



УДК 577.27 : 547.458.27.057

ИЗОМЕРИЗАЦИЯ ТРИФТОРАЦЕТАМИДОПРОПИЛ-2-
АЦЕТАМИДО-2-ДЕЗОКСИ- β -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИДА
В α -АНОМЕР. УДОБНЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА
ИСКУССТВЕННОГО Т-АНТИГЕНА

Бовин Н. В.* , Землянухина Т. В., Хорлин А. Я.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

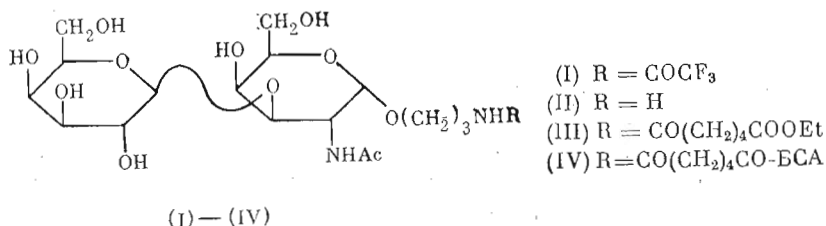
Осуществлен синтез биозида $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCF}_3$. Ключевой α -гликозид $\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCF}_3$ (перацетат) получали изомеризацией β -аномера под действием трифторметансульфокислоты, а также прямым гликозилированием 3-(трифторацетамидо)пропанола перацетатом D-галактозамина в присутствии смеси трифторметансульфокислоты и эфира трехфтористого бора. Далее получали бензилдеповое производное, которое гликозилировали ацетобромгалактозой. Снятие защитных групп привело к (3-аминпропил)биозиду, который иммобилизовали на бычьем сывроточном альбумине и цитохроме с.

Антиген Томсена-Фриденрейха (Т-антиген) является важным маркером процессов дифференцировки и онкотрансформации клеток [1—3]. Определение уровня анти-Т-антител в сыворотке крови человека легло в основу диагностики ряда карцином [4]. Поскольку Т-антиген представляет интерес для практической медицины, несколькими группами исследователей осуществлены синтезы искусственных Т-антигенов и иммуносорбентов соответствующей специфичности [5—12]. Использование синтезированных антигенов для иммунизации в литературе не описано, для получения антител применяли природный Т-антиген — десиалированные эритроциты человека. Однако получение моноспецифической антисыворотки с использованием десиалированных эритроцитов человека в качестве антигена осложняется тем, что на поверхности эритроцитов находятся не только α -связанные дисахаридные структуры ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1$ -)Ser/Thr (Т-антиген, [13]), но и β -связанные фрагменты $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1$ - (ганглиозид GM_1 [14]) вместе с множеством других антигенов углеводной и белковой природы. Поэтому для получения моноспецифических антител, узнающих только α -дисахарид, более предпочтительным нам представлялся искусственный Т-антиген, несущий однотипные детерминанты.

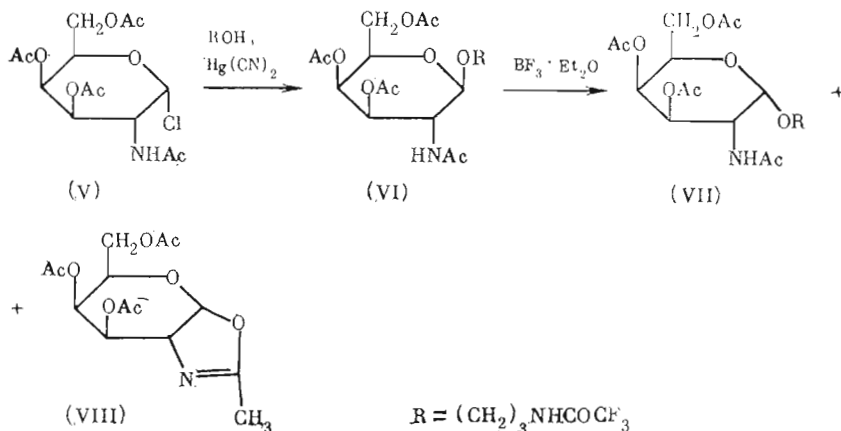
Несмотря на разнообразие синтезированных структур [5—12], из-за отсутствия данных по иммунизации искусственными Т-антигенами ставалось неясным, является ли необходимой в составе Т-антигена аминокислота (серин или треонин) или достаточно иметь α -связанный с простым спейсером дисахарид. В работе [15] нами показано, что для получения моноспецифических анти-Т-антител, узнающих природный антиген, может быть использован достаточно простой искусственный антиген (IV). В синтезе биозида (I) [16], а также во всех других упоминавшихся синтезах [5—12] на ключевой стадии — α -галактозаминировании спейсеров (или остатка β -гидроксиаминокислоты) в качестве гликозилирующих агентов использовались производные 2-азидо-2-дезоксигалактозы. В данной работе описан новый, значительно более простой путь синтеза искусственного антигена (IV), в котором на ключевой стадии синтеза биозида (I) применяется аномеризация соответствующего β -галактоза-

