



УДК 547.455.9.057

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ЭТИЛТИОГЛИКОЗИДА N-ГЛИКОЛИЛНЕЙРАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ГЛИКОЗИЛДОНОРОВ

© 1996 г. Л. А. Симеони*, Н. Э. Байрамова#, Н. В. Бовин

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

Поступила в редакцию 29.02.96 г.

Описан синтез полностью защищенного производного тиогликозида N-гликолилнейраминной кислоты исходя из соответствующего производного N-ацетилнейраминной кислоты путем депротекции до свободного тиогликозида с последующим N-гликолилированием, этерификацией и ацетилированием. При использовании последовательности реакций с обращенным порядком стадий этерификации и гликолилирования получено производное N-гликолилнейраминной кислоты, содержащее две гликолилированные гидроксильные группы. Оба соединения могут быть использованы в реакциях сиалирования, промотируемых тиофильными реагентами.

Ключевые слова: N-ацетилнейраминная кислота, N-гликолилнейраминная кислота, сиалирование, сиалозиды, тиогликозиды.

N-Гликолилнейраминная кислота (Neu5Gc) – одна из наиболее распространенных сиаловых кислот позвоночных. Из позвоночных лишь птицы и человек не способны в норме синтезировать Neu5Gc [1]. Среди множества человеческих опухолеассоциированных антигенов углеводной природы известны антигены с так называемой HD-активностью, которую объясняют присутствием Neu5Gc в составе олигосахаридных цепей гликоконъюгатов, экспрессируемых опухолевыми клетками ([2] и ссылки, цитируемые там). Настоящая работа – часть программы лаборатории химии углеводов ИБХ по синтезу сиалосодержащих олигосахаридов и неогликоконъюгатов на их основе для медико-биологических исследований. В работе описывается синтез двух производных этилтиогликозида Neu5Gc – потенциальных гликозилдоноров в синтезе олигосахаридов, содержащих Neu5Gc.

Для синтеза сиалосодержащих олигосахаридов наиболее эффективны два типа реакции гликозиллирования, промотируемой тиофильными реагентами: в первом [3–6] в качестве донора гликозильного остатка используется алкил- или

арилтиогликозид, во втором [7] – производное, содержащее при C2 остаток этилксантогеновой кислоты.

Все опубликованные до настоящего времени работы по сиалированию этими методами использовали N-ацетилнейраминную кислоту (Neu5Ac). Для синтезов Neu5Gc-содержащих олигосахаридов мы выбрали реакцию первого типа, так как в этом случае гликозилдонор содержит тиогликозидную функцию, способную выдержать большое число манипуляций с защитными группами. Это позволяет синтезировать целевое Neu5Gc-производное (IX) исходя из Neu5Ac-производного (III) с уже готовой тиогликозидной функцией.

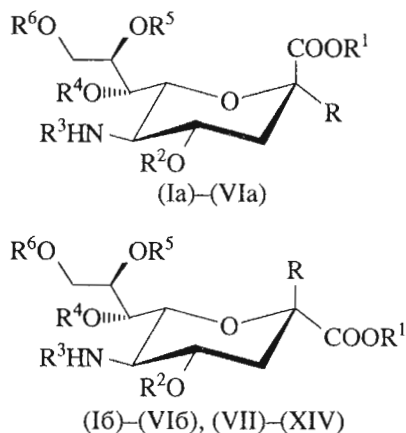
В данной работе предлагаются три схемы синтеза (A, B, C) производных (IX) и (XII) этилтиогликозида Neu5Gc исходя из Neu5Ac-предшественника – β-тиогликозида (IIIб). Для реакции сиалирования аномерная чистота тиогликозида не имеет значения, и большинство авторов пользуется, как правило, смесью аномеров. Индивидуальный β-тиогликозид (IIIб) в качестве исходного мы выбрали во избежание трудностей интерпретации ТСХ при контроле на промежуточных стадиях.

Стереоселективный синтез тиогликозидов (III) описан в работе [8], согласно которой β-аномер (IIIб) получается при катализируемом эфира-том трехфтористого бора тиолировании защищенного β-ацетата (Iб) этилмеркаптаном. Получение индивидуальных аномерных ацетатов (Ia, Iб) описано в работе [9], в которой показано, что прямое ацетилирование метилового эфира Neu5Ac

Сокращения: Neu5Ac – N-ацетилнейраминная кислота, Neu5Gc – N-гликолилнейраминная кислота, DAP – л-диметиламинопиридин, Gc(Ac) – O-ацетилгликолил-, Py – пиридин, FABMS (fast atom bombardment mass spectrometry) – масс-спектрометрия с бомбардировкой ускоренными атомами, КХ – колоночная хроматография.

* Стипендиат Национального совета исследований по науке и технике (CNPq – Бразилия, Бразилия).

Автор для переписки.



