

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ*,†

Глава 1. Общие принципы химического синтеза неогликоконъюгатов‡

В данном разделе диссертации кратко рассмотрены наиболее широко используемые типы НГК, а также возможности, которые открывает их применение в биологии и медицине. Сформулированы современные представления о наиболее целесообразных подходах к химическому синтезу НГК, а также о тех аспектах, которые приходится принимать во внимание при его планировании. Особое внимание уделено выбору стратегии спейсеризации, определяемому задачей синтеза каждого типа НГК. Приведенные в данной главе представления о стратегии спейсеризации были сформулированы в ходе выполнения данной работы и частично являются результатом анализа и обобщения материала, изложенного в последующих главах, а частично основываются на результатах, полученных другими исследователями.

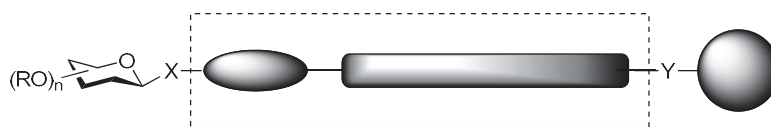


Рис. 1-1.[§] В структуре молекул НГК условно выделяют три части (см. также схему 1-1): 1) собственно углеводный фрагмент биологически значимого природного ГК (или его аналог), 2) носитель и 3) спейсер (или «мостик»). Шести- или пятичленный цикл обозначает моно- или олигосахаридный фрагмент.

Для направленного синтеза неогликоконъюгатов необходимо решение нескольких ключевых задач. Во-первых, необходимо синтезировать углеводные фрагменты биологически значимого гликоконъюгата, часто представляющие собой достаточно сложные олигосахариды. Во-вторых, необходимо осуществить функционализацию синтезированного олигосахариды. В третьих, необходимо выбрать подходящий «мостик» («спейсер»), соединяющий углеводный компонент с «носителем» (подробнее см. ниже). Наконец, в-четвертых, необходимо присоединить «спейсерированный» олигосахарид к тому или иному спейсеру и затем к «носителю».

* Структура всех полученных впервые соединений однозначно подтверждено методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C , двумерной корреляционной спектроскопии ЯМР $^1\text{H}-^1\text{H}$ и $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, а также масс-спектрометрией.

† Нумерация соединений, описанных в литературе, но не входящих в данную диссертацию, состоит из двух частей, разделенных точкой: римская цифра соответствует номеру главы, а следующая за ней арабская цифра – порядковому номеру литературного соединения в данной главе (например, VII.3). Соединения, входящие в данную диссертацию и описанные в публикациях автора по теме диссертации, обозначены арабскими цифрами и нумеруются последовательно без разбивки по главам (например, 153).

‡ Совместно с Й. Магнуссоном и др. [1] (здесь и далее приведены ссылки на публикации автора; фамилии всех соавторов см. в списке публикаций по теме диссертации).

В соответствии с этим при анализе возможных подходов к химическому синтезу неогликоконъюгатов, в структуре молекул последних условно выделяют три части (рис. 1-1 и схема 1-1):

1) собственно углеводный фрагмент (часто – лиганд углевод-узнающего «рецептора», обычно имеющего белковую природу), определяющий специфичность взаимодействия НГК с углевод-узнающими белками (ферментами, антителами, лектинами);

2) «носитель», под которым для упрощения обсуждения понимается не только традиционный полимерный носитель (растворимый или нерастворимый, в частности, поверхность), но и фармакофорный фрагмент физиологически-активного вещества (ФАВ, и в частности лекарства) или «метка»,** которая позволяет отслеживать локализацию НГК в тестовой системе, в том числе *in vivo*;

3) «спейсер» (или «мостик»), через который углеводный фрагмент соединяется с «носителем» и который обеспечивает доступность углеводного лиганда для взаимодействия с «рецептором».

1.1. Основные типы неогликоконъюгатов

Наиболее широко используемые типы НГК, подходы к их синтезу, а также возможности, которые открывает их применение в биологии и медицине, подробно обсуждены в исчерпывающих обзорах, к которым мы и отсылаем читателя.^{145,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243}

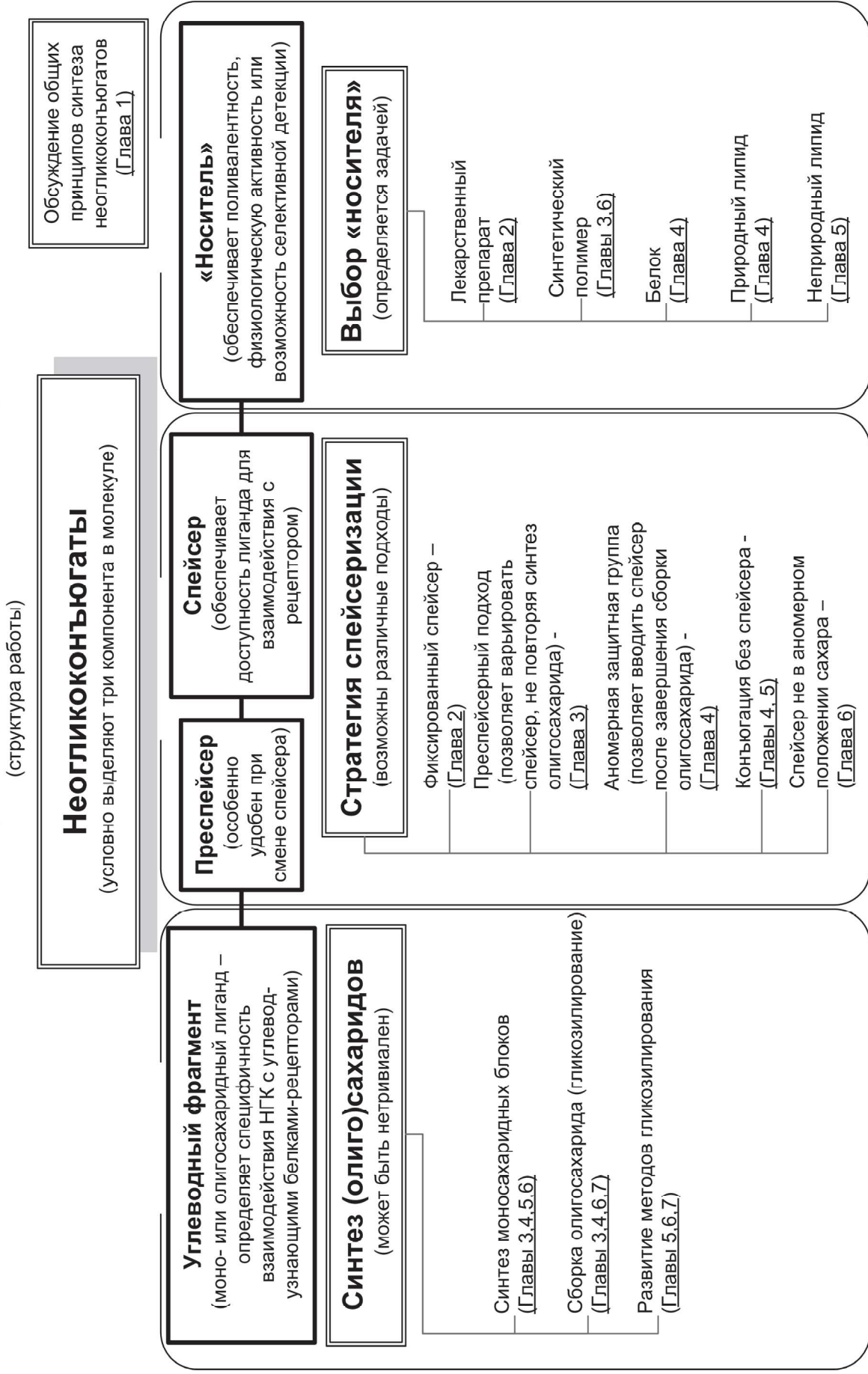
Для иллюстрации спектра возможных применений НГК здесь уместно будет упомянуть лишь следующие варианты НГК.

Неогликопротеины с природными сахарами. Полезны как иммуногены и для скрининга специфичности углевод-специфичных антител и клеток, как субстраты систем клиренса и захвата гликопротеинов (например, гепатоциты) или в качестве цитохимических маркеров. Обычно сахарид присоединяют к белку-носителю через неприродный спейсер. Потенциальное использование в качестве вакцин против инфекций и рака.

§ Рисунки, схемы и таблицы нумеруются в каждой главе независимо: номер состоит из двух частей, разделенных дефисом, – номера главы и последовательного номера объекта (рисунка, схемы или таблицы) в этой главе.

** Иногда для обозначения такого фрагмента НГК в русскоязычной литературе используют термины «зонд» или «проба»; использование последнего термина, на наш взгляд, неправильно и, по-видимому, связано с недоразумением (в англоязычной литературе в таких ситуациях употребляют термин “probe” – зонд).

Схема 1-1. Общие подходы к синтезу неогликоконъюгатов различных типов



Неогликопротеины с неприродными сахарами. Полезны как иммуногены в тех случаях, когда природный сахарид нестабилен или необходим повышенный иммунный ответ. Необходимо тщательно проверять перекрестные реакции продуктов иммунизации (антител, клеток) с природным сахаридом. Полезны в качестве ингибиторов при определении эпитопов связывания между сахаридом и лектином.

Неогликолипиды с природным или неприродным сахаридом. Полезны для нековалентного связывания сахаридов с искусственными поверхностями. Возможность создания на их основе липосом для иммунизации и для включения лекарств. Использование для определения эпитопов связывания бактерий, вирусов, антител или лектинов. Включение гликолипидов в мембраны живых клеток.

Неогликолипиды с неприродным липидом. Удобны для тонкой настройки образования липосом. Пригодны для ковалентного присоединения гликолипидов к носителям.

Гликохромофоры/гликофлуорофоры. Полезны для визуализации сахаридов, например, в тканях, при ВЭЖХ, на пластинках ТСХ и т.п. Пригодны для фотоаффинного мечения. В тех случаях, когда флуоресценция или окраска возникает в результате ферментативного расщепления гликозидной связи, возможна локализация соответствующих ферментов или количественное определение их активности.

Гликолекарства. Молекулы этих НГК содержат наряду с фармакофорным фрагментом физиологически-активного вещества (ФАВ) углеводный остаток. Такие НГК – углеводсодержащие фармацевтические препараты – получают с целью повышения растворимости лекарства в воде, для модификации его фармакокинетики и в последние годы для направленной доставки (гликотаргетинга или гликоадресования) лекарственных препаратов к специфическим клеткам и тканям, обладающим лектино-подобными свойствами.

Неогликополимеры с природным или неприродным сахаридом. Другое название – псевдополисахариды. Полезны в качестве иммуногенов, для характеристики антител, в исследовании клеточной адгезии, для аффинной хроматографии, а также в качестве зондов при анализе лектинов и т.п. Особый класс неогликополимеров – на основе защищенных производных углеводов – приобретает все большую значимость в последние годы для синтеза олигосахаридов на полимерных подложках (как нерастворимых, так и растворимых), что связано с большим прогрессом в разработке автоматических олигосахаридных синтезаторов (см. главу 6).

Гликочастицы с природным сахаридом. Полезны для аффинной очистки лектинов и антител, удаления нежелательных антител из кровотока пациента. Магнитные частицы особенно полезны при сортировке клеток и т.п.

Гликочастицы с неприродным сахаридом. Полезны для тонкой настройки силы связывания с лектином, что значительно упрощает десорбирование лектина с хроматографической колонки с аффинным сорбентом.

Гликоповерхности с природным или неприродным сахаридом. Полезны для количественных исследований связывания лектинов и микроорганизмов. Определение эпитопов связывания в лектинах и анти-углеводных антителах.

Гликочипы. В последние годы в связи с бурным развитием нанотехнологий большой интерес вызывает разработка миниатюрных (часто автоматизированных) систем, которые были бы способны имитировать биологические свойства природных ГК и в то же время позволять параллельный скрининг большого числа образцов или мониторинг микро- и нано-систем в реальном времени.

1.2. Выбор носителя зависит от задачи

В зависимости от предполагаемой области применения НГК углеводный фрагмент присоединяют к соответствующему носителю и получают НГК различных типов. Рассмотрим более детально их достоинства и ограничения.

1.2.1. Неогликополимеры в широком смысле слова

Так, если предполагается использовать НГК, например, в качестве аналога природного гликопротеина в иммунохимических тестах (и в большинстве других гликобиологических исследований), то синтезируемый НГК должен обладать поливалентностью (мультивалентностью),^{206,238,239,240,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255} т.е. к носителю необходимо присоединить несколько идентичных углеводных остатков, определяющих углеводную специфичность НГК. Самое простое (на первый взгляд) решение – присоединить углеводные фрагменты к полимеру с образованием *неогликополимеров*. Различают несколько типов неогликополимеров.

1.2.1.1. Неогликопротеины

Традиционное и самое распространенное решение – присоединение углеводных детерминант к белковому носителю (рис. 1-2) с образованием неогликопротеинов (НГП).^{211,214,218,224,226,231,233} Преимущества – наиболее близкое подобие НГК природному гликопротеину, обычно высокая иммуногенность, связанная с присутствием белкового носителя (т.е. НГП – перспективные кандидаты на роль углеводных вакцин^{145,158,166,170,172,183,184,185,193,195,198,199,200,201,225,239}), которую часто можно модулировать адекватным подбором белкового носителя. Недостатки НГП являются следствием их

достоинств: в иммунологическую специфичность вносит свой вклад белковый носитель – антитела против НГП дают перекрестные реакции с белковыми антигенными детерминантами, что приемлемо не во всех случаях. Так, например, при использовании НГП в качестве диагностических препаратов белковые детерминанты НГП вносят свой вклад в иммуногенность, и НГП могут давать ложноположительный ответ даже тех в случаях, когда в тестовой системе отсутствуют углевод-узнающие белки.

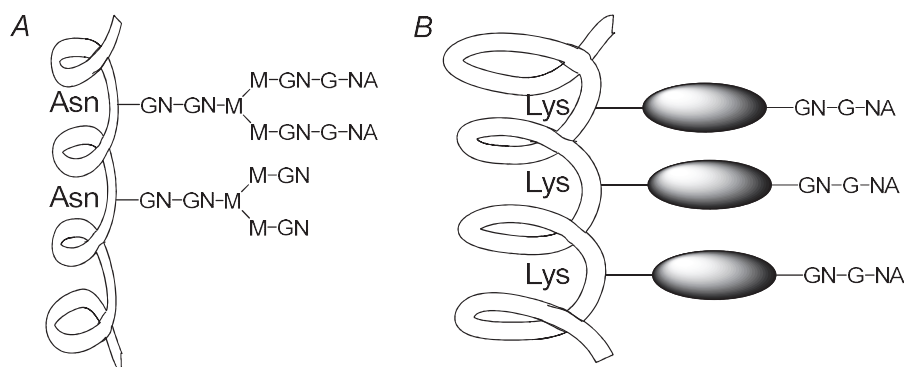


Рис. 1-2. Сходства и различия в строении гликопротеинов (А) и неогликопротеинов (В): 1) микрогетерогенность углеводных цепей природного гликопротеина, 2) углеводные цепи присоединены к различным типам аминокислотных остатков (например, Asn и Lys), 3) в состав неогликопротеина обычно включают более короткие терминальные фрагменты олигосахаридных цепей, присутствующих в природном гликопротеине, 4) полипептидные цепи (обозначены волнистыми линиями) могут существенно различаться по составу и строению в гликопротеинах и неогликопротеинах, 5) количество олигосахаридных цепей на одной полипептидной цепи может различаться в гликопротеинах и неогликопротеинах. Обозначения моносахаридных остатков: GN – N-ацетилглюкозамин, M – манноза, G – галактоза, NA – N-ацетилнейраминная кислота. Темный овал обозначает спейсер.