* Научно-исследовательский институт тоговых лекарственных средств Минмедпрома СССР, Москва.

минида или непосредственное α -гликозилирование спейсера пентаацетатом *D*-галактозамина.



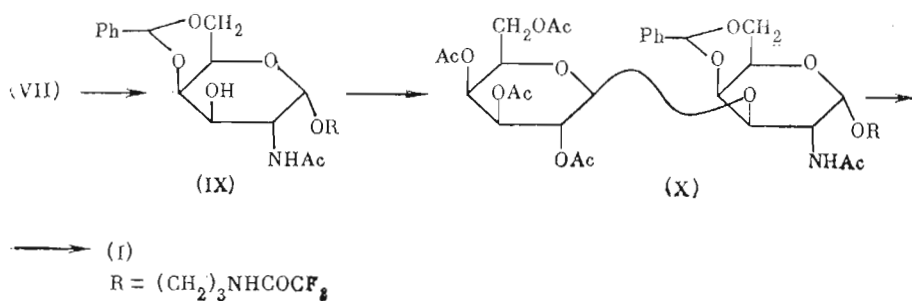
Изомеризация β -алкил- и арилгликозидов нейтральных моносахаридов в α -аномеры, один из препаративных методов синтеза некоторых простых α -гликозидов, происходит под действием кислот (обычно сильных кислот Льюиса) [17—19]. Для 2-ацетамино-2-дезоксисахаридов такой путь до сих пор не был реализован из-за преобладания других направленных реакций, главным образом циклизации в оксазолины (см., например, [20]). Опыты, в которых катализатором был взят эфират трехфтористого бора, в нашем случае также показали, что β -гликозид (VI) (полученный из α -хлорида (V)) при 20° С изомеризуется в α -аномер (VII) крайне медленно, а при повышении температуры образуется в основном оксазолин (VIII).



Соотношение продуктов реакции резко меняется при замене катализатора на сильную протонную трифторметансульфокислоту: при 90—100° С в нитрометане в первые часы реакции обнаруживаются (по ТСХ) α -гликозид (VII) и сравнимые количества оксазолина (VIII); через 24 ч остается не более 20% исходного β -гликозида (VI) и следы оксазолина, главным продуктом реакции становится α -гликозид (VII). α -Аномер (VII) легко отделяется от исходного β -аномера препаративной хроматографией. В приведенных условиях α -аномер (VII) был получен с выходом 50—60%.

Найденные условия аномеризации позволили предложить еще более простой вариант синтеза гликозида (VII). Полный ацетат галактозамина (в виде смеси аномеров, получен ацетилированием *N*-ацетил-*D*-галактозамина) гликозилировал 3-(трифторацетиламино)пропанол при 90—100° С за 20 ч в присутствии катализаторной смеси $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H} + \text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. По-видимому, кислота Льюиса катализирует образование оксазолина (VIII) из перацетата, а протонная кислота — гликозилирование спирта образовавшимся оксазолином, а также последующую аномеризацию. Этот вариант синтеза хотя и дает более низкий выход гликозида (VII), однако исключает стадии получения α -хлорида (V) и β -гликозида (VI).

Деацетилирование соединения (VII) по Земплеру и последующая реакция с α, α -диметоксилолуолом дали производное (IX).



Гликозилирование последнего ацетобромгалактозой¹ в присутствии трифлата серебра привело к дисахариду (X); далее удалением бензильденовой и ацетильных защитных групп получен биоизид (I), идентичный синтезированному ранее [16].

