



## НЕОГЛИКОКОНЬЮГАТЫ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРНЫХ ПОЛИ(АМИНОАМИДОВ)

© 2002 г. Д. Е. Цветков\*, П. Е. Чешев\*, А. Б. Тузиков\*\*, А. А. Чинарев\*\*,  
Г. В. Пазынина\*\*, М. А. Саблина\*\*, А. С. Гамбарян\*\*\*, Н. В. Бовин\*\*,  
Р. Рибен\*\*\*\*, А. С. Шашков\*, Н. Э. Нифантьев\*\*#

\* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, В-334, Ленинский просп., 47;

\*\* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

\*\*\* Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Московская обл.;

\*\*\*\* Департамент кардиологии госпиталя Бернского университета, Берн, Швейцария

Поступила в редакцию 04.10.2001 г. Принята к печати 25.12.2001 г.

На основе дендримерных полиглицидамидов (РАМАМ) синтезированы неогликоконьюгаты, содержащие 4, 8, 16, 32 и 64 терминальных остатка B-дисахарида ( $B_{D1}$ ) или N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac). Исследована способность коньюгатов B-дисахарида связывать анти- $B_{D1}$ -антитела (естественные ксеноантитела), а коньюгатов N-ацетилнейраминовой кислоты ингибировать опосредованную гемагглютинином адгезию вируса гриппа. Биологическая активность РАМАМ-коньюгатов оказалась большей, чем у свободных углеводных лигандов, однако она уступает активности мультивалентных гликоконьюгатов на основе синтетических полимерных матриц других типов. Проведен конформационный анализ РАМАМ-матриц и синтезированных коньюгатов для оценки статистических расстояний между углеводными лигандами. Расчетными методами выявлена тенденция к сжиманию РАМАМ-цепей и образованию плотных глобул. Данный процесс приводит к уменьшению межлигандных расстояний в коньюгатах и, вероятно, может влиять на способность гликоконьюгатов эффективно связываться с белками, имеющими несколько углеводсвязывающих сайтов.

**Ключевые слова:** неогликоконьюгаты; дендримеры; полиглицидамид; B-дисахарид; N-ацетилнейраминовая кислота; ксеноантитела; вирус гриппа.

### ВВЕДЕНИЕ

На поверхности клеток представлены разнообразные углеводные цепи, связанные с мембранными липидами и белками. Фрагменты гликокаликса участвуют в процессах биологического узнавания, взаимодействуя с клеточными и внеклеточными белками и углеводами. Как правило, углевод-белковые взаимодействия характеризуются невысокими константами связывания на моновалентном уровне, и опосредуемые ими биологические процессы реализуются через многоточечное связывание, когда несколько углеводных лигандов взаимодействуют с несколькими белковыми рецепторами [1]. Поэтому при изучении процессов, связанных с углевод-белковыми взаимодействиями, часто бывает предпочтительным применение не моновалентных, а поливалентных гликоконьюгатов на основе высокомолекуляр-

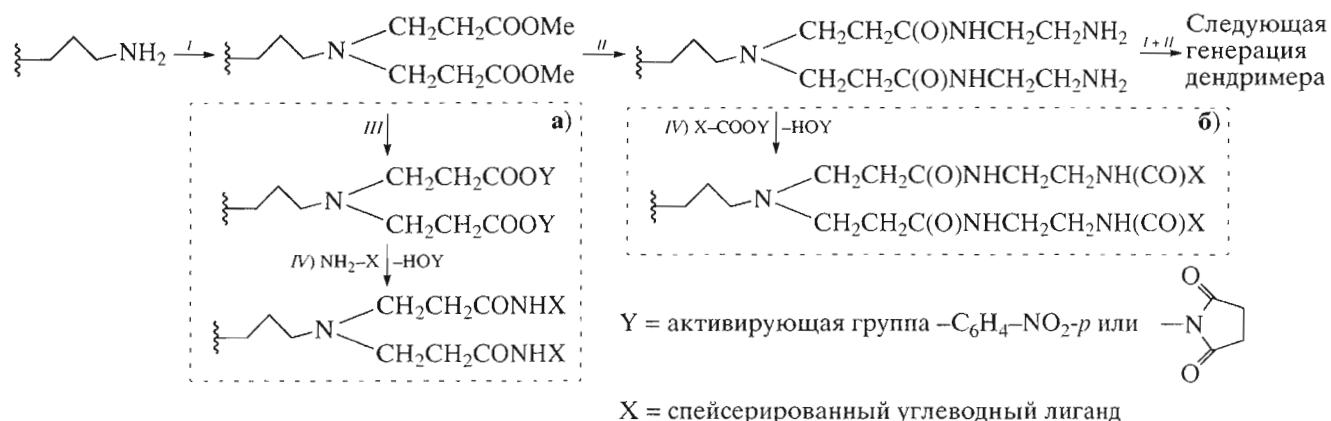
ных носителей. В качестве природных носителей для конструирования поливалентных неогликоконьюгатов обычно используют белки или полисахариды, а в качестве синтетических носителей – линейные полимеры, например полиакриловую кислоту или ее производные [2, 3].

В биоаналитических исследованиях нашли широкое применение гликоконьюгаты на основе линейных полимерных носителей, позволяющие достигать эффективного поливалентного связывания с комплементарными белками. Однако всегда остается неизвестным взаимное расположение лигандов в таком гликоконьюгате, сколько и какие именно из них распознаются белками, а какие находятся внутри полимерной глобулы и оказываются недоступными для взаимодействия. В ряде случаев это затрудняет как корректную интерпретацию результатов экспериментов, так и дальнейшую оптимизацию структуры гликоконьюгатов для создания более активных соединений.

Перечисленные проблемы могут быть во многом решены, если в качестве носителей углеводных лигандов использовать дендримеры, т.е. предельно разветвленные полимерные системы, по-

Сокращения:  $B_{D1}$  – B-дисахарид; EDA – этилендиамин; HA – гемагглютинин; Neu5Ac – N-ацетилнейраминовая кислота; PAA – полиакриламид(ный); РАМАМ – полиглицидамид(ный); АРТ – “Attached Protons Testing”, ЯМР-эксперименты по проверке числа присоединенных протонов.

# Автор для переписки (эл. почта: nen@ioc.ac.ru; тел.: (095) 135-87-84).



лучаемые путем последовательного удлинения цепей разветвленного центрального фрагмента с помощью разветвленных мономеров. Структурные и химические свойства дендримеров, такие, как топология, гидрофильно-гидрофобный баланс и функциональность терминальных групп, можно контролировать и изменять в процессе синтеза, проводимого на базе пошаговой реитеративной последовательности реакций [4, 5]. В гликоконьюгатах на основе дендримеров, которые для краткости здесь называются гликодендримерами, остатки углеводных лигандов прикреплены только к расположенным на поверхности молекулы-носителя функциональным группам. В результате вокруг носителя образуется углеводное обрамление, что делает строение гликодендримеров подобным строению природных гликоконьюгатов. Примеры синтеза гликодендримеров описаны ранее [6–12].

Среди известных дендримерных матриц, пригодных для конъюгации с углеводными лигандами, особый интерес представляют полигаминоамидные (РАМАМ) дендримеры [13]. Эти соединения малотоксичны [14], хорошо растворимы в органических и водных средах. Кроме того, представлялось, что РАМАМ-дендримеры могут быть легко получены с помощью последовательных реакций разветвления (I) и удлинения (II) цепей и, затем, конъюгированы с углеводными группами (стадии III + IV, схема 1).

В настоящей статье рассматриваются строение и синтез двух групп гликодендримеров, несущих остатки либо  $B_{DI}$  ( $Ga\alpha 1-3Gal\beta$ ), либо Neu5Ac $\alpha$ . Первая серия гликоконьюгатов синтезирована для использования в качестве блокаторов естественных анти- $B_{DI}$ -иммуноглобулинов, вызывающих отторжение пересаженных органов при ксенотрансплантации от свиньи к человеку.

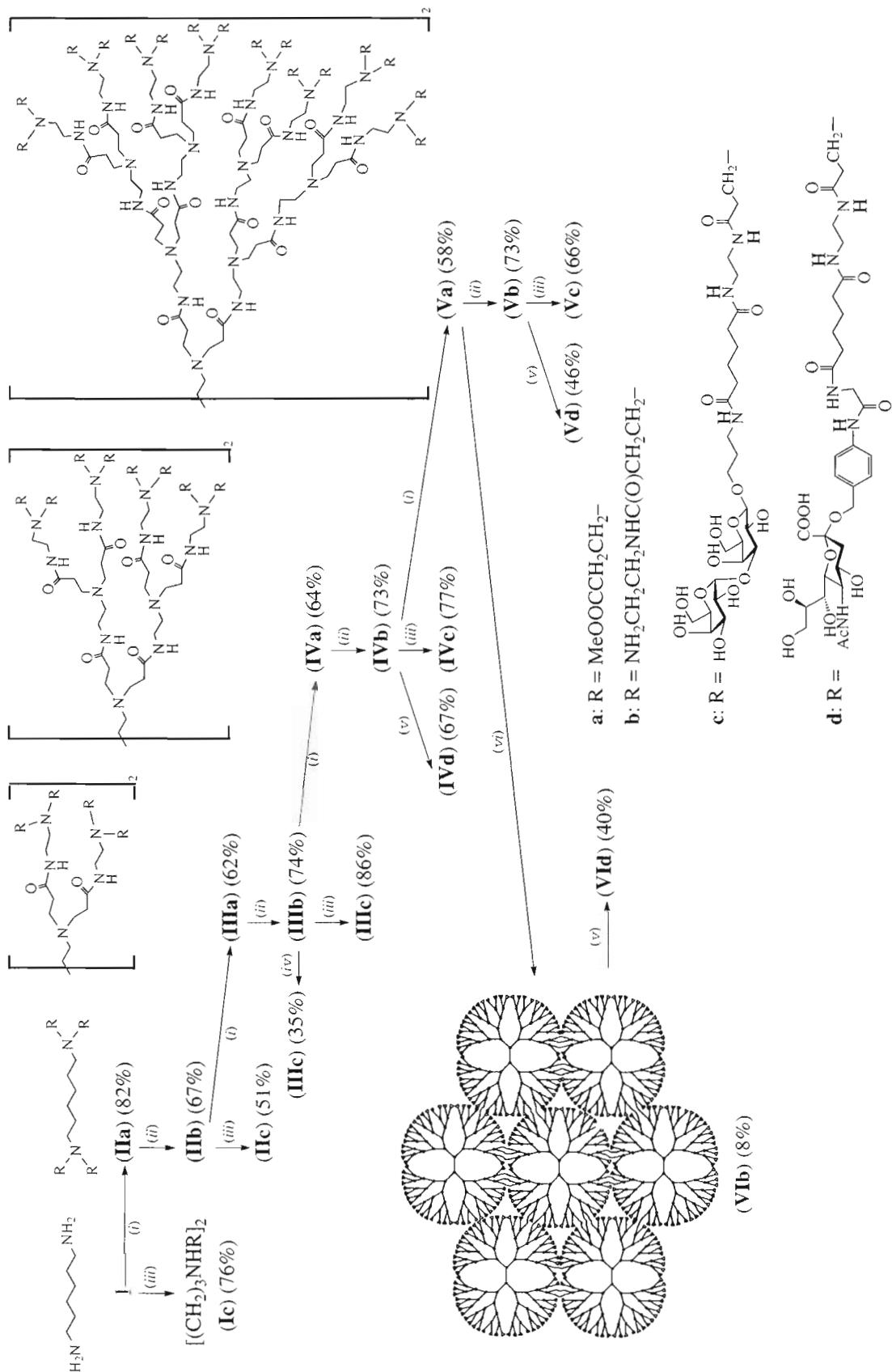
[15], а вторая – в качестве ингибиторов адгезии вируса гриппа [16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

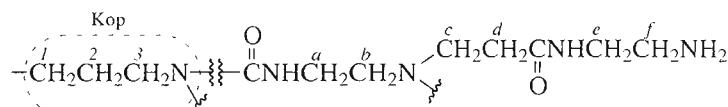
### Синтез РАМАМ-матриц и гликодендримеров

В качестве носителей для получения целевых гликоконьюгатов нами использовались РАМАМ-дендримеры (IIb)–(Vb) и (VIIb) с 4, 8, 16, 32 и 64 концевыми аминогруппами, а также поливалентный продукт (VIb), состоящий из сшивных молекул дендримера (Vb). Соединения (IIb)–(Vb) были получены исходя из гексаметилендиамина (I) по модифицированному реитеративному методу [17], включающему показанные на схеме 2 стадии: (i) разветвления цепи при обработке метилакрилатом и (ii) удлинения цепи с помощью этилендиамина (EDA), причем в обоих случаях использовался избыток указанных реагентов для обеспечения гарантированно полного протекания реакций и исключения возможных побочных процессов.

