



УДК 543.422.25:547.458.057:577.114.012

# СИНТЕЗ ОЛИГОСАХАРИДОВ, РОДСТВЕННЫХ АНТИГЕНУ HNK-1.

## 1. СИНТЕЗ ИЗБИРАТЕЛЬНО ЗАЩИЩЕННОГО АЛЛИЛ-3-О-[МЕТИЛ(β-D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)УРОНАТ]-β-D- ГАЛАКТОПИРАНОЗИДА

© 1997 г. А. В. Корнилов, Л. О. Кононов, Г. В. Затонский, А. С. Шашков, Н. Э. Нифантьев<sup>#</sup>*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
117913, Москва, В-334, Ленинский просп., 47*

Поступила в редакцию 21.01.97 г. Принята к печати 19.02.97 г.

С целью разработки препаративного метода синтеза избирательно защищенного дисахарида β-D-GlcA-(1→3)-β-D-Gal в форме, позволяющей дальнейшее получение соответствующих гликозил-доноров и спейсированных производных, изучено гликозилирование ряда моно- и дигидроксильных гликозил-акцепторов на основе аллил-β-D-галактопиранозидов с помощью сполна ацилированных глюкуронилбромидов в условиях реакции Гельфериха. Показано, что доминирующими первоначально образующимися продуктами реакции являются 1,2-ортоэферы, дальнейшее превращение которых в изомерные им гликозиды зависит от кислотности среды и может регулироваться типом используемых молекулярных сит. Предпочтительному образованию гликозидов способствует применение так называемых молекулярных сит, промытых кислотой (Acid Washed Molecular Sieves) AW 300. При глюкуроноилровании 2,3- и 3,4-диольных гликозил-акцепторов не наблюдалось избирательного образования требуемого (1→3)-связанного дисахаридного продукта. Его наиболее эффективный синтез проведен гликозилированием аллил-4,6-О-бензилиден-2-О-бензоил-β-D-галактопиранозидов пивалоилированным глюкуронилбромидом. Другие реакции гликозилирования галактозида с помощью ацетилированного и бензоилированного глюкуронилбромидов, а также пивалоилированного глюкуронилмидаата характеризовались меньшим выходом требуемого (1→3)-связанного дисахаридного продукта и более низкой стереохимической избирательностью гликозилирования.

*Ключевые слова:* гликозилирование, глюкуроноилрование, глюкуроновая кислота, HNK-1.

β-(1→3)-Связанный глюкуронилгалактозный дисахаридный блок представляет собой структурный фрагмент ряда природных олиго- и полисахаридов и гликоконъюгатов. Например, этот дисахарид является повторяющимся звеном O-антигенного полисахарида из *Klebsiella*, тип 20 [1], находится в области связывания гликозаминогликанов (гепарина, хондроитинсульфата, дерматансульфата и др.) с полипептидной цепью [2], а также входит в состав олигосахаридных цепей ряда клеточных антигенов, узнаваемых антителами HNK-1 (Leu-7, L2) [3–5].

Олигосахаридные цепи последнего типа и природные гликоконъюгаты, в которые они входят, изучены мало, хотя и представляют большой интерес для исследователей. Так, была показана важная роль этих соединений в ряде иммуно- и

нейробиологических процессов (см. обзоры [6–9]), включая миграцию и развитие нервных клеток [10] и некоторые невропатические заболевания [11–14]. Недавно было показано, что гликоконъюгаты, содержащие углеводные цепи антигена HNK-1, могут выступать в роли рецепторов L- и P-селектинов, но не E-селектинов [15].

Антитела HNK-1 были получены впервые [3] против мембранного антигена HSB-2 Т-клеток человека. Они распознают поверхностные антигены лимфоцитов, в том числе ЕК человека (HNK), что и определило название антител. В дальнейшем было показано, что эпитоп для антител HNK-1 входит в состав углеводной части гликолипидов SGGL-1 и SGGL-2, содержащих пента- (1) и гептасакхарид (2), моносультатированные по ОН-группе при С3 глюкуроноильного остатка [4]. Полные синтезы пента- и гептасакхаридных гликозилцерамидов данного типа успешно проведены в последнее время группами Т. Огавы [16] и А. Хасегавы [17].

Строение распознаваемых антителами HNK-1 олигосахаридных цепей, входящих в состав гли-

Сокращения: Алл – аллил, Вп – бензил, Пив – пивалоил, CSA – 10-камфоросульфоновая кислота, TFA – трифторуксусная кислота.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: 938-35-52; факс: 135-87-84; e-mail: nen@NMR1.ioc.ac.ru).





Данные спектров <sup>1</sup>H-ЯМР соединений (9–11), (22–31), (33), (35), (37), (39–40), (42–43) (CDCl<sub>3</sub>; δ, м. д.; J, Гц)

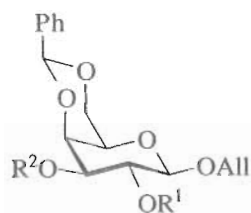
Соединение	Остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	J <sub>1,2</sub>	J <sub>2,3</sub>	J <sub>3,4</sub>	J <sub>4,5</sub>	J <sub>5,6a</sub>	J <sub>5,6b</sub>	J <sub>6a,6b</sub>
(9)*	Gal	4.60	5.36	3.88	4.10	3.89	4.50–4.63			8.0	9.9	3.3				
(10)*	Gal	4.43	4.95	3.66	3.91	3.67	4.30	4.38		6.6	8.5	3.2	1.2	5.4	5.3	9.4
(11)*	Gal	4.39	3.49–3.57		3.90	3.58	3.71	3.76		7.0	9.7	2.9	0.8	6.0	5.9	10.0
(22)*	Gal	4.46	3.63–3.68		3.99	3.50	3.85	3.94		7.4				4.7	6.1	12.4
	GlcA	4.88	5.02	5.30	5.17	4.02			3.75	8.0	9.1	9.8	9.8			
(23)	Gal	4.52	3.86	4.97	5.33	3.85	4.09	4.15		7.9	10.1	3.4	1.2	6.3	6.6	11.2
	GlcA	4.84	4.97	5.15–5.26		4.02			3.75	7.9	9.5		9.8			
(24)	Gal	4.41	5.22	3.89	5.41	3.82	4.08	4.16		8.3	10.3	3.5	1.1	7.0	5.8	11.4
	GlcA	4.68	4.91	5.14–5.26		4.00			3.77	7.7	9.4		9.8			
(25)	Gal	4.54	3.88	4.13	5.36	3.73	4.10	4.10		7.5	9.4	3.7		6.6	6.6	12.1
	GlcA	4.85–5.10		5.36	5.18	4.01			3.75							
	GlcA'	4.85–5.10		5.36	5.18	4.06			3.77							
(26)	Gal	4.68	5.45	4.03	5.51	4.04	4.30	4.54		8.2	10.3	3.4		7.0	6.7	11.3
	GlcA	5.88	4.02	5.05–5.12		4.11			3.74	4.8	7.0		8.0			
(27)	Gal	4.70	5.32	4.04	5.52	4.05	4.38	4.55		7.9	10.0	4.0	1.2	6.5	7.0	11.5
(28)	Gal	4.72	5.56	5.27	5.57	4.13	4.35	4.59		8.0	10.5	3.4	1.3	6.8	6.7	11.0
(29)	Gal	4.64	***	3.87	4.20	3.87	4.58	4.68		6.5	9.6	2.7		5.8	4.9	9.6
	GlcA	5.08	***	5.28	5.23	4.02			3.61	6.1		8.0	8.0			
(29)**	Gal	4.53	5.60	3.86	4.08	3.72	4.73	4.86		8.0	10.0	2.2		7.0	5.1	11.5
	GlcA	5.17	5.32	5.54	5.39	3.98			3.85	8.1	9.6	9.6	9.6			
(30)	Gal	4.53	5.39	3.87	4.42	3.85	4.55	4.68		8.2	9.9	2.7		7.0	5.7	11.7
	GlcA	4.72	4.97	5.18	5.23	4.00			3.73	7.9	9.4	9.5	9.5			
	GlcA'	5.28	5.11	5.45	5.19	4.25			3.57	4.4	9.4	9.4	10.5			
(31)	Gal	4.62	5.53	4.08	5.59	4.03	4.38	4.48		8.0	10.0	3.5	1.0	6.7	7.3	11.8
	GlcA	4.64	4.89	5.19	5.01	3.95			3.69	7.4	9.4	9.4	10.0			
(33)*	Gal	4.58	5.32			3.55				8.4	10.5					
	GlcA	5.30	4.81						3.31	4.2	10.5					
(35)*	Gal	4.60	5.57	4.00	4.05	3.59	3.99–4.08			8.0	9.9	3.7				
	GlcA	5.41	4.86	5.46	5.06	4.19			3.39	4.0	10.3	9.3	10.3			
(37)*	Gal	4.55	5.46	3.88	4.15	3.60	3.80	3.91		8.4	10.5	3.0		5.7	6.6	12.0
	GlcA	4.71	4.92	5.06–5.09		4.03			3.71	7.8	10.2		10.2			
(39)*	Gal	4.56	5.47	4.05	4.16	3.65	3.85	3.99		8.0	9.8	3.3		4.9	6.6	11.9
	GlcA	4.80	5.03	5.19–5.24		4.02			3.72	7.7	9.4			9.4		
(40)	Gal	4.48	5.37	4.18	5.41	3.82	4.05	4.12		8.4	10.8	3.6	1.2	6.6	7.8	11.4
	GlcA	4.62	4.86	5.05	5.15	3.85			3.68	7.8	9.6	9.6	9.6			
(42)*	Gal	4.57	5.26	3.78	4.11	3.69	3.94	4.04		8.0	9.8	4.5		5.9	8.0	9.8
	GlcA	4.70	5.07	5.40	5.24	4.12			3.76	8.0	9.5	9.5	9.5			
(43)	GlcA	6.67	5.22	5.72	5.33	4.51				3.0	10.3	10.3	10.3			

