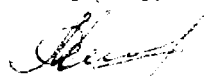


*На правах рукописи*



Ибатуллин Фарид Миникасимович

РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДОВ СИНТЕЗА  
ПРОИЗВОДНЫХ УГЛЕВОДОВ

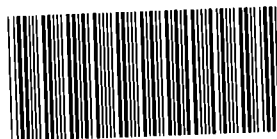
02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

24 МАЙ 2012

Санкт-Петербург  
2012



005044690

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова».

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор  
Шавва Александр Григорьевич.

Официальные оппоненты: Якимович Станислав Иванович, доктор химических наук, старший научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет, ведущий научный сотрудник,

Студенцов Евгений Павлович, кандидат химических наук, доцент, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук  
Институт органической химии  
им. Н. Д. Зелинского РАН (ИОХ РАН).

Защита диссертации состоится 7 июня 2012 г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 212.232.28 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199004, Санкт-Петербург, Средний пр., д. 41/43, химический факультет (БХА).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. А. М. Горького, СПбГУ, Университетская наб., 7/9.

Автореферат разослан 5 июня 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



/А. Ф. Хлебников/

## 1. Общая характеристика работы

### Актуальность исследования

Углеводы играют важную роль в различных биологических процессах – дифференциации и развитии клеток, иммунных реакциях, межклеточном взаимодействии, развитии воспалений, инфекционных процессах, метастазировании и многих других. За последние десятилетия достигнут значительный прогресс в изучении биологических функций углеводов и понимании их участия в развитии некоторых болезней. Имеются практические рекомендации по использованию углеводсодержащих соединений в терапии ряда заболеваний и созданию искусственных вакцин. Однако исследования в этом направлении находятся в начале своего пути.

Для изучения биологических функций углеводов и взаимодействующих с ними белков необходимы разнообразные углеводсодержащие соединения. Поиску и разработке новых методов синтеза именно таких соединений и посвящена данная диссертационная работа.

### Цель исследования

Анализ современной литературы указывает на то, что существует необходимость в разработке простых и эффективных методов синтеза углеводных производных, широко использующихся в синтетической химии для получения самых разнообразных биологически активных углеводсодержащих соединений. Это позволило сформулировать основную цель диссертационной работы: поиск новых путей образования 1-тиосахаров, 1-гликозилазидов, 1,2-*транс*-гликозилхлоридов и *N*-гликозилированных производных аспарагина и разработка практических методов их синтеза; синтез серии  $\beta$ -(1-4)-тиосилоолигосахаридов как потенциальных ингибиторов  $\beta$ -(1-4)-ксилаза для биохимических и структурных исследований данных ферментов.

Для достижения этой цели следовало решить следующие задачи:

- ▷ предложить пути синтеза различных производных 1-тиосахаров, включая алкил-, арил-, трифенилметил-1-тиогликозиды, *S*-ацил-тиоальдозы, а также тиоолигосахаридов из *S*-гликозилотиуриониевых производных с использованием алкиламинов в качестве оснований в безводной среде;
- ▷ разработать метод получения тиоолигосахаридов, содержащих три, четыре или пять моносахаридных остатков с использованием *S*-гликозил-отиуриониевых производных;
- ▷ изучить некоторые реакции 1,2-*транс*-гликозилацетатов с различными реагентами, включая азид натрия, тиомочевину и пентахлорид фосфора;
- ▷ исследовать реакцию гликозилгалогенидов с азидом натрия в растворах органических растворителей, содержащих воду;
- ▷ исследовать реакцию ангидрида *N*-Fmoc-аспарагиновой кислоты с пер-*O*-ацетилированными производными 1-*N*-гликозиламинов и найти условия, способствующие региоселективному протеканию реакции и образованию *N*-гликозилированных производных аспарагина.

### Научная новизна полученных результатов

- Исследовано несколько новых реакций 1,2-транс-гликозилацетатов тиомочевинной, с хлоридом фосфора (V) и с азидом натрия, приводящих к образованию, соответственно, 1,2-транс-S-гликозилотиуруриновых производных, 1,2-транс-гликозилхлоридов и 1,2-транс-гликозилазидов.
- Изучено превращение S-гликозилотиуруриновых производных в S-ацил-тиоальдозы, 1-тиогликозиды и тиоолигосахариды в безводных условиях использованием алкиламинов.
- Синтезирована серия  $\beta$ -(1-4)-тиоксилоолигосахаридов, которые были использованы для биохимических и структурных исследований триксилаза 11-го семейства. С помощью полученных соединений удалось определить параметры связывания указанных ферментов с лигандами различной длины и получить представление о структуре комплекса фермент-ингибитор ксиланазы из *Chaetomium thermophilum*.
- Показано, что гликозилгалогениды гладко реагируют с азидом натрия в водно-ацетоновой среде с образованием гликозилазидов.
- Установлено, что реакция циклического ангидрида N-Фмос-аспарагиновой кислоты с пер-O-ацетилованными 1-N-гликозиламинами диметилсульфоксиде приводит преимущественно к гликозилированным производным N-Фмос-аспарагина.

### Практическая ценность работы

Разработаны новые методы получения нескольких классов углеводных производных, включая:

1. метод получения 1,2-транс-S-гликозилотиуруриновых производных катализируемой эфиром трехфтористого бора реакцией 1,2-транс-гликозилацетатов с тиомочевинной, позволяющий синтезировать целевые соединения непосредственно из ацетилованных сахаров без предварительного превращения их в гликозилгалогениды;
2. методы получения 1,2-транс-гликозилхлоридов катализируемой кислотами Льюиса реакцией 1,2-транс-гликозилацетатов с хлоридом фосфора (V), также реакцией 1,2-транс-гликозилацетатов с хлоридом фосфора (V) ацетонитриле, отличающиеся от уже известных методов простотой, быстротой и доступностью реагентов, отсутствием необходимости работы с высокотоксичным и канцерогенным дихлорметилловым эфиром;
3. метод получения 1,2-транс-гликозилазидов катализируемой эфиром трехфтористого бора реакцией 1,2-транс-гликозилацетатов с азидом натрия в ацетонитриле, позволяющий получать целевые соединения непосредственно из ацетилованных сахаров без использования малодоступного и дорогостоящего триметилсилилазида;
4. метод получения гликозилазидов реакцией гликозилгалогенидов с азидом натрия в водно-ацетоновой среде, позволяющий проводить синтез г...

