



УДК 547.455.9.057

СИНТЕЗ ТРИСАХАРИДОВ Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)[Gal($\alpha 1 \rightarrow 3$)]GalNAc α И Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)]GalNAc α В ВИДЕ ЗАЩИЩЕННЫХ ТРИФТОРАЦЕТАМИДОПРОПИЛГЛИКОЗИДОВ

© 1999 г. Л. А. Симеони*, Н. Э. Байрамова[#], Н. В. Бовин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

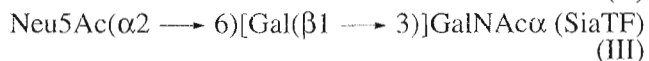
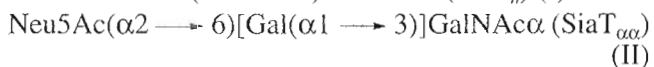
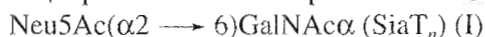
Поступила в редакцию 26.02.98 г. Принята к печати 03.07.98 г.

Описан синтез защищенных сиалосодержащих трисахаридов, представляющих собой фрагменты олигосахаридных цепей муциновых гликопротеинов. Избирательным сиалилированием первично-спиртовой группы (3-трифторацетамидопропил)-2-азидо-2-дезоксид-3-*O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-бензил)- α -*D*-галактопиранозил- α -*D*-галактопиранозидом полным ацетатом метилового эфира β -этилтиогликозида *N*-ацетилнейраминового эфира кислоты в присутствии *N*-йодсукцинимид и трифторметансульфокислоты (или ее триметилсилилового эфира) получены производные α - и β -сиалил-(2 \rightarrow 6)-биозидов с выходами соответственно 39 и 25%. Каталитическим гидрогенолизом азидной и бензильных групп с последующим *N*- и *O*-ацетилированием из α -аномера получен целевой трифторацетамидопропилгликозид Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)[Gal($\alpha 1 \rightarrow 3$)]GalNAc α -OSp в виде полного ацетата. Аналогичной конденсацией сиалилдонора с (3-трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-3-*O*-(2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил)- β -*D*-галактопиранозил- α -*D*-галактопиранозидом получен ацетилированный трифторацетамидопропилгликозид Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 6$)[Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)]GalNAc α -OSp с выходом 15% (и его Neu5Ac($\beta 2 \rightarrow 6$)-аномер с выходом 12%).

Синтезированные сиалилбиозиды после *O*-дезацетилирования и *N*-детрифторацетилирования могут быть использованы в качестве лигандов для получения неогликоконъюгатов.

Ключевые слова: *N*-ацетилнейраминовая кислота; тиогликозиды; сиалилирование; сиалилолигосахариды; антиген SiaT_n; муцин.

Ранее мы сообщали [1] о синтезе спейсированного производного дисахарида (I), полученного с целью его дальнейшего использования в синтезе неогликоконъюгатов. Дисахарид (I), привязанный α -*O*-гликозидной связью через гидроксильную группу серина или треонина к пептидному кору, представляет собой антигенную детерминанту опухолеассоциированного гликопротеина MUC1 [2].



Сокращения: Neu5Ac – *N*-ацетилнейраминовая кислота; NIS – *N*-йодсукцинимид; TfOH – трифторметансульфокислота; TMS-OTf – триметилсилиловый эфир трифторметансульфокислоты; TOF-MS (²⁵²Cf Plasma Desorption Time-of-Flight mass spectrometry) – время-пролетная масс-спектрометрия путем ионизации осколками ядер ²⁵²Cf; Sp – спейсер – CH₂CH₂CH₂NHCOCF₃; КХ – колоночная хроматография.

* Стипендиат Национального Совета по развитию науки и технологии (CNPq), Бразилия, Бразилия.

[#] Автор для переписки (byramova@carb.siobc.ras.ru).

В настоящем сообщении мы описываем синтез двух спейсированных разветвленных трисахаридов (II) и (III). Эти трисахариды можно рассматривать, с одной стороны, как усложненные формы сиалил-*T_n*-дисахарида (α - и β -галактозил-SiaT_n), а с другой стороны, как сиалилированные формы биологически важных дисахаридов – (T_{αα}) (IV) и TF (V).

Дисахарид (IV) (T_{αα}), присоединенный α -*O*-гликозидной связью через гидроксильную группу серина или треонина к пептидному кору, найден в муцине, экспрессированном на клетках тератокарциномы человека [3]. Недавно появилось сообщение [4] о выделении из мокроты пациента, страдавшего хроническим бронхитом, нового типа муциновой коровой структуры – трисахарида (II) (SiaT_{αα}).

Дисахарид (V) (TF) – иммунодоминантный участок антигена Томсена–Фриденрайха. В сиалилированной форме (SiaTF) он присутствует на эпителиальных клетках большинства животных тканей [5, 6].

В данной работе защищенные производные целевых трисахаридов (II) и (III) синтезированы по методологии, аналогичной использованной при синтезе спейсированного производного SiaT_n,

описанном в предыдущем сообщении [1], а именно, путем промотируемого парой *N*-йодсукцинимид-трифторметансульфокислота (или ее триметилсилиловый эфир) (2 → 6)-региоселективного сиалилирования производного галактозамина, несущего на восстанавливающем конце 3-трифторацетамидопропильную спейсерную группу в α-конфигурации. В качестве гликозилдонера, как и в работе [1], служил этилтиогликозид ацетилнейраминовой кислоты (VI).

Синтез трисахарида (II) в виде полного ацетата (XIa) осуществлен в четыре стадии (схема 1). В качестве гликозилакцептора служило 3-*O*-α-*D*-галактозилированное производное галактозамина – диол (VII). Получение этого диола, который однако, не был охарактеризован, из соответствующего 4,6-*O*-бензилиденового производного кислотным гидролизом описано в работе [7]. В данной работе производное (VII) охарактеризовано с помощью данных MS и ¹H-ЯМР.

Конденсацией донора (VI) с акцептором (VII) в ацетонитриле в присутствии NIS/TMS-OTf и последующим фракционированием с помощью КХ были выделены два главных продукта – α- и β-сиалилбиозиды (VIIIa) и (VIIIб) с выходами 39 и 22% соответственно (или 45 и 25%, считая на прореагировавший исходный диол (VII)). Из реакционной смеси были выделены также непрореагировавший исходный диол (VII) (13%) и гликаль (IX) (31%). Строение аномеров (VIIIa) и (VIIIб) подтверждалось данными TOF-MS. В спектре α-аномера (VIIIa) присутствовал пик [M + Na + K], а

юющего 4,6-*O*-бензилиденового производного кислотным гидролизом описано в работе [7]. В данной работе производное (VII) охарактеризовано с помощью данных MS и ¹H-ЯМР.

