



УДК 547.458.41.057

© 1990 г.

Т. В. Землянухина, Н. В. Бовин

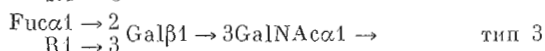
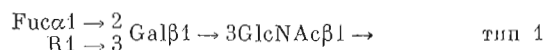
СИНТЕЗ ОЛИГОСАХАРИДОВ С ГРУППОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ КРОВИ А, В И Н (ТИП 3)

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Синтезированы тетрасахариды А и В, а также трисахарид Н типа 3, являющиеся терминальными фрагментами группоспецифических гликопротеинов и гликолипидов. Олигосахариды получены в виде R-гликозидов ($R = \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCF}_3$). 4,6; 4',6'-Ди-O-бензилиденное производное дисахарида $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow R$ селективно хлорацетилировали по 3'-ОН, затем α -фукозиллировали и снимали хлорацетильную защиту. Полученный защищенный трисахарид Н (тип 3) гликозиллировали 2-азидо-3,4,6-три-O-бензил-2-дезоксид- β -D-галактопиранозилхлоридом, а также тетра-O-бензил- α -D-галактопиранозилбромидом, получая защищенные тетрасахариды А и В (тип 3) соответственно.

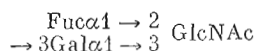
Снятием защитных групп получены R-гликозиды, которые затем переведены в $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ -гликозиды. Конденсацией последних с поли(4-нитрофенилакрилатом) синтезированы полиакриламидные конъюгаты со специфичностью А, В и Н (тип 3).

Группоспецифические эритроцитарные антигены АВН типов 3 и 4 обнаружены в виде гликопротеинов, а также гликолипидов. Хотя они являются минорными (по сравнению с антигенами типа 2) компонентами эритроцитов, антигены типов 3 и 4 определяют специфичность подгруппы крови A_2 ; высокая их экспрессия наблюдается на ряде других клеток.



R = GalNAc α A-структуры; R = Gal α B-структуры; R = H H-структуры

Отличие структур типов 3 и 4 от типов 1 и 2 состоит в том, что в коровой части находится N-ацетилгалактозамин вместо N-ацетилглюкозамина. Типы 3 и 4 различаются в первую очередь конфигурацией гликозидной связи остатка GalNAc (α - и β -соответственно), но есть различия и в более «глубинной» части. Структуры типа 4 найдены только в гликолипидах, где присоединены к фрагменту $\rightarrow \text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcCer}$ (глобосерия), в то время как структуры типа 3 встречаются в двух существенно различных вариантах: в гликопротеинах они присоединены непосредственно к белку (через серин или треонин), а в гликолипидах — к фрагменту



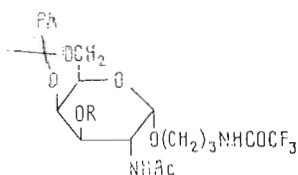
Структуры типов 3 и 4 ответственны за серологическое различие эритроцитов подгрупп A_1 и A_2 : на эритроцитах A_1 найдены обе детерминанты (3 и 4), тогда как для эритроцитов A_2 характерен повышенный уровень экспрессии детерминант Н (тип 3) и Н (тип 4) и пониженный уровень детерминант А всех типов [1—5]. Подобно группоспецифическим эритроцитар-

ным антигенам АВН (типы 1 и 2) и Le антигены типов 3 и 4 широко представлены и на других клетках: структура А (тип 3) найдена в человеческих аденокарциномах [6]; гликопротеиновый вариант антигена А (тип 3) найден в жидкости кисты пациента с карциномой яичника [7]; резкое увеличение экспрессии антигена Н (тип 4) характерно для рака молочной железы и тератокарциномы человека [8]. Для группы В также известны подгруппы, выявленные иммунологическими методами. Правда, эти данные пока никак не соотнесены с определенными химическими структурами. В целом для группы В не обнаружено столь широкого структурного разнообразия, как для А (а также Н), тем не менее следует отметить наличие гликолипида В (тип 4) в крысиной гепатоме [9].

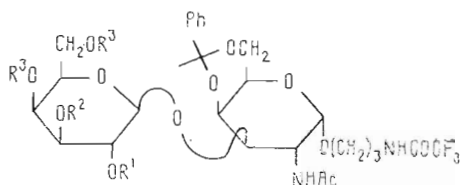
В последнее время интенсивно изучается возможность использования в качестве реагентов, способных достоверно выявлять не только группы, но и подгруппы крови системы АВО, моноклональных антител. Так, получены моноклональные антитела, специфически узнающие только А-антиген (тип 3) [2] или оба (типы 3 и 4) А [5]; получены антитела к антигенам Н (тип 3) и Н (тип 4) [5, 10—13]. Практическая направленность получения моноклональных антител, узнающих варианты антигенов системы АВО, обусловлена в первую очередь стремлением к максимально точному совпадению эритроцитарных антигенов у донора и реципиента при переливаниях крови и пересадках органов. Кроме того, представляется перспективным применение таких антител в гистохимической онкодиагностике [5].

В данной работе описан химический синтез олигосахаридов АВН типа 3, необходимых для точного установления специфичности моно- и поликлональных антител к природным группоспецифическим антигенам, а также для целенаправленного получения (при помощи синтетических антигенов) моноклональных антител с заранее заданной специфичностью.