Неогликопротеины получали следующим образом. N-Трифторацетильную группу биоизиды (I) удаляли анионитом в OH^- -форме, аминопропилгликозид (II) ацилировали пентафторфениловым эфиром моноэтилового эфира адипиновой кислоты, полученный эфир (III) превращали в гидразид действием гидразингидрата в этаноле, а затем в азид действием четырехоксида азота [24]. Азид конъюгировали с белками (бычий сывороточный альбумин (БСА) и цитохром *c*) по методу [22] в следующих условиях: рН 8,9—9,0, 4° С, 20 ч. Полученный конъюгат с БСА содержал 7,5% (по весу) углеводов (14 дисахаридных звеньев на молекулу белка), а конъюгат с цитохромом *c* — 10% (по весу) углеводов (4-дисахаридных звена на молекулу белка). Схема иммунизации неогликопротеином (IV), а также характеристика специфичности полученных антител обсуждаются в работе [15].

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли на приборе Boetius (ГДР). Оптические вращения измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141 (США) при 20—25° С. Спектры ЯМР сняты на приборе Varian SC-300 (США). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60F-254 (Merck, ФРГ), пятна обнаруживали 5% раствором серной кислоты в метаноле при 150° С. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L 40—100 мкм (Chemapol, ЧССР) и на нейтральной окиси алюминия активности II по Брокману (ЧССР). ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5710A с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке (50 м × 0,24 мм) с фазой SE-30 при 140—220° С (2°/мин), газ-носитель — гелий. Трифторметансульфатокислота — препарат фирмы Merck (ФРГ), эфират трехфтористого бора — препарат производства «Союзреактив».

2-Ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- α -D-галактопиранозилхлорид (V). Перемешивали 15,5 г (70 ммоль) N-ацетил-D-галактозамина, 150 мл пиридина и 100 мл уксусного ангидрида до полного растворения, раствор полученного перацетата упарили досуха. Остаток растворили в смеси 400 мл дихлорметана и 200 мл диметилформамида, добавили 8,1 г (80 ммоль) гидразинацетата [23, 24] и перемешивали 6 ч. Затем раствор охладили и прибавили при 0° С по каплям 10,5 мл (150 ммоль) тионилхлорида, выдерживали при 0° С в течение 3 ч, затем промыли 3 раза холодной водой, раствором бикарбоната калия, нанесли на колонку (5 × 5 см) с окисью алюминия и элюировали бензолом 13,5 г хлорида (V) с незначительной примесью перацетата (ТСХ в системе хлороформ — метанол, 12 : 1). Полученный хлорид сразу использовали для гликозилирования.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- β -D-галактопиранозид (VI). Смесь 13,5 г (~35 ммоль) хлорида (V), 12 г (70 ммоль) 3-(трифторацетамидо)пропанола [25], 22 г (62 ммоль) цианида ртути, 0,5 г бромида ртути и 10 г сит 4 Å в 100 мл 1,2-дихлорэтана перемешивали 4 сут при 20° С. Затем смесь разбавили 0,5 л хлорофор-

ма, профильтровали, промыли водой, раствором бикарбоната калия, высушили хлоридом кальция, упарили, остаток перекристаллизовали из смеси ацетон — эфир — гексан, получили 5,5 г гликозида (VI). Маточный раствор упарили, остаток растворили в метаноле, добавили 2 мл 1 М метилата натрия в метаноле. Когда дезацетилирование закончилось (контроль по ТСХ), раствор упарили и кристаллизацией из ацетонитрила получили чистый (3-трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-галактопиранозид, ацетилированием которого получено дополнительное количество триацетата (VI). Суммарный выход 9,2 г, т. пл. 122,5° С, $[\alpha]_D -42^\circ$ (с 1, хлороформ). ЯМР (CDCl₃): 1,90 м (2H, CCH₂C); 1,98 с, 2,02 с, 2,06 с, 2,17 с (12H, 4Ac); 3,33 м, 3,64 м (4H, OCH₂CCH₂N); 4,64 д (1H, J_{1,2} 8,5 Гц, H-1); 5,98 д (1H, J_{NH,2} 8,5 Гц, NHAc); 7,56 м (1H, NHCOCF₃). Найдено, %: С 45,52; Н 5,49, N 5,50. C₁₉H₂₇F₃N₂O₁₀. Вычислено, %: С 45,6, Н 5,4, F 11,4, N 5,6.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-3,4,6-три-О-ацетил-2-дезоксид-α-D-галактопиранозид (VII). А. К раствору 4 г (8 ммоль) β-гликозида (VI) в 250 мл нитрометана прибавили 0,3 мл трифторметансульфокислоты и выдерживали 72 ч при 100° С. Темный раствор упарили до объема 50 мл, нанесли на колонку (20 × 2 см) с окисью алюминия и элюировали смесью хлороформ — толуол (4 : 1) 2,0—2,4 г (50—60%) α-гликозида (VII), т. пл. 121,5° С (хлороформ — эфир), $[\alpha]_D +73^\circ$ (с 0,8, хлороформ), ЯМР (CDCl₃): 1,92 м (2H, CCH₂C); 2,00 с, 2,01 с, 2,06 с, 2,18 с (12H, 4Ac); 3,43 м, 3,78 м (4H, OCH₂CCH₂N); 4,61 дд (1H, J_{2,3} 11,5 Гц, J_{2, NH} 9,5 Гц, J_{1,2} 3,5 Гц, H-2); 4,88 д (1H, J_{1,2} 3,5 Гц, H-1); 6,21 д (1H, J_{2, NH} 9,5 Гц, NHAc); 7,33 м (1H, NHCOCF₃). Найдено, %: С 45,65, Н 5,41. C₁₉H₂₇F₃N₂O₁₀. Вычислено, %: С 45,6, Н 5,4.