комнатной температуре без использования высококипящих апротонных биполярных растворителей из легкодоступного азида натрия;

метод синтеза тиогликозидов, тиоолигосахаридов и *S*-ацил-1-тиоальдоз реакцией *S*-гликозиллизотиуриониевых производных с соответствующими алкилирующими или ацилирующими агентами в присутствии триэтиламина в безводной среде, позволяющий получать целевые соединения из легко гидролизующихся алкилгалогенидов и ангидридов карбоновых без необходимости использовать высококипящие апротонные растворители;

метод получения тиогликозидов, тиоолигосахаридов и *S*-ацил-1-тиоальдоз из 1,2-*транс*-гликозилацетатов катализируемой эфиратом трехфтористого бора реакцией с тиомочевинной и последующим алкилированием или ацилированием полученных *in situ* *S*-гликозиллизотиуриониевых производных в присутствии триэтиламина, позволяющий получать целевые соединения без выделения промежуточных продуктов непосредственно из ацетилированных производных сахаров, исключая стадию превращения их в гликозилгалогениды;

метод получения гликозилированных производных *N*-Fmoc-аспарагина реакцией ангидрида *N*-Fmoc-аспарагиновой кислоты с пер-*O*-ацетилированными 1-*N*-гликозиламинами в диметилсульфоксиде, позволяющий легко и быстро получать целевые соединения из аспарагиновой кислоты в три стадии.

**Достоверность и надежность результатов исследования** и обоснованность обобщений и выводов, представленных в диссертации, обеспечивается квалифицированным использованием современных физико-химических методов установления структуры и индивидуальности полученных соединений, обсуждением основных положений работы на научных международных конференциях и их публикацией в международных научных журналах, содержащихся в перечне ВАК РФ.

#### **Личный вклад автора**

Основная часть работы выполнена автором самостоятельно. Она включает в себя непосредственное получение экспериментальных данных, разработку методологии исследования и интерпретации полученных результатов, формулировку цели, задач и выводов данной работы, написание и публикацию статей.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

Новые пути образования 1-тиосахаров, 1-гликозилазидов, 1,2-*транс*-гликозилхлоридов и *N*-гликозилированных производных аспарагина.

Новые методы синтеза 1-тиосахаров, 1-гликозилазидов, 1,2-*транс*-гликозилхлоридов и *N*-гликозилированных производных аспарагина.

Предложенные методы удобны для получения указанных углеводных производных, что было продемонстрировано в том числе на примере синтеза

серии  $\beta$ -(1-4)-тиоксилоолигосахаридов, потенциальных ингибиторов  $\beta$ -(1-4)-ксилааназ.

### Апробация работы

Отдельные материалы работы представлены на 3-й Международной конференции по биоинженерии углеводов (3-d International Carbohydrate Bioengineering Meeting, Newcastle Upon Tyne, Great Britain, April 11–14, 1999) и на 20-м Международном симпозиуме по углеводам (20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg, Germany, August 27 – September 1, 2000)

### Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 статей в международных журналах.

### Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 133 страницах и состоит из обзора литературы, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитированной литературы.

В обзоре литературы рассмотрены наиболее известные методы получения производных углеводов, включая 1-тиосахара, 1-гликозилазиды, 1,2-*транс*-гликозилхлориды и гликозилированные производные аспарагина, о которых идет речь в данной диссертации. В главе «Обсуждение результатов» обоснован выбор подходов и путей решения задач, стоявших перед диссертантом, обсуждены результаты работы.

Диссертация содержит 22 схемы, 18 рисунков и 7 таблиц, список литературы включает 332 наименования.

## 2. Основное содержание работы

### 2.1. Синтез 1-тиосахаров из *S*-гликозиллизотиурониевых производных

Благодаря уникальной реакционной способности тиоэфирной группы 1-тиогликозиды сравнительно легко могут быть превращены в самые различные производные углеводов, что делает их весьма ценными соединениями для химии углеводов. Большая устойчивость тиогликозидов и тиоолигосахаридов к кислотному гидролизу, резистентность к действию ферментов открыли дорогу для широкого применения этих соединений в биохимических и структурных исследованиях важных *O*-гликозил-гидролаз (гликозидаз) и углеводсвязывающих белков.

Алкил- $\beta$ -D-тиогалактозиды как индукторы  $\beta$ -галактозидазы, являющейся продуктом *lacZ* гена лактозного оперона, широко используются в молекулярной биологии для экспрессии и трансформации генов.

Использование неионных детергентов на основе 1-тиогликозидов позволяет выделять и изучать мембранные белки.

*S*-гликозиллизотиуриониевые производные являются удобными предшественниками 1-тиосахаров. Их легко получают из гликозил-галогенидов тиомочевины, их просто трансформировать в тиоальдозы и другие производные 1-тиосахаров. Удается избежать использования высокотоксичных тиолов, имеющих неприятный, труднопереносимый запах.