При получении олигосахаридов (X), (XIV) и (XVII) применена традиционная стратегия синтеза структур АВН, а именно получение А- и В-олигосахаридов из их общего предшественника Н-олигосахарида. С целью последующей привязки олигосахаридов к макромолекулам или другим носителям в агликоновую часть сразу введена спейсерная группировка $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCF}_3$, дающая широкие возможности для дальнейшей функционализации [14—18]. Синтез исходного спейсированного производного N-ацетилгалактозамина (I) и его β -галактозилирование до дисахарида (II) описаны ранее [19]. Применение классических условий Гельфериха для β -галактозилирования соединения (I) вместо катализа трифлатом серебра [19] позволило поднять выход дисахарида (II) с 50 до 73%. Интересно, что в качестве побочного продукта реакции Гельфериха образуется с выходом 15% ацетат (Ia), т. е. вместо гликозилирования частично происходит ацетилирование соединения (I).



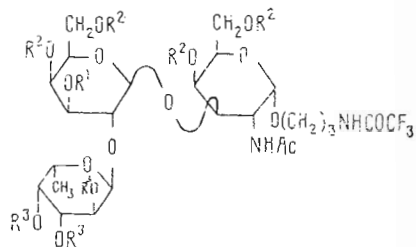
(I) R = H
(Ia) R = Ac



- (II) $R^1 = R^2 = R^3 = \text{Ac}$
- (III) $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$
- (IV) $R^1 = R^2 = \text{H}, R^3R^3 = \text{PhCH}$
- (V) $R^1 = R^2 = \text{Ac}, R^3R^3 = \text{PhCH}$

(VI) $R^1 = H, R^2 = ClAc, R^3R^3 = PhCH$

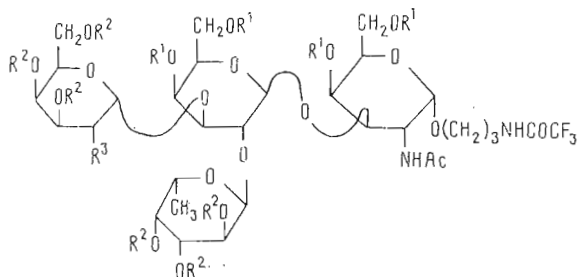
(VII) $R^1 = R^2 = ClAc, R^3R^3 = PhCH$



(VIII) $R^1 = ClAc, R^2R^2 = PhCH, R^3 = Bzl$

(IX) $R^1 = H, R^2R^2 = PhCH, R^3 = Bzl$

(X) $R^1 = R^2 = R^3 = H$



(XI) $R^1R^1 = PhCH, R^2 = Bzl, R^3 = OBzl$

(XII) $R^1 = H, R^2 = Bzl, R^3 = OBzl$

(XIII) $R^1 = Ac, R^2 = Bzl, R^3 = OBzl$

(XIV) $R^1 = R^2 = H, R^3 = OH$

(XV) $R^1R^1 = PhCH, R^2 = Bzl, R^3 = N_3$

(XVI) $R^1 = H, R^2 = Bzl, R^3 = N_3$

(XVII) $R^1 = R^2 = H, R^3 = NHAc$

Для введения фукозильного остатка получали дисахаридное производное (VI) с одной свободной гидроксильной группой при C-2': соединение (II) дезацетилювали по Земплону, затем реакцией с α, α -диметокситолуолом в присутствии TsOH получали бензилхлоридное производное (IV), которое селективно ацилировали хлорацетилом по 3'-ОН. Хотя моно(хлорацетилирование) диола (IV) идет селективно в положение 3'-ОН, максимально достигнутый выход хлорацетата (VI) составлял лишь 53%, из-за того, что даже при низкой конверсии исходного диола уже образовывался ди(хлорацетат) (VII). В описанных условиях (см. «Экспериментальную часть») соотношение (VI)/(VII) составляло 2 : 1. Положение хлорацетильной группы в соединении (VI) однозначно вытекает из данных спектров ПМР: моно(хлорацетилирование) приводит к слабому сдвигу H-3' на 1,4 м. д., а при введении второй хлорацетильной группы наблюдается слабый сдвиг H-2' на 1,2 м. д. (по сравнению с сигналом H-2' в монохлорацетате (VI)). Проведенное в аналогичных условиях ацетилирование диола (IV) хлористым ацетилом шло неизбирательно.

Фукозилирование хлорацетата (VI) проводили в условиях галоидионного катализа [20] три-О-бензил- α -L-фукопиранозилбромидом. Выход трисахарида (VIII) (с учетом возвращенного исходного (VI)) составил 63%. Фукозилбромид, а также тетра-О-бензил- α -D-галактопиранозилбромид (см. далее синтез тетрасахарида (XI)) получали из соответствующих этилтиогликозидов бромированием [24]. Снятием защитных групп при помощи обычных методов (см. «Экспериментальную часть») из соединения (VIII) получили спейсерированный трисахарид H (тип 3) (X).

Защищенный тетрасахарид (XI) синтезировали из трисахарида (IX), полученного в условиях реакции Земплена из хлорацетата (VIII). α -Галактозное звено вводили при помощи тетра-О-бензил- α -D-галактопира-

позилбромид в присутствии цианида ртути. Выход (XI) составил 83%. Снятием защитных групп получен спейсерированный тетрасахарид В (тип 3) (XIV).