Б. 15 г (68 ммоль) N-ацетил-D-галактозамина, 100 мл пиридина и 60 мл уксусного ангидрида перемешивали 15 ч при 25° С, раствор упарили в вакууме, остаток упарили несколько раз с толуолом и растворили в 400 мл нитрометана. Прибавили 17,1 г (100 ммоль) 3-(трифторацетамидо)пропанола, 5 мл BF₃·Et₂O и 2 мл трифторметансульфокислоты, выдерживали 20 ч при 90—100° С, охладили, упарили до объема 100 мл и нанесли на колонку (35 × 5 см) с окисью алюминия. Элюировали смесью хлороформ — толуол (3 : 2 → 4 : 1) 10 г (30%) α-гликозида (VII).

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид-α-D-галактопиранозид (IX). К раствору 1 г (2 ммоль) гликозида (VII) в 100 мл метанола прибавили 0,1 мл 1 М метилата натрия в метаноле и выдерживали 5 сут при 20° С. Раствор обработали катионитом IR-120 (H⁺), упарили, кристаллизацией остатка из этанола получили аналитический образец (3-трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-2-дезоксид-α-D-галактопиранозид, т. пл. 153° С, $[\alpha]_D +136^\circ$ (с 2, метанол). Полученный триол растворили в 15 мл диметилформамида, прибавили 0,91 г (6 ммоль) α,α-диметокситолуола и 50 мг 4-толуолсульфокислоты, выдерживали 24 ч при 20° С и атмосферном давлении, 45 мин при 1 мм рт. ст. Затем прибавили 1 мл пиридина и растворители удалили в вакууме. Остаток промыли эфиром и перекристаллизовали из этанола, получили 0,59 г (64%) соединения (IX), т. пл. 232—234° С, $[\alpha]_D +123^\circ$ (с 0,4, метанол). ЯМР (DMSO-d₆): 1,78 м (2H, CCH₂C); 1,85 с (3H, Ac); 4,58 д (1H, 7 Гц, OH); 4,80 д (1H, J_{1,2} 3,5 Гц, H-1); 5,61 с (1H, PhCH); 7,40—7,50 м (6H, Ph + NH); 9,33 м (1H, NHCOCF₃). Найдено, %: С 51,95, Н 5,46, N 6,20. C₂₀H₂₅F₃N₂O₇. Вычислено, %: С 51,95, Н 5,45, N 6,06.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-3-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-галактопиранозил)-4,6-О-бензилиден-2-дезоксид-α-D-галактопиранозид (X). Смесь 1,19 г (2,6 ммоль) α-гликозида (IX), 0,35 мл (3,0 ммоль) тетраметилмочевины, 0,77 г (3,0 ммоль) трифлата серебра, 3 г сит 4 А и 50 мл дихлорметана выдерживали в токе сухого азота 30 мин при 20° С, затем в течение 4 ч прибавляли раствор 1,64 г (4 ммоль) ацетобромгалактозы в 15 мл дихлорметана. Через 24 ч добавили еще 0,19 г (0,75 ммоль) трифлата серебра, 0,1 мл (0,83 ммоль) тетраметилмочевины и 0,62 г (1,5 ммоль) ацетобромгалактозы. Через 24 ч смесь разбавили хлороформом, профильтровали, фильтрат промыли водой, раствором бикарбоната

