюкопиранозид)уронатом опыты не проводились из-за ожидаемого большого расхода реагентов, связанного с бромированием и восстановлением метильной группы агликона.

В настоящей работе в отличие от применявшихся ранее 1-*O*-ацетил- или 1-*O*-метилпроизводных глюкуроновой кислоты в качестве исходного соединения был выбран метил(2,3,4-три-*O*-ацетил-β-*D*-глюкуронопиранозилфторид)уронат (I). В основе такого выбора находились известные данные о том, что связь C-F не расщепляется при действии трибутилстаннана [10], а также то обстоятельство, что при успехе был бы обеспечен выход к ключевому фториду (III), который в дальнейшем можно было бы использовать для синтеза самых разных α-*L*-идуринов.

Оказалось, что первая стадия этого процесса протекает аналогично описанным ранее примерам [8, 11] и приводит к кристаллическому бромиду (II) с выходом 81%. А вот в ходе восстановления бромид (II) трибутилстаннаном, которое легко осуществляется при кипячении в толуоле в течение 5–15 мин, наблюдается резкое увеличение селективности образования производного *L*-идуруновой кислоты — соединения (III) по сравнению с 1-*O*-ацетил- и 1-*O*-метилпроизводными *D*-глюкуроновой кислоты. Соотношение эпимеров по C-5 составляет ~3:1 с преобладанием *L*-идо-эпимера. Образующиеся таким образом соединения (I) и (III) были разделены пренаративной колоночной хроматографией на силикагеле. На наш взгляд, это превращение делает весьма доступными широкий круг производных *L*-идуруновой кислоты, тем более что в синтезе исходного соединения (I) достигнут более высокий выход, чем это описано в первоначальном сообщении [9] (70–72% вместо 49%).

Полученный фторид (III) был далее введен в конденсацию с триметилсилиловыми эфирами 4-метил- и 4-трифторметилумбеллиферона в среде бензола и при катализе эфиром трехфтористого бора аналогично работе [9], в которой описан синтез гликозидов *D*-глюкуроновой кислоты: образующиеся с хорошим выходом кристаллические эфиры (IV) и (V) были выделены хроматографией на силикагеле, защитные ацетильные и метильные группы удалены в два приема — кислотным метанолизом и щелочным гидролизом. Конечные гликозиды (VIII) и (IX) очищались геле-хроматографией на сорбенте Toyopearl HW 55.

Структура конечных и всех промежуточных продуктов доказана с помощью спектроскопии ЯМР. *L*-идо-Конфигурация ключевого фторида (III) следует из рассмотрения КССВ протонов пиранозного цикла. В частности, $J_{4,5}$ составляет 2,5 Гц, что весьма близко к значению константы $J_{4,5}=3,5$ Гц, отмеченной для метил(1,2,3,4-тетра-*O*-ацетил-α-*L*-идо-пиран)уроната [8]. Напротив, для *D*-глюко-эпимера соответствующая константа составляет ~9 Гц. Отсутствие *D*-глюко-эпимера, которое весьма важно для диагностики заболеваний типа Гурлер, в соединениях (IV)–(IX) контролировалось путем прямого сравнения ¹³C-ЯМР-спектров для *D*-глюко- и *L*-идо-эпимеров. Характер распределения сигналов C2–C5 в этих двух сериях резко различается. Для производных *L*-идуруновой кислоты они проявляются в узкой области, ограниченной ~1 м.д., для производных *D*-глюкуроновой кислоты интервал составляет 4–4,5 м.д. Весьма информативно также сопоставление в области резонанса апомерных углеродных атомов. Например, для соединения (V) и его глюко-аналога разница в химических сдвигах C1 достигает 2,7 м.д., для деацетилированного производного (VIII) — 0,9 м.д. и для конечного гликозида (IX) — 0,4 м.д., что позволяет надежно осуществлять контроль на всех этапах работы.



Изучена возможность использования трифторметильного аналога соединения (VIII) в диагностических целях в сравнении с препаратом фирмы Calbiochem, применение которого для идентификации болезни Гурлер описано ранее [12]. Данные, полученные при исследовании лейкоцитов больного синдромом Гурлер, его родителей, больных другими типами мукopolисахаридозов и здоровых доноров свидетельствуют о том, что соединение (IX) — равноценный субстрат для диагностики и выявления гетерозиготного носительства этого заболевания.