Необходимо отметить, что в последнее десятилетие все больше появляется работ, направленных на получение чисто синтетических «гомогенных гликопротеинов» (рис. 1-3), которые содержат точно определенные углеводные структуры, присоединенные к определенным аминокислотным остаткам «нативных» белков, являющихся компонентами природных гликопротеинов. По нашему мнению, такие структуры, несмотря на их существенные отличия от «классических» неогликопротеинов (рис. 1-2), в которых углеводные фрагменты случайным образом присоединены к специально отобраным «белкам-носителям»^{226,233} через остатки лизина, аспарагиновой или глутаминовой кислот, тирозина или цистеина (или через N-/C-терминальные аминокислоты),²³³ в большинстве своем все-таки правильнее классифицировать как неогликопротеины, т.к. для соединения олигосахарида с полипептидной цепью используются разнообразные *неприродные* типы связей. При этом олигосахаридный фрагмент может быть получен как химическим синтезом, так и с использованием ферментов (наиболее часто используют комбинированные химико-ферментативные подходы к синтезу олигосахаридов); известны также примеры конъюгации олигосахаридов, выделенных из природных источников. Белковый компонент таких

конструкций может быть выделен из природных источников (и использован для конъюгации после отщепления всех углеводных заместителей), получен методами генной инженерии (рекомбинантные белки) и/или «сшиванием» (химической лигацией) пептидных фрагментов, полученных с помощью автоматических пептидных синтезаторов (или комбинацией этих подходов). В то же время, необходимо подчеркнуть, что за последние 5 лет успешно завершены синтезы нескольких природных гликопротеинов, идентичных по строению природным объектам, в том числе полностью функционального фермента рибонуклеазы С.^{256,257} В таких случаях употребление термина *неогликопротеин*, на наш взгляд, уже неуместно, т.к. речь идет о природных соединениях. Более подробно с этим направлением исследований можно ознакомиться в соответствующих обзорах и публикациях.^{239,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282}

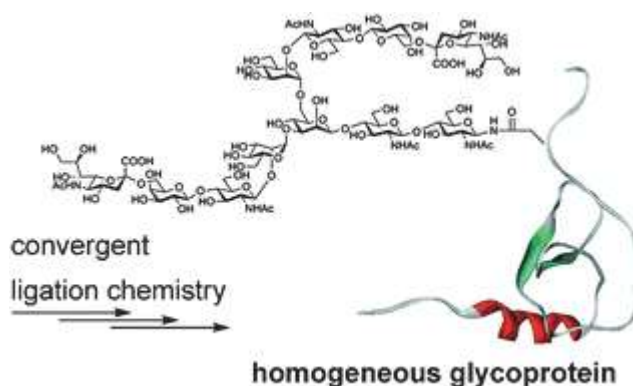


Рис. 1-3. Гомогенные синтетические гликопротеины, (почти) идентичные по строению природным объектам, в последнее время становятся все более доступными. Источник изображения – ссылка²⁷⁸.

1.2.1.2. Синтетические неогликополимеры

Неогликополимеры, в которых углеводные фрагменты присоединены в синтетическому полимеру,^{226,227,228,229,230,231,233,234,238,239,242,283,284} лишены многих недостатков внутренне присущих неогликопротеиновым искусственным антигенам, в которых неизбежно присутствуют белковые эпитопы. Синтетические неогликополимеры* часто используются для детальной характеристики поликлональных антител, выработанных против НГП, и изучения углевод-белковых взаимодействий.^{227,234} К сожалению, в большинстве случаев синтетические неогликополимеры не обладают иммуногенностью и поэтому не могут быть использованы для иммунизации и создания вакцин.

Для получения полиакриамидных неогликоконъюгатов сополимерного типа возможны два принципиально различных подхода, каждый из которых обладает как достоинствами,

* В данном обзоре мы ограничимся рассмотрением гликополимеров на основе полиакриламида, имеющих непосредственное отношение к данной работе (см. главу 3).

так и недостатками, основанных либо на полимераналогичных превращениях* уже сформированного полимера,^{228,234,283,284} либо на сополимеризации мономеров,^{224,226,233} один из которых содержит конъюгируемый фрагмент (схема 1-2).

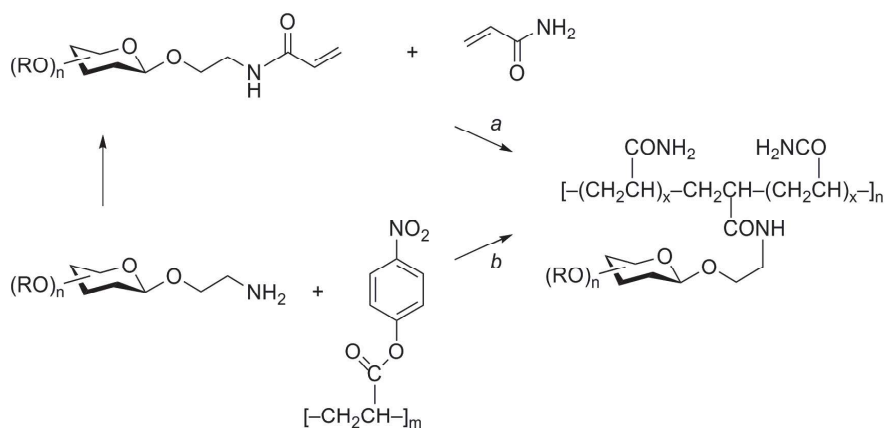


Схема 1-2. Два пути синтеза НГК сополимерного типа из общего предшественника с агликоном-преспейсером. **Реагенты и условия:** *a.* (NH₄)₂S₂O₈, Me₂NCH₂CH₂NMe₂, H₂O, ~20 °С; *b.* 1. Et₃N, DMSO, 40 °С; *b.* NH₃, DMSO, ~20 °С.

В наиболее распространенном в настоящее время подходе используют трансформацию активированного производного уже сформированного полимера (обычно – поли(нитрофенилакрилата)), которое вводят в реакцию с конъюгируемым фрагментом, содержащим аминогруппу (обычно это – терминальная аминогруппа в агликоне моно- или олигосахарида или другого конъюгируемого лиганда).^{226,228,234,283,284} Основными преимуществами этого подхода является крайне высокая эффективность присоединения (реакция протекает с количественным выходом) аминоксодержащих соединений к активированной полиакриловой кислоте и возможность получения полимеров, содержащих одновременно различные конъюгированные фрагменты в произвольно задаваемых и точно определенных соотношениях. Как следствие высокой эффективности возникает возможность проведения реакции конъюгирования с полимером в микромасштабах, что позволяет получать неогликополимеры из очень малых количеств (требуется не более 1 мг) труднодоступных углеводных структур (как синтетических, так и, что более важно, выделенных из природных источников).²⁸⁴ Единственное обязательное условие – наличие в молекуле конъюгируемого соединения только одной первичной аминогруппы.

* Полимераналогичные превращения – химические реакции функциональных групп макромолекул или отдельных атомов основной цепи полимера, в ходе которых длина и строение скелета цепи сохраняются, но изменяются состав и строение боковых групп.

1.2.1.3. Гликокластеры и гликодendrимеры

Эти типы неогликоконъюгатов качественно сходны между собой, и поэтому их удобно рассматривать вместе.²⁰⁷ Архитектура кластерных НГК (рис. 1-4)^{61,207,231,236,239,285,286,,287288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301} и гликодendrимеров (рис. 1-5)^{182,207,231,239,233,239,296,302,303,304,305,306} предполагает разветвление основной цепи с образованием «ветвей», на которых и расположены углеводные фрагменты. Разница скорее в количественном отношении: в гликокластерах число ветвей (и значит, поливалентность НГК) измеряется единицами (3–5 в зависимости от природы «матрицы»*, к которой присоединяются «ветви»), в то время как дендримеры вследствие своей полимерной природы[†] могут содержать десятки углеводных остатков в молекуле. Следует подчеркнуть, что вследствие метода синтеза дендримеры представляют собой монодисперсные системы.

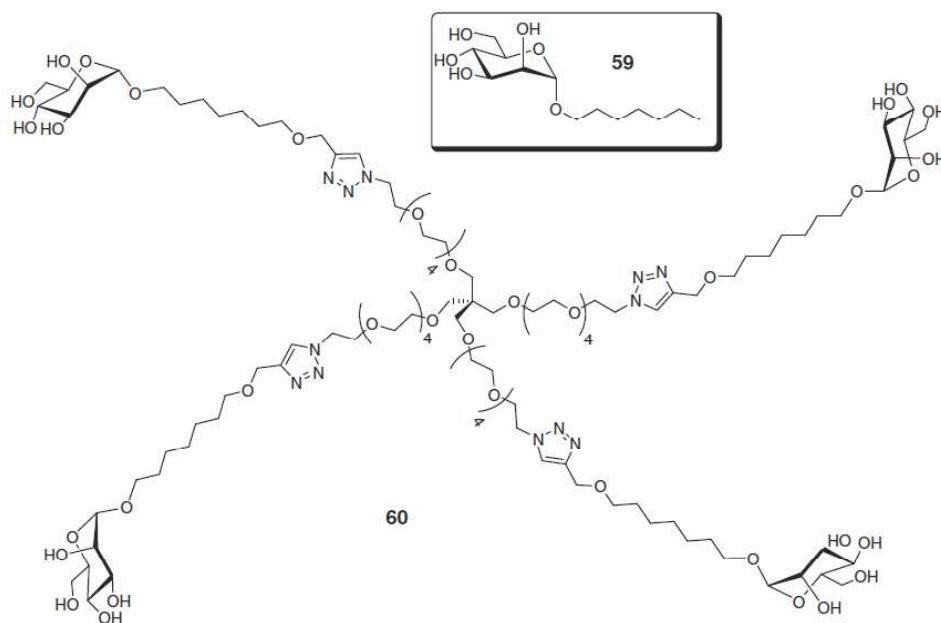


Рис. 1-4. Тетравалентный гликокластер маннозы – эффективный лиганд для ингибирования связывания *E.coli* с клетками мочевого пузыря мышей.³⁰⁷ Источник изображения (и шифров соединений на этом рисунке) – ссылка²³⁹.

* В последние годы в русскоязычной литературе часто употребляют термин «скаффолд», – от англ. scaffold – основа или то, что несет на себе нагрузку.

† Дендримеры – высоковетвистые полимеры, в которых разветвления достигаются за счет присутствия в молекуле регулярно повторяющихся разветвленных фрагментов – дендронов.

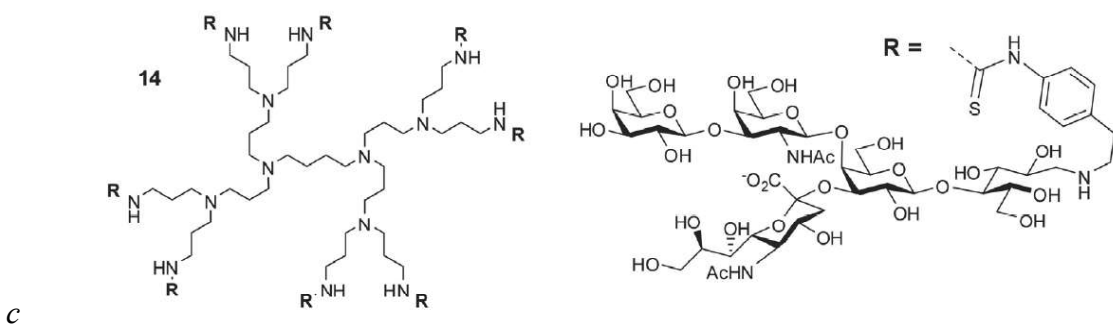
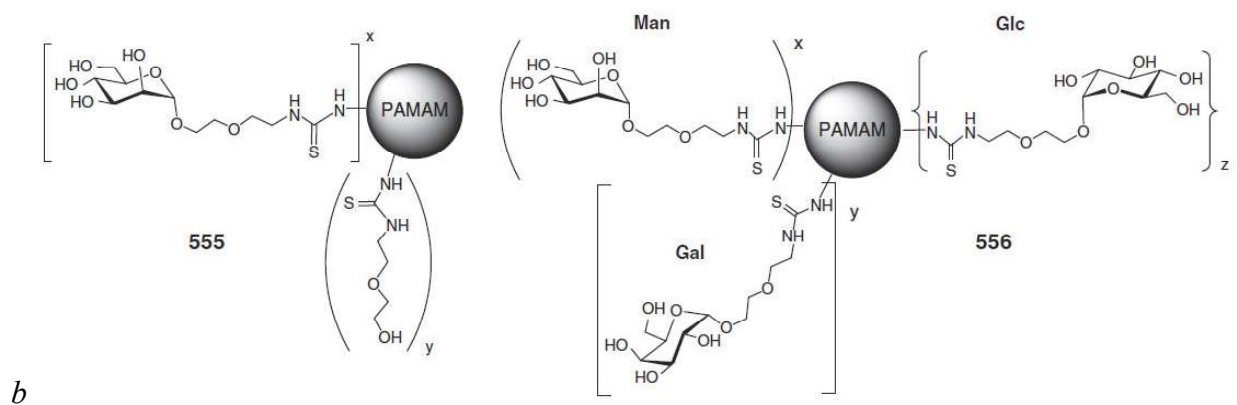
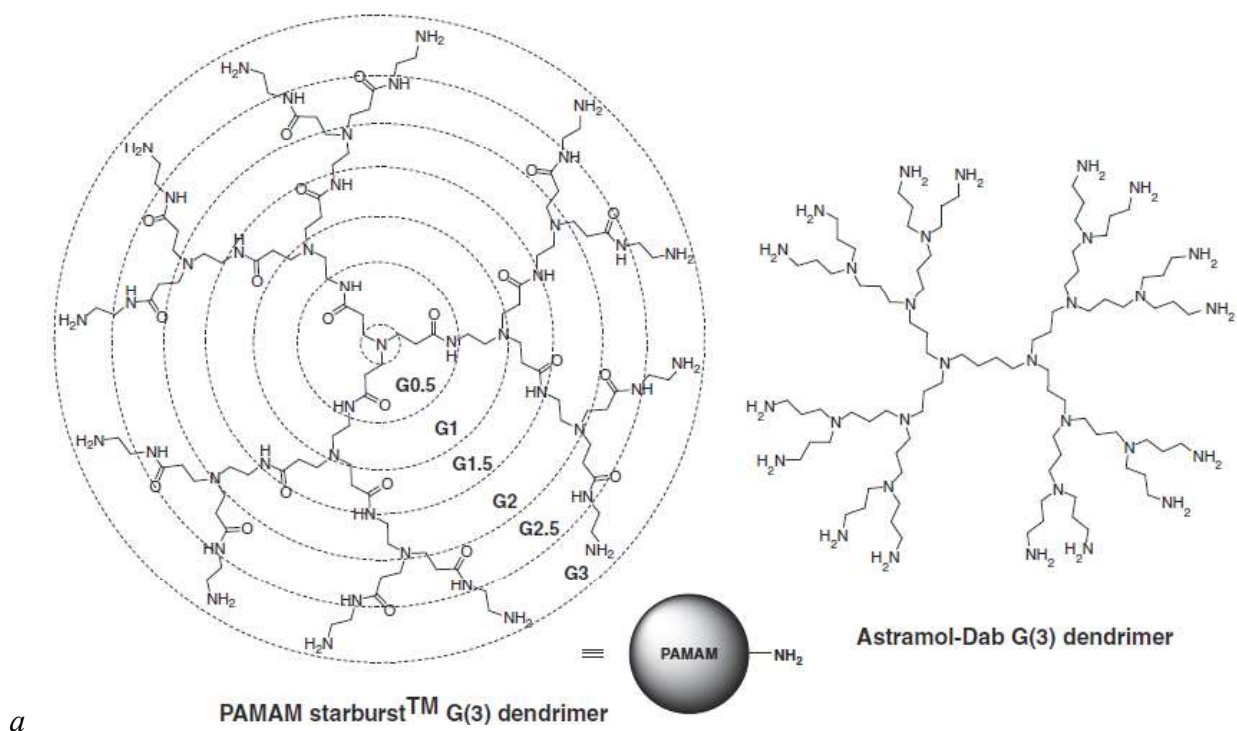


Рис. 1-5. Структура коммерчески доступных дендримеров с ПАМАМ (слева) и полипропилениминовым корами (справа), содержащих аминогруппы, пригодные для модификации углеводными остатками (а). Пример гетерофункционального гликодендримера с ПАМАМ кором (b) и дендримера полипропилениминовым кором и пентасахаридом GM₁ в качестве углеводного лиганда, способного ингибировать адгезию шига-токсина к клеткам (c). Источник изображения (и шифров соединений на этом рисунке) (a) – ссылка,²³⁹ (b) – ссылка,^{239,308,309} (c) – ссылка.²⁹⁴

синтетическим полимерам (например, частицам латекса, зернам шитого пористого полимера или поверхностям, несущим реакционноспособные функциональные группы; см. также раздел 1.2.1.6, посвященный гликочипам)^{224,237,243} или к самоорганизованным монослоям функционализированных алкантиолов на поверхности золота (рис. 1-7 и рис. 1-8).^{314,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331}

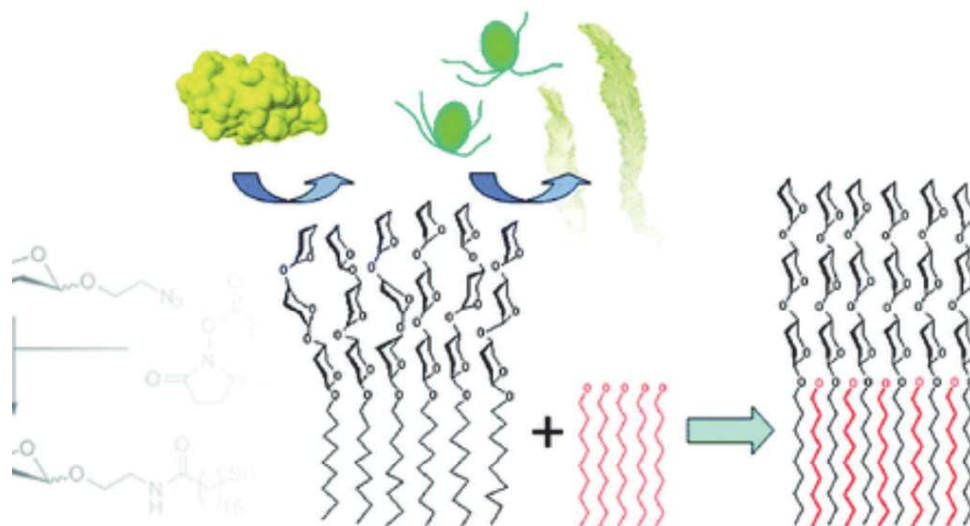


Рис. 1-8. Самоорганизованные монослои гликозилированных алкантиолов на поверхности золота. Источник изображения – ссылка³³⁰.