Синтетические возможности трансформации *S*-гликозиллизотиуриониевых производных были недостаточно изучены. В частности, не было известно, можно ли при получении производных 1-тиосахаров избежать применения водных растворов неорганических оснований, что часто приводит к образованию гетерогенной реакционной среды, препятствующей полноте протекания реакции. Для выяснения этого мы исследовали действие аминов на *S*-гликозиллизотиуриониевые производные. Оказалось, что они способны приводить к трансформации *S*-гликозиллизотиуриониевых производных в 1-тиоальдозы и способствуют алкилированию последних с образованием алкил-1-тиогликозидов. Реакция протекает в гомогенной среде, даже при использовании высоких концентраций реагирующих веществ. Важно, что при применении триалкиламинов в безводных условиях можно использовать чувствительные по отношению к воде ацилирующие и алкилирующие агенты для получения, соответственно, производных ацил-1-тиоальдоз и *S*-трифенилметил-1-тиогликозидов (схема 1). В рамках традиционного подхода это было невозможно.

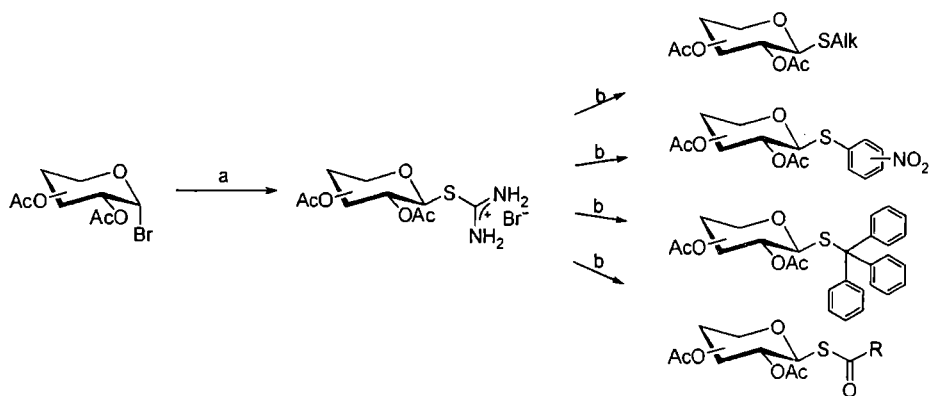


Схема 1. Условия реакции: а)  $\text{SC}(\text{NH}_2)_2 / \text{CH}_3\text{CN}$ , кипячение 5–10 мин; б)  $\text{Et}_3\text{N} / \text{CH}_3\text{CN}$ , алкил- или арилгалогенид, 10–120 мин.

Аналогичным образом *S*-гликозиллизотиуриониевые производные можно превратить в тиодисахариды, что было продемонстрировано на примере получения производных 4-тиолактозы и 4-тиоцеллобиозы (схема 2).

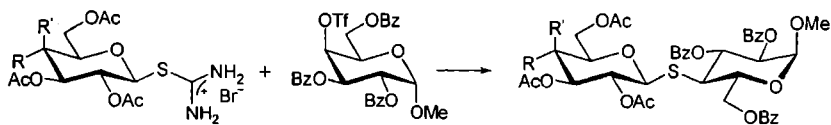


Схема 2. Синтез тиодисахаридов. Условия реакции: а)  $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_3\text{CN}$ , комнатная температура, 60 мин.

Таким образом, прототируемая триэтиламином реакция гликозилотиуриониевых производных с различными алкилирующими и ацилирующими агентами может быть рекомендована как общий метод превращения их в тиогликозиды, тиоолигосахариды и *S*-ацил-1-тиоальдозы. Предлагаемый подход отличается простотой, быстротой и доступностью соответствующих реагентов, а применение высококипящих апротонных биполярных растворителей ограничивается лишь случаями, когда приходится работать с нерастворимыми в ацетонитриле исходными соединениями.

Практическая ценность метода была продемонстрирована на примере синтеза серии (1-4)- $\beta$ -тиоксилоолигосахаридов, которые были использованы для биохимических и структурных исследований нескольких ксиланаз.

## 2.2. Стереоселективный синтез серии (1-4)- $\beta$ -тиоксилоолигосахаридов из *S*-гликозилотиуриониевых производных как потенциальных ингибиторов ксиланаз

К началу данной работы синтез производных 4-тиоксилобиозы и 4,4'-дителиоксилобиозы был описан, но для более детальных исследований эндоксилаз требовались более протяженные молекулы ингибиторов, поскольку ни один из упомянутых тиоолигосахаридов не показал значимой ингибирующей активности.

Мы синтезировали серию тиоксилоолигосахаридов, включая метилгликозиды 4-тиоксилобиозы, 4,4'-дителиоксилотриозы, 4,4',4''-трителиоксилотетраозы и 4,4',4'',4'''-тетраителиоксилопентаозы (рис. 1).

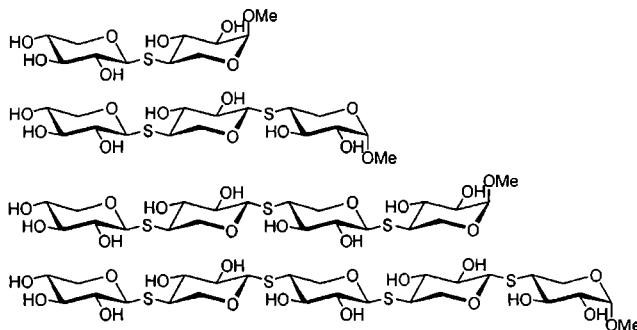


Рис. 1. Тиоксилоолигосахариды – потенциальные ингибиторы (1-4)- $\beta$ -ксилаза



Некоторые из них, как предполагалось, могли представлять собой ингибиторы эндо-ксилаз, что необходимо для биохимических и структурных исследований данных ферментов

Тиоксилоолигосахариды были получены из *S*-гликозиллизотиуриониевых предшественников разработанным методом под действием триэтиламина.

В качестве ключевого соединения использовали производное 1.

Синтез осуществляли последовательным наращиванием цепи с восстановления конца (схема 3).