Гликозилирование трисахарида (IX) 2-азидо-3,4,6-три-О-бензил-2-дезоксид-β-D-галактопиранозилхлоридом [22] в присутствии карбоната и перхлората серебра привело к тетрасахариду (XV). Его не удалось выделить гомогенным при помощи колоночной хроматографии на силикагеле, поэтому доочистку проводили на следующих стадиях синтеза — снятии защит и замене азидной группировки на ацетамидную. Общий выход спейсерированного тетрасахарида А (тип 3) на стадиях (IX) → → (XVII) составил 43%.

При снятии бензилиденовых защит с тетрасахаридного производного (XI) в водной уксусной кислоте наблюдалось частичное ацетилирование тетраола (XII), что следует из идентичности соединений, полученных перацетилированием соединения (XII) и перацетилированием побочных продуктов реакции (XI) → (XII). Ацетилирование наблюдалось также в реакции бензилиденового производного (XV) с водной уксусной кислотой. Следует отметить и необычно трудно шедший гидрогенолиз соединения (XII) по сравнению с нормально протекавшим гидрогенолизом его ацетата (XIII).

В макромолекулярную форму гликозиды (X) и (XVII) переводили путем присоединения к полиакриламиду (ПАА). Ранее ПАА-производные олигосахаридов получали акрилоилированием 3-аминопропилгликозидов и последующей сополимеризацией с акриламидом [23]. В данной работе аналогично построенные N-замещенные полиакриламиды получены более простым способом: 3-аминопропилгликозиды конденсировали с поли(4-нитрофенилакрилатом) в диметилформамиде, затем непрореагировавшие группы — $\text{COOC}_3\text{H}_4\text{NO}_2$ превращали в амидные действием аммиака*.

Групповую активность полученных ПАА-производных изучали в реакции ингибирования антиген — антитело [24] иммуноферментным методом (вариант ELISA)**. В качестве антигена брали сумму гликопротеинов из эритроцитов донора группы крови А, этим природным антигеном сенсibilizировали планшеты из полистирола. Антитела (моноклональные, 1Н10 [25]) были получены к рецептору эпидермального фактора роста клеточной линии А 431, которая берет происхождение от опухоли большого группы крови А. Данные по ингибированию позволяют заключить, что наибольшую специфичность к антителам 1Н10 имеет синтетический антиген А (тип 3): $\text{А (тип 3)} \gg \text{Н (тип 3)} > \text{А (трисахарид)} \gg \text{А (тип 1)}, \text{А (тип 2)}, \text{В (трисахарид)}, \text{В (тип 3)}$.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе Voetius (ГДР). Оптическое вращение измеряли на поляриметре JASCO DIP-360 (Япония) и Polamat M (ГДР). Спектры ЯМР снимали на приборах Bruker WM-500 (500 МГц), WM-250 (250 МГц) и Varian SC-300 при 303—305 К, значения химических сдвигов (δ, м. д.) приведены относительно тетраметилсилана. Константы спин-спинового взаимодействия измерены в герцах. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ), вещества обнаруживали 5% раствором серной кислоты в воде при 150° С. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле 40/100 мкм (Chemapol, ЧСФР), гель-хроматографию — на колонке (2,5 × 50 см) с TSK-гелем HW-40 (элюция водой). Растворители упаривали в вакууме при 30—40° С. Перацетилирование проводили смесью уксусного ангидрида с пиридином (1 : 2) при 20° С в течение 12—24 ч. Деацетилировали по Земплону в абс. метаноле, добавляя к раствору ацилпроизводного каталитическое количество 1 М раствора метилата натрия в метаноле; по окон-

* Синтезу этим способом, а также физико-химическим и иммунологическим свойствам ПАА-производных олигосахаридов будет посвящена отдельная публикация.