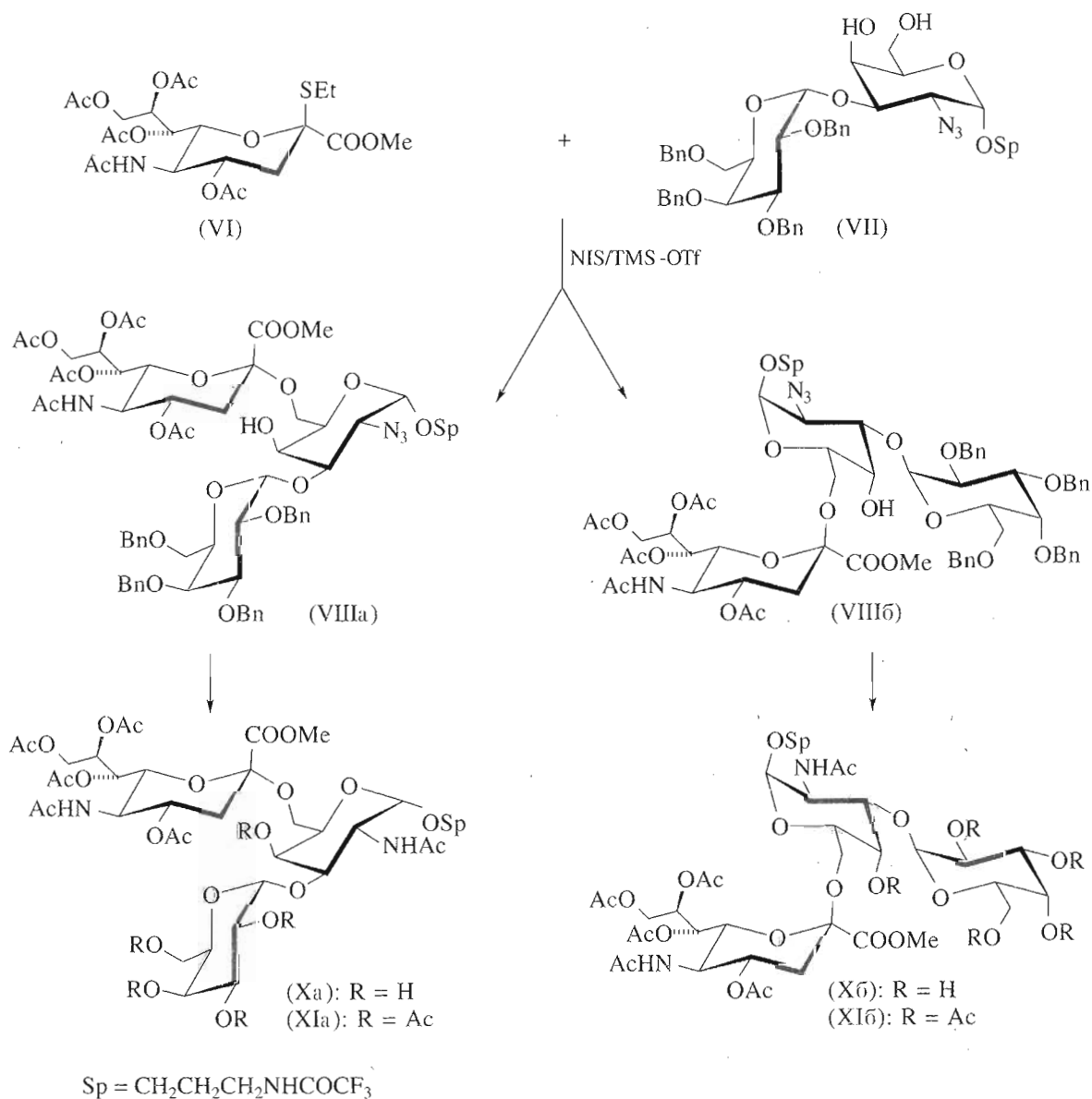
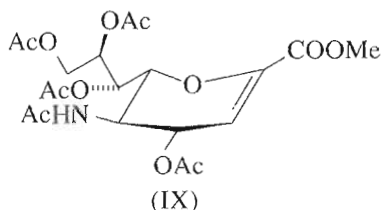


Схема 1.

также пик $[M + 91]$, который отвечал “захвату” бензильной группы молекулярным ионом. Высокая концентрация ионов бензильных групп, образовавшихся при распаде молекулы этого трисахарида, содержащего четыре бензильные группы, подтверждалась наличием интенсивного пика с молекулярной массой 91. Как и в случае дисахаридов, содержащих азидную группу, присутствовал пик $[M - 26]$ [1]. Для сравнения интересно отметить, что пик $[M + 91]$, а также пик $[M + 91 - 26]$ наблюдались также и в спектре TOF-MS исходного диола (VII).



Трисахаридные структуры обоих аномеров подтверждались данными спектров ^1H -ЯМР, которые содержали сигналы ацетильных и ароматических групп, метильной группы сложного эфира, сигналы протонов спейсерной группы. Отнесение аномерной конфигурации остатка Neu5Ac триозидов (VIIIa) и (VIIIб) предварительно было сделано на основании значений химических сдвигов характеристичных сигналов H3a и H3e, а затем подтверждено после перевода их в полные ацетаты (XIa) и (XIб).

Азид (VIIIa) был подвергнут каталитическому гидрогенолизу над палладием на угле в присутствии уксусного ангидрида в растворе метилового спирта и этилацетата. Образовавшееся (в результате дебензилирования и восстановления азидной группы в аминную с одновременным ее *N*-ацелированием) производное (IXa) было до-*O*-ацелировано действием уксусного ангидрида в пиридине. Это привело к целевому полному ацетату триозида (XIa) с выходом 59%. Аналогично, из β -аномера (VIIIб) по той же схеме через производное (XIб) был получен полный ацетат триозида (XIб) с выходом 56%.

Трисахаридная структура перацетата (XIa) следовала из данных TOF-MS. В спектре наблюдались пики ионов $(M + K)$ и $(M + Na)$, (M) , а также пики, отвечающие отрыву AcOH или SpOH от молекулярного иона. Аналогичная информация была получена также и для β -аномера (XIб).