Соединение	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
(Ia, б)	OAc	Me	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
(IIa, б)	OH	Me	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
(IIIa, б)	SEt	Me	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
(IVa, б)	SEt	Me	H	Ac	H	H	H
(Va, б)	SEt	H	H	Ac	H	H	H
(VIa, б)	SEt	H	H	H	H	H	H
(VII)	SEt	H	H	Gc(Ac)	H	H	H
(VIII)	SEt	Me	H	Gc(Ac)	H	H	H
(IX)	SEt	Me	Ac	Gc(Ac)	Ac	Ac	Ac
(X)	SEt	Me	H	H	H	H	H
(XI)	SEt	Me	Gc(Ac)	Gc(Ac)	H	H	Gc(Ac)
(XII)	SEt	Me	Gc(Ac)	Gc(Ac)	Ac	Ac	Gc(Ac)
(XIII)	SEt	Me	Gc(Ac)	Gc(Ac)	Gc(Ac)	Gc(Ac)	Gc(Ac)
(XIV)	SEt	Me	H	Gc	H	H	H

действием уксусного ангидрида в пиридине приводит к смеси аномеров в соотношении $\beta : \alpha = 3.6 : 1$. Для увеличения доли β -ацетата мы провели двухстадийное ацетилирование метилового эфира

Neu5Ac: сначала ацетоллиз действием 60% хлорной кислоты в уксусном ангидриде, который, согласно [9–11], приводит к известному β -тетраацетату (IIб) со свободной OH-группой при C2 [9], выделяемому из реакционной смеси прямой кристаллизацией. Не выделяя индивидуальный β -ацетат, полученную смесь ацетатов (IIa, б) мы ввели в реакцию доацетилирования действием уксусного ангидрида в пиридине в присутствии DAP. Аномерная смесь ацетатов (Ia, б) в соотношении $\beta : \alpha = 5.5 : 1$ с выходом 79% (считая на исходную Neu5Ac) была получена после очистки с помощью КХ. Соотношение аномеров определялось благодаря различию в их ¹H-ЯМР-спектрах химических сдвигов атомов H6 и KCCB $J_{6,7}$ [9]. Тиолирование полученной смеси ацетатов в условиях [11] дало α - и β -тиогликозиды (IIIб) и (IIIа) с выходами 75 и 14% соответственно.

Для пере-N-ацилирования тиогликозида (IIIб) в целевое производное Neu5Gc (IX) было осуществлено его полное деблокирование в аминокислоту (VIб) (схема 1) последовательным O-деацетилированием по Земплону, омылением и N-деацетилированием путем гидразинолиза в условиях работы [12] по схеме (IIIб) \rightarrow (IVб) \rightarrow (Vб) \rightarrow (VIб) без специальной очистки на промежуточных стадиях с общим выходом 80%. Аналогично из α -аномера (IIIа) синтезирована кристаллическая аминокислота (VIa). Строение обоих аномеров подтверждено на основании данных ¹H-ЯМР и FABMS.

Были опробованы три варианта (А, В, С) перевода аминокислоты (VIб) в тиогликозид Neu5Gc (IX) (схема 2). В вариантах А и В в качестве гликолилирующего реагента использовался *n*-нитрофениловый эфир ацетоксиуксусной кислоты (XV), получаемый из соответствующего хлорангидрида и *n*-нитрофенола. Варианты А и В различались тем, что в первом случае кислоту (VIб) сначала N-гликолилировали, а затем этерифицировали

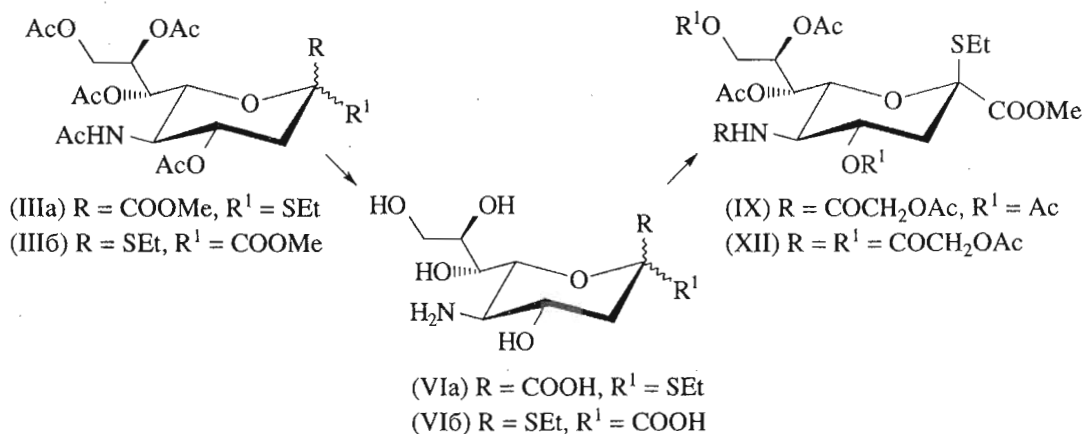


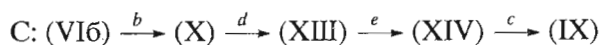
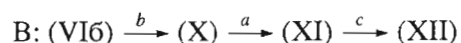
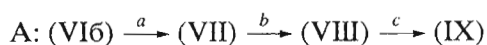
Схема 1.