Последние являются основой современного подхода к изучению кинетики и термодинамики непосредственного взаимодействия различных молекул и объектов нанодиапазона (в том числе биомолекул, например, белков) в режиме реального времени без необходимости предварительного мечения участников реакции (в том числе углеводов с белками), реализованного в коммерческих приборах серии *BiaCore* (GE Healthcare).^{332,333}

1.2.1.6. Гликочипы

Гликочип* – это миниатюрное устройство, на котором размещено множество углеводных структур (лигандов), с помощью которых можно анализировать различные биологические жидкости. Гликочипы могут быть двумерными (2D) или трехмерными (3D). В первом случае лиганды сорбционно (схема 1-3) или химически (схема 1-4) закреплены на специально обработанной стеклянной или иной поверхности. В 3D-гликочипах на основе гидрогелей лиганды равномерно распределены по всему объему капли геля. По сути, 2D-гликочип – это вариант гликоповерхности; менее распространенные 3D-гликочипы можно условно отнести к комбинированному типу гликочастицы/гликоповерхности. Вследствие крайне высокой популярности этого типа

* В англоязычной литературе используются термины ‘glycan arrays’ и ‘carbohydrate microarrays’.

НГК гликочипы обсуждаются в отдельном разделе данной главы.^{239,334,335,336,337,338,339,340,341, 342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360}

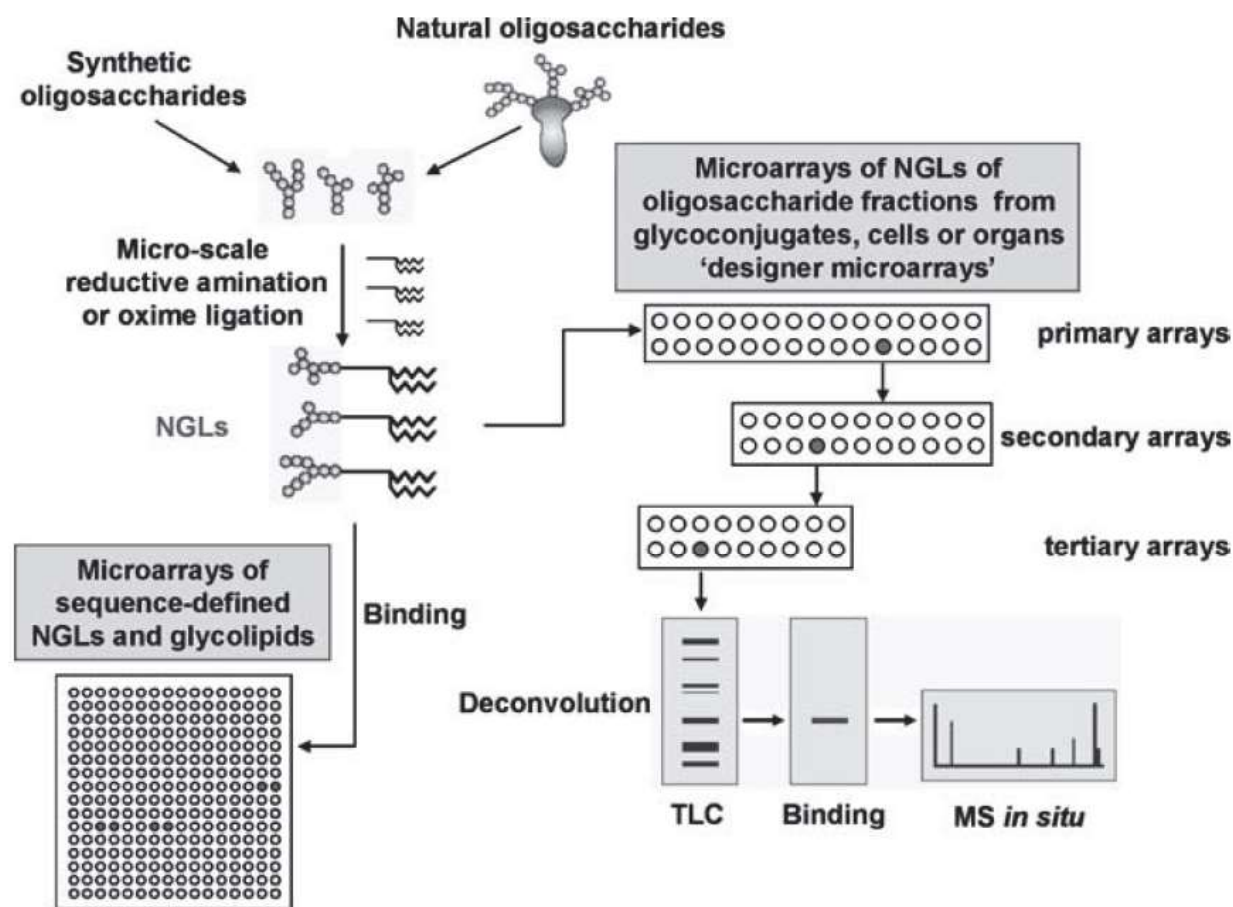


Схема 1-3. Схема приготовления гликочипов на основе негликолипидных зондов, полученных из природных или синтетических олигосахаридов (схема 1-5), и их использование для установления структур олигосахаридов, связывающихся с белками. Источник изображения – ссылка³⁴⁵.

Гликочипы, впервые предложенные в 2002 г., уже завоевали себе прочное место среди других средств изучения углевод-белковых взаимодействий и вышли из стадии прототипов, призванных продемонстрировать работоспособность идеи, превратившись в надежные гликобиологические инструменты для скрининга, обладающие большим потенциалом. На одном чипе* можно разместить сотни^{†,338,339,361} и даже тысячи гликанов, что позволяет параллельно анализировать их взаимодействия с углевод-связывающими белками, такими как лектины С-типа, сиглеки, галектины, антиуглеводные антитела, присутствующие в различных объектах (например, плазме крови), лектины из растений и

* Используется также термин «слайд» (“slide”).

† Консорциум функциональной гликомики (Consortium for Functional Glycomics, CFG) еще в 2004 г. создал гликочип, доступный для публичного использования и содержащий 200 углеводных структур, как синтетических, так и выделенных из природных источников, которые являются представительной выборкой типичных гликанов гликопротеинов и гликолипидов. Репертуар гликановых структур на гликочипах был в дальнейшем расширен до 610 гликановых структур млекопитающих (версия 5.1, 2012 г.) и 96 полисахаридных структур микробных патогенов (версия 1.0, 2008 г.) (<http://www.functionalglycomics.org>).

микробов, и даже с интактными вирусами и клетками, получая огромное количество информации за очень небольшое время.

Важными обстоятельствами являются миниатюрность гликочипов и минимальные количества гликанов, необходимых для их приготовления. Так, для практического конструирования гликочипов достаточны пикомольные количества олигосахаридов, которые могут быть выделены с помощью аналитической ВЭЖХ, например, из гликопротеинов. Это существенно снижает требования к количеству анализируемого образца (например, 1 мкл и меньше), и существование коммерчески доступного оборудования для автоматизации процессов как приготовления гликочипов, так и их использования в анализе, что делает использование гликочипов крайне конкурентоспособным в сравнении с альтернативными аналитическими методами.

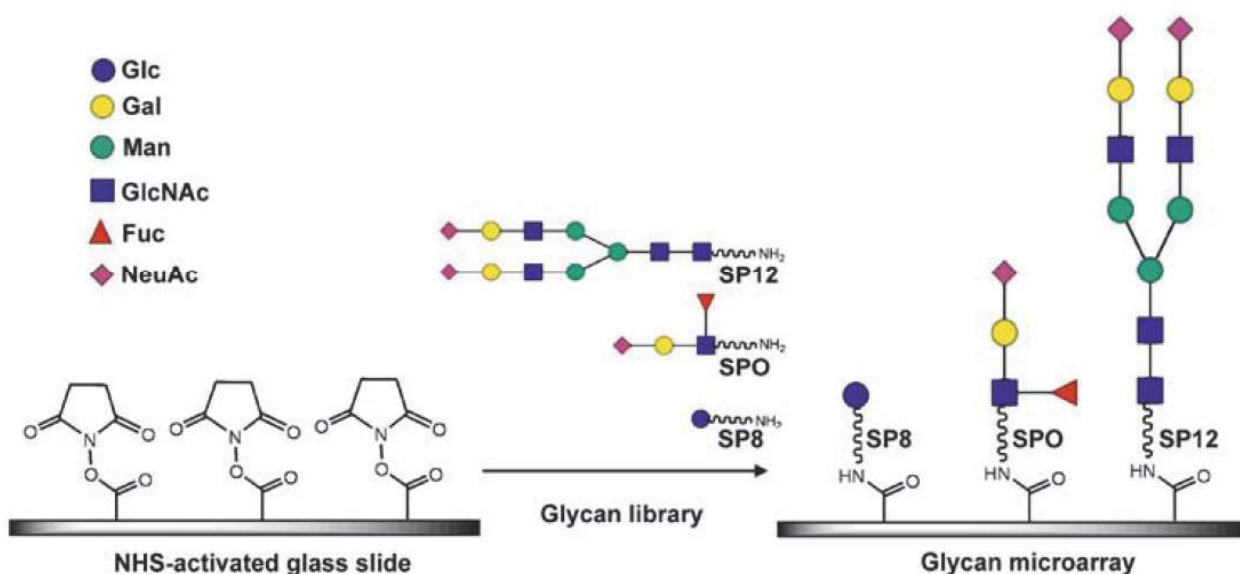


Схема 1-4. Приготовление гликочипа путем ковалентной иммобилизации гликанов с терминальной аминогруппой в агликоне на коммерчески доступных стеклянных слайдах, содержащих активированные сложноэфирные группы (NHS). Линкеры: SP0 = $-(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, SP8 = $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, SP12 = Asn.³⁶¹ Источник изображения – ссылка³⁴⁵.

Для химической иммобилизации³⁶² на чипе с активированными *N*-оксисукцинимидильными (NHS) сложноэфирными группами или алкинильными группами, привязанными к поверхности, были использованы^{*,334,361} как синтетические спейсерированные олигосахариды с функциональной (амино или азидо) группой в терминальном положении агликона, так и олиго- и полисахариды, выделенные из природных источников, которые были предварительно дериватизированы (схема 1-4).^{338,339} Из множества известных методов^{227,237,239,264,266,356} дериватизации восстанавливающих сахаров в данном контексте особо стоит отметить гидроксилламинную

* Мы сознательно ограничиваем рассмотрение синтеза гликочипов только результатами работы Консорциума функциональной гликомики, исключая при этом подход, основанный на иммобилизации биотинилированных производных сахаров (первое поколение гликочипов).

методологию,³⁶³ основанную на превращении полуацеталей сахаров в *N,O*-диалкиламинопериодические, которая позволяет осуществлять эффективную иммобилизацию микрограммовых количеств восстанавливающих гликанов. Особенно перспективным является использование бифункционального спейсерирующего реагента, содержащего одновременно фрагмент *N*-метилгидроксиламина и первичную аминогруппу.³⁶⁴

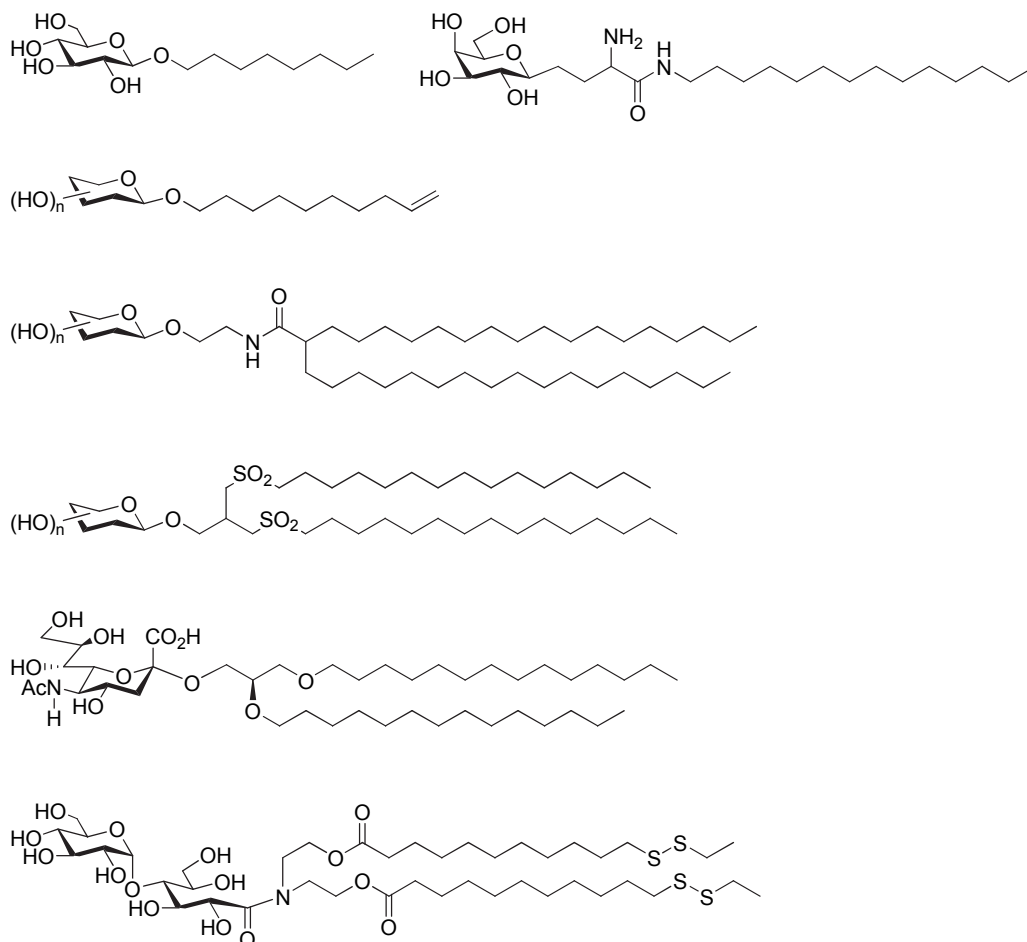


Рис. 1-9. Типичные примеры неогликолипидов. Изображение из ссылки²³³ модифицировано. Шестичленный цикл с неопределенными заместителями обозначает моно- или олигосахаридный фрагмент.**1.2.2.**

Неогликолипиды и гликолипосомы

К этому классу относятся НГК, в которых углеводные фрагменты ковалентно присоединены к липидным фрагментам,^{214,218,219,224,226,228,233,234,239} что дает возможность для их иммобилизации на гидрофобных поверхностях с образованием гликоповерхностей и гликочипов (см. схема 1-3, схема 1-5 и рис. 1-9, а также разделы 1.2.1.5 и 1.2.1.6). На основе неогликолипидов (НГЛ) могут быть созданы липосомы для иммунизации и для включения лекарств. В последние 20 лет появились работы по применению гликолипосом для углевод-опосредованного направленного транспорта лекарств (и других ФАВ)^{144,145,147,148,149,150,153,154,155,158,160,163,171,181,186,189,239,365,366,367,368} или терапевтических генов

(рис. 1-10)^{164,180,187,239,369,370,371,372,373,374,375,376} при генной терапии к определенным тканям организма (например, в раковые опухоли).

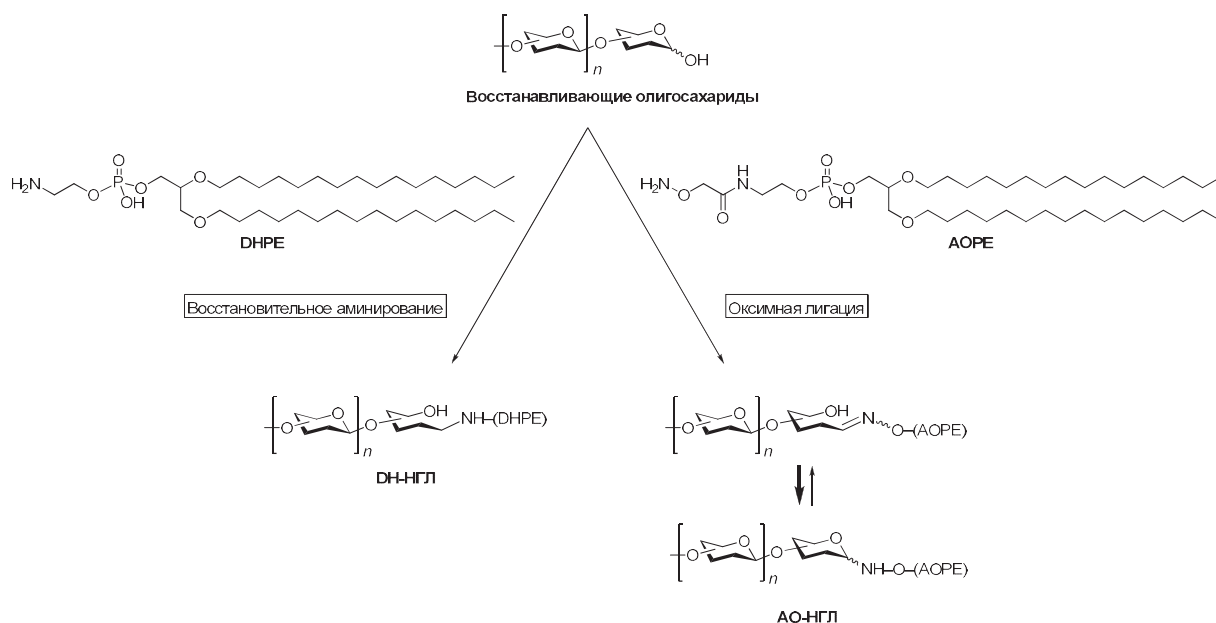


Схема 1-5. Схема приготовления неогликолипидных (НГЛ) зондов из восстанавливающих олигосахаридов путем восстановительного аминирования и оксимной лигации, которые приводят к НГЛ с раскрытым (DH-НГЛ) и циклическим (AO-НГЛ) моносахаридным остатком на восстанавливающем конце, соответственно. Изображение из ссылки³⁴⁵ модифицировано.