Интересно отметить, что хим. сдвиги протонов остатка Neu5Ac в спектрах ^1H -ЯМР полных ацетатов три- и дисахаридов (см. [1]) для соответствующих аномеров имели близкие значения. Разница значений $\Delta\delta_{\text{H}_3}$ хим. сдвигов протонов при C3 остатка GalNAc при переходе от дисахарида (Ia) (или Ib) к трисахариду (XIa) (или XIб) 5.094 (или 5.146) \rightarrow 3.945 (или 3.958) подтверждает, что в первом случае (для обоих аномеров) гидро-

кисильная группа при C3 ацилирована, а во втором случае – гликозилирована. В то же время разница значений $\Delta\delta_{\text{H}_4}$ остатка GalNAc при переходе от дисахаридов (Ia) и (Ib) к трисахаридам (XIa) и (XIб) [(5.379 (и 5.448) \rightarrow 5.363 (и 5.416))] и слабое положение этих сигналов показывает, что гидроксильная группа при C4 в обоих случаях ацилирована. Это подтверждает (2 \rightarrow 6)-регионаправленность сиалилирования 4,6-диола (VII) и является дополнительным подтверждением аналогичной направленности в описанном ранее [1] сиалилировании 3,4,6-триола – 3-трифторацетамидопропил 2-азидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозидом.

Для синтеза трисахарида (SiaTF), отличающегося от трисахарида SiaT $_{\alpha\alpha}$ конфигурацией галактозидной связи при C3–O остатка галактозамина, в качестве акцептора был использован диол (XIII) (схема 2). Диол (XIII) был получен нами кислотным дебензилированием 4,6-*O*-бензилиденового производного (XII) [8–10] и охарактеризован данными ^1H -ЯМР и MS. Диол (XIII), в отличие от диола (VII), вместо неполярных азидной и четырех бензильных групп содержал ацетамидную и четыре *O*-ацетильные группы. Более низкая растворимость диола (XIII) по сравнению с диолом (VII) могла отрицательно повлиять на эффективность сиалилирования. Кроме того, существовала опасность, что в условиях сиалилирования тиогликозидом (VI) может пройти побочная реакция замещения водорода при ацетамидной группе остатка GalNAc на EtS-группу, как это было недавно обнаружено [11]. С другой стороны, в случае удачного исхода реакции сиалилирования выход к целевому трисахариду осуществлялся бы в одну стадию, что должно было существенно компенсировать вышеуказанные недостатки такого акцептора.

Конденсация акцептора (XIII) с донором (VI) привела к сложной смеси продуктов. С помощью КХ удалось выделить аномеры (XIVa) и (XIVб) с выходами 15 и 12% соответственно. Структура аномерных триозидов (XIVa) и (XIVб) подтверждалась данными масс- и ^1H -ЯМР-спектров и сравнением с данными для полных ацетатов трисахаридов (XIa) и (XIб), о которых речь шла выше.

В масс-спектре TOF аномеров (XIVa) и (XIVб) наблюдались пики $[M]$, $[M + K]$, $[M + Na]$, а также пики $[M - \text{AcOH}]$, $[M - \text{SpOH}]$; пик 473, отвечающий остатку Neu5Ac после разрыва сиалозидной связи и пик $[473 - \text{AcOH}]$ – наиболее интенсивный в спектрах обоих аномеров. В спектрах ^1H -ЯМР сигналы (дд) протонов H3a и H3e имели значения 1.729 и 2.457 м. д. (для α -аномера XIVa) и 1.682 и 2.264 м. д. (для β -аномера), что подтверждало аномерную конфигурацию остатка Neu5Ac в этих соединениях. Другим подтверждением аномерной конфигурации остатка Neu5Ac были также характеристичные значения $\Delta\delta_{9a,9b}$ [12, 13]: высокое

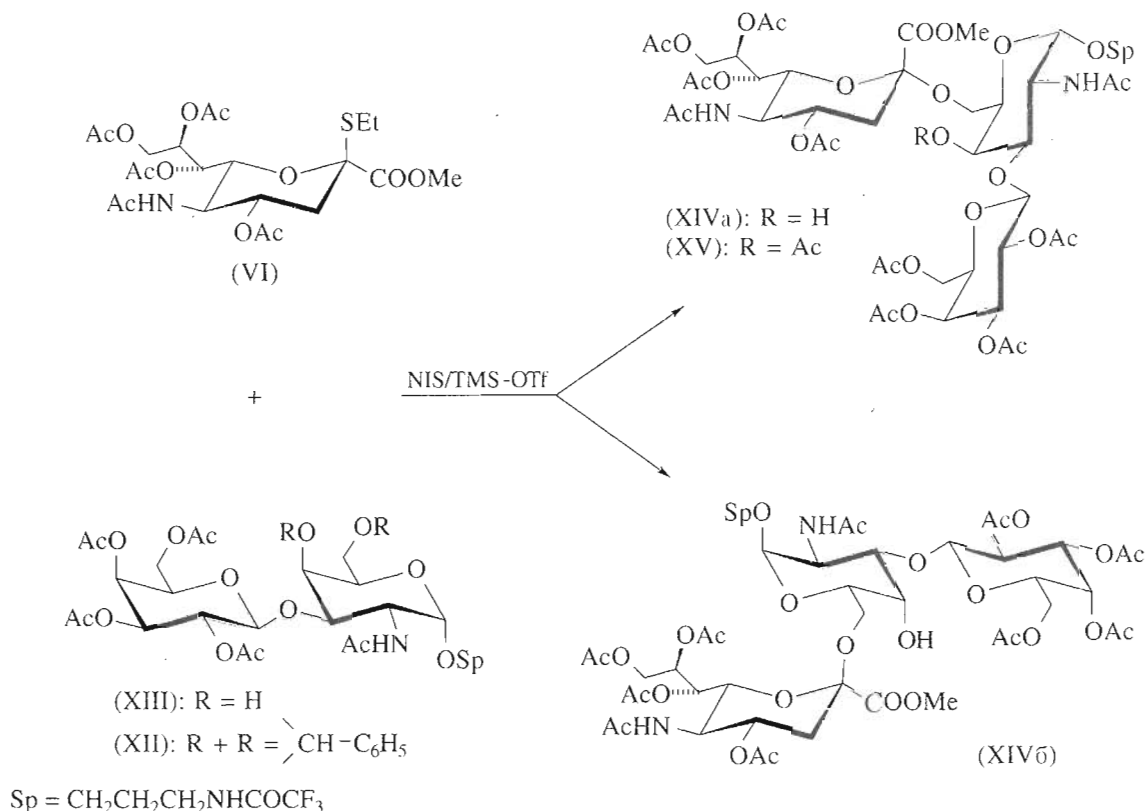


Схема 2.