карбоксильную группу с получением эфира (VII), а в варианте В – наоборот, сначала проводили этерификацию карбоксильной группы, а затем N-гликолилирование полученного метилового эфира (X).

Последовательное N-гликолилирование, этерификация действием 0.14 н. HCl в MeOH и O-ацетилирование действием уксусного ангидрида в пиридине соответственно варианту А (схема 2) дали целевой β-тиогликозид (IX) с выходом 34%. При этом в качестве побочного продукта был выделен также тиогликозид (IIIб) с выходом 23%.

В синтезе по схеме варианта В, по которому гликолилированию в аналогичных условиях (6 экв. активированного эфира (XV) на исходный тиогликозид (IIIб)) подвергалась не кислота (VIб), а ее метиловый эфир (X), имело место параллельное бис- и моно-O-ацетоксиацетилирование. Продукт реакции гликолилирования был доацелирован действием Ac₂O в пиридине. Из полученной смеси фракционированием с помощью КХ и препаративной ВЭЖХ были выделены продукт бис-O-ацетоксиацетилирования – кристаллический тиогликозид (XII) с выходом 42%, тиогликозид (IX) с выходом 3%, а также суммарная фракция изомерных бис- и трис-N,O-Gc(Ac)-производных. Эта фракция была подвергнута O-дезацелированию с последующим ре-O-ацетилированием, что привело к тиогликозиду (IX) с выходом 17%. Таким образом, суммарный выход N-ацетоксиацетилированных производных (IX + XII) составил 62%. С выходом 6% был выделен также N-ацетат (IIIб). Образование N-ацетилированного продукта, идентичного исходному тиогликозиду (IIIб), можно объяснить частичным O → N-переносом ацетильной группы из ацетоксиацетилирующего агента (XV) на стадии N-гликолилирования аминокислоты (VIб) (23% в варианте А) или ее метилового эфира (X) (6% в варианте В). Образование N-Ac-производного (IIIб) можно объяснить также обратной реакцией N-ацетилирования в присутствии не удаленного полностью N-ацетилгидразина. Действительно, при использовании специально очищенного препарата кислоты (VIб) выход N-Gc(Ac)-производного (IX) по схеме А составил 45% (считая на (VIб)), а N-Ac-производное (IIIб) было выделено с выходом 10%.

В варианте С (схема 2) аминокислоту (VIб) последовательно обработали хлористым водородом в MeOH, N,O-ацелировали избытком хлорангидрида ацетоксиуксусной кислоты в пиридине, O-дезацелировали действием метилата натрия в смеси метанол–пиридин [13] и ре-O-ацетилировали действием Ac₂O в пиридине. Целевой тиогликозид (IX) был выделен при этом с выходом 49% наряду с тиогликозидом (IIIб), выход которого составил 17% (считая на исходный (IIIб)).



a: AcOCH₂COO–C₆H₄NO₂ (XV)/Et₃N;

b: HCl/MeOH; c: Ac₂O/Py;

d: AcOCH₂COCl/Py; e: MeONa/MeOH.

Схема 2.

Строение “нормального” продукта (IX) и продукта (XII), содержащего две O-ацетоксиацетильные группы, установлено путем сопоставления спектров ¹H-ЯМР и данных FABMS тиогликозидов (IIIб), (IX) и (XII). Спектр ¹H-ЯМР (см. таблицу и “Экспер. часть”) производного (IX) отличался от спектра (IIIб) наличием двух дублетов АВ-системы метиленовых протонов N-ацетоксиацетильной группы с большой КССВ (15.5 Гц) при δ 4.28 и 4.57 м. д. Спектр тригликолильного производного (XII) отличался от спектра моно-N-гликолильного производного (IX) наличием сигналов АВ-систем двух O-ацетоксиацетильных групп. Замена ацетильной группы при атоме азота на ацетоксиацетильную вызвала сдвиг сигнала протона C5-NH у производных (IX) и (XII) по сравнению с (IIIб) на 0.6 м. д. в сторону слабого поля. При этом сигналы остальных протонов, более удаленных от “пункта замены”, практически не изменили своих химических сдвигов в случае тиогликозида (IX). Интересно, что в случае тиогликозида (XII) в отличие от соединения (IX) достаточно выраженный сдвиг (0.05–0.08 м. д.) в сторону слабого поля по сравнению с (IIIб) испытывают протоны H9 и H4, косвенно свидетельствуя, что две OGc(Ac)-группы локализованы именно в этих положениях. Локализация OGc(Ac)-групп в соединении (XII) нами специально не доказывалась, и положение O9, O4 мы приписываем им на основании данных работы [14], где на примере избирательного ацетилирования метилового эфира β-метилогликозида Neu5Ac действием N-ацетил-имидазола в пиридине показано, что после C9-гидроксильной группы по активности в реакции ацетилирования следует гидроксильная группа при C4.

Таким образом, разработан синтез производных (IX) и (XII), являющихся потенциальными гликозилдодонорами остатка Neu5Gc в синтезе олигосахаридов. Интересно, что тиогликозидная функция сиаловой кислоты выдержала условия кислотного метанолиза, что позволило этерифицировать карбоксильную группу в аминокислоте (VI) и в N-гликолильном производном (VII) действием хлористого водорода в метаноле, не прибегая к этерификации действием диазометана.