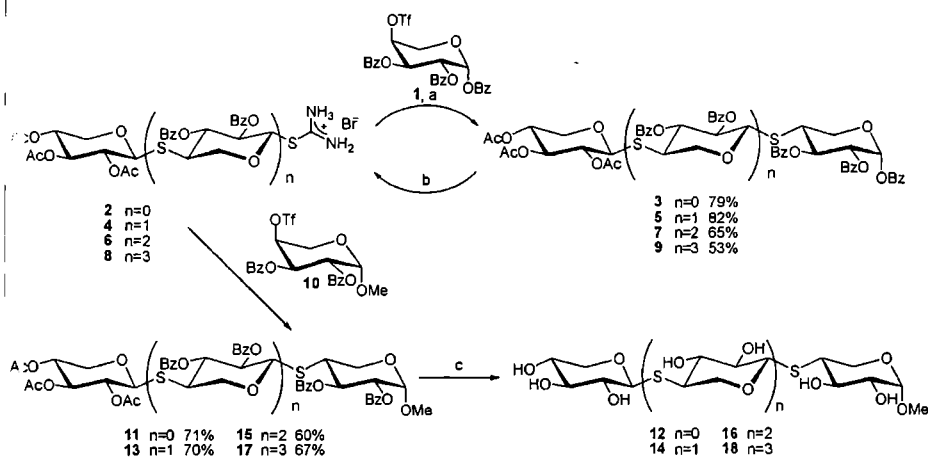


Схема 3. Синтез тиоксилоолигосахаридов. Условия реакций: а)  $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_3\text{CN}$  или  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{DMF}$ , 20 °С, 60 мин; б) *i*:  $\text{HBr}/\text{AcOH}$ , 20 °С, 15 мин; *ii*:  $\text{SC}(\text{NH}_2)_2/\text{CH}_3\text{CN}$ , кипячение, 10 мин; с)  $\text{NaOMe}/\text{MeOH}$ , 20 °С, в течение ночи.

В качестве примера приводим промотируемую триэтиламином реакцию бромида 2,3,4-три-*O*-ацетил- $\beta$ -D-ксилопиранозилизотиуриония (2) с трифлатом 1, приводящую к дисахариду 3 с 79%-м выходом. Соединение 3 превратили в гликозилбромид 15-минутной обработкой 33%-м раствором бромистого водорода в уксусной кислоте. Пятнадцатиминутное кипячение полученного бромида и тиомочевины в ацетонитриле привело к изотиурионий бромиду 4, конденсация которого с 20%-м избытком трифлата 1 дала ацилированный дитиотрисахарид 5, выход 82 %. Трисахарид превратили в изотиуриониевое производное 6, следуя той же последовательности реакций описанной для дисахаридов 4, и, после реакции с трифлатом 1 (30%-й избыток), получили ацилированный тритиотетрасахарид 7 с 65%-м выходом.

Из-за низкой растворимости соединения 6 в ацетонитриле реакцию проводили в смеси ацетонитрил-диметилформамид. Для уменьшения окисления 1-тиоальдозы в дисульфид добавляли один эквивалент дитиотрейтола.

Конверсия **7** в производное изотиомочевины **8** и последующая реакция трифлатом **1** в ДМФ/ацетонитриле привела к получению производной тетрагидроксилопентаозы **9** с 53%-м выходом.

Подобным образом из интермедиатов **2**, **4**, **6** и **8** и метил-2,3-ди-*O*-беозоил-4-*O*-трифторметансульфонил-β-*L*-арабинопиранозида **10** получили метилгликозиды **11**, **13**, **15** и **17** с выходами, соответственно, 71, 70, 60 и 67 % (пересчете на **2**, **4**, **6** и **8**). Удаление защитных групп под действием метилата натрия в метаноле привело к образованию тиоксилолигосахаридов **12**, **14**, **16** и **18**.

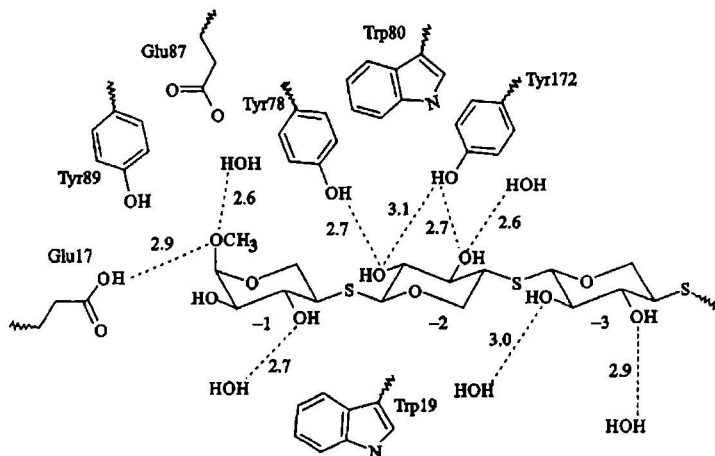
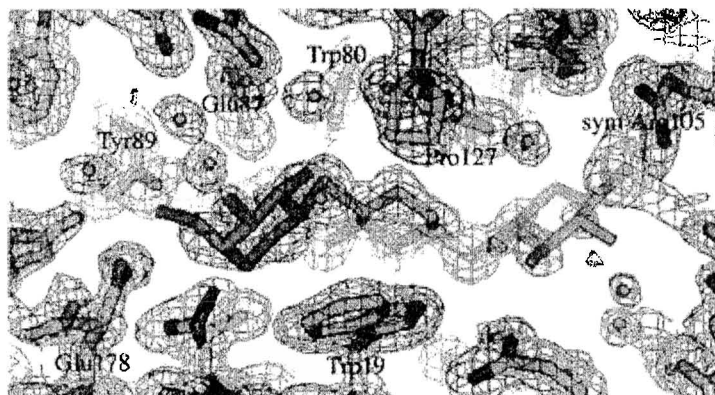


Рис. 2. Карта  $2F_o - F_c$  электронной плотности активного центра СТХ с S-Xyl15-Me. Молекулы воды изображены в виде красных сфер. Снизу схематически изображены взаимодействия СТХ с молекулой ингибитора S-Xyl15-Me

Полученные тиоолигосахариды использовались в качестве лигандов для изучения нековалентного связывания с тремя эндо-1,4-β-ксилазами семейства 11, включая ксиланазы TRX I и TRX II из *Trichoderma reesei* и CTX из *Chaetomium thermophilum* методом ионно-циклотронно-резонансной масс-спектрометрии с Фурье-преобразованием с ионизацией распылением в электрическом поле (ESI FT-ICR MS).