(0.564 м.д.) – для β - и низкое (0.369 м. д.) – для α -аномера. Как и во всех предыдущих примерах, наблюдался слабополюсный сдвиг сигнала протона C5-NHAc при переходе от α -аномера к β -аномеру (6.996 \rightarrow 7.287 м. д.).

Сильное перекрытие сигналов в спектрах трисахаридов (XIVa) и (XIVb) не позволяло однозначно заключить о (2 \rightarrow 6)-региоселективности сиаилирования. Место замещения сиаловой кислотой в остатке звена GalNAc было показано следующим образом. α -Аномер (XIVa) действием уксусного ангидрида в пиридине был переведен в ацетат (XV). Сравнивая спектр исходного гидроксилсодержащего триозида (XIVa) со спектром его ацетата (XV) и спектрами триозида (XIa) (см. эксперимент. часть), полного ацетата (α 2 \rightarrow 6)-биозида (I) и его (β 2 \rightarrow 6)-аномера, а также производного, отличающегося от соединения (I) отсутствием ацетильной группы при O3 [1], можно видеть, что для всех соединений, у которых положение O4 (остатка GalNAc) ацетилировано, сигнал H4 (дд \approx т) с двумя КССВ (порядка 0.5–3.0 Гц), отвечающими спин-спиновому взаимодействию экваториального H4 с вицинальными аксиальными соседями H3 и H5 находится в области слабого поля – 5.20–5.50 м.д. В этой области у производного (XIVa) имелись три сигнала, отвечающие H7 и H8 остатка Neu5Ac, а также H4 остатка β -Gal.

В спектре ацетата (XV) к этим трем сигналам добавился новый сигнал (дд, δ 5.348 м.д., $J_{4,5} < 1$ Гц и $J_{4,3} = 3$ Гц), отвечающий протону C4H-OAc. Эти данные, а также сильнополюсное (дд, δ 3.350 и дд, δ 3.698) положение сигналов H6a и H6b остатка GalNAc α в ацетате (XV), ясно свидетельствовало, что положение O6 остатка GalNAc гликозилировано, т.е. несет остаток Neu5Ac.

Таким образом, при синтезе SiaTF одностадийный переход диола (XIII) в ацетаты (XIVa) и (XIVb) привел к целевому α -сиалилбиозиду (XIVa) с выходом 15%. Этот выход невысок, но вполне сопоставим с выходом (23%) целевого α -сиалилбиозида (XIa) при синтезе SiaT $_{\alpha\alpha}$ достигнутым в результате четырехстадийного перехода диола (VII) в ацетаты (XIa) и (XIб).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ^1H -ЯМР (δ , м.д. относительно Me_4Si) сняты на приборах WM-500 и WM-250 Bruker (в растворе CDCl_3). Приведены химические сдвиги в миллионных долях и КССВ (J) в герцах. Оптическое вращение при 20°C измеряли на поляриметре DIP-360 фирмы Jasco. Спектры TOF-MS с фиксацией положительных ионов сняты на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ Сумского

ПО "Электрон" (источник ионизации – десорбция плазмы ^{252}Cf).

КХ проводили на силикагеле 60 (Merck), ТСХ – на стеклянных или алюминиевых пластинках с силикагелем 60 (Merck 5553) в системах: изопропиловый спирт–этилацетат–вода (ИЭВ), этилацетат–метанол (ЭМ), гексан–хлороформ–изопропиловый спирт (ГХИ), гексан–хлороформ–метиловый спирт (ГХМ), гексан–этилацетат–изопропиловый спирт (ГЭИ), вещества обнаруживали нагреванием после обработки 7% фосфорной кислотой. ВЭЖХ проводили на колонках (24 × 250 мм, 10 мкм и 3 × 250 мм, 6 мкм) с сорбентом Силасорб 600 с рефрактометрическим детектором (Chemapol) в системе ГЭИ.

Ацетонитрил для реакции гликозилирования перегоняли над перманганатом калия в присутствии карбоната калия, затем над пятиокисью фосфора и далее над гидридом кальция. Растворы веществ в хлороформе и бензоле высушивали фильтрованием через слой ваты. Дисахариды (VII) и (XII) любезно предоставлены Т.В. Овчинниковой.

(3-Трифторацетиамидопропил)-2-азидо-2-дезоксис-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил- α -D-галактопиранозил)- α -D-галактопиранозид (VII). Перед конденсацией дисахарид (VII) был очищен с помощью КХ. R_f 0.58 (ГХИ, 4 : 2 : 1); TOF-MS, m/z (I,%): 944.0 (80) [$M - 26 + 91$]; 853.2 (100) [$M - 26$].

$^1\text{H-NMR}$ -спектр: 1.834 (м, 2H, CH_2 , Sp), 2.366, 2.371 (2H, H4, H6, GalN_3), 3.297 (м, 1H, NCHb , Sp), 3.463 (м, 1H, OCHb , Sp), 3.501 (дд, 1H, $J_{6b,5}$ 5, $J_{6b,6a}$ 9, H6b, Gal), 3.623 (м, 1H, NCHa , Sp), 3.626 (дд, 1H, $J_{6a,5}$ 8.5, H6a, Gal), 3.689 (дд, 1H, $J_{6b,6a}$ 8.5, $J_{6b,5}$ 4, H6b, GalN_3), 3.719 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 4, $J_{2,3}$ 10, H2, GalN_3), 3.831 (дд, 1H, H6a, GalN_3), 3.845 (м, 1H, OCHa , Sp), 3.913 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 3, H3, GalN_3), 3.922 (дд, 1H, H4, GalN_3), 3.954 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 10, $J_{3,4}$ 3, H3, Gal), 4.089 (дд ≈ д, 1H, H4, Gal), 4.103 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 4, H2, Gal), 4.184 (ддд ≈ дд, $J_{5,4} < 2$, H5, Gal), 4.847 (д, 1H, H1, Gal), 4.898 (д, 1H, H1, GalN_3), 7.205 (дд ≈ с, 1H, NHCOCF_3 , Sp), 7.282 (м, Ar).