Данные спектров ¹H-ЯМР ацилированных метиловых эфиров этилтиогликозидов Neu5Ac и Neu5Gc (CDCl₃)*

Соединение	δ, м.д.										
	H3a дд (т)	H3e дд	H4 ддд	H5 ддд	H6 дд	H7 дд	H8 ддд	H9a дд	H9b дд	NH д	COOMe с
(IIIa)	1.99	2.72	4.87	4.05	3.84	5.33	5.38	4.33	4.12	5.16	3.81
(IIIб)	2.14	2.53	5.28	4.09	4.34	5.44	5.15	4.79	4.17	5.33	3.82
(IX)	2.11	2.50	5.30	4.05	4.38	5.38	5.12	4.79	4.14	5.92	3.80
(XII)	2.11	2.53	5.36	4.07	4.39	5.34	5.12	4.84	4.23	5.95	3.79
КССВ, Гц											
	J _{3e,3a}	J _{3e,4}	J _{3a,4}	J _{4,5}	J _{5,6}	J _{6,7}	J _{7,8}	J _{8,9a}	J _{8,9b}	J _{9a,9b}	J _{NH, CH}
(IIIa)**	12.5	4.5	12.5	10.5	11.0	2.2	8.0	3.0	8.0	12.5	10.0
(IIIб)**	12.5	5.0	12.0	10.5	10.5	2.5	3.0	2.3	8.0	12.5	10.5
(IX)	12.5	5.0	12.5	11.0	10.5	2.5	3.0	2.5	8.0	12.5	10.5
(XII)	12.5	5.0	10	11.0	10.0	2.5	2.5	2.5	8.0	12.5	10.0

* Данные для Ac, SEt и Gc см. в "Экспер. части".

** Ср. данные для раствора в C₆D₆ [8].

Во всех трех вариантах критической стадией, дающей наименьший выход (45–62%), является гликолилирование. Это делает все три варианта препаративно почти равнозначными. Описанный недавно [15] трехстадийный переход от производного бензилгликозида Neu5Ac в соответствующее производное бензилгликозида Neu5Gc, включающий избирательное N-деацетилирование действием ангидрида трифторметансульфокислоты в присутствии 2,6-ди-*трет*-бутилпиридина с последующим мягким кислотным гидролизом (имидата в амин), выглядит более предпочтительным по сравнению с нашим с точки зрения числа стадий. Однако он дает более низкий выход (24%) конечного продукта из-за низкой (37%) эффективности двухстадийного N-деацетилирования.

Синтон (XII) в качестве донора остатка Neu5Gc расширяет круг возможностей для сиалирования. По нашим предварительным данным, доля α-гликозида при сиалировании первичных спиртов этим производным выше, чем в случае производного (IX).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ¹H-ЯМР (δ, м. д. относительно Me₄Si) сняты на спектрометре WM-500 Bruker в CDCl₃. Приведены химические сдвиги в миллионных долях и КССВ (J) в герцах. Оптическое вращение измеряли на поляриметре DIP-360 фирмы Jasco. Масс-спектры сняты на приборе Kratos MS 50 TC, FAV TC, газ-реагент – ксенон, энергия 8 кэВ, матрица – глицерин. КХ проводили на силикагеле (Merck), ТСХ – на стеклянных или алюминиевых пластинках с силикагелем 60 (Merck) в системах А

(изопропиловый спирт–этилацетат–вода, 4 : 3 : 2), Б (хлороформ–метанол, 9 : 1), В (гексан–хлороформ–изопропиловый спирт, 4 : 2 : 1), Г (изопропиловый спирт–этилацетат–вода, 8 : 6 : 1), Д (гексан–хлороформ–изопропиловый спирт, 8 : 4 : 1), вещества обнаруживали нагреванием с фосфорной кислотой. ВЭЖХ осуществляли на колонках с сорбентом Силасорб 600 (6 мкм) с рефрактометрическим детектором в системе Е (гексан–этилацетат–изопропиловый спирт, 8 : 4 : 1). DMF перед употреблением перегоняли в вакууме над нингидрином. Растворы веществ в хлороформе и бензоле высушивали фильтрованием через слой ваты. Хлорангидрид ацетоксиуксусной кислоты получали по методу [16].

n-Нитрофениловый эфир ацетоксиуксусной кислоты (XV). К раствору *n*-нитрофенола (68 мг, 465 мкмоль) и триэтиламина (65 мкл, 465 мкмоль) в 4 мл сухого бензола добавляли раствор (50 мкл, 465 мкмоль) хлорангидрида ацетоксиуксусной кислоты в 0.4 мл сухого бензола, осадок отделяли, промывали бензолом, объединенные фильтраты упаривали и получали эфир (XV) (выход количественный), который использовали для N-гликолилирования.