Другие сигналы: OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> 5.16–5.32 (для соед. 9–11, 22–31), 5.00–5.22 (для соед. 33, 35, 37, 39–40, 42); OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> 5.80–5.95 (для соед. 9–11, 22–31), 5.60–5.78 (для соед. 33, 35, 37, 39–40, 42); OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> 4.05–4.15 и 4.25–4.35; PhCH 5.52–5.57; PhCH<sub>2</sub> 4.68–4.95; Ar 6.90–8.20; Ac 1.91–2.31, 1.78–2.06 (для соед. 33, 37); Fiv 0.60–1.20; C(Ni)CCl<sub>3</sub> 8.72; CH<sub>3</sub> ортоэфира (26) 1.60.

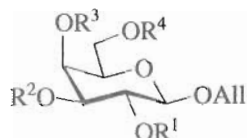
\* К образцам были добавлены 2 капли CD<sub>3</sub>OD для дейтерирования.

\*\* Образец был снят в смеси растворителей C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>-(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO-CD<sub>3</sub>OD (6 : 3 : 1).

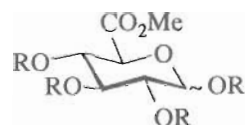
\*\*\* δ 5.06–5.15 м. д.



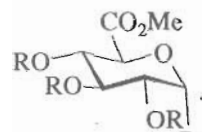
- (6)  $R^1 = R^2 = H$   
 (7)  $R^1 = Bz, R^2 = H$   
 (8)  $R^1 = H, R^2 = Bz$



- (9)  $R^1 = R^4 = Bz, R^2 = R^3 = H$   
 (10)  $R^1 = R^4 = Ac, R^2 = R^3 = H$   
 (11)  $R^1 = R^4 = Bn, R^2 = R^3 = H$   
 (12)  $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H,$   
 (13)  $R^1 = R^4 = H, R^2, R^3 = CMe_2,$   
 (14)  $R^1 = H, R^2, R^3 = CMe_2,$   
 $R^4 = C(OMe)Me_2$   
 (15)  $R^1 = Bz, R^2 = R^3 = R^4 = H$



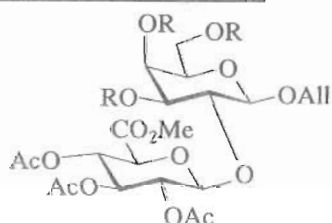
- (16)  $R = Ac$   
 (17)  $R = Bz$   
 (18)  $R = Piv(\beta)$



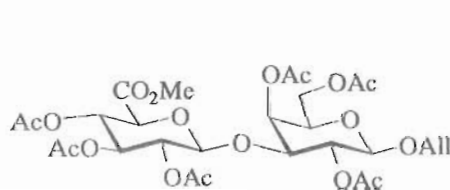
- (19)  $R = Ac$   
 (20)  $R = Bz$   
 (21)  $R = Piv$

При гликозилировании 2,3-диола (6) ацетилированным бромидом (19) (5 экв.) в ацетонитриле в присутствии цианида ртути и каталитического количества бромида ртути после кислотного гидролиза (для дебензилиденирования) из реакционной смеси был выделен с выходом 34%  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-связанный дисахарид (22), а после доацетилирования других продуктов гликозилирования – еще и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанный дисахарид (24), а также vicинально разветвленный трисахарид (25), выходы которых составляли 18 и 11% соответственно. Для подтверждения строения диол (22) был переведен в полный ацетат (23). Направление межмоносакхаридных связей в изомерах (23) и (24) установлено с помощью спектроскопии  $^1H$ -ЯМР. Так, слабопольное положение сигналов H3(Gal), H4(Gal), H6a(Gal) и H6b(Gal) ( $\delta$  4.97, 5.33, 4.09, 4.15 м.д.) в спектре (23), сигналов H2(Gal), H4(Gal), H6a(Gal) и H6b(Gal) ( $\delta$  5.22, 5.41, 4.08, 4.16 м.д.) в спектре (24), а также сигналов H4(Gal), H6a(Gal) и H6b(Gal) ( $\delta$  5.36, 4.10, 4.10 м.д.) в спектре (25) однозначно подтверждало, что галактозный оста-

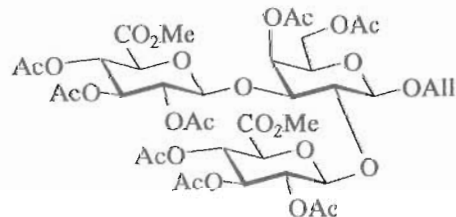
ток в биоиде (23) глюкуронылирован по O2, в (24) – по O3, а в (25) – по O2 и O3.  $\beta$ -Аномерная конфигурация глюкуроныльных заместителей в дисахаридах (23) и (24) подтверждалась характеристическими величинами соответствующих КССВ  $J_{1,2}$  в спектрах  $^1H$ -ЯМР (7.9 и 7.7 Гц). Аналогичный анализ конфигураций в трисахариде (25) по величинам КССВ  $J_{1,2}$  не был возможен из-за перекрытия сигналов H1 и H2 для обоих глюкуроныльных остатков в узкой области спектра  $^1H$ -ЯМР ( $\delta$  4.85–5.10 м.д.). Однако  $\beta$ -аномерная конфигурация глюкуроныльных заместителей в соединении (25) была подтверждена с учетом других спектральных характеристик, отличающих  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкуроныльные производные. Так, в спектрах  $^1H$ -ЯМР  $\alpha$ -глюкуронылированных соединений (33) и (35) (см. ниже) сигналы H1(GlcA) ( $\delta$  5.30 и 5.41 м.д.) находятся в заметно более слабопольной области ( $\delta$  4.85–5.10 м.д.), а сигнал сложноэфирной OCH<sub>3</sub>-группы ( $\delta$  3.31 и 3.39 м.д.) – в более сильнопольной области, чем соответствующие сигналы в спектре трисахариде (25) ( $\delta$  3.75 и 3.77 м.д.).