Таким образом, разработан удобный синтез метил(2,3,4-три-О-ацетил- α -L-идопиранозилфторид)уроната. Показано, что это соединение может служить эффективным гликозилирующим средством в синтезе флуорогенных гликозидов L-идуроновой кислоты, находящих применение в диагностике мукopolисахаридозов типа I.

Экспериментальная часть

D-Глюкуроновая кислота — продукт фирмы Fluka; N-бромсукцинимид, ч. (Союзреактив), очищен кристаллизацией из хлороформа; трибутилстаннан, т. кип. 80° С (0,4 мм рт. ст.) — получен восстановлением трибутилоловохлорида алюмогидридом лития, четыреххлористый углерод, ч. (Союзреактив), перегнан перед использованием. Фторид (I), триметилсилиловые эфиры 4-метилумбеллиферона и 4-трифторметилумбеллиферона получены по методике [9]. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV 254 (ЧССР), для обнаружения соединений использовали лампы ДБ-15 и ДРУФЗ 125 (СССР). Значения подвижности приведены для той же системы растворителей, которая использовалась в колоночной хроматографии. Удельные вращения измеряли на поляриметре ЕПО-1 (СССР). ^{13}C -ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker AM-300 (ФРГ). Хим. сдвиги приведены в миллионных долях от тетраметилсилана, КССВ — в герцах. Колоночная хроматография проводилась на сорбенте Silpearl (ЧССР).

Метил(2,3,4-три-О-ацетил- β -D-глюкопиранозилфторид)уронат (I). Из 5,0 г метил(1,2,3,4-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиран)уроната получали 3,2 г (72%) эфира (I) по методике [9], по вместо эфира для экстракции фторида (I) из реакционной смеси использовали хлороформ, в котором соединение (I) растворяется лучше.

Метил(2,3,4-три-О-ацетил-5-С-бром- β -D-глюкопиранозилфторид)уронат (II). Раствор 2,0 г (5,95 ммоль) соединения (I), 2,0 г (11,2 ммоль) N-бромсукцинимида в 30 мл четыреххлористого углерода кипятили 2 ч с обратным холодильником, освещая лампой накаливания 150 Вт. Смесь охлаждали, фильтровали, фильтрат унаривали и колоночной хроматографией в системе растворителей эфир — бензол, 1 : 4, выделяли 2,0 г (81%) соединения (II), R_f 0,40, т. пл. 102–103° С (из этанола), $[\alpha]_D^{20}$ -119° (с 0,8, хлороформ). ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): 106,4д (C1, $J_{\text{C, F}}$ 227), 70,3д (C2, $J_{\text{C, F}}$ 17,1), 70,1д (C3, $J_{\text{C, F}}$ 9,8), 69,6 (C4), 88,0д (C5, $J_{\text{C, F}}$ 7,3), 164,0 (C6), 54,4 (COOCH_3), 168,9; 169,1; 169,7 (COCH_3), 20,5; 20,6 (COCH_3).

Метил(2,3,4-три-О-ацетил- α -L-идопиранозилфторид)уронат (III) и метил(2,3,4-три-О-ацетил- β -D-глюкопиранозилфторид)уронат (I). Раствор 2,0 г (4,82 ммоль) соединения (II) и 2,0 мл (7,42 ммоль) трибутилстаннана в 15 мл толуола кипятили 15 мин в колбе с обратным холодильником. После охлаждения и колоночной хроматографии в системе раствори-

телей эфир — бензол, 1 : 4, выделяли 0,41 г (25%) соединения (I), R_f 0,30, т. пл. 108—109° С (из смеси эфир — гептан), $[\alpha]_D +18^\circ$ (с 1,0, хлороформ), и 1,08 г (67%) соединения (III), R_f 0,24, $[\alpha]_D -39^\circ$ (с 1,1, хлороформ). ПМР (C_6D_6) 5,61д (1H, $J_{1,F}$ 48,5, H1), 5,40м (1H, $J_{4,3}$ 3,5, $J_{4,5}$ 2,5, H4), 5,29м (1H, $J_{3,4}$ 3,5, $J_{3,1}$ 1,5, $J_{3,2}$ 3,0, H3), 5,05м (1H, $J_{2,1}$ 1,5, $J_{2,3}$ 3,0, $J_{2,4}$ 1,0, $J_{2,F}$ 5,0, H2), 4,93д (1H, $J_{5,4}$ 2,5, H5), 3,32с (3H, OCH₃), 1,55с (3H, OAc), 1,57с (3H, OAc), 1,68с (3H, OAc).