Метиловый эфир 5-ацетида-4,7,8,9-тетра-О-ацетил-3,5-дидезокси-β-D-глицеро-D-галакто-2-нонулопиранозоновой кислоты (IIIб). К смеси 3.15 г (10.2 ммоль) Neu5Ac в 300 мл абс. метанола добавляли 2.4 мл трифторуксусной кислоты и оставляли на 16 ч при комнатной температуре. Раствор упаривали, к остатку добавляли 3–5 мл бензола и упаривали, операцию повторяли 4 раза, получали 3.34 г хроматографически однородного метилового эфира Neu5Ac, R_f 0.60 (А) (исходная

Neu5Ac имела R_f 0.30). Полученный продукт подвергли ацетолизу в условиях работы [9]. К раствору 75 мкл 60% хлорной кислоты в 10 мл As_2O_3 , нагретому до 40°C, в течение 1 ч добавляли при перемешивании небольшими порциями 3.32 г метилового эфира Neu5Ac, оставляли при перемешивании на 2 ч при 40°C. При 20°C осторожно добавляли 100 мл насыщенного раствора NaCl в воде, экстрагировали хлороформом (6 × 30 мл). Объединенные хлороформные экстракты промывали раствором $NaHCO_3$ (2 × 50 мл), водой (2 × 50 мл), высушивали, упаривали и получали 5 г (100%) сырого тетраацетата (IIб), ТСХ (Б): R_f 0.50 (IIб, главный компонент) и 0.55 (IIа, минорный компонент). Температура плавления кристаллического образца (IIб) 150–153°C (этилацетат–гексан), $[\alpha]_D^{20}$ -7.4° (с 1, хлороформ). Ср. т. пл. 147–148°C, $[\alpha]_D$ -2.1° [9].

Метилловый эфир 5-ацетида-2,4,7,8,9-пента-О-ацетил-3,5-дидезокси-β- и α-D-глицеро-D-галакто-2-нонупиранозидонової кислоты (Iб) и (Iа). Полученный как описано выше сырой продукт (IIа, б) (5 г) выдерживали 16 ч в 40 мл пиридина и 19 мл As_2O_3 в присутствии 30 мг DAP при комнатной температуре, добавляли 2 мл воды, раствор концентрировали в вакууме до 30 мл, экстрагировали хлороформом (2 × 50 мл), экстракт промывали 1 н. HCl, водой, насыщенным раствором $NaHCO_3$, высушивали, упаривали, остаток подвергали КХ в градиенте изопропилового спирта (3 → 7%) в смеси хлороформ–гексан (1 : 2) и получали 4.22 г (79%) смеси аномеров (Iа, б) (β : α = 5.5 : 1), ТСХ (система В), R_f 0.47 (α-аномер), 0.35 (β-аномер). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): в числе других 4.70 (дд, 1H, $J_{6,7}$ 2.5, H6, α-аномер), 4.08 (дд, 5.5H, $J_{6,7}$ 1.5, H6, β-аномер).

Метилловый эфир (этил-5-ацетида-4,7,8,9-тетра-О-ацетил-3,5-дидезокси-2-тио-α- и β-D-глицеро-D-галакто-2-нонупиранозидонової кислоты (IIIа) и (IIIб)). К раствору 4.18 г (7.85 ммоль) смеси ацетатов (Iа, б) и 640 мкл (8.6 ммоль) этилмеркаптана в 60 мл сухого хлористого метилена добавляли 2.5 мл (19.63 ммоль) эфира бора, оставляли на 16 ч при комнатной температуре. Раствор разбавляли 60 мл хлороформа, промывали насыщенным раствором $NaHCO_3$ (2 × 100 мл), водную фазу экстрагировали хлороформом (5 × 50 мл), объединенные хлороформные экстракты высушивали, упаривали, остаток (4.14 г) подвергали КХ в градиенте изопропилового спирта (5 → 7%) в смеси гексан–хлороформ (2 : 1) и получали 3.16 г (75%) β-аномера (IIIб), R_f 0.55 (В), $[\alpha]_D^{20}$ -77.0° (с 1, хлороформ) (ср. $[\alpha]_D^{20}$ -74° [8]) и 0.60 г (14%) α-аномера (Iа), R_f 0.50, $[\alpha]_D^{20}$ +17.2° (с 1, хлороформ) (ср. $[\alpha]_D^{20}$ +21° [8]).

Этил-5-амино-3,5-дидезокси-2-тио-β-D-глицеро-D-галакто-2-нонупиранозидонової кислоты (VIб). К раствору 280 мг (525 мкмоль) тиогликозида (IIIб) в 15 мл сухого метанола добавляли 900 мкл 2 н. метилата натрия в метаноле и оставляли на 2 ч при комнатной температуре. Получали метиловый эфир (IVб), R_f 0.74 (0.95 у исходного (IIIб) (Г)). К реакционной смеси добавляли 5 мл воды и 450 мкл 2 н. метилата натрия в метаноле, оставляли на 16 ч при комнатной температуре, добавляли еще 450 мкл 2 н. метилата натрия, оставляли на 3 ч при комнатной температуре и получали Na-соль кислоты (Vб), R_f 0.50 (А) (у исходного Me-эфира (IVб) R_f 0.85). Раствор деионизовали до pH 5 катионитом КУ-2 (H⁺-форма), смолу отделяли, раствор фильтровали через Filtercell, упаривали и получали 150 мг (80%) кислоты (Vб). Кислоту (Vб) (100 мг, 274 мкмоль) нагревали с 2 мл гидразингидрата при 85°C в течение 69 ч, раствор охлаждали, гидразин удаляли соупариванием в вакууме с бутанолом (5 × 2 мл) и получали 100 мг сухого остатка, по данным ТСХ (система А) состоявшего из аминокислоты (VIб) (R_f 0.20) с небольшой примесью высокоидущего второго нингидринположительного вещества с R_f 0.60, по-видимому лактона (0.50 у исходной нингидринтрицательной кислоты (Vб)).