натрия, водой, высушили сульфатом натрия. Хроматографией на силикагеле (колонка 30 × 3 см, хлороформ — метанол, 49 : 1) и последующей кристаллизацией получили 1,02 г (50%) дисахарида (X), т. пл. 220—221° С (хлороформ — эфир), $[\alpha]_D +82^\circ$ (с 1, хлороформ). ЯМР (CDCl₃): 1,75 м (2H, CCH₂C); 2,00 с, 2,04 с, 2,06 с, 2,10 с, 2,18 с (15H, 5Ac); 4,74 д (1H, J_{1,2} 8 Гц, H-1'); 4,87 д (1H, J_{1,2} 3 Гц, H-1); 5,58 с (1H, PhCH); 6,45 д (1H, J 8,5 Гц, NHAc); 7,40—7,57 м (5H, Ph); 7,69 м (1H, NHCOCF₃). Найдено, %: С 51,53, Н 5,40. C₃₄H₄₃F₃N₂O₁₆. Вычислено, %: С 51,52, Н 5,43.

(3-Трифторацетамидопропил)-2-ацетамидо-3-О-(β-D-галактопиранозил)-2-дезоксис-α-D-галактопиранозид (I). Выдерживали 500 мг (0,63 ммоль) дисахарида (X) с 30 мл 60% уксусной кислоты 1,5 ч при 100° С, затем раствор упарили, остаток растворили в 30 мл метанола и прибавили 0,2 мл 1 М метилата натрия в метаноле. Через 4 сут (20° С) раствор обработали катионитом IR-120 (H⁺), упарили, остаток перекристаллизовали из этанола, получили 250 мг (75%) биозида (I), т. пл. 205—208° С, $[\alpha]_D +82^\circ$ (с 1, вода), что совпадает с константами вещества, полученного ранее [16].

Получение неогликопротеинов. Растворили в смеси 10 мл этанола и 10 мл воды 100 мг (0,19 ммоль) биозида (I), прибавили 2 мл анионита Amberlyst A-26(OH⁻) (Fluka) и перемешивали 2 сут при 20° С. Раствор упарили, остаток растворили в 25 мл метанола и прибавили раствор 0,44 ммоль пентафторфенилового эфира этилового эфира адипиновой кислоты в 4 мл оксолана (раствор активированного эфира получали из 5 ммоль моноэтилового эфира адипиновой кислоты, 5,5 ммоль пентафторфенола и 5 ммоль дициклогексилкарбодиимида в 20 мл оксолана, осадок дициклогексимочевины отделяли и промывали 25 мл оксолана). Раствор выдерживали 24 ч при 20° С, упарили, остаток на стенках колбы несколько раз промыли эфиром для удаления пентафторфенола и избытка активированного эфира. Полученный этиловый эфир (III) растворили в 15 мл этанола, содержащего 1,5 мл гидразингидрата, и выдерживали 7 сут при 20° С. Раствор упарили, еще раз упарили с 5 мл воды, высушили в вакуум-эксикаторе над пятиокисью фосфора, получили 110 мг (99%) гидразида.

27 мг (46 мкмоль) гидразида суспендировали в 1,5 мл диметилформамида, охладили до -40° С и прибавили 145 мкл охлажденного 0,48 М раствора четырехоксида азота (69 мкмоль) в дихлорметане [21]. Выдерживали смесь при -10 ÷ -20° С 30 мин, полученный раствор азидов разделили на две части (⁴/₅ и ¹/₅). Большую порцию конъюгировали с 80 мг БСА, вторую — с 20 мг цитрохрома с, рН 8,9—9,0, 20 ч при 4° С по методу [22]. Количество углеродных цепей в конъюгатах устанавливали, подвергая образцы кислотному метанолизу [26] и анализируя метилгликозиды в виде ТМС-производных при помощи ГЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kim Z., Uhlenbruck G. Z. Immun. Forsch., 1966, В. 130, № 1, S. 88—99.
2. Springer G. F., Desai P. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 61, № 2, p. 420—425.
3. Irle C., Piquet P.-F., Vassali P. Cell Immun., 1977, v. 31, № 242, p. 32—43.
4. Longenecker B. M., Rahman A. F. R., Leigh J. B., Purser R. A., Greenberg A. H., Willans D. J., Keller O., Petrik P. K., Thay T. Y., Suresh M. R., Noujaim A. A. Int. J. Cancer, 1984, v. 33, № 1, p. 123—129.
5. Paulsen H., Hölck J.-P. Carbohydr. Res., 1982, v. 109, № 1, p. 89—107.
6. Paulsen H., Paal M. Carbohydr. Res., 1983, v. 113, № 2, p. 203—218.
7. Paulsen H., Jacquinet J.-C., Rust W. Carbohydr. Res., 1982, v. 104, № 2, p. 195—219.
8. Ratcliffe R. M., Baker D. A., Lemieux R. U. Carbohydr. Res., 1981, v. 93, № 1, p. 35—41.
9. Bencomo V. V., Jacquinet J.-C., Sinaj P. Carbohydr. Res., 1982, v. 110, № 2, p. C9—C11.
10. Piskorz C. F., Abbas S. A., Matta K. L. Carbohydr. Res., 1984, v. 126, № 1, p. 115—124.
11. Bencomo V. V., Sinaj P. Gly conjugate J., 1984, v. 1, № 1, p. 5—8.