Необходимость использования избытков реагентов была показана ранее [13]. Но мы не наблюдали снижения выхода и чистоты получаемых РАМАМ при применении нами избытков в 1.4–5 экв. реагента на реагирующую группу, что значительно ниже предложенных ранее [13] 30 экв. А образование “сшивных” дендримерных молекул наблюдалось при аминолизе соединения (Va) в условиях недостатка EDA, вследствие взаимодействия между терминальными аминогруппами и еще не успевшими вступить в реакцию эфирными группами продуктов неполной конденсации (схема 2). С помощью гель-хроматографии установлено, что средняя молекулярная масса продукта сшивки (VIb) составляет около 400 кДа.



**Схема 2.** Получение РАМАМ-гликонидпримеров. Разветвление цепи: (i) 1,4–4 экв. метилакрилата, MeOH, 20°C, 18 ч; удлинение цепи: (ii) ~5 экв. EDA, MeOH, 20°C, 48 ч; конъюгация: (iii) (VII), DMF, 20°C, 18 ч, (iv) (IX), DMF, 18 ч, 20°C, 1 н. NaOH, (v) (XI), DMF, 20°C, 18 ч, 1 н. NaOH, (vi) 0.83 экв. EDA, MeOH, 20°C. Синтезы соединений (VIII), (IX) и (XI) приведены на схеме 4.

**Таблица 1.** Химические сдвиги сигналов ( $\delta$ , м.д.) в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР РАМАМ (**IIb**)–(**Vb**) ( $\text{D}_2\text{O}$ )

Фрагмент	pH 1		pH 10	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
кор: 1 + 2	1.25–1.35; 1.60–1.70	23.8; 26.3	1.35–1.45; 1.55–1.65	26.4; 27.6
кор: 3	2.65–2.85	52.6	2.45–2.60	53.3–54.0
<i>a</i>	3.53–3.57	34.5–35.5	3.30–3.43	49.8–50.2
<i>b</i>	3.23–3.32	52.0–53.0	2.60–2.80	33.1–33.7
<i>c</i>	3.40–3.52	49.8–52.0	2.65–3.00	41.5–42.0
<i>d</i>	2.65–2.85	29.4–29.9	2.45–2.60	51.5–53.0
<i>e</i>	3.03–3.10	39.3–40.2	3.30–3.43	38.0–39.5
<i>f</i>	3.40–3.52	37.2–38.3	2.65–3.00	40.2–40.8

Полнота протекания реакций удлинения цепей дендримеров контролировалась методом спектроскопии  $^1\text{H}$ -ЯМР интегрированием сигналов фрагментов *a* + *e* и *d* в спектрах соединений (**IIb**)–(**Vb**) (табл. 1). На стадии разветвления завершенность реакции контролировалась интегрированием в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР аминоэфиров (**Pa**)–(**Va**) сигналов при  $\sim 3.6$  м.д., соответствующих  $\text{CH}_3\text{OC(O)}$ -группам, а также при  $\sim 3.2$  м.д., соответствующих  $\text{C(O)NHCH}_2$ -группам. Отнесение сигналов выполнено с использованием данных гомоядерной и гетероядерной корреляционной спектроскопии ( $\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}, ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ), а также АРТ-экспериментов.

Химические сдвиги сигналов протонов всех структурных фрагментов РАМАМ-матрицы зависят от величины pH раствора, причем наибольшие изменения наблюдаются для групп, связанных с солеобразующими атомами азота (табл. 1). Уширение линий и заниженная интенсивность некоторых сигналов соответствует данным, описанным ранее для дендримеров разных классов [18–20].

Конъюгация углеводных лигандов с РАМАМ-матрицами могла быть осуществлена двумя способами. Первый основан на использовании дендримерных матриц с терминальными карбокси-группами (в виде их активированных эфиров) и гликозида, содержащего  $\text{NH}_2$ -группу в спейсере (схема 1, **a**). Во втором подходе (схема 1, **b**) аминотерминированные РАМАМ (серия **b** на схеме 2, схема 3) соединяют с углеводными лигандами, несущими в спейсере активированную карбоксильную группу (синтез лигандов см. схему 4).

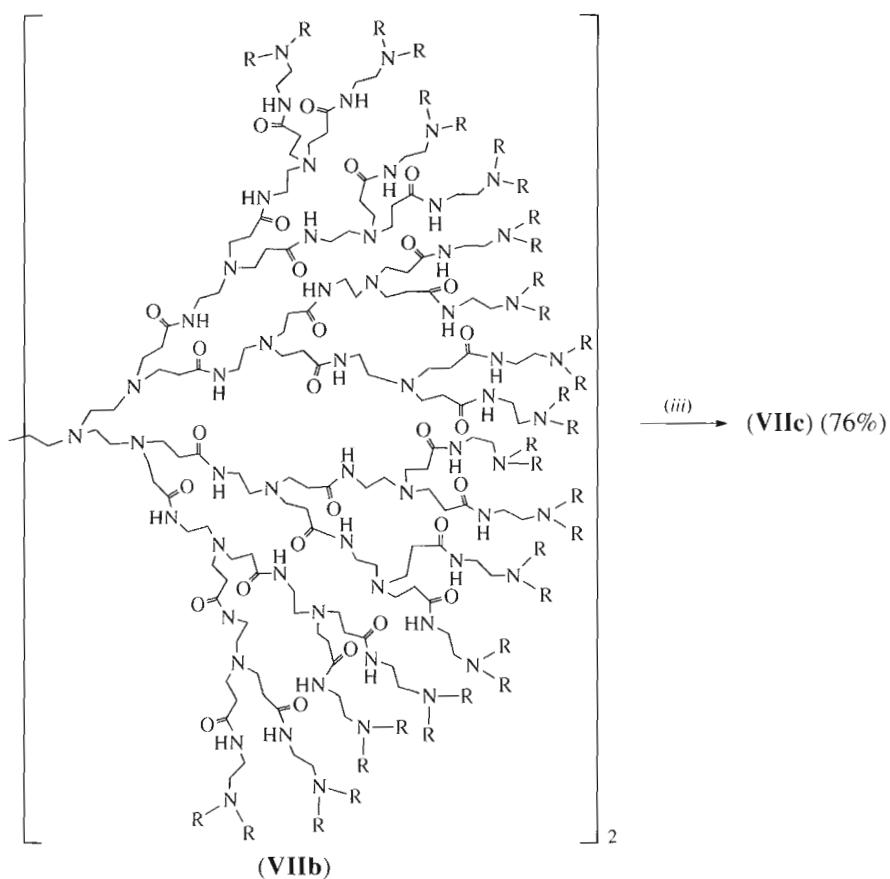
Для проверки первого подхода была предпринята попытка синтеза активированного эфира из модельного соединения (**Pa**). Гидролиз эфира (**Pa**) в 1 М водно-метанольном растворе  $\text{NaOH}$  проходил с выходом 93%, однако нам не удалось количественно этерифицировать образовавшую-

ся тетракарбоновую кислоту ни трифторацетоксукциниimidом, ни *пара*-нитрофенилтрифторацетатом в присутствии пиридина.

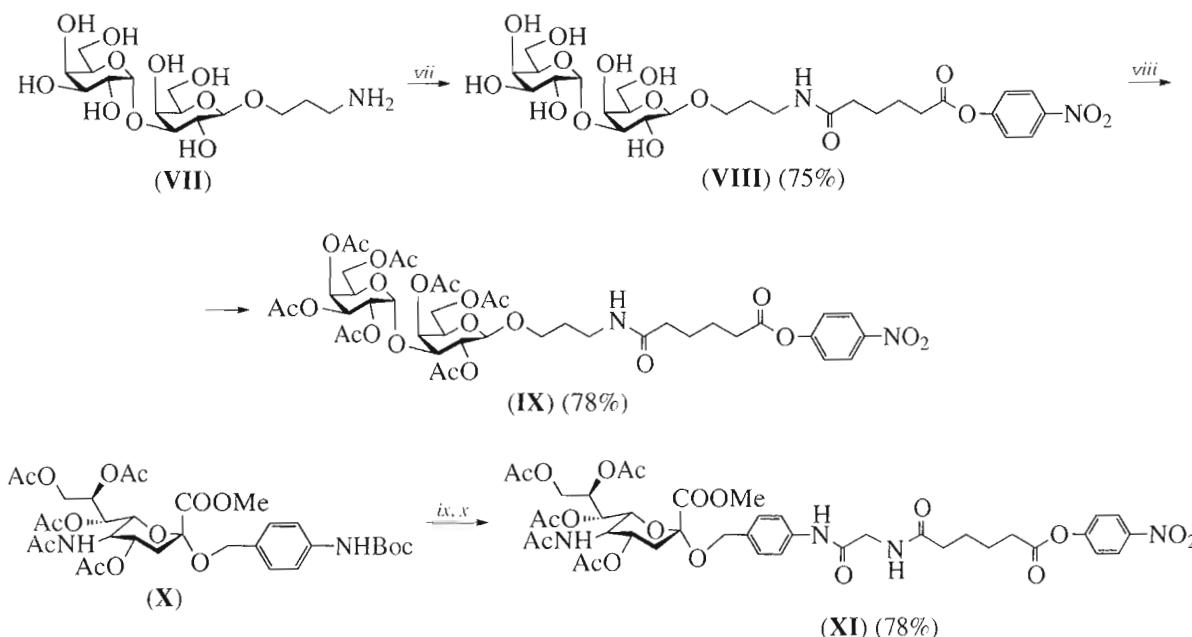
Конъюгация  $\text{NH}_2$ -терминированных РАМАМ-матриц, согласно способу (**b**) (схема 1), с углеводными лигандами, несущими активированный карбоксильный остаток в агликоне позволила получить гликодендримеры с высокими выходами. Конъюгацию с РАМАМ-матрицами проводили с гликозидом **B<sub>D1</sub>** (**VIII**) (или его полностью *O*-ацетилированным аналогом (**IX**)) и гликозидом метилового эфира полностью *O*-ацетилированной Neu5Ac $\alpha$  (**XI**), синтезированным согласно схеме 4.

Оптимизация условий проведения конъюгации РАМАМ-матриц с углеводными лигандами проводилась с использованием октаамина (**IIb**). Обнаружено, что в присутствии 20% мольного избытка защищенного гликозида (**IX**) и проведении реакции при 20°C в течение 18 ч достигается исчерпывающее замещение всех аминогрупп в дендримере (**IIIb**). Полноту протекания конъюгации контролировали по исчезновению в продуктах реакции неацетилированных аминогрупп, определяемых нингидриновым тестом. После удаления защитных групп обработкой 1 н.  $\text{NaOH}$  в водном метаноле (схема 2, стадия *iv*) продукт (**IIIc**) выделяли гель-хроматографией с выходом 35%.

Конъюгация незащищенного гликозида (**VIII**) вместо его ацетилированного аналога (**IX**) позволила исключить стадию удаления защитных групп и повысить выход конъюгата (**IIIc**) до 74%. Поэтому в дальнейшем для конъюгации с  $\text{NH}_2$ -терминированными РАМАМ (**IIb**)–(**Vb**), а также с гексаметилендiamином (**I**) (схемы 2, 3) был использован гликозид (**VIII**). После хроматографии выходы продуктов (**Ic**)–(**VIIc**) составляли 51–86%.

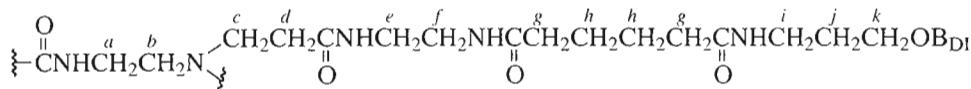


**Схема 3.** Синтез неогликоконъюгата (VIIc) из 64-дентатного PAMAM (VIIb) и лиганда (VIII). Обозначение заместиеля R для серий b и c, условия реакции и реагенты соответствуют условиям, приведенным на схеме 2.