(3-Трифторацетиамидопропил)-2-азидо-2-дезоксис-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил- α -D-галактопиранозил)-6-О-[метил(4,7,8,9-тетра-О-ацетил-5-ацетиамидо-3,5-дидезокси- α - и - β -D-глицеро-D-галакто-2-нонулопиранозил)онат]- α -D-галактопиранозиды (VIIIa) и (VIIIb). Смесь 97 мг (181 мкмоль) тиогликозида (VI), 80 мг (91 мкмоль) дисахарид (VII), 82 мг (364 мкмоль) NIS, молекулярных сит 4 Å и 10 мл ацетонитрила перемешивали 30 мин при комнатной температуре. При -60°C добавляли 7 мкл TMS-OTf, реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры при перемешивании (30 мин). Разбавляли 30 мл хлороформа, раствор промывали 1 н. Na_2CO_3 (2 × 30 мл), 1 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2 × 30 мл), во-

дой (1 × 20 мл), высушивали, упаривали, остаток, 160 мг, подвергали КХ в градиенте изопропилового спирта (0 → 4%) в смеси хлороформ–гексан (1 : 2) и получали в порядке элюции:

10.5 мг (13%) непрореагировавшего диола (VII). R_f 0.58 (ГХИ 4 : 2 : 1);

27.0 мг β -аномера (VIIIb), выход 22% (25%, считая на прореагировавший диол (VII). $[\alpha]_D +70.0$ (с 0.7, CHCl_3). R_f 0.61 (ГХИ, 4 : 2 : 1; исходный тиогликозид (V) в этой системе имел R_f 0.55); 0.48 (ГЭИ, 4 : 2 : 1);

26 мг (31%) гликаля (IX), R_f 0.43 (ГХИ, 4 : 2 : 1), 0.28 (ГЭИ, 4 : 2 : 1);

далее получали 48 мг α -аномера (VIIIa), выход 39% (45%, считая на прореагировавший дисахарид (VII)). R_f 0.51 (ГХИ, 4 : 2 : 1), 0.38 (ГЭИ, 4 : 2 : 1); $[\alpha]_D +43.0^\circ$ (с 1, CHCl_3). TOF-MS, m/z (I,%): 1446.2 (10) [$M + 91$]; 1414.5 (20) [$M + 91 - 26$]; 1325.7 (20) [$M - 26$]; 1293.3 (35) [$M + \text{Na} + \text{K} - \text{AcOH} - \text{AcOH}$]; 472.0 (70); 414.2 (100).

$^1\text{H-NMR}$ -спектр α -аномера (VIIIa): 1.849, 1.974, 1.994, 2.091, 2.100 (5 × с, 5 × 3H, 5Ac), 1.946 (1H, H3a), 1.832 (м, 2H, CH_2 , Sp), 2.590 (дд, 1H, $J_{3e,3a}$ 12.5, $J_{3e,4}$ 5, H3e), 3.291 (м, 1H, NCHb , Sp), 3.480 (м, 1H, OCHb , Sp), 3.491 (дд, 1H, $J_{6b,6a}$ 9, $J_{6b,5}$ 5, H6b, GalN_3), 3.603 (дд, 1H, $J_{6a,6b}$ 9, $J_{6a,5}$ 8, H6a, Gal), 3.603 (м, 1H, NCHa , Sp), 3.709 (с, 3H, COOMe), 3.709 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 3.5, $J_{2,3}$ 10, H2, GalN_3), 3.860 (м, 1H, OCHa), 3.94 (м, 2H, H3, H4, GalN_3), 3.967 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 10.5, $J_{3,4}$ 2.5, H3, Gal), 4.060 (м, 1H, H2, Gal), 4.062 (м, 1H, H9b), 4.164 (ддд ≈ т, 1H, H5, Gal), 4.294 (дд, 1H, $J_{9a,8}$ 2.5, $J_{9a,9b}$ 12.5, H9a), 4.817 (ддд, 1H, H4), 4.827–4.882 (м, 2H, H1, GalN_3 , H1, Gal), 5.117 (д, 1H, $J_{\text{NH},5}$ 10, NHAc), 5.302 (1H, H7), 5.361 (ддд, 1H, H8), 7.257 (м, Ar).

$^1\text{H-NMR}$ -спектр β -аномера (VIIIb): 1.755, 1.857, 1.944, 2.024, 2.116 (5 × с, 5 × 3H, 5Ac), 1.849 (1H, H3a), 2.471 (дд, 1H, $J_{3e,3a}$ 13, $J_{3e,4}$ 5, H3e), 3.726 (м, 1H, NCHb , Sp), 3.775 (с, 3H, COOMe), 4.672 (дд, 1H, $J_{9a,8}$ 2.5, $J_{9a,9b}$ 12, H9a), 4.903 (м, 1H, $J_{1,2}$ 4, H1, Gal), 5.056 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4, H1, GalN_3), 5.263 (ддд, 1H, H4), 5.325 (1H, H7), 5.367 (ддд, 1H, H8), 6.092 (д, 1H, $J_{\text{NH},5}$ 10, NHAc), 7.078 (дд ≈ с, 1H, NHCOCF_3), 7.268 (Ar).

(3-Трифторацетиамидопропил)-2-ацетиамидо-4-О-ацетил-2-дезоксис-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- α -D-галактопиранозил)-6-О-[метил(4,7,8,9-тетра-О-ацетил-5-ацетиамидо-3,5-дидезокси- α -D-глицеро-D-галакто-2-нонулопиранозил)онат]- α -D-галактопиранозид (XIa). Раствор 38 мг (28 мкмоль) тетрабензилазидопроизводного (VIIIa) в смеси 1500 мкл метилового спирта, 1500 мкл этилацетата и 300 мкл уксусного ангидрида гидрировали действием H_2 в присутствии 10 мг 10%-го палладия на угле при атмосферном давлении в течение 72 ч при комнатной температуре, фильтровали, осадок на фильтре промывали метанолом, филь-

трат и промывные растворы упаривали. Остаток полученного метилового эфира ацетамидоприводного (Ха) (ИЭВ, 4 : 3 : 1, R_f 0.55), 32 мг, обрабатывали 80 мкл As_2O в 160 мкл пиридина 16 ч при комнатной температуре, избыток As_2O разлагали метиловым спиртом. Смесь концентрировали в вакууме, остаток обрабатывали 15 мл воды и 25 мл хлороформа. Водную фазу экстрагировали хлороформом (3 × 25 мл). Объединенные хлороформные экстракты промывали 1 н. HCl (2 × 10 мл), раствором $NaHCO_3$ (2 × 10 мл), водой (1 × 15 мл), высушивали, упаривали. Остаток подвергали КХ на силикагеле в градиенте концентрации MeOH (0 → 6%) в смеси хлороформ–гексан (1 : 2) и выделяли 20 мг (59%) полного ацетата (XIa). R_f 0.35 (ГХИ, 4 : 2 : 2); $[\alpha]_D^{+44.0}$ (с 1, $CHCl_3$). TOF-MS, m/z (I,%): 1258.0 (20) [$M + K$]; 1241.1 (40) [$M + Na$]; 1218.9 (45) [M]; 1160.2 (70) [$M - AcOH$]; 1049.9 (40) [$M - SpOH$]; 729.2 (40); 473.8 (80); 414.8 (100) [474 – $AcOH$].