Константы связывания, определенные методом масс-спектрометрии, были в пределах  $10^4$ – $10^3$  M<sup>-1</sup> с понижением в серии пентасахарид > тетрасахарид > трисахарид. Дисахарид не связывался ни с одной из указанных ксиланаз в пределах концентраций от 5 до 200 μM.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа ксиланазы из *Chaetomium thermophilum* (CTX) синтезированные тиоксилоолигосахариды связываются с активным центром фермента.

В отсутствие криопротектора даже для 4-тиоксидобиозы наблюдалась электронная плотность в субсайтах –1 и –2. В остальных случаях по наблюдаемой электронной плотности установлены положения трех ксилозных остатков, расположенные в субсайтах – 1, – 2 и – 3 (рис. 2).

Ни один из ингибиторов не связывался с агликоновым субсайтом активного центра фермента. Эти результаты подтверждают наблюдения других авторов, полученные в опытах с неактивными мутантными ксиланазами и ксилотетраозой.

Таким образом, разработанный нами метод позволяет получать тиоолигосахариды, которые можно использовать для биохимических и структурных исследований эндо-гликозидаз, что было показано нами на примере трех ксиланаз 11-го семейства. С помощью полученных соединений удалось определить параметры связывания указанных ферментов с лигандами различной длины, установить структуру комплексов ксиланазы из *Chaetomium thermophilum* и показать как тиоксилоолигосахариды связываются с активным центром фермента.

### **2.3. Реакция 1,2-транс-гликозилацетатов с тиомочевинной как новый путь к 1-тиосахарам**

До настоящего исследования был известен лишь один метод синтеза S-гликозилотиомочевин, основанный на реакции тиомочевины с гликозилгалогенидами, которые получают из ацетатов сахаров. Однако известно, что ацетаты сахаров также могут служить гликозилирующими агентами. Несмотря на это, не было предпринято ни одной попытки исследовать возможность гликозилирования тиомочевины гликозилацетатами, что могло бы стать удобным подходом к синтезу S-гликозилотиурониевых производным и, соответственно, к получению 1-тиогликозидов, минуя стадию получения гликозилгалогенидов и использование меркаптанов.

Оказалось, что 1,2-*транс*-гликозилацетаты реагируют с тиомочевинной в присутствии эфирата трехфтористого бора в ацетонитриле с образованием производных *S*-гликозилизотиомочевины. При комнатной температуре такое превращение занимает около 48 ч, при кипячении оно заканчивается за 20 мин (схема 4).

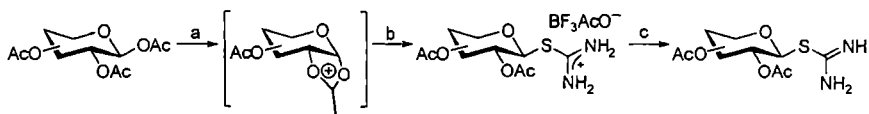


Схема 4. Синтез *S*-гликозилизотиомочевин. Условия реакции: а)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ; б) тиомочевина,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , кипячение, 20 мин; с) пиридин.

Полученные таким образом *S*-гликозилизотиомочевины можно либо выделять из реакционной смеси, либо сразу использовать для синтеза производных 1-тиосахаров, в том числе с помощью разработанного нами способа с применением триэтиламина в качестве основания (схема 5):

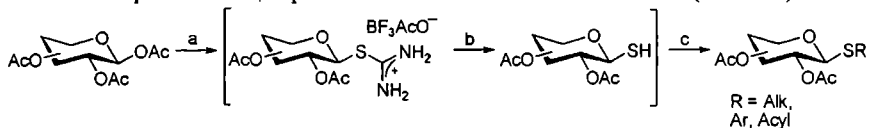


Схема 5. Синтез 1-тиосахаров. Условия реакции: а)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{S} = \text{C}(\text{NH}_2)_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , кипячение, 20 мин.; б)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ; с)  $\text{RX}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 10–120 мин.

Практическая ценность метода была продемонстрирована на примере синтеза ряда тиогликозидов, тиодисахаридов и *S*-ацил-1-тиоальдоз.

Таким образом, катализируемая эфиратом трехфтористого бора реакция 1,2-*транс*-гликозилацетатов с тиомочевинной являет собой новый простой путь к 1,2-*транс*-гликозилизотиомочевинным производным. Она предоставляет очень удобный инструмент для синтеза 1-тиосахаров, включая тиогликозиды, тиоолигосахариды и *S*-ацил-1-тиоальдозы.

#### 2.4. Реакция 1,2-*транс*-гликозилацетатов с хлоридом фосфора (V) как новый путь к 1,2-*транс*-гликозилхлоридам

Ацетилированные 1,2-*транс*-гликозилхлориды являются важными производными для получения 1,2-*цис*-производных сахаров, хотя синтез 1,2-*транс*-гликозилхлоридов не является простой задачей. Каждый из существующих методов их получения имеет свои недостатки, в числе которых можно упомянуть сложность процедуры синтеза, использование высокотоксичных и дорогих реагентов, опасность аномеризации и т. д. Поэтому существовала потребность в простых и эффективных методах получения данных соединений.