**Схема 4.** Синтез активированных B<sub>D1</sub>-производных (VIII), (IX); vii: (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>-*p*)<sub>2</sub> DMSO/DMF, 1 : 3; viii: Ac<sub>2</sub>O/Py, и активированного производного Neu5Ac (XI); ix: 20% TFA/CHCl<sub>3</sub>, x: (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>-*p*)<sub>2</sub>, DMF, Et<sub>3</sub>N.

**Таблица 2.** Химические сдвиги сигналов ( $\delta$ , м.д.) в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликоконьюгатов (IIc)–(Vc) и (VIIc) ( $\text{D}_2\text{O}$ )



Фрагмент	рН 3		рН 5.5		рН 10	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
<i>a</i>	3.12–3.2	37.20	3.18–3.35	37.20	3.35–3.47	36.32
<i>b</i>	3.58–3.63	48.64	2.53–2.80	50.90	2.61–2.67	50.80
<i>c</i>	3.41–3.47	51.60	2.72–2.98	49.74	2.68–2.76	49.99
<i>d</i>	2.68–2.75	—	2.32–2.52	33.0–34.0	2.39–2.47	33.27
<i>e + f</i>	3.12–3.20	39.68; 39.08	3.18–3.35	39.62; 39.37	3.30–3.47	39.44; 39.28
<i>g</i>	2.1–2.14	36.16	2.15–2.27	36.32	2.22–2.30	36.19
<i>h</i>	1.42–1.47	25.62; 25.56	1.48–1.62	25.72; 25.68	1.55–1.65	25.59
<i>i</i>	3.12–3.2	37.20	3.18–3.35	37.20	3.35–3.47	37.16
<i>j</i>	1.76	29.21	1.81	29.34	1.70–1.80	29.21
<i>k</i>	3.81	69.01	3.92	69.10	3.95	68.45

Конъюгацию производного Neu5Ac $\alpha$  (XI), имеющего активированный карбоксил в спейсере, с NH $_2$ -терминированными РАМАМ (IVb), (Vb) и дендритным полимером (VIIb) проводили в аналогичных условиях. Выходы гликодендримеров (IVd)–(VId) составляли 40–67%.

Полученные гликодендримеры были охарактеризованы с помощью спектроскопии  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР. Спектры ЯМР содержат наборы сигналов, соответствующие РАМАМ-матрице, спейсерным группам, а также  $\text{B}_{\text{DI}}$ - или Neu5Ac $\alpha$ -лигандам (табл. 2, 3). При получении конъюгатов  $\text{B}$ -дисахарида полноту конъюгации подтверждали сравнением интегральных интенсивностей сигналов в спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР, соответствующих протонам фрагмента *d* матрицы, и протонам, соответствующим фрагментам *h*, *g* и *j* спейсерной группы  $\text{B}_{\text{DI}}$ -лиганда (схема при табл. 2). При аналогичном анализе спектров гликодендримеров (IVd)–(VId) сопоставлялись интенсивности сигналов протонов фрагмента *d* матрицы и протонов, соответствующих фрагментам *h* и *g* спейсерной группы Neu5Ac $\alpha$ -лиганда (схема при табл. 3).

В спектрах гликоконьюгатов (IIc)–(Vc), (VIIc), как и в случае исходных дендримеров, величины химических сдвигов сигналов фрагментов РАМАМ-матрицы зависят от величины pH раствора (табл. 2). Сигналы ядра РАМАМ наблюдаются только в спектрах конъюгатов (IIc)–(IVc), причем в случае соединения (IVc) только при pH 3, что, видимо, связано с присутствием “развернутой” конформации молекул. При возрастании величины pH наибольшие изменения в  $^1\text{H}$ -спектрах наблюдаются для сигналов, соответствующих CH $_2$ -группам фрагментов *b* и *c*. В спектрах

$^{13}\text{C}$ -ЯМР зависимость химических сдвигов от смеши pH менее заметна. Нужно отметить особенности сигналов, соответствующих фрагментам *d*, которые хорошо разрешены при pH 10, уширены при pH 5.5 и отсутствуют при pH 3.

Химические сдвиги сигналов  $\text{B}_{\text{DI}}$  и спейсерной группы в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликодендримеров не зависят от величины pH и соответствуют данным для исходного аминопропилгликозида (VII) [21]. Значения химических сдвигов сигналов Neu5Ac $\alpha$ -лиганда и спейсерной группы в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликодендримеров соответствуют данным для гликозида незащищенной Neu5Ac $\alpha$  [22]. Их зависимость от величины pH нами не изучалась.

#### Конформационный анализ РАМАМ-матриц и $\text{B}_{\text{DI}}$ -гликодендримеров

Для оценки расстояний между углеводными лигандами в синтезированных дендритных гликоконьюгатах нами было проведено исследование конформационных и геометрических характеристик  $\text{B}_{\text{DI}}$ -гликодендримеров (IIc)–(VIIc) и исходных РАМАМ (IIb)–(VIIb) с помощью методов компьютерного моделирования [23].

Вычислительные эксперименты для РАМАМ проводились методом молекулярной динамики с параметром времени 10–15 пс, в приближении вакуума, исходя из “вытянутой конформации” с “развернутыми” цепями (рис. 1a, b, d).

Было обнаружено, что для РАМАМ-матриц (IIb)–(VIIb) характерен переход из “развернутой” конформации (рис. 1a) в “скатую” (рис. 1b), в которой расстояния между противолежащими (ан-

**Таблица 3.** Химические сдвиги сигналов ( $\delta$ , м.д.) в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР гликоконъюгатов (IVd)–(Vd) ( $\text{D}_2\text{O}$ )

Фрагмент	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
<i>a</i>	3.3–3.42 м	39.4
<i>b</i>	3.17–3.25 м	50.3
<i>c</i>	2.9–3.05 м	49.8
<i>d</i>	2.38–2.54 м	31.6
<i>g</i>	2.13–2.3 м	36.1
<i>h</i>	1.47–1.55 м	25.5
<i>j</i>	7.32 м; 7.38 м	122.4; 130.4
<i>k</i>	4.41 д; 4.64 д	67.4

**Таблица 4.** Характеристики РАМАМ-дендримеров, полученные методом молекулярной динамики

РАМАМ	Валентность	$D_{\max}, \text{\AA}^*$	$D_{\min}, \text{\AA}^*$	$V, \text{\AA}^3**$	$S, \text{\AA}^2**$
(I)	2	10	–		
(IIb)	4	15	7–10	4051	1620
			26	4142	1630
(IIIb)	8	14–25	4–16	6654	1992
			7–15	9582	3637
(IVb)	16	16–32	3–19	12873	3220
			55	20595	7539
(Vb)	32	30–46	6–13	28441	7168
			62	35470	10298
(VIIb)	64	35–49	7–13	50598	10111
			84	83367	26423

\*  $D_{\max}$  и  $D_{\min}$  – расстояния между терминальными  $\text{NH}_2$ -группами.

\*\* Площадь поверхности молекулы ( $S$ ), доступная пробе радиусом 3 Å, и объем ( $V$ ) вычислены согласно работе [34] с использованием значений атомных радиусов [35].

типодными)  $\text{NH}_2$ -группами составляют приблизительно половину от максимального значения (табл. 4). Для каждого следующего поколения дендримеров время сжатия молекулы увеличивается. Оказалось также, что как в “развернутой”,

так и в “сжатой” конформациях поверхность, занятая концевыми  $\text{NH}_2$ -группами, составляет только часть общей площади поверхности молекулы, т.е. образование “плотной” поверхности из терминальных групп [24] не наблюдается.

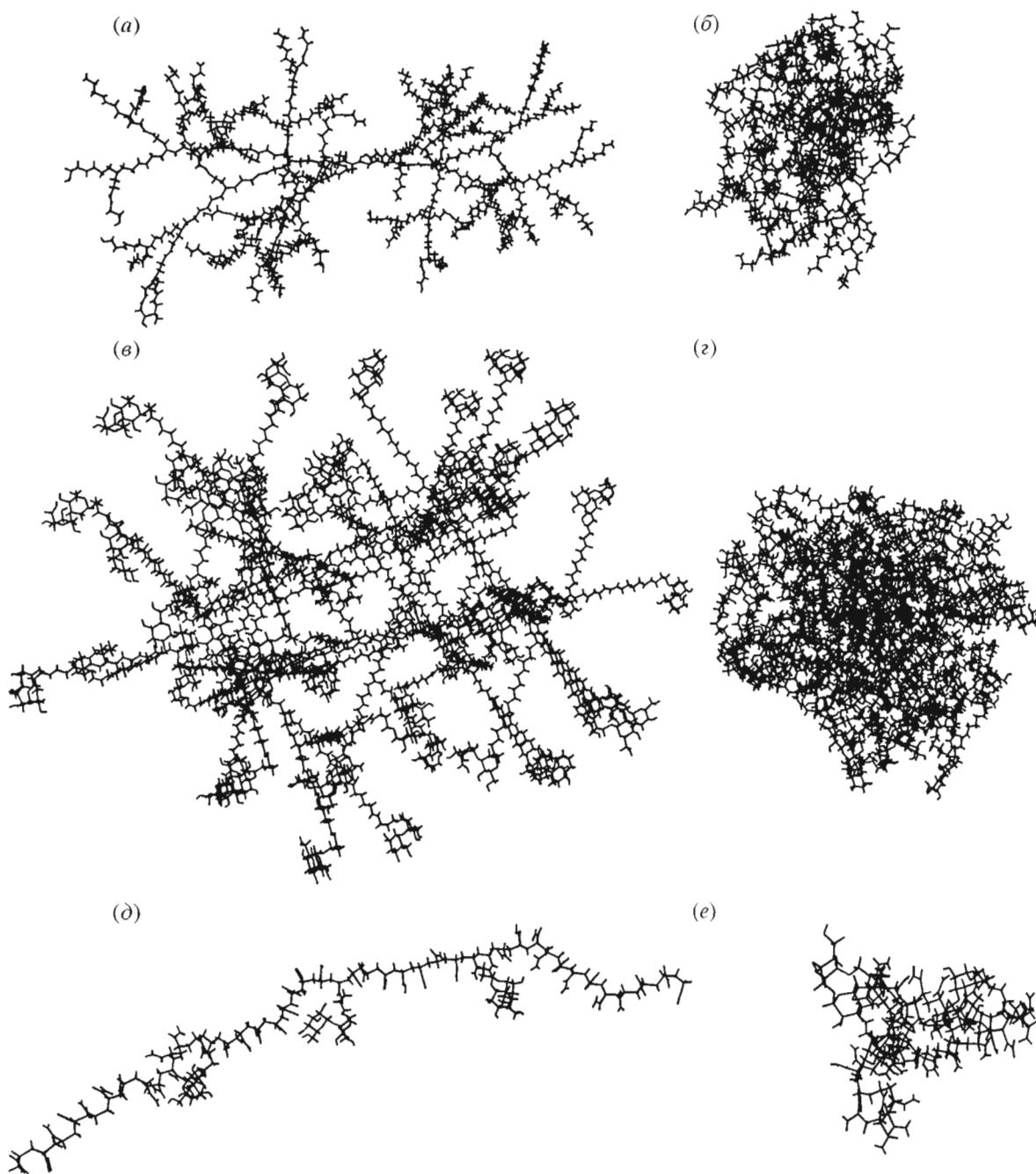


Рис. 1. “Развернутые” и “сжатые” конформации РАМАМ-матрицы (VIIb) (а, б), B<sub>DI</sub>-конъюгата на ее основе (VIIc) (в, г) и конъюгата B<sub>DI</sub>-PAA (д, е).

Исследование гликодендримеров (**IIc**)–(**VIIc**) методом молекулярной динамики показало, что как в “развернутой”, так и в “сжатой” конформациях молекулы углеводные остатки располагаются на поверхности конъюгатов, не погружаясь в дендримерную матрицу (рис. 1в, г). Такое расположение углеводных лигандов, являющееся важным с точки зрения доступности для их распознавания белками, по-видимому, должно дополнительно стабилизироваться за счет сольватации.

Полученные в расчетах значения максимально возможных расстояний между аномерными кислородами  $\beta$ -Gal-углеводных лигандов приведены в табл. 5. Так как указанные расстояния в случае 32- и 64-валентных B<sub>DI</sub>-конъюгатов (**Vc**) и (**VIIc**) оказываются близкими к расстоянию между Fab-фрагментами в IgG ( $\geq 100 \text{ \AA}$ ) [25], можно было ожидать повышенной эффективности связывания этих гликодендримеров с двумя центрами иммуноглобулина.