1H -ЯМР-спектр α -аномера: 1.853 (дд ≈ т, 1H, H3a), 1.903, 1.990, 2.028, 2.052, 2.088, 2.106, 2.118, 2.121 (11Ac), 2.509 (дд, 1H, $J_{3e,3a}$ 13.5, $J_{3e,4}$ 4.5, H3e), 3.241 (дд, 1H, $J_{6b,6a}$ 10, H6b, GalNAc), 3.388 (м, 1H, NCHb, Sp), 3.520 (м, 2H, OCHb, NCHa, Sp), 3.754 (с, 3H, COOMe), 3.736 (дд, 1H, $J_{6a,6b}$ 10, $J_{6a,5}$ 6.5, H6a, GalNAc), 3.760 (м, 1H, OCHa, Sp), 3.945 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 3.5, H3, GalNAc), 3.992 (в.м.* 4H, H6b, Gal; H5, GalNAc; H5, H9b), 4.182 (дд, 1H, H6a, Gal), 4.267 (дд, 1H, $J_{9a,8}$ 2.5, $J_{9a,9b}$ 13, H9a), 4.345 (дд ≈ т, 1H, H5, Gal), 4.647 (ддд, 1H, $J_{2,1}$ 4, $J_{2,NH}$ 10, H2, GalNAc), 4.785 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4, H1, GalNAc), 4.814 (ддд, 1H, H4), 5.105 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 10.5, $J_{3,4}$ 3, H3, Gal), 5.125 (д, 1H, $J_{NH,5}$ 10.5, NHAc), 5.244 (м, 2H, H2, H1, Gal), 5.278 (1H, H7), 5.308 (ддд, 1H, H8), 5.363 (дд, 1H, H4, GalNAc), 5.416 (дд, 1H, H4, Gal), 6.121 (д, 1H, $J_{NH,2}$ 10.5, NHAc, GalNAc), 7.136 (дд ≈ с, 1H, $NHCOCF_3$, Sp).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-4-О-ацетил-2-дезоксид-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- α -D-галактопиранозил)-6-О-[метил(4,7,8,9-тетра-О-ацетил-5-ацетамидо-3,5-дидезокси- β -D-глицеро-D-галакто-2-нонупиранозил)онат]- α -D-галактопиранозид (XIb) получили аналогично из 20.5 мг (15 мкмоль) тетрабензилазидоприводного (VIIIb). Выход 10 мг (56%). R_f 0.35 (ГХИ, 4 : 2 : 2); $[\alpha]_D^{+70.6}$ (с 0.9, $CHCl_3$). TOF-MS, m/z (I,%): 1218.4 (40) [M]; 1192.6 (40) [$M - 26$]; 1156.0 (30) [$M - AcOH$]; 1045.0 (30) [$M - SpOH$]; 1018.1 (40); 473.3 (80); 414.2 (100) [474 – $AcOH$].

1H -ЯМР-спектр: 1.790 (дд ≈ т, 1H, $J_{3a,3e}$ 13, H3a), 1.900, 1.920, 1.957, 2.035, 2.059, 2.095, 2.109, 2.125, 2.132 (11Ac), 2.417 (дд, 1H, $J_{3e,3a}$ 13, $J_{3e,4}$ 5, H3e), 3.442 (дд, 1H, $J_{6b,6a}$ 10, $J_{6b,5}$ 6, H6b, GalNAc), 3.724 (дд, 1H, $J_{6a,6b}$ 10, $J_{6a,5}$ 6, H6a, GalNAc), 3.750 (с, 3H,

COOMe), 3.958 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 11, $J_{3,4}$ 3.5, H3, GalNAc), 4.190 (дд, 1H, $J_{6a,6b}$ 11.5, $J_{6a,5}$ 6, H6a, Gal), 4.330 (ддд ≈ т, 1H, H5, Gal), 4.666 (ддд, 1H, $J_{2,1}$ 4, $J_{2,3}$ 11, $J_{2,NH}$ 10, H2, GalNAc), 4.728 (дд, 1H, H9a), 4.827 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4, H1, GalNAc), 5.084 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 11, $J_{3,4}$ 4, H3, Gal), 5.178 (д, 1H, $J_{1,2}$ 3.5, H1, Gal), 5.218 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 3.5, $J_{2,3}$ 11, H2, Gal), 5.324 (ддд, 1H, H8), 5.416 (дд, 1H, H4, GalNAc), 5.458 (дд, 1H, H4, Gal), 6.025 (д, 1H, $J_{NH,5}$ 10, NHAc), 6.098 (д, 1H, $J_{NH,2}$ 10, NHAc, GalNAc), 7.096 (дд ≈ с, 1H, $NHCOCF_3$, Sp).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)- α -D-галактопиранозид (XIII). 72 мг (91 мкмоль) бензилиденового производного (XII) нагревали в течение 3 ч при 80°C с 10 мл 80% AcOH. Упаривали, остаток подвергали КХ в градиенте метилового спирта (0 → 2%) в этилацетате. Получали 48 мг (75%) продукта (XIII). R_f 0.31 (ЭМ, 19 : 1, исходный (XII) в этой системе имел R_f 0.55); $[\alpha]_D^{+56.6}$ (с 1, $CHCl_3$). TOF-MS, m/z (I,%): 742.6 (30) [$M + K$]; 725.5 (100) [$M + Na$]; 703.5 (90) [M]; 533.2 (65) [$M - SpOH$].