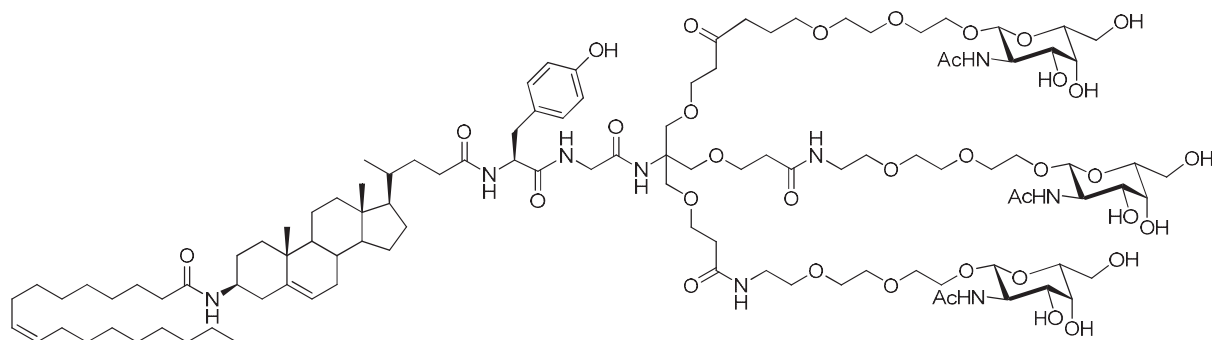


Рис. 1-10. Структура неогликолипида, способного эффективно связываться с асиалогликопротеиновым рецептором ($K_d = 2.1 \pm 0.3$ нМ) и осуществлять направленную доставку липосом на его основе в клетки печени. Источник изображения – ссылка³⁷¹.

1.2.3. «Меченые» НГК

К этому классу относятся НГК, дополнительно содержат «метку» (например, флуоресцентную или биотиновую), присутствие которой в молекуле НГК позволяет отслеживать локализацию флуоресцентно- или биотин-меченых НГК в тестовой системе (например, в живых клетках, см. схемы 1-6 и 1-7)^{377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394} или повысить чувствительность его детекции при хроматографии.^{395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405}

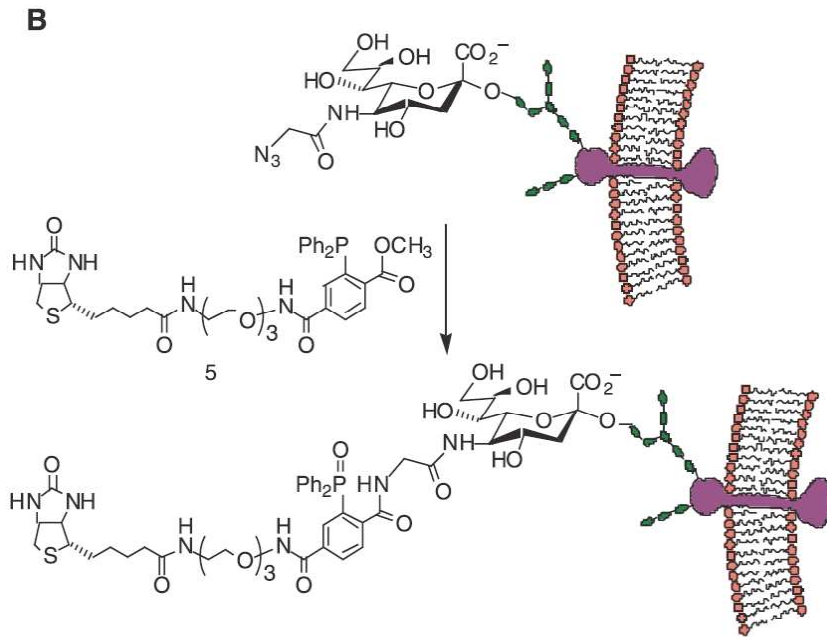


Схема 1-6. Реакция биотитнированного фосфина с азидо-содержащей сиаловой кислотой на поверхности живой клетки, что приводит к селективному мечению сиаловых кислот. Источник изображения (и шифров соединений на этом рисунке) – ссылка³⁷⁷.

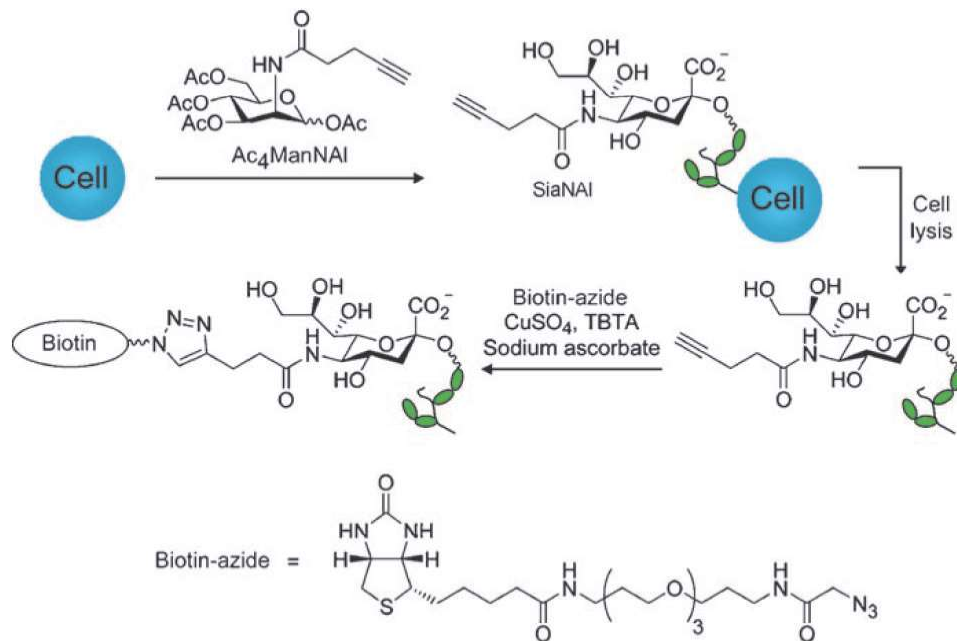


Схема 1-7. Метаболическое мечение клеточных гликанов *N*-пентинойлманнозамином и присоединение азидо-содержащего производного биотина к клеточной поверхности «клик»-реакцией. Источник изображения – ссылка³⁷⁹.

1.2.4. Гликолекарства

К этому классу относятся НГК, в которых углеводные фрагменты присоединены к фармацевтическим препаратам. Это делается для повышения растворимости лекарства в воде, для модификации его фармакокинетики и в последние годы для углевод-опосредованной направленной доставки (таргетинга) ФАВ к специфическим клеткам и органам^{144,145,147,148,149,150,152,153,154,155,156,158,160,163,164,165,168,169,170,171,175,178,180,181,186,187,188,189,192,194,}

201,205,206,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376 (см. также разделы 1.2.2 и 2.1). Ссылки на использование НГК в качестве вакцин см. раздел 1.2.1.1.

1.3. Выбор места присоединения носителя к олигосахариду

Выбор места (сайта) присоединения «носителя» (в широком смысле) к углеводу (обычно олигосахариду) определяется тем, как предполагается использовать НГК. Носитель можно присоединять в любое положение сахара, кроме аномерного, если нужно моделировать свойства группировок сахара, расположенных в аномерном положении (например, способность сахара гликозилировать, т.е. выступать в качестве гликозил-донора). Этот вариант используется в тех случаях, когда стоит задача синтезировать полимерный гликозил-донор.*

Присоединение носителя к аномерному положению предпочтительнее, если нужно моделировать свойства терминального фрагмента олигосахарида (это наиболее важно при узнавании углеводов лектинами и антителами). В данной главе мы будем рассматривать только этот более распространенный тип присоединения углевода к носителю. Для реализации такого варианта в аномерном положении сахара должен находиться функционализированный агликон, который может быть инкорпорирован в ходе синтеза олигосахарида или присоединен к невосстанавливающему олигосахариду (не содержащему защитных групп), как полученному синтетически, так и выделенному из природных источников.

Введение агликона-спейсера в аномерное положение немодифицированных (природных) сахаров[†] является в настоящее время хорошо разработанной областью,^{227,237,239,264,356,363,364} обсуждение которой выходит за рамки данной работы, посвященной химическому синтезу НГК. При последующем обсуждении мы будем неявно предполагать, что речь идет о введении агликона-спейсера в ходе химического синтеза олигосахарида.

1.4. Выбор типа будущей связи с носителем

При синтезе НГК необходимо решить еще один важный вопрос – какую функциональную группу использовать для связывания с носителем.

* Именно так мы поступили при синтезе первого сиалил-донора, иммобилизованного на полимере (см. главу 6).

[†] Часто говорят о дериватизация восстанавливающих сахаров.

Из большого набора вариантов присоединения к носителю наиболее широкое распространение получили подходы,^{224,227,233,234} основанные на создании амидной связи.^{406,407,408} И это неудивительно, т.к. методы создания амидных (пептидных) связей относятся к числу наиболее хорошо разработанных; многие из новых подходов, предложенных для синтеза пептидов, находят применение в синтезе НГК. Выбор группы в агликоне-спейсере (амино- или карбоксильная группа) часто диктуется типом функциональных групп, присутствующих в олигосахаридной части (ср., например, уроновые, сиаловые кислоты и аминоксахара), – они должны быть ортогональны⁴⁰⁹ между собой.

Особым вариантом присоединения через амидную связь, получившим большую популярность в последнее время, является использование производных квадратной кислоты в качестве «сшивающих» агентов, что позволяет объединить в одной молекуле два различных фрагмента со свободными аминогруппами (схема 1-8).^{201,313,410,411,412,413,414, 415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426}

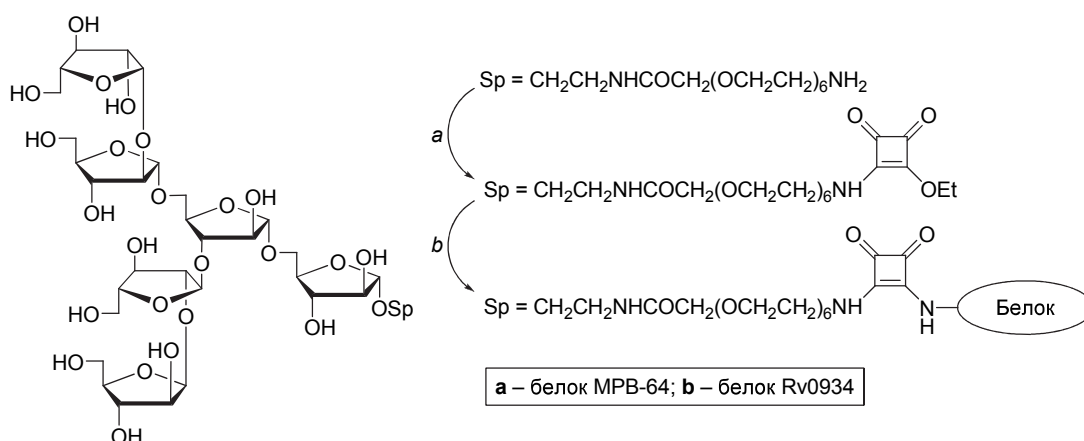


Схема 1-8. Использование «сквартной» химии для синтеза ковалентных конъюгатов терминального гексаарабинофуранозидного фрагмента липоарабиноманнана *Mycobacterium tuberculosis* с рекомбинантными белковыми антигенами MPB-64 и Rv0934 *M. tuberculosis* для использования в качестве антигенов для серодиагностики туберкулеза. **Реагенты и условия:** *a.* диэтилскварт, H₂O, pH 7.5, хроматография на Sep-Pak C18; *b.* белок **a** или **b**, pH 9; диализ. Источник изображения – ссылка⁴²⁷.

Возможно создание тиоэфирной связи для соединения с носителем. Обычно сопряженная (например, замещенный малеимид или акриламид) или несопряженная двойная связь расположена в агликоне-спейсере, а тиол – на «носителе» (например, меркаптогруппа остатка цистеина); известно и альтернативное расположение реагирующих групп.^{218,221,227,233,235,237,239} Кроме того тиол-содержащие «носители» можно связывать со спейсеризованными олигосахаридами дисульфидными связями (схема 1-9).^{233,235} Если для присоединения к «носителю» предполагается использовать реакцию

1,3-диполярного циклоприсоединения азидов к терминальным алкинам,^{*,379,381,383,384, 387,389,390,391,393,394,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452} то следует иметь в виду, что триазольный мостик может быть успешно создан как в случае присутствия азидного, так и алкинового компонента в агликоне-спейсере (см. схемы 1-6 и 1-7 в разделе 1.2.3).

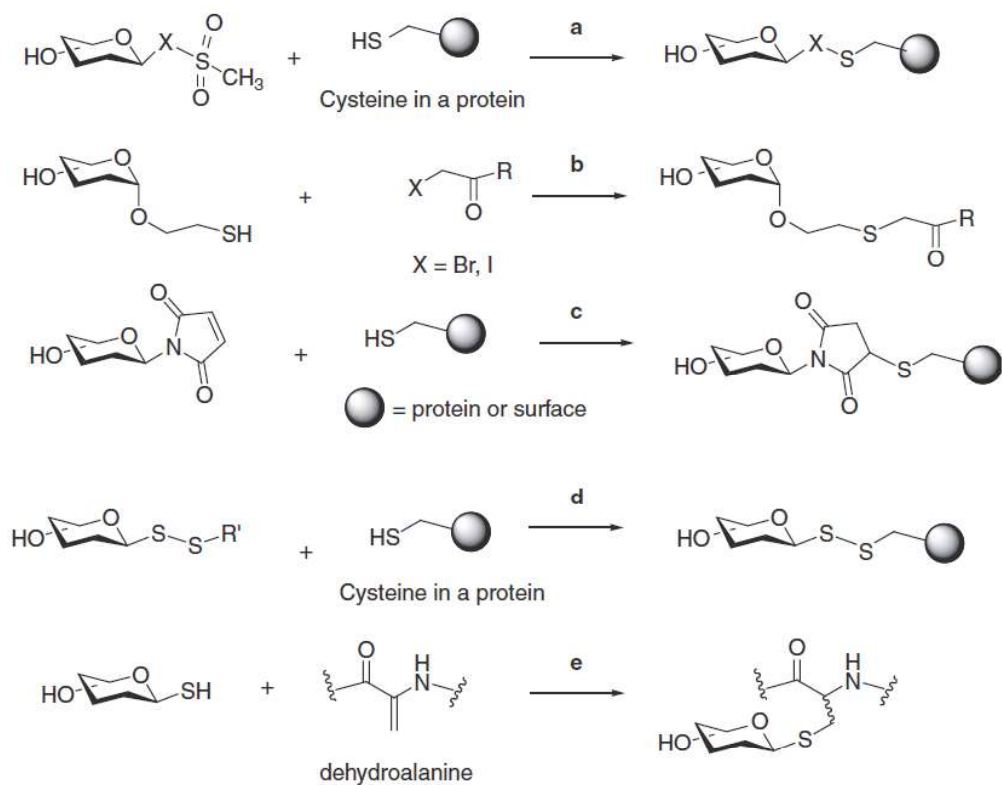


Схема 1-9. Создание тиоэфирной или дисульфидной связей для соединения с носителем. Источник изображения – ссылка²³⁹.

1.5. Синтез олигосахаридов с функционализированным агликоном

1.5.1. Выбор типа межсахаридной связи в олигосахаридной части НГК и для присоединения олигосахарида к агликону-спейсеру

Обычно моносахариды в олигосахаридной части НГК соединены между собой природными O-гликозидными связями. Этот тип связи также чаще всего используют и для присоединения олигосахарида к агликону-спейсеру. Следует подчеркнуть, что хотя многие O-гликозидные связи нестабильны в кислых условиях и, самое главное, подвергаются расщеплению под действием ферментов в физиологических условиях, O-гликозиды (ацетали) достаточно устойчивы для большинства вариантов применения НГК.