**Таблица 5.** Расчетные расстояния между аномерными кислородными атомами  $\beta$ -Gal в  $B_{DI}$ -PAMAM-гликоконъюгатах и способность этих гликоконъюгатов ингибировать связывание анти- $B_{DI}$ -IgG с иммобилизованным  $B_{DI}$ -PAA

Соединение	Количество $B_{DI}$ -групп	Максимальное межлигандное расстояние, Å	$IC_{50}$ , мкМ**
$B_{DI}$	1	—	500
$B_{DI}$ -PAA*	~35	—	9
(Ic)	2	35	500
(IIc)	4	45	500
(IIIc)	8	65	500
(IVc)	16	80	60
(Vc)	32	100	40
(VIIc)	64	110	35

\* Средняя степень полимеризации ~350, содержание  $B_{DI}$ -групп 10 мол.%.

\*\* Концентрация 50% ингибирования.

Геометрические характеристики PAMAM-матриц и гликодендримеров сопоставляли с данными, полученными для фрагмента полимерного конъюгата на основе полиакриламида (PAA), содержащего 10 мол.%  $B_{DI}$ -лигандов ( $B_{DI}$ -PAA), который используется в иммунологических тестах в качестве положительного контроля [26] и обладает активностью, превышающей на два порядка активность свободного  $B_{DI}$ .

Исследование молекулярной динамики в течение 15 пс фрагмента гликополимера  $B_{DI}$ -PAA размером в 50 PAA звеньев, содержащего один остаток B-дисахарида на 10 звеньев полиакриламида (рис. 1d), показало превращение исходной вытянутой цепи в петлеобразную (рис. 1e). Расстояние между аномерными кислородными атомами остатков  $\beta$ -Gal концевых  $B_{DI}$ -лигандов в данном фрагменте может изменяться от 10 до 80 Å, а в случае ближайших по цепи  $B_{DI}$ -лигандов – от 15 до 30 Å. Таким образом, очевидно, что в PAA гликоконъюгате со средней молекулярной массой носителя 40 кДа (~350 звеньев) реализуется очень широкий набор межлигандных расстояний, в то время как для исследованных гликодендримеров характерны узкие интервалы расстояний между остатками углеводов. Например, для соединения (IIc) максимальное расстояние около 45 Å, а для (VIIc) около 110 Å, а нижние пределы одинаковы и составляют несколько ангстрем (табл. 5).

Гликодендримеры, содержащие нейраминовую кислоту, не исследовались методом молекулярной динамики из-за отсутствия достоверной оценки распределения заряженных карбоксильных и аминогрупп в молекуле конъюгата. Однако возможна приблизительная оценка максимального

расстояния в “развернутой” конформации между атомами кислорода при C2 остатков Neu5Aca. Для гликодендримера (IVd) оно составляет около 80–90 Å, что превышает расстояние между углеводсвязывающими центрами гемагглютинина (см. ниже рис. 5a), составляющее 46 Å по данным кристаллографии [28, 29], и приблизительно соответствует диапазону возможных расстояний между углеводсвязывающими центрами соседних молекул гемагглютинина, подвижно закрепленных в вирусной мембране. Этот диапазон можно оценить исходя из расстояния между центрами тримеров гемагглютинина (105–109 Å), полученного методом малоуглового рассеяния нейтронов [30]. Для различных взаимных ориентаций гемагглютинина межтримерное расстояние может составлять 60–90 Å, а эти значения близки к наборам возможных межлигандных расстояний в дендримере (IVd) и его гомологах (Vd), (VId).

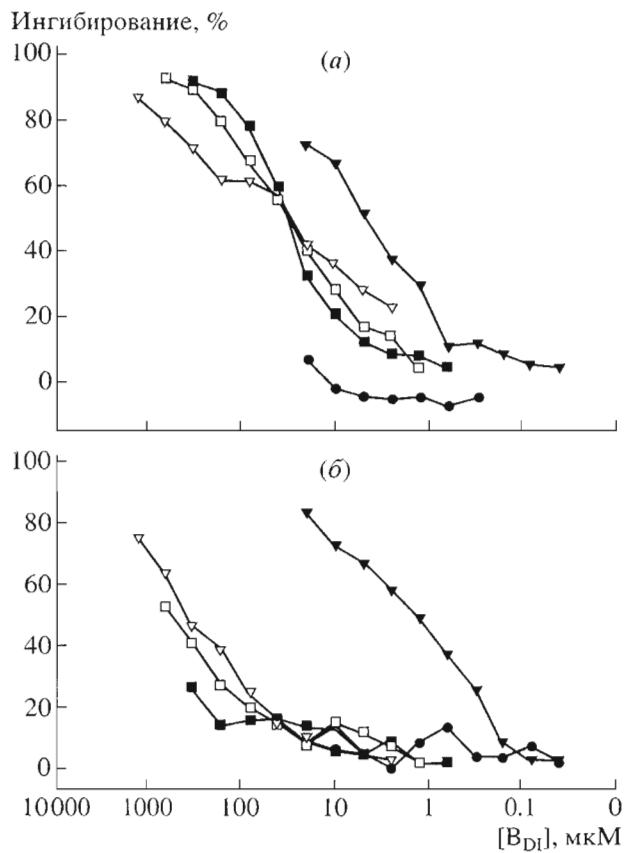
### Исследование биологической активности гликодендримеров

Исследование взаимодействия  $B_{DI}$ -гликодендримеров с сывороткой крови человека, содержащей  $B_{DI}$ -специфичные антитела, проводили методом иммуноферментного анализа с использованием  $B_{DI}$ -PAA в качестве антигена-подложки [26]. Сыворотку предварительно инкубировали с ингибитором в последовательных разведениях [27], после чего вносили в лунки планшета. Связавшиеся анти- $B_{DI}$ -иммуноглобулины детектировали изотипспецифичными антителами (рис. 2).

Гликоконъюгаты (Ic)–(IIIc) связывали ксенонантитела класса IgG (рис. 2a), подобно мономерному  $B_{DI}$  (VII), и поэтому данные для них на рисунках не представлены. Эффективность гликоконъюгатов (IVc), (Vc) и (VIIc) была выше, чем в случае неконъюгированного  $B_{DI}$ , но уступала та-ковой для  $B_{DI}$ -PAA.

Эффективные концентрации, вызывающие ингибирование связывания антител класса IgM, а также цитотоксичности человеческой сыворотки по отношению к культуре клеток РК-15 [27] (рис. 3), были примерно такими же, как и в случае ингибирования антител класса IgG. Из исследованных соединений только гликодендримеры (Vc) и (VIIc) ингибируют связывание IgM с иммобилизованным  $B_{DI}$ -PAA (рис. 2б) в более низких концентрациях, чем мономер (VII).

Таким образом, в обеих экспериментальных моделях ингибирования связывания антител и ингибирования цитотоксичности максимальная активность наблюдалась для  $B_{DI}$ -дендримеров (Vc) и (VIIc), имеющих наибольшую валентность и максимальные расстояния между углеводными группами, близкие к расстоянию между Fab-доменами антител. Однако выигрыш в активности

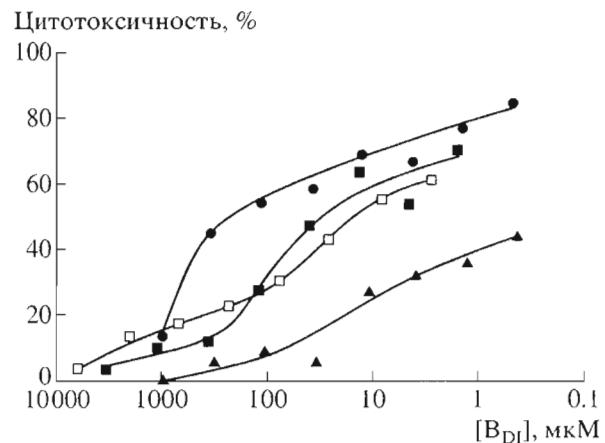


**Рис. 2.** Ингибирование конъюгатами  $B_{DI}$ -дисахарида связывания человеческих анти- $B_{DI}$ -иммуноглобулинов в ELISA (*a* – IgG, *b* – IgM): гликодендример (**IVc**) (■), гликодендример (**Vc**) (□), гликодендример (**VIIc**) (▽), контроль –  $B_{DI}$ -дисахарид (●) и  $B_{DI}$ -PAA (▼).

этих конъюгатов по сравнению с моновалентным  $B_{DI}$  оказался не столь значительным [1, 8], как можно было ожидать в случае реализации двухцентрового связывания гликодендримерных молекул с антителами (рис. 4*в*).

По-видимому, в конъюгатах (**Vc**) и (**VIIc**) максимально удаленные друг от друга остатки  $B_{DI}$  не ориентированы оптимальным образом для одновременного встраивания их в углеводсвязывающие сайты антител, а расстояния между другими парами углеводных лигандов слишком малы (<100 Å) для такого взаимодействия. Менее активными оказались изученные гликодендримеры и по сравнению с  $B_{DI}$ -PAA, в случае которого необходимые для двухцентрового связывания с антителами ориентация и взаиморасположение углеводных лигандов обеспечиваются за счет гибкости линейной полимерной матрицы (рис. 4*г*).

Рост ингибирующей активности, наблюдавшийся в ряду исследованных РАМАМ-конъюгатов (**IVc**)–(**VIIc**) при увеличении их валентности, скорее всего, связан не с реализацией двухвалентного взаимодействия, а с увеличением локальной



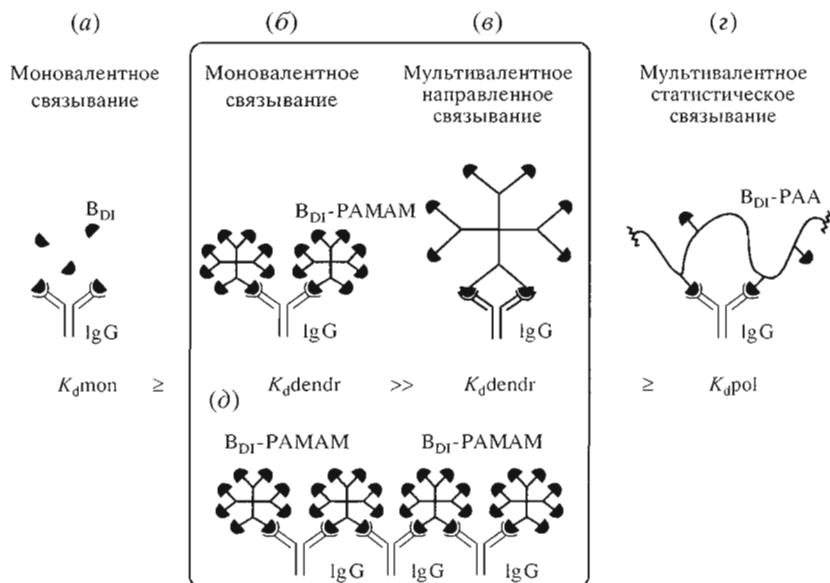
**Рис. 3.** Ингибирование гликодендримерами цитотоксичности сыворотки крови человека по отношению к культуре клеток PK15. Сыворотку инкубировали с последовательными разведениями  $B_{DI}$ -дисахарида (●), гликодендримера (**IVc**) (■), гликодендримера (**Vc**) (□) и  $B_{DI}$ -PAA (▲), затем исследовали с помощью теста цитотоксичности [27] (цитотоксичность сыворотки без ингибиторов = 100%).

концентрации  $B_{DI}$ -лигандов около Fab-доменов (рис. 4*б*). Еще одно объяснение относительно невысокой активности дендримеров основано на допущении возможности протекания их перекрестного связывания с антителами (рис. 4*д*). Образование полимолекулярных комплексов при этом должно приводить к уменьшению энтропии в рассматриваемой системе, и суммарный выигрыш в энергии в результате подобного мультивалентного взаимодействия может оказаться незначительным.