1H -ЯМР-спектр: 1.856 (уд, 1H, C4-OH, GalNAc), 1.947, 1.978, 2.015, 2.053, 2.127 (5 × с, 5 × 3H, 5Ac), 3.435 (м, 2H, NCHb, OCHb, Sp), 3.607 (м, 1H, NCHa, Sp), 3.735 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 3, $J_{3,2}$ 10.5, H3, GalNAc), 3.763 (м, 3H, (H6b, H6a, GalNAc), OCHa, Sp), 3.900 (м, 2H, (H5, GalNAc), H5, Gal), 4.050 (дд, 1H, $J_{6b,6a}$ 11.5, $J_{6b,5}$ 7, H6b, Gal), 4.060 (дд, 1H, H4, GalNAc), 4.142 (дд, 1H, $J_{6a,6b}$ 11.5, $J_{6a,5}$ 7, H6a, Gal), 4.500 (ддд ≈ дд, 1H, $J_{2,1}$ 3.5, $J_{2,NH}$ 9.5, H2, GalNAc), 4.600 (д, 1H, $J_{1,2}$ 8.5, H1, Gal), 4.823 (д, 1H, $J_{1,2}$ 4, H1, GalNAc), 4.975 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 11, $J_{3,4}$ 3.5, H3, Gal), 5.155 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 8.5, $J_{2,3}$ 11, H2, Gal), 5.351 (дд ≈ д, 1H, H4, Gal), 6.135 (д, 1H, $J_{NH,2}$ 9.5, NHAc, GalNAc), 7.239 (дд ≈ с, 1H, $NHCOCF_3$).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)-6-О-[метил(4,7,8,9-тетра-О-ацетил-5-ацетамидо-3,5-дидезокси- α - и - β -D-глицеро-D-галакто-2-нонупиранозил)онат]- α -D-галактопиранозиды (XIVa) и (XIVb). Смесь 55 мг (103 мкмоль) тиогликозида (VI), 36 мг (51 мкмоль) диола (XIII), 47 мг (209 мкмоль) NIS, молекулярных сит 4 Å и 6 мл ацетонитрила перемешивали 30 мин при комнатной температуре. При –60°C добавляли 4 мкл TMS-OTf, реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры при перемешивании (1 ч). Разбавляли 20 мл хлороформа, раствор промывали 1 н. Na_2CO_3 (2 × 15 мл), 1 н. $Na_2S_2O_3$ (2 × 15 мл), водой (1 × 20 мл), высушивали, упаривали, остаток 80 мг, подвергали КХ в градиенте концентрации MeOH (0 → 5%) в смеси хлороформ–гексан (1 : 2) и получали:

* в.м. – сигнал внутри мультиплета.

9.5 мг (26.5%) непрореагировавшего диола (XIII). R_f 0.51 (ГХМ, 4 : 2 : 2);

24 мг (49.5%) гликаля (IX). R_f 0.73 (ГХМ, 4 : 2 : 2);

9.0 мг α -аномера (XIVa), выход 15% (20%, считая на прореагировавший диол (XIII)). R_f 0.58 (ГХМ, 4 : 2 : 2); $[\alpha]_D^{+27.3^\circ}$ (*c* 1, CHCl_3). TOF-MS, m/z (*I*, %): 1216.2 (65) [$M + K$]; 1200.2 (100) [$M + Na$]; 1176.8 (75) [M]; 1117.0 (70) [$M - \text{AcOH}$]; 1007.5 (75) [$M - \text{SpOH}$]; 475 (50); 413.9 (30).

7.0 мг β -аномера (XIVb), выход 12% (16%, считая на прореагировавший диол (XIII)). R_f 0.66 (ГХМ, 4 : 2 : 2, исходный триогликозид (VI) в этой системе имел R_f 0.78); $[\alpha]_D^{+36.0^\circ}$ (*c* 0.9, CHCl_3). TOF-MS, m/z (*I*, %): 1218.1 (80) [$M + K$]; 1200.6 (100) [$M + Na$]; 1179.1 (50) [M]; 1012.0 (20) [$M - \text{SpOH}$]; 474.6 (20); 414.4 (50).

^1H -ЯМР-спектр α -аномера (XIVa): 1.729 (дд \approx т, 1H, H3a), 1.679, 1.817, 1.841, 1.868, 1.880, 1.911, 1.949, 1.959, 1.994 (10Ac), 2.457 (дд, 1H, $J_{3e,3a}$ 13.5, $J_{3e,4}$ 5, H3e), 3.659 (с, 3H, COOMe), 3.819 (в.м. 3H, H5, Gal; H5, H9b), 4.188 (дд, 1H, $J_{9a,8}$ 2.5, $J_{9a,9b}$ 12.5, H9a), 4.329 (ддд, 1H, $J_{2,1}$ 3.5, $J_{2,NH}$ 10, H2, GalNAc), 4.549 (д, 1H, $J_{1,2}$ 3.5, H1, GalNAc), 4.624 (ддд, 1H, H4), 4.549 (д, 1H, $J_{1,2}$ 8, H1, Gal), 4.842 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 10.5, $J_{3,4}$ 3.5, H3, Gal), 4.976 (м, 1H, $J_{2,3}$ 11, $J_{2,1}$ 8, H2, Gal), 5.138 (1H, H7), 5.187 (ддд, 1H, H8), 5.220 (дд, 1H, H4, Gal), 6.996 (д, 1H, $J_{NH,5}$ 10, NHAc), 8.659 (дд \approx с, 1H, NHCOCF_3).

^1H -ЯМР-спектр β -аномера (XIVb): 1.682 (дд \approx т, 1H, $J_{3a,3e}$ 13.5, H3a), 1.717, 1.813, 1.829, 1.860, 1.868, 1.872, 1.929, 1.971, 1.992 (10Ac), 2.264 (дд, 1H, $J_{3e,3a}$ 13.5, $J_{3e,4}$ 5, H3e), 3.644 (с, 3H, COOMe), 3.917 (дд, 1H, H9b), 4.346 (ддд, 1H, $J_{2,1}$ 3.5, $J_{2,3}$ 11, $J_{2,NH}$ 10, H2, GalNAc), 4.531 (дд, 1H, H9a), 4.545 (д, 1H, $J_{1,2}$ 3, H1, GalNAc), 4.600 (д, 1H, $J_{1,2}$ 8, H1, Gal), 4.866 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 10.5, $J_{3,4}$ 3.5, H3, Gal), 4.984 (ддд, 1H, H4), 5.024 (дд, 1H, $J_{2,1}$ 3.5, $J_{2,3}$ 10.5, H2, Gal), 5.234 (дд, 1H, H4, Gal), 5.252 (ддд, 1H, H8), 7.287 (д, 1H, $J_{NH,5}$ 10; NHAc), 8.677 (дд \approx с, 1H, NHCOCF_3).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетида-4-О-ацетил-2-дезоксид-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-галактопиранозил)-6-О-[метил(4,7,8,9-тетра-О-ацетил-5-ацетида-3,5-дидезокси- α -D-глицеро-D-галакто-2-нонанолипиранозил)онат]- α -D-галактопиранозид (XV). Раствор 2 мг (1.7 мкмоль) трисахарид (XIVa) в 100 мкл пиридина обрабатывали 50 мкл As_2O при комнатной температуре в течение 16 ч. К смеси добавляли 50 мкл воды и 50 мкл MeOH , упаривали, остаток подвергали КХ в градиенте изопропилового спирта в смеси хлороформ-гексан (1 : 2) и получали (XV). Выход 1.7 мг (82%). R_f 0.62 (ГХМ, 4 : 2 : 2).