** ELISA — твердофазный иммуноферментный анализ.

чании реакции ионы Na^+ удаляли катионитом IR-120 (H^+). Для ВЭЖХ использовали прибор LKB 2152, колонка Separon SCX C18, 7 мкм (Tessek), элюция водным ацетонитрилом (3 → 10% ацетонитрила) при скорости 0,9 мл/мин, детекция при 206 нм. Твердые реагенты для гликозидного синтеза высушивали 2 ч в вакууме (0,1 мм рт. ст.) при 20° С. Растворители хранили над ситами 4 А, метанол — над ситами 3 А. Поли(4-нитрофенил-акрилат) любезно предоставлен А. Е. Ивановым (ИБХ АН СССР). Цианид и бромид ртути, α, α -диметокситолуол, хлорацетилхлорид использовали фирмы Merck (ФРГ), Amberlyst A26 — фирмы Fluka (Швейцария).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид- α -D-галактопиранозид (II). Смесь 1,01 г (2,2 ммоль) соединения (I) [19], 1,72 г (6,8 ммоль) цианида ртути, 0,245 г (0,68 ммоль) бромида ртути, 5 г сит 4 А в 15 мл бензола и 15 мл нитрометана выдерживали 3 ч в токе сухого азота, затем в течение 5 ч прибавляли раствор 2,8 г (6,8 ммоль) ацетобром-галактозы в 20 мл бензола. Через 20 ч смесь разбавили хлороформом, профильтровали, фильтрат промыли водой, раствором нитрата калия, раствором бикарбоната натрия, водой, высушили сульфатом натрия. Хроматографией (колонка 3 × 25 см, элюция бензол — ацетон, 10 : 1 → 1 : 1, затем хлороформ — метанол, 20 : 1) получено 1,58 г смеси веществ, из которой повторной хроматографией выделили 1,23 г (73%) дисахарида (II), идентичного полученному ранее [19]. Выделен также ацетат (Ia). Выход 15%. ПМР (250 МГц, CDCl_3): 1,86м (2H, CCH_2C), 2,00с, 2,10с (6H, 2Ac), 3,71м (1H, H-5), 4,35дд (1H, $J_{3,4} = 3,5$, $J_{4,5} = 0,7$, H-4), 4,78ддд (1H, $J_{2,3} = 11$, $J_{2,\text{NH}} = 9,5$, $J_{1,2} = 3,5$, H-2), 4,96д (1H, $J_{1,2} = 3,5$, H-1), 5,17дд (1H, $J_{3,2} = 11$, $J_{3,4} = 3,5$, H-3), 5,55с (1H, PhCH), 6,04д (1H, $J_{\text{NH},2} = 9,5$, NHAc), 6,73м (1H, NHCOCF_3), 7,36м, 7,52м (5H, Ph).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-4,6-О-бензилиден-3-О-(4,6-О-бензилиден- β -D-галактопиранозил)-2-дезоксид- α -D-галактопиранозид (IV). 1,03 г (1,30 ммоль) дисахарида (II) растворили в 25 мл метанола и дезацетилировали (см. выше). Полученный тетраол (III) высушили в вакууме, растворили в 20 мл ацетонитрила, прибавили 2,9 г (1,9 ммоль) α, α -диметокситолуола, 20 мг TfOH , выдерживали смесь 14 ч при 20° С, затем прибавили 1 мл пиридина и упарили досуха, остаток на стенках колбы дважды промыли гексаном. Хроматографией (колонка 3 × 15 см, хлороформ — метанол, 20 : 1 → 10 : 1) выделили 0,70 г (75%) диола (IV), т. пл. 236—238° С (этилацетат), $[\alpha]_D^{25} + 95^\circ$ (с 0,13, хлороформ — метанол, 1 : 1). ПМР (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 1,73м (2H, CCH_2C), 1,78с (3H, Ac), 3,30м (1H, H-2'), 3,37м (1H, H-3'), 3,89дд (1H, $J_{3,2} = 12$, $J_{3,4} = 3$, H-3), 4,02д (1H, $J_{4',3'} = 3,5$, H-4'), 4,20ддд (1H, $J_{3,2} = 12$, $J_{2,\text{NH}} = 8$, $J_{2,1} = 3$, H-2), 4,33д (1H, $J_{3,4} = 3$, H-4), 4,44д (1H, $J_{1',2'} = 7,5$, H-1'), 4,52д (1H, $J_{2',\text{OH}} = 4$, 2'-OH), 4,77д (1H, $J_{1,2} = 3$, H-1), 4,84д (1H, $J_{3',\text{OH}} = 6,5$, 3'-OH), 5,50с, 5,56с (2H, 2PhCH), 7,26—7,44м (5H, Ph), 7,48д (1H, $J_{\text{NH},2} = 8$, NHAc), 9,31м (1H, NHCOCF_3). Найдено, %: С 54,84, Н 5,48, N 4,04. $\text{C}_{33}\text{O}_{12}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{F}_3$. Вычислено, %: С 55,62, Н 5,52, N 3,93.

Получен также ди-О-ацетат соединения (IV), дисахарид (V), т. пл. 135—140° С (хлороформ — гексан), $[\alpha]_{546}^{24} + 110^\circ$ (с 0,4, хлороформ), $[\alpha]_D^{24} + 92^\circ$ (с 1, хлороформ). ПМР (250 МГц, CDCl_3): 1,80м (2H, CCH_2C), 2,02с, 2,06с, 2,08с (9H, 3Ac), 4,31дд (1H, $J_{3,2} = 12$, $J_{3,4} = 3,5$, H-3), 4,39д (1H, $J_{4',3'} = 3,5$, H-4'), 4,42д (1H, $J_{4,3} = 3,5$, H-4), 4,51ддд (1H, $J_{2,3} = 12$, $J_{2,\text{NH}} = 7,5$, $J_{2,1} = 3,5$, H-2), 4,92д (1H, $J_{1',2'} = 8$, H-1'), 4,95дд (1H, $J_{3',2'} = 10,5$, $J_{3',4'} = 3,5$, H-3'), 5,09д (1H, $J_{1,2} = 3,5$, H-1), 5,41дд (1H, $J_{2',3'} = 10,5$, $J_{2',1'} = 8$, H-2'), 5,53с, 5,54с (2H, 2PhCH), 6,36д (1H, $J_{\text{NH},2} = 7,5$, NHAc), 6,90м (1H, NHCOCF_3), 7,3—7,6м (10H, 2Ph). Найдено, %: С 55,48, Н 5,56, N 3,00, F 6,74. $\text{C}_{37}\text{H}_{43}\text{O}_{14}\text{N}_2\text{F}_3$. Вычислено, %: С 55,78, Н 5,44, N 3,52, F 7,15.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-4,6-О-бензилиден-3-О-(4,6-О-бензилиден-3-О-хлорацетил- β -D-галактопиранозил)-2-дезоксид- α -D-галакто-