Предполагалось, что при понижении величины pH растворов гликодендримеров из-за отталкивания образующихся положительно заряженных четвертичных аммониевых групп в узлах разветвлений РАМАМ-цепей возможно изменение конформации носителей и, как следствие, изменение активности дендримерных конъюгатов вследствие увеличения межлигандных расстояний. Однако попытки увеличить ингибирующую активность  $B_{DI}$ -гликодендримеров (**Vc**) и (**VIIc**), изменяя pH среды, не достигли результата.

Синтезированные сиалодендримеры (**IVd**)–(**VId**) были изучены как ингибиторы адгезии вируса гриппа с помощью твердофазного метода анализа. Последний основан на конкурентном взаимодействии меченного пероксидазой фетуина и ингибитора с вирусами, адсорбированными на поверхности полистирольных планшетов [29]. В табл. 6 представлены константы диссоциации комплексов вирус-ингибитор, меньшая константа соответствует большей степени ингибирования.

В первичном тесте образцы сиалодендримеров (**IVd**) и (**Vd**) продемонстрировали невысокую



**Рис. 4.** Нейтрализация ксеноантител моно- и мультивалентными B<sub>DI</sub>-лигандами ( $K_d$  – константа диссоциации комплекса лиганд–антитело).

ингибирующую активность, близкую к активности мономерного  $\alpha$ -гликозида Neu5Aca. В качестве возможного объяснения этого было выдвинуто предположение об электростатическом взаимодействии отрицательно заряженных остатков Neu5Aca с положительно заряженными аммониевыми группами матрицы. Данный процесс должен приводить к экранированию лигандов и затруднению контакта гликодендримеров с поверхностью вириона. Если это предположение верно, то изменение величины pH растворов гликодендримеров должно приводить к улучшению их ингибирующих свойств. Действительно, в ходе проверки было установлено, что после инкубации гликодендримеров (**IVd**) и (**VId**) в течение 18 ч при 4°C в 0.1 M водном растворе амиака с последующей его нейтрализацией их активность по сравнению с Neu5Aca-OBzI оказывается выше, на 1 и 2 порядка соответственно (табл. 6).

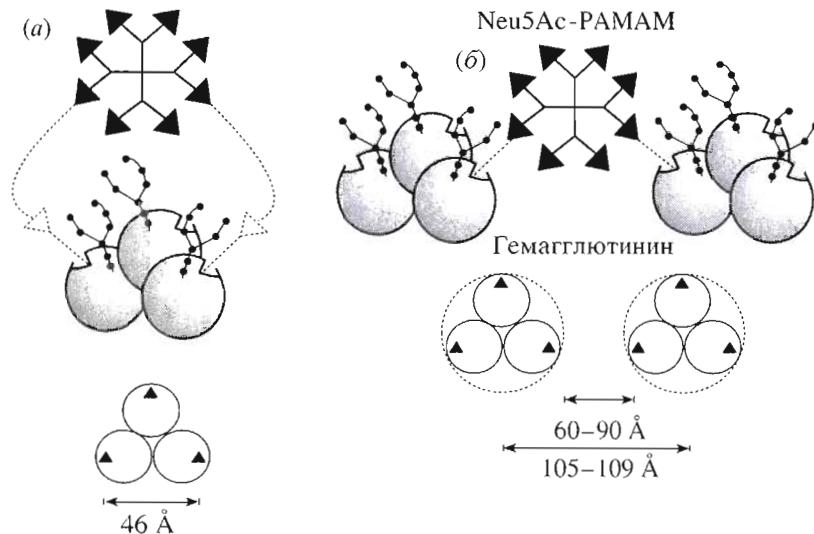
В случае вируса гриппа мультивалентное взаимодействие Neu5Aca-PAMAM конъюгатов с гемагглютинином может реализовываться в двух вариантах. Первый – взаимодействие одной молекулы конъюгата одновременно со всеми углеводузыющими сайтами одного тримера гемагглютинина. Этот вариант представляется маловероятным в силу следующих причин. Хотя расстояния между Neu5Aca-лигандами в изучаемых гликодендримерах, по-видимому, допускают внутритримерное связывание (рис. 5а), необходимая для этого ориентация углеводных групп (обусловленная направлением их взаимодействия с рецепторами) и реальная их ориентация (определенная геометрией молекулы конъюгата) могут не совпадать. Кроме того, такому взаимодействию могут стерически препятствовать собственные олигосахаридные цепи гемагглютинина. Поэтому более вероятным представляется механизм, включающий одновременное взаимодействие одного конъюгата с разными тримерами гемагглютинина – межтримерное связывание (рис. 5б).

Некоторое увеличение противовирусной активности, отмеченное для конъюгата (**IVd**) после инкубации в растворе амиака, может объясняться именно внутритримерным взаимодействием. Это соответствует сделанному ранее предположению о необходимости благоприятной ориентации лигандов, в дополнение к необходимому соответствию значений расстояний между атомами кислорода при C2 остатков Neu5Aca в развернутой конформации и диапазона возможных расстояний между углеводсвязывающими центрами тримеров HA (рис. 5). В то же время высокую активность конъюгата (**VId**) на основе носителя из сшитых молекул PAMAM (как и PAA-конъюгатов) можно объяснить и возможностью осуществления

**Таблица 6.** Константы диссоциации комплексов вирус–сиалозид. Штамм вируса A/NIB/44/90M

Сиалозид	$K_d$ , мкМ	$K_d$ , мкМ**
Neu5AcaBzI	0.1	0.1
( <b>IVd</b> )	0.2	0.01*
( <b>Vd</b> )	0.1	–
( <b>VId</b> )	–	<0.001*

\* Данные для образцов, выдержанных перед тестом в 0.1 M водном растворе амиака; \*\* через 30 сут.



**Рис. 5.** Анализ возможных вариантов взаимодействия сиалодендримеров с поверхностью вируса. “Внутри-” (а) и “межтримерный” (б) режимы связывания.

нескольких межтримерных взаимодействий, а также блокадой вируса объемными молекулами гликоконъюгата, стерически препятствующими его сближению с рецептором [31].

К сожалению, детальное изучение свойств сиалогликоконъюгатов (**IVd**)–(**VId**) оказалось осложнено нестабильностью в растворе, особенно в случае конъюгата (**VId**). Так, при хранении нейтральных или щелочных растворов данных гликодендримеров происходила их коагуляция. Сопоставляя свойства описанных ранее сиалодендримеров [11] со свойствами полученных нами конъюгатов (**IVd**)–(**VId**), можно предположить, что в нашем случае причиной реологической нестабильности растворов гликоконъюгатов могут быть процессы, связанные с наличием гидрофобного ароматического ядра в спейсерной группе вместо короткого алифатического спейсера сиалодендримеров, описанных ранее [11]. Следует заметить, что такой спейсер нами использовался намеренно, так как  $\alpha$ -гликозиды Neu5Ac $\alpha$  с ароматическим агликоном более эффективно ингибируют адгезию данного штамма вируса гриппа по сравнению с соответствующими алифатическими гликозидами [22].

Таким образом, применение РАМАМ-матриц высокой валентности (дентатности) перспективно для получения гликоконъюгатов как молекулярных проб с высоким содержанием активных лигандов. Однако, если синтез РАМАМ-дендримеров средних размеров, имеющих до 32 концевых NH<sub>2</sub>-групп, не вызывает затруднений, получение более крупных молекул связано с рядом синтетических проблем и сложностью анализа конъюгатов, полученных на их основе. Кроме того, необходимо учитывать, что конформация, а

следовательно, и биологическая активность гликоконъюгатов на основе РАМАМ-матриц, зависит от наличия заряда у углеводного лиганда.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы (Merck, Германия) и (Fluka, Швейцария), 64-дентатный дендример (**VIIb**) – РАМАМ-G4 (Dendritech Inc., США). Растворители и реактивы очищали по методикам, приведенным ранее [32]. Метилакрилат после перегонки стабилизировали добавлением 0.01% ди(*трет*-бутил)фенола для предотвращения возможной радикальной полимеризации. Контроль за реакциями осуществляли с помощью хроматографии в тонком слое на пластинках с силикагелем Kieselgel 60 (Merck, Германия). Вещества обнаруживали опрыскиванием 2% раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (с последующим нагреванием до 150°C), J<sub>2</sub>, нингидрином или хлортоллидиновым реагентом [33]. Растворители из реакционных смесей удаляли в вакууме при температуре не выше 40°C. Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel 60 32–63 мкм (Merck, Германия), а гель-хроматографию – на TSK-гелях HW-40F, HW-50F, HW-55F (TOYO SODA Manufacturing Co., Япония). ЯМР-спектры регистрировали на приборе AM-300 (Bruker, Германия). Эксперименты двумерной корреляционной ЯМР-спектроскопии были проведены по стандартным методикам на приборе DRX-500 (Bruker, Германия). Химические сдвиги для характеристических сигналов в спектрах ЯМР приведены в миллионных долях и КССВ в герцах.

**Аминоэфир (Ia).** К 1.1 г (9.8 ммоль) гексаметилендиамина (**I**) прибавляли 8.8 мл (98 ммоль) метилакрилата. Смесь перемешивали в течение

24 ч при 20°C, упаривали в вакууме, следы метилакрилата удаляли в вакууме упариванием с 25 мл изопропилового спирта. Колоночной хроматографией (элюент 96% водный этанол) из остатка выделяли 0.9 г (82%) аминоэфира (**IIa**), бесцветный сироп,  $R_f$  0.56 (MeOH) и 0.3 (*n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O, 3 : 1 : 1). Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 3.57 (с, 12H, CH<sub>3</sub>O), 2.66 (т, 8H, OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.34 (т, 8H, OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.30 (т, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 1.15–1.35 (м, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 173.0 (CO), 51.3 (CH<sub>3</sub>O), 32.2 (OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 49.0 (OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 53.5 ((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 26.9 и 27.0 ((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

**Аминоамид (IIb).** К 0.68 г (1.5 ммоль) аминоэфира (**IIa**) прибавляли 2 мл (30 ммоль) EDA, перемешивали в течение 24 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали, следы EDA удаляли в вакууме упариванием с водой (2 × 20 мл). Остаток очищали гель-фильтрацией на TSK HW-40F (2.5 × 90 см) в 0.5% водном растворе аммиака. Из содержащих фронтальный пик фракций удаляли растворитель и выделяли 0.57 г (67%) аминоамида (**IIb**), светло-желтое масло,  $R_f$  0.32 (MeOH-H<sub>2</sub>O, 3 : 1). <sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 176.5 (CO), 42.8 (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 41.0 (CH<sub>2</sub>NHC(O)), 33.8 (NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 50.0 (NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 53.8 ((CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 26.9 и 27.9 ((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

**Аминоэфир (IIIa).** К раствору 0.17 г (0.3 ммоль) аминоамида (**IIb**) в 1 мл абс. MeOH прибавляли 1.9 мл (20.9 ммоль) метилакрилата. Реакционную смесь перемешивали 24 ч при 20°C, упаривали в вакууме, следы метилакрилата удаляли в вакууме упариванием с 25 мл изопропилового спирта. Колоночной хроматографией в EtOH (96%) выделяли 0.23 г (62%) аминоэфира (**IIIa**), бесцветное масло,  $R_f$  0.24 (MeOH-H<sub>2</sub>O, 10 : 1) и 0.70 (MeOH-25% водн. раствор аммиака, 40 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 7.15 (ущ. с, 4H, NH), 3.63 (с, 24H, CH<sub>3</sub>O), 2.40 (ущ. т, 16H, OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.32 (м, 8H, NHC(O)CH<sub>2</sub>), 2.71 (м, 24H, OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> + + NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.50 (м, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.24 (м, 8H, CH<sub>2</sub>NHC(O)), 1.15–1.45 (м, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 172.0 (C(O)O), 172.9 (C(O)NH), 53.4 (CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH)<sub>2</sub>), 53.1 (CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)O)<sub>2</sub>), 51.4 (CH<sub>3</sub>O), 49.6 (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH)<sub>2</sub>), 49.3 (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)O)<sub>2</sub>), 37.1 (C(O)NHCH<sub>2</sub>), 33.6 (CH<sub>2</sub>C(O)NH), 32.7 (CH<sub>2</sub>C(O)O), 26.8 и 27.5 ((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

**Аминоамид (IIb)** получали аналогично (**IIb**) из 0.98 г (0.78 ммоль) аминоэфира (**IIIa**) и 2 мл (30 ммоль) EDA. Выделяли 0.88 г (74%) аминоамида (**IIb**), светло-желтое масло,  $R_f$  0.4 (MeOH-25% водн. раствор аммиака, 3 : 2). <sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 176.7 и 176.5 (C=O), 53.3 и 51.9 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 49.7 и 49.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)), 42.1 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 40.4 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 37.4 (C(O)NHCH<sub>2</sub>), 33.5 и 33.3 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH), 27.4 и 26.3 ((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