¹³C-ЯМР (CDCl₃): 104,6д (C1, $J_{C,F}$ 226), 64,3д (C2, $J_{C,F}$ 64), 65,2; 65,9; 67,4 (C3, C4, C5), 167,1, (C6), 20,4; 20,5 (COCH₃), 52,7 (COOCH₃), 168,6; 168,9; 169,1 (COCH₃).

Метил(4-метилумбеллиферил-2,3,4-три-О-ацетил-α-L-идопиранозид) уронат (IV). К раствору 0,69 г (2,05 ммоль) соединения (III) и 0,68 г (2,74 ммоль) триметилсилилового эфира 4-метилумбеллиферона в 4 мл абс. бензола прибавляли при перемешивании раствор 0,26 мл (2,1 ммоль) эфирата трехфтористого бора в 1 мл абс. бензола. Через 18 ч смесь упаривали, прибавляли 8 мл смеси пиридин — уксусный ангидрид, 1 : 3, оставляли на ночь. Разбавляли хлороформом (20 мл), промывали водой (2×50 мл), упаривали, хроматографировали на колонке в системе растворителей эфир — бензол, 1 : 1. Выделяли 0,63 г (62%) соединения (IV), R_f 0,20, т. пл. 112—113° С (из этанола), $[\alpha]_D -98^\circ$ (с 0,8, хлороформ). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 95,6 (C1), 66,6; 66,9; 67,7 (C2, C3, C4, C5), 167,8 (C6), 52,8 (COOCH₃) 20,6; 20,8 (COCH₃), 168,9; 169,3; 169,4 (COCH₃); 18,6; 104,5; 112,8; 113,1; 115,4; 125,9; 152,2; 154,9; 158,5; 160,8 (4-метилумбеллиферил).

Метил(4-трифторметилумбеллиферил-2,3,4-три-О-ацетил-α-L-идопиранозид) уронат (V). Аналогично соединению (IV) из 0,32 г (0,95 ммоль) фторида (III), 0,32 г (1,06 ммоль) триметилсилилового эфира 4-трифторметилумбеллиферона и 0,13 мл (1,05 ммоль) эфирата трехфтористого бора после колоночной хроматографии в системе растворителей эфир — бензол (1 : 4) получали 0,41 г (79%) производного (V), R_f 0,25, т. пл. 132—133° С (из смеси эфир — гептан), $[\alpha]_D -97^\circ$ (с 0,5, хлороформ). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 95,6 (C1), 66,5; 66,8; 67,8 (C2, C3, C4, C5), 167,7 (C6), 52,8 (COOCH₃), 20,6; 20,7 (COCH₃); 104,8, 109,0; 113,6; 113,9; 126,8; 141,2; 158,8; 159,3 (4-трифторметилумбеллиферил).

Метил(4-метилумбеллиферил-α-L-идопиранозид) уронат (VI). Смесь 10 мл абс. метанола и 5 мл сухого хлороформа охлаждали до 0° С и при охлаждении прибавляли 0,4 мл хлористого ацетида. К полученному раствору прибавляли 0,40 г соединения (IV), выдерживали 24 ч при 20° С, упаривали и хроматографировали на колонке с этилацетатом в качестве элюента. Выделяли 0,24 г (88%) соединения (VI), R_f 0,25, $[\alpha]_D 104^\circ$ (с 1,7, этанол). ¹³C-ЯМР $C_6H_5N-d_5$ 100,8 (C1), 71,9; 72,4; 72,9 (C2, C3, C4), 73,4 (C5), 171,3 (C6), 51,9 (COOCH₃); 18,2; 104,5; 112,9; 113,8; 115,0; 152,8; 155,5; 160,9 (4-метилумбеллиферил).

Метил(4-трифторметилумбеллиферил-α-L-идопиранозид) уронат (VII). Аналогично соединению (VI) из 0,28 г соединения (V) получали 0,16 г (74%) метилового эфира (VII), R_f 0,50 (в этилацетате), $[\alpha]_D -104^\circ$ (с 1,4, хлороформ). ¹³C-ЯМР ($C_6H_5N-d_5$) 100,7 (C1), 71,8; 72,4; 72,9; 73,6 (C2, C3, C4, C5), 171,2 (C6), 51,9 (COOCH₃); 105,2; 108,2; 114,1; 114,8; 121,6; 126,6; 140,4; 156,4; 159,2; 161,6 — 4-трифторметилумбеллиферил.