* Получил распространение термин «клик-химия» (от *англ.* “click-chemistry”), который обозначает концепцию «быстрой сборки» сложных молекул из подходящих блоков крайне надежными и эффективными реакциями. Этот подход, строго говоря, включает и другие типы реакций. Список публикаций по этой тематике (до 2007 г.) доступен на сайте лаборатории К. Б. Шарплесса (К. В. Sharpless) по адресу <http://www.scripps.edu/sharplless/click.html>.

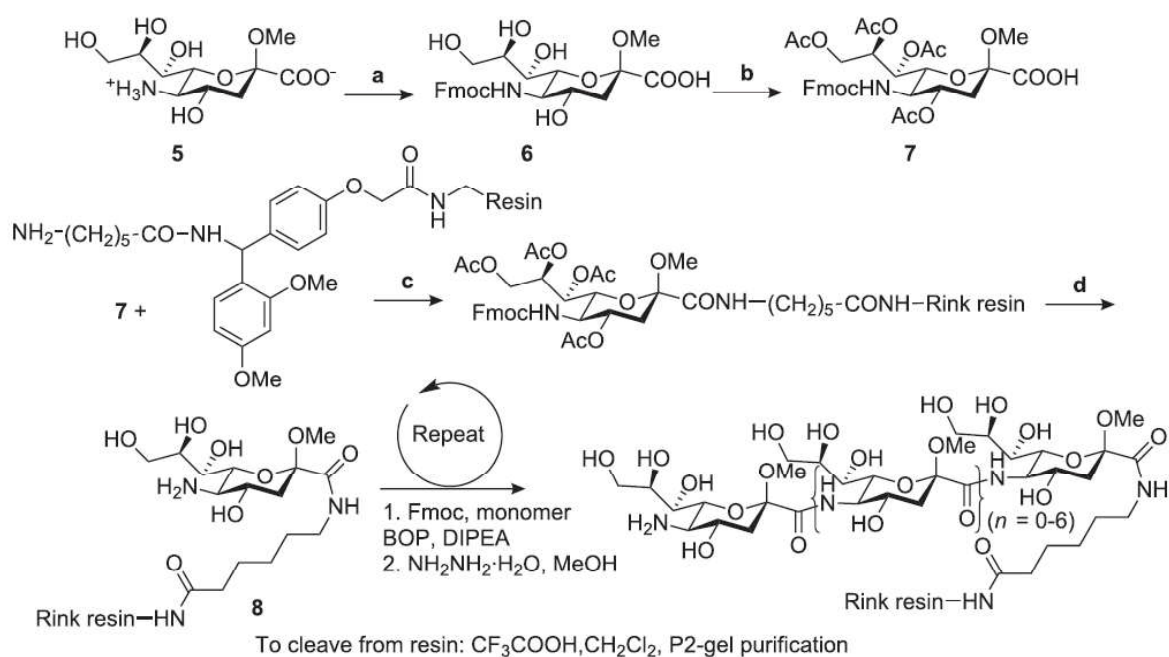


Схема 1-10. Синтез амидно-связанных сиаололигомеров. **Реагенты и условия:** *a.* Fmoc-Cl, NaHCO_3 , H_2O , dioxane, 0°C ; *b.* Ac_2O , Pyridine, 0°C ; *c.* BOP, DIPEA; *d.* $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, MeOH. Источник изображения (и шифров соединений на этом рисунке) – ссылка⁴⁶³.

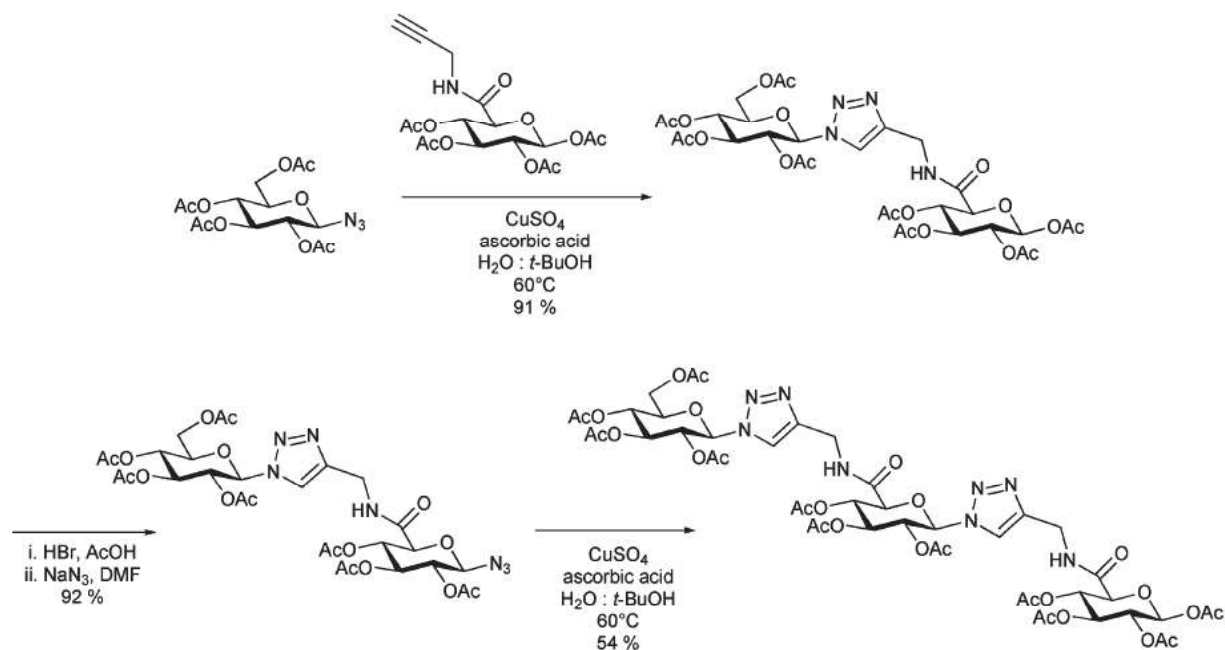


Схема 1-11. Синтез триазольно-связанного трисахарида. Источник изображения – ссылка⁴³⁸.

Однако в ряде приложений требуется большая стабильность, и в этих ситуациях используют непривычные типы межсахаридной гликозидной связи (например, C-, S-, N-гликозиды и т.п.).^{224,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462} Поскольку создание гликозидных связей представляет во многих случаях нетривиальную задачу, иногда более привлекательным вариантом является использование более легко доступных типов связей. В качестве примеров можно привести амидные (схема 1-10)^{463,464,465} или триазольные мостики, ставшие в последние годы популярными вследствие развития концепции «быстрой сборки» («клик-химия») (схема 1-11; ссылки см. в разделе 1.4). При синтезе НГК

возможно использование и комбинации различных типов связей. Например, олигосахарид с природными О-гликозидными связями (полученный химическим или (химико)-ферментативным синтезом, или выделенный из природных источников) может быть присоединен тиогликозидной или гликозиламидной (S-, N-гликозиды) связью к агликону-спейсеру.

1.5.2. Выбор агликона-спейсера

Выбор «правильного» типа спейсера крайне важен как для адекватного «представления»^{*,61,234,237,240,251,252,314,326,336,466} углеводного лиганда в НГК и, как следствие, для взаимодействия с «рецептором», так и для предсказуемого протекания химических реакций в ходе синтеза неогликоконъюгата. Обычно принято оптимизировать (или хотя бы обсуждать) длину агликона-спейсера,^{237,240,251,287,288,289,312,467} которая во многом определяет доступность углеводного фрагмента для взаимодействия с углеводным рецептором (лектином).

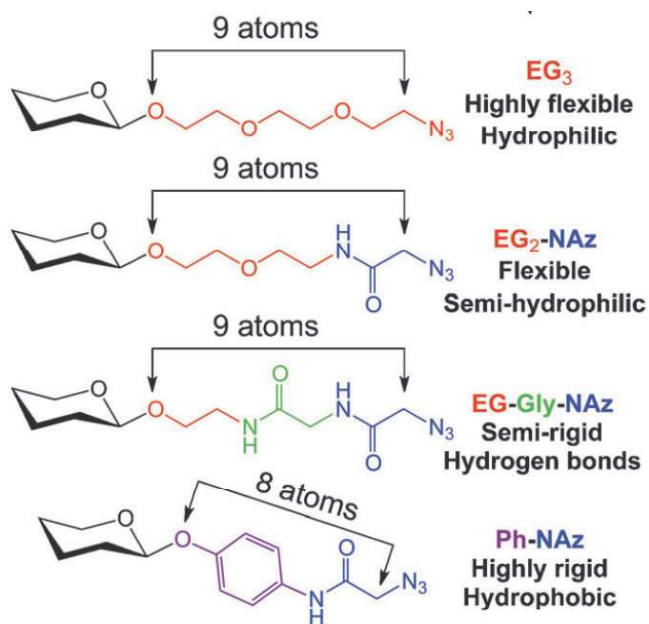


Рис. 1-11. Структура агликонов-спейсеров, различающихся гидрофобностью/гидрофильностью и гибкостью/жесткостью. EG = этиленгликоль, NAz = N-азидоацетил, Gly = глицин, Ph = фенил. Источник изображения – ссылка²⁹⁹.

Крайне важна также адекватная (для конкретного использования НГК) гидрофобность/гидрофильность спейсера (рис. 1-11),^{240,287,299} т.к. она влияет на возможность полученных (в общем случае) амфифильных НГК агрегировать с образованием супрамолекулярных структур различного строения. Немаловажна также жесткость/гибкость спейсера (рис. 1-11),^{240,287,299} т.к. она может влиять как на доступность углеводного фрагмента для взаимодействия с углеводным рецептором (лектином), так и

* Или «презентации» (от *англ.* “presentation”).

на тип образуемых супрамолекулярных агрегатов. Наличие ароматических фрагментов в агликоне иногда вполне уместно, однако на практике часто (но далеко не всегда²⁹⁹) избегают ароматических агликонов. Это связано с тем, что они иммунологически не инертны, и кроме того возможно их участие в π - π -взаимодействиях, которые способны влиять на характер супрамолекулярной агрегации НГК. Отметим, что способность агликона вызывать супрамолекулярную агрегацию НГК может оказаться и достоинством, т.к. в результате агрегации могут возникать нековалентно-связанные поливалентные НГК, обладающие улучшенными характеристиками.^{468,469,470} Для синтеза НГК наиболее широко используются (а) алкильные агликоны, (б) агликоны, содержащие ароматические фрагменты, (в) агликоны на основе олигоэтиленгликолей разной длины и (г) олигопептидные агликоны, а также комбинации блоков разных типов в составе одного агликона-спейсера.

1.5.3. Стратегия спейсеризации

Зачастую один и тот же олигосахарид необходим для синтеза НГК, содержащих различные спейсеры. Например, для синтеза неогликопротеинов с целью получения искусственных антигенов для иммунизации оптимален достаточно длинный (обычно не менее C_6) агликон-спейсер. В то же время, для создания полиакриламидных неогликополимеров, очень популярных в современных глиобиологических исследованиях, достаточно иметь короткий (C_2 или C_3) спейсер (это, по-видимому, связано с тем, что полимерная цепь сама выступает в роли спейсера),^{226,228,234} более того, НГК такого типа* с более длинными спейсерами могут не иметь дополнительных преимуществ при изучении их взаимодействии с углевод-связывающими белками.[†]

Традиционно используемый фиксированный тип спейсера не позволяет варьировать длину и природу спейсера, не повторяя сложный олигосахаридный синтез.[‡] По этой причине широкое распространение получил т.н. «преспейсерный подход»,^{218,224,227,233} который основан на использовании относительно короткого агликона-преспейсера с функциональной группой (часто латентной – для минимизации проблем в ходе сборки олигосахаридов), удлинение которого на последних этапах синтеза приводит к набору различных спейсеров. Этот прием позволяет легко варьировать спейсер, не повторяя нетривиальные синтетические стадии. Схема 1-12 иллюстрирует превращение

* В отличие от неогликопротеинов.

† Н. В. Бовин (ИБХ РАН), *частное сообщение*.

‡ См. ссылки в разделе 1.5.6. Пример влияния природы удаленного агликона-(пре)спейсера в гликозил-акцепторе на скорость и результат гликозилирования трисахаридных гликозил-акцепторов см. схему 7-13 в разделе 7.3.

пентасахарида **I.1** с 2-аминоэтильным агликоном-преспейсером в моновалентный и поливалентный НГК с биотином (**I.3** и **I.6**), отличающиеся финальными спейсерами.⁴⁷¹

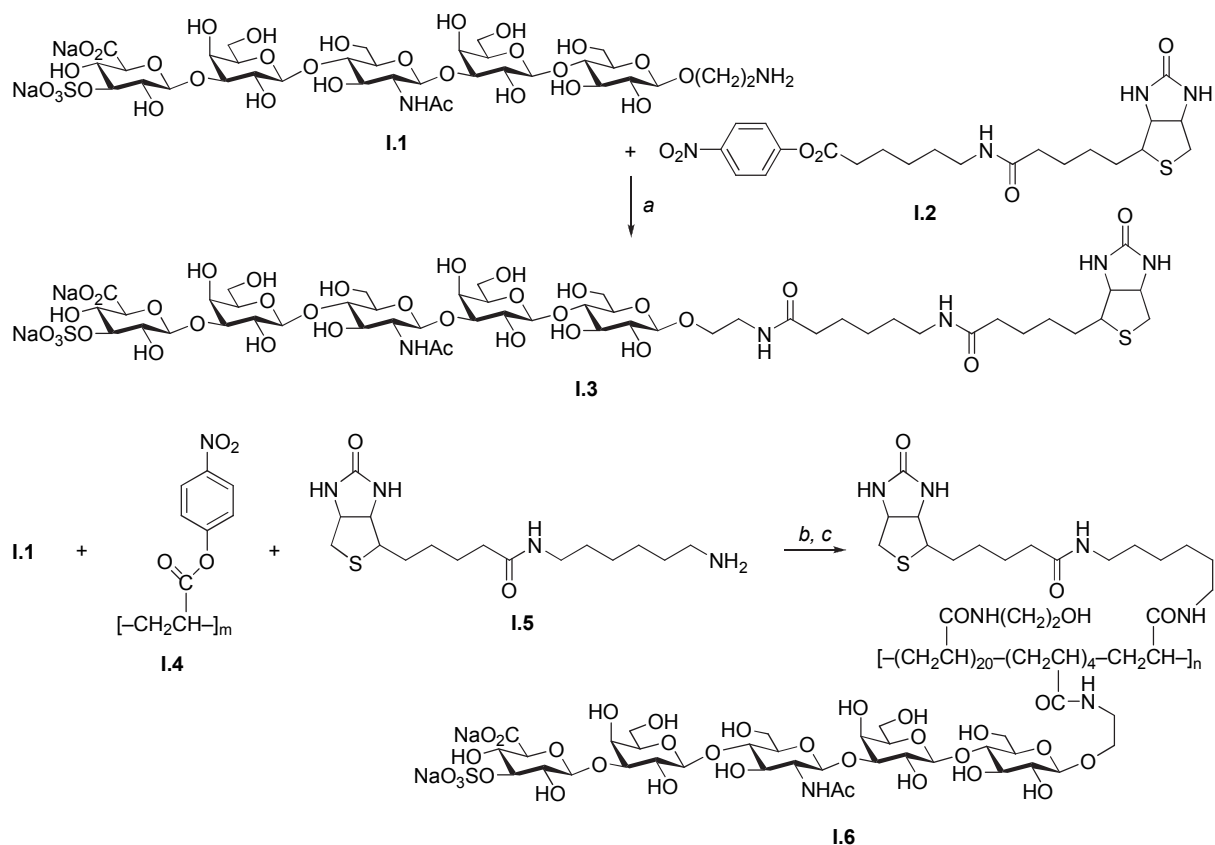


Схема 1-12. Преспейсерный подход в синтезе моновалентного и поливалентного конъюгатов сульфатированного пентасахарида GlcA(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glcβ с биотином. **Реагенты и условия:** *a.* Et₃N, DMSO, ~20 °C (выход **I.3** – 94%); *b.* Et₃N, DMSO, 40 °C; *c.* HO(CH₂)₂NH₂, DMSO, ~20 °C (выход **I.6** – 90% на две стадии). Изображение из ссылки⁴⁷¹ модифицировано.*

1.5.3.1. Выбор момента спейсеризации сахара

Выбранный тип агликона-спейсера (или преспейсера; суть проблемы от этого не меняется) необходимо присоединить к углеводному фрагменту, – осуществить т.н. «спейсеризацию» сахара. Существует два принципиально различающихся подхода: (а) спейсер вводится с самого начала синтеза углеводного фрагмента НГК (раздел 1.5.3.1.1) и (б) спейсер вводится после сборки олигосахарида (раздел 1.5.3.1.2).