**Аминоэфир (IVa)** получали аналогично (**IIa**) из 0.19 г (0.12 ммоль) аминоамида (**IIb**) и 0.22 мл (2.5 ммоль) метилакрилата. Выделяли 0.123 г

(24%) аминоэфира (**IVa**), желтое масло,  $R_f$  0.5 (MeOH-25% водн. раствор аммиака, 60 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 3.62 (с, 48H, OCH<sub>3</sub>), 3.25 (м, 24H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.73 и 2.70 (м, 56H, NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.5 (м, 24H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)), 2.38 (м, 32H, MeOC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.3 (м, 24H, NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.45–1.1 (м, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 172.8 и 172.2 (C=O), 52.36 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)), 51.5 (OCH<sub>3</sub>), 49.7 и 49.0 (NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 36.97 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)), 33.6, 33.2 и 32.5 (NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 27.3 и 26.3 ((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

**Аминоамид (IVb).** К раствору 0.86 г (0.03 ммоль) аминоэфира (**IVa**) в абс. MeOH прибавляли 180 мкл (2.5 ммоль) EDA. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 20°C. Затем обрабатывали аналогично (**IIb**) и выделяли 0.74 г (74%) аминоамида (**IVb**), светло-желтое масло,  $R_f$  0.75 (MeOH-25% водн. раствор аммиака, 3 : 1). <sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 175.7 и 175.3 (C=O), 53.5, 53.5 и 51.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 50.0 и 49.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)), 42.1 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 40.6 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 39.1 и 37.6 (C(O)NHCH<sub>2</sub>), 33.7 и 33.6 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH), 27.4 и 26.3 ((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

**Аминоэфир (Va).** К раствору 0.13 г (0.04 ммоль) аминоамида (**IVb**) в абс. MeOH прибавляли 0.29 мл (3.2 ммоль) метилакрилата. Реакционную смесь перемешивали в течение 48 ч при 20°C и затем обрабатывали аналогично (**IIa**). Выделяли 0.14 г (58%) аминоэфира (**Va**), желтое масло,  $R_f$  0.5 (MeOH). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 3.62 (с, 96H, OCH<sub>3</sub>), 3.29 (м, 56H, CH<sub>2</sub>NHC(O)), 2.75 (т, 64H, C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.52 (т, 32H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.41 (т, 64H, OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.35 (м, NHC(O)CH<sub>2</sub>), 1.25 (м, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>). <sup>13</sup>C-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 173.0 (C(O)O) и 172.3 (C(O)N), 52.36 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)), 51.5 (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)), 49.7 и 49.0 (NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 36.97 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)), 33.6 и 32.5 (NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 27.3 и 26.2 ((CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

**Аминоамид (Vb).** К 0.44 г (0.073 ммоль) аминоэфира (**Va**), растворенного в абс. MeOH, прибавляли 780 мкл (11.7 ммоль) EDA. Реакционную смесь перемешивали 48 ч при 20°C, упаривали, следы EDA удаляли в вакууме упариванием с водой (2 × 20 мл). Остаток очищали гель-фильтрацией на TSK HW-40F (2.5 × 90 см) в 0.5% водном растворе аммиака и последующей рехроматографией в том же растворителе на TSK HW-50F (2.5 × 90 см). Фракции, содержащие аминоамид (**Vb**), концентрировали и высушивали в вакууме. Получали 0.38 г (74%) соединения (**Vb**), светло-желтое масло,  $R_f$  0.45 (MeOH-25% водн. раствор аммиака, 3 : 2). <sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 176.8 и 176.2 (C=O), 52.1, 51.2 и 49.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 49.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)), 40.8 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 40.4 (C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 39.2 и 37.6 (C(O)NHCH<sub>2</sub>), 33.6 и 33.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH).

**“РАМАМ-полимер” (VIb).** К раствору 200 мг (0.033 ммоль) аминоэфира (**Va**) в 0.5 мл MeOH прибавляли 58 мкл (0.88 ммоль) EDA. Через 1 сут реакционную смесь упаривали, следы EDA удаля-

ли в вакууме упариванием с водой ( $2 \times 20$  мл). Остаток очищали гель-фильтрацией на TSK HW-55F ( $2.5 \times 90$  см). Фракции, соответствующие удерживаемому объему  $\sim 130$  мл, концентрировали и лиофилизовали. Получали 8 мг (8%) соединения (VIIb).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3.35 и 3.17 (ущ. м,  $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$ ), 2.83 (ущ. м,  $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH} + + \text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2.63 (ущ. м,  $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.45 (ущ. м,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{N}$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 176.9 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 53.9 ( $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 52.4 и 51.5 ( $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 42.0 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 39.2 ( $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$ ), 35.1 ( $(\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ).

**(3-Аминопропил)-3-O- $\alpha$ -D-галактопиранозил- $\beta$ -D-галактопиранозид** (VII) получали с выходом 62% по модифицированному методу [21] с использованием в качестве промотора  $\text{AgOSO}_2\text{CF}_3$ . Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 1.97 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.09 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.65 (дд, 1H, H2, Gal $\beta$ ), 3.80 (м, OCH'), 3.86 (дд, 1H,  $J_{3,2}$  10, H2, Gal $\alpha$ ), 3.94 (дд, 1H,  $J_{2,3}$  10,  $J_{4,3}$  3.5, H3, Gal $\alpha$ ), 4.01 (ущ. д, 1H, H4, Gal $\alpha$ ), 4.05 (м, 1H, OCH), 4.18 (м, 2H, H4, Gal $\beta$ , H5, Gal $\alpha$ ), 4.47 (д, 1H,  $J_{2,1}$  8, 1H, Gal $\beta$ ), 5.14 (д, 1H,  $J_{2,1}$  4, H1, Gal $\alpha$ ).

**3-[4-Нитрофенокси]карбонилпентаноиламино]пропил-3-O-( $\alpha$ -D-галактопиранозил)- $\beta$ -D-галактопиранозид** (VIII). К раствору дисахарида (VII) (74 мг, 0.19 ммоль) в 0.5 мл DMSO прибавляли при интенсивном перемешивании раствор бис(4-нитрофенил)адипата (287 мг, 0.74 ммоль) в 1.7 мл DMF. Реакционную смесь перемешивали 0.5 ч при 20°C, наносили на колонку, заполненную сепадексом LH-20 ( $1.7 \times 50$  см), и элюировали 50% водн. ацетонитрилом. Концентрированием и лиофилизацией соответствующих фракций получили 90 мг (75%) производного (VIII).  $R_f$  0.67 (изопропанол- $\text{EtOAc}-\text{H}_2\text{O}$ , 4 : 3 : 2).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 8.38, 7.43 (д,  $2 \times 2$  H,  $J$  9.5, 4-нитрофенокси), 5.19 (д, 1H,  $J_{1,2}$  4, H1, Gal $\alpha$ ), 4.48 (д, 1H,  $J_{1,2}$  8, H1, Gal $\beta$ ), 4.23 (ущ. т, 1H, H5, Gal $\alpha$ ), 4.20 (ущ. д, 1H, H4, Gal $\beta$ ), 4.06 (ущ. д, 1H, H4, Gal $\alpha$ ), 4.01 (м, 1H, OCH), 4.00 (дд, 1H, H3, Gal $\alpha$ ), 3.91 (дд, 1H,  $J_{3,2}$  10, H2, Gal $\alpha$ ), 3.78 (м,  $2 \times$  H6, Gal $\alpha$ ), 3.76 (м, 1H, OCH'), 3.69 (т, 1H,  $J_{3,2}$  9, H2, Gal $\beta$ ), 3.36 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.77 (м, 2H,  $\text{NHCOCH}_2$ ), 2.36 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 1.89 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.78 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ ): 171.8 (CO), 171.1 (CO), 155.4 (C4, 4-нитрофенокси), 144.9 (C1, 4-нитрофенокси), 125.2 (C3, C5, 4-нитрофенокси), 123.2 (C2, C6, 4-нитрофенокси), 103.1 (C1, Gal $\beta$ ), 96.2 (C1, Gal $\alpha$ ), 60.3 и 60.2 (C6, Gal), 35.8 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 35.0 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 33.2 ( $\text{NHCOCH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 24.6 и 23.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).

**3-[4-Нитрофенокси]карбонилпентаноиламино]пропил-3-O-(2,3,4,6-тетра-O-ацетил- $\alpha$ -D-галактопиранозил)-2,4,6-три-O-ацетил- $\beta$ -D-галактопиранозид** (IX). Раствор 30 мг (0.046 ммоль) соединения (VIII) в смеси 1 мл  $\text{Ac}_2\text{O}$  и 0.2 мл Py выдерживали 18 ч, удаляли растворитель в вакууме, остатки растворителей удаляли, упаривая с 20 мл толуола. Колончной хроматографией в смеси  $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}$ , 40 : 1 выделяли 34 мг (78%)

производного (IX),  $R_f$  0.53 ( $\text{CHCl}_3$ -изопропанол, 15 : 1).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.22 и 7.25 (д,  $2 \times 2$  H,  $J$  8.9, 4-нитрофенокси), 6.08 (ущ. т, 1H, NHCO), 5.40 и 5.33 (ущ. д, 2  $\times$  1H, H4, Gal $\alpha$  и H4, Gal $\beta$ ), 5.24 (дд, 1H,  $J_{1,2}$  3.5,  $J_{2,3}$  10.5, H2, Gal $\alpha$ ), 5.21 (д, 1H,  $J_{1,2}$  3.5, H1, Gal $\alpha$ ), 5.17 (дд, 1H,  $J_{1,2}$  8,  $J_{3,2}$  10.5, H2, Gal $\beta$ ), 5.11 (дд, 1H,  $J_{3,4}$  3.3, H3, Gal $\alpha$ ), 4.33 (д, 1H,  $J_{1,2}$  8, H1, Gal $\beta$ ), 4.26 (ущ. т, 1H, H5, Gal $\alpha$ ), 4.14 (дд, 1H,  $J_{5,6}$  7, H6, Gal $\alpha$ ), 4.13 (дд, 1H, H6, Gal $\beta$ ), 4.09 (дд, 1H,  $J_{5,6}$  7,  $J_{6,6}$  11, H6', Gal $\beta$ ), 4.01 (дд, 1H,  $J_{5,6}$  6.5,  $J_{6,6}$  11.5, H6', Gal $\alpha$ ), 3.96 (м, 1H, OCH), 3.88 (дд, 1H,  $J_{4,3}$  3.3, H3, Gal $\beta$ ), 3.80 (ущ. т, 1H, H5, Gal $\beta$ ), 3.51 (м, 1H, OCH'), 3.40 и 3.27 (м,  $2 \times$  1H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.60 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.26 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.11, 2.10 (2), 2.02, 2.01, 2.00, 1.91 (с,  $7 \times$  3H, 7 COCH<sub>3</sub>), 1.75 (м, 6H, 3 CH<sub>2</sub>).