Аналитический образец (VIб): сырой продукт гидразинолиза, полученный из 93 мг (173 мкмоль) тиогликозида (IIIб), растворяли в 500 мкл воды и наносили на колонку с 2 г КУ-2 (H⁺-форма), промывали водой и далее элюировали 1.5 M NH_4OH . Элюат упаривали, остаток наносили на колонку с 2 г дауэкса 2 × 8 (ОН⁻-форма), промывали водой и далее 4 M $AcOH$ элюировали аминокислоту (VIб). Выход 43 мг (80%), $[\alpha]_D^{25}$ -120° (с 1, вода), -125° (с 1, 0.04 н. NaOH). FAB/MS: m/z 312 ($M + 1$). 1H -ЯМР-спектр (D_2O): 1.146 (т, 3H, J 7.5, CH_3CH_2S), 1.868 (дд, 1H, $J_{3a,3e}$ 14, $J_{3a,4}$ 11, H3a), 2.50 (м, 3H, CH_3CH_2S , H3e), 3.225 (дд ≈ т, 1H, $J_{5,6} = J_{3,4} = 10$, H5), 3.718 (дд ≈ д, 1H, $J_{7,8}$ 7, $J_{7,6}$ 0, H7), 3.741 (дд, 1H, $J_{9b,9a}$ 12, $J_{8,9}$ 4.5, H9b), 3.828 (дд, 1H, $J_{9a,8}$ 3, H9a), 3.921 (ддд, 1H, H8), 4.158 (дт, 1H, $J_{4,5}$ 10, H4), 4.480 (дд ≈ д, 1H, $J_{6,5}$ 10, H6).

Этил-5-амино-3,5-дидезокси-2-тио-α-D-глицеро-D-галакто-2-нонупиранозидонової кислоты (VIа). Аналогично описанному для получения (VIб) из 280 мг (525 мкмоль) тиогликозида (IIIа) дезацетилированием и омылением получали сырую кислоту (Va), которую подвергали гидразинолизу при 85°C в течение 72 ч, упаривали, остаток соупаривали с бутанолом и получали хроматографически однородный продукт с R_f 0.45 (ТСХ, система А). Продукт обрабатывали метанолом и выделяли 60 мг (36%) кристаллической аминокислоты (VIа); из маточного раствора после

обработки катионитом и анионитом, как описано выше, получали еще 74 мг (46%) продукта, т. пл. 210–230°C, $[\alpha]_D^{25} 0^\circ$ (с 1, вода), $[\alpha]_D^{25} -3.6^\circ$ (с 1, 0.03 н. NaOH). FABMS: m/z 312 ($M + 1$). ^1H -ЯМР-спектр (D_2O): 1.192 (т, 3H, J 7.5, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$), 1.752 (дд \approx т, $J_{3a,3e} = J_{3a,4} = 12.5$, H3a), 2.611 и 2.711 (два дкв по 1H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$), 2.814 (дд, 1H, $J_{3e,4} 4.5$, H3e), 3.219 (дд \approx т, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 10$, H5), 3.69 (дд, 1H, H9b), 3.76 (дт, 1H, $J_{4,3e} 5$, $J_{4,5} = J_{4,3a} = 10$, H4), 3.84–3.92 (м, 4H, H9a, H6, H8, H7).