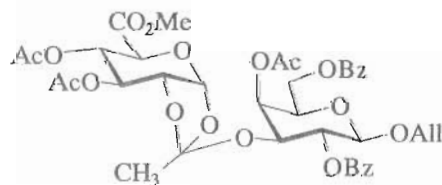
- (22)  $R = H$   
 (23)  $R = Ac$



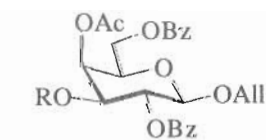
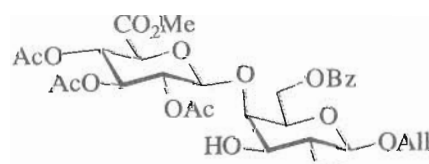
(24)



(25)

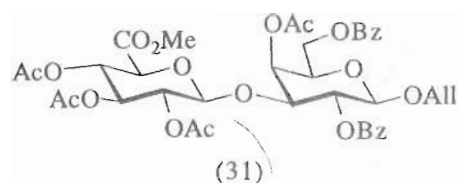
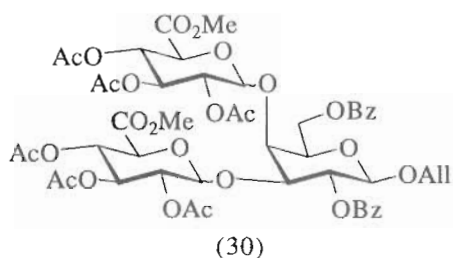


(26)

(27)  $R = H$  (28)  $R = Ac$ 

(29)





Глюкуронылирование 3,4-диолов (9)–(11) бромидом (19) в условиях реакции Гельфериха протекало неэффективно. Реакции, проведенные в присутствии традиционно используемых в таких случаях молекулярных сит 3 Å, характеризовались отсутствием требуемой (1→3)-региоизбирательности гликозилирования и предпочтительным образованием нестабильных ортоэфирных продуктов, идентифицированных нами в реакционных смесях с помощью гидролитической пробы (см. “Экспериментальную часть”). При гликозилировании галактозида (9) с помощью бромида (19) один из ортоэфирных продуктов был выделен после ацетилирования реакционной смеси в индивидуальном состоянии в виде соединения (26). Его строение было установлено с помощью спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР. α-Конфигурация аномерного центра глюкуроныльного остатка подтверждена характерным слабополюсным химическим сдвигом сигнала H1(GlcA) (δ 5.88 м.д.) и величиной КССВ J<sub>1,2</sub> 4.8 Гц (ср. [37, 38]). О-Этилиденный фрагмент подтверждался наличием характерного трехпротонного синглета при δ 1.60 м.д., соответствующего метильной группе ортоацетата.

Образование ортоэфиров при гликозилировании различными донорами глюкуроновой кислоты отмечалось и ранее [26, 31, 38]. Было также показано [26], что выход ортоэфиров снижается при использовании вместо обычных молекулярных сит так называемых молекулярных сит, промытых кислотой (Acid Washed Molecular Sieves).

Учитывая эти данные, мы изучили гликозилирование 3,4-диола (9) как в отсутствие молекулярных сит, так и в присутствии сит AW 300. В первом случае с выходом 24% был получен галактозид (27), продукт 4-О-ацетилирования исходного галактозида (9), а также β-(1→4)-связанный дисахарид (29) с выходом 10%. В присутствии же молекулярных сит AW 300 наблюдалось образование сложной смеси продуктов, в том числе моноацетата (27), идентифицированного с помощью ТСХ. Двумя последовательными хроматографиями были выделены β-(1→4)-связанный дисахарид (29) (12%), а затем (после доацетилирования) вициально разветвленный трисахарид (30) и целевой β-(1→3)-связанный дисахарид (31), выходы которых составляли 8 и 4% соответственно.

Строение соединений (27)–(31) установлено с помощью спектроскопии <sup>1</sup>H-ЯМР, как описано

выше для продуктов (22)–(25). Положение ацетильной группы в соединении (27) при О4 подтверждалось слабополюсным положением сигнала H4 (δ 5.52 м.д.). В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР дисахарида (29) присутствовал сигнал протона ОН-группы (δ 3.14 м.д.), имеющего спин-спиновое взаимодействие с H3(Gal). Это подтверждало наличие в соединении (29) свободной ОН-группы при С3 галактозного остатка, а также (1→4)-межмоносахаридной связи. (1→3)-Направление связи в дисахариде (31) подтверждалось слабополюсной величиной химического сдвига сигналов H2(Gal), H4(Gal), H6a(Gal) и H6b(Gal) (δ 5.53, 5.59, 4.38 и 4.48 м.д.) и сильнополюсной величиной для сигнала H3(Gal) (δ 4.08 м.д.). Аномерные конфигурации глюкуроныльных остатков в соединениях (29)–(31) установлены на основании характеристических значений соответствующих КССВ J<sub>1,2</sub> (см. таблицу). Эти величины свидетельствовали, что один из глюкуроныльных фрагментов в трисахариде (30) имеет α-конфигурацию (J<sub>1,2</sub> 4.4 Гц), а второй – β-конфигурацию (J<sub>1,2</sub> 7.9 Гц). Точное положение каждого из глюкуроныльных заместителей нами не устанавливалось.

Таким образом, проведенное нами исследование глюкуронылирования бромидом (19) 2,3- и 3,4-диольных акцепторов на основе аллилгалактозида (12) свидетельствовало о малой эффективности этого подхода для получения дисахарида (5). Поэтому далее было изучено глюкуронылирование моногидроксильного акцептора, в качестве которого был выбран аллил-4,6-О-бензилиден-2-О-бензоил-β-D-галактопиранозид (7). Известно, что бензоилоксифрагмент может оказывать пассивирующее действие на гликозилирование ОН-группы в соседнем положении [39]. Однако использование бензоильной защиты при О2 в галактозиде (7) связано с необходимостью обеспечения в дальнейшем контроля 1,2-транс-гликозилирования дисахаридным гликозил-донором на основе соединения (5), синтетическим предшественником которого является галактозид (7).

2-Бензоат (7) был синтезирован нами по двум схемам. В первом подходе бензоилированием диола (6) бензоилцианидом [40] были получены 3-бензоат (8) и 2-бензоат (7) с выходами 85 и 7% соответственно. 3-Бензоат (8) далее подвергался изомеризации по известной методике [34] при действии разбавленной NaOH в водном ацетоне,



после чего образовывалась смесь изомеров (7) и (8), выделенных с помощью колоночной хроматографии с выходами 44 и 52%. При повторении изомеризации суммарный выход целевого продукта (7) составлял 64%. Неудачный результат изомеризации 3-бензоата (8) связан с тем, что не происходило избирательной кристаллизации 2-бензоата (7) из реакционной смеси, как это наблюдалось в других аналогичных случаях [41, 42].