**Лиганд (XI).** К раствору 375 мг (0.655 ммоль) полученного по методике [22] Вос-гликозида (X) в 11 мл  $\text{CHCl}_3$  прибавляли 2.5 мл CF<sub>3</sub>COOH, смесь выдерживали 1 ч при 20°C, упаривали с добавлением 5 мл толуола и высушивали в вакууме. Остаток растворяли в 7 мл THF, добавляли раствор бис(4-нитрофенил)адипата (975 мг, 2.5 ммоль) в 14 мл THF и 0.6 мл Et<sub>3</sub>N. Смесь перемешивали 24 ч при 20°C, затем упаривали досуха. Колончной хроматографией на силикагеле (хлороформ-2-пропанол, 20 : 1) выделяли 351 мг (78%) аморфного соединения (XI),  $R_f$  0.6 (хлороформ-метанол, 7 : 1).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.774 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ), 1.843, 1.984, 2.00, 2.100, 2.117 (с,  $5 \times$  3H, 5 Ac), 1.966 (дд, 1H, H3<sub>ax</sub>, Neu5Ac), 2.335 и 2.393 (м,  $2 \times$  1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 2.601 (т, 2H,  $J$  6,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ), 2.604 (дд, 1H, H3<sub>eq</sub>, Neu5Ac), 3.645 (с, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.688 (т, 2H,  $J$  4.7,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 4.049 (ддд, 1H, H5, Neu5Ac), 4.062 (дд, 1H,  $J_{8,9}$  6, H9a, Neu5Ac), 4.074 (д, 2H,  $J_{\text{NH}}$  5.5, COCH<sub>2</sub>NHCO), 4.111 (дд, 1H,  $J_{5,6}$  10.7,  $J_{7,6}$  2.3, H6, Neu5Ac), 4.298 (дд, 1H,  $J_{9b}$  12.5,  $J_{8,9b}$  2.9, H9b, Neu5Ac), 4.343 и 4.722 (д,  $2 \times$  1H, J 12, OCH<sub>2</sub>Ar), 4.839 (ддд, 1H,  $J_{5,4}$  10.2,  $J_{3\text{ax},4}$  12.3,  $J_{3\text{eq},4}$  4.6, H4, Neu5Ac), 5.307 (дд, 1H,  $J_{8,7}$  8.4,  $J_{6,7}$  2.3, H7, Neu5Ac), 5.359 (д, 1H,  $J_5$  9.7, NH), 5.406 (ддд, 1H, H8, Neu5Ac), 6.616 (т, 1H, COCH<sub>2</sub>NHCO), 7.243 и 7.450 (д,  $2 \times$  2H,  $J$  8.5, p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH), 7.221 и 8.208 (д,  $2 \times$  2H,  $J$  9, p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>), 8.586 (с, 1H, NHAr).

**Конъюгат (Ic).** Аликовту раствора, содержащую 0.4 мг (3.4 мкмоль) 1,6-диаминогексана (I) в DMF, прибавляли к раствору 5.1 мг (8.0 мкмоль) активированного эфира (VIII) в 0.1 мл DMF. Через 24 ч реакционную смесь высушивали, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку Lichrosorb RP-8 (4 × 250 мм), элюировали 80% MeCN. Фракции, содержащие гликоконъюгат (Ic), концентрировали и лиофилизовали. Получили 3.1 мг (79%) конъюгата (Ic),  $R_f$  0.50 (MeOH-25% водн. раствор аммиака, 3 : 1) и  $R_f$  0.22 (*n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O, 3 : 1 : 1).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.12 (д, 2H,  $J_{1,2}$  4, H1, Gal $\beta$ ), 4.41 (д, 2H,  $J_{1,2}$  8, H1, Gal $\alpha$ ), 4.20 (ущ. т, 2H, H5, Gal $\alpha$ ), 4.18 (ущ. д, 2H, H4, Gal $\beta$ ), 4.06 (ущ. д, 2H, H4, Gal $\alpha$ ), 3.93 (ущ. т, 4H,

$\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.26 (т, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.15 (уш. м, 4H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.24 (м, 8H,  $\text{NHC(O)CH}_2$ ), 2.16 (т, 4H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.57 (м, 8H,  $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.45 (уш. м, 4H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.27 (уш. м, 8H,  $(\text{CH}_2)_4$ ).

**Конъюгат (IIIc).** К раствору 15 мг (23.1 мкмоль) соединения (VIII) в 150 мкл DMF прибавляли раствор 2.9 мг (5.1 мкмоль) аминоамида (IIb) в 100 мкл DMSO, через 24 ч реакционную смесь высушивали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл воды, наносили на колонку Lichrosorb RP-8 ( $4 \times 250$  мм), элюировали в течение 40 мин градиентом MeCN (5–85%), содержащем 0.01% TFA. Содержащие гликодендример (IIIc) фракции концентрировали и лиофилизовали. Получили 6.7 мг (51%) соединения (IIIc),  $R_f$  0.35 (MeOH–25% водн. раствор аммиака, 3 : 1) и 0.05 ( $n$ -BuOH–AcOH– $\text{H}_2\text{O}$ , 3 : 1 : 1).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.12 (д, 4H,  $J_{1,2}$  4, H1, Gal $\beta$ ), 4.41 (д, 4H,  $J_{1,2}$  8, H1, Gal $\alpha$ ), 4.20 (уш. т, 4H, H5, Gal $\alpha$ ), 3.50 (уш. с, 8H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 3.62–3.4 (м, 24H,  $\text{CH}_2\text{NHC(O)}$ ), 2.71–2.60 (уш. с, 8H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.32–2.15 (уш. с, 16H,  $\text{NHC(O)CH}_2(\text{CH}_2)_3$ ), 1.80 (уш. т, 8H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.62–1.51 (уш. с, 16H,  $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ), 1.27 (уш. м, 4H,  $(\text{CH}_2)_4$ ).

**Конъюгат (IIIc).** а) К раствору 11.2 мг (11.8 мкмоль) эфира (IX) в 150 мкл DMF прибавляли раствор 2.0 мг (1.34 мкмоль) аминоамида (IIIb) в 200 мкл DMSO. Через 24 ч реакционную смесь высушивали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл MeOH и к раствору прибавляли 300 мкл 1 н. водн. раствора NaOH. Через 2 ч реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 1 мл воды, наносили на колонку TSK HW-40F (1/50 см) и элюировали 0.5% водным раствором аммиака. Лиофилизовали фракции, содержащие гликоконъюгат (IIIc). Получили 2.6 мг (35%) конъюгата (IIIc),  $R_f$  0.20 (MeOH–25% водн. раствор аммиака, 2 : 1).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.15 (д, 8H,  $J_{1,2}$  4, H1, Gal $\beta$ ), 4.46 (д, 8H,  $J_{1,2}$  8, H1, Gal $\alpha$ ), 4.18 (м, 16H, H5, Gal $\alpha$  + H4, Gal $\beta$ ), 3.35–3.25 (м, 56H,  $\text{CH}_2\text{NHC(O)}$ ), 2.87–2.80 (т, 24H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.69–2.63 (т, 8H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.44–2.39 (т, 24H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.28–2.20 (32H,  $\text{NHC(O)CH}_2(\text{CH}_2)_3$ ), 1.82 (м, 16H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.62–1.55 (32H,  $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ), 1.40–1.32 (4H,  $(\text{CH}_2)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 103.4 (H1, Gal $\alpha$ ), 96.0 (H1, Gal $\beta$ ), 50.1 (( $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>N), 39.5 и 39.3 (NHCH<sub>2</sub>), 37.1 (( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 36.3 ( $\text{NHC(O)CH}_2(\text{CH}_2)_3$ ), 33.2 (( $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>N), 29.3 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 25.7 ( $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ), 15.4 ( $(\text{CH}_2)_2$ ).

б) К раствору 12.5 мг (19.3 мкмоль) дисахарида (VIII) в 0.4 мл DMSO прибавляли 2.6 мг (1.8 мкмоль) аминоамида (IIIb) в 0.1 мл воды. Через 18 ч реакционную смесь высушивали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку TSK HW-40F (1 × 50 см), элюировали 0.5% водным раствором аммиака. Содержащие

гликоконъюгат (IIIc) фракции концентрировали и остаток лиофилизовали. Получили 7.8 мг (74%) конъюгата (IIIc),  $R_f$  0.22 (MeOH–25% водн. раствор аммиака, 2 : 1).

**Конъюгат (IVc).** К раствору 30.0 мг (46.2 мкмоль) эфира (VIII) в 250 мкл DMF прибавляли раствор 7.2 мг (2.2 мкмоль) PAMAM (IVb) в 50 мкл воды. Через 48 ч реакционную смесь высушивали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку TSK HW-55F (2.5 × 90 см), элюировали 0.5% водным раствором аммиака. Содержащие гликоконъюгат (IVc) фракции концентрировали и остаток лиофилизовали. Получили 24.5 мг (98%) конъюгата (IVc),  $R_f$  0.12 (MeOH–25% водн. раствор аммиака, 2 : 1).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.16 (д, 16H,  $J_{1,2}$  4, H1, Gal $\beta$ ), 4.45 (д, 16H,  $J_{1,2}$  8, H1, Gal $\alpha$ ), 4.19 (м, 32H, H5, Gal $\alpha$  + H4, Gal $\beta$ ), 3.35–3.25 (м, 120H,  $\text{CH}_2\text{NHC(O)}$ ), 2.87–2.76 (т, 56H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.69–2.63 (т, 28H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.48–2.39 (т, 56H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.32–2.20 (уш. с, 64H,  $(\text{NHC(O)CH}_2(\text{CH}_2)_3$ ), 1.90–1.82 (м, 32H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.66–1.53 (уш. с, 64H,  $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 103.4 (H1, Gal $\alpha$ ), 96.0 (H1, Gal $\beta$ ), 50.9 (( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 49.9 ((C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N), 39.4 и 39.3 (NHCH<sub>2</sub>), 37.1 (( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 33.3 ((C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N), 36.1 ( $\text{NHC(O)CH}_2(\text{CH}_2)_3$ ), 29.2 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 25.6 ( $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ).

**Конъюгат (Vc).** К раствору 7.0 мг (10.8 мкмоль) эфира (VIII) в 80 мкл DMF прибавляли раствор 2.1 мг (0.3 мкмоль) аминоамида (Vb) в 10 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ . Через 72 ч реакционную смесь высушивали, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку TSK HW-55F (2.5 × 90 см), элюировали 0.5% водным раствором аммиака. Содержащие гликоконъюгат (Vc) фракции концентрировали и остаток лиофилизовали. Получили 3.2 мг (46%) конъюгата (Vc),  $R_f$  0.08 (MeOH–25% водн. раствор аммиака, 2 : 1).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.14 (д, 32H,  $J_{1,2}$  4, H1, Gal $\beta$ ), 4.43 (д, 32H,  $J_{1,2}$  8, H1, Gal $\alpha$ ), 4.17 (м, 64H, H5, Gal $\alpha$  + H4, Gal $\beta$ ), 3.35–3.25 (м, 248H,  $\text{CH}_2\text{NHC(O)}$ ), 2.87–2.82 (уш. т, 60H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.58–2.53 (уш. т, 28H, C(O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.45–2.40 (уш. т, 60H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.30–2.22 (уш. с, 128H,  $\text{NHC(O)CH}_2(\text{CH}_2)_3$ ), 1.87–1.80 (м, 64H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.68–1.53 (уш. с, 128H,  $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 103.6 (H1, Gal $\alpha$ ), 96.4 (H1, Gal $\beta$ ), 49.9 ((C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N), 39.8 и 37.5 (NHCH<sub>2</sub>), 36.6 (( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 33.3 ((C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N), 26.0 ( $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ).

**Конъюгат (VIIc).** К раствору 20.0 мг (30.8 мкмоль) эфира (VIII) в 100 мкл DMSO прибавляли раствор 6.0 мг (0.42 мкмоль) PAMAM-G4 (VIIb) в 150 мкл смеси  $\text{H}_2\text{O}$  : DMSO (1 : 2). Через 18 ч реакционную смесь высушивали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку TSK HW-55F (2.5 × 90 см), элюировали

0.5% водным раствором аммиака. Содержащие гликоконъюгат (**VIIc**) фракции концентрировали и остаток лиофилизовали. Получили 14.9 мг (76%) конъюгата (**VIIc**).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 5.13 (д, 32H,  $J_{1,2}$  4, H1, Gal $\beta$ ), 4.42 (д, 32H,  $J_{1,2}$  8, H1, Gal $\alpha$ ), 4.17 (м, 64H, H5, Gal $\alpha$ +H4, Gal $\beta$ ), 3.4–3.2 (м, 248H,  $\text{CH}_2\text{NHC(O)}$ ), 3.0–2.8 (уш. т, 60H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.78–2.65 (уш. т, 28H,  $\text{C(O)NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.51–2.35 (уш. т, 60H,  $(\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 2.30–2.15 (уш. с, 128H,  $\text{NHC(O)CH}_2(\text{CH}_2)_3$ ), 1.87–1.80 (м, 64H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.60–1.53 (уш. с, 128H,  $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 176.1, 175.8 и 173.9 ( $\text{C=O}$ ), 102.3 (H1, Gal $\alpha$ ), 94.9 (H1, Gal $\beta$ ), 51.1 и 48.8 ( $(\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 38.2 и 36.8 ( $\text{NHCH}_2$ ), 35.1 ( $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 31.7 ( $(\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 24.5 ( $\text{NHC(O)CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$ ).