Мы исследовали реакции ацелированных производных сахаров с различными донорами хлорид-ионов и обнаружили, что в присутствии кислот Льюиса в хлористом метиле 1,2-*транс*-гликозилацетаты легко вступают в реакцию с хлоридом фосфора (V) с образованием 1,2-*транс*-гликозилхлоридов. Превращение протекает гладко даже при комнатной температуре, требуя лишь следовых количеств катализатора, и завершается не более чем за 15 мин (схема 6).

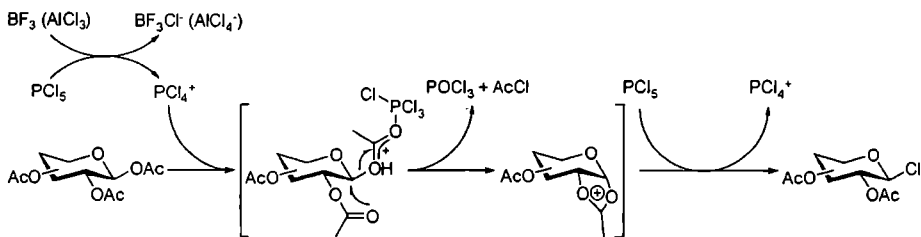


Схема 6. Предполагаемый механизм галогенирования гликозилацетатов пентахлоридом фосфора.

Вероятно, в ходе реакции первоначально образуются тетрахлорфосфониевые ионы ( $\text{PCl}_4^+$ ). Эти ионы далее атакуют карбонильные атомы кислорода ацетоксигруппы гликозидного центра, приводя к образованию хлорокиси фосфора, хлористого ацетила и 1,2-ацилосониевого иона (схема 6).

Свидетельством в пользу данного предположения может служить тот факт, что в ацетонитриле, в котором  $\text{PCl}_5$  почти нацело диссоциирован на ионы  $\text{PCl}_4^+$  и  $\text{PCl}_6^-$ , данная реакция протекает так же быстро и без участия катализаторов. На полную конверсию в 1,2-*транс*-гликозилхлориды требуется менее 15 мин. Это позволило предложить еще один метод синтеза целевых соединений без использования кислот Льюиса.

В обоих случаях, для полноты протекания реакции необходим лишь небольшой (10–15 %) избыток хлорида фосфора (V).

На основе этих наблюдений было разработано два простых метода получения гликозилхлоридов нестабильного ряда, первый из которых основан на катализируемой эфиром трехфтористого бора реакции 1,2-*транс*-гликозилацетатов с пятихлористым фосфором в хлористом метиле, второй – на реакции в ацетонитриле без использования катализатора.

Оба метода позволяют быстро и с высоким выходом получать желаемые 1,2-*транс*-гликозилхлориды, делая их даже более доступными, чем 1,2-*цис*-гликозилгалогениды.

Практическая ценность методов была продемонстрирована на примере синтеза нескольких ацелированных 1,2-*транс*-хлоридов моно- и олигосахаридов.

## 2.5. Реакция 1,2-*транс*-гликозилацетатов с азидом натрия. Новый подход к синтезу гликозилазидов из 1,2-*транс*-гликозилацетатов

Гликозилазиды принадлежат к важному классу *N*-гликозидов и являются предшественниками *N*-гликозиламинов, *N*-гликозиламинокислот, *N*-гликопептидов и *N*-гликопротеинов. Гликозилазиды применяются в синтезе *N*-гликозилмочевин и гликомиметиков, неионных детергентов на основе *N*-гликозиламинов, а также гликозилтриазолов как потенциальных терапевтических препаратов. Гликозилазиды используются в биохимии в качестве субстратов для ферментативного трансгликозилирования, отличающихся от традиционно применяемых нитрофенил-гликозидов лучшей растворимостью в воде и гораздо большей скоростью протекания реакции. Мы обнаружили, что 1,2-*транс*-гликозилацетаты могут реагировать с азидом натрия в ацетонитриле в присутствии эфира трехфтористого бора, приводя к образованию гликозилазидов (схема 7).

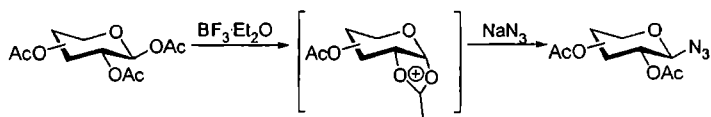


Схема 7. Реакция 1,2-*транс*-гликозилацетатов с азидом натрия.

При комнатной температуре конверсия занимает от 24 до 48 ч, при кипячении почти полное исчезновение исходных ацетатов наступает уже через 30–60 мин. Производные моносахаридов реагируют быстрее и с полной конверсией исходного ацетата, выход целевых соединений высок. Межгликозидные связи остаются незатронутыми, мы показали это на примере синтеза ацетилированных производных  $\beta$ -целлобиозилазида и  $\beta$ -мальтозилазида.

Данная реакция может служить основой нового метода синтеза гликозилазидов из 1,2-*транс*-гликозилацетатов, что было продемонстрировано на целом ряде примеров.

Ограничением метода является невозможность получения 2-ацетиламино-3,4,6-три-*O*-ацетил-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозилазида из соответствующего 1,2-*транс*-гликозилацетата. Однако, поскольку 1,2-*транс*-гликозилацетаты 2-ацетиламино-2-дезоксидсахаров не являются легкодоступными соединениями, для получения соответствующих гликозилазидов был разработан метод, описанный в следующем разделе.