пиранозид (VI) и (3-трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-4,6-С-бензилиден-3-О-(4,6-О-бензилиден-2,3-ди-О-хлорацетил-β-D-галактопиранозил)-2-дезоксид-α-D-галактопиранозид (VII). К раствору 500 мг (0,7 ммоль) диола (IV) в смеси 20 мл дихлорметана и 1 мл пиридина при -15° С прибавляли в течение 3 ч раствор 60 мкл (0,78 ммоль) хлорацетилялхлорида в 10 мл дихлорметана. Смесь выдерживали 4 ч при -10 ÷ -15° С, затем прибавили еще 30 мкл хлорацетилялхлорида в 5 мл дихлорметана, выдерживали 3 ч при -10 ÷ -15° С, после чего прибавили 1 мл метанола, разбавили смесь хлороформом, промыли водой, 1 н. раствором HCl, водой, упарили. Хроматографией (колонка 20 × 2,5 см, элюция смесью толуол — ацетон, 10 : 1 → 1 : 1, хлороформ — метанол, 30 : 1 → 5 : 1) выделили 290 мг (53%) монохлорацетата (VI), т. пл. 154—155° С (хлороформ — гексан), $[\alpha]_{546}^{23} +150^\circ$ (с 0,5, хлороформ — метанол, 1 : 1), $[\alpha]_D^{24} +140^\circ$ (с 0,6, хлороформ); ПМР (CDCl₃, 500 МГц): 1,80 м (2H, CCH₂C), 1,98с (3H, Ac), 3,56м, 3,71м (2H, OCH₂), 3,82дд (1H, J_{3,2} = 11, J_{3,4} = 3, H-3), 3,96м (1H, H-2'), 4,04д, 4,12д (2H, J_{AB} = 15, CH₂Cl), 4,35д (2H, H-4 и H-4'), 4,39д (1H, J_{1',2'} = 7,5, H-1'), 4,64ддд (1H, J_{2,3} = 11, J_{2,NN} = 8, J_{2,1} = 3,5, H-2), 4,80дд (1H, J_{3',2'} = 10, J_{3',4'} = 3, H-3'), 4,86д (1H, J_{1,2} = 3,5, H-1), 5,46с, 5,56с (2H, 2CHPh), 6,40д (1H, J_{NH,2} = 8, NHAc), 6,74м (1H, NHCOCF₃), 7,25—7,49м (10H, 2Ph). Найдено, %: С 52,90, Н 5,13, N 3,39, F 7,02, Cl 4,85. C₃₅O₁₃H₄₀N₂F₃Cl. Вычислено, %: С 53,27, Н 5,11, N 3,55, F 7,22, Cl 4,49. Дихлорацетат (VII), 170 мг (28%), т. пл. 224—225° С, $[\alpha]_{546}^{22} +138^\circ$ (с 0,5, хлороформ — метанол, 1 : 1). ПМР (500 МГц, DMSO-d₆): 1,81м (2H, CCH₂C), 1,84с (3H, Ac), 4,07 м, 4,18 м (4H, J_{AB} = 13, J_{A',B'} = 12, 2CH₂Cl), 5,08дд (1H, H-2'), 5,63 с, 5,64 с (2H, PhCH), 7,67 д (1H, NHAc), 7,25—7,48 м (10H, 2Ph). ПМР (500 МГц, CDCl₃): 1,80м (2H, CCH₂C), 2,00 с (3H, Ac), 4,18 дд (1H, H-3), 4,54 ддд (1H, H-2), 4,97м (3H, H-1, H-1', H-3'), 5,16 дд (1H, H-2'), 5,36 с, 5,40 с (2H, 2PhCH), 6,70д (1H, NHAc), 7,25—7,50 м (10H, 2Ph). Найдено, %: С 51,52, Н 4,80, N 3,09, F 6,17. C₃₇H₄₁O₁₄N₂F₃Cl₂. Вычислено, %: С 51,34, Н 4,78, N 3,24, F 6,58. Выделили также неидентифицированные вещества, которые объединили с дихлорацетатом (VII) и дезацетилировали по Земплону. Получили 230 мг (46% от исходно взятого) диола (IV).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-4,6-О-бензилиден-3-О-(4,6-О-бензилиден-2-О-(2,3,4-три-О-бензил-α-L-фукопиранозил)-3-О-хлорацетил-β-D-галактопиранозил)-2-дезоксид-α-D-галактопиранозид (VIII). Смесь 270 мг (0,34 ммоль) дисахарида (VI), 270 мг (1,4 ммоль) тетраэтил-аммонийбромида, 0,23 мл (1,4 ммоль) диизопропилэтиламина и 3 г сит 4 А в 15 мл дихлорметана и 7 мл DMF выдерживали 1 ч при 20° С в токе сухого азота, затем прибавили раствор три-О-бензил-α-L-фукопиранозилбромида, полученного из 1,4 ммоль соответствующего этилтиогликозида [21], в 5 мл дихлорметана. Смесь перемешивали 72 ч, затем обработали как описано в работе [21]. Хроматографией (колонка 20 × 2 см, элюция бензол — ацетон, 20 : 1 → 3 : 1, затем хлороформ — метанол, 30 : 1 → 10 : 1) выделили 120 мг (45%) исходного дисахарида (VI) и 145 мг (63%, считая на прореагировавший (VI)) трисахарида (VIII), т. пл. 154—155° С (хлороформ — гексан), $[\alpha]_{546}^{30} +34^\circ$ (с 1, хлороформ, $[\alpha]_D^{22} +38^\circ$ (с 1,7, хлороформ). ПМР (500 МГц, CDCl₃): 1,17д (3H, J = 5, CH₃ фукозы), 1,62м (2H, CCH₂C), 1,74с (3H, Ac), 4,42м (1H, H-2), 4,66д (1H, J_{1',2'} = 7, H-1'), 5,24дд (1H, J_{3',2'} = 13, J_{3',4'} = 3,5, H-3'), 5,22д (1H, J_{1',2'} = 3, H-1'), 5,35д (1H, J_{1,2} = 3, H-1), 5,51с, 5,55с (2H, 2PhCH), 7,73 д (1H, J_{NH,2} = 7,5, NHAc), 6,75м (1H, NHCOCF₃), 7,22—7,68м (25H, 5Ph). Найдено, %: С 62,21, Н 5,85, N 2,12, F 4,84, Cl 2,92. C₆₂H₆₈O₁₇N₂ClF₃. Вычислено, %: С 61,76, Н 5,69, N 2,32, F 4,72, Cl 2,94.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-3-О-[2-О-(α-L-фукопиранозил)-β-D-галактопиранозил]-α-D-галактопиранозид (X). К раствору 75 мг (0,063 ммоль) хлорацетата (VIII) в 3 мл абс. метанола прибавили 0,06 мл 1 н. раствора метилата натрия в метаноле. через 1,5 ч обработали катионитом IR-120 (H⁺), упарили. Хроматографией (колонка