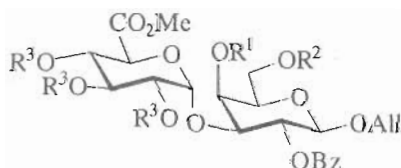
Более эффективный синтез 2-бензоата (7) был проведен из аллил- $\beta$ -D-галактопиранозида (12) по методике [43] обработкой избытком 2,2-диметоксипропана в присутствии каталитического количества CSA с образованием моногидроксильного производного (14), его бензоилирования, кислотного гидролиза, приводящего к аллил-2-O-бензоил- $\beta$ -D-галактопиранозиду (15), и последующего бензилиденирования. Перечисленные четыре стадии были проведены с суммарным выходом 77% и без выделения промежуточных продуктов. Использование в качестве катализатора CSA, а не TsOH  $\cdot$  H<sub>2</sub>O, как в оригинальной методике [43], позволило заметно сократить время реакции.

Гликозилирование 2-бензоата (7) ацетилированным гликозилбромидом (19) в присутствии молекулярных сит AW 300 протекало недостаточно эффективно и приводило к образованию двух изомерных дисахаридов (32) и (36). После кислотного гидролиза продуктов гликозилирования с выходом 46% была получена смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных дисахаридов (33) и (37), строение которых подтверждено данными спектров <sup>1</sup>H-ЯМР (таблица). Соотношение изомеров (33) и (37) (1 : 8) определено интегрированием сигнала

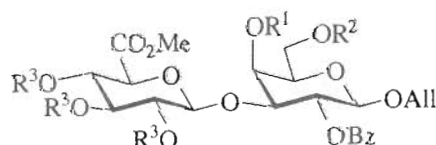
лов сложноэфирной OCH<sub>3</sub>-группы при  $\delta$  3.31 и 3.71 м.д. и сигналов метилов ацетильных групп при  $\delta$  2.05 и 1.91 м.д.

Для поиска более успешных условий гликозилирования галактозида (7) далее использовались бензоилированный (20) и пивалоилированный (21) доноры. Глюкуронилбромид (20) оказался инертным в условиях реакции Гельфериха – гликозилирование им не происходило даже при нагревании до 80°C. Самым же эффективным из изученных нами глюкуронил-доноров оказался пивалоилированный бромид (21), ранее не применявшийся в олигосахаридном синтезе, но использовавшийся для получения простейших алкилглюкуронидов и стероидных гликозидов глюкуроновой кислоты [44].

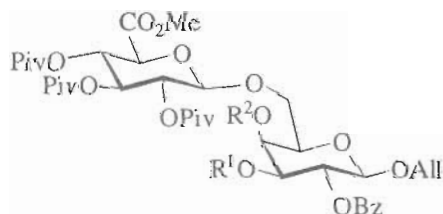
Гликозилирование пивалоилированным глюкуронилбромидом (21) (1.6 экв.) галактозида (7) (в присутствии молекулярных сит AW 300) привело к образованию смеси изомерных  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)- и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных дисахаридов (34) и (38), а также неустойчивого  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-связанного дисахида (по-видимому, (41)) с общим выходом 72%. Изомеры были разделены нами затем в виде диолов (35), (39) и (42). С препаративной точки зрения оказалось удобнее сразу проводить гидролиз реакционной смеси и только после этого выделять продукты гликозилирования. В этом случае выход целевого  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанного дисахида (39) составлял 61%, а его  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)- и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-связанного изомеров (35) и (42) – 1 и 6%. Кроме этих соединений был также выделен аллил-2-O-бензоил- $\beta$ -D-галактопиранозид (15) (выход 6%), образовавшийся при гидролизе непрореагировавшего гликозил-акцептора (7).



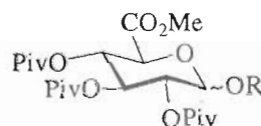
- (32) R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = PhCH, R<sup>3</sup> = Ac  
 (33) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Ac  
 (34) R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = PhCH, R<sup>3</sup> = Piv  
 (35) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Piv



- (36) R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = PhCH, R<sup>3</sup> = Ac  
 (37) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Ac  
 (38) R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = PhCH, R<sup>3</sup> = Piv  
 (39) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = Piv  
 (40) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Ac, R<sup>3</sup> = Piv



- (41) R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = PhCH  
 (42) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H



- (43) R = C(NH)CCl<sub>3</sub>( $\alpha$ )  
 (44) R = H

Строение изомерных дисахаридов (35), (39) и (42) установлено с помощью спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР (таблица), как и для описанных выше соединений (22)–(31). Кроме того, был получен 4,6-ди-*O*-ацетилированный дисахарид (40), спектральные характеристики которого также приведены в таблице. Наличие (1→6)-межмоносахаридной связи в соединении (42), по-видимому, образующемся в результате частичной миграции в процессе гликозилирования бензилиденовой группировки в галактозиде (7), подтверждается слабопольным положением в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сигнала C6(Gal), находящегося в области  $\delta$  67.4–72.1 м.д., в группе перекрывающихся сигналов. Отметим для сравнения, что сигнал “негликозилированного” атома C6(Gal), несущего свободную OH-группу, находится в заметно более сильнопольной области, например в случае дисахарида (39) при  $\delta$  62.1 м.д.

Как уже отмечалось выше, гликозилирование глюкуронилбромидом в условиях реакции Гельфериха используется в настоящее время сравнительно редко, а предпочтение отдается более реакционноспособным глюкуронилимидатам. Для сопоставления обоих типов глюкуронил-доноров нами было также проведено гликозилирование галактозида (7) пивалоилированным имидазом (43).

Соединение (43) было синтезировано избирательным *O*-депивалоилированием тетрапивалоата (18) [44] в DMF под действием гидразинацетата и последующей реакцией образующегося полуацетала (44) (выход 64%) с трихлорацетонитрилом при  $-30^\circ\text{C}$  в присутствии 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена, протекающей с выходом 78%. Таким образом, имидаз (43) был получен с общим выходом 50%, причем на обеих стадиях потребовалось применение колоночной хроматографии. Поэтому имидаз (43) является несравненно менее доступным реагентом, чем глюкуронилбромид (21), который легко получается с выходом 90–95% при обработке тетрапивалоата (18) раствором бромистого водорода в уксусной кислоте.

Нами проведены два эксперимента по гликозилированию галактозида (7) глюкуронил-донором (43) в условиях, рекомендуемых при использовании гликозилимидазов. Первый опыт проводился в ацетонитриле [45] при  $-35^\circ\text{C}$ , в отсутствие молекулярных сит, при использовании 1.5 экв. донора (43) и 0.3 экв. (в расчете на донор) катализатора – триметилсилилтрифлата. По данным ТСХ, эта реакция приводила главным образом к ортоэфирному продукту и лишь незначительным количеством изомерных дисахаридов (34) и (38), которые нами далее анализировались. Заметное об-

разование ортоэфиров при гликозилировании глюкуронилимидатами наблюдалось и ранее [26].

Во втором эксперименте гликозилирование спирта (7) имидазом (43) (1.5 экв.) проводилось, как и в работе [25], в хлористом метиле при  $-20^\circ\text{C}$  в присутствии триметилсилилтрифлата (0.35 экв. в расчете на донор) и молекулярных сит AW 300. После кислотного гидролиза продуктов гликозилирования колоночной хроматографией была выделена с выходом 46% смесь (5 : 6) дисахаридов (35) и (39), а также  $\beta$ -(1→6)-связанный дисахарид (42), выход которого составил 20%.