1.5.3.1.1. Спейсер вводится с самого начала синтеза НГК

В этом случае необходимо присутствие ортогональной⁴⁰⁹ защитной группы в спейсере, которая бы выдержала все манипуляции в ходе олигосахаридного синтеза. Отсюда –

* Нумерация соединений, описанных в литературе, но не входящих в данную диссертацию, состоит из двух частей, разделенных точкой: римская цифра соответствует номеру главы, а следующая за ней арабская цифра – порядковому номеру литературного соединения в данной главе (например, **VII.3**). Соединения, входящие в данную диссертацию и описанные в публикациях автора по теме диссертации, обозначены арабскими цифрами и нумеруются последовательно без разбивки по главам (например, **153**).

поиск новых защитных групп, как для функциональной группы в агликоне, так и для групп в остатке сахара.

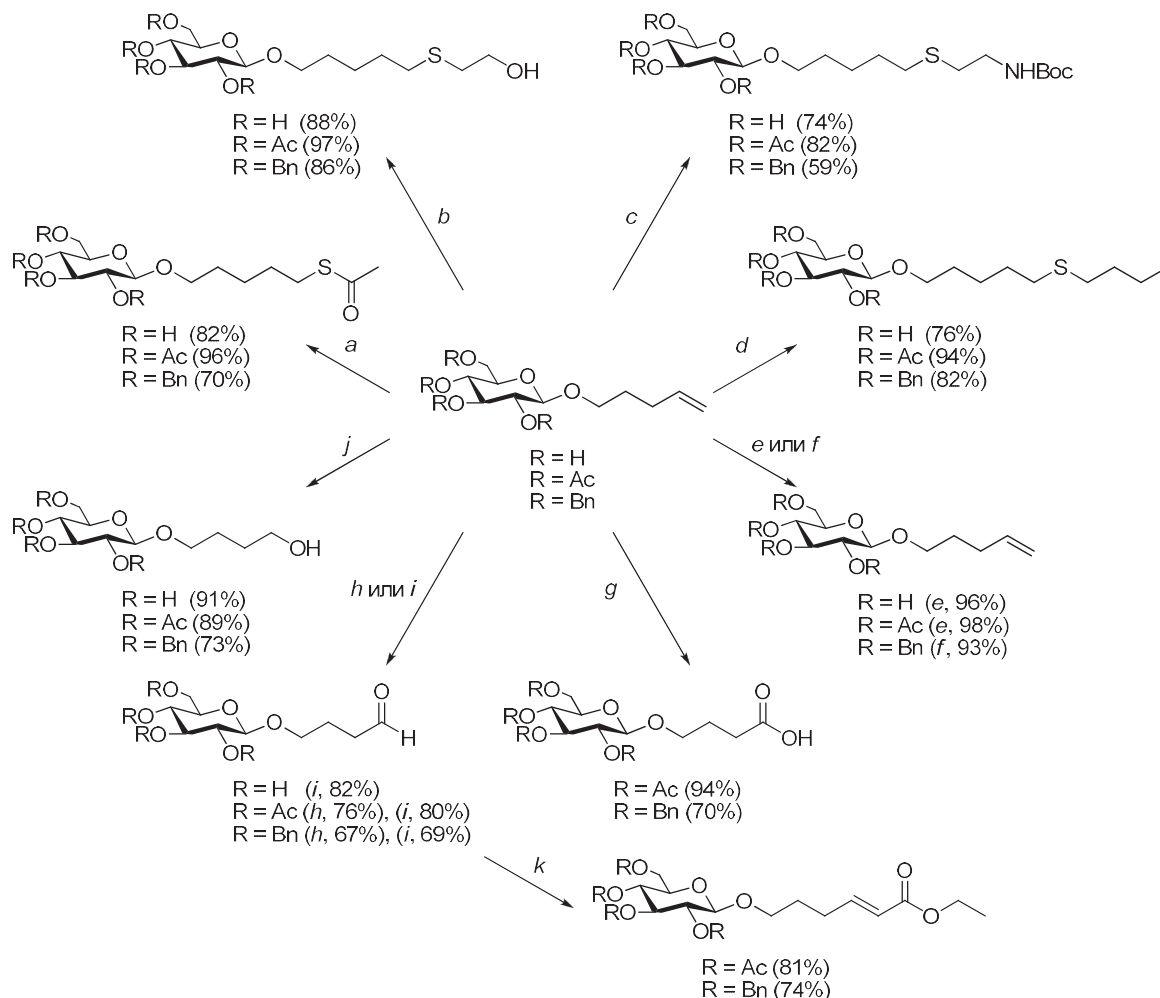


Схема 1-13. Функционализация пентенилгликозидов. **Реагенты и условия:** *a.* CH_3COSH , AIBN, диоксан, N_2 , 75 °C; *b.* $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, AIBN, диоксан, N_2 , 75 °C; *c.* $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NHBOc}$, AIBN, диоксан, N_2 , 75 °C; *d.* $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{SH}$, AIBN, diioxane, N_2 , 75 °C; *e.* H_2 , Pd-C, EtOAc или MeOH, 2 ч; (*f.*) H_2 , катализатор Уилкинсона, EtOAc, 2 ч; *g.* $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeCN-H}_2\text{O}$ 2:2:3; *h.* $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$, диоксан- H_2O 4:1; *i.* 1) O_3 , CH_2Cl_2 , -78 °C, 2) Me_2S ; *j.* 1) O_3 , CH_2Cl_2 , -78 °C, 2) $\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ или NaBH_4 ; *k.* NaN , $(\text{EtO})_3\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{COOEt}$, THF, 0 °C. Изображение из ссылки⁴⁷² модифицировано.

Альтернатива – наличие в агликоне латентной группы, которую в нужный момент можно превратить в необходимую функцию. В качестве такой латентной группы можно использовать азидную группу, восстановление которой приводит к соответствующему гликозиду с аминогруппой в терминальном положении агликона. Агликоны с азидной группой в терминальном положении известны (см., например, рис. 1-11); в подавляющем большинстве они достаточно длинны и могут выполнять функции полноценного спейсера, отдаляющего функционально важный углеводный фрагмент от носителя.^{299,473,474} В то же время, по нашему мнению, более перспективны короткие агликоны-преспейсеры, содержащие азидную группу. Примером такого агликона-преспейсера с латентной

азидной группой может служить предложенный нами в начале 1990-х гг. 2-азидоэтильный агликон (подробнее см. раздел 3.3.1).⁴⁷⁵

В качестве латентного предшественника функциональной группы можно использовать также двойную связь в терминальном положении агликона. Наибольшее распространение получили аллилгликозиды (см. также раздел 1.5.3.3),^{215,224,227,476,477,478,479,480,481,482,483} пентенилгликозиды (см. схему 1-13)^{472,484,485,486} и деценилгликозиды.^{487,488}

Следует подчеркнуть, что многие олигосахариды были синтезированы в форме аллилгликозидов^{*,477,489,490,491} или пентенилгликозидов,^{492,493} что является несомненным преимуществом этих агликонов с точки зрения их использования в качестве преспейсеров (см. также разделы 1.5.3.2 и 1.5.3.3).

Для введения функциональных групп в такие агликоны традиционно используют озонлиз до альдегида, который затем подвергают восстановительному аминированию (при этом в качестве амино-компонента обычно выступают ε-аминогруппы остатков лизина, входящие в состав тех или иных белков-носителей)^{211,214,215,224,227,233,479,494} или вводят в реакцию Виттига.⁴⁷⁷ Широко распространено радикальное присоединение тиолов (обычно 2-меркаптоэтиламина (цистеамина) или AcSH)^{476,477,481,482,484,472} к двойной связи (т.н. тиол-ен-реакции^{495,496,497}). В первом случае для присоединения к «носителю» часто производят дополнительное ацилирование терминальной аминогруппы. Известно также применение для функционализации алкенилгликозидов реакции региоселективного гидроборирования,⁴⁹⁸ а также окисления двойной связи до кислоты.^{472,499}

Деценилгликозиды особенно хороши, если необходимо синтезировать аналоги гликолипидов (неогликолипиды): олигосахариды с такими агликонами часто узнаются ферментами биосинтеза соответствующих гликолипидов и поэтому могут быть непосредственно использованы, например, для изучения специфичности этих ферментов.

Алкенилгликозиды имеют существенное ограничение, связанное с электрофильностью двойной связи, – такие агликоны нельзя (или, по крайней мере, сложно) использовать на гликозил-акцепторах при гликозилровании тиогликозидами, которое обычно промотируют электрофилами (это относится в первую очередь к наиболее популярным мягким электрофилам типа NIS или IDCP; в то же время гораздо более жесткий электрофил MeOTf может быть использован в таких ситуациях без осложнений).[†] Самыми чувствительными являются пентенилгликозиды, которые при такой электрофильной активации превращаются в гликозил-катионы, т.е. также способны выступать в качестве

* Прежде всего, это относится к «ранним» синтезам сложных олигосахаридов (до середины 1990-х гг.).

† NIS – N-иодсукцинимид, IDCP – иодоний(ди-*cimm*-коллидин)перхлорат, MeOTf – метиловый эфир трифторметансульфокислоты.

гликозил-доноров. С другой стороны эта особенность, ограничивающая применение пентенилгликозидов в качестве гликозил-акцепторов, является их несомненным достоинством в других ситуациях. Аллилгликозиды ведут себя в условиях электрофильной активации тиогликозидов (или пентенилгликозидов) по-разному в зависимости от природы конкретного олигосахарида (и защитных групп в нем): известны как примеры их стабильности, так и полной деградации в указанных условиях гликозилирования. Хотя в настоящее время однозначная трактовка этих наблюдений отсутствует, мы склонны полагать, что причина различного поведения аллил-гликозидов различных олигосахаридных гликозил-акцепторов связана с различиями строения (и значит реакционной способности) супрамолекулярных агрегатов (супрамеров)* аллилгликозидов, образующихся в растворах различных соединений.

Такой взгляд на причины неоднозначного отношения аллилгликозидов по отношению к электрофилам косвенно подтверждается тем, что указанная проблема нестабильности двойной связи при электрофильной активации (тиогликозидов) полностью отсутствует† для деценилгликозидов,^{487,488} широко используемых в синтезе сложных олигосахаридов, неогликолипидов и неогликопротеинов. По нашему мнению, эта особенность деценилгликозидов связана с особенностями строения супрамеров, образующихся из их молекул в растворах (при реакции гликозилирования). В таких супрамерах крайне липофильный агликон с терминальной двойной связью, по-видимому, погружен в центральную часть (ядро, кор) этих агрегатов и в значительной степени экранирован от более полярного растворителя.‡ Поэтому в таких супрамерах атака электрофильного промотора на двойную связь деценильного агликона гликозил-акцептора затруднена, и они инертны к действию электрофилов.

1.5.3.1.2. Спейсер вводится после сборки олигосахарида

Для реализации второго подхода необходимо использование временной защитной группы в аномерном положении, которую в нужный момент можно было бы селективно удалить, не затрагивая другие защитные группы и межсахаридные гликозидные связи.^{224,500,501} В качестве таких групп наибольшую популярность§ получили аллильная

* Подробное изложение «супрамерного» подхода приведено в главе 7.

† А. В. Николаев (Университет Данди, University of Dundee, Шотландия), *частное сообщение*.

‡ Это особенно относится к крайне полярному MeCN.

§ В некоторых случаях для временной защиты аномерного положения может быть использована метильная группа (метилгликозиды), удаляемая в довольно жестких условиях селективного гидролиза или ацетолита, в которых многие межсахаридные гликозидные связи могут оказаться недостаточно стабильными. Хотя такой подход был достаточно популярен на ранних этапах (до начала 1990-х гг.) развития химии олигосахаридов и НГК, в настоящее время он используется довольно редко, и поэтому не обсуждается в данной работе.

(аллилгликозиды),^{502,503,504,505,506,507} бензильная (бензилгликозиды),^{500,501} 2-(триметилсилил)этильная (TMSEt-гликозиды или SE-гликозиды),^{500,501,508,509,510,511,512} различным образом замещенные силильные группы (силилгликозиды)^{500,501} и 4-метоксифенильная группа (MP-гликозиды),^{500,501,513} эту же функцию в ряде случаев могут выполнять и тиогликозиды, которые порой не инертны* в условиях гликозилирования такими на первый взгляд «ортогональными»⁴⁰⁹ гликозилирующими агентами как гликозилгалогениды или гликозилимидаты. Несмотря на множество достоинств, особенно заметных в блочном синтезе сложных олигосахаридов, этот подход имеет единственное, но очень существенное ограничение, связанное с часто проблематичным (с точки зрения эффективности и стереоселективности) введением спейсера или пре-спейсера в достаточно сложный олигосахарид на последнем этапе синтеза (один из таких примеров, обнаруженный в данной работе, описан в разделе 4.3).

1.5.3.2. «Универсальные» агликоны позволяют избежать выбора момента спейсеризации сахара

Возможно совмещение достоинств обоих изложенных подходов. Это достигается в том случае, если используется «универсальный» агликон, выступающий одновременно и как (пре)спейсер и как временная защитная группа в аномерном положении. К числу гликозидов с такими агликонами можно отнести уже упоминавшиеся аллилгликозиды,^{502,506} пентенилгликозиды,⁴⁸⁴ а также (с некоторой натяжкой) «удлиненные SE-гликозиды» с удаляемым 2-[4-(метоксикарбонилбутил)диметилсилил]этильным агликоном, в которых одна из метильных групп заменена на более длинную алкильную цепь,^{514,515} пригодные для твердофазного олигосахаридного синтеза, а также получения неогликолипидов и гликоповерхностей.

Недавно было показано, что 3-аминопропильный агликон, на протяжении многих лет успешно применяющийся для синтеза самых разнообразных НГК в качестве агликона-преспейсера,^{516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530} также может быть отнесен к классу «универсальных» агликонов, т.к. соответствующие гликозиды могут быть гладко превращены в аномерные ацетаты⁵³¹ и затем в олигосахаридные гликозил-доноры (схема 1-14), пригодные для блочного синтеза более сложных олигосахаридов.^{532,533}

* Наблюдается активация тиогликозидного гликозил-акцептора в нетипичных условиях (по-видимому под действием гликозил-катиона, образующегося из гликозил-донора), которая приводит к «переносу агликона» (в англоязычной литературе используется термин “aglycon transfer”). Этот процесс протекает *не всегда*, причины чего в настоящее время не известны. По нашему мнению, ситуация полностью аналогична иногда наблюдающейся чувствительности аллилгликозидов по отношению к мягким электрофилам и связана с особенностями строения супрамеров тиогликозидного гликозил-акцептора.

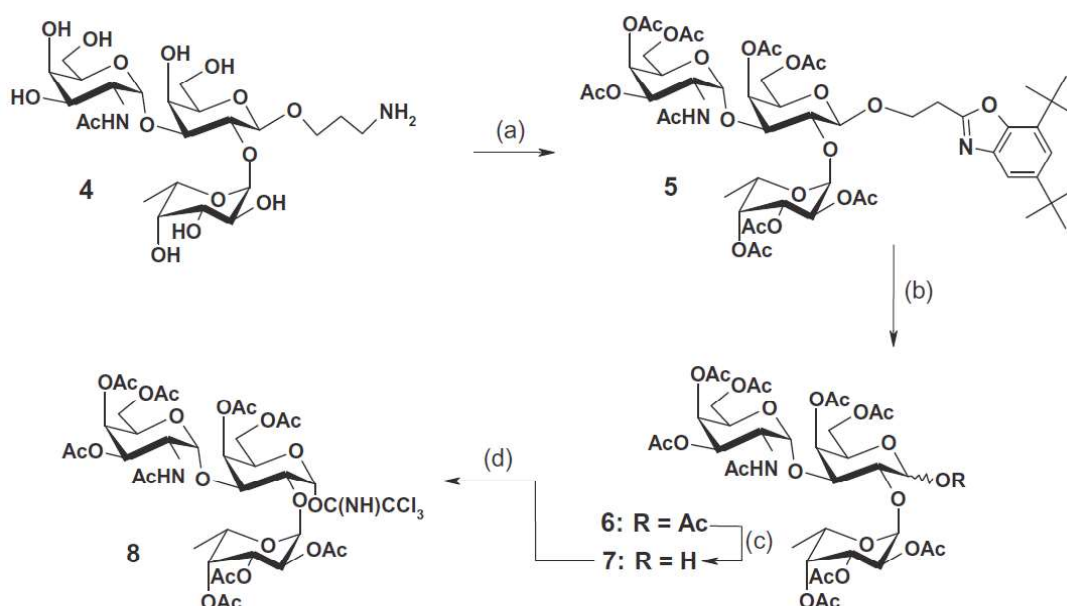


Схема 1-14. 3-(Аминопропил)гликозиды – гликозиды с «универсальным» агликоном – содержат агликон-преспейсер и могут быть превращены в гликозил-доноры. **Реагенты и условия:** *a.* (i) 3,5-ди-*трет*-бутил-1,2-бензохинон, MeOH; (ii) (COOH)₂ · 2 H₂O (pH 4); (iii) Ac₂O/Py, 92% (на три стадии); *b.* NaOAc, Ac₂O–AcOH (1:1), 100 °С, 10 сут., 96%; *c.* N₂H₄·HOAc, DMF, 50 °С, 95%; *d.* Cl₃CCN, DBU, CH₂Cl₂, 90%. Источник изображения (и шифров соединений на этом рисунке) – ссылка⁵³³.