1,5 × 15 см, элюция толуол — ацетон, 4 : 1 → 3 : 1) выделили 70 мг (98%) соединения (IX), $[\alpha]_D^{20} +14^\circ$ (с 0,16, хлороформ). ПМР (500 МГц, CDCl₃): 1,13д (3H, CH₃ фукозы), 1,79м (2H, CCH₂C), 1,82с (3H, Ac), 4,45 м (1H, H-2), 4,57 д (1H, $J_{1',2'} = 7$, H-1'), 5,05 д (1H, $J_{1'',2''} = 3,5$, H-1), 5,33д (1H, $J_{1,2} = 3$, H-1), 5,54с, 5,58с (2H, 2C₆HPh), 5,78м (1H, NHCOCF₃), 7,10—7,60 м (2Ph + NHAc).

30 мг (0,026 ммоль) производного (IX) выдерживали 3 ч в 5 мл 60% уксусной кислоты при 75—85° С, упарили. Остаток растворили в смеси хлороформ — метанол, профильтровали через тонкий слой силикагеля, раствор упарили. Гидрогенолизом остатка над 30 мг 10% Pd/C в течение суток с последующей гель-хроматографией выделили 13 мг (71%) трисахарида (X), $[\alpha]_{516}^{20} +33^\circ$ (с 0,26, вода), $[\alpha]_D^{23} +36^\circ$ (с 1, вода). ПМР (500 МГц, D₂O): 1,20д (3H, $J = 5$, CH₃ фукозы), 1,89м (2H, CCH₂C), 2,05с (3H, Ac), 4,64д (1H, $J_{1',2'} = 8$, H-1'), 4,86д (1H, $J_{1,2} = 3$, H-1), 5,24д (1H, $J_{1'',2''} = 3$, H-1'). ¹³C-ЯМР (D₂O): 16,7 (C-6''), 23,2 (CH₃CO), 28,9 (CCH₂C), 38,1 (CH₂N), 50,8 (C-2), 62,3; 62,6 (C-6 и C-6'), 66,2 (CH₂O), 68,2 (C-5''), 69,5 (C-4), 70,4 (C-4', C-2''), 71,0 (C-3''), 71,9 (C-5), 73,2 (C-4''), 74,9 (C-3'), 75,5 (C-2'), 76,3 (C-5'), 77,6 (C-3), 98,1 ($J_{C,H} = 170,9$, C-1), 100,6 ($J_{C,H} = 170,9$, C-1''), 103,4 ($J_{C,H} = 163,6$, C-1'), 169,4 (CONH).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-4,6-О-бензилиден-3-О-[4,6-О-бензилиден-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил-α-D-галактопиранозил)-2-О-(2,3,4-три-О-бензил-α-L-фукопиранозил)-β-D-галактопиранозил]-2-дезоксид (XI). Смесь 70 мг (0,062 ммоль) трисахарида (IX), 165 мг (0,65 ммоль) цианида ртути, 2 г сит 4 А в 8 мл дихлорметана выдерживали 2 ч при 20° С в токе сухого азота, затем за 0,5 ч прибавили раствор тетра-О-бензил-α-D-галактопиранозилбромид, полученного из 0,2 ммоль соответствующего этилтиогликозида [21], в 5 мл дихлорметана. Через 48 ч прибавили 0,5 мл метанола, смесь разбавили хлороформом, профильтровали, фильтрат промыли водой, раствором бикарбоната натрия, водой, высушили. Хроматографией (колонка 1,5 × 20 см, элюция бензол — ацетон, 10 : 1 → 2 : 1) выделили 85 мг (83%) тетрасахарида (XI), т. пл. 102—104° С (хлороформ — гексан), $[\alpha]_D^{23} +14,5^\circ$ (с 1, хлороформ). ПМР (250 МГц, CDCl₃): 1,03д (3H, $J = 6$, CH₃ фукозы), 1,57с (3H, Ac), 1,71м (2H, CCH₂C), 5,27д, 5,29д, 5,32д (3H, все $J_{1,2} = 3,5$, H-1, H-1'', H-1'''), 5,50с, 5,59с (2H, 2PhCH), 6,90 м (1H, NHCOCF₃), 7,00—7,60 м (Ph). Найдено, %: С 68,51, Н 6,10, N 1,80. C₉₄H₁₀₁F₃N₂O₂₁. Вычислено, %: С 68,39, Н 6,16, N 1,70.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-3-О-(3-О-α-D-галактопиранозил-2-О-α-L-фукопиранозил-β-D-галактопиранозил)-α-D-галактопиранозид (XIV). 60 мг (0,036 ммоль) дибензилиденового производного (XI) выдерживали 3 ч при 70° С с 2 мл 80% уксусной кислоты, смесь упарили, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (1 × 15 см, элюция 4 → 10% метанола в хлороформе), выделили 27 мг (50%) тетраола (XII) и 18 мг смеси частично ацетилированных соединений. Ацетилирование последних смесью пиридин — уксусный ангидрид и последующая хроматографическая очистка продукта (колонка 1 × 15 см, элюция 10 → 30% ацетона в толуоле) дали 17 мг (32%) тетраацетата (XIII), $[\alpha]_D^{25} +34^\circ$ (с 1, хлороформ). ПМР (250 МГц, CDCl₃): 1,08д (3H, CH₃ фукозы, $J = 6$), 1,56с, 1,57с, 1,84с, 2,08с, 2,10с (15H, 5 Ac), 1,79 м (2H, CCH₂C), 5,05д (1H, $J = 4$), 5,16д (1H, $J = 3$), 5,25д (1H, $J = 3,5$) — неотнесенные протоны H-1, H-1'' и H-1''', 5,51 д (1H, $J = 3$, H-4), 6,87 д (1H, NHCOCF₃).