Таким образом, полученные результаты наглядно свидетельствуют об успешном гликозилировании в условиях реакции Гельфериха пивалоилированным глюкуронилбромидом (21), не уступающим по эффективности описанным в литературе глюкуронилдонорам имидазного и тиогликозидного типов [15, 21–27], а также ацетилированному глюкуронилбромиду при катализе карбонатом серебра [28, 29]. Поэтому именно бромид (21) был применен для препаративного синтеза дисахарида (39), успешно использованного нами в дальнейшем для получения пентасахарида (1).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методики очистки растворителей и реагентов, условия съемки спектров ЯМР и определения физико-химических констант аналогичны приведенным в работе [46]. Оптическое вращение растворов полученных соединений измеряли в хлороформе (*c* 1) на цифровом поляриметре JASKO DIP-360 (Япония) при 26–30 $^\circ\text{C}$ . Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках с силикагелем Kieselgel-60 (Merck), вещества обнаруживали опрыскиванием 10% раствором ортофосфорной кислоты в этиловом спирте с последующим нагреванием при  $\sim 150^\circ\text{C}$ . Системы растворителей для ТСХ: этилацетат – петролейный эфир, 1 : 1 (А), 2 : 1 (Б), 2 : 3 (В), 2 : 5 (Г); этилацетат (Д); ацетон – толуол, 2 : 5 (Е), 1.3 : 4.5 (Ж). Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Silica Woelm 32–63 мкм (Woelm Pharma), используя градиентное элюирование от петролейного эфира к этилацетату (система З) или от толуола к ацетону (система И).

**Бензоилирование аллил-4,6-*O*-бензилиден- $\beta$ -D-галактопиранозида (6).** К суспензии 572 мг (1.87 ммоль) диола (6) [34] и 271 мг (2.05 ммоль) бензоилцианида (Fluka) в 10 мл абс. ацетонитрила при перемешивании прибавляли каплю  $\text{Et}_3\text{N}$  и выдерживали 2 ч до исчезновения исходного диола (6) (контроль ТСХ, в системе А), добавляли 1 мл MeOH, перемешивали 15 мин и упаривали. Коло-



ночной хроматографией (система 3) выделяли 2-бензоат (7) (57 мг, 7%, т.пл. 147–148°C (этилацетат–петролейный эфир),  $[\alpha]_D +11^\circ$ ,  $R_f$  0.50 (A)) и 3-бензоат (8) (657 мг, 85%, т.пл. 176–177°C (этилацетат–петролейный эфир),  $[\alpha]_D +84^\circ$ ,  $R_f$  0.65 (A)). Лит. данные для (7) [25]: т.пл. 144–145°C (этилацетат–эфир),  $[\alpha]_D +10^\circ$  (с 1,  $\text{CHCl}_3$ ); для (8) [25]: т.пл. 172–173°C (этилацетат–эфир),  $[\alpha]_D +83^\circ$  (с 1,  $\text{CHCl}_3$ ).

**Аллил-4,6-О-бензилиден-2-О-бензоил-β-D-галактопиранозид (7).**

**Опыт а.** К охлажденному до 0°C раствору 1.04 г (2.54 ммоль) 3-бензоата (8) в 60 мл ацетона при перемешивании в течение 30 мин прибавляли 24 мл 6 мМ водного раствора NaOH. Реакционную смесь постепенно нагревали до комнатной температуры и выдерживали 1.5 ч до установления равновесия (контроль ТСХ, система А), нейтрализовали разбавленной уксусной кислотой, упаривали и хроматографией (система 3) выделяли 458 мг (44%) 2-бензоата (7), 542 мг (52%) исходного 3-бензоата (8) и 24 мг (3%) дебензоилированного производного (6).

**Опыт б.** К суспензии 2.85 г (13.1 ммоль) аллилгалактозида (12) [35] в 300 мл 2,2-диметоксипропана (Fluka) при перемешивании прибавляли 14 мг CSA и через 3 ч еще 31 мг CSA, выдерживали 18 ч и добавляли еще 36 мг CSA. Через 7 ч добавляли еще 100 мл 2,2-диметоксипропана, выдерживали дополнительно 1 ч, прибавляли 2 мл  $\text{Et}_3\text{N}$  и упаривали. Реакционную смесь растворяли в 10 мл пиридина и при 0°C прибавляли 3 мл (26 ммоль) бензоилхлорида и через 24 ч (при 20°C) 5 мл MeOH. Реакционную смесь выдерживали 1 ч, упаривали с толуолом (4 × 10 мл) до исчезновения запаха пиридина, остаток растворяли в 30 мл хлористого метилена, добавляли 5 мл 90% водной трифторуксусной кислоты, выдерживали 2 ч и упаривали с толуолом (4 × 10 мл). Реакционную смесь растворяли в 25 мл абс. ацетонитрила, добавляли 7.7 мл (39 ммоль) диэтилацетата бензальдегида и 45 мг CSA и выдерживали 40 ч при комнатной температуре. К смеси прибавляли 2 мл  $\text{Et}_3\text{N}$  и упаривали с 10 мл толуола. Остаток промывали 70 мл петролейного эфира и из остатка колоночной хроматографией (система 3) выделяли 4.12 г (77%) 2-бензоата (7).

**Аллил-2,6-ди-О-бензоил-β-D-галактопиранозид (9).** К раствору 144 мг (0.50 ммоль) ацетонида (13) в 5 мл пиридина добавляли 0.29 мл (2.51 ммоль) хлористого бензоила и выдерживали 14 ч при комнатной температуре. Прибавляли 0.5 мл метанола, выдерживали 30 мин и раствор концентрировали на ротаторном испарителе. Остаток растворяли в 3 мл хлористого метилена, обрабаты-

вали 30 мин 0.3 мл 90% TFA, контролируя дезацетонирование с помощью ТСХ (система Б), соупаривали с толуолом (4 × 3 мл) и хроматографией (система 3) выделяли 2,6-дibenзоат (9). Выход 182 мг (85%), т.пл. 146–147°C (этилацетат–петролейный эфир),  $[\alpha]_D -17^\circ$ ,  $R_f$  0.55 (Б).

**Аллил-2,6-ди-О-ацетил-β-D-галактопиранозид (10).** В условиях синтеза дibenзоата (9) ацетилированием ( $\text{Ac}_2\text{O}$ , Py) ацетонида (13) (90 мг, 0.32 ммоль) и последующим гидролизом получали 2,6-диацетат (10). Выход 47 мг (74%), аморфный,  $[\alpha]_D -12^\circ$ ,  $R_f$  0.17 (Б). Лит. данные [27]: т.пл. 75–76.5°C (эфир–петролейный эфир),  $[\alpha]_D -9.5^\circ$  (с 2,  $\text{CHCl}_3$ ).

**Аллил-2,6-ди-О-бензил-β-D-галактопиранозид (11).** К раствору 102 мг (0.36 ммоль) ацетонида (13) в 2 мл абс. DMSO при охлаждении добавляли 75 мг (1.32 ммоль) измельченного KOH и 0.14 мл (1.2 ммоль) хлористого бензила, не допуская нагревания выше 30°C, и выдерживали 14 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь растворяли в 10 мл хлористого метилена, промывали водой (2 × 10 мл) и концентрировали до объема 3–5 мл. Гидролизовали действием 0.3 мл 90% водной TFA так, как описано для получения соединения (9), и колоночной хроматографией (система 3) выделяли 2,6-ди-О-бензилированное производное (11). Выход 138 мг (97%), сироп,  $[\alpha]_D +7^\circ$ ,  $R_f$  0.55 (Б).