**Конъюгат (IVd).** К раствору 20.0 мг (25.0 мкмоль) эфира (**XI**) в 200 мкл DMF прибавляли раствор 4.2 мг (0.3 ммоль) аминоамида (**IVb**) в 10 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ . Через 18 ч реакционную смесь высушивали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл MeOH и к раствору прибавляли 0.5 мл 1 н. водн. раствора NaOH. Через 2 ч полученный раствор упаривали, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку TSK HW-40F (1 × 50 см), соединенную последовательно с колонкой TSK HW-50F (1 × 50 см), элюировали 0.5% водным раствором аммиака. Фракции, содержащие гликоконъюгат (**IVd**), концентрировали и остаток лиофилизовали. Получили 10.5 мг (67%) конъюгата (**IVd**).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.39 (м, 64H, 4-аминофенил), 4.72 и 4.50 (д, 32H,  $J$  12,  $\text{ArCH}_2\text{O}$ ), 4.01 (с, 32H,  $\text{COCH}_2\text{NH}$ ), 3.26 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO(O)}$ ), 3.05 (м, 24H,  $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.97 (м, 24H,  $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.76 (дд, 16H, H-3eq), 2.51 (уш. т, 32H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N}$ ), 2.34 и 2.23 (с, 64H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 2.04 (с, 48H,  $\text{NHC(O)CH}_3$ ), 1.67 (дд, 16H,  $J_{2,3\text{ax}}$  12.5, H3ax), 1.65–1.56 (уш. с, 64H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N}$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 178.2, 177.8, 176.3, 174.6, 174.2 и 171.0 ( $\text{C=O}$ ), 137.7, 135.5, 130.7 и 122.8 (4-аминофенил), 102.2 (C1), 67.7 ( $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 50.3 ( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 49.8 ( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 44.3 ( $\text{C(O)CH}_2\text{NH}$ ), 41.8 (C3), 40.1 и 39.7 ( $\text{C(O)NHCH}_2$ ), 36.7 и 36.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N}$ ), 31.7 ( $(\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 26.0 и 25.8 ( $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2$ ), 23.3 ( $\text{CH}_3\text{C(O)}$ ).

**Конъюгат (Vd).** К раствору эфира (**XI**) (17.5 мг, 19.5 мкмоль, 1.1 экв.) в 200 мкл DMSO прибавляли раствор 3.83 мг (5.5 мкмоль) аминоамида (**Vb**) в 30 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ . Через 24 ч реакционную смесь высушивали в вакууме, остаток растворяли в 1 мл MeOH и к раствору прибавляли 1 мл 1 н. водн. раствора NaOH. Полученный раствор через 2 ч упаривали, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку TSK HW-40F (1 × 50 см), соединенную последовательно с колонкой TSK HW-50F (1 × 50 см), элюировали 0.5% водным раствором аммиака. Содержащие гликоконъюгат (**Vd**) фракции концентрировали и остаток лифи-

лизовали. Получили 8.1 мг (46%) конъюгата (**Vd**).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.39, 7.32 (м, 4-аминофенил), 4.64 и 4.41 (д,  $J$  11.2,  $\text{ArCH}_2\text{O}$ ), 3.95 (уш. с, Gly), 3.79 (м, 9a), 3.75 (м, H5), 3.73 (м, H8), 3.71 и 3.67 (м, H6), 3.63 (м, H7), 3.62 (м, 9b), 3.54 (м, H4), 3.43–3.30 ( $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.20 (уш. с,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ), 3.16–2.75 ( $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.70 (дд, H-3eq), 2.59–2.33 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N}$ ), 2.28–2.21 и 2.18 (уш. с,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 1.98 (с,  $\text{NHC(O)CH}_3$ ), 1.60 (дд, H-3ax), 1.55 (уш. с,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 177.6, 177.5, 177.0, 175.9 и 174.3 ( $\text{C=O}$ ), 137.4, 135.0, 130.4 и 122.4 (4-аминофенил), 101.8 (C2), 73.6 (C6), 72.6 (C8), 69.2 (C7), 69.0 (C4), 67.4 ( $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 63.4 (C9), 52.8 (C5), 50.3 ( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 49.2 ( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 44.3 ( $\text{C(O)CH}_2\text{NH}$ ), 41.4 (C3), 39.7 и 39.3 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 36.3, 36.1 и 35.9 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N} + \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)N}$ ), 31.6 ( $(\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ), 25.7 и 25.4 ( $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 22.9 ( $\text{CH}_3\text{C(O)NH}$ ).

**Полимерный конъюгат (VId).** К раствору эфира (**XI**) (17.1 мг, 19.2 мкмоль) в 200 мкл DMSO прибавляли раствор 3.75 мг (16.0 мкмоль, пересчет на NH<sub>2</sub>-группы) РАМАМ-полимера (**VId**) в 50 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ . Через 48 ч реакционную смесь высушивали в вакууме, остаток суспендировали в 1 мл MeOH и к смеси прибавляли 1 мл 1 н. водн. раствора NaOH. Через 4 ч полученную смесь упаривали, остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку TSK HW-55F (2.5 × 90 см), элюировали 0.5% водным раствором аммиака. Содержащие гликоконъюгат (**VId**) фракции концентрировали и остаток лиофилизовали. Получили 7.4 мг (40%) конъюгата (**VId**). Удерживаемый объем ~125 мл.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 177.6–175.9 и 174.3 ( $\text{C=O}$ ), 137.5, 135.0, 130.5 и 122.1 (4-аминофенил), 101.9 (C2), 73.6 (C6), 53.9 ( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 52.4 и 51.5 ( $\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 42.0 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 39.2 ( $\text{C(O)NHCH}_2$ ), 35.1 ( $(\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ ).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа выполнена при поддержке INTAS (грант № 94-4606, 97-32036), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 00-03-32815a, 99-04-48064) и Фонда содействия отечественной науке.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kiessling L., Pohl N. // Chem. Biol. 1996. V. 3. P. 71–77.
- Zanini D., Roy R. // Carbohydrate Mimics: Concepts and Methods / Ed. Y. Chapleur. Weinheim: Verlag Chemie, 1998.
- Bovin N. // Glycoconjugate J. 1998. V. 15. P. 431–436.
- Newkome G.R., Moorefield C.N., Vogtle F. Dendritic Molecules. Concepts. Syntheses. Perspectives. Weinheim: Verlag Chemie, 1996.
- Esfand R., Tomalia D.A. // Drug Discovery Today. 2001. V. 6. P. 427–436.
- Aoi K., Itoh K., Okada M. // Macromolecules. 1995. V. 28. P. 5391–5393.

7. Lindhorst T.K., Kieburg C. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996. V. 35. P. 1953–1956.
8. Roy R. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996. V. 6. P. 692–702.
9. Ashton R.R., Hounsell E.F., Jayaraman N., Nilsen T.M., Spencer N., Stoddart J.F., Young M. // *J. Org. Chem.* 1998. V. 63. P. 3229–3437.
10. Zanini D., Roy R. // *J. Org. Chem.* 1996. V. 61. P. 7348–7354.
11. Zanini D., Roy R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 2088–2095.
12. Ashton P.R., Boyd S.E., Brown C.L., Jayaraman N., Neogodiev S.A., Stoddart J.F. // *Chem. Eur. J.* 1996. V. 2. P. 1115–1128.
13. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J. // *Macromolecules.* 1986. V. 19. P. 2466–2468.
14. Duncan R., Malik N. // *Proceed. Inter. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1996. V. 23. P. 105.
15. Paul L.C. // *Xenotransplantation* / Eds D.C.C. Cooper, E. Kemp, K. Reemtsma, D.J.G. White. Heidelberg: Springer-Verlag, 1991. P. 47.
16. Byramova N.E., Mochalova L.V., Belyanchikov I.M., Matrosovich M.N., Bovin N.V. // *J. Carbohydr. Chem.* 1991. V. 10. P. 691–700.
17. Tsvetkov D.E., Cheshev P.E., Tuzikov A.B., Pazynina G.V., Bovin N.V., Rieben R., Nifant'ev N.E. // *Mendeleev Commun.* 1999. P. 47–50.
18. Newkome G.R., Weis C.D., Moorefield C.N., Baker G.R., Childs B.J., Epperson J. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1998. V. 37. P. 307–310.
19. Gitsov I., Frechet J.M.J. // *Macromolecules.* 1993. V. 26. P. 6536.
20. Gitsov I., Frechet J.M.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 3785.
21. Корчагина Е.Ю., Бовин Н.В. // *Биоорган. химия.* 1992. Т. 18. С. 283–298.
22. Chinarev A.A., Tuzikov A.B., Gambaryan A.S., Matrosovich M.N., Imbert A., Bovin N.V. // *Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosylation* / Eds Y. Inoue, Y.C. Lee, F.A. Troy II. Osaka: Gakushin Publishing Company, 1999. P. 135–143.
23. HyperChem(TM), Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.
24. Naylor A.M., Goddard III, W.A., Kiefer G.E., Tomalia D.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 2339.
25. Saphire E.O., Parren P.W.H.I., Pantophlet R., Zwick M.B., Morris G.M., Rudd P.M., Dwek R.A., Stanfield R.L., Burton D.R., Wilson I.A. // *Science.* 2001. V. 239. P. 1155.
26. Rieben R., von Allmen E., Korchagina E.Y., Nydegger U.E., Neethling F.A., Kujundžic M., Koren E., Bovin N.V., Cooper D.K.C. // *Xenotransplantation.* 1995. V. 2. P. 98.
27. Rieben R., Bovin N.V., Korchagina E.Y., Oriol R., Nifant'ev N.E., Tsvetkov D.E., Daha M.R., Mohacs P.J., Joziasse D.H. // *Glycobiology.* 2000. V. 10. P. 141–148.
28. Gambaryan A.S., Matrosovich M.N. // *J. Virol. Methods.* 1992. V. 39. P. 111–123.
29. Whilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Nature.* 1981. V. 289. P. 366–373.
30. Cusack S., Ruigrok R.W.H., Krygsman P.C.J., Mellema J.E. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 186. P. 565–582.
31. Sigal G.B., Mammen M., Dahmann G., Whitesides G.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 3789–3800.
32. Purification of Laboratory Chemicals. 3 ed. / Eds D.D. Perrin, W.L. Armarego. New York: Pergamon Press.
33. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир, 1980. Ч. 2. С. 576–606.
34. Bodor N., Gabanyi Z., Wong C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 3783.
35. Gavezotti A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1983. V. 10. P. 5220.

## Neoglycoconjugates Based on Dendrimer Poly(aminoamides)

D. E. Tsvetkov\*, P. E. Cheshev\*, A. B. Tuzikov\*\*, A. A. Chinarev\*\*,  
G. V. Pazynina\*\*, M. A. Sablina\*\*, A. S. Gambaryan\*\*\*,  
N. V. Bovin\*\*, R. Rieben\*\*\*\*, A. S. Shashkov\*, and N. E. Nifant'ev\*\*#

#Phone: +7 (095) 135-8784; e-mail: nen@ioc.ac.ru

\*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 119991 Russia

\*\*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*\*Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides,

Russian Academy of Medical Sciences, Moscow oblast, Russia

\*\*\*\*Department of Cardiology, Bern University Hospital, Bern, Switzerland

Neoglycoconjugates containing 4, 8, 16, 32, and 64 terminal residues of B-disaccharide ( $B_{DI}$ ) or *N*-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac) attached to poly(aminoamide)-type dendrimers (PAMAMs) were synthesized. The ability of  $B_{DI}$  conjugates to bind natural xenoantibodies (anti- $B_{DI}$  antibodies) and the ability of Neu5Ac conjugates to inhibit the hemagglutinin-mediated adhesion of influenza virus were studied. The biological activity of PAMAM conjugates turned out to be higher than that of free carbohydrate ligands, but less than that of multivalent glycoconjugates based on other types of synthetic polymeric carriers. A conformational analysis of PAMAM matrices and resulting conjugates was performed to determine the statistical distances between carbohydrate ligands. The computations revealed the tendency of the PAMAM chains toward compaction and formation of dense globules. The process results in a decrease in the distances between the carbohydrate ligands in the conjugates and, hence, could affect the ability of glycoconjugates to efficiently bind the polyvalent carbohydrate-recognition proteins. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

**Key words:** *B*-disaccharide, dendrimers, influenza virus, *N*-acetylneuraminic acid, neoglycoconjugates, poly(aminoamide), xenoantigen