## 2.6. Синтез гликозилазидов реакцией гликозилгалогенидов с азидом натрия в водно-ацетоновой среде

Классический метод получения гликозилазидов из гликозилгалогенидов, заключающийся в обработке их азидами металлов в диметилформамиде при нагревании, способен обеспечить лишь умеренные выходы. Метод, основанный

в использовании катализаторов фазового переноса, более эффективен, но требует использования до пяти эквивалентов азид натрия. Азид 1,1,3,3-тетраметилгуанидиния, предложенный ранее в качестве эффективного реагента для превращения гликозилгалогенидов в гликозилазиды, не является коммерчески доступным реагентом и не может конкурировать в этом отношении азидом натрия.

Мы установили, что гликозилгалогениды гладко реагируют с азидом натрия в одном ацетоне или ацетонитриле, приводя к образованию гликозилазидов с хорошими выходами. Превращение протекает с полной инверсией конфигурации гликозидного атома углерода при комнатной температуре, время реакции не превышает 3 ч (схема 8).

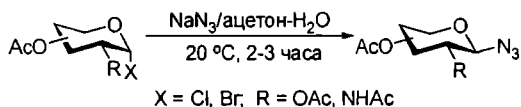


Схема 8. Синтез гликозилазидов из гликозилгалогенидов.

Присутствие воды в реакционной среде является определяющим фактором для протекания реакции, без нее реакция не идет. Мы обнаружили лишь следы гликозилазида после нескольких часов кипячения ацетобромглюкозы с азидом натрия в сухом ацетонитриле. После добавления воды реакция закончилась за 2 ч при комнатной температуре.

Причина, по которой вода облегчает превращение, кроется, вероятно, в слабой растворимости азид натрия в органических растворителях, включая диметилформамид. Вода не только растворяет азид натрия, но и способствует его диссоциации, приводя к образованию азид-иона, который и взаимодействует с гликозилгалогенидом, образуя гликозил. При проведении реакции в присутствии одного эквивалента дибензо-18-краун-6 эфира в сухом ацетонитриле при комнатной температуре полная конверсия в гликозилазиды происходит почти за то же время, что и в водно-органической среде, что подтверждает сказанное выше.

Реакция может служить в качестве простого метода синтеза гликозилазидов из гликозилгалогенидов, в котором используются только доступные и недорогие реагенты. Метод не требует применения высококипящих апротонных растворителей и нагревания.

Синтезированные этими методами гликозилазиды были использованы для получения производных N-гликозиласпарагина, речь о которых пойдет в следующем разделе.

## 2.7. Реакция ангидрида *N*-Fmoc-аспарагиновой кислоты с производными гликозиламинов – простой путь к *N*-гликозиласпарагинам

Ключевым структурным фрагментом *N*-гликопротеинов является остаток *N*-ацетилглюкозаминил( $\beta$ 1-*N*)аспарагина. Реже встречаются гликопротеины, в которых связь с аспарагином осуществляется через остаток  $\alpha$ - или  $\beta$ -D-глюкозы,  $\beta$ -*N*-ацетилгалактозы и L-рамнозы.

Наиболее удобная стратегия получения *N*-гликопротеинов и *N*-гликопептидов основана на химико-ферментативном подходе, включающем ферментативное трансгликозилирование или перенос углеводных цепей (гликанов) на синтетический полипептид, имеющий один или несколько остатков *N*-ацетилглюкозамина. Необходимый для этого *N*-ацетилглюкозаминил-полипептид получают чаще всего твердофазным пептидным синтезом с использованием гликозилированных производных *N*-Fmoc-аспарагина. Получение данных соединений связано с необходимостью использования производных аспарагиновой кислоты, защищенных по amino- и  $\alpha$ -карбоксильным группам, синтез которых является наиболее трудоемкой частью работы. Так, для приготовления наиболее часто используемого предшественника производных *N*-гликозиласпарагина, 1-трет-бутил-*N*-Fmoc-L-аспартата, исходя из аспарагиновой кислоты, необходимо пять стадий. Еще три стадии требуются на активацию  $\beta$ -карбоксильной группы, гликозилирование и удаление защитной группы с  $\alpha$ -карбоксильной группы полученного эфира *N*-гликозиласпарагина для последующего введения полученной гликозиламиноокислоты в (глико)пептидную цепь.

В противоположность этому, *N*-защищенные циклические ангидриды аспарагиновой кислоты можно получить из свободной кислоты в две стадии. По разработанному нами методу ангидрид *N*-Fmoc-аспарагиновой кислоты получается кратковременным нагреванием *N*-Fmoc-аспарагиновой кислоты с избытком уксусного ангидрида (схема 9). Продукт кристаллизуется из реакционной смеси при охлаждении, дополнительной очистки не требуется.

Данный ангидрид является мощным ацилирующим агентом, легко реагирующим с аминами, приводя к образованию производных аспарагина и изоаспарагина. Дополнительных стадий активации, введения и удаления защитных групп не требуется.

Мы исследовали реакцию данного ангидрида с пер-*O*-ацетилированными гликозиламинами и обнаружили, что региоселективность аминолита ангидрида *N*-Fmoc-аспарагиновой кислоты ацетилированными гликозиламинами сильно зависит от полярности реакционной среды.

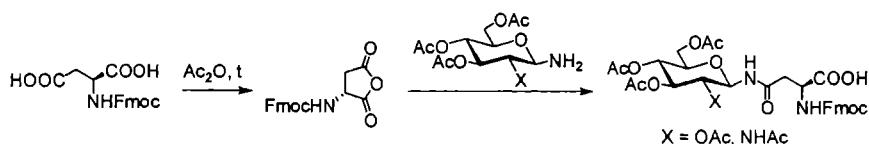


Схема 9. Синтез гликозилированных производных *N*-Fmoc-аспарагина.



В малополярных растворителях главным продуктом является изоаспарагиновое производное. При увеличении полярности растворителя выход аспарагинового производного увеличивается. Самый высокий выход целевого продукта получен при проведении реакции в диметилсульфоксиде. Реакция протекает гладко и завершается обычно менее чем за 1 ч.