**Аллил-3,4-О-изопропилиден-β-D-галактопиранозид (13).** К смеси 487 мг аллилгалактозида (12) [35] и 5 мл 2,2-диметоксипропана (Fluka) добавляли каталитическое количество  $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ , выдерживали 14 ч при комнатной температуре до исчезновения исходного (12) (контроль ТСХ в системе Е). Прибавляли 0.5 мл  $\text{Et}_3\text{N}$ , реакционную смесь концентрировали, остаток растворяли в 15 мл MeOH и 0.65 мл воды и нагревали 5 ч при 80°C до завершения гидролиза аллил-3,4-О-изопропилиден-6-О-(2-метоксиизопропил)-β-D-галактопиранозид (14) с  $R_f$  0.66 (Е) в 3,4-ацетонид (13). Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, упаривали с толуолом (4 × 10 мл), высушивали в вакууме и получали 615 мг 3,4-О-изопропилиденового производного (13) ~90% чистоты (по данным ТСХ) с  $R_f$  0.34 (Е), которое использовалось нами в дальнейшем без дополнительной очистки.

**Получение глюкуронилбромидов (19)–(21).** К раствору 10 ммоль тетрапivalоата (18) [44], тетрабензоата (17) [47] или тетраацетата метилового эфира глюкуроновой кислоты (16) [48] в 10 мл хлористого метилена прибавляли 45 мл 40% HBr в ледяной уксусной кислоте, содержащей 5% уксусного ангидрида, и выдерживали 4 ч при ком-



натной температуре. Реакционную смесь выливали в 250 мл воды со льдом и экстрагировали хлористым метиленом ( $2 \times 100$  мл). Объединенный экстракт промывали ледяной водой (250 мл), охлажденным насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (150 мл) и водой (100 мл). Органический слой отделяли, фильтровали через слой ваты, концентрировали и высушивали в вакууме. Ацетилованный (19) и бензоилированный (20) бромиды, образующиеся с выходами 95–97%, далее использовали без дополнительной очистки. Пивалоилированный бромид (21) выделяли с выходом 89% после кристаллизации из метанола, т.пл. 92–93°C. Лит. данные для продукта (21) [44]: т.пл. 89–91°C (этанол).

**Гидролитическая проба на ортоэфир.** Образец анализируемой реакционной смеси наносили на пластинку для ТСХ, а затем на это же пятно капилляром наносили 90% TFA так, чтобы пятно кислоты полностью покрывало пятно пробы. Пластинку сушили в течение 15 мин в вакууме масляного насоса, хроматографировали в необходимой системе растворителей и обнаруживали вещества обычным образом. Указанная обработка не затрагивает гликозидные связи, а приводит к гидролизу алкилиденных групп и ортоэфиров, превращая последние в соответствующие полуацетали глюкуроновой кислоты и исходный гликозил-акцептор или соответствующее дебензилиденированное производное.

**Гликозилирование ацетилованным бромидом (19) 2,3-диола (6).** Смесь 69 мг (0.23 ммоль) 2,3-диола (6) [34], 274 мг (1.08 ммоль) цианида ртути (Aldrich), 39 мг (0.11 ммоль) бромида ртути (Fluka), 3 мл абс. ацетонитрила и 400 мг молекулярных сит 3 Å (Ferak) перемешивали 1 ч в атмосфере аргона. К полученной смеси прибавляли раствор 430 мг (1.08 ммоль) глюкуронилбромида (19) в 3 мл абс. ацетонитрила и перемешивали 18 ч. Суспензию разбавляли 15 мл хлористого метилена и фильтровали через слой целита, который затем промывали 15 мл хлористого метилена. Органический слой отделяли, промывали 20 мл 1 М водного раствора  $\text{KBr}$ , 20 мл насыщенного водного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и водой. Экстракт фильтровали через слой ваты, концентрировали и высушивали в вакууме, а затем обрабатывали 3 мл 90% TFA, как описано для соединения (9). Колоночной хроматографией (система 3) выделяли 40 мг аллил-2-О-[метил(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-β-D-галактопиранозида (22) {выход 34%, аморфный,  $[\alpha]_D -3^\circ$ ,  $R_f$  0.10 (Д)} и 57 мг смешанной фракции с  $R_f$  0.15 (Д), из которой после ацетилирования уксусным ангидридом в пиридине хроматографией выделяли (система 3) 27 мг аллил-2,4,6-три-О-ацетил-3-О-

[метил(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-β-D-галактопиранозида (24) {выход 18%, аморфный,  $[\alpha]_D -4^\circ$ ,  $R_f$  0.21 (А)} и 24 мг аллил-4,6-ди-О-ацетил-2,3-ди-О-[метил(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-β-D-галактопиранозида (25) {выход 11%,  $R_f$  0.15 (А)}.

**Аллил-2-О-[метил(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-2,4,6-три-О-ацетил-β-D-галактопиранозид (23).** 2 мг биозида (22) ацетилировали 100 мкл уксусного ангидрида в 100 мкл пиридина при 20°C в течение 48 ч. Раствор упаривали с 2 мл толуола, высушивали в вакууме и получали продукт (23), который далее анализировали с помощью спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР без специальной очистки.

**Гликозилирование ацетилованным бромидом (19) 3,4-диола (9).**

**Опыт а (в присутствии молекулярных сит 3 Å, Ferak).** В условиях гликозилирования диола (6) глюкуронилбромидом (19) проводили взаимодействие 50 мг (0.12 ммоль) диола (9) с 76 мг (0.19 ммоль) бромида (19) в смеси с 1.2 мл абс. ацетонитрила, 45 мг (0.18 ммоль) цианида ртути, 11 мг (0.03 ммоль) бромида ртути и 240 мг молекулярных сит 3 Å (Ferak). Колоночной хроматографией (система 3) выделяли фракцию I (77 мг,  $R_f$  0.36–0.37 (В)) и фракцию II (11 мг,  $R_f$  0.34–0.35 (В)). Фракцию I ацетилировали смесью уксусного ангидрида и пиридина и колоночной хроматографией (система 3) выделяли 45 мг аллил-3,4-ди-О-ацетил-2,6-ди-О-бензоил-β-D-галактопиранозида (28) {выход 74%, аморфный,  $R_f$  0.73 (В)}, 13 мг ортоэфира (26) {выход 14%, аморфный,  $R_f$  0.30 (В)} и 29 мг смеси 13 : 5 метил(1,2,3,4-тетра-О-ацетил-α-D-глюкопиран)уроната (α-16) и его изомера (β-16) {выход 42% в пересчете на донор (19),  $R_f$  0.43 (В)}, идентифицированных с помощью спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР сравнением с известными соединениями. После ацетилирования фракции II смесью уксусного ангидрида и пиридина колоночной хроматографией (система II) выделяли 4 мг диацетата (28) (выход 7%) и 7.5 мг продукта (α-16), выход 11% в пересчете на донор (19).

**Опыт б (в отсутствие молекулярных сит).** При гликозилировании 61 мг (0.14 ммоль) 3,4-диола (9), 88 мг (0.22 ммоль) бромида (19) в 1.1 мл абс. ацетонитрила в присутствии 57 мг (0.23 ммоль) цианида ртути и 9 мг (0.03 ммоль) бромида ртути в условиях опыта "а", но в отсутствие молекулярных сит, получали 16 мг аллил-4-О-ацетил-2,6-ди-О-бензоил-β-D-галактопиранозида (27) {выход 24%, аморфный,  $R_f$  0.64 (Е)} и 11 мг аллил-2,6-ди-О-бензоил-4-О-[метил(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-глюкопиранозил)уронат]-β-D-галактопиранози-



да (29) {выход 10%, аморфный,  $[\alpha]_D -17^\circ$ ,  $R_f$  0.49 (E)}.