11 мг (7,5 мкмоль) полученного соединения (XIII) подвергали гидрогенолизу над 20 мг 10% Pd/C в смеси метанола и уксусной кислоты (8 : 1), после чего ацетильные группы удалили по Земплеру. Гель-хроматографией выделили гомогенный (по ВЭЖХ) тетрасахарид (XIV), $[\alpha]_D^{28} +70^\circ$ (с 0,4, вода). ПМР (250 МГц, D₂O): 1,19д (3H, $J = 6,5$, CH₃ фукозы), 1,87м (2H, CCH₂C), 4,70д (1H, $J_{1',2'} = 7$, H-1'), 4,87д (1H, $J_{1,2} = 3,5$, H-1), 5,23 д (1H, $J = 3$) и 5,25 д (1H, $J = 3,5$) — неотнесенные протоны H-1'' и H-1'''.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-3-О-[3-О-(2-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозил)-2-О- α -L-фукопиранозил- β -D-галактопиранозил]-2-дезоксид- α -D-галактопиранозид (XVII). Смесь 78 мг (0,069 ммоль) трисахарида (IX), 350 мг (0,7 ммоль) карбоната серебра, 10 мг (0,048 ммоль) перхлората серебра и 2 г сит 4 А в 5 мл дихлорметана выдерживали 1 ч при 20° С в токе азота, затем добавили еще 0,5 г сит и в течение 30 мин прибавили к смеси раствор 80 мг (0,16 ммоль) 2-азидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-бензил- β -D-галактопиранозилхлорида [22] в 3 мл дихлорметана. Через 24 ч прибавили еще 80 мг хлорида и выдерживали при перемешивании 48 ч, затем смесь разбавили хлороформом, профильтровали, упарили. Хроматографией (колонка 1×15 см, элюция 0 → → 50% этилацетата в бензоле) выделили 65 мг тетрасахарида (XV), содержащего трудноотделимые примеси. Характеристики аналитического образца (XV): $[\alpha]_{25}^{D}$ +25° (с 0,6, хлороформ); ПМР (250 МГц, CDCl₃): 1,06д (3H, J = 6, CH₃ фукозы), 1,42с (3H, Ac), 1,62м (2H, CCH₂C), 5,22д, 5,24д, 5,32д (3H, J_{1,2} = J_{1'',2''} = J_{1''',2'''} = 3,5, H-1, H-1'', H-1'''), 5,50 с, 5,63 с (2H, 2PhCH). 50 мг выделенного вещества выдерживали 2 ч с 80% уксусной кислотой при 70° С, раствор упарили досуха и остаток дезацетилировали по Земплону. Хроматографией (колонка 1 × 15 см, элюция 4 → 10% метанола в хлороформе), выделили 35 мг тетрасахарида (XVI). Гидрогенолиз 10 мг полученного тетрасахарида (XVI) проводили в смеси 4 мл метанола и 0,5 мл уксусного ангидрида в присутствии 20 мг 10% Pd/C в течение 72 ч, затем прибавили еще 0,2 мл уксусного ангидрида и выдерживали 24 ч. Гель-хроматографией выделили 6 мг (42% в пересчете на исходный трисахарид (IX)) тетрасахарида (XVII), $[\alpha]_{25}^{D}$ +108° (с 0,22, вода). ПМР (500 МГц, D₂O, 60° С): 1,18д (3H, J = 6,5, CH₃ фукозы), 1,86м (2H, CCH₂C), 2,02с, 2,03с (6H, 2 Ac), 4,67 д (1H, J_{1',2'} = = 7,5, H-1'), 4,85д (1H, J_{1,2} = 3,5, H-1), 5,16д (1H, J = 3,5), 5,24д (1H, J = 4) — неотнесенные протоны H-1'' и H-1'''.