Для демонстрации практической пригодности данного подхода были синтезированы *N*-Fmoc-аспарагиновые производные глюкозы, 2-дезоксид-2-*N*-ацетилглюкозамина, целлобиозы и мальтозы. Методом ЯМР показано, что реакция протекает практически без рацемизации.

Синтезированные производные используются в Петербургском институте ядерной физики им. Б. П. Константинова для синтеза биоактивных гликопептидов.

### 3. Выводы

1. Реакция 1,2-*транс*-гликозилацетатов с тиомочевинной в присутствии эфирата трехфтористого бора приводит к образованию 1,2-*транс*-*S*-гликозилнотиоурониевых производных и может использоваться для конверсии 1,2-*транс*-гликозилацетатов в различные 1-тиосахара.
2. Катализируемая кислотами Льюиса реакция 1,2-*транс*-гликозилацетатов с хлоридом фосфора (V), а также некатализируемая реакция этих же реагентов в ацетонитриле могут служить в качестве простых и удобных методов получения 1,2-*транс*-гликозилхлоридов.
3. Катализируемая эфиратом трехфтористого бора реакция 1,2-*транс*-гликозилацетатов с азидом натрия приводит к образованию 1,2-*транс*-гликозилазидов и может быть рекомендована для получения последних.
4. Алкиламины промотируют превращение *S*-гликозилнотиоурониевых производных в 1-тиогликозиды, тиоолигосахариды и *S*-ацил-1-тиоальдозы, что показано, в том числе, на примере синтеза серии  $\beta$ -(1-4)-тиоксил-олигосахаридов, потенциальных ингибиторов эндо-ксилаза.
5. Реакция гликозилгалогенидов с азидом натрия в водно-ацетоновой среде гладко протекает при комнатной температуре и может служить удобным методом получения гликозилазидов.
6. Реакция ангидрида *N*-Fmoc-аспарагиновой кислоты с пер-*O*-ацетилированными 1-*N*-гликозиламинами в диметилсульфоксиде протекает региоселективно и может служить в качестве простого метода получения гликозиллированных производных *N*-Fmoc-аспарагина.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:**

1. **Ibatullin F. M., Utille J.-P., Cottaz S., Mori H., Svensson B., Driguez H.** 4-Thiomaltooligosaccharides: Their Synthesis and Use as Inhibitors for Barley  $\alpha$ -Amylase 1 and 2 // 3-d International Carbohydrate Bioengineering Meeting. Newcastle Upon Tyne, Great Britain, April 11–14, 1999. P. 1.1.
2. **Ibatullin F. M., Firsov L. M., Fessner W.-D.** Synthesis of Some Thio Linked Analogues of 5'a-Carbamaltose and 5"a-Carbamaltotriose as Potential Inhibitors for Glucoamylases // 20th International Carbohydrate Symposium. Hamburg, Germany, August 27 – September 1, 2000. Poster B-342, Abstracts. P. 229.
3. **Ivanen D. R., Shabalin K. A., Ibatullin F. M.** A Novel Convenient Approach for Synthesis of Thiooligosaccharides. Synthesis of a Series of Thioxylooligosaccharides as Potential Inhibitors for Xylanases // 20th International Carbohydrate Symposium. Hamburg, Germany, August 27 – September 1, 2000. Poster B-352, Abstracts. P. 234.
4. **Ibatullin F. M., Shabalin K. A.** A New Approach to Synthesis of Glycosyl Azides from 1,2-*Trans*-Glycosyl Esters // Carbohydrate Letters. 2000. V. 3, No. 6. P. 427–429.
5. **Ibatullin F. M., Shabalin K. A.** A Simple and Convenient Synthesis of Glycosyl Azides // Synthetic Communications. 2000. V. 30, No. 15. P. 2818–2823.
6. **Ibatullin F. M., Selivanov S. I., Shavva A. G.** A General Procedure for Conversion of *S*-Glycosyl Isothiourea Derivatives into Thioglycosides, Thiooligosaccharides and Glycosyl Thioesters // Synthesis. 2001. V. 2001, No. 3. P. 419–422.
7. **Ibatullin F. M., Shabalin K. A., Jänis J. V., Selivanov S. I.** Stereoselective Synthesis of Thioxylooligosaccharides from *S*-Glycosyl Isothiourea Precursors // Tetrahedron Letters. 2001. V. 42, No. 27. P. 4565–4567.
8. **Ibatullin F. M., Selivanov S. I.** Reaction of 1,2-*Trans*-Glycosyl Esters with Phosphorus Pentachloride: New Efficient Approach to 1,2-*Trans*-Glycosyl Chlorides // Tetrahedron Letters. 2002. V. 43, No. 52. P. 9577–9580.
9. **Ibatullin F. M., Shabalin K. A., Jänis J. V., Shavva A. G.** Reaction of 1,2-*Trans*-Glycosyl Acetates with Thiourea: a New Entry to 1-Thiosugars // Tetrahedron Letters. 2003. V. 44, No. 43. P. 7961–7964.
10. **Jänis J. V., Hakanpää J., Hakulinen N., Ibatullin F. M., Hoxha A., Derrick P. J., Rouvinen J., Vainiotalo P.** Determination of Thioxylo-Oligosaccharide Binding to Family 11 Xylanases Using Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and X-Ray Crystallography // FEBS Journal. 2005. V. 272, No. 9. P. 2317–2333.
11. **Ibatullin F. M., Selivanov S. I.** Reaction of *N*-Fmoc Aspartic Anhydride with Glycosylamines: a Simple Entry to *N*-Glycosyl Asparagines // Tetrahedron Letters. 2009. V. 50, No. 46. P. 6351–6354.

Отпечатано в типографии ФГБУ «ПИАФ»

188300, Гатчина Ленинградской обл., Орлова роща  
Зак. 107, тир. 100, уч.-изд. л. 1; 27.04.2012 г.