**Опыт в (в присутствии молекулярных сит AW 300).** При гликозилировании 61 мг (0.14 ммоль) 3,4-диола (9), 90 мг (0.23 ммоль) бромида (19) в 1.1 мл абс. ацетонитрила в присутствии 56 мг (0.22 ммоль) цианида ртути, 6 мг (0.02 ммоль) бромида ртути в условиях опыта "а", но в присутствии 454 мг молекулярных сит AW 300 (Fluka) получали 13 мг (12%)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связанного дисахарида (29), 13 мг трисахаридного продукта (30) {выход 8%, аморфный,  $R_f$  0.51 (E)} и 19 мг смешанной фракции с  $R_f$  0.34 (E), после ацетилирования которой смесью уксусного ангидрида и пиридина получали 4 мг аллил-4-О-ацетил-2,6-ди-О-бензоил-3-О-[метил(2,3,4-три-О-ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозил)уронат]- $\beta$ -D-галактопиранозид (31) {выход 4%, аморфный,  $[\alpha]_D -28^\circ$  (с 0.25,  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f$  0.71 (E)}.

**Гликозилирование ацетилированным бромидом (19) 2-бензоата (7).** В условиях взаимодействия соединений (19) и (9) (опыт "в") в течение 22.5 ч проводили гликозилирование 55 мг (0.13 ммоль) 2-О-бензоата (7) действием 130 мг (0.33 ммоль) бромида (19) в 1 мл абс. ацетонитрила в присутствии 55 мг (0.22 ммоль) цианида ртути, 10 мг (0.03 ммоль) бромида ртути и 600 мг молекулярных сит AW 300. Дополнительно прибавляли 38 мг (0.1 ммоль) бромида (19) в 0.4 мл абс. ацетонитрила и выдерживали реакционную смесь 29 ч, прибавляли еще 46 мг (0.12 ммоль) бромида (19) в 0.4 мл абс. ацетонитрила и выдерживали следующие 28 ч. После кислотного гидролиза, как описано для соединения (9), колоночной хроматографией (система И) выделяли 11 мг аллил-2-О-бензоил- $\beta$ -D-галактопиранозид (15) {26%, аморфный,  $R_f$  0.08 (E)}, совпадающего по ТСХ с триолом (15), являющимся промежуточным продуктом в синтезе 2-бензоата (7), и 39 мг (46%) смеси (1 : 8) аллил-2-О-бензоил-3-О-[метил(2,3,4-три-О-ацетил- $\alpha$ - и - $\beta$ -D-глюкопиранозил)уронат]- $\beta$ -D-галактопиранозидов (33) и (37).

**Гликозилирование пивалоилированным бромидом (21) 2-бензоата (7).** В условиях предыдущего эксперимента в течение 62 ч проводили гликозилирование 202 мг (0.49 ммоль) 2-О-бензоата (7), 252 мг (0.48 ммоль) бромида (21) [44] в 2.5 мл абс. ацетонитрила и в присутствии 126 мг (0.5 ммоль) цианида ртути, 18 мг (0.05 ммоль) бромида ртути, 1 г молекулярных сит AW 300. Прибавляли 157 мг (0.3 ммоль) донора (21) и 76 мг (0.3 ммоль) цианида ртути и перемешивали еще 22 ч, гидролизировали 90% водной TFA, как описано для соединения (9), и колоночной хроматографией (система И) выделяли 3 мг аллил-2-О-бензоил-3-О-[метил(2,3,4-

три-О-пивалоил- $\alpha$ -D-глюкопиранозил)уронат]- $\beta$ -D-галактопиранозид (35) {выход 1%, аморфный,  $[\alpha]_D +168^\circ$  (с 0.1),  $R_f$  0.40 (E)}, 231 мг аллил-2-О-бензоил-3-О-[метил(2,3,4-три-О-пивалоил- $\beta$ -D-глюкопиранозил)уронат]- $\beta$ -D-галактопиранозид (39) {выход 61%,  $R_f$  0.38 (E), аналитический образец кристаллизовали (этилацетат-петролейный эфир), т.пл. 217–218°C,  $[\alpha]_D -9^\circ$  (с 0.8)}, 21 мг аллил-2-О-бензоил-6-О-[метил(2,3,4-три-О-пивалоил- $\beta$ -D-глюкопиранозил)уронат]- $\beta$ -D-галактопиранозид (42) {выход 6%, аморфный,  $[\alpha]_D -21^\circ$  (с 0.7),  $R_f$  0.48 (E)} и 10 мг (6%) аллил-2-О-бензоил- $\beta$ -D-галактопиранозид (15).

**Аллил-4,6-ди-О-ацетил-2-О-бензоил-3-О-[метил(2,3,4-три-О-пивалоил- $\beta$ -D-глюкопиранозил)уронат]- $\beta$ -D-галактопиранозид (40).** 433 мг дисахарида (39) ацетилировали 2 мл уксусного ангидрида в 2 мл абс. пиридина при 20°C в течение 70 ч, упаривали с толуолом (4  $\times$  2 мл) и колоночной хроматографией выделяли 470 мг 4,6-ди-О-ацетилированного дисахарида (40). Выход 98%, аморфный,  $[\alpha]_D +4^\circ$ ,  $R_f$  0.66 (Ж).

**Метил(2,3,4-три-О-пивалоил- $\alpha$ -D-глюкопиранозил)трихлорацетимидат)уронат (43).** К раствору смеси 170 мг (0.36 ммоль) полуацетата (44) и 370 мкл (0.36 ммоль) трихлорацетонитрила (Merck) в 3 мл абс. хлористого метилена при -30°C в атмосфере сухого аргона прибавляли при перемешивании 20 мкл (0.12 ммоль) 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена (Fluka), выдерживали 1 ч, постепенно доводя температуру смеси до 20°C. Смесь упаривали и из остатка колоночной хроматографией (система З) выделяли трихлорацетимидат (43). Выход 170 мг (77%), аморфный,  $[\alpha]_D +68^\circ$ ,  $R_f$  0.69 (Г).

**Метил-2,3,4-три-О-пивалоил-D-глюкопирануронат (44).** К раствору 374 мг (0.69 ммоль) полного пивалоата (18) [44] в 3 мл DMF добавляли 63 мг (0.69 ммоль) гидразинацетата, выдерживали 70 ч, добавляли 10 мл хлористого метилена и промывали 10 мл насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и водой. Экстракт фильтровали через слой ваты, упаривали при 35°C, упаривали с толуолом (4  $\times$  10 мл) и из остатка колоночной хроматографией (система З) выделяли полуацеталь (44). Выход 209 мг (64%), аморфный,  $R_f$  0.40 (Г).

**Гликозилирование 2-бензоата (7) имидатом (43).** Смесь 71 мг (0.17 ммоль) 2-О-бензоата (7), 160 мг (0.26 ммоль) имидата (43), 420 мг молекулярных сит AW 300 и 2 мл абс. хлористого метилена перемешивали 30 мин при 20°C в атмосфере сухого аргона, температуру понижали до -20°C, прибавляли 16 мкл (0.09 ммоль) триметилсилiltrифлата (Merck) и перемешивали 3 ч, постепенно повышая температуру до 20°C. Прибавляли 1 мл