12. Paulsen H., Paal M. Carbohydr. Res., 1984, v. 135, № 1, p. 71—84.
13. Springer G. F., Cheingsong-Popov R., Schirmacher V., Desai P. R., Tegtmeier H. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 9, p. 5702—5706.
14. Springer G. F., Cantrell J. L., Desai P. R., Tegtmeier H. Clin. Immunol. Immunopathol., 1982, v. 22, № 1, p. 29—35.
15. Медведев А. Э., Габриэлян Н. Д., Бовин Н. В., Хорлин А. Я. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 908—919.
16. Бовин Н. В., Землянухина Т. В., Хорлин А. Я. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 9, с. 1256—1264.
17. Pacsu E. J. Amer. Chem. Soc., 1930, v. 52, № 6, p. 2563—2571.
18. Kuhn M., von Wartburg A. Helv. chim. acta, 1968, v. 51, № 7, p. 1631—1641.
19. Lindberg B. Acta chim. scand., 1948, v. 2, № 2, p. 426—432.
20. Salo W. L., Fletcher H. G., Jr. J. Org. Chem., 1968, v. 33, № 9, p. 3585—3588.
21. Pinto B. M., Bundle D. R. Carbohydr. Res., 1983, v. 124, № 2, p. 313—318.
22. Inman J. K., Merchant B., Claflin L., Tacey S. E. Immunochimistry, 1973, v. 10, № 3, p. 165—174.
23. Excoffier G., Gagnaire D., Utille J.-P. Carbohydr. Res., 1975, v. 39, № 2, p. 368—373.
24. Бовин Н. В., Зурабян С. Э., Хорлин А. Я. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1981, № 12, с. 2806—2808.
25. Бовин Н. В., Иванова И. А., Хорлин А. Я. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 5, с. 662—670.
26. Pritchard D. J., Todd C. W. J. Chromatogr., 1977, v. 133, № 1, p. 133—139.

Поступила в редакцию
11.IX.1985

ISOMERIZATION OF TRIFLUOROACETAMIDOPROPYL-2-ACETAMIDO- 2-DEOXY- β -D-GALACTOPYRANOSIDE INTO α -ANOMER. A FACILE SYNTHESIS OF ARTIFICIAL T-ANTIGEN

BOVIN N. V.*, ZEMLYANUKHINA T. V., KHORLIN A. Ya.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; * Research Institute of Medicinal Preparations,
Ministry of Medical Industry of the USSR, Moscow*

Bioside Gal β 1-3GalNAca1 — O(CH₂)₃NHCOCF₃ has been synthesized. The key α -glycoside GalNAca1-O(CH₂)₃NHCOCF₃ (peracetate) was obtained either by isomerization of its β -anomer with trifluoromethanesulfonic acid, or by direct glycosylation of 3-(trifluoroacetamido)propanol with *D*-galactosamine (anomeric pentaacetate) in the presence of a mixture of trifluoromethanesulfonic acid and boron trifluoride etherate. De-O-acetylated α -galactosaminide obtained was further transformed into benzylidene derivative, the latter was glycosylated with acetobromogalactose to give the protected α -bioside. The removal of the protecting groups gave the (3-aminopropyl)- α -bioside, which was subsequently immobilized on bovine serum albumin and cytochrome *c*.