Метилловый эфир (этил-5-ацетоксиацетиамидо-4,7,8,9-тетра-О-ацетил-3,5-дидезокси-2-тио- β -D-глицеро-D-галакто-2-нонулопиранозид)оновой кислоты (IX). *Вариант А.* Тиогликозид (IIIб) (187 мг, 350 мкмоль) дезацетилировали по Земплону и омыляли, как описано выше, продукт обрабатывали смолой КУ-2 (H^+ -форма) и получали 96 мг (78%) кислоты (Vб). Ее подвергали гидразинолизу, как описано выше, и остаток аминокислоты (VIб), полученный после упаривания избытка гидразина, растворяли в 2 мл DMF. К раствору добавляли 370 мг (1.54 ммоль) эфира (XV) в 10 мл DMF и далее 420 мкл (3.0 ммоль) триэтиламина. Раствор оставляли на 16 ч при комнатной температуре. По данным ТСХ (система А), нингидринположительные пятна – с R_f 0.20 (основное), отвечающее аминокислоте (VIб), и с R_f 0.60 (минорное), ее лактон, – исчезали и появлялись два новых – нингидринотрицательных, с R_f 0.73 (главное) и 0.85 (минорное). Раствор упаривали досуха в вакууме и получали кислоту (VII). К смеси остатка и 2 мл сухого метанола добавляли раствор 0.25 мл хлористого ацетила в 25 мл метанола (0.14 н. HCl), смесь оставляли на 4 ч при комнатной температуре. При ТСХ в системе Г обнаруживается главный продукт с R_f 0.60. Реакционную смесь нейтрализовали добавлением пиридина и упаривали. Полученный сырой эфир (VIII) обрабатывали 16 ч 0.6 мл уксусного ангидрида и 1.2 мл пиридина в присутствии 4 мг DAP при комнатной температуре, добавляли 100 мкл воды и 200 мкл метанола. Смесь концентрировали в вакууме, остаток обрабатывали 25 мл воды и 25 мл хлороформа. Водную фазу экстрагировали хлороформом (3 \times 25 мл). Объединенные хлороформные экстракты промывали 1 н. HCl (3 \times 30 мл), раствором NaHCO_3 (6 \times 50 мл), водой (4 \times 50 мл), высушивали, упаривали. Остаток подвергали КХ в градиенте (3 \rightarrow 7%) изопропилового спирта в смеси хлороформ–гексан (1 : 2) и получали 54 мг (34%, считая на (Vб)) тиогликозида (IX) [R_f 0.29 (Е), $[\alpha]_D -76^\circ$ (с 1, хлороформ)]. ^1H -ЯМР: 1.87, 2.03, 2.04, 2.09 и 2.14 (5 с по 3H, 5Ac), 1.22 (т, 3H, J 7.5, SCH_2CH_3), 2.4–2.6 (м, 2H, J 12.5, SCH_2 -), 4.567 (д, 1H, AcOCHa-, J 15.5), 4.267 (д, 1H, J 15.5, AcOCHb-) (см. также таблицу)] и 33 мг (23%) тиогликозида (IIIб), R_f 0.25 (Д).

Метилловый эфир (этил-5-ацетоксиацетиамидо-4,9-ди-О-ацетоксиацетил-7,8-ди-О-ацетил-2-тио- β -D-глицеро-D-галакто-2-нонулопиранозид)оновой кислоты (XII). *Вариант В.* Тиогликозид (IIIб) (624 мг, 1.165 ммоль) О-дезацетилировали и омыляли, как описано выше. Щелочной раствор Na-соли кислоты (Vб) упаривали досуха, остаток подвергали гидразинолизу, как описано выше, гидразин удаляли соупариванием с бутанолом и получали 870 мг аминокислоты (VIб). Ее обрабатывали раствором хлористого водорода в метаноле (полученным добавлением 1.55 мл хлористого ацетила к 50 мл метанола) и оставляли на 36 ч при комнатной температуре. ТСХ в системе А: исходная аминокислота (VIб) исчезала полностью и образовывался новый нингидринположительный продукт (X) с R_f 0.70. Раствор нейтрализовали до pH 7 добавлением 2.8 мл триэтиламина, упаривали, остаток обрабатывали раствором 1.4 г (6 ммоль) активированного эфира (XV) в 40 мл DMF и далее 1.7 мл (12.2 ммоль) триэтиламина. Оставляли на 72 ч при комнатной температуре. Раствор упаривали, DMF удаляли соупариванием с пиридином (2 \times 2 мл) и получали сырой нингидринотрицательный продукт (XI), R_f 0.90 (Г). В этой системе исходный метилловый эфир (X) имел R_f 0.45, а N-гликолилированный метилловый эфир (VIII), получаемый по схеме А, – 0.60. Продукт (XI) ацилировали 2.6 мл уксусного ангидрида в 5.2 мл пиридина в присутствии DAP, обрабатывали, как при синтезе (IX); после КХ в градиенте изопропилового спирта (1 \rightarrow 5%) в смеси хлороформ–гексан (1 : 2) получили 38 мг (6%) тиогликозида (IIIб) и 600 мг смеси N-гликолилированных производных, которую фракционировали с помощью ВЭЖХ на колонке (3 \times 250 мм) в системе Е. Получили (в порядке элюции): 18 мг (3%) тиогликозида (IX), идентичного полученному по схеме А. FABMS: m/z 594 ($M + 1$). Далее выделяли 346 мг тиогликозида (XII), выход 42%, т. пл. 128–130°C (этилацетат–гексан), $[\alpha]_D^{20} -80.7^\circ$ (с 1, хлороформ). Спектр ^1H -ЯМР: 2.047, 2.087, 2.102, 2.112 и 2.157 (5 с по 3H, 5Ac), 1.193 (т, 3H, J 7.5, SCH_2CH_3), 2.46–2.62 (м, 2H, SCH_2CH_3), 4.58 и 4.30 (два д по 1H и J 15.5, АВ-система NHCOCHaCHbOAc), 4.44 и 4.48, 4.50 и 4.54, 4.46 и 4.52 (две АВ-системы двух OCOCHaCHbOAc -групп) (см. также таблицу). FABMS: m/z 710 ($M + 1$). Затем выделяли 173 мг смеси изомерных трис- и бис-N,О-ацетоксиацетатов, два продукта в соотношении 1 : 1. Смесь дезацилировали по Земплону и реацетилировали действием уксусного ангидрида в пиридине, получали 120 мг (17%, считая на (IIIб)) тиогликозида (IX), идентичного полученному по варианту А.