триэтиламина, фильтровали через слой целита, упаривали, гидролизовали 90% водной TFA, как описано для соединения (9), и колоночной хроматографией (система II) выделяли 26 мг (20%)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-связанного дисахарида (42) и 60 мг (46%) смеси (5 : 6)  $\alpha$ - и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-связанных дисахаридов (35) и (39).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № 96-15-96991 и гранта № 97-03-33037а Российского фонда фундаментальных исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Choy Y.-M., Dutton G.G.S. // *Can. J. Chem.* 1973. V. 51. P. 3015–3020.
- Kjellen L., Lindahl U. // *Ann. Rev. Biochem.* 1991. V. 60. P. 443–475.
- Abo T., Balch C.M. // *J. Immunol.* 1981. V. 127. P. 1024–1029.
- Chou D.K.H., Ilyas A.A., Evans J.E., Costello C., Quarles R.H., Jungalwala F.B. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 161. P. 11717–11725.
- Vashol H., Van Zuylen W.E.M., Orberger G., Vli-ghenthart J.F.G., Schachner M. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 22957–22960.
- Schachner M. // *Carbohydrate Recognition in Cellular Function. Ciba Foundation Symposium 145* / Eds G. Bock, S. Hammett. Chichester: Wiley, 1989. P. 156–172.
- Jessell T.M., Hynes M.A., Dodd J. // *Annu. Rev. Neurosci.* 1990. V. 13. P. 227–255.
- Jungalwala F.B. // *Neurochem. Res.* 1994. V. 19. P. 945–957.
- Schachner M., Martini R. // *Trends Neurosci.* 1995. V. 18. P. 183–191.
- Schmitz B., Schachner M., Ito Y., Nakano T., Ogawa T. // *Glycoconj. J.* 1994. V. 11. P. 345–352.
- Stefansson K., Marton L., Antel J.P., Wollmann R.L., Roos R.P., Chejfec G., Arnason B.G. // *Acta Neuropathol.* 1983. V. 59. P. 255–261.
- Steck A.J., Murray N., Meier C., Page N., Perruisseau G. // *Neurology.* 1983. V. 33. P. 19–23.
- Tatum A.H. // *Ann. Neurol.* 1993. V. 33. P. 502–506.
- Ogawa-Goto K., Kubota K., Kurotani A., Abe T. // *J. Neuroimmunol.* 1994. V. 55. P. 55–60.
- Asa D., Gant T., Oda Y., Brandley B.K. // *Glycobiology.* 1992. V. 2. P. 395–399.
- Nakano T., Ito Y., Ogawa T. // *Carbohydr. Res.* 1993. V. 43. P. 43–69.
- Isogai Y., Kawase T., Ishida H., Kiso M., Hasegawa A. // *J. Carbohydr. Chem.* 1996. V. 15. P. 1001–1023.
- Noble-Ozazio E., Hays A.P., Latov N., Perman G., Golier J., Shy M.E., Freddo L. // *Neurology.* 1984. V. 34. P. 1336–1342.
- Kruse J., Mailhammer R., Wernecke H., Faissner A., Sommer I., Goridis C., Schachner M. // *Nature.* 1984. V. 311. P. 153–155.
- Kononov L.O., Sherman A.A., Shashkov A.S., Kor-nilov A.V., Zyryanov E.V., Zatonsky G.V., Judina O.N., Nifant'ev N.E. // *Proc. XVIII Int. Carbohydrate Symposium. Milan, 1996.* P. 417.
- Das S.K., Roy N. // *Synth. Commun.* 1995. V. 25. P. 1699–1710.
- Sarkar A.K., Esko J.D. // *Carbohydr. Res.* 1995. V. 279. P. 161–171.
- Neumann K.W., Tamura J., Ogawa T. // *Bioorg. Med. Chem.* 1995. V. 3. P. 1637–1650.
- Goto F., Ogawa T. // *Pure Appl. Chem.* 1993. V. 65. P. 793–801.
- Rio S., Beau J.-M., Jacquinet J.-C. // *Carbohydr. Res.* 1993. V. 244. P. 295–313.
- Tamura J., Neumann K.W., Ogawa T. // *Liebigs Ann.* 1996. P. 1239–1257.
- Jacquinet J.-C. // *Carbohydr. Res.* 1990. V. 199. P. 153–181.
- Zsiska M., Meyer B. // *Carbohydr. Res.* 1991. V. 215. P. 279–292.
- He D.-Y., Li Z.-J., Cai M.-S. // *Carbohydr. Res.* 1993. V. 239. P. 267–271.
- Marra I., Dong X., Petitou M., Sinay P. // *Carbohydr. Res.* 1989. V. 195. P. 39–50.
- Schultz M., Zoerkler G. // *Liebigs Ann. Chem.* 1989. S. 393–395.
- Черняк А.Я., Антонов К.В., Кочетков Н.К. // *Био-орган. химия.* 1989. Т. 15. С. 1113–1127.
- Norberg T. // *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis* / Eds S.H. Khan, R.A. O'Neill. Amsterdam: Harwood Acad. Publ., 1996. P. 82–107.
- Jacquinet J.-C., Sinay P. // *Tetrahedron.* 1979. V. 35. P. 365–371.
- Lee R.T., Lee Y.S. // *Carbohydr. Res.* 1974. V. 37. P. 193–201.
- Chernyak A.Ya., Levinsky A.B., Dmitriev B.A., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* 1984. V. 128. P. 269–282.
- Kaspersen F.M., van Boeckel C.A.A. // *Xenobiotica.* 1987. V. 17. P. 1451–1471.
- Черняк А.Я., Кононов Л.О., Кочетков Н.К. // *Био-орган. химия.* 1988. Т. 15. С. 1394–1410.
- Nifant'ev N.E., Amochaeva V.Y., Shashkov A.S., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* 1993. V. 242. P. 77–89.
- Abbas S.A., Haines A.H. // *Carbohydr. Res.* 1975. V. 39. P. 358–363.
- Chittenden G.J.F., Buchanan J.G. // *Carbohydr. Res.* 1969. V. 11. P. 379–385.

42. Нифантьев Н.Э., Амочаева В.Ю., Шашков А.С., Кочетков Н.К. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. С. 699–716.
43. Barile P.L., Berti G., Catelani G., Colonna F., Marra A. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 2307–2310.
44. Vlahov J., Snatzke G. // Liebigs Ann. Chem. 1983. S. 570–574.
45. Schmidt R.R. // Synlett. 1990. V. 11. P. 694–696.
46. Нифантьев Н.Э., Бакиновский Л.В., Липкинд Г.М., Шашков А.С., Кочетков Н.К. // Биоорг. химия. 1991. Т. 177. С. 517–530.
47. Contant C., Jacquinet J.-C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1995. V. 12. P. 1573–1581.
48. Литвак М.М., Бетанели В.И., Бакиновский Л.В., Кочетков Н.К. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. С. 1133–1142.

## Synthesis of Oligosaccharides Related to the HNK-1 Antigen.

### 1. Synthesis of Selectively Protected Allyl 3-O-[Methyl ( $\beta$ -D-glucopyranosyl)uronate]- $\beta$ -D-galactopyranoside

A. V. Kornilov, L. O. Kononov, G. V. Zatonskii, A. S. Shashkov, and N. E. Nifant'ev

Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

**Abstract**—The glycosylation of several mono- and dihydroxyl glycosyl acceptors based on allyl  $\beta$ -D-galactopyranoside with completely acylated glucuronyl bromides under the Helferich reaction conditions was studied in order to develop a method for the preparative synthesis of selectively protected disaccharide  $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal in a form that can be used for further preparation of corresponding glycosyl donors and spacers derivatives. We found that 1,2-orthoesters were the major primary products of the reaction, and their further conversion into isomeric glycosides depended on pH and can be regulated by the type of molecular sieves used. When Acid Washed Molecular Sieves AW 300 were used, glycosides were predominantly synthesized. No selective formation of the (1 $\rightarrow$ 3)-bound disaccharide was observed upon glycosylation of glycosyl acceptors with 2,3- and 3,4-diol groupings. This (1 $\rightarrow$ 3)-bound disaccharide was most efficiently synthesized by glycosylation of allyl 4,6-O-benzylidene-2-O-benzoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside with pivaloylated glucuronyl bromide. With acetylated or benzoylated glucuronyl bromides or with pivaloyl glucuronyl imidate, this galactoside can also be glycosylated but with a lower yield of the target (1 $\rightarrow$ 3)-bound disaccharide and lower glycosylation regioselectivity.

*Key words:* glycosylation, glucuronylation, glucuronic acid, HNK-1