^1H -ЯМР-спектр: 1.865 (дд \approx т, 1H, $J_{3a,3e}$ 12.5, $J_{3a,4}$ 12.5, H3a), 1.844, 1.938, 1.988, 1.997, 2.010, 2.054, 2.084, 2.031, 2.122 (11Ac), 1.880 (м, 2H, $-\text{CH}_2-$, Sp),

2.534 (дд, 1H, $J_{3e,4}$ 5, H3e), 3.350 (дд, 1H, $J_{6b,6a}$ 10.0, $J_{6b,5}$ 6, H6b, GalNAc), 3.480 (м, 3H, OCHa, NCHa, NCHb, Sp), 3.698 (дд, 1H, $J_{6a,5}$ 7, H6a, GalNAc), 3.740 (м, 1H, OCHb, Sp), 3.764 (с, 3H, COOMe), 3.844 (ддд \approx т, 1H, $J_4 < 1$, H5, GalNAc), 3.884 (дд, 1H, $J_{3,4}$ 3, $J_{3,2}$ 10.5, H3, GalNAc), 3.938 (ддд \approx т, 1H, $J_{5,6b}$ 6, $J_{5,4} < 1$, H5, Gal), 4.010 (дд, 1H, $J_{9b,8}$ 6, $J_{9b,9a}$ 12.5, H9b), 4.05 (м, H6b, Gal), 4.15 (м, 2H, H5, H6), 4.190 (дд, 1H, $J_{6a,5}$ 2, H6a, Gal), 4.324 (дд, 1H, $J_{9a,8}$ 3, H9a), 4.444 (ддд, 1H, $J_{2,1}$ 3.5, $J_{2,NH}$ 10, H2, GalNAc), 4.604 (д, 1H, $J_{1,2}$ 8, H1, Gal), 4.864 (ддд, 1H, H4), 4.890 (д, 1H, H1, GalNAc), 4.945 (дд, 1H, $J_{3,2}$ 10, $J_{3,4}$ 3, H3, Gal), 5.080 (д, 1H, $J_{NH,5}$ 10, NHAc), 5.092 (дд, 1H, H2, Gal), 5.262 (1H, $J_{7,6}$ 2, $J_{7,8}$ 8, H7), 5.32 (м, 2H, (H4, Gal), H8), 5.348 (дд, 1H, H4, GalNAc), 8.689 (дд \approx с, 1H, NHCOCF_3).

Авторы выражают благодарность А.С. Шашкову и Г.В. Затонскому (ИОХ РАН), И.В. Масленникову и А.Б. Тузикову за съемку спектров ЯМР, Ю.П. Козьмину – за съемку спектров TOF-MS, Т.В. Овчинниковой – за предоставленные дисахариды (VII и XII).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Симеоны Л.А., Байрамова Н.Э., Бовин Н.В. //Био-орган. химия. 1997. Т. 23. С. 753–762.
2. Fournet B., Fiat A.M., Alais C., Jolles P. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 576. P. 339–346.
3. Leppanen A., Korvuo A., Puro K., Renkonen O. // Carbohydr. Res. 1986. V. 153. P. 87–95.
4. Van Halbeek H., Strang A.-M., Lhermitte M., Rahmoune H., Lamblin G., Russel P. // Glycobiology. 1994. V. 4. P. 203–219.
5. Watkins W.M. // Biochem. Soc. Trans. 1987. V. 15. P. 620–624.
6. Galili U., Shohet S.B., Kobrin E., Stults C.L.M., Machler B.A. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 17755–17762.
7. Овчинникова Т.В., Тер-Григорян А.Г., Пазынина Г.В., Бовин Н.В. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 61–74.
8. Бовин Н.В., Землянухина Т.В., Хорлин А.Я. //Био-орган. химия. 1985. Т. 11. С. 1256–1264.
9. Бовин Н.В., Землянухина Т.В., Хорлин А.Я. // Био-орган. химия. 1986. Т. 12. P. 533–538.
10. Землянухина Т.В., Бовин Н.В., Байрамова Н.Э. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 299. С. 129–131.
11. Nifant'ev N.E., Tsvetkov Y.E., Shashkov A.S., Kononov L.O., Menshov V.M., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // J. Carbohydr. Chem. 1996. V. 15. P. 939–953.
12. Byramova N.E., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // Carbohydr. Res. 1992. V. 237. P. 161–175.
13. Paulsen H., Tietz H. // Angew. Chem. Int. Ed. 1982. V. 21. P. 927–928.

The Synthesis of Trisaccharides Neu5Ac(α 2 \rightarrow 6)[Gal(α 1 \rightarrow 3)]GalNAc α and Neu5Ac(α 2 \rightarrow 6)[Gal(β 1 \rightarrow 3)]GalNAc α as Protected Trifluoroacetamidopropyl Glycosides

L. A. Simeoni, N. E. Byramova[#], and N. V. Bovin

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

Protected sialo-containing trisaccharides, fragments of oligosaccharide chains of mucin glycoproteins, were synthesized. Regioselective sialylation of the primary hydroxyl group of (3-fluoroacetamidopropyl)-2-azido-2-deoxy-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl)- α -*D*-galactopyranosyl)- α -*D*-galactopyranoside with methyl ester of peracetyl- β -ethylthioglycoside of *N*-acetylneuraminic acid in the presence of *N*-iodosuccinimide and trifluoromethanesulfonic acid (or its trimethylsilyl ester) yielded 39 and 25% of α - and β -sialyl-(2 \rightarrow 6)biosides, respectively. Catalytic hydrogenolysis of the azide and benzyl groups of the α -anomer followed by *N*- and *O*-acetylation gave target trifluoroacetamidopropyl glycoside, Neu5Ac(α 2 \rightarrow 6)[Gal(α 1 \rightarrow 3)]GalNAc α -OSp, as a peracetate. An analogous coupling of the sialyl donor with (3-fluoroacetamidopropyl)-2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl)- β -*D*-galactopyranosyl)- α -*D*-galactopyranoside affords acetylated trifluoroacetamidopropyl glycoside Neu5Ac(α 2 \rightarrow 6)[Gal(β 1 \rightarrow 3)]GalNAc α -OSp in a yield of 15% and the corresponding Neu5Ac(β 2 \rightarrow 6)-anomer in a yield of 12%. After *O*-deacetylation and *N*-detrifluoroacetylation, these sialylbiosides can be used as ligands in preparing neoglycoconjugates.

Key words: *N*-acetylneuraminic acid, thioglycosides, sialylation, sialyloligoglycosides, SiaTn antigen, mucin

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: byramova@carb.siohc.ras.ru.