Вариант С. К раствору эфира (X), полученного как в варианте В, из 810 мг (1.51 ммоль) тиогликозида (IIIб) в 20 мл пиридина при 0°C острожно добавляли 5 мл (46.5 моль) хлорангидрида

ацетоксиуксусной кислоты и оставляли на 3 ч при комнатной температуре. Получали единственный нингидринотрицательный продукт (XIII) с R_f 0.4 (Г). Избыток хлорангидрида разлагали 30 мл метанола, к смеси добавляли 50 мл 2-н. метилата натрия в метаноле. Через 1 ч добавляли 10 мл 2 н. АсОН в толуоле и упаривали. Из остатка удаляли растворители соупариванием с пиридином (5×1 мл) и получали хроматографически однородный продукт (XIV) с R_f 0.57 (Г). Его растворяли в 8.6 мл пиридина, добавляли 4.3 мл Ас₂О и 15 мг DAP, через 16 ч избыток Ас₂О разлагали 0.4 мл воды и 0.4 мл метанола, упаривали, остаток распределяли между водой и хлороформом (по 60 мл), водную фазу экстрагировали хлороформом (3×50 мл). Объединенные хлороформные вытяжки промывали последовательно 1 н. HCl (5×30 мл), насыщенным раствором NaHCO₃ (8×50 мл), водой (6×50 мл), фильтровали через вату, упаривали, остаток подвергали КХ на силикагеле в градиенте изопропилового спирта (1 → 5%) в смеси гексан-хлороформ (2 : 1), выделяли 890 мг смеси тиогликозидов (IX + IIIб), которую фракционировали с помощью ВЭЖХ на колонке (24 × 250 мм) в системе Е, и выделяли 439 мг (49%, считая на IIIб) N-ацетоксиацетильного производного (IX) и 138 мг (17%) тиогликозида (IIIб).

Авторы приносят глубокую благодарность А.Б. Тузикову за внимание и помощь при выполнении этой работы, И.В. Масленникову – за съемку спектров ЯМР, А.В. Сулиме – за съемку спектров FABMS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schauer R. // *Adv. Carbohydr. Chem.* N.Y.: Acad. Press, 1982. V. 40. P. 132–234.
2. Kawal T., Kato A., Higashi H., Kato S., Naiki M. // *Cancer Res.* 1991. V. 51. P. 1242–1246.
3. Konradsson P., Udodong U. E., Fraser-Reid B. // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. P. 4313–4316.
4. Veeneman G.H., Van Leeuwen S.H., Van Boom J.H. // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. P. 1331–1334.
5. Hasegawa A., Ogawa M., Kojima Y., Kiso M. // *J. Carbohydr. Chem.* 1992. V. 11. P. 333–341.
6. Hotta K., Komba S., Isida H., Kiso M., Hasegawa A. // *J. Carbohydr. Chem.* 1994. V. 13. P. 665–677.
7. Marra A., Sinay P. // *Carbohydr. Res.* 1990. V. 195. P. 303–308.
8. Marra A., Sinay P. // *Carbohydr. Res.* 1989. V. 187. P. 35–42.
9. Marra A., Sinay P. // *Carbohydr. Res.* 1989. V. 190. P. 317–322.
10. Kuhn R., Lutz P., MacDonald D.L. // *Chem. Ber.* 1966. V. 99. P. 611–617.
11. Bagget N., Mardsen B.J. // *Carbohydr. Res.* 1982. V. 110. P. 11–18.
12. Schreiner E., Zbiral E., Kleineiden R., Schauer R. // *Carbohydr. Res.* 1991. V. 216. P. 61–66.
13. Backinowsky L.V., Byramova N.E., Tsvetkov Yu.E., Betaneli V.I. // *Carbohydr. Res.* 1981. V. 98. P. 181–193.
14. Haverkamp J., Schauer R., Wember M., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1975. V. 356. P. 1575–1583.
15. Yoshino T., Schmidt R.R. // *Carbohydr. Lett.* 1995. V. 1. P. 329–334.
16. Friedman O.M., Seligman A.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1954. V. 76. P. 658–661.

Synthesis of Derivatives of N-Glycolylneuraminic Acid Ethylthioglycoside and Their Use As Glycosyl Donors

L. A. Simeoni, N. E. Bairamova, and N. V. Bovin

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

Abstract—The synthesis of a completely protected derivative of N-glycolylneuraminic acid thioglycoside from the corresponding derivative of N-acetylneuraminic acid via deprotection to the free thioglycoside followed by N-glycolylation, esterification, and acetylation was described. The reverse order of the stages of esterification and glycolylation resulted in the N-glycolylneuraminic acid derivative with two glycolylated hydroxyl groups. Both compounds obtained can be used as glycosyl donors in the reactions of sialylation promoted with thiophilic agents.

Key words: N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid, sialylation, sialosides, thioglycosides.