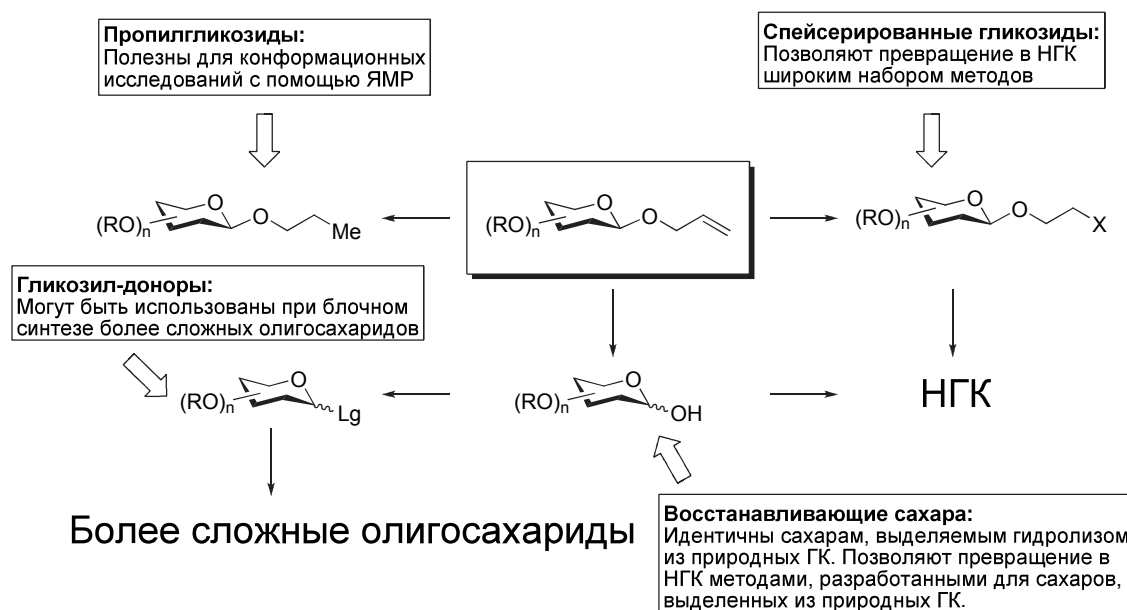


Схема 1-15. Аллилгликозиды – «универсальные» предшественники гликозидов с функционализированным агликоном.

Особый интерес для химии НГК представляет использование аллильного агликона, который можно рассматривать в качестве «универсальной» защитной группы аномерного центра, позволяющей не только осуществить синтез углеводной последовательности олигосахарида, но и легко переходить от аллилгликозидов к восстанавливающим производным сахаров (после удаления агликона путем изомеризации в пропенилгликозид с последующим сольволизом в мягких кислых условиях), пропиленгликозидам (после гидрирования двойной связи) с фиксированной аномерной конфигурацией, необходимые

для конформационных исследований методом ЯМР, или к спейсерированным формам олигосахаридов (после функционализации агликона), а затем получению на их основе НГК (схема 1-15, см. также раздел 1.5.3.3).

Поиск новых типов «универсальных» агликонов, лишенных ограничений и недостатков известных агликонов, представляет чрезвычайно важную и очень сложную задачу.

1.5.3.3. Аллилгликозиды как предшественники гликозидов с азидо- или аминогруппой в терминальном положении агликона

Учитывая перспективность применения аллильного агликона в качестве «универсального» агликона, достаточно много усилий было приложено для поиска эффективных путей его трансформации в производные с терминальной азидо- или аминогруппой. В этом случае для присоединения к носителю можно использовать хорошо разработанные методы ацилирования аминогруппы или подходы «клик-химии», основанные на циклоприсоединении алкинов к азидам (ссылки см. раздел 1.4).

Известно несколько способов функционализации аллилгликозидов, позволяющих вводить азидо- или амино-группы (непосредственно или путем восстановления азиды) в терминальное положение агликона и при этом получать как C₂-, так и C₃-агликоны с азидо-/амино-группой. В данном разделе эти подходы будут рассмотрены более детально.

1.5.3.3.1. Озонолиз аллилгликозида – восстановление до спирта, далее в азид

Один из подходов, использованный для функционализации аллильного агликона, заключается в окислительном озонолизе двойной связи в MeOH, восстановлении продуктов озонолиза NaBH₄ до соответствующего (2-гидроксиэтил)гликозида, превращении его в сульфонат, а затем замещении сульфоноксигруппы на азидную: аллил → озонид → спирт → сульфонат → азид (схема 1-16).^{471,534,535} Указанные превращения были использованы в ходе синтеза НГК на основе олигосахаридов, родственных антигену HNK-1.⁴⁷¹

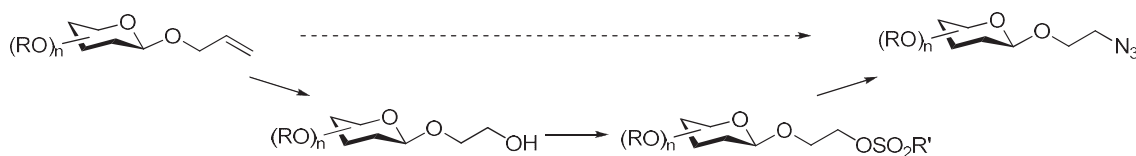


Схема 1-16. Общая схема превращений аллилгликозидов в (2-азидоэтил)гликозиды: шестичленный цикл обозначает моно- или олигосахаридный фрагмент, R – защитные группы, R' = Me, Tol.^{471,534,535}

Прежде всего условия трансформации агликона были отработаны на трисахаридном (GlcN-Lac) субстрате **I.7**, содержащем представительный набор защитных групп: гидролитически нестабильную O-ацетильную, чувствительную к восстановлению

ацетамидную и способные окисляться в условиях озонлиза *O*-бензильные группы (схема 1-17). Аллилгликозид **I.7** по описанной выше схеме был превращен в (2-азидоэтил)гликозид **I.11** с выходом 71% (4 стадии).

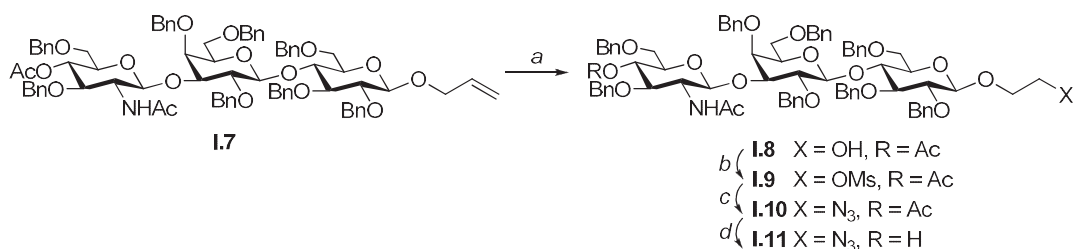


Схема 1-17. Функционализация аллильного агликона в трисахариде GlcN-Lac. **Реагенты и условия:** *a.* 1. O₃, -78 °C, CH₂Cl₂-MeOH; 2. NaBH₄, -78 °C → 0 °C (выход **I.8** – 90% на две стадии); *b.* MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; *c.* NaN₃, 18-краун-6, DMF; *d.* 0.15 M MeONa, MeOH (выход **I.11** – 79% на три стадии). Изображение из ссылки⁴⁷¹ модифицировано.

Однако буквальное перенесение найденных условий функционализации аллильного агликона на дисахарид **I.12**, содержащий остатки глюкуроновой кислоты, оказалось проблематичным. Это было вызвано тем, что в условиях восстановления продуктов озонлиза метилового эфира **I.12** избытком боргидрида натрия происходило восстановление метоксикарбонильной группы остатка глюкуроновой кислоты с образованием диола **I.13**, содержащего остаток глюкозы вместо глюкуроновой кислоты (схема 1-18).

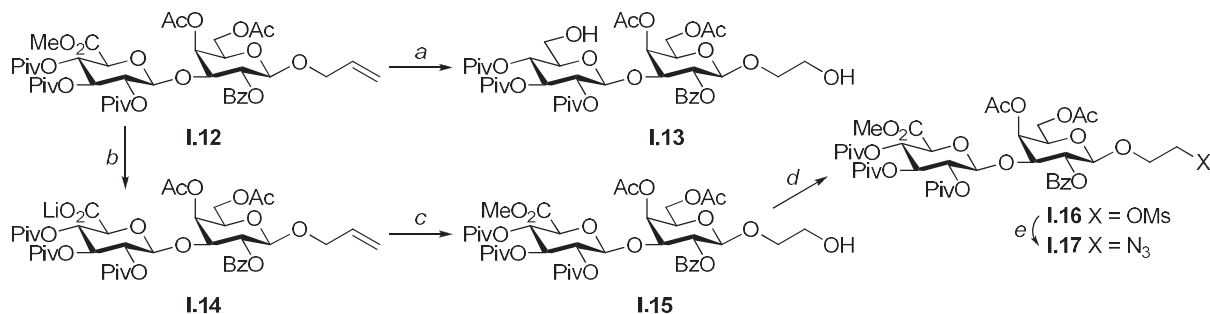


Схема 1-18. Функционализация аллильного агликона в дисахариде GlcA-Gal. **Реагенты и условия:** *a.* 1. O₃, -78 °C, CH₂Cl₂-MeOH; 2. NaBH₄, -78 °C → 0 °C (выход **I.13** ~100% на две стадии); *b.* LiI, Py, кипячение; *c.* 1. O₃, -78 °C, CH₂Cl₂-MeOH; 2. NaBH₄, -78 °C → 0 °C; 3. обработка 1 M H₂SO₄; 4. CH₂N₂, 0 °C, CH₂Cl₂ (выход **I.15** – 95% в расчете на **I.12**); *d.* MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂; *e.* NaN₃, 18-краун-6, DMF (выход **I.17** – 90% на две стадии). Изображение из ссылки⁴⁷¹ модифицировано.

Проблему удалось обойти, осуществляя восстановление продукта озонлиза литиевой соли **I.14**, полученной из **I.12** действием LiI⁵³⁶ в Py. Следует подчеркнуть, что эффективность такой более «длинной» трансформации аллильного агликона в 2-гидроксиэтильный, необходимой в случае производных урановых кислот, не уступает эффективности исходной процедуры, описанной выше: (2-гидроксиэтил)гликозид **I.15** был выделен с выходом 95% (схема 1-18) и затем превращен в целевой (2-

азидоэтил)гликозид **I.17** с суммарным выходом 86% (в расчете на исходный аллилгликозид **I.12**).

Аналогичным образом пентасахаридный аллилгликозид **I.18** был превращен в (2-азидоэтил)гликозид **I.21** с суммарным выходом 64% (схема 1-19).

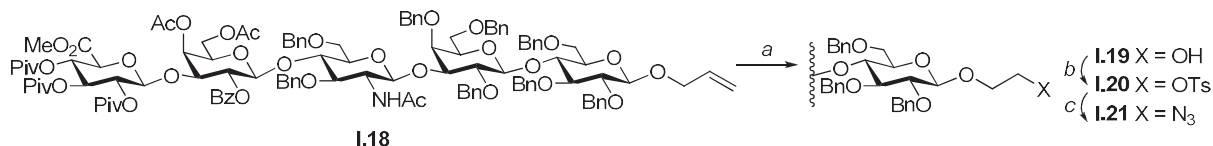


Схема 1-19. Функционализация аллильного агликона в пентасахариде GlcA-Gal-GlcN-Lac. **Реагенты и условия:** *a.* 1. LiI, Py, кипячение; 2. O₃, -78 °C, CH₂Cl₂-MeOH; 3. NaBH₄, -78 °C → 0 °C; 4. обработка 1 M H₂SO₄; 5. CH₂N₂, 0 °C, CH₂Cl₂; *b.* TsCl, Py; *c.* NaN₃, 18-краун-6, DMF (выход **I.21** – 64% в расчете на **I.18**). Изображение из ссылки⁴⁷¹ модифицировано.

1.5.3.3.2. Превращение аллилгликозидов в (2-аминоэтил)гликозиды через имины и оксим

Успех с применением схемы трансформации аллильного агликона в олигосахаридах в 2-аминоэтильный через 2-гидроксиэтильный и 2-азидоэтильный агликаны, позволяющей осуществлять это превращение с выходами 64–86% (раздел 1.5.3.3.1), несколько омрачается многостадийностью этой методики и необходимостью использовать полностью защищенные производные углеводов. В то же время известно, что собственно стадия озонлиза двойной связи протекает крайне эффективно. Поэтому прямое восстановительное аминирование⁴⁹⁴ образующегося альдегида^{494,499,537,538,539}, используя в качестве аминоконцентра аммиак* или *N*-бензиламин, кажется на первый взгляд крайне перспективным подходом (схема 1-20).

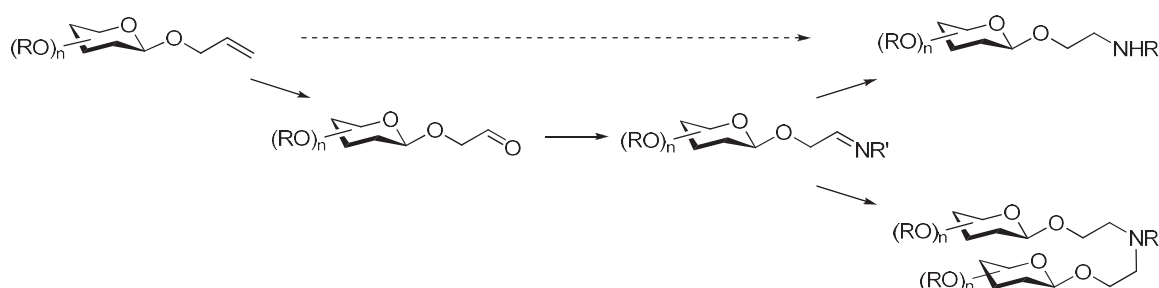


Схема 1-20. Общая схема превращений аллилгликозидов в (2-аминоэтил)гликозиды или их *N*-бензильные производные с помощью восстановительного аминирования; показаны также побочно образующиеся продукты полиалкилирования. Шестичленный цикл обозначает моно- или олигосахаридный фрагмент, R = H или защитные группы, R' = H или Bn.

И действительно, в литературе известны примеры таких превращений аллилгликозидов в (2-аминоэтил)гликозиды^{498,537,539} (или их *N*-бензильные производные^{498,539}), протекающих через образование и последующее восстановление соответствующего ими́на

* Или его синтетические эквиваленты, например, NH₄OAc.

(аналогичные превращения описаны и для *O*-аллил-циклодекстринов⁵³⁴). К сожалению, хотя процесс функционализации и включает небольшое количество стадий, выходы продуктов умеренные (50–65%). Можно предположить, что основным продуктом реакции восстановительного аминирования, будучи первичным (или вторичным) амином, в условиях реакции способен реагировать далее, превращаясь в ходе восстановительного алкилирования во вторичный (или третичный⁵⁴⁰) амин (схема 1-20).

Эта точка зрения подтверждается тем, что восстановительное аминирование альдегида, полученного в результате озонолиза аллилгликозида, вторичным амином (Bn_2NH), а не аммиаком или первичным амином, приводит к соответствующему 2-(*N,N*-дибензиламиноэтил)гликозиду с выходом 74%,⁴⁹⁸ т.к. в этом случае полиалкилирование невозможно.

Кроме того, в литературе имеются многочисленные примеры успешного использования восстановительного аминирования для присоединения углеводов к белкам, что основано на реакции альдегида в агликоне с ϵ -аминогруппой остатка аминокислоты лизина белка.^{211,214,215,224,227,233,479,494} В этих работах, однако, выход продукта не мог быть определен в силу специфики объектов, и потому эффективность таких превращений не может быть адекватно оценена, особенно если принять во внимание то, что для конъюгации с белком практически всегда используют избытки альдегида.

В то же время известно, что первичные амины могут быть получены с высокими выходами в результате восстановления⁵⁴¹ оксимов, которые легко образуются из альдегидов. Поэтому были изучены⁵⁴² препаративные возможности применения подобного подхода для превращения аллилгликозидов в 2-(аминоэтил)гликозиды в соответствии со следующей схемой: аллил \rightarrow альдегид \rightarrow оксим \rightarrow амин (схема 1-21).

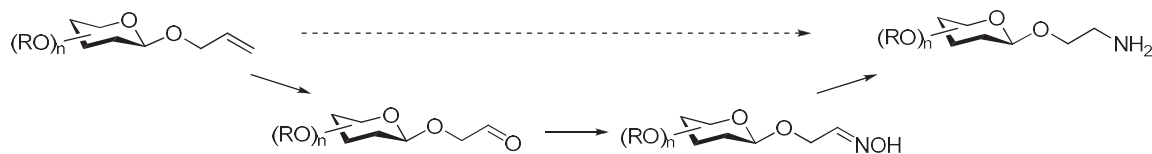


Схема 1-21. Общая схема превращений аллилгликозидов в (2-аминоэтил)гликозиды через оксимы: шестичленный цикл обозначает моно- или олигосахаридный фрагмент, R = H или защитные группы. Изображение из ссылки⁵⁴² модифицировано.