Получение полиакриламидных конъюгатов олигосахаридов А, В и Н (тип 3). Соединения (X), (XIV) и (XVII) превращали в соответствующие аминокликозиды действием анионита Amberlyst А 26 (ОН-) в смеси вода — этанол (1 : 1). Выход количественный. 2,3 мкмоль аминокликозида растворяли в 340 мкл DMF и прибавляли раствор 4,4 мг (23 мкг-экв) поли(4-нитрофенилакрилата) в 220 мкл DMF. Выдерживали раствор 24 ч при 40° С, после чего аминокликозид не обнаруживалось на ТСХ (система этанол — бутанол — вода — уксусная кислота — пиридин, 100 : 10 : 10 : 3 : 10, проявление нингидрином). Избыточные нитрофенильные группы превратили в амидные действием 25% водного раствора аммиака (50 мкл, 30 мин), полученный раствор нанесли на колонку с сефадексом LH-20 и элюировали (ацетонитрил — вода, 1 : 1, рефрактометрическая детекция) ПАА-конъюгат. Выход 70—95%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clausen H., Watanabe K., Kannagi R., Levery S. B., Nudelman E., Arao-Tomono Y., Hakomori S. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 124. № 2. P. 523—529.
2. Clausen H., Levery S. B., Nudelman E., Tsuchiya S., Hakomori S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 1199—1203.
3. Gane P., Vellayoudom J., Mollicone R., Breimer M. E., Samuelson B. E., Rouger P., Gerard G., Le Pendu J., Oriol R. // Vox Sang. 1987. V. 53. № 1. P. 117—125.
4. Takasaki S., Yamashita K., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 17. P. 6086—6091.
5. Le Pendu J., Lambert F., Samuelsson B., Breimer M. E., Seitz R. C., Urdaniz M. P., Suesa N., Ratcliffe M., Francois A., Poschmann A., Vinas J., Oriol R. // Glycoconj. J. 1986. V. 3. № 2. P. 255—271.
6. Dabelsteen E., Graem N., Clausen H., Hakomori S. // Cancer Res. 1988. V. 48. № 1. P. 181—187.
7. Dua V. K., Rao B. N. N., Wu S.-S., Dube V. E., Busch C. A. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 4. P. 1599—1608.
8. Bremer E. G., Levery S. B., Sonnino S., Ghidoni R., Canevari S., Kannagi R., Hakomori S. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 23. P. 14773—14777.
9. Taki T., Kimura H., Gasa S., Nakamura M., Matsumoto M. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 10. P. 6219—6225.

10. Clausen H., Levery S. B., Kannagi R., Hakomori S. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 3. P. 1380—1387.
11. Levery S. B., Bremer E. G., Hakomori S., Sonnino S., Ghidoni R., Colnaghi M. I. // Fed. Proc. 1984. V. 43. № 6. P. 1751.
12. Menard S., Tagliabue E., Canevari S., Fossati G., Colnaghi M. I. // Cancer Res. 1983. V. 43. № 3. P. 1295—1300.
13. Kannagi R., Levery S. B., Ishigami F., Hakomori S., Shevinski L. H., Knowles B. B., Solter D. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 14. P. 8934—8942.
14. Бовин Н. В., Иванова И. А., Хорлин А. Я. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 662—670.
15. Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Хорлин А. Я. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1256—1264.
16. Землянухина Т. В., Бовин Н. В., Байрамова Н. Э. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 299. № 1. С. 129—131.
17. Бовин Н. В., Хорлин А. Я. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1405—1408.
18. Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Чагашвили Ц. Н., Хорлин А. Я. // Химия природ. соединений. 1988. № 6. С. 777—785.
19. Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Хорлин А. Я. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 533—538.
20. Lemieux R. U., Hendriks K. B., Stick R. V., James K. // J. Amer. Chem. Soc. 1975. V. 97. № 14. P. 4056—4063.
21. Lönn H. // Carbohydr. Res. 1985. V. 139. № 1. P. 105—113.
22. Бовин Н. В., Хорлин А. Я. // Биоорганич. химия. 1984. Т. 10. № 6. С. 853—860.
23. Хорлин А. Я., Бовин Н. В. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 671—673.
24. Galanina O. E., Sorokin A. B., Nicol'ski N. N., Korchagina E. Yu., Bovin N. V. // 11th European Symposium on Carbohydrates, Prague, Czechoslovakia, 1989. P. C 71.
25. Нестеров А. М., Сорокин А. Б., Соркин А. Д., Романов В. И. // Всесоюзное со-
общение «Биология клетки в культуре». Цитология. 1987. Т. 29. С. 1095.

Поступила в редакцию
10.X.1989

T. V. ZEMLYANUKHINA, N. V. BOVIN

SYNTHESIS OF BLOOD GROUP OLIGOSACCHARIDES WITH A, B AND H (TYPE 3) SPECIFICITY

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

Chemical synthesis of A, B, and H (type 3) human blood group determinant oligosaccharides (as R-glycosides, $R=OCH_2CH_2CH_2NHCOCF_3$) and their polymeric derivatives are reported. 4,6; 4',6'-Di-O-benzylidene derivative of $Gal\beta 1\rightarrow 3GalNAc\alpha 1\rightarrow R$ was chloroacetylated selectively at 3'-OH, the chloroacetate was α -fucosylated and dechloroacetylated to give protected H (type 3) trisaccharide bearing free 3'-OH. α -Glycosylation of the trisaccharide with 2-azido-3,4,6-tri-O-benzyl- β -D-galactopyranosyl chloride and 2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl bromide gave rise to protected A and B tetrasaccharides, respectively.

Deprotected R-glycosides were converted to $OCH_2CH_2CH_2NH_2$ derivatives. Their reaction with poly(4-nitrophenylacrylate) affords polyacrylamide-coupled conjugates with A, B, and H (type 3) specificity.