4-Метилумбеллиферил-α-L-идопиранозидуруновая кислота (VIII). К 0,05 г соединения (VI) прибавляли 0,5 мл 1 М NaOH, выдерживали 30 мин при 20° С, нейтрализовали 1 М HCl и упаривали. Гель-хроматографией на колонке с Toyopearl HW 55 с метанолом в качестве элюента выделяли 0,044 г (91%) соединения (VIII), R_f 0,16 (n-бутанол — конд. водный аммиак, 5 : 2), $[\alpha]_D -60^\circ$ (с 0,9, вода). ¹³C-ЯМР (D₂O): 100,0 (C1), 71,2; 72,1 (C2, C3, C4, C5), 174,4 (C6); 49,1; 104,8; 112,4; 115,3; 115,9; 127,6; 154,8; 157,0; 160,5; 165,2 (4-метилумбеллиферил), $[\alpha]_D -94^\circ$ [6], $[\alpha]_D -48^\circ$ [7].

4-Трифторметилумбеллиферил-α-L-идопиранозидуруновая кислота (IX). К 0,05 г соединения (VII) прибавляли 0,5 мл 1 М NaOH, выдерживали

вали 30 мин при 20° С, нейтрализовали 1 М НСl, упаривали. Гель-хроматографией на колонке Toyocarl HW 55 с использованием метанола в качестве элюента выделяли 0,033 г (69%) соединения (IX), R_f 0,16 (*n*-бутанол — конц. водный аммиак, 5:2), $[\alpha]_D^{20} -58^\circ$ (с 0,7, вода), ^{13}C -ЯМР $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-d_5$ 99,3 (C1), 72,9; 74,5; 75,5 (C2, C3, C4), 74,1 (C5), 175,8 (C6); 105,5; 107,6; 113,3; 115,2; 122,2; 126,1; 140,5; 156,6; 159,5; 162,6 (4-трифторметилумбеллиферил).

Спектры ЯМР сняты в лаборатории физико-химических методов ИОХ АН СССР, в связи с чем авторы выражают глубокую благодарность д-ру хим. наук А. С. Пашкову.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fransson L. A.* // The Polysaccharides. V. 3./Ed. Aspinnall G. O. Orlando: Acad. Press, 1985. P. 337-415.
2. *Фон Фигура К., Клейн У.* // Лизосомы и лизосомные болезни накопления/Ред. Каллахан Д. В., Лоуден Д. А. М.: Медицина. 1984. С. 250-270.
3. *Weissmann B.* // Meth. Enzymol. 1978. V. 50. P. 141-150.
4. *Roma L. M.* // Meth. Enzymol. 1982. V. 83. P. 578-582.
5. *Calbiochem Biochemical* // Immunochemical Catalog. 1987. P. 161.
6. *Srivastava R. M., Hudson N., Seymour F. R., Weissmann B.* // Carbohydr. Res. 1978. V. 60. № 2. P. 315-326.
7. *Baggett N., Samra A. K., Smithson A.* // Carbohydr. Res. 1983. V. 124. № 1. P. 63-74.
8. *Chiba T., Sinaï P.* // Carbohydr. Res. 1986. V. 151. P. 379-389.
9. *Возный Я. В., Каличева И. С., Галоян А. А.* // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 12. С. 1655-1658.
10. *Ando T., Namigata F., Yamanaka H., Funasaka W.* // J. Amer. Chem. Soc. 1967. V. 89. № 22. P. 5719-5721.
11. *Ferrier R. J., Furneaux R. H.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1977. № 18. P. 1996-2000.
12. *Гусина И. Б., Пуржерман Г. Л.* // Лаб. дело. 1988. № 7. С. 46-49.

Поступила в редакцию
9.III.1989
После доработки
16.V.1989

A CONVENIENT SYNTHESIS OF FLUOROGENIC GLYCOSIDES OF α -L-IDURONIC ACID

VOZNYI Ya. V., KALICHEVA I. S., GALOYAN A. A., GUSINA N. B.*
*Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian
SSR, Yerevan:*

* *Regional Clinic, Republic Centre of Metabolic Diseases, Mogilev*

Photochemical bromination of methyl(2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl fluoride)uronate followed by reduction of 5-C-Br-derivative by tri-*n*-butylstannane led to methyl(2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-idopyranosyl fluoride)uronate. Condensations of the fluoride with TMS-derivatives of 4-methylumbelliferone and 4-trifluoromethylumbelliferone yielded glycosides of the L-iduronic acid. Structures of the final and intermediate products have been confirmed by ^{13}C NMR spectroscopy.