В качестве представительных примеров были выбраны превращения аллиллактозидов **I.22a,b** в лактозид **I.26b**, содержащий гидроксильные группы при С-3' и С-4' и трифторацетамидогруппу в агликоне, а также его предшественник **I.26a** с изопропилиденовой защитной группой (схема 1-22).

Ключевым оказалось использование Ph_3P в качестве восстановителя озонидов, что позволило проводить всю последовательность превращений при низкой температуре,

исключающей протекание побочных процессов, и позволило поднять выходы целевых продуктов **1.26a,b** до ~90% (схема 1-22).⁵⁴²

Таким образом, превращение аллилгликозидов в (2-аминоэтил)гликозиды через соответствующие оксимы (схемы 1-21 и 1-22) применимо и к частично защищенным производным сахаров, в то время как одна из самых эффективных на настоящий момент альтернативных схем функционализации аллилгликозидов, основанная на их озонлизе, восстановлении до (2-гидроксиэтил)гликозидов и последующем их сульфонилировании, введении азидной группы и ее превращении в аминогруппу (см. схемы 1-16, 1-17, 1-18 и 1-19 в разделе 1.5.3.3.1), применима только к полностью защищенным производным трансформируемой молекулы. Мы полагаем, что использование других способов восстановления оксимов (например, каталитического гидрирования) позволит распространить описанный в данном разделе подход также и на полностью незащищенные аллилгликозиды и в значительной мере расширит область применимости предлагаемого способа функционализации аллильного агликона.

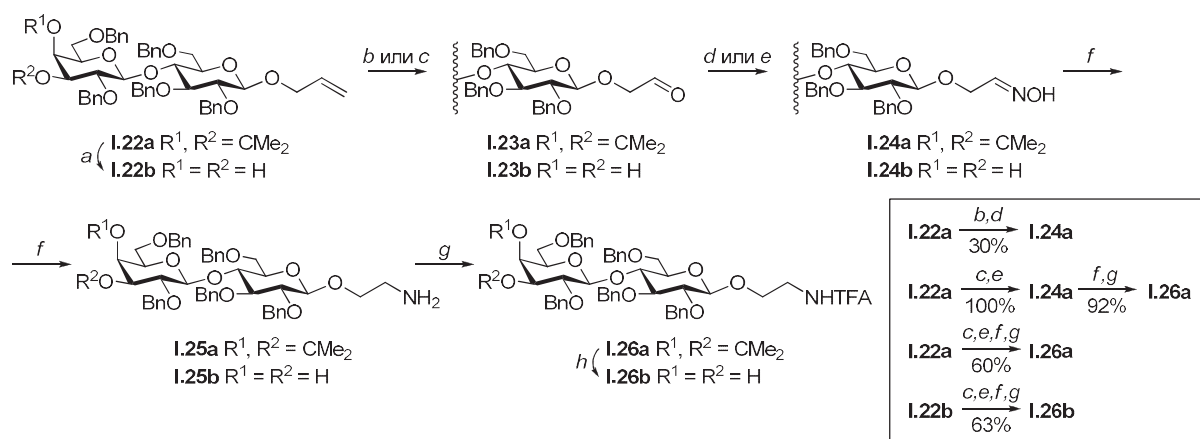


Схема 1-22. Функционализация аллильного агликона в дисахаридах Лас. **Реагенты и условия:** *a.* AcOH–H₂O (8:2), 100 °C; *b.* 1. O₃, –78 °C, CH₂Cl₂–MeOH (1:4); 2. Me₂S, –78 °C → ~20 °C; *c.* 1. O₃, –78 °C, CH₂Cl₂–MeOH (1:1); 2. Ph₃P, –50 °C; *d.* NH₂OH·HCl, Py, MeOH, ~20 °C; *e.* NH₂OH·HCl, –50 °C → 15 °C; *f.* LiAlH₄, THF, 18 °C → 66 °C; *g.* TFAOEt, Et₃N, MeOH, ~20 °C; *h.* 90% водн. TFA–CH₂Cl₂ (1:9), ~20 °C. Изображение из ссылки⁵⁴² модифицировано.

1.5.3.3.3. Азидофенилселенирование аллиллактозида, далее в амин

Все описанные выше (см. разделы 1.5.3.3.1 и 1.5.3.3.2) способы функционализации аллильного агликона приводят к укорочению агликона с образованием (2-аминоэтил)гликозидов или их предшественников – (2-азидоэтил)гликозидов. В то же время, в ряде случаев интерес могут представлять и более длинные агликаны с нечетным числом метиленовых звеньев, например, 3-аминопропильный агликон, который также широко используется для синтеза неогликоконъюгатов (см. раздел 1.5.3.2).

Для функционализации аллильного агликона с сохранением углеродной цепи было предложено⁵⁴³ использовать реакцию азидофенилселенилирования [(PhSe)₂, NaN₃, PhI(OAc)₂] (схема 1-23), протекающую по радикальному механизму и приводящую к присоединению азидной группы против правила Марковникова.⁵⁴⁴ Для достижения высоких выходов (до 86%) 3-азидо-аддуктов ключевым оказалось постепенное добавление избытка PhI(OAc)₂ и максимизация эффективной концентрации азид-аниона путем повышения растворимости азид натрия (добавление 18-краун-6 и использование в качестве растворителя DMF). После восстановления азид по Штаудингеру и радикального деселенирования было получено производное **I.35b** с 3-(*N*-трет-бутоксикарбониламино)пропильным агликоном (схема 1-23).⁵⁴³

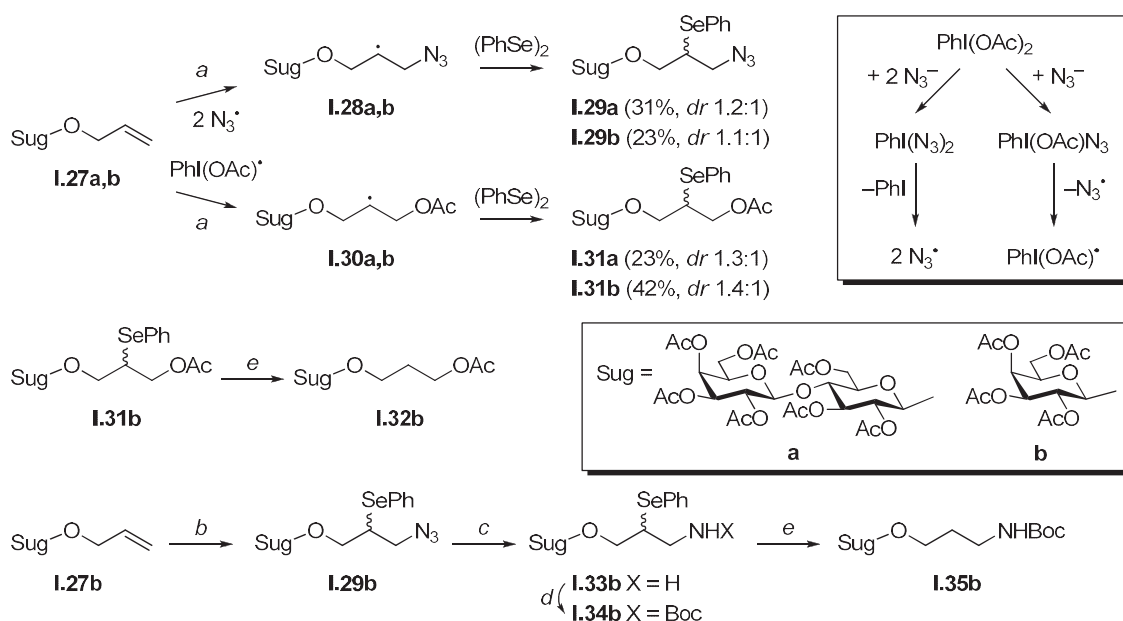


Схема 1-23. Функционализация аллильного агликона реакцией азидофенилселенилирования. **Реагенты и условия:** *a.* NaN₃ (2.4 экв.), (PhSe)₂ (0.6 экв.), PhI(OAc)₂ (1.4 экв.), CH₂Cl₂, ~20 °С, 18 ч; *b.* NaN₃ (3 экв.), (PhSe)₂ (0.6 экв.), PhI(OAc)₂ (2 экв., добавление порциями), DMF, 18-краун-6, ~20 °С, 72 ч (выход **I.29b** – 86%); *c.* 1. Ph₃P, THF, кипячение; 2. H₂O; *d.* BocON(CO)₂(CH₂)₂, THF, ~20 °С (выход **I.34b** – 62% в расчете на **I.29b**, без выделения промежуточно образующихся веществ); *e.* Bu₃SnH, AIBN, толуол, кипячение (выход **I.32b** – 83%; выход **I.35b** – 93%). Изображение из ссылки⁵⁴³ модифицировано.

1.5.4. Выбор набора защитных групп

Самое очевидное и обычно легко выполнимое требование, предъявляемое к защитным группам:⁵⁴⁵ они должны быть совместимы⁴⁰⁹ с типами реакций, используемых при сборке олигосахаридной цепи. Более проблематичной является их совместимость с функциональной группой в аглиcone. По этой причине опубликованные синтезы олигосахаридов с простыми агликонами (например, метилгликозиды олигосахаридов) часто плохо переносятся на спейсированные олигосахариды. Так, например, при попытке буквального перенесения условий успешного синтеза синтеза конечного гексасахаридного фрагмента арабиногалактана и липоарабиноманнана микобактерий в

виде метилгликозида **I.38**⁵⁴⁶ на синтез родственного гексасахаридного производного **I.39**, снабженного 8-аминооктильным агликоном-спейсером,⁵⁴⁷ возникли непредвиденные проблемы при гидрогенолизе *O*-бензильных защитных групп в молекуле, содержащей 8-азидооктильный агликон (не удавалось полностью удалить бензильные группы), что привело к необходимости поиска обходных путей и снижению выхода целевого продукта (схема 1-24). И это не единственный пример. По нашему мнению, причины наблюдаемых различий в эффективности гидрогенолитического удаления *O*-бензильных защитных групп из **I.37** и **I.40** связаны с различиями в строении супрамеров,* образуемых молекулами этих соединений (и продуктов их частичного дебензилирования) в использованных растворителях; во втором случае, по-видимому, доступность части бензильных групп понижена (они «спрятаны» во внутренней части («коре») супрамера), и они не реагируют.

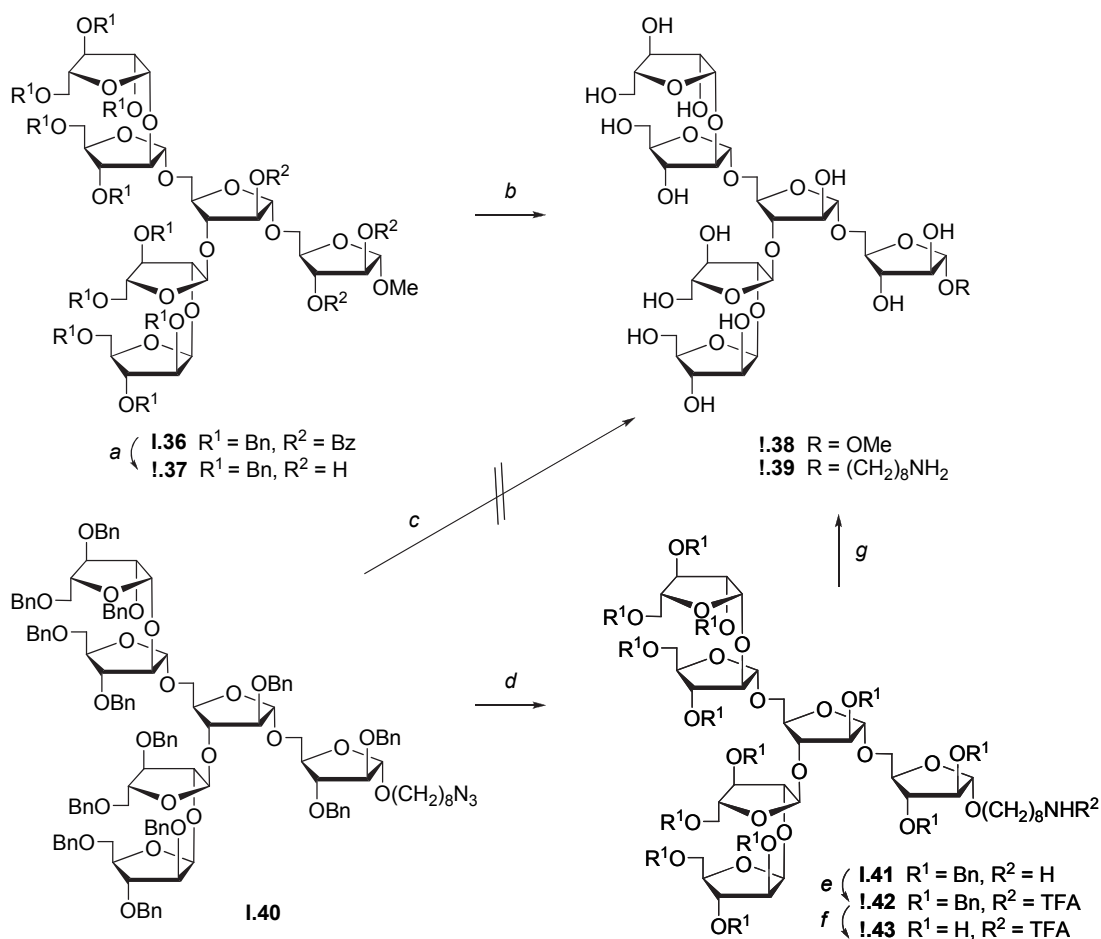


Схема 1-24. Различия в удалении защитных групп из метил- и (8-азидооктил)гликозидов. **Реагенты и условия:** *a.* MeONa, MeOH-CH₂Cl₂ (3:1), ~20 °C; *b.* H₂, Pd/C, AcOH-H₂O (4:1), ~20 °C (выход **I.38** – 86% на 2 стадии из **I.36**); *c.* H₂, Pd/C, MeOH (реакция не доходит до конца и **I.39** не образуется); *d.* Ph₃P, H₂O, THF, 0 °C → ~20 °C (выход **I.41** – 78%); *e.* (CF₃CO)₂O, Py, ~20 °C; *f.* H₂, Pd/C, MeOH (выход **I.43** – 65% на две стадии из **I.41**); *g.* NH₃, MeOH (выход **I.39** не указан). Изображение из ссылок^{546,547} модифицировано.

* Подробное изложение «супрамерного» подхода см. главу 7.

1.5.5. Синтез моносахаридных (частично защищенных) блоков

Этот этап является в настоящее время необходимым для олигосахаридного синтеза без использования ферментов и не имеет каких-либо особенностей в случае синтеза НГК. Примеры подходов, используемых для получения таких блоков можно найти в литературе (см. обзоры и избранные статьи последних лет^{548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579}).

1.5.6. Сборка олигосахарида

К настоящему моменту разработаны разнообразные стратегии сборки олигосахаридных цепей с помощью различных реакций гликозилирования (см. обзоры и избранные статьи последних лет^{138,486,487,492,538,555,556,558,559,566,567,568,569,570,571,572,573,574,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690}). Все они, в принципе, применимы для синтеза НГК с учетом совместимости присутствующих функциональных и защитных групп, а также условий проведения реакций гликозилирования.*

1.6. Присоединение олигосахарида к носителю

Этап присоединения олигосахарида к носителю, «метке», фармакофорному фрагменту (т.е. собственно конъюгация) является кульминацией синтеза НГК.^{237,362,356} Часто принято полагать, что синтез НГК сводится только к реализации этого этапа, который можно проводить по «хорошо разработанным протоколам» (как это принято в биохимии). Следует подчеркнуть, что такой взгляд является существенным упрощением гораздо более сложной ситуации, т.к. успех собственно конъюгации определяется не только типами функциональных групп в агликоне и «носителе», но и природой дополнительных групп, присутствующих в олигосахаридном фрагменте, а также физико-химическими свойствами олигосахаридного блока (и не в последнюю очередь его склонностью к агрегации в условиях проведения стадии конъюгации). Важными моментами являются выбор адекватных методов выделения НГК из реакционной смеси и возможности его очистки, что зачастую представляет нетривиальную задачу.

* Ссылки на работы, посвященные влиянию растворителя на результат гликозилирования и изучению механизма реакции гликозилирования см. раздел 7.1.3).

1.7. Примеры синтеза НГК

В последующих главах приведены примеры получения конкретных НГК различных типов, необходимых для разнообразных медико-биологических исследований, каждый из которых имеет определенные особенности. Это синтезы гликоконъюгатов с препаратами для БНЗТ (глава 2), гликополимеров на основе фрагментов бактериальных полисахаридов, включающих амиды гликуроновых кислот с аминокислотами (глава 3), неогликопротеина и неогликолипида на основе лактама сиалоолигосахаридной цепи ганглиозида G_{M3} (глава 4), а также НГК гликолипидного типа – сиалил(полипренил)фосфата (глава 5) и гликополимерного типа – полимерного сиалил-донора (глава 6). Проблемы, которые пришлось решать в ходе синтеза этих НГК, стимулировали развитие соответствующих разделов химии углеводов и органической химии в целом (глава 7), что отражено в структуре данной диссертации и выводах (см. также схему 1-1).